



11281



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

INSTITUTO DE QUÍMICA

**Caracterización molecular de alergenios de
Hevea brasiliensis.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

P R E S E N T A:

César Augusto Sandino Reyes López.

DIRECTOR DE TESIS:

DRA. ADELA RODRIGUEZ ROMERO



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Agradecimientos

Académicos:

Quiero agradecer a todas las personas que me impulsaron y apoyaron durante el desarrollo de este proyecto:

A la Dra. Adela Rodríguez Romero que me permitió trabajar en este proyecto y que siempre tuvo el tiempo y la paciencia para enseñarme y apoyarme en todo momento.

Al Dr. Federico Martínez y al Dr. Edgar Zenteno, miembros de mi comité tutorial, por su apoyo y dirección durante todo el desarrollo de esta tesis.

Al Dr. Andrés Hernández Arana, por su invaluable apoyo y valiosos comentarios en diversas etapas del proyecto.

Al Dr. Guillermo Mendoza por su valioso apoyo durante el proyecto.

A la Dra. Alejandra Hernández por su ayuda, enorme y desinteresada, para el desarrollo de la presente tesis.

A todos los miembros del jurado de examen por los comentarios y precisiones para el mejoramiento de la presentación de los resultados del proyecto.

Personales:

A mi madre que en todo momento me ha motivado y apoyado para lograr todas mis metas.

A mi esposa Laura, por el apoyo sincero e incondicional que me ha brindado siempre en lo académico y en lo personal, GRACIAS.

A mis hijos, mi motivación para seguir adelante.

A mis hermanos y sobrina por su apoyo y comprensión.

A mi suegra Salomé por su invaluable apoyo.

A Rubén y Luz María por su amistad y apoyo.

A Juan Pablo y David por su ayuda y amistad.

Al CONACyT por los apoyos: beca doctoral No. 158401 y Proyecto 32417-E.

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
SUMMARY.....	3
INTRODUCCIÓN.....	5
La hipersensibilidad.....	5
Funciones de los alergenos de naturaleza proteica.....	6
Características moleculares de los alergenos.....	8
Alergenos del látex del árbol <i>Hevea brasiliensis</i>	9
OBJETIVOS.....	15
Objetivo general.....	15
Objetivos particulares.....	15
METODOLOGÍA.....	16
Purificación del Hev b 6.02 y su isoforma.....	16
Electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) en condiciones nativas.....	16
Estructura primaria de la isoforma del Hev b 6.02.....	17
Modificación química del Hev b 6.02.....	18
Caracterización espectroscópica de la isoforma del Hev b 6.02.....	19
Caracterización de los parámetros termodinámicos de unión de la isoforma a quitotriosa por calorimetría de titulación isotérmica.....	20
Pruebas inmunológicas a voluntarios del INP.....	21
Inhibición de la unión de IgE por inmunoensayo acoplado a enzima (ELISA).....	21
Cristalización y resolución de la estructura tridimensional del Hev b 6.02...	23
Cristalización y colección de datos de difracción del Hev b 6.02.....	23
Reemplazo molecular y afinamiento del Hev b 6.02.....	23
Cristalización y colección de datos de la isoforma del Hev b 6.02.....	24
Resolución de la estructura y afinamiento de la isoforma del Hev b 6.02....	25
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	26
Purificación del Hev b 6.02 y su isoforma.....	26

Caracterización espectroscópica de la isoforma del Hev b 6.02.....	28
Caracterización de los parámetros termodinámicos de unión de la isoforma a quitotriosa por calorimetría de titulación isotérmica.....	29
Secuencia la isoforma del Hev b 6.02.....	30
Modificación química del Hev b 6.02.....	32
Pruebas inmunológicas.....	35
Inhibición de la unión de IgE por ELISA.....	37
Cristalización y resolución de la estructura tridimensional del Hev b 6.02...	39
Resolución de la estructura y afinamiento del Hev b 6.02 y de la isoforma..	39
Cristalización y resolución de la estructura tridimensional de la isoforma del Hev b 6.02.....	41
Resolución de la estructura y afinamiento de la isoforma del Hev b 6.02....	44
Análisis y comparación de las estructuras del Hev b 6.02 y su isoforma.....	45
Dimensión del epítopo conformacional del Hev b 6.02.....	51
¿Existe un motivo estructural que sea el responsable de que una proteína sea alérgica?.....	52
CONCLUSIONES.....	55
BIBLIOGRAFÍA.....	56
ANEXO.....	61

RESUMEN

Las reacciones de hipersensibilidad son una respuesta inmunitaria inapropiada provocada por moléculas comúnmente inocuas para el organismo. Estas reacciones son desarrolladas principalmente por personas con predisposición genética. Se han descrito cuatro tipos de hipersensibilidad denominadas de la I a la IV dependiendo del mecanismo de acción que provoca daño al organismo.

La hipersensibilidad de tipo I es desencadenada por moléculas de naturaleza proteica (alergenos) al ser reconocidas por las IgE acopladas a receptores de alta afinidad localizados en la membrana de células cebadas y basófilos. Los alergenos provienen de fuentes diversas como animales, insectos y plantas.

El látex del árbol del hule *Hevea brasiliensis* es una fuente importante de alergenos que afecta principalmente a las personas que cotidianamente tienen contacto con productos elaborados del látex. Se han descrito a 17 alergenos como los principales responsables de la sensibilización de personas alérgicas a este material.

El Hev b 6.02 es uno de los alergenos más importantes en el látex, afecta principalmente a los trabajadores del área de la salud y a niños que sufren de múltiples cirugías. Ésta molécula es una proteína de 43 residuos de aminoácido y podría ser producida por la planta como mecanismo de defensa en contra de hongos, ya que se ha comprobado que puede unirse a oligómeros de N-acetilglucosamina e inhibir, *in vitro*, el crecimiento de hongos.

En esta tesis describimos la caracterización inmunológica y estructural de un epítoto del Hev b 6.02, que es reconocido por las IgE de personas alérgicas al látex. La identificación de los residuos de aminoácido más importantes en la unión con las IgE se realizó modificando químicamente a los dos triptofanos de ésta molécula y realizando una caracterización estructural e inmunológica de una forma molecular del Hev b 6.02 que sólo difiere en una posición en la secuencia de aminoácidos (Asn14Asp).

Los resultados obtenidos nos muestran que los triptofanos del Hev b 6.02 son responsables del 75% de la afinidad de unión a los anticuerpos y que la Asn14 contribuye en un 25% en esta unión. Estructuralmente ambas moléculas son muy similares, pero se encontraron diferencias en el potencial electrostático principalmente en la zona en donde están ubicados los triptofanos. La dimensión del epítoto propuesto es muy similar al del Bet v 1, reconocido por un anticuerpo monoclonal.

Estos resultados contribuyen a la comprensión del desarrollo de la alergia y son útiles para el diseño de moléculas que puedan ser empleadas en el tratamiento de personas alérgicas al látex.

SUMMARY

Hypersensitivity reactions are inappropriate immune responses produced by otherwise innocuous molecules to organism. These reactions are developed predominantly by people with genetic predisposition. Four hypersensitivity types have been described and denominated I to IV, which depend on the mechanism that produce damage to the organism. Type I hypersensitivity is triggered by proteic molecules (allergens) when they are recognized by IgE complexes with high-affinity receptors on mast and basophilic cells membranes. Animals, insects and plants are some of the main sources of allergens.

Rubber tree latex from *Hevea brasiliensis* is an important source of allergens, which mainly affect people that have frequent contact with latex elaborated products. Seventeen allergens have been described as mostly responsible for sensibility of allergic people to this material.

Hev b 6.02 is a major latex allergen, which mainly affects health-care workers and children that have suffered multiple surgeries. This molecule is a protein with 43 amino acids and is possibly produced by plants as a defense mechanism against fungi, since it binds N-acetylglucosamine oligomers and inhibits, *in vitro*, the fungi growth.

This thesis describes the immunological and structural characterization of a Hev b 6.02 epitope, which has been recognized by IgE from latex allergic people. Identification of important amino acid residues on the surface of the molecule was achieved by modifying chemically the two tryptophans present in the molecule and by a structural and immunological characterization of one of its molecular forms that differs in only one position in the amino acid sequence (Asn14Asp).

Results show that the tryptophan residues are responsible for about 75% of the binding affinity to antibodies, while the isoform (Asn14Asp) contributes up to 25% in this binding. Structurally both molecules are very similar, but when surface potentials are compared, charge differences are observed near the tryptophans zone, principally. Dimensions of the putative epitope are very similar to the one reported for Bet v 1, an allergen whose structure has been solved in complex with a monoclonal antibody.

These results contribute to the understanding of allergic reactions and are useful for the design of molecules that could be used in latex allergy therapy.

INTRODUCCIÓN

La hipersensibilidad.

El término hipersensibilidad se aplica a las situaciones en las que se produce una respuesta inmune exagerada. Las reacciones de hipersensibilidad son consecuencia de un comportamiento inadecuado de las respuestas inmunitarias, normalmente beneficiosas, que a veces llegan a provocar reacciones inflamatorias y lesiones tisulares. Coombs y Gell (1968)^{1,2} describieron 4 tipos de reacciones de hipersensibilidad denominadas I a IV. Las reacciones de hipersensibilidad tipo I (inmediata), conocidas como alergia, se producen cuando se desencadena una respuesta de inmunoglobulinas de tipo E (IgE) contra agentes ambientales inocuos de tipo proteico, llamados alérgenos. Esto provoca la liberación de mediadores inflamatorios, por parte de los mastocitos (células cebadas) sensibilizados por las IgE produciendo una reacción inflamatoria aguda, que da lugar a patologías como el asma o la rinitis. La hipersensibilidad de tipo II (citotóxica dependiente de anticuerpos) se produce cuando las inmunoglobulinas del tipo G (IgG) se unen a antígenos propios o ajenos situados sobre superficies celulares, con la consiguiente activación de fagocitos, células T asesinas naturales o lisis mediada por complemento. Las reacciones del tipo III ocurren cuando se producen grandes cantidades de complejos inmunes o cuando el sistema retículo-endotelial no es capaz de eliminar los que hay presentes. Finalmente la hipersensibilidad del tipo IV (retardada) ocurre cuando algunos antígenos quedan atrapados en los macrófagos y no pueden ser destruidos, dando lugar a la estimulación de los linfocitos T, que producen citocinas mediadoras de una amplia gama de fenómenos inflamatorios.

Existen estimaciones que indican que alrededor del 25% de la población mundial padece o ha padecido reacciones de hipersensibilidad de tipo I en alguna etapa de su vida. Las personas con una predisposición genética, conocida como atopia, son las que tienen mayor riesgo a sufrir de esta enfermedad.^{3,4} Este padecimiento comienza con una sensibilización previa durante los primeros años de vida o durante períodos de exposición prolongados con las diferentes fuentes de alérgenos. Si esto ocurre, el contacto con alérgenos para los que previamente una persona ha sido sensibilizada da lugar a la sintomatología clínica de la alergia, que puede ser: rinoconjuntivitis, asma, dermatitis, e incluso llegar a desencadenar en una anafilaxis que provoque la muerte.⁵ Los alérgenos inducen la activación de células efectoras (mastocitos y basófilos) mediante el entrecruzamiento de un receptor de alta afinidad (FcεRI) localizado en la membrana de estas células a través de las IgE.^{6,7} En los mastocitos la activación de este receptor provoca la liberación de histamina, seguida de la síntesis y liberación de prostaglandinas, leucotrienos, citocinas y otros mediadores de la respuesta inflamatoria.

Funciones de los alérgenos de naturaleza proteica.

Los alérgenos proteicos provienen de fuentes muy diversas como las plantas, los insectos o diversos animales.⁸ Estas moléculas cumplen funciones biológicas específicas en los organismos que las producen, pero en el hombre y en algunos animales provocan la producción elevada de IgE. Algunas proteínas alérgicas son producidas por plantas como respuesta a infecciones por hongos o bacterias y en contra de ataques de insectos, por lo que son denominadas proteínas relacionadas con la patogénesis (PR). Los principales alérgenos de este

tipo son las quitinasas de clase I, las β -1,3-glucanasas y las lectinas que se unen a residuos de N-acetil glucosamina de la quitina impidiendo el crecimiento de hongos.⁹

Por otro lado, se han realizado estudios en los que se demuestra que una familia de proteínas de transferencia de lípidos (LTPs), asociadas con la defensa de las plantas, pueden producir reacciones alérgicas en algunas personas. Esta familia está formada de polipéptidos con masas moleculares de alrededor de 9 kDa (90 a 95 residuos de aminoácidos) y se acumulan en la superficie de los órganos de las plantas, están ampliamente distribuidos en el reino vegetal. Esto último provoca que algunos frutos y hojas comestibles contengan a estos alergenicos, lo que expone a una gran cantidad de personas al contacto frecuente con estas moléculas.

Así mismo, se han determinado las funciones biológicas de la mayoría de los alergenicos clínicamente relevantes.¹⁰ Tal es el caso de algunas enzimas que provocan reacciones alérgicas, como son: la proteasa cisteínica del ácaro del polvo (Der p 1) y la lisozima de pollo (Gal d 4). También se han reportado proteínas con funciones estructurales, como la profilina del polen del árbol de *Betula verrucosa* (Bet v 2), la del polen del pasto *Phleum pratense* (Phl p 2) y la del látex de *Hevea brasiliensis* (Hev b 8) y algunas proteínas de reserva como la albúmina de pollo (Gal d 2). De muchos otros alergenicos no se conoce la función que desarrollan en los organismos que los producen. A la fecha no existen evidencias que relacionen la actividad biológica de los alergenicos con la capacidad que tienen estos para provocar la producción elevada de IgE en el organismo.

Características moleculares de los alergen.

Algunos investigadores han analizado las estructuras tridimensionales de ciertos alergen con el objetivo de evidenciar características moleculares comunes que pudieran dar información del por qué algunas proteínas provocan respuestas de hipersensibilidad, así como explicar el fenómeno conocido como alergenidad cruzada. Este término es empleado cuando las IgE específicas de una persona sensible a un alergen pueden unirse a otra proteína molecularmente similar, esto ocasiona una respuesta inflamatoria alérgica, aún cuando sea la primera vez que se tenga contacto con esa molécula.

Los plegamientos de las proteínas alérgicas son muy diversos, algunos de ellos son ricos en hebras β antiparalelas, hélices alfa o bien hojas β asociadas a hélices alfa, etc.¹¹ Estos análisis se han realizado con las escasas estructuras tridimensionales de alergen que se han determinado, ya sea por métodos experimentales como rayos X o resonancia magnética nuclear (RMN) o bien mediante modelos obtenidos *in silico* basados en la similitud de secuencias.

Por otro lado, la reactividad cruzada entre alergen se ha tratado de explicar principalmente en base a la similitud molecular y estructural que pudiera existir entre ellos, lo que daría por resultado que estas proteínas pudieran ser reconocidas por la misma clona de anticuerpos. Existen trabajos en los que se han analizado las estructuras de alergen de fuentes diversas con actividades biológicas homólogas, demostrando que puede presentarse reactividad cruzada entre ellos.¹²⁻¹⁴ No obstante, también se ha observado que el cambio de un solo residuo en algunos alergen, ya sea mediante el uso de técnicas de biología

molecular o bien en formas moleculares naturales, llevan a la pérdida de la capacidad de provocar reacciones inflamatorias alérgicas.¹⁵

Investigaciones recientes han demostrado que la unión de los alérgenos a las IgE se ve afectada por la conformación tridimensional de estos, lo que indica que los epítopos que son reconocidos por estos anticuerpos se forman al plegarse la proteína.^{11,16,17} A estos epítopos se les conoce como conformacionales. La presencia de este tipo de epítopos se ha demostrado en el alérgeno de ácaro del polvo (Der f2), el cual al perder un enlace disulfuro por mutación de un par de aminoácidos, disminuye notablemente su capacidad de unión con las IgE.¹⁸ En otro estudio se reportó que al realizar múltiples mutaciones al alérgeno Api g 1 de la cebada se provocaron cambios importantes a nivel global de la estructura tridimensional, dando por resultado que el reconocimiento de las IgE hacia este alérgeno disminuyera drásticamente.¹⁷

Existen también epítopos formados por residuos de aminoácidos consecutivos en la secuencia de un antígeno, a estos epítopos se les conocen como lineales; sin embargo, no se ha evaluado su relevancia clínica en el caso del reconocimiento por las IgE. No obstante estos estudios, aún no se sabe a ciencia cierta si algunos elementos estructurales son los responsables de la unión con las IgE.

Alérgenos del látex del árbol *Hevea brasiliensis*.

El látex del árbol del hule (*Hevea brasiliensis*) es una fuente muy importante de alérgenos que se han estudiado, a partir de la década pasada, a nivel inmunológico principalmente. El primer reporte de alergia al látex lo realizó Nuter¹⁹

en 1979; sin embargo, fue hasta los años 80's en que se observó un incremento importante en el número de personas alérgicas a productos elaborados con látex. Esto ocurrió por el aumento desmesurado en el uso de guantes de hule cuando se atendían personas heridas o cuando se realizaban exámenes de fluidos corporales, ya que se había descubierto que el VIH podía transmitirse por medio de dichos fluidos.²⁰ Aunado a esto, el uso de condones como medida de prevención al contagio de VIH ha contribuido también al aumento en el número de personas que tienen contacto con productos elaborados con este material.

Por otra parte, el avance en la tecnología de las intervenciones quirúrgicas ha dado lugar al desarrollo de dispositivos elaborados con látex como catéteres, equipos de venoclisis, torniquetes, etc. Recientemente se ha descubierto que los tapones de los viales en los que se almacenan fármacos, los cuales son elaborados con látex, pueden liberar alergenos exponiendo a un gran número de personas al contacto con estas moléculas.²¹ Asimismo, el uso de este polímero en la elaboración de artículos para el hogar como balones, zapatos deportivos, ligas, etc., se ha incrementado aceleradamente en los últimos años. De esta forma las estimaciones más recientes en los E.U. muestran que del 10 al 18% de los trabajadores del área de la salud sufren de alergia al látex. En nuestro país se carece de datos estadísticos sobre la incidencia de alergia al látex; sin embargo, se ha registrado que la producción de guantes de látex en México aumentó de 74.1 millones de pares en 1994 a 113.3 millones de pares en 1998, lo que podría indicar un aumento importante en el número de personas que tienen contacto con alergenos de estos productos.²²⁻²⁴

El látex es el citoplasma de las células laticíferas del árbol del hule, el cual contiene más de 200 proteínas distintas que constituyen alrededor del 1% de dicho material.^{25,26} Del total de proteínas, 17 con masas moleculares que fluctúan entre 4.7 kDa y 57 kDa, son las que se ha reconocido que provocan las respuestas alérgicas, y de las cuales trece tienen asignadas una nomenclatura oficial por el Subcomité de Nomenclatura de Alergenos de la Unión Internacional de Sociedades de Inmunólogos.^{27,28} Los principales alergenos del hule se han denominado como Hev b 1 a Hev b 13 (Tabla I), los que además muestran reactividad cruzada con algunos alergenos de alimentos como el aguacate, el kiwi, el plátano y con algunos aeroalergenos que afectan la mucosa respiratoria, principalmente los derivados de pólenes.²⁹

Por otro lado, en la revisión realizada por Breiteneder y Scheiner en 1998, reportaron que los grupos de pacientes alérgicos al látex son sensibilizados por distintos alergenos. El 81% de los pacientes con espina bífida, que son alérgicos al látex, producen IgE principalmente contra los alergenos Hev b 1 (factor de elongación del hule), el 83% para Hev b 3, el 56% para Hev b 5 y sólo el 27% para Hev b 6.02 (heveína). Por otra parte, el 75% de los pacientes alérgicos al látex que tienen como ocupación la industria y/o centros de salud, desarrollan IgE principalmente contra Hev b 6.02, el 21% para Hev b 6.01 (proheveína), el 23% para Hev b 7 y el 21% para Hev b 2 (β -1,3-glucanasa). Los pacientes con espina bífida no producen IgE para estos dos últimos alergenos.

Los mismos autores reportaron que el 100% de los pacientes alérgicos al látex que padecen de espina bífida desarrollaron IgE para la Hev b 8 (profilina), y el 95% de los trabajadores de la salud también desarrollaron IgE para este

alergeno. Ninguno de los pacientes que presentaban alergia a frutas desarrolló anticuerpos para la profilina del látex.²⁷

Tabla I. Principales alergenios provenientes del látex del árbol de *Hevea brasiliensis*.

Alergeno	Función en la planta	Secuencia completa Aminoácidos / nucleótidos	Epitopos lineales para células T o B	Estructura tridimensional
Hev b 1	Biosíntesis del látex	SI / SI	T y B	NO
Hev b 2	Defensa	SI / SI	NO	NO
Hev b 3	Biosíntesis del látex	SI / SI	T y B	NO
Hev b 4	Estructural	NO / NO	NO	NO
Hev b 5	Desconocida	SI / SI	B	NO
Hev b 6	Protección y coagulación del látex	SI / SI	T y B	SI
Hev b 7	¿Protección?	SI / SI	NO	NO
Hev b 8	Estructura y señalización	SI / SI	NO	SI
Hev b 9	Biosíntesis de nutrientes	SI / SI	NO	NO
Hev b 10	Eliminación de radicales libres	SI / SI	NO	NO
Hev b 11	Protección	SI / SI	NO	NO
Hev b 12	Protección	SI / SI	NO	NO
Hev b 13	Metabolismo de ácidos grasos	SI / SI	NO	NO
Hevamina	Protección	SI / NO	NO	NO
Quitinasa de clase II	Protección	NO / NO	NO	NO
Triosa fosfato isomerasa	Biosíntesis de nutrientes	NO / NO	NO	NO
Componente de proteosoma.	Catabolismo de proteínas	NO / NO	NO	NO

En el 2002 Reyes-López y Rodríguez-Romero realizaron una recopilación de los estudios de caracterización molecular de los alergenios de látex reportados hasta ese año.²⁸ Ahí se describe que de los alergenios con nomenclatura oficial asignada se han reportado sus pesos moleculares y puntos isoeléctricos. De la

mayoría de ellos se conoce su estructura primaria y sólo de dos su estructura tridimensional. Entre los cuatro alérgenos que no cuentan con una nomenclatura oficial, la hevamina A es la que más se ha estudiado habiéndose reportado ya su estructura tridimensional resuelta por técnicas de difracción de rayos X.³⁰ Finalmente se encuentra un grupo de alérgenos entre los que destaca la superóxido manganeso dismutasa, la triosa fosfato isomerasa y un componente de proteosoma, de los cuales se han reportado sus pesos moleculares y puntos isoeléctricos, pero no se han realizado estudios inmunológicos o moleculares detallados que permitan determinar cual es su importancia en la sensibilización de las personas alérgicas al látex.

Respecto al problema de reactividad cruzada Posch³¹ y colaboradores (1999) proponen que las endoquitinasas de clase I presentes en el aguacate y que contienen un dominio de Hev b 6.02 en su estructura, son las responsables de este fenómeno. Estos investigadores observaron que el 80% de los sueros de pacientes alérgicos al Hev b 6.02 resultaron positivos al reconocimiento de la endoquitinasa de 31 kDa del aguacate.

Por otro lado, se ha reportado que el Hev b 6.02 puede inducir, en condiciones *in vitro*, un aumento en la producción de radicales oxidativos provenientes de neutrófilos, por lo que esta respuesta podría contribuir al daño a los tejidos durante la respuesta alérgica al látex.³²

En investigaciones recientes se han hecho esfuerzos por caracterizar a los alérgenos que más dañan a los pacientes en todo el mundo y de esta forma se han determinado algunas características moleculares de los mismos. En nuestro laboratorio se purificó, cristalizó y resolvió la estructura tridimensional mediante

difracción de rayos-X a 2.8 Å³³ y recientemente a 1.5 Å de resolución del Hev b 6.02 (heveína).³⁴ Por otra parte, en colaboración con el Dr. Jiménez Barbero del Instituto de Química Orgánica del CSIC de Madrid España, se determinó la estructura tridimensional de este alérgeno en solución.³⁵ Esencialmente lo que se ha encontrado es que varios residuos de los epítopos lineales de este alérgeno, descritos por Beezhold³⁶ y colaboradores, se encuentran muy cercanos en la proteína plegada formando una superficie compuesta de residuos aromáticos rodeados de residuos ácidos y polares.

La importancia de la caracterización molecular de los alérgenos, con el fin de determinar los residuos de aminoácidos que son reconocidos por IgE, se ha hecho evidente en la búsqueda de alternativas profilácticas que combatan, de forma eficaz, a las alergias que cada día afectan a más personas en todo el mundo. Así mismo, es importante en el desarrollo de pruebas diagnósticas integrales para la caracterización de las alergias y poder ofrecer así alternativas y las restricciones necesarias a aquellos pacientes que presentan hipersensibilidad a las proteínas de los productos manufacturados con hule natural. En fechas recientes se han comenzado a caracterizar molecularmente a los alérgenos; sin embargo, es muy amplia la variedad de estos, por lo que es mucho lo que falta para lograr los objetivos trazados por los diversos grupos de investigación.

En esta tesis describimos la caracterización molecular e inmunológica del Hev b 6.02 y de una forma molecular de este alérgeno, el cual aportó información acerca de los residuos de aminoácidos de este alérgeno que son reconocidos por las IgE de personas alérgicas al látex.

OBJETIVOS

Objetivo general:

Realizar la caracterización molecular e inmunológica del Hev b 6.02 y de una de sus isoformas del árbol del hule *Hevea brasiliensis*.

Objetivos particulares:

1. Purificar y realizar la caracterización bioquímica, molecular e inmunológica del Hev b 6.02 y de una de sus isoformas.
2. Realizar pruebas de alergenidad con los alergenos puros Hev b 6.02 y su isoforma además de determinar la frecuencia de afectación en voluntarios que laboran en el Instituto Nacional de Pediatría (INP).
3. Llevar a cabo modificaciones químicas en algunos residuos de la cadena polipeptídica del alergeno Hev b 6.02 para evaluar el grado en que se ve afectada su alergenidad.

METODOLOGÍA.

Purificación del Hev b 6.02 y su isoforma.

La purificación de estos alérgenos se realizó a partir del látex del árbol del hule *Hevea brasiliensis* (clona GV-42). Éste se centrifugó a 70 000 x g para obtener la fracción lutoide. Las proteínas se extrajeron con un regulador de Tris 50 mM pH 8.2 con 200 mM de NaCl. Posteriormente se llevó a cabo una precipitación fraccionada con sulfato de amonio al 65% y después al 100% de saturación. Las proteínas que precipitaron en la última etapa se separaron en una columna de exclusión molecular utilizando como matriz ultrogel AcA-54 equilibrada con el regulador de extracción. Las fracciones con mayor retención en la columna fueron dializadas contra agua desionizada y finalmente la purificación se completó mediante cromatografía de fase reversa en una columna C-18 previamente equilibrada con ácido trifluoroacético (TFA) al 0.1% en agua desionizada. La elución se realizó con un gradiente lineal de 15% a 20% de TFA al 0.12% en acetonitrilo. Las fracciones que contenían tanto al Hev b 6.02 como a su isoforma se liofilizaron y se resuspendieron en agua desionizada. La masa de estos alérgenos se determinó en un espectrómetro de masas OMNIFLEX MALDI-TOF (Bruker Daltonics) con una fuente de láser de nitrógeno de 337.1 nm y 19 kV de voltaje de aceleración en el modo lineal.

Electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) en condiciones nativas.

La diferencia en la carga total relativa entre el Hev b 6.02 y su isoforma fue determinada mediante una electroforesis en condiciones nativas. Veinte µg de los alérgenos puros se aplicaron por separado y mezclados a un gel homogéneo de

poliacrilamida al 20% utilizando una diferencia de potencial de 120 V en un amortiguador de Tris pH 8.6 y finalmente las proteínas se revelaron con el reactivo de plata.

Estructura primaria de la isoforma del Hev b 6.02.

La determinación de la secuencia de la isoforma del Hev b 6.02 se realizó empleando la técnica de degradación de Edman en fase sólida. Los puentes disulfuro del alérgeno puro (300 µg) se redujeron incubándolo en una solución de 6 M de cloruro de guanidinio y 10 mM de ditioneitol (DTT) en amortiguador de Tris 0.15 M, pH 8.2 a 37 °C durante 20 minutos. Los grupos sulfhidrilo se bloquearon con iodoacetamida a una concentración final de 10 mM en el mismo amortiguador durante 15 minutos a temperatura ambiente. La proteína se dializó contra un amortiguador de Tris 0.15 M pH 8.2 y se incubó durante 24 h a 37 °C con 10 µg de tripsina (SIGMA). Los péptidos obtenidos se separaron en una columna de fase reversa C-18, previamente equilibrada con TFA al 0.1%. La elución se realizó con un gradiente lineal de 0% a 60% de TFA al 0.12% en acetonitrilo.

Para la determinación de la masa de los péptidos obtenidos se mezclaron 1 µL de los péptidos con 4 µL de una solución saturada de ácido α-ciano-4-hidroxicinámico en acetonitrilo:agua:TFA (30:70:0.1). El análisis se realizó usando un espectrómetro de masas MALDI-TOF (Bruker Daltonics) con una fuente de láser de nitrógeno de 337.1 nm y 19 kV de voltaje de aceleración en el modo lineal. El péptido conteniendo los residuos 11 al 42 se aplicó a una membrana de PVDF para determinar su secuencia en un equipo automático para proteínas de fase gaseosa.

Con el fin de obtener la secuencia de la región central (residuos 24 al 29) de la forma molecular del Hev b 6.02 se realizó una hidrólisis química del alérgeno con 3-bromo-3-metil-2-(2-nitrofenilmercapto)-3H-indol (BNPS-Skatole). Este compuesto bajo ciertas condiciones rompe el enlace peptídico entre el triptofano y el siguiente residuo.³⁷ Quinientos μg de la proteína reducida y carboximetilada se incubaron 6 min a 47 °C con BNPS-Skatole en una proporción molar 1:40 (un exceso 20 molar por cada triptofano) en ácido acético al 87%. Para precipitar el exceso de reactivo sin reaccionar se adicionaron a 300 μL de la mezcla reacción, 600 μL de agua desionizada, posteriormente se centrifugó a 16 000 x g y se liofilizó a sequedad. Los péptidos se resuspendieron en 700 μL de agua desionizada centrifugando a 16 000 x g durante 10 minutos. El sobrenadante se aplicó a una columna C-18 en las mismas condiciones usadas para separar los péptidos obtenidos en la hidrólisis con tripsina.

La región carboxilo terminal de la isoforma del Hev b 6.02 se analizó de los péptidos obtenidos al digerir a la proteína con la proteasa Glu-C, cuyo único sitio de corte fue el Glu29. El péptido que correspondía a los residuos 30 al 43 se separó en una columna C-18 en las mismas condiciones utilizadas para los péptidos obtenidos con la digestión con tripsina. La masa de este péptido fue analizada en el espectrómetro de masas en las condiciones descritas anteriormente.

Modificación química del Hev b 6.02.

La evaluación de la importancia de los triptofanos del Hev b 6.02 en su interacción con las IgE se realizó mediante la modificación química de éstos como

se describe por Omenn³⁸ *et al.* con algunas modificaciones. Brevemente, a una solución de 1 mg del alérgeno en ácido acético al 60% se agregó un exceso 10 molar de BNPS-Skatole en ácido acético glacial. La mezcla se dejó reaccionar en oscuridad con agitación constante durante 15 minutos a temperatura ambiente, e inmediatamente después se aplicó a una columna empacada con Bio-Gel P2 equilibrada con ácido acético 1.5 M. Después de separar el reactivo que no reaccionó, la proteína se dializó exhaustivamente contra agua desionizada. La masa del alérgeno modificado se determinó por espectrometría de masas en condiciones similares a las de los péptidos obtenidos por la hidrólisis con tripsina de la forma molecular.

Caracterización espectroscópica de la isoforma del Hev b 6.02.

Para analizar la estructura secundaria de los alérgenos se obtuvieron los espectros de dicroísmo circular (DC) del Hev b 6.02 nativo, su forma molecular y el químicamente modificado. Los experimentos se llevaron a cabo en un espectropolarímetro marca JASCO J-700 utilizando una celda de cuarzo de 10 mm de paso de luz, a 25 °C, con una velocidad de barrido de 10 nm/min. Para obtener los espectros en la región del ultravioleta lejano (190-260 nm), los alérgenos puros se dializaron contra un amortiguador de fosfatos 10 mM, pH 7.0 y se llevaron a una concentración de 0.2 mg/mL.

Por otro lado, la movilidad de los residuos de triptofano se analizó obteniendo los espectros de DC en la región del UV cercano (250-350 nm), para lo cual se utilizaron muestras con una concentración de 1.4 mg/mL en un amortiguador de fosfatos 10 mM, pH 7.0 y una celda de cuarzo de 1 cm de paso

de luz. El análisis de los datos registrados en ambas regiones del UV se llevó a cabo utilizando el promedio de 3 espectros.

También se exploró la posibilidad de estudiar la exposición de los residuos de triptofano al disolvente analizando los espectros de fluorescencia para ambos alérgenos. Las muestras se excitaron a 290 nm, registrando los espectros de emisión de 300 a 500 nm. Para estos experimentos las proteínas se prepararon de forma similar a las utilizadas para la obtención de los espectros de DC en la región del UV cercano.

Caracterización de los parámetros termodinámicos de unión de la isoforma a quitotriosa por calorimetría de titulación isotérmica.

Los ensayos calorimétricos se realizaron utilizando un equipo VP-ITC (MicroCal, Inc.) en las condiciones descritas para el Hev b 6.02 por nuestro grupo de trabajo³⁹. Se registró el calor liberado por la reacción de unión de la isoforma a quitotriosa al adicionar pequeñas cantidades del trisacárido a la proteína en solución. La proteína se dializó previamente contra un amortiguador de fosfatos 100 mM a pH 7.4 y la concentración se ajustó a 0.249 mM. La quitotriosa fue disuelta en el mismo amortiguador a una concentración de 8 mM. Se realizaron 25 inyecciones del ligando a una celda conteniendo 2.1 mL de la proteína a 25 °C. El calor de dilución de la quitotriosa se determinó realizando un experimento en condiciones idénticas a las utilizadas en la reacción de unión, pero omitiendo a la proteína. Los valores de ΔH y K_a se determinaron al ajustar el calor producido por inyección como una función del titulante inyectado empleando el programa

ORIGIN. Los experimentos se realizaron con una agitación constante de aproximadamente 300 rpm.

Pruebas inmunológicas a voluntarios del INP.

Las pruebas cutáneas se realizaron como parte de un protocolo para determinar la prevalencia en la producción de IgE para alérgenos del látex, en personal voluntario de alto riesgo que labora en el Instituto Nacional de Pediatría. Este protocolo fue autorizado por el comité de ética de dicha institución. Los alérgenos que se incluyeron para realizar las pruebas cutáneas fueron: Hev b 6.02, la isoforma de éste y el Hev b 6.02 modificado químicamente. Estos se diluyeron con solución de Evans (PBS con 0.1% de fenol) a una concentración de 1.0, 10 y 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Para determinar la existencia de IgE específicas producidas contra alguno de los alérgenos probados se realizó una pequeña incisión en la piel del antebrazo y se depositaron aproximadamente 5 μL de cada una de las soluciones. Como control positivo se utilizó histamina a 10 mg/mL en solución de Evans y el control negativo fue la solución de Evans. Se consideró una reacción positiva cuando, en un tiempo de 5 a 15 minutos, el diámetro de la lesión que se provoca por la unión de los alérgenos a las IgE fue igual o mayor al producido por la histamina. El control negativo no debió provocar lesión.

Inhibición de la unión de IgE por inmunoensayo acoplado a enzima (ELISA).

Con el propósito de comparar qué tan fuerte era la unión entre las IgE del suero de personas alérgicas con el alérgeno nativo, su isoforma y el modificado

químicamente en los residuos de triptofano, se llevaron a cabo ensayos de inhibición por ELISA.

Cinco μg del Hev b 6.02 se adsorbieron en una micro placa de poliestireno para ELISA, los sitios vacíos de la placa se bloquearon con una suspensión de leche descremada al 5% en amortiguador de fosfatos salino (PBS) durante 1.5 horas a 37 °C. Después de lavar las placas con PBS, se aplicaron 50 μL de una mezcla de sueros de voluntarios con IgE específicas para este alergeno, diluidos 1:10 con PBS. Los sueros fueron preincubados con diferentes concentraciones de cada uno de los alergenos a probar (0.1 a 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) durante 1 hora, incluyendo al Hev b 6.02 y después la placa se incubó con estos sueros toda la noche. Después de lavar 5 veces con PBS, la placa se incubó durante 1 hora con 50 μL de un anti-IgE de humano unido a biotina diluido 1:500 en PBS. La placa se lavó 5 veces con PBS-Tween-20 al 0.1% y se incubó 1 hora más con estreptavidina unida a peroxidasa de rábano a una dilución de 1:1500 en PBS-Tween-20 al 0.1%. En todos los casos las incubaciones se llevaron a cabo a 37 °C. Al cabo de este tiempo se lavó la placa y se adicionaron 50 μL de tetrametil-benzidina (TMB) permitiendo el desarrollo de color durante 30 minutos en oscuridad. La reacción se paró al añadir 50 μL de ácido sulfúrico 2 M, la absorbancia a 450 nm de cada una de las celdas se registró en un lector automatizado para placas de ELISA. El porcentaje de inhibición se calculó normalizando la inhibición máxima observada para la mayor concentración del Hev b 6.02 como 100%.

Cristalización y resolución de la estructura tridimensional del Hev b 6.02 y su isoforma.***Cristalización y colección de datos de difracción del Hev b 6.02.***

El Hev b 6.02 se dializó contra agua desionizada y se concentró por liofilización a 10 mg/mL. Se llevaron a cabo pruebas de cristalización utilizando la técnica de difusión en fase vapor en gota sedente a 18 °C. Como agente precipitante se empleó al 2-metil-2,4-pentanodiol (MPD) al 60% en amortiguador de Tris-HCl 40 mM, pH 7.1. Utilizando un monocristal se realizó una captación de datos hasta a 1.5 Å de resolución a 4 °C en la estación 7-1 del laboratorio de radiación del sincrotrón de Stanford. Se empleó una longitud de onda de 1.08 Å y un detector Mar 30 de placas fosforescentes, a una distancia del cristal de 16 cm. Se obtuvieron 37 imágenes de 3° y 18 de 2° de rotación. Los datos de la difracción fueron integrados con el programa DENZO⁴⁰ y posteriormente escalados con programas de CCP4.⁴¹

Reemplazo molecular y afinamiento del Hev b 6.02.

La estructura tridimensional del alérgeno fue determinada por el método de reemplazo molecular empleando el programa CNS.⁴² Como modelo para la búsqueda de fases se utilizaron las coordenadas del Hev b 6.02 resuelto por la técnica de RMN (código PDB 1HEV). Las fases de las soluciones con menor R y mayor correlación fueron utilizadas para el cálculo de mapas y para el afinamiento. Se seleccionó la solución en la que el modelo se encontrara en su mayoría dentro

de la densidad electrónica y que no tuviera contactos entre las moléculas relacionadas por simetría.

El afinamiento se realizó empleando varios ciclos de recocido simulado seguido de ajustes del modelo dentro del mapa de densidad electrónica usando el programa QUANTA2000 (Accelrys). Durante todo el afinamiento se realizó una validación cruzada utilizando el 10% de los datos para el cálculo del R_{free} . Las moléculas de agua fueron incluidas empleando la rutina X-SOLVATE dentro de QUANTA2000. La estructura inicial y los archivos de topología del MPD se obtuvieron en el sitio HIC-Up (<http://alpha2.bmc.uu.se/hicup/>).⁴³

Para realizar el afinamiento a alta resolución se utilizó el modelo final de CNS y se realizó un ajuste anisotrópico de los factores de temperatura (factores B) por el método de mínimos cuadrados con el programa SHELX97.⁴⁴

Cristalización y colección de datos de la isoforma del Hev b 6.02.

El alérgeno puro se dializó contra agua desionizada y se concentró por liofilización a 10 mg/mL. Las pruebas de cristalización se realizaron mediante la técnica de difusión de vapor en gota colgante a 18 °C. Como agente precipitante se utilizó MPD al 60% en un amortiguador de Tris-HCl 20 mM a pH 7.5. Utilizando un monocristal enfriado a -160 °C se llevó a cabo la captación de los datos de difracción a 1.7 Å de resolución, en el Laboratorio Universitario de Estructura de Proteínas. Se empleó un generador de rayos X de ánodo rotatorio de cobre operado en un enfoque fino a 50 kV y 100 mA, con un detector RAXIS II de placas fosforescentes y a una distancia del cristal al detector de 8 cm. Los datos de la

difracción fueron procesados con el programa d*TREK de CRYSTAL CLEAR (RIGAKU, MSC).

Resolución de la estructura y afinamiento de la isoforma del Hev b 6.02.

La estructura fue resuelta empleando el método de reemplazo molecular con el programa AMoRE.⁴⁵ Las coordenadas atómicas del Hev b 6.02 a 1.5 Å de resolución se utilizaron como modelo de búsqueda de la fases (código PDB 1Q9B). El afinamiento inicial se realizó utilizando CNS, se empleó un recocido simulado en cada afinamiento, seguido de un ajuste manual del modelo dentro de la densidad electrónica usando el programa QUANTA2000. Durante todo el afinamiento se realizó una validación cruzada utilizando el 10% de los datos para el cálculo del R_{free} . Las moléculas de agua se asignaron utilizando la rutina de X-SOLVATE en QUANTA2000, verificando las distancias adecuadas para la formación de puentes de hidrógeno. En la última etapa del afinamiento se llevó a cabo un afinamiento anisotrópico de los factores B utilizando el programa Refmac-TLS de CCP4. Para esto último se emplearon 2 grupos pseudorígidos, uno formado por la cadena principal y el otro formado por las cadenas laterales. En esta etapa del afinamiento los factores B se fijaron a 20 Å² durante el afinamiento de cuerpo rígido y posteriormente se afinaron en la última etapa de cada ciclo de ajuste en el TLS.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Purificación del Hev b 6.02 y de su isoforma.

De la cromatografía de exclusión molecular se obtuvo una fracción principal al Hev b 6.02 y su isoforma (Figura 1)³³. De las proteínas totales en esta fracción, aproximadamente el 90% es Hev b 6.02.

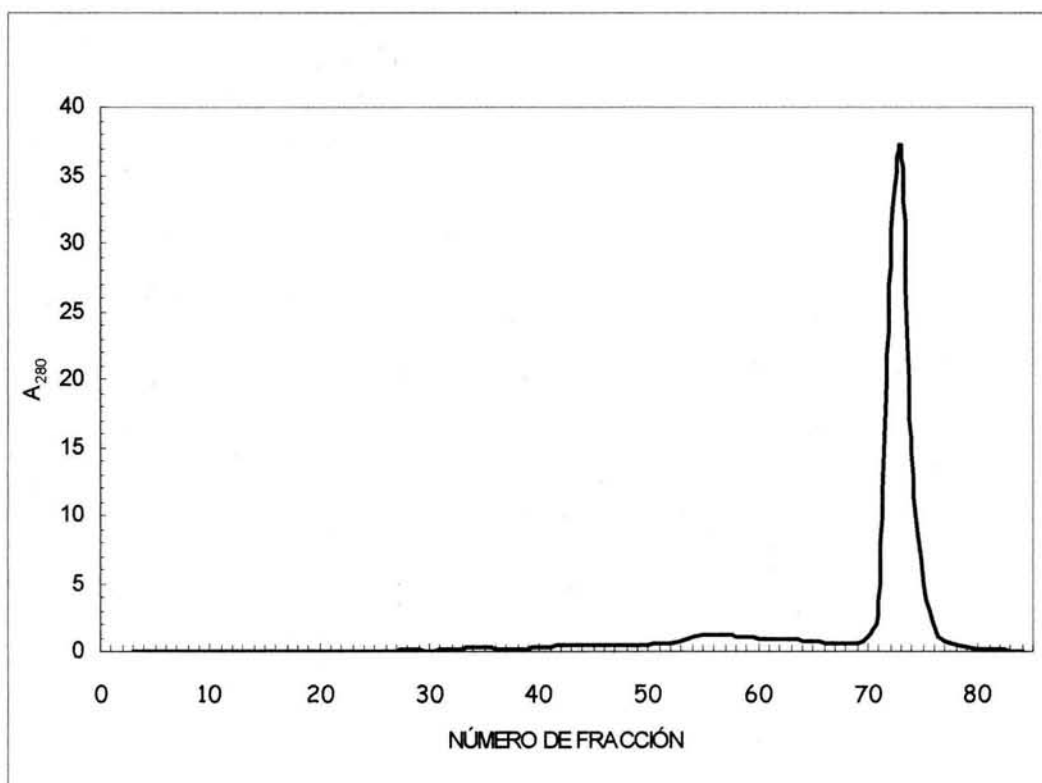


Figura 1. Perfil de elución de la cromatografía de exclusión molecular de la fracción lútoide del látex (precipitado del 65 al 100% de saturación con sulfato de amonio), en una columna de AcA-54. Como puede apreciarse sólo se obtuvo una fracción principal conteniendo a los alérgenos, siendo Hev b 6.02 la proteína más abundante. Las fracciones colectadas fueron de 3 mL c/u.

Las proteínas presentes en esta fracción se separaron por cromatografía de fase reversa en varias fracciones (Figura 2).

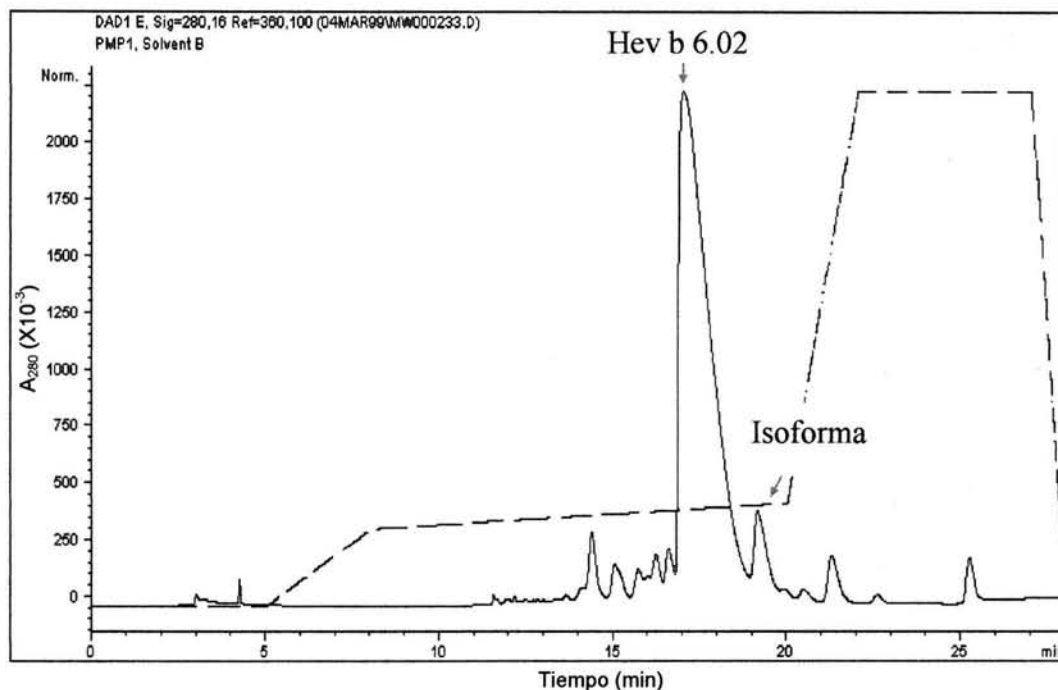


Figura 2. Perfil de elución de la fracción principal en la cromatografía de exclusión molecular en una columna de fase reversa C-18. La línea continua indica la A_{280} y la línea discontinua indica el gradiente de acetonitrilo empleado para la elución.

La fracción principal contiene al Hev b 6.02 y la siguiente fracción a la isoforma de este alérgeno. Por cada mg del Hev b 6.02 se obtuvieron aproximadamente 100 μg de la isoforma. La pureza y la masa de estas dos proteínas fueron determinadas mediante espectrometría de masas. Para el Hev b 6.02 se obtuvo una masa de 4720 Da, valor que corresponde con lo calculado por secuencia, y para la isoforma de 4717 Da. Este análisis se realizó por triplicado observando siempre la misma diferencia de masas, que no hemos logrado justificar en base a la secuencia (ver adelante).

Caracterización espectroscópica de la isoforma del Hev b 6.02.

Las propiedades espectroscópicas de la forma molecular fueron determinadas y comparadas con las del Hev b 6.02. La Figura 3 muestra los espectros de DC en la región del UV lejano. Se observa que los espectros son prácticamente idénticos, con un máximo centrado entre 219 y 221 nm y un mínimo en 190 nm. Estos tipos de espectros están dominados por las señales provenientes de los puentes disulfuro de estas moléculas y a partir de ellos no puede estimarse el contenido de estructura secundaria. Sin embargo, la integridad estructural de estas proteínas puede ser confirmada a partir de ellos.⁴⁶

El análisis del espectro de DC de la región del UV cercano, que está dominado por las señales de los residuos aromáticos principalmente, nos da información acerca del microambiente en solución de estos residuos dentro de la proteína. Como puede apreciarse en la Figura 3, ambos alérgenos muestran las mismas señales, lo que nos permite asegurar que estos residuos se encuentran en un microambiente parecido en estas moléculas.

Por otra parte, el espectro de fluorescencia nos da información del grado de exposición al disolvente de los residuos de tirosina y triptofano. Los espectros de ambas moléculas fueron idénticos (Figura 3). Observamos que la longitud de onda de máxima emisión de fluorescencia estaba centrada alrededor de 355 nm, que coincide con los espectros de fluorescencia del triptofano libre, lo que nos indica que la exposición al disolvente de estos residuos en los alérgenos es muy alta. Esto nos permite afirmar que los residuos de triptofano presentes en ambos alérgenos tienen una exposición al disolvente similar en la estructura tridimensional.

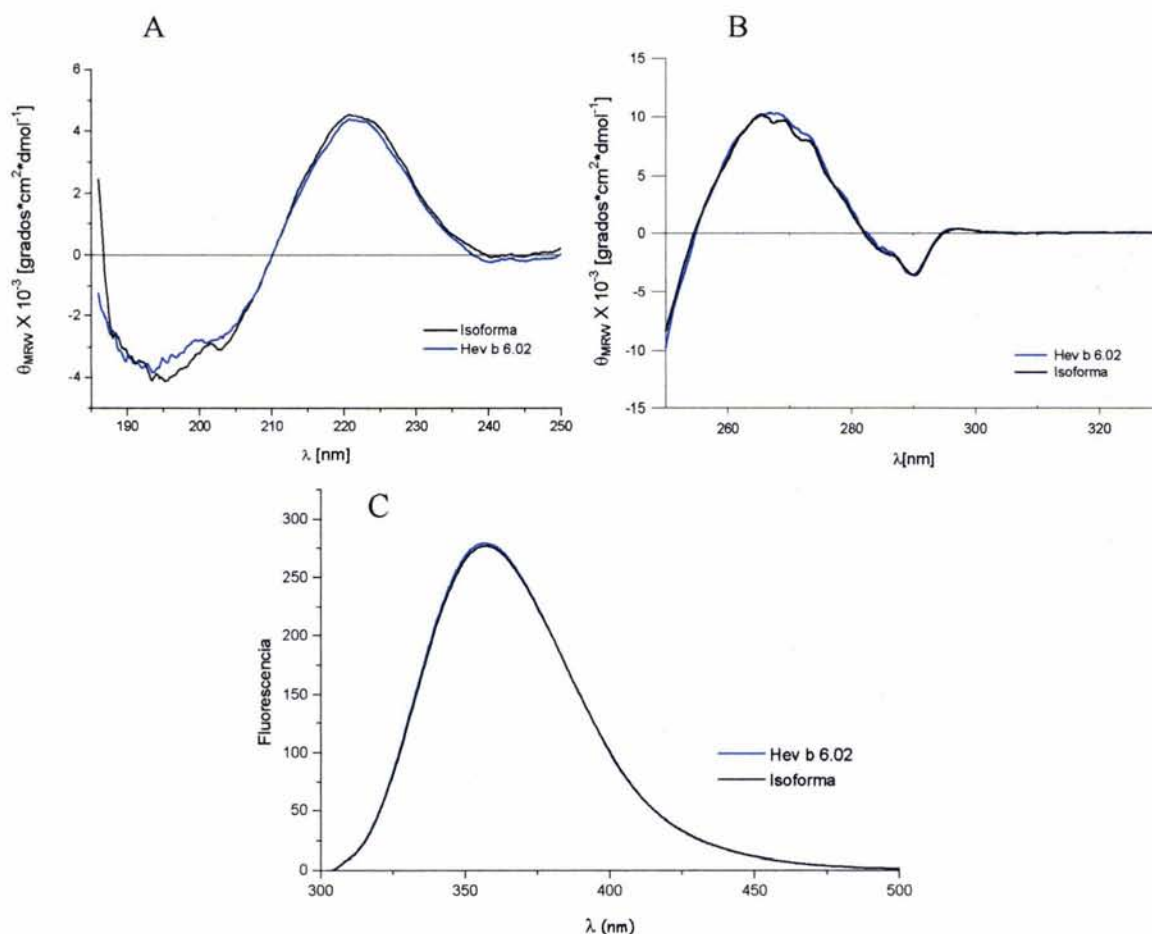


Figura 3. Propiedades espectroscópicas del Hev b 6.02 y su isoforma. Comparación de los espectros de A) DC en el UV lejano, B) DC en el UV cercano y C) espectros de fluorescencia. Todos los experimentos se realizaron a 25 °C.

Caracterización de los parámetros termodinámicos de unión de la isoforma a quitotriosa por calorimetría de titulación isotérmica.

Mediante calorimetría de titulación isotérmica determinamos los parámetros termodinámicos de la interacción isoforma-quitotriosa, y los comparamos con los reportados para el Hev b 6.02.³⁹ En general, lo que observamos es que no existen diferencias significativas en la constante de afinidad (K_a), ni en el cambio de entalpía ($14250 \pm 770 \text{ M}^{-1}$ y $7.04 \pm 0.13 \text{ kcal/mol}$ para el Hev b 6.02, y $14640 \pm$

1300 M⁻¹ y 7.4 ± 0.3 kcal/mol para el caso de la isoforma respectivamente), lo que nos indica que los triptofanos, además de la Tyr30 y la Ser19, que son residuos que también participan en la unión,³⁵ están espacialmente dispuestos de forma similar en ambos alérgenos (Figura4).

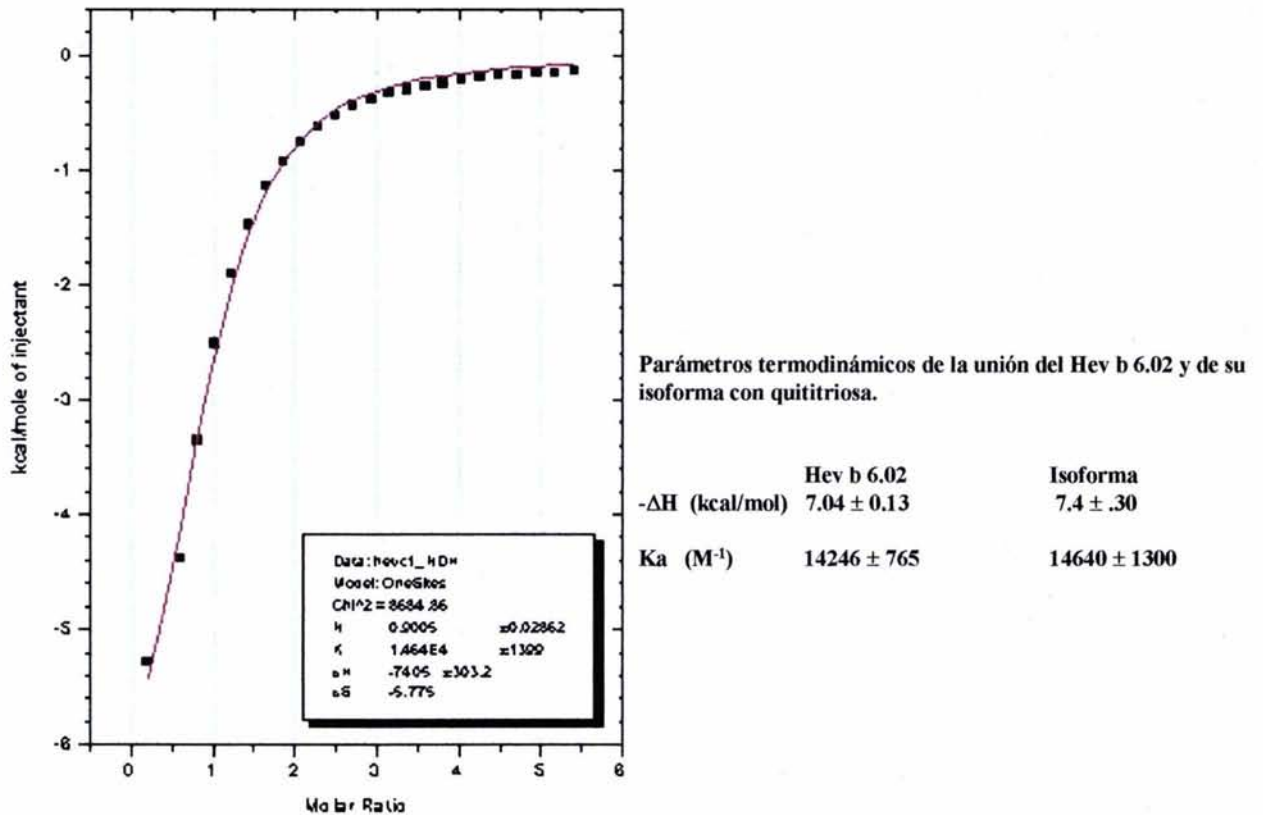


Figura 4. Exoterma de la unión de la isoforma del Hev b 6.02 a quitotriosa.

Secuencia de la isoforma del Hev b 6.02.

El análisis de la secuencia de los péptidos obtenidos de la hidrólisis con tripsina, la realizada con Glu-C y la obtenida con el BNPS-Skatole mostró que la isoforma presenta únicamente un residuo diferente: la Asn14 en Hev b 6.02 es Asp en la isoforma. Interesantemente, encontramos que con la hidrólisis realizada con el BNPS-Skatole el sitio de corte principal fue en el Trp21, mientras que el Trp23 únicamente fue oxidado, lo que nos podría indicar que el Trp21 se

encuentra más expuesto al disolvente. El resto de la secuencia de la isoforma fue la misma que la reportada para el Hev b 6.02.

El perfil electroforético en un gel de poliacrilamida en condiciones nativas confirma que la isoforma tiene una carga negativa total mayor a la del Hev b 6.02 (Figura 5).

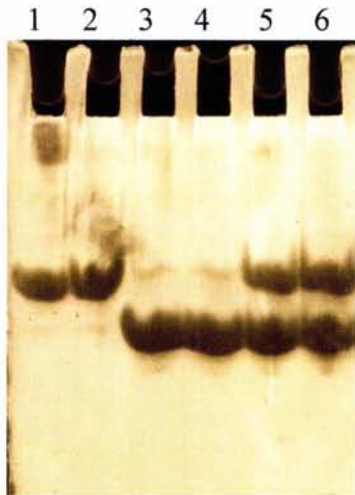


Figura 5. Perfil electroforético del Hev b 6.02 y del Hev b 6.0201. Se aplicaron 20 μg de cada alérgeno por carril en un gel de poliacrilamida al 20% en condiciones nativas. Los carriles 1 y 2 contienen al Hev b 6.02, 3 y 4 a la isoforma, 5 y 6 una mezcla de Hev b 6.02 y su forma molecular (20 μg c/u).

La masa de los péptidos purificados, determinada por MALDI-TOF, fue concordante con la calculada para los productos de las hidrólisis realizadas. Por otro lado, pensamos que la diferencia del residuo 14 en la isoforma no puede ser ocasionada por la desaminación de la Asn, ya que en las condiciones de purificación utilizadas (pH 8.2 a 4 °C) no se ha descrito esta modificación. La desaminación de los residuos de Asn suele darse cuando el residuo siguiente es Gly, lo cual no ocurre en esta proteína, ya que el siguiente residuo es otra Asn. Una posible explicación de esta diferencia, podría ser el fenómeno llamado polimorfismo de un solo nucleótido, en el que existe el cambio de una sola base en la secuencia de un gen en la misma posición.⁴⁷ Las sustituciones más comunes son de purina por purina o pirimidina por pirimidina, que son conocidas como cambios por transición, aunque también se han descrito, de forma menos

frecuente, cambios de pirimidinas por purinas y viceversa, conocidas como transversiones. Un ejemplo de estos estudios fue el realizado con el CD14, un receptor celular que participa en la activación del mecanismo de defensa innato en las personas, como la liberación de citocinas en procesos inflamatorios. Se encontró que el gen que codifica para este receptor tiene un cambio en el nucleótido 159, ubicado en la región del promotor, de citosina por timina. Este cambio de un solo nucleótido produce un nivel elevado de CD14 soluble en la sangre provocando alteraciones en la síntesis de IgE, por lo que se ha asociado con el desarrollo de la alergia y el asma, además de que también se ha asociado con un incremento en el riesgo de padecer un infarto al miocardio.⁴⁷ Otro ejemplo es el de la mutación que sufre la desmuslina, una proteína expresada en músculo cardíaco y esquelético, debido al polimorfismo de un solo nucleótido. Esta mutación está asociada a la miopatía hereditaria que se presenta en humanos.⁴⁹ En el caso de plantas los estudios al respecto son muy pocos y a la fecha lo que se ha reportado es a nivel de genes, no de proteínas. No obstante, es posible que este tipo de modificaciones ocurra en plantas pudiendo entonces explicar el cambio de Asn14Asp en la isoforma del Hev b 6.02. Es importante señalar que para que haya una mutación de Asn por Asp se requiere el cambio del primer nucleótido del codón que codifica para Asp (de AAU a GAU o de AAC a GAC) consistente con lo que hemos discutido anteriormente.

Modificación química del Hev b 6.02.

La modificación química de los dos triptofanos del Hev b 6.02 se realizó con la finalidad de evaluar la importancia de estos residuos en la unión con las IgE. El

alergeno modificado se caracterizó mediante espectroscopía de absorción en la región del UV y espectrometría de masas. Se ha reportado que en los espectros de absorción de las proteínas que son modificadas con BNPS-Skatole se observa una disminución en la banda de 280 nm y un aumento de la de 250 nm; esto es debido a la formación de un oxindol³⁸ (adición de un átomo de oxígeno en la posición 2 del anillo indólico del triptofano, Figura 6). Este comportamiento espectral se observó en el Hev b 6.02 modificado (Figura 7).

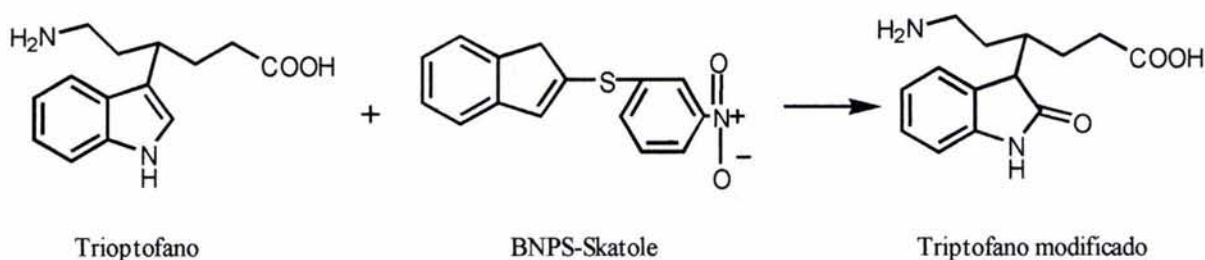


Figura 6. Estructuras de las moléculas involucradas en la reacción del BNPS-Skatole con el triptofano en las proteínas y uno de los principales productos de la reacción³⁷.

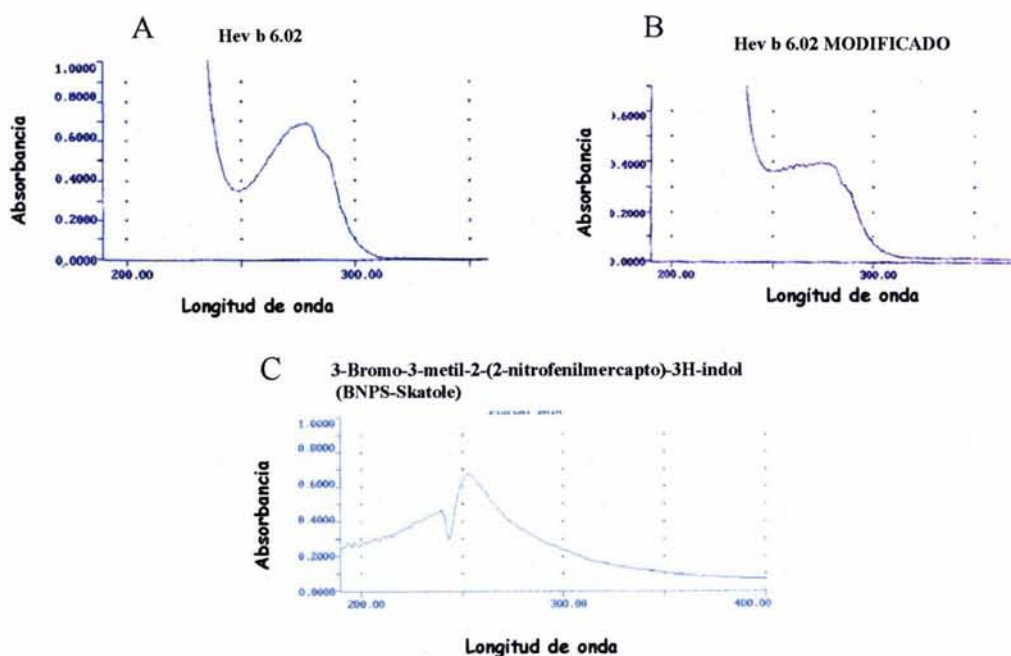


Figura 7. Espectros de absorción en la región del UV de A) Hev b 6.02, B) Hev b 6.02 modificado con BNPS-Skatole y C) BNPS-Skatole.

Se ha reportado también que la oxidación con este agente resulta en un incremento de masa de 14 a 16 Da por cada residuo de triptofano presente en la molécula, dependiendo de si existe corte en el enlace peptídico o no, respectivamente.³⁷ Nosotros observamos que la masa del alérgeno al ser modificado se incrementa también en 40 Da, 20 por cada residuo de triptofano en este alérgeno. Los productos de oxidación con BNPS-Skatole son muy variados y dependen principalmente de la temperatura, el tiempo de reacción y la cantidad de reactivo empleado. A la fecha no se ha logrado una caracterización completa de los productos de oxidación con este reactivo. Nosotros realizamos la oxidación con cinco lotes distintos de Hev b 6.02, obteniendo siempre los mismos resultados.

El espectro de dicroísmo circular en la región del ultravioleta lejano indica que no existen modificaciones importantes en la estructura secundaria del Hev b 6.02 cuando se modifica con el BNPS-Skatole (Figura 8). Adicionalmente encontramos que la secuencia de los 5 primeros residuos corresponde a la región amino terminal del alérgeno. La reducción del alérgeno modificado y la carboximetilación de sus residuos de cisteína no produjo fragmentos observables cuando fue analizado por espectrometría de masas, confirmando que no hubo ruptura en el enlace peptídico ocasionado por el tratamiento con el BNPS-Skatole. Con estos datos confirmamos que únicamente se llevó a cabo la modificación de los triptofanos de la molécula del Hev b 6.02 y que se trabajó con la cadena polipeptídica intacta.

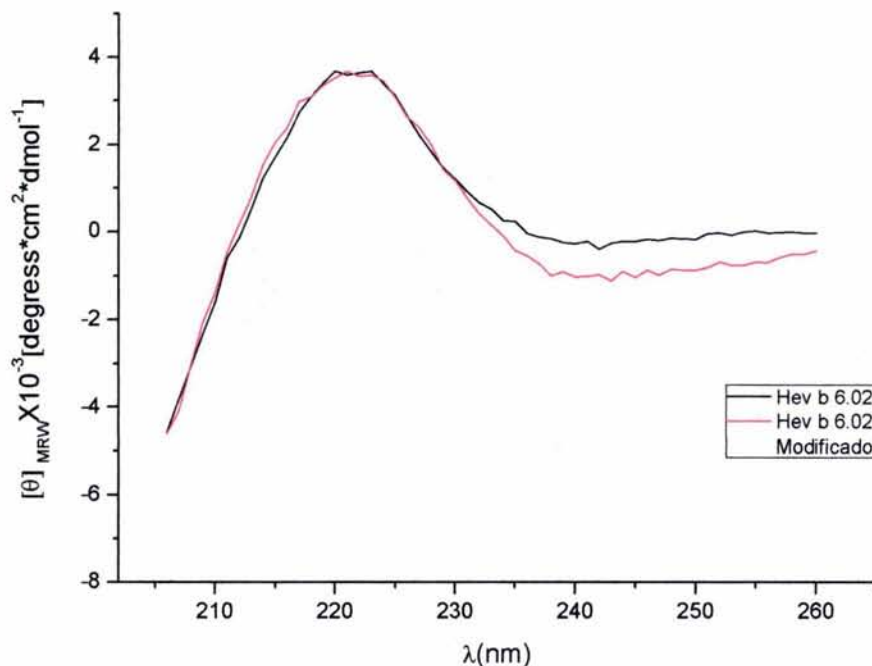


Figura 8. Espectros de CD del Hev b 6.02 nativo y modificado en la región del UV lejano.

Pruebas inmunológicas.

Estas pruebas se realizaron con 100 voluntarios que laboran en el INP. Cincuenta fueron clasificados como un grupo de alto riesgo a desarrollar alergia a las proteínas presentes en el látex, por estar en contacto frecuente con artículos elaborados con este material. El resto fue un grupo de bajo riesgo, principalmente personas que tienen poco contacto con productos de látex. Los resultados de estas pruebas se resumen en la tabla II, en donde se observa que seis personas fueron positivas para el Hev b 6.02 y siete lo fueron para la isoforma.

TABLA II: Resultados de las pruebas cutáneas realizadas a voluntarios del INP. En la primera columna se presentan los números asignados a cada voluntario dentro del protocolo. Cada cruz representa 2 mm de diámetro en la lesión provocada por los alergenos. * Hev b 6.02 modificado químicamente

Paciente	Hev b 6.02	Hev b 6.02*	Isoforma	Histamina
2	-	-	+++++	+
6	+++	-	-	+
7	+++	-	-	+
9	-	-	++	+
13	+++	-	-	+
15	-	-	++	+
18	++++	-	-	+
34	-	-	+	+
48	++++	-	-	+
50	-	-	++	+
52	-	-	+	+
53	++++	+	+	+

De esta misma tabla se destaca que todos los voluntarios que fueron positivos al Hev b 6.02 presentaron una prueba negativa o significativamente menor cuando estaba modificado con BNPS-Skatole. Esto nos indica que la modificación realizada a los triptofanos de este alergen es suficiente para evitar que se desarrolle la respuesta inflamatoria, por lo que consideramos que estos aminoácidos se encuentran en el epitopo conformacional en la superficie de la proteína y que son clave para la interacción con las IgE. El segundo aspecto encontrado es en la mayoría de los casos la isoforma es reconocida por las IgE de personas distintas de las que lo hicieron para el Hev b 6.02, y en general la reacción inflamatoria fue menor, lo que nos indica que esta proteína es menos alérgica cuando se compara con el Hev b 6.02. Estos resultados nos indican

que las personas alérgicas al látex pueden ser sensibilizadas por cualquiera de los dos alérgenos, pero al parecer rara vez por ambos.

Inhibición de la unión de IgE por ELISA.

Para evaluar la afinidad de proteínas antigénicas con anticuerpos se llevan a cabo pruebas de inhibición de dicha interacción. Con este fin se utilizan antígenos naturales similares, modificados químicamente o bien obtenidos mediante técnicas de biología molecular. Los anticuerpos empleados pueden ser monoclonales o policlonales, siendo importante la detección específica de la clase a la que pertenecen, ya que los resultados de estos experimentos dependen de esta información.

En nuestro caso, se evaluó la unión de las IgE a alérgenos con modificaciones sutiles con respecto al Hev b 6.02, ya que éstas inmunoglobulinas son las clínicamente relevantes para el desarrollo de la alergia. Sin embargo, es posible que los alérgenos se unan a anticuerpos de clases distintas, ya que éstos provienen de sueros y no son sometidos a procesos de purificación previos a los ensayos.

La Figura 9 muestra los resultados de la unión del Hev b 6.02 nativo y modificado con BNPS-Skatole. Como puede apreciarse, con el alérgeno modificado la afinidad disminuye en un 75%. En el caso de la isoforma, la afinidad de unión a las IgE es 25% menor cuando se compara con el Hev b 6.02. Estos resultados nos indican que los triptofanos se encuentran formando parte de uno de los epitopos conformacionales de este alérgeno y que este epitopo es

clínicamente relevante para el desarrollo de la inflamación alérgica, como lo confirmamos con las pruebas cutáneas (ver tabla II).

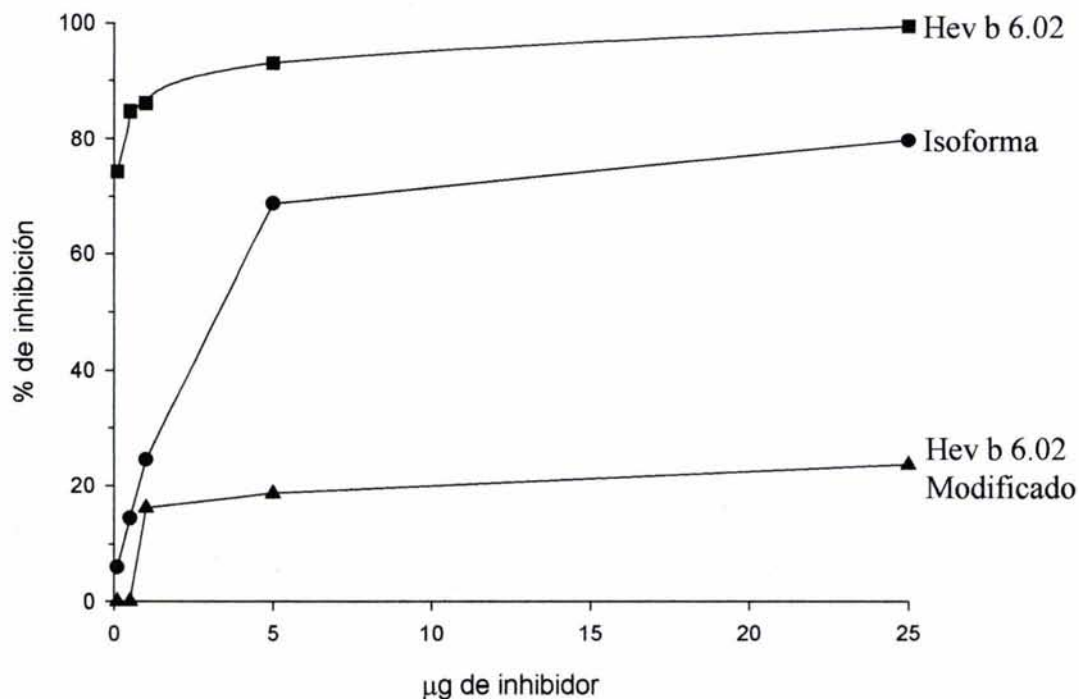


Figura 9. Ensayo de inhibición por ELISA. La inhibición promedio de la unión de las IgE a 5 µg de Hev b 6.02 en fase sólida fue determinado utilizando la isoforma (círculos) y el Hev b 6.02 modificado químicamente con BNPS-Skatole (triángulos), en el suero de pacientes pediátricos. Se encontró un promedio de inhibición del 75% para la isoforma y 25% con el Hev b 6.02 modificado. Como comparación, se muestra la curva de inhibición con el Hev b 6.02 (cuadros).

Los resultados espectroscópicos del Hev b 6.02 y su isoforma, al igual que los parámetros termodinámicos de la interacción de estos polipéptidos con quitotriosa indican que prácticamente no hay diferencias entre ellos. Por otro lado, con el perfil electroforético, la secuencia de aminoácidos y el comportamiento en la caracterización inmunológica de los alérgenos, confirmamos que ambas proteínas tienen diferencias que se ven reflejadas principalmente en su interacción con las

IgE de personas alérgicas al látex y en la respuesta inflamatoria provocada por esta interacción. Con la finalidad de buscar cuales son las diferencias moleculares entre estos alergenios, que dan lugar a los resultados observados en la caracterización inmunológica, realizamos la resolución de las estructuras tridimensionales y un análisis de éstas.

Cristalización y resolución de la estructura tridimensional del Hev b 6.02.

El cristal del Hev b 6.02, obtenido después de 20 días, tuvo dimensiones de 0.6 x 0.15 x 0.01 mm y difractó hasta 1.5 Å de resolución. En la Tabla III se resume la estadística del procesamiento de los datos y del afinamiento. Como se muestra en esta tabla, el grupo espacial en que crecieron los cristales fue P2₁2₁2 con una sola molécula en la unidad asimétrica. Las dimensiones de la celda unitaria fueron: a = 31.81 Å, b = 60.95 Å y c = 22.51 Å, $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$.

Resolución de la estructura y afinamiento del Hev b 6.02.

El modelo con el que se comenzó el afinamiento tuvo un R de 49.5%. Después de los ciclos de afinamiento con CNS, se asignaron 25 moléculas de agua y una molécula de MPD, bajando el R a 19.8 y el R_{free} a 21.5. Con el afinamiento anisotrópico de los factores B el R disminuyó a 12.8 y el R_{free} a 14.5.

El modelo afinado contiene 342 átomos, pertenecientes a los 43 residuos de aminoácido de la proteína, 39 moléculas de agua y 2 moléculas de MPD, estas últimas provenientes de la solución de cristalización. La estereoquímica del modelo fue excelente, el r.m.s. (desviación cuadrática media, por sus siglas en inglés) con respecto a los valores ideales fue de 0.011 Å para las longitudes de

enlace y 0.030 Å para los ángulos de enlace. En el gráfico de Ramachandran, que indica si los residuos de aminoácidos modelados tienen las conformaciones de los ángulos psi y phi que son estereoquímicamente favorables en las estructuras de proteínas, muestra un 88.2% de los residuos en las posiciones más favorables y 11.8% en las regiones permitidas.

Por otro lado, la densidad electrónica mostró dos conformaciones (rotámeros) para los residuos Glu1, Leu11, Pro13, Ser26, Glu29 y la Pro33, así como en las dos moléculas de MPD en la zona de unión de carbohidratos. Cuatro regiones pequeñas de estructura secundaria regular caracterizan a la molécula (Figura 10).

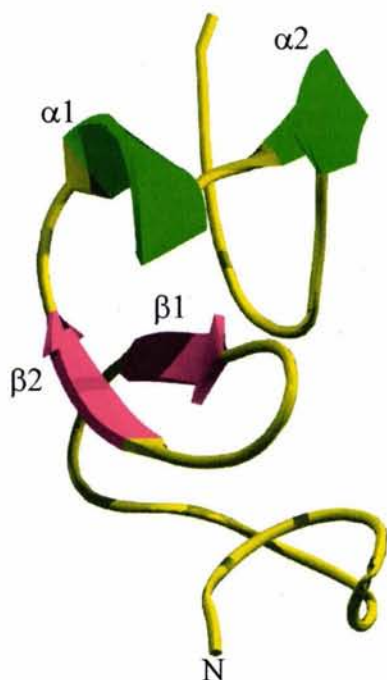


Figura 10. Representación en listones de los elementos de estructura secundaria del Hev b 6.02. En verde se muestran las dos hélices α y en rojo las hebras β . La figura se realizó con Swiss-PdbViewer y POV-Ray.

El sitio de unión a oligómeros de N-acetil-glucosamina muestra una región compuesta por los residuos Trp21, Trp23 y Tyr30, que están rodeados por los residuos Glu1, Gln6, Gln20 y Glu29. La Figura 11 muestra los puentes de hidrógeno encontrados entre las moléculas de MPD101 y el residuo de Trp21 (O2

MPD¹⁰¹-NH_ε1 Trp²¹) y entre el MPD102 con el residuo Tyr30 (O2 MPD¹⁰²- OH Tyr³⁰ y O4 MPD¹⁰²- OH Tyr³⁰ para las dos conformaciones).

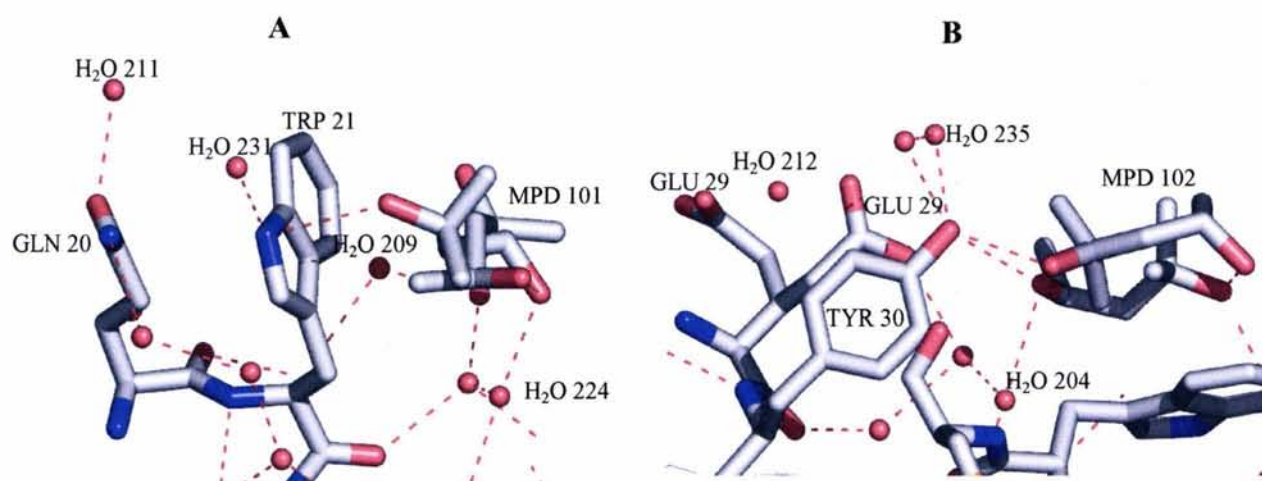


Figura 11. Detalle de los contactos polares del Hev b 6.02 **A)** MPD101 con el Trp21 y **B)** MPD102 con la Tyr30. En **B)** Se pueden apreciar las 2 conformaciones del Glu29 encontradas. Algunas moléculas de agua están señaladas (esferas rojas).

A esta resolución la estructura, es muy similar a la estructura obtenida en solución por métodos de RMN.³⁵ Una superposición de los C α entre este modelo y los obtenidos por RMN muestra un r.m.s. de 0.62 Å para el modelo que tiene unido quitobiosa, y 0.83 Å para el modelo con el sitio de unión a azúcares vacío, indicando que la estructura cambia ligeramente cuando el sitio de unión a carbohidratos se encuentra ocupado.

Cristalización y resolución de la estructura tridimensional de la isoforma del Hev b 6.02.

La optimización de las condiciones de cristalización para la isoforma se realizó variando la concentración de proteína, ya que los mejores cristales se obtuvieron a 6 mg/mL del polipéptido y no a 10 mg/mL como sucedió con el Hev b

6.02. Esto dió lugar a monocristales en forma de agujas de hasta 3 mm de largo por 0.05 mm de espesor al cabo de 30 días (Figura 12). Estos cristales difractaron a 1.7 Å de resolución (Figura 13).

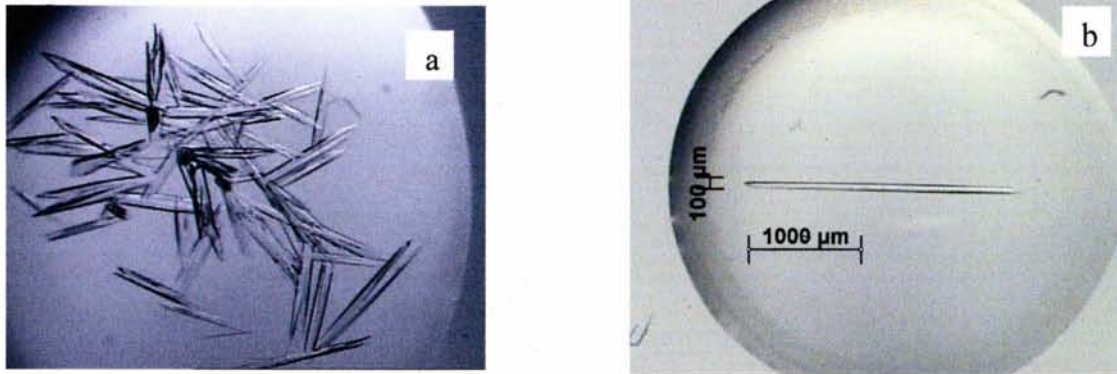


Figura 12. Cristales obtenidos al cabo de 30 días a 18° C, utilizando una concentración del alérgeno de a) 10 mg/mL y b) 8 mg/mL. Como agente precipitante se utilizó MPD al 60% en un amortiguador de Tris 20 mM, pH 7.1.

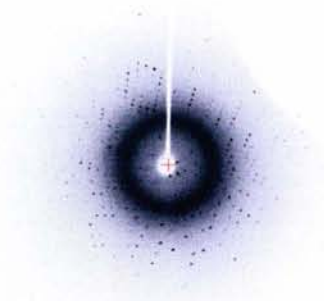


Figura 13. Patrón de difracción de un cristal de la isoforma del Hev b 6.02 a 1.7 Å de resolución. La colección de datos se realizó a una temperatura de -160° C y el tiempo de exposición del cristal a los rayos-X fue de 8 minutos. La distancia del cristal al detector fue de 8 cm.

En la tabla III se resumen la estadística del procesamiento de datos y del afinamiento de la estructura. Como se muestra en esta tabla, el grupo espacial en que crecieron los cristales fue el P3₁21, con dimensiones de celda de $a = b = 37.2$,

$c = 48.79$, $\alpha = \beta = 90^\circ$ y $\gamma = 120^\circ$. El R_{merge} de los datos procesados fue de 3.7% y la integridad del conjunto de datos fue de 97%.

Tabla III. Resumen de las estadísticas del procesamiento de los datos y el afinamiento de las estructuras del Hev b 6.02 y su isoforma.

<i>(A) Colecta de datos</i>	Hev b 6.02	Isoforma del Hev b 6.02
Grupo espacial	P2 ₁ 2 ₁ 2	P3 ₁ 2 ₁
Parámetros de la celda unitaria		
a, b, c (Å)	31.81, 60.95, 22.51	37.22, 37.22, 48.79
α , β , γ (°)	90, 90, 90	90, 90, 120
Monómeros por unidad asimétrica	1	1
Rango de resolución (Å)	15-1.5	16-1.7
Número de reflexiones totales	57,822	17,304
Número de reflexiones únicas	7,113	4,440
$I/\sigma(I)$	6.7	25.2
Complejidad de los datos (%)	95.5	97.1
Multiplicidad	4.7	3.9
R_{sym} (%)	5.0	--
R_{merge} (%)	--	3.7
<i>(B) Afinamiento</i>		
R-factor (%)	12.8	15.2
R_{free} (%)	14.5	19.1
Número de átomos		
Proteína	345	321
Solvente	39	40
MPD	32	
RMS (respecto a los valores ideales)		
Longitud de enlace (Å)	0.011	0.014
Ángulos de enlace	0.03(Å)	2.1(°)
Residuos en el gráfico de Ramachandran (%)		
Regiones más favorables	88.2	91.8
Regiones permitidas	11.8	8.2
Factores B promedio (Å ²)		
Proteína	17.4	15.2
Solvente	33.3	24.9
MPD	36.7	---

Resolución de la estructura y afinamiento de la isoforma del *Hev b* 6.02.

Después de encontrar una solución clara en el reemplazo molecular, el R fue de 34.8%. Con los ciclos de afinamiento de cuerpo rígido, seguido de un recocido simulado y ajuste del modelo a la densidad realizados con CNS y QUANTA2000 respectivamente, el R disminuyó a 22.3 y el R_{free} a 24.74. Con el afinamiento anisotrópico de los factores de temperatura con TLS el factor R final fue de 15.1 y el R_{free} de 19.2. El modelo final consta de 321 átomos pertenecientes a la proteína y 40 moléculas de agua. En general la densidad electrónica observada es de muy buena calidad (ver Figura 14), la mayoría de los residuos fueron claramente modelados dentro de ésta, con excepción de la Lys42 que no tienen la densidad para el C_{γ} y para el N_{ζ} de la cadena lateral, pero se pudo modelar este residuo. Para la cadena lateral del Asp43 no observamos densidad más allá del C_{β} , por lo que fue modelado como Ala. Los factores de temperatura para estos residuos fueron los más altos (32.03 \AA^2 para el C_{ϵ} de la Lys42 y 41.18 \AA^2 para el O del carbonilo del Asp43), esto nos indica que son muy flexibles.

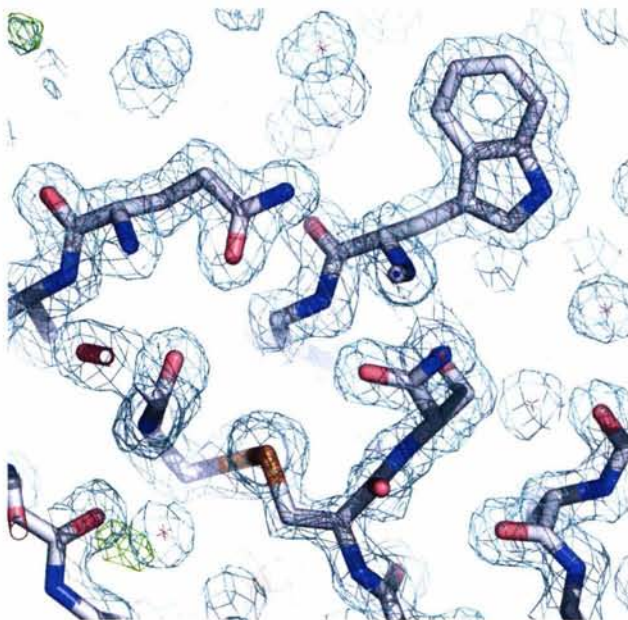


Figura 14. Mapa de densidad electrónica 2Fo-Fc con contorno de 1σ en la región del Trp21. En general, el mapa muestra la misma calidad en todo el modelo. La figura fue realizada con el programa PyMOL.

La densidad electrónica en un mapa 2Fo-Fc, calculado para el residuo de aminoácido Asp14, fue explicada completamente con el modelo. Los mapas Fo-Fc calculados y con contorno de 3σ y -3σ no muestran discrepancia con los átomos modelados, lo que nos indica la presencia de éstos en la molécula (Figura 15).

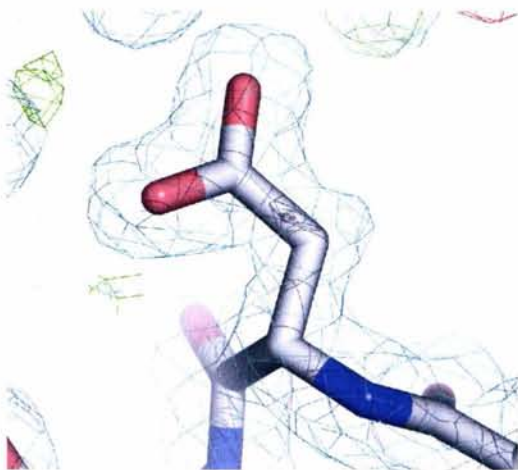


Figura 15. Detalle de los mapas de densidad electrónica 2Fo-Fc a 1σ y Fo-Fc a 3σ y -3σ en la región del Asp14 de la isoforma del Hev b 6.02.

El 91.8% de los residuos se encuentran en las regiones más favorables en el gráfico de Ramachandran y el 8.2% en regiones permitidas. Las desviaciones cuadráticas promedio (r.m.s) en el modelo con respecto a los valores ideales observados en estructuras de moléculas pequeñas fueron de 0.014 \AA para distancias de enlace y 2.1° para los ángulos de enlace.

Análisis y comparación de las estructuras del Hev b 6.02 y su isoforma.

En general, las estructuras tridimensionales de los dos alergenitos son muy parecidas. La superposición de los modelos del Hev b 6.02 y su isoforma a 1.5 \AA y a 1.7 \AA de resolución, respectivamente, tienen un r.m.s. de 0.24 \AA para los $C\alpha$ y 1.07 \AA para todos los átomos (Figura 16).

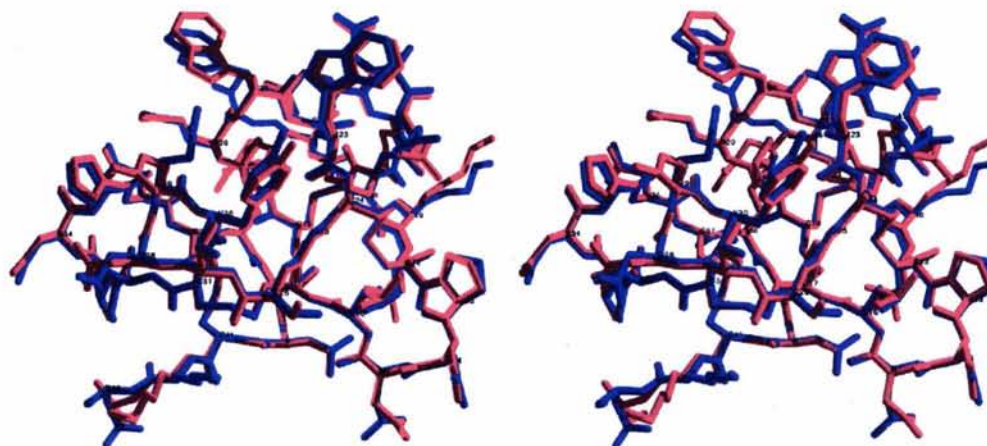


Figura 16. Imagen estereoscópica de la superposición de los modelos del Hev b 6.02 a 1.5 Å de resolución (azul) y su isoforma a 1.7 Å de resolución (rojo). El r.m.s. de los dos modelos es de 0.24 Å para los $C\alpha$ y de 1.07 Å para todos los átomos. La figura fue realizada en Swiss-PDBViewer y PovRay.

Es importante señalar que las superficies moleculares del Hev b 6.02 y su isoforma muestran diferencias sutiles en la distribución de cargas en la región donde se encuentran los residuos de triptofano. En una publicación reciente de nuestro grupo de trabajo postulamos la posible participación de estos residuos de aminoácido en la unión a las IgE.³⁴ En la Figura 17 se muestra un análisis de secuencias con otros alérgenos y se observa que algunos residuos están conservados, principalmente los que se encuentran en las posiciones equivalentes en estas proteínas, localizados en su mayoría en los epitopos lineales del Hev b 6.02, pudiendo formar parte de una zona de reconocimiento por las IgE de pacientes alérgicos a esta proteína.

	10	20	30	40
Hev b 6.02	EQCGRQAGGK LCPNNLCCSQ	WGWCGSTDEY	CSPDHNCQSN	CKD
pseudo-hevein	EQCGRQAGGK LCPNNLCCSQ	YGWCGSSDDY	CSPSKNCQSN	CKGGG
Hev b 11	EQCGRQAGGA LCPGGLCCSQ	YGCANTPEY	CGSGCQSQCD	GGV
WGA3	IKCGSQAGGK LCPNNLCCSQ	WGYCGLGSEF	CGEGCQNGAC	STD

Figura 17. Comparación de la secuencia del Hev b 6.02 con pseudoheveína, la quitinasa de clase I y la aglutinina del germen del trigo. Los epitopos lineales del Hev b 6.02 son mostrados con fondo gris.

En la Figura 18 se muestra una comparación de los potenciales electrostáticos en las superficies de estos alérgenos. Como puede apreciarse en esta figura las principales diferencias se encuentran en la región de los triptofanos y la Asn14 del Hev b 6.02 y Asp14 de la isoforma. Si bien los rotámeros de algunas cadenas laterales del Hev b 6.02 pueden contribuir a la diferencia en el potencial electrostático en la superficie entre estos alérgenos, es evidente que la presencia del Asp14 en la isoforma modifica de forma importante la distribución de cargas en la zona en que se encuentran ubicados los residuos aromáticos.

Estos resultados eventualmente nos dan información, aunque insuficiente, de la dimensión del epitopo conformacional del Hev b 6.02.

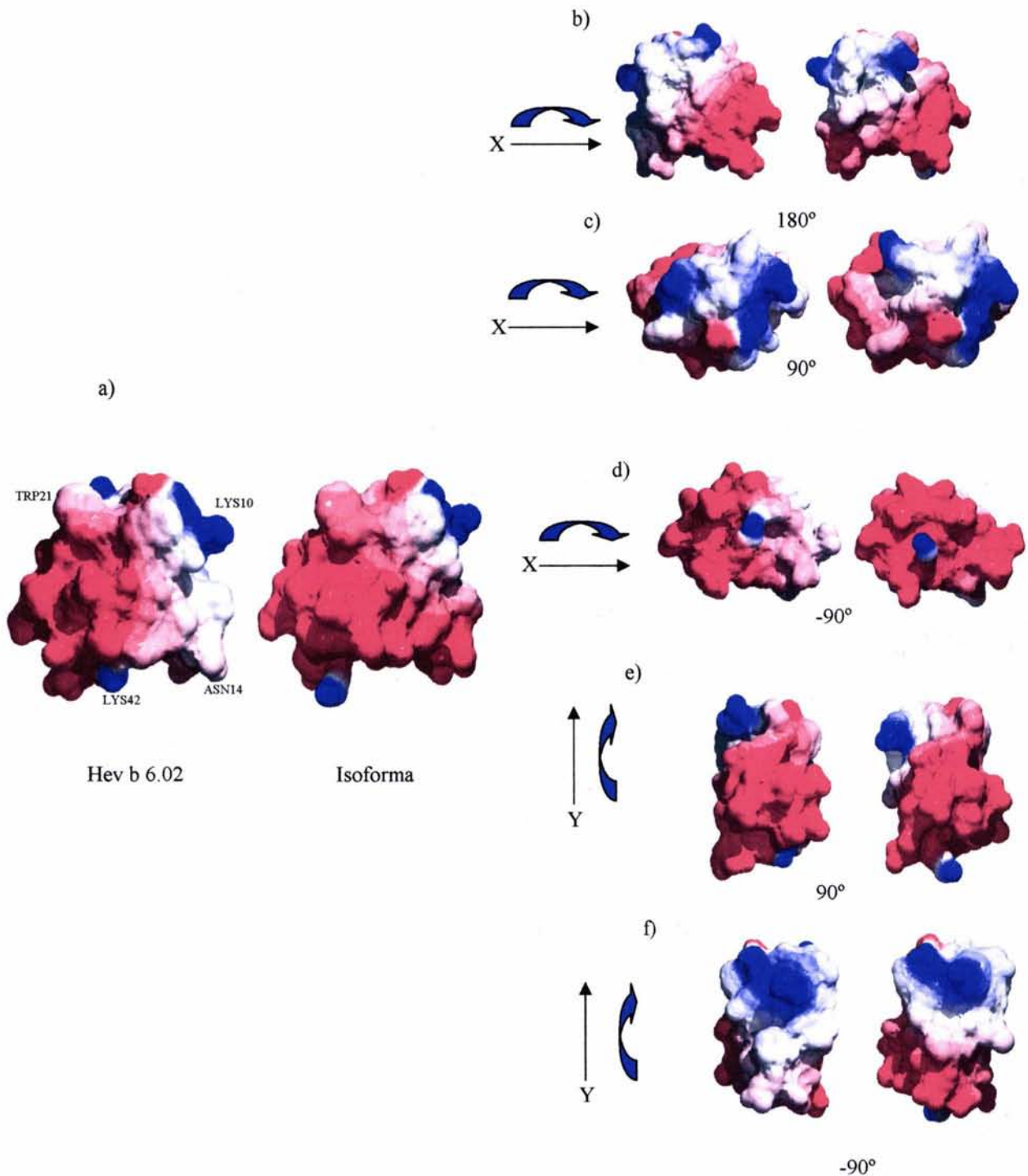


Figura 18. Comparación de los potenciales electrostáticos del Hev b 6.02 y su isoforma. En rojo se representa el potencial negativo, en azul el positivo y en blanco las zonas sin potencial. a) las superficies en el plano de los triptofanos, b) la parte superior respecto a la vista a), c) la parte inferior, d) la parte posterior, e) la parte izquierda con respecto a la vista a) y f) la parte derecha. Algunos residuos están señalados como referencia.

Recientemente Karisola⁵⁰ y colaboradores en un trabajo paralelo al nuestro describen algunos residuos de aminoácido del Hev b 6.02 que podrían participar en su unión con las IgE de personas alérgicas. Ellos reportan que son seis los principales residuos responsables de dicha unión, (Arg5, Lys10, Glu29, Tyr30, His35 y Gln38). Un análisis de la localización de estos residuos en la estructura del Hev b 6.02 nos muestra que se encuentran distribuidos en tres regiones diferentes del alérgeno, una de ellas opuesta a las otras dos, lo que sugiere que se puede tratar de dos epitopos diferentes o que las mutaciones realizadas en la molécula provocaron un cambio conformacional importante por reacomodo de cadenas laterales (ver Figura 19).

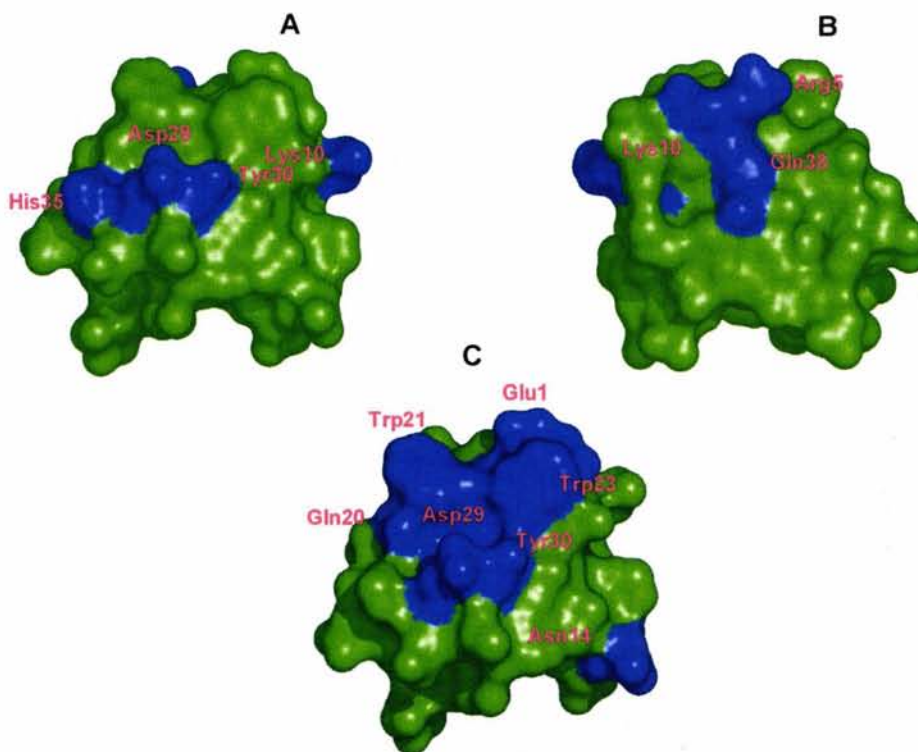


Figura 19. Superficie molecular del Hev b 6.02 donde se muestran los residuos de aminoácidos que el grupo de Karisola *et al.* han propuesto para la interacción con las IgE. Por claridad las superficies de los 6 residuos están indicadas en azul y el resto en verde. La imagen en A tiene la misma orientación que la imagen a) de la Figura 18 y B tiene la orientación de la imagen b) en la misma figura. C muestra los residuos propuestos por nosotros que forman parte del epitopo conformacional de este alérgeno.

Es importante destacar que ellos observan hasta un 50% de pérdida en la capacidad de inhibir la unión de las IgE al Hev b 6.02 cuando se realizan las mutaciones de Arg5Ala, Tyr30Phe e His35Ala. No obstante, en este reporte no se demuestra que el plegamiento de la proteína tras las mutaciones fue el adecuado y tampoco se describe un análisis de cómo pudiera haberse modificado la estructura tridimensional del alérgeno al llevar a cabo las mutaciones. Como se expuso con anterioridad, uno de los aspectos críticos para que se lleve a cabo la unión de un alérgeno a las IgE, es la integridad conformacional del epítopo, por lo que pequeñas variaciones en éste se pueden traducir en cambios importantes en la fuerza de unión.

Como ya se mencionó anteriormente, nosotros observamos que la modificación de Asn14Asp en la isoforma provoca la pérdida de hasta el 25% del poder inhibitorio del Hev b 6.02 en su unión con las IgE, y que la modificación química de los residuos de triptofano produce hasta un 75% de pérdida de esta capacidad. Interesantemente los resultados de Karisola contrastan, en parte, con los obtenidos por nuestro grupo de trabajo, ya que nosotros hemos demostrado que la modificación química de los triptofanos en el alérgeno disminuye significativamente su afinidad por las IgE y no provoca cambios importantes en otras regiones de la molécula. Adicionalmente hemos observado que la Asn14 del Hev b 6.02 contribuye significativamente en la interacción de este alérgeno con las IgE. Además, con base en un análisis de secuencias con otros alérgenos sugerimos que los residuos Glu29 y Tyr30 también pueden formar parte de un epítopo conformacional, ya que estos residuos se encuentran expuestos al disolvente en el mismo plano que los triptofanos.

Dimensión del epitopo conformacional del Hev b 6.02.

En uno de los pocos reportes que existen de la estructura tridimensional del complejo anticuerpo-alergeno, se describe la superficie oculta en la interacción Fab de un anticuerpo monoclonal murino y el alergeno Bet v 1⁵¹. Dicha área tiene una dimensión de 931 Å². La dimensión de la región formada desde los residuos de triptofano hasta la Asn14 en Hev b 6.02 es similar a la observada en el epitopo del Bet v 1. En la Figura 20 se muestra una comparación de las dimensiones del epitopo del Bet v 1 determinado a partir de los contactos encontrados a 3.2 Å de distancia o menos, en la estructura cristalina de este alergeno unido al anticuerpo BV16, con las dimensiones de un posible epitopo conformacional del Hev b 6.02. Como se puede apreciar en esta figura las dimensiones de estos epitopos son muy similares. La distribución de los átomos polares en la superficie del Bet v1 es ligeramente más rica, comparada con la distribución observada en el Hev b 6.02, pero se debe considerar que son alérgenos que no tienen relación biológica o estructural. Es importante destacar también que este epitopo es reconocido por IgG, por lo que aún se desconoce con precisión cuáles residuos del alergeno se unirían a las IgE. Sin embargo, es muy interesante observar que los residuos del Hev b 6.02, que podrían formar al epitopo conformacional, están formando una región de dimensiones similares a las del epitopo determinado a través de la estructura de un alergeno con su anticuerpo.

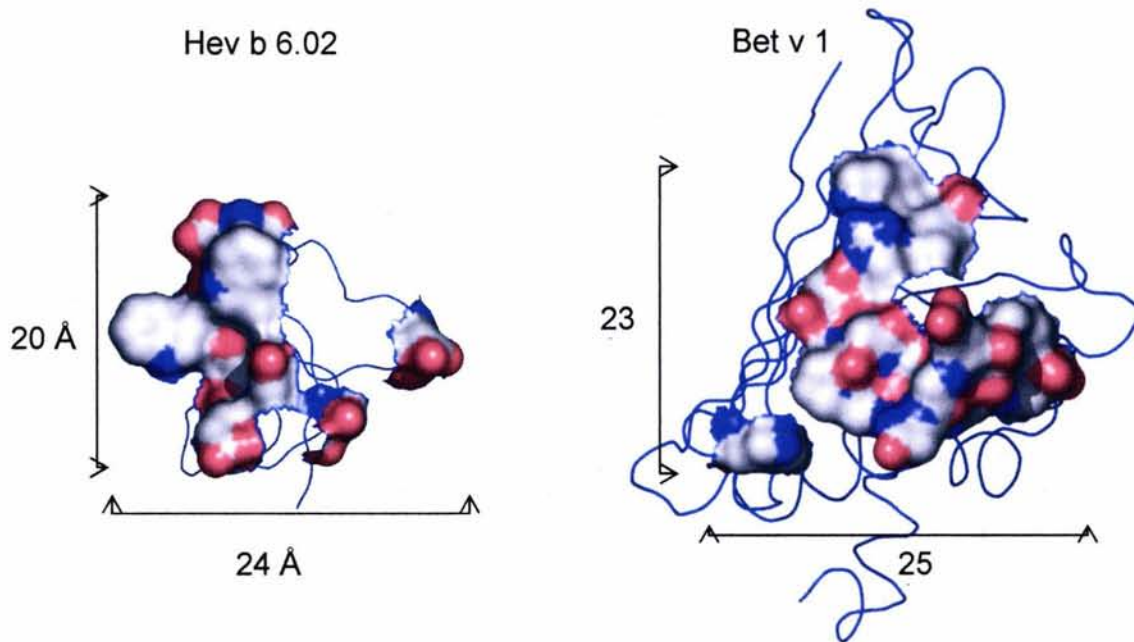


Figura 20. Comparación de las dimensiones del epitopo del Bet v1 y del posible epitopo de la isoforma. En la figura se muestran las superficies de los residuos que tienen contactos a 3.5 Å o menos del Bet v 1 con el mAb BV16 y los residuos Glu1, Asp14, Ser19, Trp21, Trp23, Ser26, Glu29 y Tyr30 del Hev b 6.02, que proponemos, pueden participar en la unión a las IgE.

¿Existe un motivo estructural que sea el responsable de que una proteína sea alérgica?

Una de las preguntas de mayor interés entre los grupos de investigación que estudian a los alérgenos es la del por qué sólo algunas proteínas provocan respuestas alérgicas. Se ha discutido si existe alguna relación entre la función biológica de estas proteínas y su alérgenicidad, sin embargo no se han encontrado evidencias que sustenten dicha aseveración, ya que pueden tener una gran variedad de funciones. De igual forma, no se ha identificado una relación entre la estructura tridimensional global de estas moléculas y su capacidad para provocar las reacciones alérgicas, ya que las escasas estructuras tridimensionales obtenidas experimentalmente de alérgenos son diversas.

Algunos grupos proponemos que la alergenicidad de una proteína puede radicar en algunos motivos estructurales que sean los responsables de conferirle esta propiedad, aunado a una importante participación de la predisposición genética de los individuos alérgicos.

Con base a esto y en un intento por tratar de encontrar homologías estructurales entre alergenos que presentan reactividad cruzada con el látex, se realizó una búsqueda (en el Protein Data Bank (PDB)) de alergenos que se han resuelto estructuralmente y de los cuales se conocieran sus epitopos lineales⁵². Al analizar los resultados se observó que los epitopos lineales de diversos alergenos presentaban un patrón similar al de la heveína, por lo que sugerimos que esos residuos pueden ser los determinantes antigénicos que son reconocidos por las IgE's.³⁴ En la Figura 21 se presenta una comparación de las superficies de los alergenos Bet v 2, Hev b 8 y el Hev b 6.02. Como se puede observar existe un motivo similar entre estos alergenos, el cual esta formado por residuos aromáticos accesibles al disolvente rodeados de residuos polares y algunos cargados, principalmente residuos ácidos.

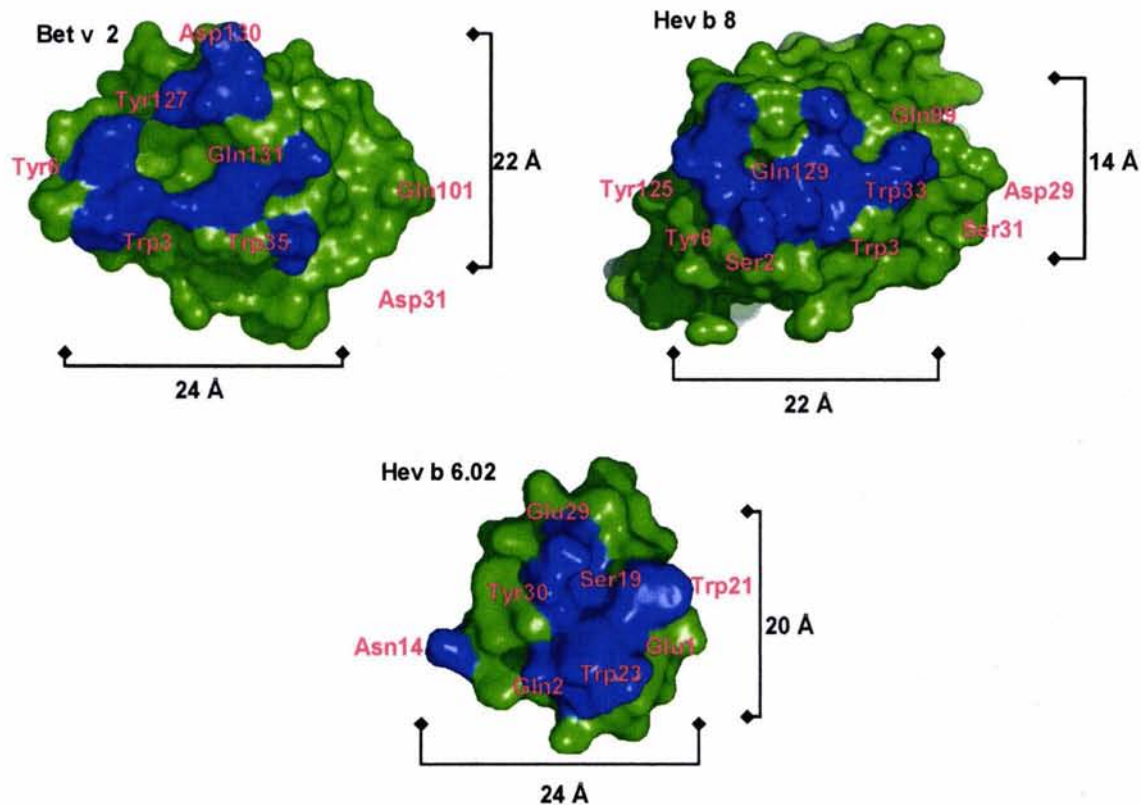


Figura 21. Superficies moleculares de tres alérgenos. En azul se muestran algunos de los residuos de aminoácidos de los epitopos lineales del Bet v 2 y los residuos equivalentes en el Hev b 8. En el Hev b 6.02 se muestran los residuos que se encuentran en la cara de los triptofanos que forman el posible motivo estructural que confiere la alérgenicidad a estas proteínas.

A la fecha no existe información suficiente de estructuras tridimensionales de proteínas alérgicas, ni de los residuos de aminoácidos que forman sus epitopos conformacionales, que nos permita realizar un análisis más detallado. A medida que se resuelvan un mayor número de estructuras y se determinen los residuos que participan en la interacción con los anticuerpos se logrará determinar con mayor precisión si existe un motivo o motivos estructurales que causen que una proteína desencadene una respuesta alérgica en los individuos con predisposición genética.

CONCLUSIONES

La isoforma del Hev b 6.02 difiere de éste en sólo una posición en la secuencia de aminoácidos (Asn14Asp). Esta diferencia en la secuencia da lugar a una disminución del 25% en la afinidad de unión a las IgE. La electroforesis en condiciones nativas confirma la diferencia en el número de cargas encontrada en la secuencia.

Las propiedades espectroscópicas entre el Hev b 6.02 y su isoforma son idénticas. Esto mismo sucede con los parámetros termodinámicos de la unión de estos alergenios a quitotriosa.

La isoforma del Hev b 6.02 es reconocida por prácticamente el mismo número de personas alérgicas que el Hev b 6.02, pero no hay reconocimiento cruzado de estos alergenios cuando se realizan pruebas inmunológicas *in vivo*.

Los triptofanos del Hev b 6.02 se encuentran en un epitopo conformacional que es reconocido por las IgE de personas alérgicas al látex. La modificación química de estos residuos disminuye hasta en un 75% la afinidad de unión del alergenio a los anticuerpos.

La estructura tridimensional de la isoforma es básicamente igual a la del Hev b 6.02, pero el potencial electrostático en ambas difiere principalmente en la zona en que están ubicados los residuos de triptofano. La dimensión del posible epitopo del Hev b 6.02 es similar al determinado a partir de la estructura tridimensional del Bet v 1 y un anticuerpo monoclonal murino.

BIBLIOGRAFÍA

1. Coombs, R. R. A., and P. G. H. Gell. (1968) Classification of allergic reactions responsible for clinical hypersensitivity and disease. p. 575. In P. G. H. Gell and R. R. A. Coombs ed. *Clinical aspects of immunology*, Philadelphia.
2. Rajan, T. V. (2003) The Gell-Coombs classification of hypersensitivity reactions: a re-interpretation. *Trends Immunol.* 7: 376-379.
3. Rolland, J. M. and O'Hehir, R. E. (2002) Allergen immunotherapy: current and new therapeutic strategies. *Allergol. International* 51: 221-231.
4. Gore, C. and Custovic, A (2004) Can we prevent allergy? *Allergy* 59: 151-161.
5. Gould, H.J., Sutton, B.J., Beavil, A.J., Beavil, R.L., McCloskey, N., Coker, H. A., Fear, D. and Smurthwaite, L. (2003) The biology of IgE and the basis of allergic disease. *Annu. Rev. Immunol.* 21: 579-628.
6. Turner, H. and Kinet, J. P. (1999) Signaling through the high-affinity IgE receptor FcεRI. *Nature* 402: B24-B30.
7. Garman, S.C., Wurzburg, B.A., Tarchevskaya, S.S., Kinet, J.P. and Jardetzky T.S. (2000) Structure of the Fc fragment of human IgE bound to its high-affinity receptor FcεRIα *Nature* 406: 259-266.
8. Shakibn F. and Furmonaviciene R. (2000) The significance of enzymatic and other biological activities of proteins in relation to their capacity to serve as allergens. *Clin. Exp. Allergy* 30: 1056-1057.
9. Breiteneder, H. and Ebner, C. (2000) Molecular and biochemical classification of plant-derived food allergens. *J. Allergy Clin. Immunol.* 106: 27-36.
10. Bufe A. (1998) The Biological Function of Allergens: Relevant for the induction of Allergic Diseases? *Int. Arch. Allergy Immunol.* 117: 215-219.
11. Aalberse C. R. (2000) Structural biology of allergens. *J. Allergy Clin. Immunol.* 106: 228-238.
12. Fedorov, A.A., Ball, T., Mahoney, N.M., Valenta R. and Almo, S.C. (1997) The molecular basis for allergen cross-reactivity: crystal structure and IgE-epitope mapping of birch pollen profilin. *Structure* 5: 33-45.

13. Furmonaviciene, R., Sewell H.F. and F. Shakib (2000) Comparative molecular modelling identifies a common putative IgE epitope on cysteine protease allergens of diverse sources. *Clin. Exp. Allergy* 30: 1307-1313.
14. Neudecker, P., Schweimer, K., Nerkamp, J., Scheurer, S., Vieths, S., Sticht, H. and Rösch, P. (2001) Allergic Cross-Reactivity Made Visible: The Solution Structure of the Major Cherry Allergen Pru av1. *J. Biol. Chem.* 276: 22756-22763.
15. Chua, K.Y., Huang, C.H., Shen, H.D. and Thomas, W.R. (1996) Analysis of sequence polymorphism of a major mite allergen, Der p 2. *Clin. Exp. Allergy* 26: 829–837
16. González, E.M., Villalba, M., Lombardero, M., Aalbers, M., van Ree, R. and Rodríguez, R. (2002) Influence of the 3D-conformation, glycan component and microheterogeneity on the epitope structure of Ole e 1, the major olive allergen. Use of recombinant isoforms and specific monoclonal antibodies as immunological tools. *Mol. Immunol.* 39: 93–101.
17. Neudecker, P., Lehrmann, K., Neukamp, J., Haase, T., Wangorsch, A., Foetisch, K., Hoffmann, S., Roesch, P., Vieths, S. and Scheurer, S. (2003) Mutational epitope analysis of Pur av 1 and Api g 1, the major allergens of cherry (*Prunus avium*) and celery (*Apium graveolens*): correlating IgE reactivity with three-dimensional structure. *Biochem. J.* 376: 97–107.
18. Takai, T., Yolota, T., Yasue, M., Nishiyama, C., Yuuki, T., Mori, A., Okudaira, H. and Okumura, Y. (1997) Engineering of the house dust mite allergen Der f 2 for allergen-specific immunotherapy. *Nat. Biotechnol.* 15: 754-758.
19. Nuter A. (1979) Contact urticaria to rubber. *Br. J. Dermatol.* 101: 597-598.
20. Nettis, E., Assennato, G., Ferrannini A. and Corsi, A. (2002) Type I allergy to natural rubber latex and type IV allergy to rubber chemicals in health care workers with glove related skin symptoms. *Clin. Exp. Allergy*, 32: 441-447.
21. Shojaei A.R. and Haas, D.A. (2002) Local Anesthetic Cartridges and Latex Allergy: A Literature Review. *J. Can. Dent. Assoc.* 68: 622-626.
22. INEGI, 1999
23. <http://www.anesth.com/lair/latex/contents.html>

24. <http://www.latexallergy.net/historymain.htm>
25. Yeang, H.Y., Arija, M.S., Faridah, Y.A. and Sunderasan, E. (2002) Allergenic proteins of natural rubber latex. *Methods* 27: 32–45.
26. Nel A. and Gujuluva Ch. (1998) Latex antigens: identification and use in clinical and experimental studies including cross reactivity with food and pollen allergens. *Ann. Allergy Asthma Immunol.* 81: 388-398.
27. Breiteneder H. and Scheiner O. (1998) Molecular and immunological Characteristics of Latex Allergens. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 116: 83-92.
28. Reyes-López C.A. y Rodríguez-Romero, A. (2002) Características bioquímicas y moleculares de alérgenos del látex de *Hevea brasiliensis*. *Alergia, Asma e Inmunol. Ped.* 11: 92-100.
29. Ferreira, M. and Carlos A.G., (1999) Latex: a complex allergy. *Allerg. Immunol.* 31: 18-21.
30. Terwisscha van S.A.C., Hennin M. and Dijkstra B.W. (1996) The 1.8 Å resolution structure of hevine, a plant chitinase/lysozyme and analysis of the conserved sequence and structure motifs of glycosyl hydrolase family 18. *J. Mol. Biol.* 262: 243-257.
31. Posch A., Wheeler C.H., Chen Z., Flagge A., Dunn M.J., Papentuss F., Raulf-Hemsoth M. and Baur X. (1999) Class I endochitinase containing a hevein domain the causative allergen in latex-associated avocado allergy. *Clin. Exp. Allergy* 29: 667-672.
32. Rojas E., Llinas P., Rodríguez-Romero A., Hernández C., Linares M., Zenteno E. and Lascurain R. (2001) Hevein, an allergenic lectin from rubber latex, activates human neutrophils' oxidative burst. *Glycoconj J.* 4: 339-45.
33. Rodríguez-Romero A., Ravichandran K.G. and Soriano-García M. (1991) Crystal structure of hevein at 2.8 Å resolution. *FEBS* 291: 307-309.
34. Reyes-López, C.A., Hernández-Santoyo, A., Pedraza-Escalona, M., Mendoza, G., Hernández-Arana A. and Rodríguez-Romero, A. (2004). Insights into a conformational epitope of Hev b 6.02 (hevein). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 314: 123-130.

35. Andersen, N.H, Cao, B., Rodríguez-Romero, A. and Arreguín, B. (1993) Hevein: NMR Assignment and assessment of solution-state folding for the agglutinin-toxin motif. *Biochemistry* 32: 1407-1422.
36. Beezhold, D.H., Kostyal, D.A. and Sussman, G.L. (1997) IgE epitope analysis of the hevein preprotein, a mayor latex allergen. *Clin Exp. Immunol.* 108: 114-121.
37. Vestling, M.M., Nelly, A.M. and Fenselau, C. (1994) Optimization by mass spectrometry of a tryptophan-specific protein cleavage reaction. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 8: 786-790.
38. Omenn, G.S., Fontana, A. and Anfinsen, C.B. (1970) *J. Biol. Chem.* 254: 1895-1902.
39. García-Hernández, E., Zubillaga, R.A., Rojo-Domínguez, A., Rodríguez-Romero, A. and Hernández-Arana, A. (1997) New insights into the molecular basis of lectin carbohydrate interactions: a calorimetric and structural study of the association of hevein to oligomers of N-acetylglucosamine. *Proteins* 29: 467-477.
40. Otwinowski, Z. and Minor, W. (1997) Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. *Meth. Enz.* 276: 307-326.
41. Collaborative Computational Project, Number 4. (1994) *Acta Crystallogr. Sect. D* 50: 760-763.
42. Brünger, A.T., Adams, P.D., Clore, G.M., DeLano, W.L., Gros, P., Grosse-Kunstleve, R.W., Jiang, J.S., Kuszewski, J., Nilges, M., Pannu, N.S., Read, R.J., Rice, L.M., Simonson, T. and Warren, G.L. (1998) A new software suite for macromolecular structure determination. *Acta Crystallogr. Sect. D* 54: 905-921.
43. Kleywegt, G.J. and Jones, T.A. (1998) Data bases in protein crystallography. *Acta Crystallogr. Sect. D* 54, 1119-1131
44. Sheldrick, G.M., and Schneider, T.A. (1997) SHELXL: high-resolution refinement. *Methods Enz.* 277: 319-343.
45. Navasa, J. (1994) AMoRe: an automated package for molecular replacement. *Acta Crystallogr. Sect. A* 50: 157-163.

-
46. Rodríguez-Romero, A., Arreguín, B. and Henández-Arana, A. (1989) Unusual far-ultraviolet circular dichroism of wheat germ agglutinin and hevein originated from cystine residues. *Biochim. Biophys. Acta* 998: 21-24.
 47. Vignal, A., Milan, D., Sancristobal M. and Eggen, A. (2002) A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics. *Genet. Sel. Evol.* 34: 275-305.
 48. LeVan, T.D., Bloom, T.W., Bailey, T.J., Karp, C.L., Jalonen, M., Martínez, F.D. and Vercelli, D. (2001) A common single nucleotide polymorphism in the CD14 promoter decreases the affinity of Sp protein binding and enlases transcriptional activity. *J. Immunol.* 167: 5838-5844.
 49. Mizuno, Y., Puca, A.A., O'Brien, K.F., Beggs, A.H. and Kunkel, L.M. (2001) Genomic organization and single-nucleotide polymorphism map of desmuslin, a novel intermediate filament protein on chromosome 15q26.3 *BMC Genetics.* 2: 8.
 50. Karisola, P., Mikkola, J., Kalkkinen, N., Airene, K.J., Laitinen, O.H., Repo, S., Pentikäinen, O.T., Reunala, T., Turjanmaa, K., Johnson, M.S., Palosuo, T., Kulomaa, M.S. and Alenius, H. (2004) Construction of hevein (Hev b 6.02) with reduced allergenicity for immunotherapy of latex allergy by comutation of six amino acid residues on the conformational IgE epitopes *J. Immunology.* 172: 2621–2628.
 51. Mirza, O., Henriksen, A., Ipsen, H., Larsen, J.N., Wissenbach, M., Spangfort, M.D. and Gajhede, M. (2000) Dominant epitopes and allergic cross-reactivity: complex formation between a Fab fragment of a monoclonal murine IgG antibody and the major allergen from birch pollen Bet v 1. *J. Immunology.* 165: 331–33.
 52. Fedorov, A.A., Ball, T., Mahoney, M.N., Valenta, R. and Almo, C.S. (1997) The molecular basis for allergen cross-reactivity: crystal structure and IgE-epitope mapping of birch pollen profilin. *Structure* 5: 33-45.

ANEXO

1. **Reyes-López C.A.** y Rodríguez-Romero, A. (2002) Características bioquímicas y moleculares de alérgenos del látex de *Hevea brasiliensis*. *Alergia, Asma e Inmunol. Ped.* 11: 92-100.

2. **Reyes-López, C.A.**, Hernández-Santoyo, A., Pedraza-Escalona, M., Mendoza, G., Hernández-Arana A. and Rodríguez-Romero, A. (2004). Insights into a conformational epitope of Hev b 6.02 (hevein). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 314: 123-130.



Características bioquímicas y moleculares de alergenios del látex de *Hevea brasiliensis*

QFB César Augusto Sandino Reyes López,* Dra. Adela Rodríguez Romero**

RESUMEN

En los últimos años las reacciones de hipersensibilidad de tipo I, ocasionadas por algunas proteínas del látex de *Hevea brasiliensis* (hule), se han incrementado de forma importante hasta llegar a ser un problema de salud pública ocupacional en muchos países. Esto ha generado un interés especial por entender las bases moleculares e inmunológicas del reconocimiento de estos alergenios por las IgE's de personas alérgicas a este material. Recientemente se han realizado una gran cantidad de estudios moleculares e inmunológicos sobre los alergenios del látex, lo que ha permitido que once proteínas del hule sean consideradas como las principales que participan en la sensibilización de las personas y se les ha asignado una nomenclatura oficial. Estos estudios sentarán las bases para el desarrollo de mejores métodos de diagnóstico y proveerán de nuevas herramientas para emplearse en procesos de inmunoterapia.

Palabras clave: Alergenios, látex, *Hevea brasiliensis*, métodos de diagnóstico.

ABSTRACT

In recent years, type I hypersensitivity reactions produced by some latex proteins from Hevea brasiliensis (rubber), have importantly been increased becoming a public health problem in many countries. This has generated a special interest for understanding the molecular and immunological basis of allergen recognition by the IgE's, in persons allergic to latex. Recently, several biochemical and immunological studies on latex allergens have been performed, indicating that eleven proteins are responsible of causing sensitization in patients; therefore, they have been given an allergen nomenclature designation. These studies will be useful in the development of diagnostic tools, as well as in immunotherapy.

Key words: Allergens, latex, *Hevea brasiliensis*, diagnostic tools.

INTRODUCCIÓN

La alergia o hipersensibilidad de tipo I es el desarrollo de una respuesta inmune desencadenada por una sustancia comúnmente inocua llamada alergenio. Esta respuesta de hipersensibilidad causa daño a los tejidos y puede desarrollar una respuesta inflamatoria que desencadene en

un shock anafiláctico. En base al mecanismo que causa el daño al hospedero, la hipersensibilidad se divide en cuatro tipos: la de tipo I, que es mediada por las inmunoglobulinas de tipo E (IgE's) e induce la activación de los mastocitos y los basófilos. La hipersensibilidad de tipo II y la de tipo III son mediadas por las IgG y activan la cascada del complemento, que es una serie de even-



tos catalíticos que forman un complejo capaz de destruir las membranas celulares. Finalmente, la hipersensibilidad de tipo IV que es mediada por células T citotóxicas.¹

Los alérgenos pueden ser proteínas de fuentes muy diversas como de plantas, insectos o animales. Cuando un alérgeno entra al organismo es reconocido por el complejo formado por las IgE's y los receptores específicos para estos anticuerpos, localizados en las membranas de las células cebadas y los basófilos, provocando la liberación de histamina, leucotrienos y otros mediadores inflamatorios contenidos en los gránulos presentes en estas células y algunos otros de nueva síntesis. Esta respuesta deja sensibilizadas a las mucosas y a la piel, y predispuestas a reaccionar con el alérgeno nuevamente.²

El látex del árbol del hule (*H. brasiliensis*) es una fuente muy importante de alérgenos que se han estudiado, a partir de la década pasada, a nivel inmunológico principalmente. El primer reporte de alergia al látex lo realizó Nuter en 1979;³ sin embargo, fue hasta los años 80 en que se observó un incremento importante en el número de personas alérgicas a productos elaborados con látex. Esto ocurrió por el aumento desmesurado en el uso de guantes de hule cuando se atendían personas heridas o cuando se realizaban exámenes de fluidos corporales, ya que se había descubierto que el VIH podía transmitirse por medio de dichos fluidos. Aunado a esto, el uso de condones como medida de prevención al contagio de VIH ha contribuido al aumento en el número de personas que tienen contacto con productos elaborados con látex. Por otra parte, el avance en la tecnología de las intervenciones quirúrgicas ha sido acompañado del desarrollo de accesorios elaborados con látex como catéteres, equipos de venoclisis, torniquetes, etc., además de que el uso del mismo en artículos del hogar como balones, zapatos deportivos, ligas, etc., se ha incrementado aceleradamente en los últimos años. De esta forma, las estimaciones más recientes en los EUA muestran que del 10 al 18% de los trabajadores del área de la salud sufren de alergia al látex. En México no se cuenta con estudios estadísticos formales que nos permitan estimar la cantidad de personas que son afectadas por los alérgenos del látex; sin embargo, se ha observado que la producción de guantes de látex en México aumentó de 74.1 millones de pares en 1994 a 113.3 millones de pares en 1998.⁴⁻⁶

El látex es el citoplasma de las células laticíferas del árbol del hule (*H. brasiliensis*), el cual contiene más de 200 proteínas distintas, que constituyen alrededor del 1% de dicho material.⁷ Del total de proteínas, 15 con masas moleculares de 4.7 kDa a 57 kDa, son las que se han reconocido como las que provocan las respuestas alérgicas. Once tienen designadas una nomenclatura

oficial por el Subcomité de Nomenclatura de Alérgenos y las otras cuatro no la poseen.⁸

Los principales alérgenos del hule son los que se han denominado como Hev b 1 a Hev b 11. Éstos además muestran reactividad cruzada con algunos alérgenos de alimentos como el aguacate, el kiwi, el plátano y con algunos aeroalérgenos que afectan la mucosa respiratoria, principalmente los derivados de pólenes.⁹

En una revisión realizada por Breiteneder y Scheiner en 1998,⁸ reportaron que los alérgenos del látex producen diferentes tipos de reacción en los diferentes grupos de pacientes alérgicos al látex. El 81% de los pacientes con espina bífida (EB), que son alérgicos al látex, producen IgE's principalmente contra los alérgenos Hev b 1; el 83% para Hev b 3; el 56% para Hev b 5 y sólo el 27% para Hev b 6.02. Por otra parte, el 75% de los pacientes alérgicos al látex que tienen como ocupación la industria y/o centros de salud, desarrollan anticuerpos IgE principalmente contra Hev b 6.02 (heveína), el 21% para Hev b 6.01 (proheveína), el 23% para Hev b 7 y el 21% para Hev b 2. Recientemente se han obtenido datos muy interesantes sobre el alérgeno Hev b 8 o profilina. En estos estudios el 100% de los pacientes alérgicos al látex que padecen de EB desarrollaron IgE's para la Hev b 8, y el 95% de los trabajadores de la salud (TAS) alérgicos a este material también desarrollan IgE's para este alérgeno. Ninguno de los pacientes que presentaban alergia a frutas desarrollaron anticuerpos para la profilina del látex.⁸ Por lo que se refiere a caracterización de alérgenos, los mismos autores realizaron una recopilación de los estudios moleculares de alérgenos de látex reportados hasta 1998. De los alérgenos con nomenclatura oficial asignada se han reportado sus pesos moleculares y puntos isoeléctricos. De la mayoría de ellos se conoce su estructura primaria y sólo del Hev b 6.02 y del Hev b 8 su estructura terciaria. De los 4 alérgenos que no cuentan con una nomenclatura oficial, la hevamina A es la que más se ha estudiado. De este alérgeno se ha reportado ya su estructura tridimensional resuelta por difracción de rayos X.¹⁰ De los otros alérgenos, entre los que se encuentran la superóxido manganoso dismutasa, la triosa fosfato isomerasa y un componente del proteosoma, se han reportado sus pesos moleculares y puntos isoeléctricos, pero no se han realizado estudios inmunológicos o moleculares detallados que permitan determinar cual es su importancia en la sensibilización de las personas alérgicas al látex.⁸

Respecto al problema de reactividad cruzada, Posch y colaboradores en 1999¹¹ proponen que las endoquitinasas de clase I presentes en el aguacate y que contienen un dominio de Hev b 6.02 en su estructura, son las responsables de este fenómeno. Se encontró que el 80% de los sueros de pacientes alérgicos al látex resultaron positivos al reconocimiento de la endoquitinasa de 31 KDa del aguacate.¹²



Por otro lado, se han realizado un gran número de estudios que están enfocados a la identificación de los epítomos de los alérgenos que pueden activar a las células T y a los que pueden ser reconocidos por las células B. Para estos estudios se utilizan, en general, péptidos sintéticos cuyas secuencias de aminoácidos representan a las que se encuentran en la macromolécula. Se han tenido avances importantes en la identificación de los residuos de aminoácidos que pueden ser importantes para el reconocimiento de estos polipéptidos por las células T o B, sin embargo, se ha demostrado que la unión de los alérgenos a las IgE's se ve afectada por la conformación tridimensional de éstos, lo que indica que los epítomos que son reconocidos por estos anticuerpos se forman al plegarse la proteína. A estos epítomos se les conoce como conformacionales. Por ejemplo, se ha encontrado que un alérgeno de la garrapata (Der f2), al perder un enlace disulfuro por mutación de un par de aminoácidos, disminuye notablemente su capacidad de unión con las IgE. Asimismo, se ha demostrado que la conformación tridimensional de los alérgenos contribuye a la alergenicidad de éstos, y a la inducción de la inflamación por la respuesta alérgica. Esto último ha dificultado la identificación de los epítomos que son relevantes para que se lleven a cabo las reacciones alérgicas.¹² No obstante estos estudios, aún no se sabe a ciencia cierta si algunos elementos estructurales son los responsables de la unión con las IgE's.

En investigaciones recientes se han hecho esfuerzos por caracterizar a los alérgenos que más dañan a los pacientes en todo el mundo, de esta forma se han determinado algunas características moleculares de los mismos. La importancia de dicha caracterización se ha hecho patente en la búsqueda de alternativas profilácticas que combatan, de forma eficaz, a las alergias que cada día afectan a más personas en todo el mundo. Asimismo, es importante en el desarrollo de pruebas diagnósticas integrales para la detección temprana de las alergias.

PRINCIPALES CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS Y MOLECULARES DE LOS ALÉRGENOS DEL LÁTEX DE *H. BRASILIENSIS*

Alergenos con nomenclatura oficial asignada

Hev b 1

El Hev b 1 o factor de elongación del hule es una proteína de 137 residuos de aminoácidos con una masa molecular de 14.6 kDa. Se ha observado *in vitro* que participa en la polimerización del isopreno, monómero presente en el látex de *H. brasiliensis*, que le confiere las características de resistencia, flexibilidad y durabilidad a los artículos elaborados con este material.¹³ Este alérgeno puede aislarse de las partículas de látex

mediante el uso de detergentes, obteniéndose con un grado de pureza importante. Se ha descrito su estructura primaria¹⁴ así como el gen que codifica para su secuencia de aminoácidos.¹⁵ El Hev b 1 fue la primera proteína caracterizada como alérgeno del látex y desde 1996 ya se habían identificado los epítomos lineales que son reconocidas por IgE's de pacientes alérgicos al Hev b 1.^{16,17} Recientemente se describió su expresión en *Escherichia coli*, lo que permitirá contar con cantidades suficientes para realizar estudios moleculares e inmunológicos.¹⁸

La frecuencia de sensibilización para este alérgeno es de alrededor del 80% para niños alérgicos al látex con EB, y del 50% para TAS con alergia al látex.¹¹

Hev b 2

Fue descrito por primera vez como alérgeno por Sundehrasan en 1995.¹⁹ Este alérgeno es una β -1,3-glucanasa que cataliza la hidrólisis de polímeros de β -1,3-glucanos. Los glucanos son los componentes principales de la pared celular de los hongos filamentosos, por lo que esta enzima sirve de protección para la planta. Este alérgeno se encuentra clasificado dentro de la familia de proteínas relacionadas con la patogénesis de clase 2 (PR-2).²⁰⁻²²

El Hev b 2 es una proteína glicosilada de 374 aminoácidos con un peso molecular calculado de 41.3 kDa; sin embargo, la masa molecular estimada por electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE por sus siglas en inglés) es de 35 kDa aproximadamente. Esto podría ser explicado considerando que los azúcares que se encuentran unidos a este polipéptido pueden cambiar su movilidad electroforética.²¹ Se ha estimado que entre el 20% y 60% de las personas alérgicas al látex producen IgE's específicas para este alérgeno.¹¹

La secuencia de aminoácidos de esta proteína está altamente conservada en plantas.²⁰ Esto podría explicar la antigenicidad cruzada con alérgenos de otras fuentes, no obstante, hasta la fecha no se han realizado estudios moleculares enfocados a determinar cuáles son los motivos estructurales relevantes para su alergenicidad y antigenicidad cruzada.

Hev b 3

El Hev b 3 es un alérgeno que se puede extraer de las partículas del látex de *H. brasiliensis* que tienen un diámetro de 70 nm. No se sabe con precisión cuál es su actividad biológica en la planta, pero se ha propuesto que participa en la biosíntesis del hule. En 1996 Yeang²⁴ y colaboradores reportaron que esta proteína sufre fragmentación aun cuando se almacena a -20° C, produciéndose moléculas de entre 5 y 24 kDa. Este alérgeno afecta al 83% los niños alérgicos al látex, principalmente a los que sufren de EB.²⁵



De este alérgeno se ha reportado su clonación, expresión y su secuencia, mostrando una identidad del 47% con el Hev b 1 y del 54% con la proteína PvSRP de alubia, que está relacionada con el estrés provocado por metales pesados. El cDNA del Hev b 3 codifica para una proteína ácida de 204 residuos de aminoácidos con un pI de 4.8 y una masa molecular de 22.3 kDa.²⁶

Recientemente se han reportado los aminoácidos que son importantes para la activación y proliferación de células T de individuos alérgicos al látex, destaca el epítipo formado por los aminoácidos 103 a 114 de este alérgeno, el cual presenta reactividad con células T del 50% de estas personas.²⁷

Se ha observado que los anticuerpos producidos por algunas personas en contra de este alérgeno pueden unirse también al Hev b 1 y que en otros casos se producen anticuerpos que sólo se unen con alguno de los dos alérgenos. Por otro lado, también existe un epítipo lineal que es reconocido exclusivamente por niños alérgicos con EB. Estas observaciones sugieren que estas proteínas contienen regiones en su superficie que pueden ser similares. La caracterización de estas regiones pueden proporcionar información relevante sobre los motivos estructurales que pueden ser importantes en la alergenidad de estos polipéptidos.²⁸

Hev b 4

Este alérgeno es una proteína ácida (pI 4.5) presente en el citosol de las células laticíferas del árbol de *H. brasiliensis*, que forma parte de un complejo llamado microhélice. En 1996 Sunderasan y colaboradores describieron esta proteína como un polipéptido que puede ser unido por IgE's de personas alérgicas al látex.¹⁹ La proteína pura tiene un peso molecular de 50 a 57 kDa y se ha visto que se encuentra como homodímero. La secuencia del extremo amino terminal no muestra homología con ninguna proteína reportada a la fecha. Hasta este momento no se han reportado estudios moleculares adicionales y se desconoce su importancia en la sensibilización de personas alérgicas al látex.^{8,11}

Hev b 5

Es uno de los principales alérgenos del látex, afecta al 92% de los TAS y al 50% de los niños con EB.^{8,29} En 1996 dos grupos reportaron la clonación y expresión del Hev b 5 simultáneamente. Este alérgeno consta de 151 residuos de aminoácidos, con un pI de 3.5 y una masa molecular calculada de 16 kDa, pero su desplazamiento electroforético en geles de SDS-PAGE corresponde a una masa molecular de 36 kDa, lo cual sugiere que se encuentra como un homodímero en estas condiciones. La secuencia de aminoácidos del Hev b 5 tiene alrededor del 50% de identidad con una proteína del kiwi, fruta con la que frecuentemente se ha observado antigenicidad cruzada en pacientes alérgi-

cos al látex. A la fecha se desconoce su actividad biológica en el árbol del hule.^{29,30}

En 1999 Beezhold y colaboradores reportaron algunos epítipos lineales para las IgE's de personas sensibilizadas por este alérgeno.³¹ Ellos destacan que los residuos que son reconocidos por estos anticuerpos no muestran homología con ningún otro alérgeno reportado incluyendo a la proteína del kiwi con la que tiene 50% de identidad; esto es, los epítipos lineales se encuentran en las regiones que no presentan similitud. Recientemente, mediante el uso de mutantes, se han identificado algunos residuos de aminoácidos importantes del Hev b 5 para su unión con las IgE's, logrando disminuir 4,500 veces su constante de unión.³²

Hev b 6.01

La proheveína es el alérgeno del látex que posiblemente más se haya estudiado hasta la fecha. Éste es un polipéptido con una masa molecular de 20 kDa. La proteína madura consta de un dominio amino terminal de 43 residuos de aminoácidos conocida como heveína (Hev b 6.02, masa molecular de 4.7 kDa) y un dominio carboxilo terminal de 144 residuos de aminoácidos y una masa molecular de 14 kDa (Hev b 6.03).³³ El Hev b 6.02 es la proteína más abundante en los lutoides del látex, es rica en cisteínas que forman 4 puentes disulfuro. Se ha demostrado que se une de forma específica a polímeros de *N*-acetilglucosamina por lo que se le puede considerar como lectina.³⁴ También se ha observado que *in vitro* presenta propiedades antifúngicas, por lo que podría también participar en la defensa de la planta en contra de hongos.³⁵ Por otra parte, se ha propuesto que este alérgeno participa en la coagulación del látex mediante su unión a residuos de *N*-acetilglucosamina presentes en una proteína glicosilada de 22 kDa, localizada en la superficie de las partículas del látex.³⁶

Existen varios indicios de que Hev b 6.02 es un alérgeno importante ya que participa en la sensibilización del 80% de los TAS y del 50% al 86% de niños con EB. Varios reportes han demostrado que en Hev b 6.02 existen los principales epítipos para IgE's producidas contra el Hev b 6.01 y que el Hev b 6.03 participa en menor grado en la sensibilización de pacientes alérgicos al látex. Este alérgeno se encuentra de forma abundante en los guantes elaborados con látex de *H. brasiliensis* y se ha demostrado que tiene características moleculares y propiedades inmunológicas similares a las que presenta la proteína extraída del látex sin procesar, lo que indica que resiste el proceso de manufactura sin modificaciones importantes.³⁷⁻³⁹

Adicionalmente se ha reportado la clonación y expresión del Hev b 6.01 y de los dominios Hev b 6.02 y Hev b 6.03, con características similares a las de los alérgenos purificados del látex, en lo que se refiere a su capacidad de unirse a las IgE's. Además, se han identificado



los epítomos lineales que son reconocidos por las IgE's producidas por pacientes alérgicos al Hev b 6.01 y al Hev b 6.02.^{40,41}

Otro aspecto importante de este alérgeno es que su secuencia de aminoácidos ha mostrado estar conservada en gran medida en proteínas que participan en los procesos de defensa de plantas. Principalmente, se ha determinado en las quitinasas de clase I, enzimas que hidrolizan la quitina presente en la pared celular de hongos e insectos. Estas enzimas se identifican precisamente por contar con un dominio parecido al Hev b 6.02 en su secuencia.⁴² Por lo expuesto anteriormente, se ha propuesto que esta proteína es una de las principales que participan en la antigenicidad cruzada entre látex y plantas o frutas.⁴³ A la fecha se ha podido comprobar que algunas personas con IgE's contra Hev b 6.02 pueden reconocer proteínas con actividad enzimática de quitinasa en plátano, aguacate y kiwi principalmente.^{11,44-47}

El Hev b 6.02 es uno de los pocos alérgenos de los cuales se conoce su estructura tridimensional en estado cristalino y en solución. Además se ha elucidado la estructura del complejo Hev b 6.02-quitobiosa utilizando técnicas de resonancia magnética nuclear.⁴⁸⁻⁵¹ Recientemente se ha resuelto la estructura del Hev b 6.02 a 1.5 Å de resolución con técnicas de difracción de rayos-X, lo que permitirá conocer con más detalle aspectos estructurales de la superficie de este alérgeno, así como la presencia de otras moléculas unidas en sitios específicos. (Rodríguez-Romero A. (2002) *et al.* Manuscrito en preparación).

A pesar de la gran cantidad de información con la que se cuenta de este alérgeno, a la fecha no se ha podido determinar cuál o cuáles son los motivos estructurales que participan en la sensibilización de personas alérgicas al Hev b 6, que permitan el diseño de moléculas hipoaérgicas que puedan ser empleadas en los procesos de inmunoterapia seguros y eficaces.

Hev b 7

En 1996 Beezhold y colaboradores reportaron un alérgeno del látex que es reconocido por un número importante de TAS y niños con EB. Este alérgeno es una proteína del tipo de la patatina, proteína de almacenamiento, que participa en la protección de la planta de la papa.⁵² Recientemente, se ha reportado la clonación y caracterización de este alérgeno y de varias isoformas que presentan reactividades similares en su unión a las IgE's. El cDNA de este alérgeno codifica para una proteína de 388 residuos de aminoácidos con una masa molecular de 42.9 kDa.⁵³⁻⁵⁵

Los estudios de prevalencia difieren en los porcentajes de niños y adultos que son sensibilizados con este alérgeno. En adultos se ha estimado que la prevalencia es del 8% al 61% y en el caso de niños varía del 3% al 40%. Estos resultados pueden tener esa variación tan

importante debido a que se utilizaron diferentes técnicas *in vitro* para su estudio y las poblaciones que se estudiaron son de distintos grupos de riesgo. Adicionalmente se usaron diferentes isoformas del Hev b 7 en estos estudios.⁵⁶

Hev b 8

Este alérgeno pertenece a una familia de proteínas estructurales llamadas profilinas. En 1995 Vallier la describió como una proteína que se une a las IgE's de personas alérgicas al látex.⁵⁷ Esta profilina es una cadena polipeptídica de 131 residuos de aminoácidos y una masa molecular de 14.5 kDa.⁵⁸ Las profilinas tienen conservados los residuos que participan en la unión a actina, componente de los microfilamentos del citoesqueleto en plantas y animales. La identidad en la secuencia de aminoácidos entre ellas es muy variable (20% a 80% aproximadamente); sin embargo, su estructura tridimensional está altamente conservada. Recientemente la estructura tridimensional de este alérgeno fue resuelta por difracción de rayos X a 3.1 Å de resolución, encontrándose una gran similitud con otras profilinas reportadas.

Hev b 9

Esta proteína alérgica presenta actividad de enolasa y tiene una masa molecular de 48 kDa. Las enolasas son enzimas que participan en la glucólisis y en la gluconeogénesis en las células eucarióticas y procarióticas y poseen secuencias altamente conservadas en la mayoría de los organismos que las producen. Este alérgeno fue el primero descrito de *Saccharomyces cerevisiae*, y se ha observado antigenicidad cruzada con enolasas provenientes de una gran variedad de hongos, levaduras y mohos. Recientemente se reportó la secuencia de aminoácidos y nucleótidos de la enolasa del látex.⁵⁹ Estudios inmunológicos demuestran que este alérgeno participa en la sensibilización del 14% de las personas alérgicas al látex.

Hev b 10

Este alérgeno es un polipéptido con actividad de manganeso superóxido dismutasa que participa en la sensibilización de pacientes alérgicos al látex.⁶⁰ Estudios inmunológicos realizados con esta proteína recombinante revelaron que solamente 2 de 20 pacientes alérgicos al látex producen IgE's específicas en su contra. En estos ensayos se detectaron también anticuerpos específicos contra antígenos de *Aspergillus fumigatus*, lo cual sugiere reactividad cruzada entre el Hev b 10 y otras manganeso superóxido dismutasas.⁶¹

Hev b 11

Recientemente se reportó a este alérgeno como una quitinasa de clase I de 33 kDa. Como todas las quitina-



sas de esta clase, esta proteína presenta un dominio de unión a quitina conocido como dominio de heveína. La secuencia de aminoácidos de este dominio tiene 58% de identidad con el Hev b 6.02. Por otro lado, en estudios recientes se ha observado que la unión de las IgE's a la proteína recombinante rHev b 11 puede ser inhibida hasta en un 87% con Hev b 6.02.⁶² Por otra parte, sólo el 15% de los pacientes alérgicos a frutas que producen anticuerpos contra rHev b 11 mostraron reactividad contra el Hev b 6.02. Estos resultados sugieren que existen regiones del Hev b 11 que inmunogénicamente son distintas a las que se encuentran en el Hev b 6.02, o bien que están en una región diferente de donde se encuentra el dominio de heveína.

ALERGENOS SIN NOMENCLATURA OFICIAL ASIGNADA EN EL LÁTEX DE *H. BRASILIENSIS*

Hevamina

Ésta es una enzima con actividad de lisozima y quitinasa, que también está relacionada con la protección del árbol del hule en contra de insectos, hongos y bacterias.⁶³ Esta proteína pertenece al grupo 3 de proteínas relacionadas con la patogénesis (PR-3). En el aspecto estructural se conoce la secuencia de aminoácidos completa⁶⁴ así como su estructura tridimensional a 1.8 Å de resolución.¹⁰ Este alérgeno participa muy poco en la sensibilización de pacientes alérgicos al látex, sólo 1 de 29 personas alérgicas al látex producen IgE's específicas en contra de la hevamina; sin embargo, se ha observado que este polipéptido se encuentra en los guantes de látex y que conserva su actividad enzimática,

lo que sugiere que esta enzima también resiste el proceso de manufactura.⁶⁵

Quitinasa de clase II, triosa fosfato isomerasa y componente de proteosoma

Estas proteínas han sido identificadas como posibles alérgenos en el látex secuenciando su extremo amino terminal y comparando estas secuencias con bancos de datos de proteínas. Aún no se han caracterizado a nivel molecular o inmunológico, por lo que se desconoce su importancia en la sensibilización de personas alérgicas al látex.⁶⁰

DISCUSIÓN

El fenómeno de hipersensibilidad de tipo I ha cobrado gran importancia a nivel mundial debido al dramático incremento en el número de personas que se ven afectadas por esta patología. La predisposición genética, las condiciones ambientales y la frecuencia de exposición a los alérgenos son las principales características observadas que parecen participar de forma importante durante la sensibilización de las personas.

En el caso de la alergia al látex se ha despertado un interés creciente por estudiar y comprender las características moleculares que participan en la respuesta de hipersensibilidad ocasionada por algunas proteínas presentes en los productos elaborados con este material.

La gran mayoría de los estudios realizados a los alérgenos del látex han sido enfocados principalmente al área inmunológica y en menor grado al área molecular. El *cuadro 1* resume las características moleculares

Cuadro I. Características moleculares de los principales alérgenos del látex.

Alérgeno	Función en la planta	Epítopos lineales para células T o B	Estructura tridimensional
Hev b1	Biosíntesis del látex	TyB	No
Hev b 2	Defensa	No	No
Hev b 3	Biosíntesis del látex	T y B	No
Hev b 4	Estructural	No	No
Hev b 5	Desconocida	B	No
Hev b 6.01	Protección y coagulación del látex	T y B	No
Hev b 6.02	Protección y coagulación del látex	T y B	Sí
Hev b 7	¿Protección?	No	No
Hev b 8	Estructura y señalización	No	Sí
Hev b 9	Biosíntesis de nutrientes	No	No
Hev b 10	Eliminación de radicales libres	No	No
Hev b 11	Protección	No	No
Hevamina	Protección	No	Sí
Quitinasa de clase II	Protección	No	No
Triosa fosfato isomerasa	Biosíntesis de nutrientes	No	No
Componente de proteosoma	Catabolismo de proteínas	No	No



que se han descrito de los alérgenos del látex. Como se puede observar en este cuadro, la secuencia de nucleótidos y de aminoácidos de los principales alérgenos de *H. brasiliensis* es conocida y también está descrita su función para la mayoría de ellos. Es importante resaltar que muchos de ellos juegan un papel importante en la protección y defensa de la planta. Por otro lado, a la fecha únicamente se cuenta con las estructuras tridimensionales de dos de los principales alérgenos de este material. El estudio detallado de la estructura tridimensional de estas proteínas permitirá identificar cuáles son los residuos de aminoácidos que, por su accesibilidad y características en la molécula, podrían estar participando en la unión con las IgE's. Estos estudios también permitirán encontrar los posibles motivos estructurales que son compartidos entre los alérgenos que han sido identificados como los responsables de la antigenicidad cruzada entre el látex y frutas o plantas. Estos conocimientos podrán ser utilizados en el diseño de moléculas hipolárgénicas que sirvan para el diagnóstico de la alergia al látex y en los procesos de inmunoterapia específica.

BIBLIOGRAFÍA

1. Janeway AC, Travers P. *Immunobiology*, 2ª ed., London, Curren Biology Ltd. 1996; p. 11: 3-11:9.
2. van Neerven RJ, Ebner C, Yssel H, Kapsenberg ML, Lamb RJ. T-cell responses to allergens: epitope-specificity and clinical relevance. *Immunology Today* 1996; 17: 526-532.
3. Nuter A. Contact urticaria to rubber. *Br J Dermatol* 1979; 101: 597-598.
4. Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática. *XII Censo General de Población y Vivienda*. 2002. <http://www.anesth.com/lair/latex/contents.html>
5. <http://www.latexallergy.net/historymain.htm>
7. Nel A, Gujuluva Ch. Latex antigens: identification and use in clinical and experimental studies including cross reactivity with food and pollen allergens. *Ann Allergy Asthma & Immunol* 1998; 81: 388-398.
8. Breiteneder H, Scheiner O. Molecular and immunological characteristics of latex allergens. *Int Arch Allergy Immunol* 1998; 116: 83-92.
9. Ferreira MB, Carlos AG. Latex: a complex allergy. *Allerg Immunol* 1999; 31: 18-21.
10. Terwisscha SA, Hennin M, Dijkstra BW. The 1.8 Å resolution structure of hevamina, a plant chitinase/lysozyme and analysis of the conserved sequence and structure motifs of glycosyl hydrolase family 18. *J Mol Biol* 1996; 262: 243-257.
11. Posch A, Wheeler CH, Chen Z, Flagge A, Dunn MJ, Papentuss F, Raulf-Hemsoth M, Baur X. Class I endochitinase containing a hevein domain the causative allergen in latex-associated avocado allergy. *Clin Exp Allergy* 1999; 29: 667-672.
12. Bufe A. The biological function of allergens: Relevant for the induction of allergic diseases? *Int Arch Allergy Immunol* 1998; 117: 215-219.
13. Mark SD, David R. Rubber Elongation Factor from *Hevea brasiliensis*. Identification, characterization, and role in rubber biosynthesis. *J Biol Chem* 1989; 264: 18608-18617.
14. Mark SD, William JH, Bell J, William K, David RL. Amino acid sequence of rubber elongation factor protein associated with rubber particles in *Hevea latex*. *J Bio Chem* 1989; 264: 18618-18626.
15. Goyvaerts E, Dennis M, Light D, Chau NH. Cloning and sequencing of the cDNA encoding the rubber elongation factor of *Hevea brasiliensis*. *Plant Physiol* 1991; 97: 317-321.
16. Chen Z, Van Kampen V, Raulf-Heimsoth M, Baur X. Allergenic and antigenic determinants of latex allergen Hev b 1: peptide mapping of epitopes recognized by human, murine and rabbit antibodies. *Clin Exp Allergy* 1996; 26: 406-415.
17. Czuppon AB, Chen Z, Rennert S, Engelke T, Meyer HE, Heber M, Baur X. The rubber elongation factor of rubber trees (*Hevea brasiliensis*) is the major allergen in latex. *J Allergy Clin Immunol* 1993; 92: 690-697.
18. Rhis AP, Chen Z, Schumacher S, Rozynek P, Cremer R, Lundberg M, Raulf-Heimsoth M, Petersen A, Baur X. Recombinant Hev b 1: large-scale production and immunological characterization. *Clin Exp Allergy* 2000; 30: 1285-1292.
19. Sunderasan E, Hamzah S, Hamid S, Ward MA, Yeang HY, Cardoso MJ. Latex B-serum b-1,3-glucanase (Hev b 2) and a component of the microhelix (Hev b 4) are major latex allergens. *J Nat Rubb Res* 1995; 10: 82-99.
20. Midoro-Horiuti T, Brooks EG, Goldblum RM. Pathogenesis-related proteins of plants as allergens. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2001; 87: 261-71.
21. Subroto T, van Koningsveld GA, Schreuder HA, Soedjanaatmadja UM, Beintema JJ. Chitinase and beta-1,3-glucanase in the lutoid-body fraction of *Hevea latex*. *Phytochemistry* 1996; 43: 29-37.
22. Meade JB, Weissman NA, Beezhold HD. Latex allergy: past and present. *Int Immunopharmacology* 2002; 2: 225-238.
23. Kurup VP, Yeang HY, Sussman GL, Bansal NK, Beezhold DH, Kelly KJ, Hoffman DR, Williams B, Fink JN. Detection of immunoglobulin antibodies in the sera of patients using purified latex allergen. *Clin Exp Allergy* 2000; 30: 359-369.
24. Yeang YH, Cheong FK, Sunderasan E, Hamzah S, Chew PN, Hamid S, Hamilton GR, Cardoso JM. The 14.6 kD rubber elongation factor (Hev b 1) and 24 kD (Hev b 3) rubber particle proteins are recognized by IgE from patients with spina bifida and latex allergy. *J Allergy Clin Immunol* 1996; 98: 628-39.
25. Alenius H, Palosuo T, Kelly K, Kurup V, Reunala T, Mäkinen-Kiljunen S, Turjanmaa K, Fink J. IgE reactivity to 14-kD and 27-kD natural rubber proteins in latex-allergic children with spina bifida and other congenital anomalies. *Int Arch Allergy Immunol* 1993; 102: 61-66.
26. Wagner B, Krebitz M, Buck D, Niggemann B, Yang HY, Han KH, Scheiner O, Breiteneder H. Cloning, expression, and characterization of recombinant Hev b 3, a *Hevea brasiliensis*. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 104: 1084-1092.
27. Bohle B, Wagner B, Vollmann D, Buck D, Niggemann B, Szépfalusi Z, Scheiner O, Breiteneder H, Ebner C. Characterization of T Cell Responses to Hev b 3, an allergen associated with latex allergy in spina bifida patients. *J Immunol* 2000; 164: 4393-4398.
28. Banerjee B, Kanitpong K, Fink JN, Zussman M, Sussman GL, Kelly KJ, Kurup VP. Unique and shared IgE epitopes of Hev b 1 and Hev b 3 in latex allergy. *Mol Immunol* 2000; 37: 789-798.
29. Slater JE, Vedvick T, Arthur-Smith A, Trybul DE, Kekwick RGO. Identification, Cloning, and sequence of a major allergen (Hev b 5) from natural rubber latex (*Hevea brasiliensis*). *J Biol Chem* 1996; 271: 25394-25399.



30. Akasawa A, Hsieh LS, Martin BM, Liu T, Lin Y. A Novel Acidic Allergen, Hev b 5, in latex. Purification, cloning and characterization. *J Biol Chem* 1996; 271: 25389-25393.
31. 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: 1166-1172.
32. Beezhold DH, Hickey VL, Sussman GL. Mutational analysis of the IgE epitopes in the latex allergen Hev b 5. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 107: 1069-1076.
33. Lee HI, Broekcaert WF, Raikhel NV. Co-and post-traslational processing of the hevein preprotein of latex of the rubber tree (*Hevea brasiliensis*). *J Biol Chem* 1991; 266: 15944-15948.
34. Garcia-Hernandez E, Zubillaga RA, Rojo-Dominguez A, Rodriguez-Romero A, Hernandez-Arana A. New insights into the molecular basis of lectin-carbohydrate interactions: a calorimetric and structural study of the association of hevein to oligomers of *N*-acetylglucosamine. *Proteins* 1997; 29: 467-77.
35. Parijs JV, Broekaert WF, Goldstein IJ, Peumans WJ. Hevein: an antifungal protein from rubber-tree (*Hevea brasiliensis*) latex. *Planta* 1991; 183: 258-264.
36. Gidrol X, Chrestin H, Tan HL, Kush A. Hevein, a lectin-like protein from *Hevea brasiliensis* (Rubber Tree) is involved in the coagulation of latex. *J Biol Chem* 1994; 269: 9278-9283.
37. Alenius H, Kalkkinen N, Reunala T, Turjanmaa K, Palosuo T. The Main IgE Binding epitope of a major latex allergen, prohevein, is present in its *N*-terminal 43-amino acid fragment, hevein. *J Immunol* 1996; 156: 1618-1625.
38. Chen Z, Posch A, Lohaus C, Raulf-Heimsoth M, Meyer HE, Baur X. Isolation and identification of hevein as a major IgE-binding polypeptide in *Hevea* latex. *J Allergy Clin Immunol* 1997; 99: 402-409.
39. Ylitalo L, Alenius H, Turjanmaa K, Palosuo T, Reunala T. Environmental and occupational disorders. *J Allergy Clin Immunol* 1998; 102: 659-664.
40. Banerjee B, Wang X, Kelly KJ, Fink JN, Sussman GL, Kurup VP. IgE from latex-allergic patients binds to cloned and expressed B cell epitopes of prohevein. *J Immunol* 1997; 159: 5724-5732.
41. Rozynek P, Posch A, Baur X. Cloning, expression and characterization of the major latex allergen prohevein. *Clin Exp Allergy* 1998; 28: 1418-1426.
42. Collinge DB, Kragh KM, Mikkelsen JD, Nielsen KK, Rasmussen U, Vad K. Plant chitinases. *Plant J* 1993; 3: 31-40.
43. Blanco C, Diaz-Perales A, Collado C, Sánchez-Monge R, Aragoncillo C, Castillo R, Ortega N, Alvarez M, Carrillo T, Salcedo G. Class I chitinases as potential panallergens involved in the latex-fruit syndrome. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 103: 507-513.
44. Lavaud F, Prevost A, Cossart C, Guerin L, Bernard J, Kochman S. Allergy to latex, avocado pear, and banana: Evidence for 30 kD antigen in immunoblotting. *J Allergy Clin Immunol* 1995; 95: 557-564.
45. Ahlroth M, Alenius H, Turjanmaa K, Mäkinen-Kiljunen S, Reunala T, Palosuo T. Cross-reacting allergens in natural rubber latex avocado. *J Allergy Clin Immunol* 1995; 96: 167-173.
46. Mikkola JH, Alenius H, Kalkkinen N, Turjanmaa K, Palosuo T, Reunala T. Hevein-like protein domains as a possible cause for allergen cross-reactivity between latex and banana. *J Allergy Clin Immunol* 1998; 102: 1005-1012.
47. Diaz-Perales A, Collada C, Blanco C, Sanchez-Monge R, Carrillo T, Aragoncillo C, Salcedo G. Cross-reactions in the latex-fruit syndrome: A relevant role of chitinases but not of complex asparagine-like glyicans. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 104: 681-687.
48. Rodríguez-Romero A, Ravichandran KG, Soriano-García M. Crystal structure of hevein at 2.8 Å resolution. *FEBS* 1991; 291: 307-309.
49. Andersen NH, Cao B, Rodríguez-Romero A, Arreguin B. Hevein: NMR Assignment and assessment of solution-state folding for the agglutinin-toxin motif. *Biochemistry* 1993; 32: 1407-1422.
50. Asensio JL, Cañada FJ, Bruix M, Rodríguez-Romero A, Jiménez-Barbero J. The interaction of hevein with *N*-acetylglucosamine-containing oligosaccharides. Solution structure of hevein complex to chitobiose. *Eur J Biochem* 1995; 230: 621-633.
51. Asensio JL, Cañada FJ, Bruix M, Rodríguez-Romero A, Jiménez-Barbero J. NMR investigations of protein-carbohydrate interactions: refined three dimensional structure of the complex between hevein and methyl betachitobioside. *Glycobiology* 1998; 8: 569-577.
52. Beezhold DH, Sussman GL, Kostyal DA, Chang N. Latex allergy can induce clinical reactions to specific foods. *Clin Exp Allergy* 1996; 26: 416-422.
53. Kostyal DA, Hickel VL, Noti JD, Sussman GL, Beezhod DH. Cloning and characterization of a latex allergen (Hev b 7): Homology to patatin, a plant PLA₂. *Clin Exp Immunol* 1998; 112: 355-262.
54. Sowka S, Wagner S, Krebitz M, Arij-Mad-Arif S, Yusuf F, Kinaciyani T, Brehler R, Scheiner O, Breiteneder H. cDNA cloning of the 43-kDa latex allergen Hev b 7 with sequences similarity to patatins and its expression in the yeast *Pichia pastoris*. *Eur J Biochem* 1998; 255: 213-219.
55. Sowka S, Hafner C, Radauer C, Focke M, Brehler R, Astwood JD, Arij-Mad-Arif S, Kanani A, Sussman GL, Scheiner O, Beezhold DH, Breiteneder H. Molecular and immunologic characterization of new isoforms of the *Hevea brasiliensis* latex allergen Hev b 7: Evidence of no cross-reactivity between Hev b 7 isoforms and potato patatin and proteins from avocado and banana. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 104: 1302-1310.
56. Wagner B, Buck D, Hafner C, Sowka S, Niggemann B, Scheiner O, Breiteneder H. Hev b 7 *Hevea brasiliensis* protein associated with latex allergy in children with spina bifida. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 108: 621-627.
57. Vallier P, Balland S, Herf R, Valenta R, Deviller P. Identification of profilin as an IgE-binding component in latex from *Hevea brasiliensis*. Clinical implications. *Clin Exp Allergy* 1995; 25: 332-339.
58. Rihs HP, Chen Z, Rozynek P, Baur X, Lundberg M, Cremer R. PCR-based cloning, isolation, and IgE-binding properties of recombinant latex profilin. *Allergy* 2000; 55: 712-717.
59. Wagner S, Breiteneder H, Simon-Nobbe B, Susani M, Krebitz M, Niggemann B, Brehler R, Scheiner O, Hoffmann-Sommergruber K. Hev b 9, an enolase and a new cross-reactive allergen from *Hevea* latex and molds. *Eur J Biochem* 2000; 267: 7006-7014.
60. Posch A, Chen Z, Wheeler C, Dunn MJ, Raulf-Heimsoth M, Baur X. Characterization and identification of latex allergens by two-dimensional electrofocusing and protein microsequencing. *J Allergy Clin Immunol* 1997; 99: 385-395.
61. Rihs HP, Chen Z, Rozynek P, Cremer R. Allergenicity of rHev b 10 (manganese-superoxide dismutase). *Allergy* 2001; 56: 85-86.
62. O'Riordain GO, Radauer C, Wagner S, Blanco C, Hoffmann-Sommergruber K, Scheiner O, Ebner C, Breiteneder H. Hev b 11, a class I chitinase from *Hevea brasiliensis* and its cross-



- reactivity with Hev b 6.02, hevein. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 107: S57.
63. Rozeboom HJ, Budiani A, Beintema JJ, Dijkstra BW. Crystallization of hevamine, an enzyme with lysozyme/chitinase activity from *Hevea brasiliensis* latex. *J Mol Biol* 1990; 212: 441-443.
 64. Jekel PA, Hartmann JBH, Beintema JJ. The primary structure of hevamine, an enzyme with lysozyme/chitinase activity from *Hevea brasiliensis* latex. *Eur J Biochem* 1991; 200: 123-130.
 65. Yagami T, Sato M, Nakamura A, Shono M. One of the rubber latex allergens is a lysozyme. *J Allergy Clin Immunol* 1995; 96: 677-686.

Dirección para correspondencia:
QFB César Augusto Sandino
Reyes López. Instituto
de Química, UNAM,
Circuito Exterior,
Ciudad Universitaria,
Delegación Coyoacán
C.P. 04510, México, D.F.
Tel. 56-22-45-68
Fax: 56-16-22-17
cesar_sandino@correo.unam.mx

Insights into a conformational epitope of Hev b 6.02 (hevein)

César A. Reyes-López,^a Alejandra Hernández-Santoyo,^a Martha Pedraza-Escalona,^a Guillermo Mendoza,^b Andrés Hernández-Arana,^c and Adela Rodríguez-Romero^{a,*}

^a Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior, Cd. Universitaria, Coyoacán México, DF 04510, Mexico

^b Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Coyoacán México, DF 04510, Mexico

^c Departamento de Química, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, P.O. Box 55-534, Iztapalapa México, DF 09340, Mexico

Received 27 November 2003

Abstract

Hevein (Hev b 6.02) is a major IgE-binding allergen in natural rubber latex and manufactured products. Both tryptophans (Trp²¹ and Trp²³) of the hevein molecule were chemically modified with BNPS-skatole (2-nitrophenylsulfenyl-3-methyl-3'-bromoindole-9-one); derivatized allergen failed to significantly inhibit binding of serum IgE in ELISA assays. Similarly, skin prick tests showed that hevein-positive patients gave no response with the modified allergen. Dot blot experiments carried out with anti-hevein mono- and polyclonal antibodies confirmed the importance of Trp²¹ and Trp²³ for antibody-recognition, and demonstrated the specific cross-reactivity of other molecules containing hevein-like domains. We also report the structure of Hev b 6.02 at an extended resolution (1.5 Å) and compare its surface properties around Trp residues with those of similar regions in other allergens. Overall our results indicate that the central part of the protein, which comprises three aromatic and other acidic and polar residues, constitutes a conformational epitope.

© 2003 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Allergens; Hev b 6.02; Hevein; Latex; IgE-epitope; X-ray structure

Type I allergic diseases are the result of inappropriate immune responses to certain otherwise innocuous proteins (allergens), in people with a genetic predisposition or atopy. It is well established that the recognition of allergens by immunoglobulin E (IgE) is the key step to the allergic response. The allergen is bound to the IgE high-affinity receptor complex on mast cells and, if this occurs, mediator release is induced leading to the allergic inflammation [1].

Allergenic proteins are structurally and functionally a heterogeneous group, including hydrolytic enzymes, enzyme inhibitors, carbohydrate-binding proteins, actin-binding proteins, and others without a known biological activity [2]. Many structural features of proteins could potentially contribute towards their allergenicity, including availability and identity of the epitopes. However, the stability, the presence of glycosyl groups, and enzymatic or lectin activities can influence allergenicity

[3], although in many instances the mechanisms remain unclear. Natural rubber latex (NRL) proteins are a well-recognized cause of type-I allergic reactions that increasingly affect health-care workers and other people using latex products. It is also known that latex allergy is often combined with allergy to certain fruits such as banana, avocado, and kiwi [4], which contain class I chitinases with a hevein-like domain. In addition, cross-reactivity of latex allergens with pollen allergens from ragweed, timothy grass, and mugwort has been described [5]. In general, the presence of similar or common epitopes might explain this cross-reactivity.

Basically two types of IgE epitopes have been identified. Epitopes that consist of a few continuous amino-acid residues are referred to as linear or sequential [6], whereas those composed of at least two non-adjacent regions of the molecule that are brought into close proximity within the folded structure are named discontinuous or conformational. Since most IgE epitopes appear to be conformational [7], it is clear that a proper understanding of the interactions by which allergens are

* Corresponding author. Fax: +52-55-56-16-22-17.

E-mail address: adela@servidor.unam.mx (A. Rodríguez-Romero).

recognized by IgE antibodies would benefit greatly from the accurate knowledge of allergen structures.

Hev b 6.02, one of the main allergens from rubber (*Hevea brasiliensis* latex), is a lectin-like protein that also acts as a defense-related protein [8] and whose presence has been demonstrated in NRL products [9]. In addition, nature furnishes several isoforms of hevein, one of them, known as pseudohevein (isoform 1), with six amino acid mutations [10]. Hevein-like domains are also present in agglutinins from wheat germ (four domains) [11] and from *Urtica dioica* (two domains) [12]. In these agglutinins the sugar-binding site is mainly constituted by three aromatic amino acids, which interact with sugar rings through stacking contacts.

To gain new insight into the nature of the IgE epitopes for these proteins, we performed immunological experiments using Hev b 6.02, isoform 2, and the protein modified at positions Trp²¹ and Trp²³ with BPNS-skatole. We also describe the characterization of the chemical modification by MALDI-TOF experiments. Finally, due to the importance of the carbohydrate-binding region and that some conformational differences were reported between the structure solved by X-ray techniques (2.8 Å) [13] and the one in solution [14,15], we performed a crystallographic study of the allergen at high resolution (1.5 Å). Based on a detailed structural comparison of this protein with allergens from plants such as Bet v 2 (*Betula verrucosa*), Hev b 8 (*H. brasiliensis*), and the agglutinin from wheat germ (WGA), we propose an explanation for the observed cross-reactivity pattern among the allergens under consideration.

Experimental procedures

Protein purification and crystallization. Purification and crystallization of Hev b 6.02 (clon IAN-710) have been described elsewhere [13]. In this work, crystals were grown at 18 °C by the sitting drop method, from a solution containing 60% MPD, 40 mM Tris-HCl, pH 7.1.

Chemical modification of the tryptophan residues of Hev b 6.02. Modification was carried out according to Omenn et al. [16]. Briefly, to a solution of 1 mg Hev b 6.02 in 60% acetic acid, 28 µl of a 2 mg/ml solution of 3-BNPS-Skatole in glacial acetic acid was added (15 min at room temperature). The mixture was then applied to a Sephadex G-10 column (1.0 × 100 cm) equilibrated with 1.5 M acetic acid. The fraction containing modified Hev b 6.02 was dialyzed against distilled water.

Enzymatic digestion of natural and modified Hev b 6.02 with Glu-C and characterization using MALDI-TOF mass spectrometry. Natural (control) and oxidized Hev b 6.02 (350 µg) were treated with 6 M guanidine HCl for 15 min (37 °C). Dithiothreitol (5 mM) in 0.15 M Tris, pH 8.8, was then added to the samples (37 °C, 20 min). Iodoacetamide (10 mM) in the same buffer was added to the samples (20 min at room temperature). The reaction mixtures were then transferred to a High-Trap desalting column (Pharmacia). Five micrograms of each of the samples was applied to a Superdex-peptide column (16/30) (Pharmacia) equilibrated with the Tris buffer. The rest of the proteins were digested with 5 µg endoproteinase Glu-C (Boehringer-Mannheim), which selectively cleaves peptide bond's C-terminal to glutamic acid residues, for 60 h at 37 °C, in the same Tris buffer. After this, the

N-terminal sequence for the peptides obtained was determined by automated Edman degradation on a gas-phase protein sequencer (LF 3000, Beckman Instruments, Irvine, CA).

For the matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry (MS) experiments, 270 µg of the digested proteins was applied to a reversed phase column (C-18, 4.6 × 150 mm, Waters). The purified peptides were mixed with α -cyano-4-hydroxycinnamic acid in 30% acetonitrile, 70% water, and 0.1% TFA, and analyzed in a OMNIFLEX MALDI-TOF instrument (Bruker-Daltonics) which has a 337.1 nm nitrogen laser and 19 kV accelerating voltage in the linear mode.

CD analysis of native and chemically modified Hev b 6.02. CD spectra were recorded on a JASCO J-700 spectropolarimeter at 20 °C. The spectral range was 200–260 nm at 10 nm/min and three scans were accumulated. The protein concentration was 0.2 mg/ml in a 10 mM phosphate buffer, pH 7.0.

Enzyme-linked immunosorbent assay inhibition experiments. Briefly, microplates were coated with 5 µg/well of hevein in sodium carbonate buffer (pH 9.6) and blocked. Afterwards, a serum pool of 10 high-risk pediatric patients (Instituto Nacional de Pediatría, Mexico City), diluted 1:10, was co-incubated (2 h at 37 °C) with either Hev b 6.02, isoform 2, or the allergen chemically modified, at five different concentrations (0.1–25 µg/ml). Plates were washed and biotin-labeled mouse anti-human IgE (1:500 dilution) was allowed to react for 1 h at 37 °C. The plates were then washed and incubated with 100 µl/well of streptavidin-peroxidase diluted 1:2000 for 1 h at 37 °C. Produced color was read at 490 nm using an automated Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) reader (Dynatech MR5000).

Dot blot assays. These experiments were performed to assess the possible cross-reactivity among allergens. Proteins (Hev b 6.02, Hev b 8 (profilin), Hev b 11 (class I chitinase), pseudohevein (isoform 1), isoform 2, chemically modified Hev b 6.02, WGA, and bovine serum albumin (BSA) as a negative control) were applied to nitrocellulose membranes (25 µg/dot), and then washed and blocked. The membranes were incubated with either rabbit monoclonal (PAb) or mouse monoclonal (MAb) IgGs raised against Hev b 6.02. The reaction was revealed by incubation with peroxidase-conjugated anti-rabbit or anti-mouse IgGs and the binding was detected by chemiluminescence.

Skin prick tests. Tests were performed using intact Hev b 6.02 and the protein modified at positions Trp²¹ and Trp²³ in 100 volunteer health-care workers (50% high-risk individuals). The Ethics Committee of the Instituto Nacional de Pediatría, Mexico City, approved this study. The negative control was allergen diluent (Evans solution) and the positive 1.0 mg/ml histamine solution. Five milliliters of solution containing an allergen (1.0–10.0 µg/ml) was placed on the skin, which was then pricked with the tip of a needle. The presence of a wheal larger than the one produced by histamine (2–4 mm) and no reaction with the Evans solution indicated the presence of IgE against the allergen.

X-ray diffraction analysis. X-ray diffraction data were collected, from a single crystal, at 277 K at the Stanford Synchrotron Radiation Laboratory (Station 7-1) using a MAR 30 image plate detector. Diffraction data were processed with the programs DENZO [17] and CCP4 [18]. The structure was solved by molecular replacement using CNS [19] with the protein solved by NMR methods as the search model (PDB entry IHEV). Initial crystallographic refinement was done with CNS. Simulated annealing was used and each refinement cycle was followed by fitting of the model into sigma weighted electron density maps using QUANTA2000 (Molecular Simulations Inc., San Diego, CA). Cross-validation [20] was employed throughout and 10% of the data were used for the R_{free} calculation. The initial structure and topology files of MPD were obtained from the website HIC-Up [21]. Solvent molecules were placed using the X-SOLVE routine in QUANTA2000 [22].

High-resolution refinement with SHELX97 [23] was started using the model from the CNS refinement. Protein bond and angle restraints used were of Engh and Huber [24]. Anisotropic atom B -factors were

introduced in a conjugate gradient least-squares (CGLS) minimization, in which the data-to-parameter ratio was 2.1. Anti-bumping distances restraints were added to prevent non-bonded collisions. The refinement of the MPD molecules was carried out against parameters of the SHELXL dictionary [25]. With this model, the R_{free} from the isotropic refinement dropped by 3.1 percentage points to 16.01%. A final step was carried out using a least-squares cycle (including all data) converging at R -factor = 0.128 ($F > 4\sigma$). A summary of the data-collection and refinement statistics is given in Table 1.

Structure analysis and comparisons. Analysis of the stereochemistry of the model was done using the program PROCHECK [26]. The molecular superposition of Hev b 6.02 with the two structures obtained by NMR methods was carried out with the program ALIGN [27]. The crystal structures of Bet v 2 (PDB code 1CQA), Hev b 8 (1G5U), and domain C WGA (9WGA) were obtained from the Protein Data Bank.

Table 1
Data collection and refinement statistics

<i>(A) Data collection</i>	
Space group	P2 ₁ 2 ₁ 2
Unit cell parameters (Å)	
<i>a, b, c</i>	31.81, 60.95, 22.51
No. of monomers per asymmetric unit	4
Resolution range (Å)	15–1.5
No. of observations	57,822
No. of unique reflections	7113
$I/\sigma(I)$	6.7
Completeness (%)	95.5
Multiplicity	4.7
R_{sym}^a (%)	5.0
<i>(B) Refinement</i>	
R -factor (%)	12.8
R_{free}^b (%)	14.5
No. of atoms	
Protein	345
Solvent	39
MPD	32
RMS deviation from ideal values	
Bond length (Å)	0.011
Bond angle (Å)	0.03
Residues in Ramachandran plot (%)	
Most allowed region	88.2
Allowed region	11.8
Average B -factors (Å ²)	
Protein	17.4
Water	33.3
MPD	36.7

^a $R_{\text{sym}} = 100 \sum_h \sum_i |I_i(h) - [I(h)]| / \sum_h I(h)$, where $I_i(h)$ is the i th measurement of the h reflection and $[I(h)]$ is the average value of the reflection intensity.

^b R_{free} is for 10% of the total reflections.

Results and discussion

Characterization of Chemically Modified Hev b 6.02

Hev b 6.02. Hevein, either modified or not by BNPS-Skatole, was purified by reverse-phase HPLC and submitted to reduction with DTT to break its disulfide bridges; sulfhydryl groups so produced were alkylated with iodoacetamide. The alkylated forms gave nearly identical elution volumes on gel filtration, indicating that the polypeptide chain was not cleaved by treatment with BNPS-Skatole. MALDI-TOF mass spectrometry gave for the modified hevein a mass 40 Da larger than that for the untreated protein. The first five residues, as determined by sequence analysis, were the same for both proteins, confirming that the polypeptide chain was not cleaved by the oxidation treatment.

In parallel experiments, samples of both hevein forms were digested with Glu-C after reduction and alkylation. With both samples two peptides were separated by reverse-phase HPLC. The larger peptide obtained from hevein had a mass of 3424.7 Da, corresponding to the mass of segment 1–29 with its five cysteines alkylated. As determined by Edman degradation, the N-terminal residue of this peptide was Glu, which is the N-terminus of the whole protein. Thus, Glu-C cleaved the peptide bond C-terminal of Glu²⁹ (see Fig. 1). The larger peptide from chemically modified hevein showed a 40-Da increase in mass (3465.5 Da) with respect to the larger peptide from untreated hevein, and Glu was also its N-terminus. In contrast, the mass of the smaller peptide was the same regardless of which sample it came from. This mass corresponds to that of segment 30–43 with its three cysteines alkylated. Tyr was found at the N-terminus of this peptide, confirming the cleavage point of Glu-C. It is clear, therefore, that changes brought about by BNPS-Skatole were restricted to the region where the two Trp residues are located, whereas segment 30–43, which comprises one of the two IgE sequential epitopes of this protein [28] (see Fig. 1), was unaffected. The mass increase of 40 Da suggests that both tryptophans were modified, because derivatives with mass differences of +4 and +20 are known to result from oxidation of tryptophan residues [29,30]. Furthermore, the absorption spectrum of modified hevein increased at 250 nm and decreased at longer wavelengths with respect to that

	10	20	30	40
			
Hev b 6.02	EQCGRQAGGK	LCPNNLCCSQ	WGWCSTDEY	CSPDHNCQSN CKD
Pseudo-hevein	EQCGRQAGGK	LCPNNLCCSQ	YGWCGSSDDY	CSPSKNCQSN CKGG
Hev b 11	EQCGRQAGGA	LCPGGLCCSQ	YGCANTPEY	CGSGCQSQCDD GGV
WGA3	IKCGSQAGGK	LCPNNLCCSQ	WGYCGLGSEF	CGEGCQNGAC STD

Fig. 1. Sequence comparison of Hev b 6.02, pseudohevein, isoform 3 of WGA (domain C), and class I chitinase (Hev b 11, hevein domain). The linear IgE epitopes of Hev b 6.02 are shadowed.

for the untreated protein, supporting the formation of oxindole moieties (results not shown) [16].

Circular dichroic spectra of Hev b 6.02 and its derivative (not shown) were found to be nearly identical from 250 to 200 nm. It has been reported previously that hevein exhibits an intense positive peak at 221 nm [31], which is also found between 220 and 228 nm in spectra of other small, disulfide-rich proteins [32]. Because this rather peculiar band is thought to be originated from amide groups adjacent to disulfide bridges [33], it is likely that neither disulfide bonds, which are essential for the global stability in proteins of this type, nor other structural characteristics of the polypeptide chain around these bonds were affected by chemical modification of Hev b 6.02.

ELISA inhibition and dot blot assays

ELISA inhibition with a serum pool from pediatric patients is shown in Fig. 2A. It is clear from these ex-

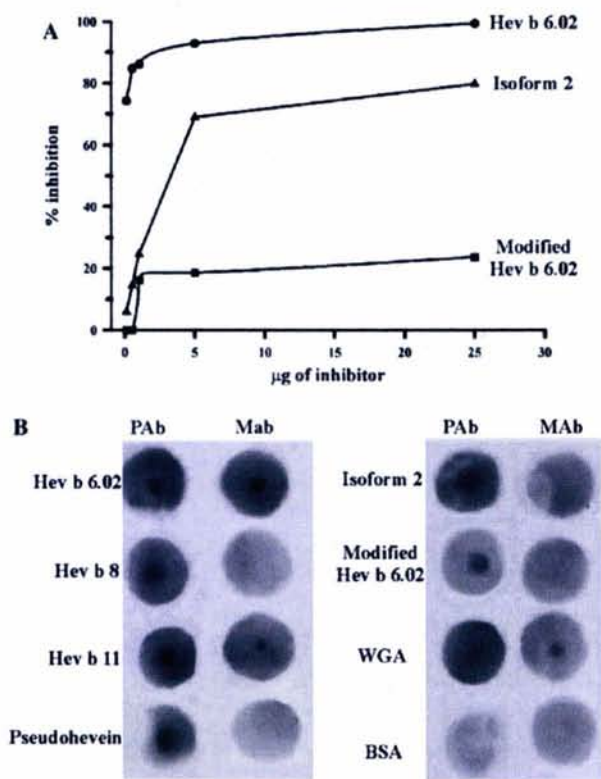


Fig. 2. (A) ELISA inhibition assays. The average inhibition of IgE binding to solid-phase Hev b 6.02 was determined using isoform 2 and the chemically modified allergen with BPNS-skatole in sera from 10 pediatric patients. An average of 75% inhibition was found with isoform 2 and only 20% with the chemically modified allergen at the maximum concentration used. The inhibition curve with Hev b 6.02 as the inhibitor is shown for comparison. (B) Specificity of the polyclonal and monoclonal anti-Hev b 6.02 antibodies in a dot blot assay. The membranes were incubated with the rabbit and mouse IgGs. Proteins used are indicated in the left margin of both figures. BSA was used as negative control.

periments that no significant inhibition of IgE binding to solid-phase Hev b 6.02 was observed with the modified allergen; in contrast, the isoform 2 inhibited binding in 75%. These results strongly suggest that the two Trp residues are necessary for the recognition of the molecule by IgE. Besides, it is evident that subtle differences are important for recognition, because the molecular characteristics of the isoform 2, which are currently under study, are likely to be very similar to those of Hev b 6.02, as judged from the small 3-Da mass difference between them (unpublished results). Additionally, dot blot assays were done in an effort to determine if model antibodies could specifically recognize surface epitopes on hevein-like antigens. We prepared a rabbit polyclonal antibody as well as a murine monoclonal antibody (6E7) raised against Hev b 6.02 (results not published). Experiments were carried out to test the reactivity of MAb 6E7 and the polyclonal Abs with several lectins (Hev b 6.02, isoform 2, pseudohevein, and WGA), a profilin (Hev b 8), and the chitinase (Hev b 11) from NRL, chemically modified Hev b 6.02, and bovine serum albumin as a control. The results obtained are shown in Fig. 2B. As can be observed, the MAb raised against Hev b 6.02 only reacted with WGA and the chitinase, indicating that antigen recognition is not due to unspecific lectin-carbohydrate reactions. It is noteworthy that the sequence identity between Hev b 6.02 and pseudohevein is 86%, whereas the chitinase is 60% and WGA domains are only about 50% identical to hevein. Indeed, only residues Trp²¹, Glu²⁹, and Thr²⁷ in Hev b 6.02 are conserved (either one or two of them) at equivalent positions in WGA domains and the chitinase, but not in pseudohevein (Fig. 1). This strongly suggests, therefore, that these residues, which are part of Hev b 6.02 linear epitopes and belong to the carbohydrate-binding region, are essential for the interaction of MAb 6E7 with hevein-like domains. This proposal is supported by the absence of reactivity of the MAb with chemically modified Hev b 6.02. Furthermore, the general relevance that aromatic and acidic side chains may have in IgE recognition by hevein-like domains is made apparent from a primary-structure comparison including 60 domains found in proteins that are recognized as allergens (WGA, Hev b 6.02, and Hev b 11) or potential allergens, belonging to the pathogenesis-related family of plant proteins [34]. In 45 cases (75%), the following motif is conserved (hevein numbering; see Fig. 1): C¹²XXX¹⁵X CCSX²⁰φ²¹XφCGXΩX AcYC³¹, where φ represents an aromatic side chain, Ω is Thr, Ser or Gly, and Ac is, in most cases (84%), either Glu or Asp. Positions marked by X are occupied by any type of residue, those of a polar character being much more frequent. The remaining 15 sequences under consideration differ from the mentioned motif only in that either Tyr³⁰ is substituted by Phe (six cases) or one of the aromatic residues at positions 21 and 23 is changed for His, Ser or Gly (nine cases).

On the other hand, all the proteins whose structure contain hevein-like domains were recognized by the PABs anti-Hev b 6.02, and even the modified hevein gave a positive reaction. Interestingly, however, the PAB also reacted with the profilin Hev b8 (Fig 2B). The folding pattern exhibited by the profilin molecule is completely unrelated to, and its sequence shows no evidence of the typical motif present in the structure of, hevein-like domains. However, the actin-binding region in this molecule shares the aromatic and acidic characteristics attributed to antibody-binding sites in hevein-like proteins, and could be responsible, therefore, for the PAB reactivity towards the profilin. Moreover, the observed cross-reactivity among NRL allergens and those from pollen seed, considered in this work, might be explained by the similar features of the binding regions.

Skin prick tests

To assess the relevance that the two Trp residues of Hev b 6.02 may have on defining B cell (conformational) epitopes, SPT were performed using the native protein and the one that had Trp²¹ and Trp²³ residues chemically modified. Hev b 6.02 gave immediate wheal and flare skin-test responses at concentrations as low as 1.0 µg/ml in 8 of the 50 high-risk volunteers. In contrast, the chemically modified allergen induced no response at all, even at a concentration of 10 µg/ml. These results show that Hev b 6.02 can elicit immediate hypersensitivity responses; however, this capacity is abolished by chemical modification of the Trp residues, thus suggesting that the region responsible for sugar-binding and formed by sequential epitopes (Fig. 4) forms a conformational epitope when the protein folds.

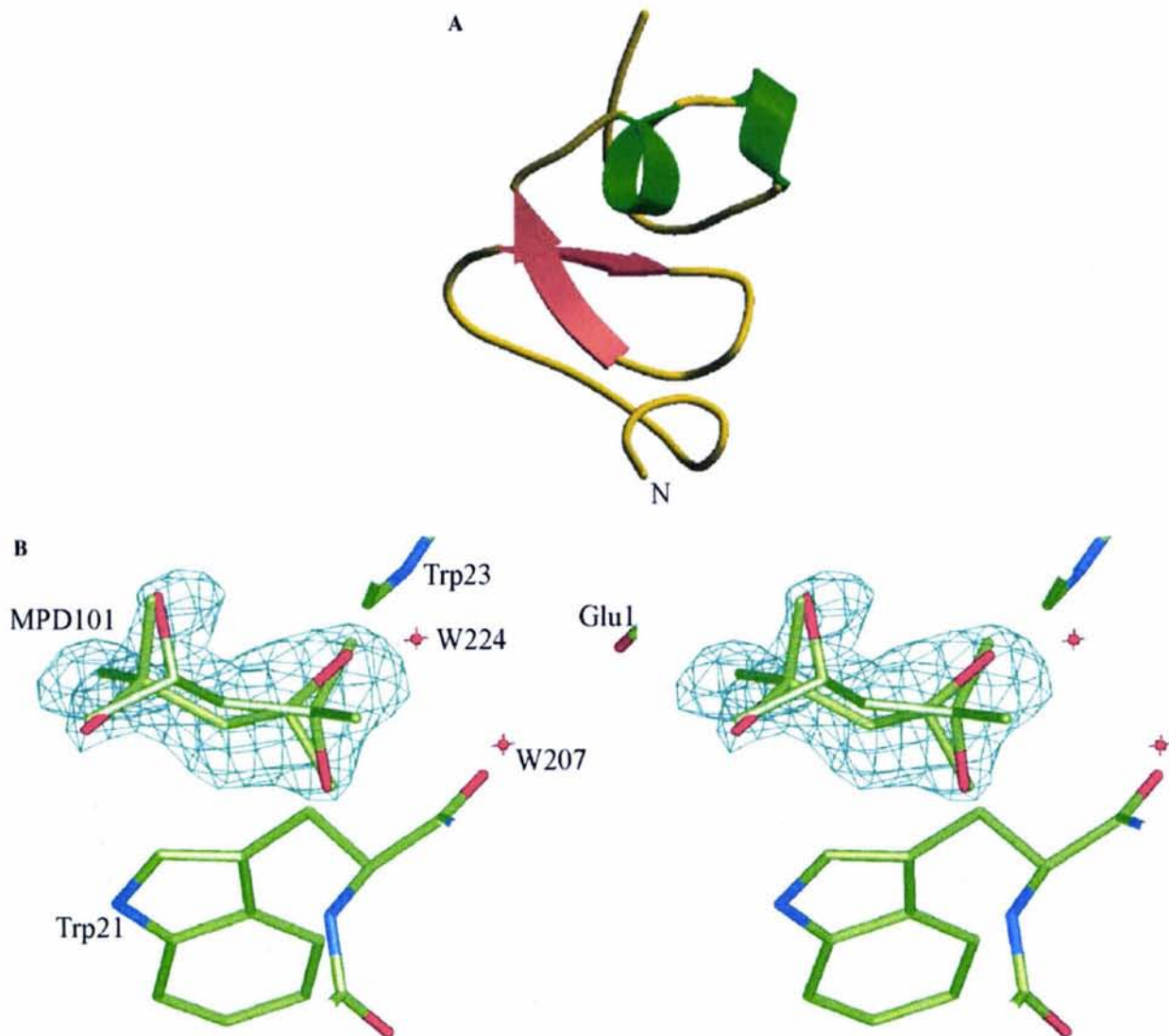


Fig. 3. (A) Overall structure of Hev b 6.02. The figure was generated with MOLSCRIPT [38]. (B) Stereo view of the electron density ($|F_o - F_c|$) corresponding to the MPD¹⁰¹ molecule and residues at hydrogen-bond distance. Water (W) mediated interactions are also shown. The contours are drawn at 3.0 σ level and the hydrogen bonds are represented by broken lines.

Molecular structure

The refined model is ovoid in shape and contains 43 residues, 39 water molecules, and two molecules of MPD in two conformations. Four small regions of secondary structure characterize the molecule (Fig. 3A). The most interesting feature of the structure is the carbohydrate-combining site, which shows an aromatic patch (Trp²¹, Trp²³, and Tyr³⁰) encircled by the side chains of Glu¹, Gln⁶, Gln²⁰, and Glu²⁹. It was interesting to find two molecules of MPD in this region, which are making hydrogen bonds to different residues: MPD¹⁰¹ (O2 MPD-NHE1 Trp²¹) (Fig. 3B) and MPD¹⁰² (O4 MPD-OH Tyr³⁰). On the other hand, the side chains for six residues: Glu¹, Leu¹¹, Pro¹³, Ser²⁶, Glu²⁹, and Pro³³ were built using two conformations.

The overall structure of Hev b 6.02, at this resolution, is very similar to the solution structure obtained by NMR methods [15]. A CA superposition between this model and the two models obtained by NMR methods shows an rmsd of 0.62 Å for the model with bound chitobiose, and 0.83 Å for the one with an empty binding site, while the superposition of the two structures solved by NMR methods shows an rmsd of 1.03 Å. An analysis of the solvent molecules found in the structure shows that the sugar-binding site is full with MPD molecules plus some waters. Thirty-four out of thirty-nine water molecules were found near polar residues exposed to the solvent and five were buried in the structure. Regarding solvent accessibility, the binding-site residues Trp²¹ and Trp²³, as well as neighbor residues such as Glu¹ and Glu²⁹, share high values, as determined with the program NACCESS (S.J. Hubbard, J.M. Thornton, University College, London, 1993), and are not involved in crystal packing interactions. Indeed, the solvent accessibility of Trp²¹ is 63% (when its solvent-accessible surface area is expressed as a percentage of the accessible area of the side chain in the tripeptide Gly-Trp-Gly in extended conformation [35]), which makes this residue one of the most exposed in Hev b 6.02; Trp residues located at equivalent positions in WGA are also highly exposed (about 67% accessibility). In profilins, one Trp also displays high accessibility (63%).

Structural comparison of Hev b 6.02 with different allergens

When we analyzed structures of other plant allergens such as Bet v 2, Hev b 8, and WGA, we noticed a similar motif, which involves a number of solvent-accessible aromatic, polar, and ionizable (mostly acidic) residues on the surface of the protein. Fig. 4 shows these exposed regions on the three-dimensional structures of the four proteins. It should be mentioned that three sequential epitopes have been reported for Bet v 2 (residues 2–19,

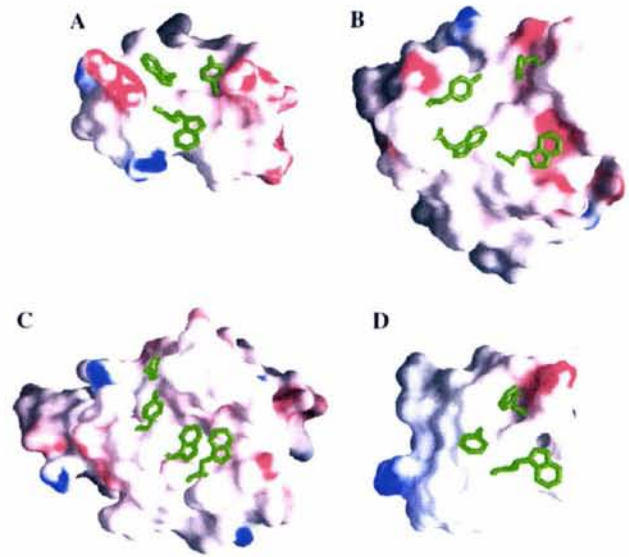


Fig. 4. Electrostatic surface-potential of four allergens. Comparison of Hev b 6.02 (A) with three plant allergens: Bet v 2 (B), Hev b 8 (C), and domain C of WGA (D). In green the aromatic residues comprising binding sites; for Hev b 6.02 and Bet v 2 these residues are also part of the linear epitopes. The protein surfaces have been produced with GRASP [39].

28–47, and 108–133; [36]), and two for Hev b 6.02 (residues 13–24 and 29–36; [28]) (Fig. 1). For these allergens the highlighted residues in green belong to their linear epitopes, indicating that those areas of the molecular surface constitute conformational epitopes. On account of the structural resemblances shown in Fig. 4, it is possible that the corresponding regions in the other allergens may play similar roles as superficial epitopes and yet conform to common determinants of allergenicity. Thus, although these proteins possess binding sites widely varying in selectivity (i.e., Hev b 6.02 and WGA bind carbohydrates, whereas Hev b 8 and Bet v 2 bind actin), it is evident that such sites could potentially contribute towards their allergenicity.

Very recently Karisola et al. [37] described a major conformational IgE binding site epitope of Hev b 6.02 using a chimera-based allergen epitope mapping strategy and molecular modeling. They suggested that its N-terminal and C-terminal regions essentially determined its IgE binding activity. In this study we present evidence supporting that the central part of the polypeptide chain is fundamental for the constitution of a conformational epitope and, therefore, for the interaction with model antibodies. This region includes the binding site, with three aromatic residues and other residues such as Glu, Gln, Asp, and Asn exposed to the solvent. These results support the existence of a main unifying feature as a common critical determinant of allergenicity in plant allergens.

The atomic coordinates and structure factors (code 1Q9B) have been deposited in the Research Collaboratory for Structural Bioinformatics Protein Data Bank.

Acknowledgments

We thank Peter Kuhn for beamline support. This work is based on research conducted at SSRL, which is funded by the Department of Energy, Office of Basic Energy Sciences. The Biotechnology Program is supported by the National Institutes of Health, National Center for Research Resources, Biomedical Technology Program and the Department of Energy. Preliminary X-ray experiments were done at LUEP IQ-UNAM. We thank Dr. Edgar Zenteno and Dra. Concepción Agundis (School of Medicine-UNAM) for their help with the production of antibodies and CONACYT (Grant 32417-E).

References

- [1] B.J. Sutton, H.J. Gould, The human IgE network, *Nature* 366 (1993) 421–428.
- [2] A. Bufer, The biological function of allergens: relevant for the induction of allergic diseases? *Int. Arch. Allergy Immunol.* 117 (1998) 215–219.
- [3] D.J.R. Huby, J.R. Dearman, I. Kimber, Why are some proteins allergens? *Toxicol. Sci.* 55 (2000) 235–246.
- [4] R. Brehler, U. Theissen, C. Mohr, T. Luger, Latex-fruit syndrome: frequency of cross-reacting IgE antibodies, *Allergy* 52 (1997) 404–410.
- [5] T. Fuchs, S. Spitzauer, C. Vente, J. Hevler, S. Kapiotis, H. Rumpold, D. Kraft, R. Valenta, Natural latex, grass pollen, and weed pollen share IgE epitopes, *J. Allergy Clin. Immunol.* 100 (1997) 356–364.
- [6] J.A. Berzofsky, Intrinsic and extrinsic factors in protein antigenic structure, *Science* 229 (1985) 932–940.
- [7] R.C. Aalberse, Structural biology of allergens, *J. Allergy Clin. Immunol.* 106 (2000) 228–238.
- [8] J. van Parijs, W.F. Broekaert, I.J. Goldstein, W.J. Peumans, Hevein: an antifungal protein from rubber-tree (*Hevea brasiliensis*) latex, *Planta* 183 (1991) 258–264.
- [9] A. Alenius, N. Kalkkinen, T. Reunala, K. Turjanmaa, T. Palosuo, The main IgE-binding epitope of a major latex allergen, prohevein, is present in its N-terminal 43-amino acid fragment, hevein, *J. Immunol.* 156 (1996) 1618–1625.
- [10] U.M. Soedjanaatmadja, J. Hofsteenge, C.M. Jeronimus-Stratingh, A.P. Bruins, J.J. Beintema, Demonstration by mass spectrometry that pseudo-hevein and hevein have ragged C-terminal sequences, *Biochim. Biophys. Acta* 1209 (1994) 144–148.
- [11] H.T. Wright, G. Sandrasegaram, C.S. Wright, Evolution of a family of *N*-acetylglucosamine binding proteins containing the disulfide-rich domain of wheat germ agglutinin, *J. Mol. Evol.* 33 (1991) 283–294.
- [12] K. Harata, M. Muraki, Crystal structures of *Urtica dioica* agglutinin and its complex with tri-*N*-acetylchitotriose, *J. Mol. Biol.* 297 (2000) 673–681.
- [13] A. Rodriguez-Romero, K.G. Ravichandran, M. Soriano-Garcia, Crystal structure of hevein at 2.8 Å resolution, *FEBS Lett.* 291 (1991) 307–309.
- [14] N.H. Andersen, B. Cao, A. Rodriguez-Romero, B. Arreguin, Hevein: NMR assignment and assessment of solution-state folding for the agglutinin-toxin motif, *Biochemistry* 32 (1993) 1407–1422.
- [15] J.L. Asensio, F.J. Cañada, M. Bruix, A. Rodriguez-Romero, J. Jimenez-Barbero, The interaction of hevein with *N*-acetylglucosamine-containing oligosaccharides. Solution structure of hevein complexed to chitobiose, *Eur. J. Biochem.* 230 (1995) 621–633.
- [16] G.S. Omenn, A. Fontana, C.B. Anfinsen, Modification of the single tryptophan residue of staphylococcal nuclease by a new mild oxidizing agent, *J. Biol. Chem.* 254 (1970) 1895–1902.
- [17] Z. Otwinowski, W. Minor, Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode, *Methods Enzymol.* 276 (1997) 307–326.
- [18] The CCP4 suite: programs for protein crystallography, Collaborative Computational Project, Number 4, *Acta Crystallogr. D* 50 (1994) 760–763.
- [19] A.T. Brünger, P.D. Adams, G.M. Clore, W.L. DeLano, P. Gros, R.W. Grosse-Kunstleve, J.S. Jiang, J. Kuszewski, M. Nilges, N.S. Pannu, R.J. Read, L.M. Rice, T. Simonson, G.L. Warren, Crystallography & NMR system: a new software suite for macromolecular structure determination, *Acta Crystallogr. D* 54 (1998) 905–921.
- [20] A.T. Brünger, Free *R*-value: a novel statistical quantity for assessing the accuracy of crystal structures, *Nature* 355 (1992) 472–474.
- [21] G.J. Kleywegt, T.A. Jones, Databases in protein crystallography, *Acta Crystallogr. D* 54 (1998) 1119–1131.
- [22] T.J. Oldfield, Macromolecular refinement, in: Proceedings of the CCP4 Study Weekend, SRS Daresbury Laboratory, Warrington, UK.
- [23] G.M. Sheldrick, T.A. Schneider, SHELXL: high-resolution refinement, *Methods Enzymol.* 277 (1997) 319–343.
- [24] R.A. Engh, R. Huber, Accurate bond and angle parameters for X-ray protein structure refinement, *Acta Crystallogr. A* 47 (1991) 392–400.
- [25] W.R. Patterson, D.H. Anderson, W.F. DeGrado, D. Cascio, D. Eisenberg, Centrosymmetric bilayers in the 0.75 Å resolution structure of a designed alpha-helical peptide, D,L-alpha-1, *Protein Sci.* 8 (1999) 1410–1422.
- [26] R.A. Laskowski, M.W. MacArthur, S.C. Hutchinson, J.M. Thornton, PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures, *J. Appl. Crystallogr.* 26 (1993) 283–291.
- [27] G.H. Cohen, ALIGN: a program to superimpose protein coordinates, accounting for insertions and deletions, *J. Appl. Crystallogr.* 30 (1997) 1160–1161.
- [28] D.H. Beezhold, D.A. Kostyal, G.L. Sussman, IgE epitope analysis of the hevein preprotein; a major latex allergen, *Clin. Exp. Immunol.* 108 (1997) 114–121.
- [29] M.M. Vestlin, A.M. Kelly, C. Fenselau, Optimization by mass spectrometry of a tryptophan-specific protein cleavage reaction, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 8 (1994) 786–790.
- [30] V. Argali, J. Gueguen, Chemical cleavage of bovine β-lactoglobulin by BNPS-skatole for preparative purposes: comparative study of hydrolytic procedures and peptide characterization, *J. Protein Chem.* 18 (1999) 1–12.
- [31] A. Rodriguez-Romero, B. Arreguin, A. Hernandez-Arana, Unusual far-ultraviolet circular dichroism of wheat germ agglutinin and hevein originated from cystine residues, *Biochim. Biophys. Acta* 998 (1989) 21–24.
- [32] M.W. Thomas, E.F. Walborg, B. Jirgensons, Circular dichroism and saccharide-induced conformational transitions of wheat germ agglutinin, *Arch. Biochem. Biophys.* 178 (1977) 625–630.
- [33] J.P. Casey, R.B. Martin, Disulfide stereochemistry. Conformations and chiroptical properties of L-cystine derivatives, *J. Am. Chem. Soc.* 94 (1972) 6141–6151.
- [34] H. Breinteneder, C. Ebner, Molecular and biochemical classification of plant-derived food allergens, *J. Allergy Clin. Immunol.* 106 (2000) 27–36.
- [35] S. Miller, J. Janin, A.M. Lesk, C. Chothia, Interior and surface of monomeric proteins, *J. Mol. Biol.* 196 (1987) 641–656.
- [36] A.A. Fedorov, T. Ball, M.N. Mahoney, R. Valenta, C.S. Almo, Crystal structure and IgE-epitope mapping of birch pollen profilin: molecular basis for allergen cross-reactivity, *Structure* 5 (1997) 33–45.

- [37] P. Karisola, H. Alenius, J. Mikkola, N. Kalkkinen, J. Helin, T.O. Pentikäinen, S. Repo, T. Reunala, K. Turjanmaa, S.M. Johnson, T. Palosuo, S.M. Kulomaa, The major conformational IgE-binding epitopes of hevein (Hev b 6.02) are identified by a novel chimera-based allergen epitope mapping strategy, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 22656–22661.
- [38] P.J. Kraulis, MOLSCRIPT: a program to produce both detailed and schematic plots of protein structures, *J. Appl. Crystallogr.* 24 (1991) 946–950.
- [39] A. Nicholls, K.A. Sharp, B. Honig, Protein folding and association: insights from the interfacial and thermodynamic properties of hydrocarbons, *Proteins* 11 (1991) 281–296.