

UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE MÉXICO



Posgrado en ciencias Biomédicas  
Instituto de Química

**ESTUDIO BIOQUÍMICO Y CARACTERIZACION  
ESTRUCTURAL DE DOS ISOFORMAS NATIVAS  
DEL ALERGENO Hev b 2 DE *Hevea brasiliensis***

**T E S I S**

Que para obtener el grado de académico de:

**Doctor en ciencias**

P r e s e n t a

**M en C. DEYANIRA FUENTES SILVA**

**TUTOR: Dra. Adela Rodríguez Romero**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

Esta tesis fue realizada en el departamento de Bioquímica del Instituto de Química de la UNAM bajo la dirección de la Dra. Adela Rodríguez Romero y contó con la supervisión del siguiente comité tutorial:

Dr. Abraham Landa Piedra  
Facultad de Medicina, UNAM.

Dr. Abel Moreno Cárcamo  
Instituto de Química, UNAM.

Dra. Adela Rodríguez Romero  
Instituto de Química, UNAM.

El siguiente Proyecto fue realizado con el apoyo DGAPA-UNAM (Proyecto IN209506-3) y CONACyT (Proyecto CB-2007/82947)

## **AGRADECIMIENTOS**

A la UNAM y su dirección general de estudios de postgrado, DGEP por la beca de doctorado PB/0197.

A la Dra. Adela Rodríguez Romero, directora de tesis.

A Vivian Stojanoff y la línea X6A del *National Synchrotron Light Source*, Brookhaven National Laboratory (NIH/NIGMS, GM-0080; contrato No. DE-AC02-98CH10886) Por su colaboración en la colecta de datos de difracción de rayos X.

A las Doctores:

Guillermo Mendoza Hernández de la Facultad de Medicina por colaboración en la identificación y confirmación de las secuencias de las proteínas por espectrometría de masas y Edman.

Laura A. Palomares del Instituto de Biotecnología, UNAM por su colaboración en la elucidación de las estructuras glicosídicas.

A nuestra secretaria de entidad, Alma Corté Montes por su atento y eficiente apoyo en los tramites escolares del posgrado.

A los revisores de este trabajo de tesis:

Dr. Enrique Rudiño Piñera (Instituto de Biotecnología).

Dr. Enrique Ortega Soto (Instituto de Biomédicas).

Dr. Diego González Halphen (Instituto de Fisiología celular).

Dr. Enrique García Hernández (Instituto de Química).

Dr. Arturo Rojo Domínguez (UAM).

A Georgina Espinosa Pérez, Maria T. Ramírez Apan, Antonio Nieto Camacho, Lucía del C. Márquez Alonso, Erendira García Ríos y José David Vázquez Cuevas del Instituto de Química, Sonia P. Rojas Trejo y Zoila V. Hernández del Instituto de Biotecnología por su apoyo técnico.

A todos mis amigos y compañeros por su colaboración y amistad.

## INDICE GENERAL

RESUMEN. ....	vi
ABSTRACT. ....	viii
<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	
1.1. ALERGIA E HIPERSENSIBILIDAD. ....	3
1.1.1. Introducción. ....	3
1.1.2. Subtipos de reacciones hipersensibilidad. ....	4
1.1.2.1. Hipersensibilidad tipo I. ....	4
1.1.2.1.1. Mecanismos moleculares de la desgranulación de mastocitos	5
1.1.2.2. Hipersensibilidad tipo II o hipersensibilidad citotóxica. ....	8
1.1.2.3. Hipersensibilidad tipo III o mediada por inmunocomplejos. ....	8
1.1.2.4. Hipersensibilidad tipo IV o celular. ....	9
1.1.2.5. Hipersensibilidad tipo V, estimuladora o neutralizante. ....	9
1.1.3. Factores que influyen en el desarrollo de la hipersensibilidad I. ....	9
1.1.3.1. Hipótesis genética. ....	9
1.1.3.2. Hipótesis de la higiene. ....	10
1.1.3.3. Hipótesis de la contaminación ambiental. ....	11
1.1.3.4. Hipótesis del linfocito T-regulador. ....	11
1.2. LA ALERGIA AL LÁTEX DE <i>Hevea brasiliensis</i> . ....	12
1.2.1. Alérgenos del látex de <i>H. brasiliensis</i> . ....	13
1.2.2. Estructura y análisis de los alérgenos del látex natural. ....	16
1.2.3. Hev b 2 ( $\beta$ -1,3-glucanasa).. ....	19
<b>II. ANTECEDENTES</b>	
<b>III. HIPÓTESIS.</b>	
<b>IV. OBJETIVOS</b>	
4.1. Objetivo general. ....	29
4.2. Objetivos específicos ....	29
<b>V. METODOS (No incluidos en los artículos)</b>	
5.1. Purificación de las isoformas I y II de la $\beta$ -1,3-glucanasa de <i>H. brasiliensis</i> . ....	33

5.2. Determinación del contenido de estructura secundaria. . . . .	34
5.3. Curvas de termoestabilidad. . . . .	35
5.4. Ensayos de actividad $\beta$ -1,3-glucosidasa. . . . .	35
5.5. Determinación del grado de polimerización del laminarin. . . . .	35
5.6. Actividad vs pH, temperatura, amortiguadores y cantidad de enzima. .	36
5.7. Caracterización cinética. . . . .	36
5.8. Reconocimiento por anticuerpos tipo IgE. . . . .	36

## VI. PUBLICACIONES

ENDO- $\beta$ -1,3-glucanasas reconocidas por anticuerpos tipo IgE de sueros de pacientes alérgicos. *Alerg. Asma Inmunol. Pediatr.* **15**:35-42(2006).

Crystallization and identification of the glycosylated moieties of two isoforms of the main allergen Hev b 2 and preliminary X-ray analysis of two polymorphs of isoform II. *Acta Crystallogr.* **F63**:787-91(2007).

Structural insights into the recognition of the natural glycoallergen Hev b 2 by human basophils. Sometido a *J. Allergy Clin. Immunol.*

## VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN (no incluidos en los artículos)

6.1. Purificación y caracterización de las isoformas de Hev b 2. . . . .	103
6.2. Análisis estructural por DC. . . . .	105
6.3. Desnaturalización térmica de las isoformas de Hev b 2. . . . .	107
6.4. Actividad en función del pH. . . . .	109
6.5. Actividad en función de la temperatura. . . . .	110
6.6. Determinación de los parámetros cinéticos. . . . .	110
6.7. Reconocimiento de las isoformas I y II de Hev b 2 por IgEs. . . . .	114

## VIII. CONCLUSIONES

## IX. PERSPECTIVAS

## X. REFERENCIAS

## ABREVIATURAS

<b>APC</b>	Células presentadoras de antígenos.
<b>BIS-TRIS</b>	bis(2-hidroxietil)amino-tris(hidroximetil)metano.
<b>C5a</b>	Componente 5a del complemento, también denominada anafilatoxina-C5a.
<b>cAmp</b>	Adenosín monofosfato cíclico.
<b>CBP</b>	Proteína de unión a citrato.
<b>DAG</b>	Diacilglicerol.
<b>DC</b>	Dicroísmo circular.
<b>DNS</b>	Ácido dinitrosalicílico.
<b>ELISA</b>	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas.
<b>FcεRI</b>	Receptor tipo I de la fracción cristalizable tipo epsilon de la IgE.
<b>HCW</b>	Trabajadores al cuidado de la salud ( <i>Health care workers</i> ).
<b>ICK</b>	Nudo inhibitorio de cistina.
<b>IgE</b>	Inmunoglobulina tipo E.
<b>IgG</b>	Inmunoglobulina tipo G.
<b>IgM</b>	Inmunoglobulina tipo M.
<b>IP<sub>3</sub></b>	Trifosfato de inositol.
<b>ITAMs</b>	Motivos de activación de inmunorreceptor basado en tirosinas.
<b>IUIS</b>	Unión Internacional de Sociedades Inmunológicas ( <i>The International Union of Immunological Societies</i> ).
<b>LTC4</b>	Leucotrieno C4.
<b>MAPK</b>	Cinasas de proteínas activadas por mitógenos.
<b>MHC</b>	Complejo principal de histocompatibilidad.
<b>MALDI-TOF</b>	Desorción/ionización láser asistida por matriz ( <i>Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization</i> )-Tiempo de vuelo – ( <i>Time-Of-Flight</i> ).
<b>MES</b>	Ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico.
<b>OPD</b>	<i>orto</i> -fenildiamina.
<b>PAGE-SDS</b>	Electroforesis en geles de poliacrilamida y SDS.
<b>PBS</b>	Solución amortiguadora de fosfato.
<b>PRP</b>	Proteínas relacionadas a la patogénesis.

<b>RMSD</b>	Raíz de la desviación cuadrática media ( <i>Root mean square deviation</i> )
<b>SNARES</b>	Receptores solubles de unión a N-etilmaleimida.
<b>SB</b>	Espina bífida.
<b>SDS</b>	Dodecilsulfato de sodio.
<b>T<sub>H1</sub></b>	Linfocitos T ayudadores del tipo I.
<b>T<sub>H2</sub></b>	Linfocitos T ayudadores del tipo II.
<b>TIM</b>	Triosa fosfato isomerasa.
<b>TSH</b>	Hormona estimulante de la tiroides.
<b>UV</b>	Ultravioleta.



## RESUMEN

La alergia a los productos del látex de *Hevea brasiliensis* es un problema de salud que ha ido emergiendo de manera importante en las últimas tres décadas y que afecta de forma especial al personal médico, sanitario, de la industria del hule e individuos con múltiples intervenciones quirúrgicas (Szépfalusi *et al.*, 1999; Liss *et al.*, 1997). Uno de los principales alérgenos de esta fuente es Hev b 2, una enzima con actividad de  $\beta$ -1,3-glucanasa identificada por Churngchow *et al.* (1995) como dos isoformas, una de ellas glicosilada. Varios trabajos previos han demostrado que sólo la isoforma glicosilada es reconocida por las IgEs de pacientes con alergia al hule y es capaz de inducir reacciones de hipersensibilidad tipo I o inmediata en individuos atópicos. Hev b 2 también ha sido implicado en la reactividad cruzada frente a diferentes proteínas procedentes de frutas, vegetales, pólenes y muy recientemente, del veneno de algunos himenópteros, en un patología denominada *síndrome látex-fruta-polen-venenos* (Mahler *et al.*, 2006).

En este trabajo hemos aislado, con alta pureza y homogeneidad, dos isoformas glicosiladas de la  $\beta$ -1,3-glucanasa del látex de *H. brasiliensis*, que presentaron diferente grado de glicosilación. La estructura de los oligosacáridos de la isoforma I está constituida principalmente por monómeros de N-acetilglucosamina, N-acetilgalactosamina, fucosa y galactosa, mientras que la isoforma II contiene monómeros de N-acetilglucosamina, fucosa, manosa y xilosa. Los ensayos de ELISA demostraron además, que ambas isoformas fueron reconocidas por las IgEs de los sueros de personas diagnosticadas con alergia al látex.

Previo a este trabajo no se tenía la estructura 3D de un alérgeno natural glicosilado debido a la dificultad que implica la purificación de este tipo de proteínas. Aquí presentamos la cristalización de las isoformas I y II de Hev b 2 y la estructura tridimensional de dos polimorfos de la última. Los cristales pertenecieron a los sistemas monoclinico y tetragonal con grupos espaciales  $P2_1$  y  $P4_1$  respectivamente. El análisis de la estructura tridimensional, junto a los ensayos inmunológicos y el modelamiento *in silico* de la interacción con

anticuerpos tipo IgE, señalan a la zona glicosilada como el principal sitio antigénico de este alérgeno.

Finalmente, el análisis de la termoestabilidad correlacionó con el grado de glicosilación de cada isoforma, mientras que el comportamiento cinético exhibido frente al substrato laminarin, no fue el característico mostrado por la mayoría de las enzimas que actúan sobre substratos simples.

## ABSTRACT

Allergy to *Hevea brasiliensis* latex products is a health problem that has been emerging in an important way over the last three decades. It affects especially the health care workers, sanitary personnel, workers of the rubber industry and individuals undergoing multiple surgeries (Szépfalusi *et al.*, 1999; Liss *et al.*, 1997). One of the main allergens of this source is Hev b 2, an enzyme with endo- $\beta$ -1,3-glucanase activity identified by Churngchow *et al.*, (1995) as two isoforms; one of them glycosylated. Previous reports demonstrated that only the glycosylated isoform of this allergen was recognized by the IgEs of patients with latex allergy. Additionally, it was also able to induce hypersensitivity type I reactions in atopic individuals. Hev b 2 has been involved in the cross reactivity against different proteins from fruits, vegetables, pollens and, very recently to some hymenopter poisons, in a pathology denominated latex-fruit-pollen-poison syndrome (Mahler *et al.*, 2006).

In this work we have isolated, with high purity and homogeneity, two glycosylated isoforms of  $\beta$ -1,3-glucanase from *H. brasiliensis* latex. These isoforms displayed different glycosylation degree. Isoform I is mainly constituted by N-acetyl-glucosamine, N-acetyl galactosamine, fucose and galactose monosaccharides whereas isoforma II contains N-acetyl glucosamine, fucose, manose and xylose residues. In addition, the ELISA assays demonstrated that both isoforms were recognized by the IgEs of sera from subjects diagnosed with latex allergy. To date, no 3D structure of a natural glycosylated allergen has been reported due to the difficulty that implies the purification of glycosylated isoforms. This work presents the crystallization of the Hev b 2 I and II isoforms. Besides the three-dimensional structure of the two polymorphic crystals of isoform II were determined. The crystals belonged to the monoclinic and tetragonal systems with space groups  $P2_1$  and  $P4_1$ , respectively. The analysis of the three-dimensional structure, as well as the immunological assays and the modeling *in silico* of the IgE-allergen interaction showed that the carbohydrate moieties are the main antigenic sites on this allergen.

Finally, the thermostability analysis of isoform I and II correlated with the glycosylation degree. The kinetic behavior exhibited by the enzyme using laminarin was not the characteristic one shown by the majority of the enzymes acting on simple substrates.

# *INTRODUCCIÓN*



# I. INTRODUCCIÓN

## 1.1. ALERGIA E HIPERSENSIBILIDAD

### 1.1.1. Introducción

El término alergia fue introducido en 1906 por Clemens von Pirquet, para designar tanto la respuesta inmune protectora, como la respuesta alterada del cuerpo al reaccionar ante una sustancia extraña. Inicialmente esta definición incluyó a todas las reacciones de hipersensibilidad, concepto que clásicamente se refiere a la respuesta inmune exacerbada, la cual causa reacciones inflamatorias, daño tisular y en ocasiones puede dar lugar a una afección multisistémica, con implicación de al menos dos órganos y un cuadro de gravedad variable (anafilaxia). Aunque la palabra hipersensibilidad implica una reacción incrementada, la respuesta no siempre lo está y más bien puede tratarse de una reacción inmune inapropiada a un antígeno, donde es requisito que el individuo haya sido previamente sensibilizado, es decir, que haya sido expuesto por lo menos una vez a el/los antígeno(s) en cuestión. Asimismo, atopia es una palabra acuñada en los años veinte para describir la asociación familiar, y por tanto una base genética en la tendencia de ciertos individuos a padecer reacciones alérgicas tras la exposición a ciertas sustancias antigénicas. De ahí, la denominación de alergia atópica o enfermedades atópicas para referirse a estos procesos.

TIPO	NOMBRE	MEDIADORES
I	Hipersensibilidad mediada por IgE	Histamina, LTC4
II	Hipersensibilidad citotóxica mediada por IgG o IgM	C o ADCC
III	Hipersensibilidad mediada por inmunocomplejos	C5a, proteasas
IV	Hipersensibilidad mediada por células	Citocinas
V	Hipersensibilidad estimuladora mediada por IgG	

Tabla I. Reacciones de Hipersensibilidad

En 1963 P.H.G. Gell y Robin Coombs clasificaron las reacciones de hipersensibilidad en cuatro tipos distintos: Tipo I al IV, de acuerdo al tiempo que demoraba la aparición de los síntomas y los mecanismos involucrados en las

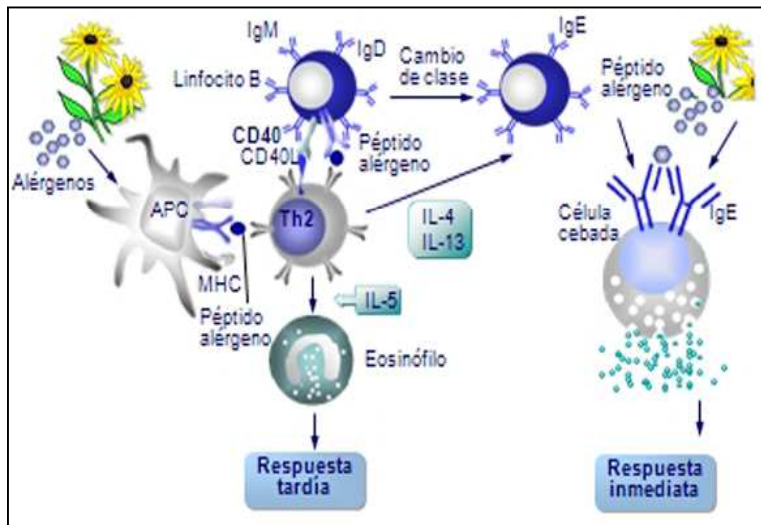
mismas (Tabla I). Los tres primeros tipos de hipersensibilidad se producen dentro de la inmunidad humoral y son mediados por anticuerpos o por complejos antígenos-anticuerpos, mientras que el cuarto tipo se encuentra mediado por células, principalmente por células T y macrófagos. Recientemente, se ha descrito un tipo V denominado hipersensibilidad estimuladora o neutralizante, la cual también se encuentra mediada por anticuerpos (Rajan, 2003).

### **1.1.2. Subtipos de reacciones hipersensibilidad**

1.1.2.1. *Hipersensibilidad tipo I.* También es denominada como hipersensibilidad anafiláctica o inmediata debido a que se presenta en minutos u horas después del desafío, y en la actualidad se usa restringidamente el término alergia para designar sólo a este tipo de hipersensibilidad. Actualmente las alergias son padecimientos que tienen una alta incidencia, llegando a afectar a más del 40% de la población mundial en algún momento de su vida. Esta respuesta exagerada del sistema inmune es originada por cierta clase de antígenos conocidos como alérgenos. Éstos son sustancias no parasitarias tales como proteínas o glicoproteínas, las cuales forman parte de productos naturales o bien pueden ser compuestos químicos de naturaleza hapténica, como la penicilina, los cuales son capaces de inducir las reacciones de hipersensibilidad inmediata en individuos sensibilizados y re-expuestos a un antígeno determinado.

Las reacciones de hipersensibilidad tipo I se encuentran mediadas por inmunoglobulinas tipo E (IgE) y, además del alérgeno, en el desarrollo de la hipersensibilidad tipo I intervienen varios tipos celulares, siendo los mastocitos o células cebadas y los basófilos, las principales células efectoras. Estas células tienen características únicas; sin embargo, ambas contienen gránulos citoplasmáticos cuyos contenidos son los principales mediadores de las reacciones alérgicas, además de compartir en gran medida el mecanismo de activación, el que se describe más adelante.





**Figura 1. Eventos de la reacción de hipersensibilidad tipo I.** La exposición a un alérgeno activa las células  $T_H2$  a través de las células presentadoras de antígeno (APC), las cuales estimulan a las células B para producir IgEs. La subsiguiente exposición al alérgeno resulta en la unión de éste a las IgEs unidas en la membrana de los mastocitos. Este evento ocasiona que estas células se activen y liberen sus gránulos.

De forma breve, las reacciones de tipo I se caracterizan por la secreción de IgEs producidas por las células plasmáticas en respuesta a la activación de células  $T_H2$  específicas por un alérgeno. La posterior activación de mastocitos tisulares y basófilos sanguíneos por la re-exposición del alérgeno, que generalmente suele producirse dentro de los 15 a 30 minutos desde la interacción del alérgeno con las IgEs preformadas y unidas en la superficie de las células, conlleva a una respuesta inflamatoria localizada o generalizada, según la magnitud de la liberación de los mediadores (Figura 1). Aunque normalmente las reacciones alérgicas se producen en un lapso de tiempo de unos pocos minutos, a veces puede presentarse como una reactividad semi-retardada dentro de las 10-12 horas siguientes a la exposición del alérgeno.

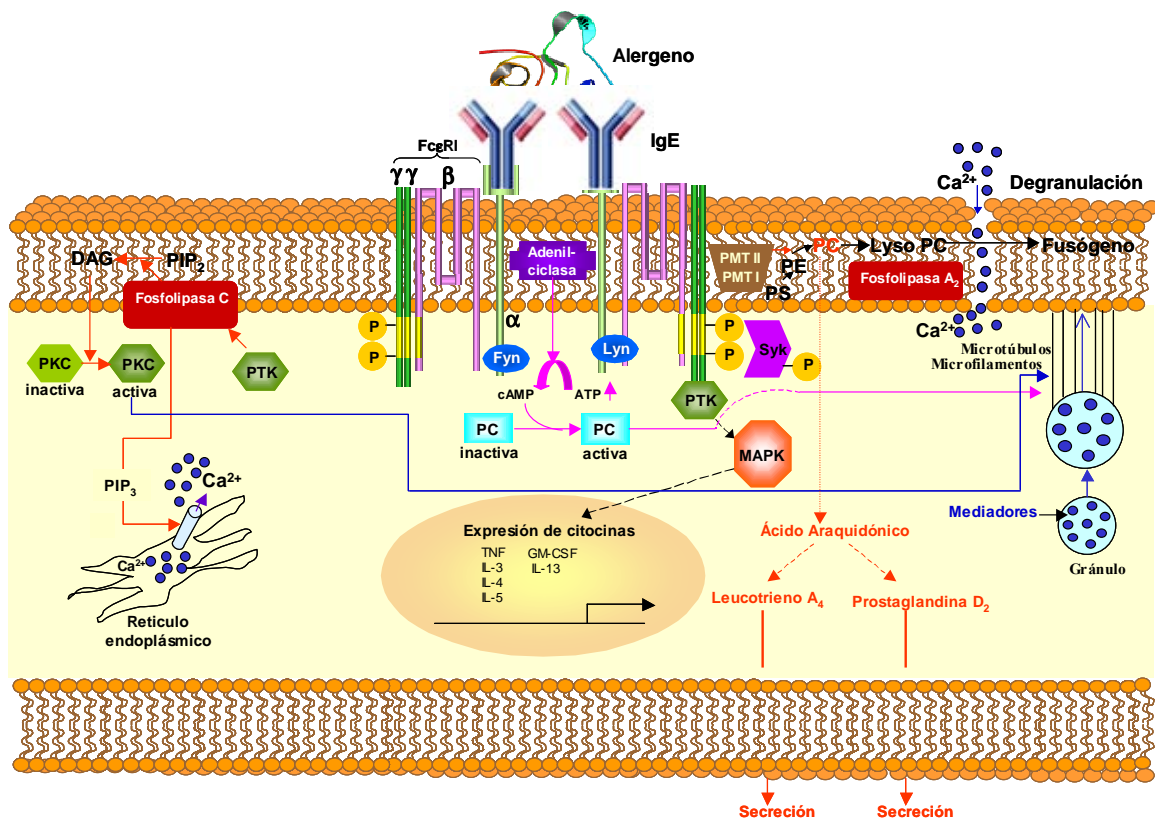
#### 1.1.2.1.1. *Mecanismos moleculares de la desgranulación de mastocitos.*

Debido a la importancia que desempeñan los mastocitos en la respuesta alérgica, numerosos estudios se han centrado en la determinación del mecanismo de desgranulación de estas células. Éste inicia por el entrecruzamiento de dos o más moléculas del receptor  $Fc\epsilon RI$ , lo que ocurre por la unión de antígenos multivalentes a las IgEs ancladas a la membrana de los mastocitos a través de los mismos. El proceso de señalización intracelular que

sigue a continuación implica la interacción de diversas fosfatasa y cinasa de proteínas y lípidos, así como el reordenamiento del citoesqueleto.

La cinasa de tirosina de la familia Src denominada Lyn, unida constitutivamente al dominio citoplasmático de la cadena  $\beta$  del Fc $\epsilon$ RI en los mastocitos, es activada por el entrecruzamiento del Fc $\epsilon$ RI. Esta enzima fosforila las tirosinas dentro de los motivos de activación de inmunorreceptor basado en tirosinas (ITAMs) en los dominios citoplasmáticos de las cadenas  $\beta$  y  $\gamma$ , del receptor Fc $\epsilon$ RI. Entonces la Syk, otra cinasa de tirosina, es reclutada a los ITAMs de las cadenas  $\gamma$  de este receptor y cambia a su estado activado, para así fosforilar y activar otras enzimas y moléculas adaptadoras de la cascada de señalización, entre ellas la fosfolipasa C (PLC). PLC cataliza el rompimiento del fosfatidilinositol bifosfato para producir 1,4,5-trifosfato de inositol (IP<sub>3</sub>) y diacilglicerol (DAG), que median el proceso de desgranulación. El IP<sub>3</sub> eleva las concentraciones intracelulares de Ca<sup>2+</sup>, y el DAG, junto con el Ca<sup>2+</sup>, activa la cinasa de proteína C (PKC). Este aumento en las concentraciones de Ca<sup>2+</sup> intracelular y de la PKC activada, conduce a la desgranulación (Figura 2). Después de quince segundos de haberse establecido el entrecruzamiento del receptor Fc $\epsilon$ RI también se observa la metilación de diversos fosfolípidos de la membrana, los que producen el aumento de la fluidez de la misma y la formación de canales de Ca<sup>2+</sup>. Así, el aumento de Ca<sup>2+</sup> intracelular que se presenta a continuación se debe tanto a la captación de Ca<sup>2+</sup> extracelular a través de los canales como a la liberación del mismo desde las reservas intracelulares en el retículo endoplásmico. De tal forma, esta elevación en la concentración de Ca<sup>2+</sup> intracelular, promueve el ensamblaje de los microtúbulos y la contracción de los microfilamentos, ambos procesos necesarios para el movimiento de gránulos hacia la membrana plasmática. De igual forma, las proteínas SNARES (receptores solubles de unión a N-etilmaleimida), que están presentes tanto en la membrana de los gránulos como en la membrana plasmática, median la fusión de los gránulos con la membrana celular y la consecuente exocitosis de los mediadores primarios relacionados con la desgranulación de los mastocitos. Asimismo, el

aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  y la metilación de fosfolípidos ocasionan el incremento transitorio en la actividad de la adenilciclasa unida a la membrana. El producto de su reacción, el monofosfato cíclico de adenosina (cAMP), promueve la activación de las proteínas dependientes cAMP.



**Figura 2. Eventos bioquímicos durante la activación y desgranulación del mastocito.** El enlace cruzado del alérgeno y las IgEs unida a la membrana del mastocito induce la agregación de los receptores  $\text{Fc}\epsilon\text{RI}$ , lo que conlleva a la activación de las cinasas Syk y Lyn. Estas últimas a su vez activan la cascada de la MAP cinasa (MAPK) para la transcripción de los genes de citocinas y a la fosfolipasa C específica para el 4,5-bisfosfato de fosfatidilinositol ( $\text{PIP}_2$ ) que forma parte de la membrana. La fosfolipasa C convierte el  $\text{PIP}_2$  en diacilglicerol (DAG) y trifosfato de inositol ( $\text{IP}_3$ ). El  $\text{IP}_3$  causa la liberación del  $\text{Ca}^{2+}$  del retículo endoplásmico. El  $\text{Ca}^{2+}$  y DAG activan activa a la cinasa de proteína C (PKC), esencial para el ensamblaje microtubular y la fusión y liberación de los gránulos. Igualmente, se cree que las cinasas de proteína (PC) dependientes de cAMP fosforilan las proteínas de los gránulos facilitando su liberación. Por otra parte, el  $\text{Ca}^{2+}$  y las MAPK activan a la fosfolipasa  $\text{A}_2$  la cual inicia la síntesis de mediadores lipídicos, junto con las metiltransferasas (PMT I y II).

Estas proteínas fosforilan las proteínas de la membrana de los gránulos y por tanto cambian su permeabilidad al agua y al mismo cAMP. La tumefacción de los gránulos, que se sucede a continuación, facilita su fusión con la

membrana plasmática, lo que ocasiona que liberen su contenido. Otro efecto del aumento de  $\text{Ca}^{2+}$ , junto con la inducción de una cinasa de proteína activada por mitógeno (MAPK), es la producción de citocinas y la activación de la enzima fosfolipasa  $A_2$  ( $\text{PLA}_2$ ). Esta última hidroliza los fosfolípidos de membrana, produciendo la formación de ácido araquidónico, que posteriormente se convierte en prostaglandinas y leucotrienos. Éstos son potentes mediadores de la inflamación, que ejercen efectos dilatadores sobre los vasos sanguíneos, ocasionan aumento de la permeabilidad vascular y tienen efectos quimiotácticos sobre neutrófilos, produciendo así los síntomas característicos de las reacciones alérgicas (Kindt *et al.*, 2007; Abbas *et al.*, 2007).

#### 1.1.2.2. *Hipersensibilidad tipo II o hipersensibilidad citotóxica*

Estas reacciones se caracterizan por la destrucción de células mediada por anticuerpos preformados tipo IgG e IgM. Éstos se unen a antígenos presentes o fijados en la superficie de la célula blanco y activan el sistema del complemento o propician la citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos (Abbas *et al.*, 2007).

#### 1.1.2.3. *Hipersensibilidad tipo III o mediada por inmunocomplejos*

Esta reacción es mediada por la formación de complejos inmunes antígeno-anticuerpo circulantes, los cuales inducen la activación del sistema del complemento cuyas anafilotoxinas C3a y C5a producen la desgranulación localizada de los mastocitos e incrementan por consiguiente, la permeabilidad vascular. Las anafilotoxinas C3a y C5a también son factores quimiotáctico para neutrófilos, los que al activarse liberan las enzimas contenidas en sus gránulos causando daño tisular (Abbas *et al.*, 2007).

#### 1.1.2.4. *Hipersensibilidad tipo IV o celular*

También se denomina hipersensibilidad tardía o retardada porque el desarrollo de la reacción requiere unas 24 horas para que sea evidente, y entre 48 y 72 horas para que sea máxima. Ésta es una respuesta mediada por linfocitos T, macrófagos y monocitos. El desarrollo de una reacción de

hipersensibilidad tipo IV requiere de un periodo de sensibilización de una a dos semanas tras el primer contacto con el antígeno. En este período los linfocitos T<sub>H</sub>1 son activados por la presentación del antígenos restringidos a moléculas MHC clase II. Tras un segundo contacto con el antígeno, los linfocitos T previamente sensibilizados, secretan citocinas que inducen una reacción inflamatoria localizada (Landsteiner & Chase, 1942; Poulter *et al.*, 1982).

#### 1.1.2.5. *Hipersensibilidad tipo V, estimuladora o neutralizante.*

Esta reacción es mediada por anticuerpos que reaccionan contra un componente de la superficie celular e inducen o neutralizan la actividad de la célula correspondiente. Ejemplo de ello es la enfermedad de *Basetow Graves*, donde una inmunoglobulina G se une a un receptor TSH de la célula tiroidea y la estimula produciendo hormona tiroidea. Otro ejemplo es la miastenia gravis, donde una inmunoglobulina G se une al receptor de acetilcolina de la placa motora y lo bloquea (Rajan, 2003).

### **1.1.3. Factores que influyen en el desarrollo de la hipersensibilidad I**

La alergia es un padecimiento multifactorial cuyas causas son muy difíciles de establecer con precisión. Sin embargo, se han identificado algunos factores individuales y ambientales que podrían influir en su desarrollo. Entre los factores individuales, el más importante lo constituye la herencia, seguido de la edad, sexo y raza. Por otra parte, como factores ambientales se han señalado las alteraciones a la exposición de microbios durante la infancia, la polución, los niveles de exposición a sustancias alergénicas y los cambios en la alimentación. Todos estos factores en conjunto, han permitido proponer cuatro hipótesis para explicar el aumento de las alergias observado en los últimos años

#### 1.1.3.1 *Hipótesis genética*

Esta hipótesis sugiere que existe una predisposición genética que influye la susceptibilidad de un individuo a las reacciones alérgicas. Las evidencias que apoyan esta hipótesis son:

- La asociación familiar de las alergias. Se ha observado que existe una probabilidad del 50% de tener hijos alérgicos cuando ambos padres son alérgicos, mientras que cuando sólo uno de los progenitores lo es, la posibilidad de que sus hijos manifiesten algún tipo de hipersensibilidad tipo I es del 30%. Asimismo, los gemelos idénticos tienen una propensión del 70% de padecer el mismo tipo de alergias, mientras que en gemelos no idénticos este valor es del 40% (De Swert, 1999; Galli, 2000).

- Otra evidencia a favor de la hipótesis genética es la identificación de polimorfismos en varios genes de citocinas ligados a la atopia como IL-3, IL-4, IL-5, IL-9, IL-13 y el factor estimulante de colonias de granulocitos/ macrófagos, GM-CSF, que influyen en el desarrollo de la enfermedad (Brown *et al.*, 2005). No obstante las evidencias anteriores, el incremento en la incidencia de las alergias en las últimas décadas no puede ser explicado sólo por factores genéticos y en consecuencia han surgido otras hipótesis.

#### 1.1.3.2. Hipótesis de la higiene.

En la actualidad la hipótesis de la higiene es la más aceptada para explicar el aumento de las alergias en países industrializados. Ésta postula que la exposición reducida a agentes infecciosos como organismos simbióticos y parásitos durante la infancia, favorece la tendencia a desarrollar reacciones alérgicas y enfermedades autoinmunes por no adecuar al sistema inmune debidamente (Liebowitz *et al.*, 1966; Strachan, 1989). De tal forma que en ausencia de estas exposiciones repetidas, nuestro sistema inmunológico en desarrollo, poco estimulado a edad temprana, estaría entonces sobre estimulado por sustancias inofensivas como el polen, provocando el desarrollo de alergias. Los resultados de un estudio en el que se compara el sistema inmune de ratones salvajes y de laboratorio parecen reforzar la hipótesis de la higiene (Devalapalli *et al.*, 2006). Éstos demuestran que los ratones silvestres en contacto con parásitos producen mayores niveles de IgEs que sus semejantes de laboratorio. No obstante, este incremento en el nivel de la IgEs

favorece la reacción protectora en los ratones silvestres, mientras que en los animales de laboratorio conllevan a la aparición de alergias.

#### 1.1.3.3. *Hipótesis de la contaminación ambiental*

Aunque la hipótesis de la higiene es la que actualmente cuenta con mayor aceptación, no es la única explicación considerada para el aumento en la prevalencia de las alergias. Otra hipótesis surgida por la pregunta de si los cambios del medio ambiente, como la polución, impuestos en el fondo genético han llevado al aumento en las alergias es la hipótesis de la contaminación ambiental. Ésta también surge como otra explicación del aumento observado de las enfermedades alérgicas en las zonas industrializadas cuando se comparan con las zonas rurales.

Un ejemplo de cómo los cambios del medio ambiente, como las partículas de diesel pueden influir en la expresión de polimorfismos genéticos, es el estudio realizado por Gilliland *et al.* (2004). En él se demuestra que una variante del gen de la glutatión-S-transferasa humana incrementa el efecto adyuvante de las partículas diesel sobre la inflamación alérgica. La glutatión S-transferasa puede metabolizar especies reactivas de oxígeno y desintoxicar xenobióticos presentes en partículas de diesel. Las mutaciones en la glutatión S-transferasa que inhiben esta función podrían aumentar la inflamación y la respuesta a sustancias no peligrosas como los alérgenos. Estas modificaciones sólo se podrían observar en áreas con una alta concentración de partículas de diesel aerotransportadas como en las grandes ciudades y constituye un claro ejemplo de la interacción gen-ambiente.

#### 1.1.3.4. *Hipótesis del linfocito T-regulador*

Esta hipótesis postula que linfocitos T reguladores ( $T_{reg}$ ), con perfiles de citocinas distintas a las  $T_H1$  y  $T_H2$  ejercen una función inmunosupresora. Estos linfocitos actúan inhibiendo las respuestas exageradas del sistema inmune frente a los alérgenos y en las personas atópicas habría una reducción del número de éstos (Hawrylowicz, 2005).

## **1.2. LA ALERGIA AL LÁTEX DE *Hevea brasiliensis***

El árbol del hule, *Hevea brasiliensis*, es una planta tropical laticífera perteneciente a la familia de las euforbiáceas. Existen aproximadamente 2000 plantas que producen látex; sin embargo, ésta es la única especie explotada comercialmente. El látex de este árbol es el citoplasma de células especializadas denominadas laticíferas cuyo principal componente es el cis-1,4-poliisopreno o hule natural con un 55 a 65% de su peso. También contiene una serie de organelos denominados lutoides, de origen vacuolar, los que contienen varios tipos de hidrolasas, así como proteínas de la coagulación del látex, enzimas relacionadas a la biosíntesis del poliisopreno y proteínas relacionadas al sistema de defensa de la planta (*Pathogenesis-related Proteins*, PRP). Todas ellas constituyen entre el 1 y 2% del peso del látex (Valls *et al.*, 2004).

Debido a las propiedades elásticas y de barrera, el hule natural obtenido del látex de *H. brasiliensis* es utilizado como materia prima para la elaboración de aproximadamente 40,000 productos, de los cuales más de 400 son artículos de uso médico y quirúrgicos. En guantes de hule natural tanto de exploración como quirúrgicos, varios reportes han demostrado la presencia de algunos alérgenos o fragmentos inmunológicamente activos de los mismos, capaces de causar la sensibilización en personas con predisposición y de provocar una respuesta de alergia al látex (Galli, 2000).

La alergia al látex se describió por primera vez en 1927 en Alemania. En las últimas décadas, este padecimiento se ha convertido en un importante problema de salud mundial que afecta cada vez a un mayor número de pacientes como consecuencia del uso masivo de productos elaborados con base en hule natural para la profilaxis de enfermedades infecciosas, aunado posiblemente al descenso en la calidad final de los productos.

Los principales grupos de riesgo de la alergia al látex incluyen los pacientes con historia de múltiples intervenciones quirúrgicas, destacando



aquellos con espina bífida (SB), malformaciones urogenitales congénitas severas, entre otras, cuya prevalencia oscila entre el 10 y 60% (Szépfalusi et al., 1999); los profesionales del área de la salud (*Health care workers*, HCW) con una incidencia del 3 al 17% (Liss et al., 1997); los trabajadores de la industria del hule con un 6 al 11% (Miri et al., 2007) y las personas con antecedentes de atopia y alergia a frutas (Niggemann & Breiteneder, 2000). En contraste con los principales grupos de riesgo, los estudios epidemiológicos demuestran que la prevalencia en la población general es del 1%, destacando la atopia como el factor individual más importante en la sensibilización (Turjanmaa, 1994).

Por su parte, las manifestaciones clínicas de los síntomas de la alergia al hule natural son muy variables y pueden progresar gradualmente con los contactos sucesivos. Dependiendo de la vía de exposición, la cantidad de alérgeno contactado y como ya se mencionó, de la predisposición genética, éstos pueden variar desde unos síntomas locales moderados como dermatitis, urticaria, angioedema, conjuntivitis, rinitis y asma, hasta presentar cuadros anafilácticos (Ownby et al., 1991; Nuter, 1979).

### **1.2.1 Alérgenos del látex de *H. brasiliensis***

En el látex de *H. brasiliensis* se han identificado más de 200 proteínas distintas, de las cuales alrededor de 50 tienen la capacidad de unir las IgEs de los sueros de pacientes con alergia a este material, pero sólo 13 de éstas, incluyendo sus isoalérgenos y varias isoformas de los mismos, han sido clasificadas como alérgenos por el Subcomité de Nomenclatura de la Unión Internacional de Sociedades Inmunológicas (IUIS). Cabe precisar que según esta asociación, dos moléculas son isoalérgenos cuando comparten, además de un tamaño molecular similar, una idéntica función biológica, si ésta es conocida, e identidad en la secuencia de aminoácidos igual o mayor al 67%. Por su parte, una variante o isoforma corresponde a las múltiples formas que puede presentar

un isoalérgeno, las cuales comparten una identidad en la secuencia de aminoácidos mayor o igual al 97% ([www.allergen.org/Allergen.aspx](http://www.allergen.org/Allergen.aspx)).

La nomenclatura como alérgeno consiste de las tres primeras letras del género a que pertenece el organismo, seguido de la primera letra de la especie y de un número arábigo que indica el orden cronológico de su purificación y depósito en la base de datos de la mencionada entidad. Cada uno de los términos va separado por un espacio. Los isoalérgenos se distinguen por dos números adicionales seguidos después de un punto del número asignado para el alérgeno mientras que las isoformas de un mismo alérgeno se caracterizan por dos números consecutivos más al asignado para la isoforma (King *et al.*, 1994).

**Tabla II. Alérgenos del látex de *Hevea brasiliensis*.**

Nomenclatura	Nombre/Función	MM(SDS-PAGE)	Individuos sensibilizados (%)
Hev b 1	Factor de elongación del hule	14 kDa	81 (SB)/ 52 (HCW) <sup>*</sup>
Hev b 2	beta-1,3-glucanasa	38 kDa	67 (SB)/ 78 (HCW) <sup>‡</sup>
Hev b 3	Proteína de la biosíntesis del poliisopreno	24 kDa	83 (SB)/ 24 (HCW) <sup>*</sup>
Hev b 4	Lecitinasa/beta-glucosidasa	53-55 kDa	77 (SB)/ 65 (HCW) <sup>*</sup>
Hev b 5	Proteína estructural citosólica	16 kDa	56 (SB)/ 92 (HCW) <sup>*</sup>
Hev b 6.01	Proheveína	20 kDa	48 (SB)/ 71 (HCW) <sup>‡</sup>
Hev b 6.0201	Heveína	4.7 kDa	88 (SB)/ 56 (HCW) <sup>*</sup>
Hev b 6.0202	Heveína	4.7 kDa	NR
Hev b 6.03	C-terminal de proheveína	16 kDa	28 (SB)/ 40 (HCW) <sup>*</sup>
Hev b 7.01	Patatina	42 kDa	11 (SB)/ 22 (HCW) <sup>*</sup>
Hev b 7.02	Patatina	42 kDa	21 (SB)/ 30 (HCW) <sup>‡</sup>
Hev b 8.0101	Profilina	15 kDa	88 (SB) <sup>*</sup> / 35 (HCW) <sup>*</sup>
Hev b 8.0102	Profilina	15 kDa	NR
Hev b 8.0201	Profilina	15 kDa	NR
Hev b 8.0202	Profilina	15 kDa	NR
Hev b 8.0203	Profilina	15 kDa	NR
Hev b 8.0204	Profilina	15 kDa	NR
Hev b 9	Enolasa	51 kDa	14.5 (HCW) <sup>*</sup>
Hev b 10.0101	Mn-superóxido dismutasa	26 kDa	0 (SB)/ 10(HCW) <sup>*</sup>
Hev b 10.0102	Mn-superóxido dismutasa	26 kDa	NR
Hev b 10.0103	Mn-superóxido dismutasa	26 kDa	NR
Hev b 11.0101	Quitinasa de clase I	30 kDa	17 (SB)/ 24 (HCW) <sup>‡</sup>
Hev b 11.0102	Quitinasa de clase I	30 kDa	NR
Hev b 12	Proteína transportadora de lípidos	9.3 kDa	17 (SB)/ 18 (HCW) <sup>‡</sup>
Hev b 13	Esterasa	42 kDa	67 (SB)/ 86 (HCW) <sup>‡</sup>

\*Dato tomado del sitio de la IUSI ([www.allergen.org/Allergen.aspx](http://www.allergen.org/Allergen.aspx))

‡Dato reportado por Raulf-Heimsoth *et al.*, 2007.

+Dato reportado por Sánchez-Palacios, A., 2001.

NR: Dato no reportado.

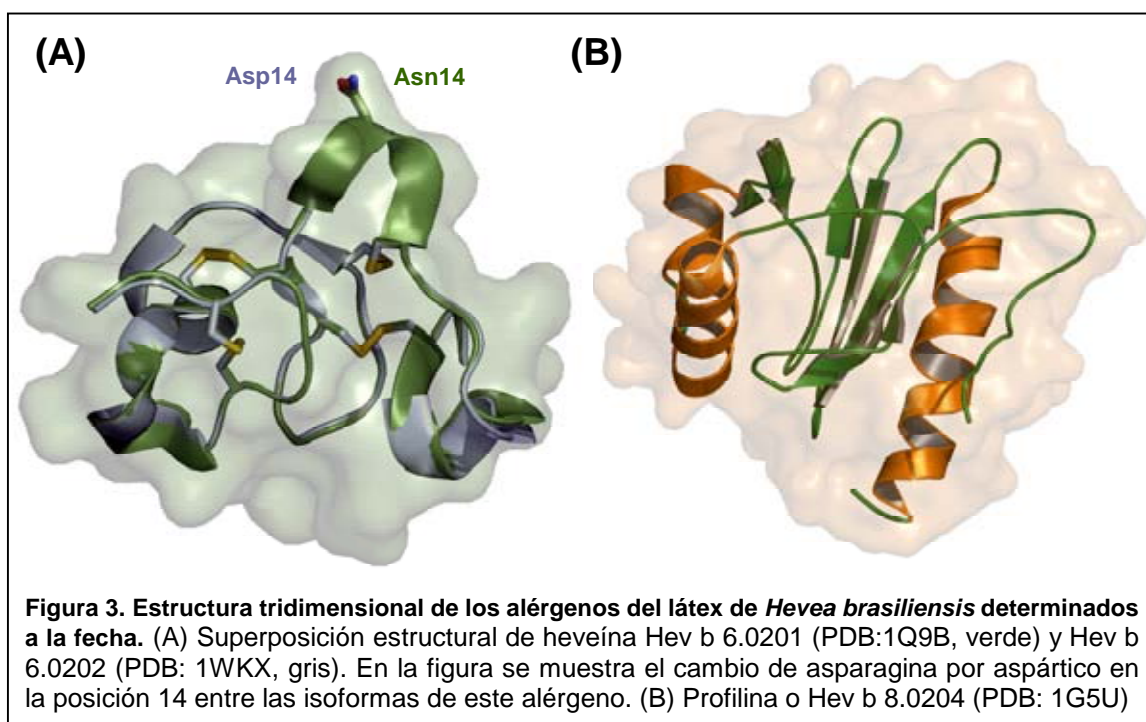
Los alérgenos del látex natural despliegan una diversidad de funciones biológicas, incluyendo enzimas, inhibidores de enzimas, proteínas estructurales y de almacenamiento. La tabla 2 lista los 13 alérgenos registrados, al igual que la prevalencia individual con la que son reconocidos por los sueros de pacientes con espina bífida y trabajadores del sector salud, entre otras características. De todos ellos y como su número lo indica, el factor de elongación del látex o Hev b 1 (Dennis & Light, 1989) fue el primer alérgeno identificado en este material. Hev b 1 es una pequeña proteína de 14.6 kDa reconocida por el 81% de los pacientes con espina bífida y en un 52% por los trabajadores del sector salud. Por otra parte Hev b 2, alérgeno en el que se centra este trabajo (Sunderasan *et al.*, 1995; Alenius *et al.*, 1995), es una glicoproteína con actividad de  $\beta$ -1,3-glucanasa cuya prevalencia en pacientes con espina bífida y trabajadores sanitarios también es alta (Tabla II). A lo largo de este trabajo nos estaremos refiriendo indistintamente a este alérgeno como Hev b 2 o  $\beta$ -1,3-glucanasa. El siguiente alérgeno es Hev b 3, una proteína de 23 kDa que comparte un 47% en identidad de secuencia con Hev b 1 y cuya actividad también se encuentra ligada a la biosíntesis del poliisopreno (Alenius *et al.*, 1993). Hev b 4 es otra glicoproteína con actividad de glicosidasa y ha sido señalada como un componente de la microhélice (Sunderasan *et al.*, 1995). Hev b 5 es una proteína ácida de 16 kDa, termoestable que al igual que Hev b 1, Hev b 2 y Hev b 3 han sido identificadas en varios extractos de guantes de látex (Akasawa *et al.*, 1996; Slater *et al.*, 1996). El sexto alérgeno del hule natural es uno de los que cuenta con la mayor prevalencia en todos los grupos susceptibles a desarrollar alergia al látex. Éste presenta tres isoalérgenos, Hev b 6.01, Hev b 6.02 y Hev b 6.03 (Archer, 1960). El primer isoalérgeno, es un precursor de 20 kDa conocido como proheveína, el cual al sufrir hidrólisis produce un fragmento N-terminal de 4.6 kDa denominado heveína o Hev b 6.02 y el segmento C-terminal o Hev b 6.03. Recientemente nuestro grupo reportó para heveína otra isoforma conocida Hev b 6.0202 (Reyes-López *et al.*, 2006). El siguiente alérgeno en la lista es Hev b 7 (Beezhold *et al.*, 1994; Kostyal *et al.*, 1998), una proteína que comparte el 50% en identidad de secuencia con el alérgeno de la papa, patatina. Por su parte, Hev b 8 es la profilina de *H. brasiliensis* (Vallier *et al.*, 1995). Esta proteína, altamente

conservada en los organismos eucariotes, forma complejos con la actina regulando su polimerización y participando de esta manera en la forma y en los movimientos celulares. Desde el punto de vista inmunológico, las profilinas son alérgenos importantes responsables de la reactividad cruzada entre especies no relacionadas. De acuerdo a lo establecido por la IUIS para la denominación de isoalérgeno e isoforma, en el látex de *H. brasiliensis* se han identificado dos isoalérgenos de Hev b 8 y cuatro isoformas del mismo. Por otra parte, Hev b 9 es la enolasa del látex natural. Ésta es otra proteína ubicua, involucrada en el catabolismo de carbohidratos (Posch *et al.*, 1997), la cual tiene una baja prevalencia en pacientes con espina bífida y trabajadores del área de la salud. El siguiente alérgeno es Hev b 10, una superóxido dismutasa de manganeso considerado como un alérgeno con poca prevalencia (Posch *et al.*, 1997), mientras que Hev b 11, una quitinasa de clase I, es considerado un alérgeno importante en la reactividad cruzada entre el látex natural, frutas y pólenes (O'Riordain *et al.*, 2002). Finalmente, los dos últimos alérgenos identificados en el hule natural lo constituyen Hev b 12 y Hev b 13. El primero es una proteína de 9.3 kDa con actividad transportadora de lípidos y con una alta relevancia en la reactividad cruzada frente a otras proteínas de frutas (Beezhold *et al.*, 2003). El segundo, es otra glicoproteína de 42 kDa con actividad de esterasa (Arif *et al.*, 2004) el cual es reconocido entre el 75 y 83% de los trabajadores del área de salud según datos de la OMS/IUIS y datos de la reciente publicación de Raulf-Heimsoft, *et al.* (2007).

### **1.2.2 Estructura y análisis de los alérgenos del látex natural**

Desde una perspectiva diferente, durante las últimas décadas se ha tratado de investigar las bases moleculares de la alergenicidad determinando las estructuras tridimensionales de algunos alérgenos (Gajhede *et al.*, 1996; Receveur-Bréchet *et al.*, 2006). Sin embargo, estos estudios estructurales, así como el conocimiento de las características conformacionales de los sitios de unión a las IgE, son muy escasos (Li *et al.*, 2008; Padavattan *et al.*, 2009), incluyendo a los alérgenos del látex de *H. brasiliensis*, los cuales comprenden un conjunto de proteínas con una amplia variabilidad, tanto funcional como

estructural. La primera estructura tridimensional resuelta de un alérgeno del látex natural fue Hev b 6.0201 o heveína, la cual fue determinada por difracción de rayos X a 2.8 Å de resolución (Rodríguez-Romero *et al.*, 1991). Posteriormente esta estructura fue determinada en disolución por RMN (PDB: 1HEV; Andersen *et al.*, 1994) y recientemente se volvió a determinar por difracción de rayos-X a 1.5 Å de resolución (PDB: 1Q9B; Reyes-López *et al.*, 2004).



Como se muestra en la figura 3A, Hev b 6.0201 es un pequeño péptido globular, altamente compacto que contiene cuatro puentes disulfuro y adopta la topología del nudo inhibitorio de cistina (*Inhibitor Cystine Knot*, ICK), plegamiento común al adoptado por toxinas polipeptídicas de origen marino, así como por toxinas provenientes del veneno de arañas e insectos (Menéz *et al.*, 1992; Pallagy *et al.*, 1994). La siguiente estructura reportada fue el isoalérgeno de la profilina, Hev b 8.0204 (Figura 3B). Las profilinas son proteínas ubicuas de los organismos eucarióticos Su estructura tridimensional compacta adquiere una topología tipo  $\alpha+\beta$ , consistiendo de un sándwich

formado por una hoja central de siete hebras  $\beta$  antiparalelas y estructuras tipo hélices  $\alpha$  a cada lado de la hoja  $\beta$  (Mahoney *et al.*, 1999). La última estructura tridimensional determinada para un alérgeno de látex de *H. brasiliensis* fue la isoforma Hev b 6.0202 (Figura 3A), la cual sólo difiere de la heveína en la sustitución de Asn por Asp en la posición catorce (PDB: 1WKX; Reyes-López *et al.*, 2006). La comparación de la estructura secundaria de estos alérgenos no muestra más que la presencia de hebras-beta común a ellos.

En el trabajo publicado por Karisola *et al.*, (2004) sobre el análisis estructural de los aminoácidos expuestos en la superficie, y potencialmente involucrados en el reconocimiento de Hev b 6.0201 por IgEs, se identificaron dos epítopos localizados en caras opuestas de la molécula y conteniendo los residuos polares y cargados Arg5, Lys10, Gln38, Glu29, Tyr30 e His35. Por otra parte, en el trabajo de Reyes-López *et al.*, (2006) se sugieren los residuos hidrofóbicos Trp21, Trp23 y Tyr30 como parte del epítipo conformacional dominante, mientras que el análisis de Hev b 8.0204 (Fig. 3B) propone tres epítopos conformacionales en áreas compuestas de residuos polares o cargados (Radauer *et al.*, 2006). Como se puede apreciar, los datos experimentales de la unión alérgeno-IgE sólo apuntan a ciertas áreas superficiales de las proteínas alergénicas como importantes para dicha interacción y más allá de la importancia documentada de éstos para la unión eficiente de las IgEs, el conocimiento de las características estructurales de los sitios conformacionales de unión a IgE es muy limitado y aún no es posible sugerir algún motivo estructural o patrón de secuencia conformacional común a todas las proteínas alergénicas.

No obstante lo anterior, dos propiedades que parecen mostrar los alérgenos del látex natural y en general todos los alérgenos de plantas, es su abundancia y su estructura tridimensional compacta, que aunado a otras características como la presencia y grado de glicosilación, puentes disulfuro y la unión de ligandos, le confieren una alta estabilidad estructural. Algunos estudios han demostrado que para varios alérgenos, la unión efectiva de la IgE

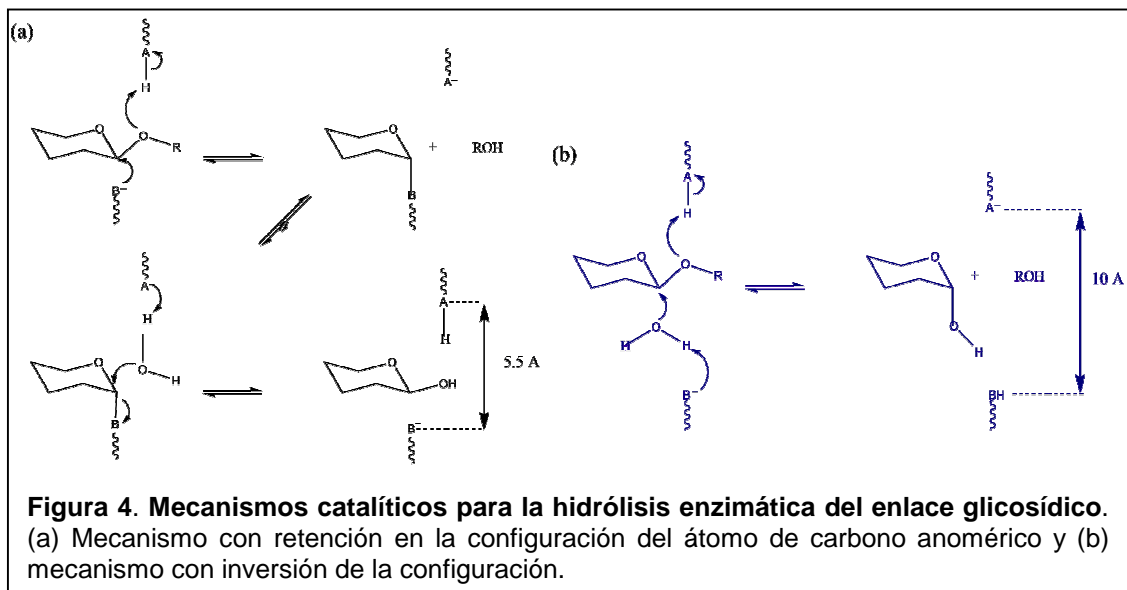
depende de la integridad de la estructura (Drew *et al.*, 2004; Davis & Williams, 1998). Actualmente, la estructura tridimensional de un número importante de alérgenos de otras fuentes han sido determinadas; sin embargo, es necesaria la determinación de un mayor número de estructuras de este tipo de proteínas para permitir un mejor entendimiento de las bases moleculares de la alergenicidad. Por ende, la determinación de la estructura terciaria permitirá identificar los aminoácidos cruciales para la unión de anticuerpo tipo IgE sobre la superficie de la molécula, además proporcionará un mejor entendimiento de la respuesta inmune frente al alérgeno y facilitará el diseño racional de una estrategia de inmunoterapia para el tratamiento de la alergia.

### **1.2.3. Hev b 2 ( $\beta$ -1,3-glucanasa)**

Hev b 2 es una glicohidrolasa básica con actividad de  $\beta$ -1,3-glucanasa que se encuentra asociada a vacuolas y la que presenta varias isoformas. Ésta fue primeramente descrita por Sunderasan *et al.* (1995) y Alenius *et al.* (1995) como una proteína de 36 kDa, reconocida por las IgEs de pacientes con alergia al hule y a frutas. Las  $\beta$ -1,3-glucanasas, han sido designadas como “proteínas relacionada a la patogénesis” (PRP) debido a su capacidad para hidrolizar las uniones (1 $\rightarrow$ 3) de los  $\beta$ -glucanos de la pared celular de hongos y bacterias (Sussman *et al.*, 2002). En general, las glicohidrolasas están ampliamente distribuidas en arqueobacterias, eubacterias y eucariota catalizando la hidrólisis de los enlaces glicosídicos de oligosacáridos, polisacáridos o bien de sus glicoconjugados.

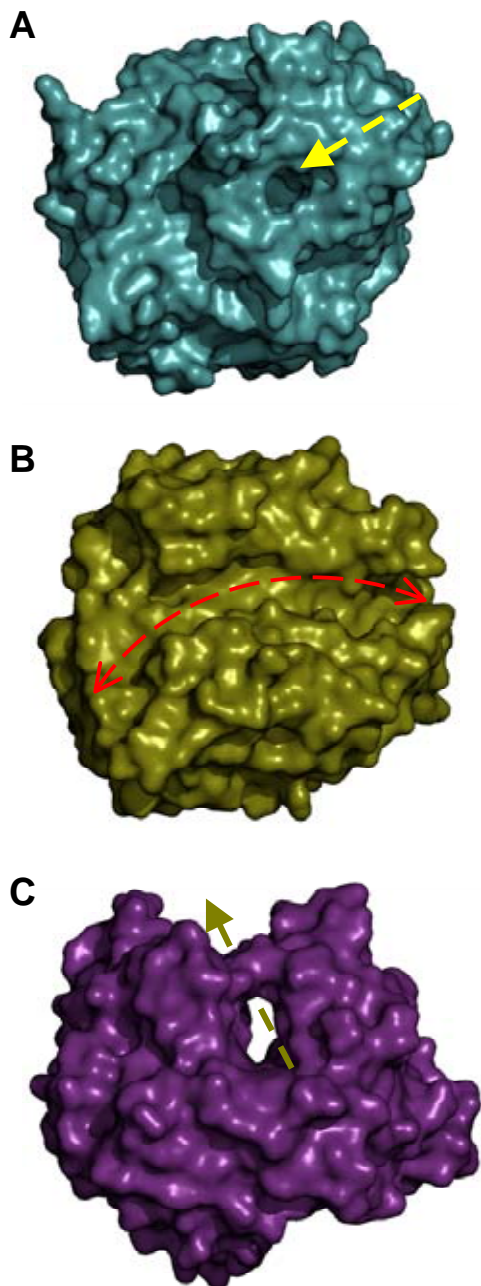
En plantas se han encontrado una amplia variedad de  $\beta$ -glucan-endohidrolasas (EC 3.2.1.-), las cuales aparecen como isoformas que difieren marcadamente en su punto isoeléctrico, ligeramente en su tamaño y estructura primaria. Estas enzimas se han dividido en tres grupos: un grupo formado por las  $\beta$ -1,3-glucanasas (EC 3.2.1.39), las cuales sólo hidrolizan uniones  $\beta$ -1,3-glicosídicas continuas. Estas enzimas no hidrolizan azúcares con uniones  $\beta$ -1,3 cuando éstos se encuentran intercalados entre azúcares con uniones  $\beta$ -1,4-glicosídicas. El otro grupo lo integran las  $\beta$ -1,3-1,4-glucanasas (EC 3.2.1.73),

las que requieren de uniones  $\beta$ -1,3 adyacentes a las uniones  $\beta$ -1,4 para hidrolizar las uniones  $\beta$ -1,4-glicosídicas. El último grupo es el de las endocelulasas o  $\beta$ -1,4-glucanasas (EC 3.2.1.4), que no sólo hidrolizan residuos con uniones  $\beta$ -1,4, sino también residuos con uniones  $\beta$ -1,3-1,4-glicosídicas, pero su producto de hidrólisis difiere del generado por las  $\beta$ -1,3-1,4-glucanasas (Høj and Fincher, 1995).



La hidrólisis enzimática de los enlaces glicosídicos llevada a cabo por estas glicohidrolasas, puede ocurrir por dos mecanismos diferentes, ya sea con retención o inversión de la configuración del átomo de carbono anomérico (Fig. 4). Por cualquiera de estos dos mecanismos que suceda la hidrólisis, ella tiene lugar por catálisis ácido/base, la cual requiere de dos aminoácidos: un donador de protones y otro que actúa como nucleófilo o base. Estos aminoácidos catalíticos generalmente son ácido aspártico o ácido glutámico, los cuales se encuentran muy conservados en casi todas las familias de glicohidrolasas. Las enzimas que actúan con retención de la configuración tienen una distancia aproximada de 5.5 Å entre los dos aminoácidos catalíticos, mientras que en enzimas que actúan con inversión en la configuración, la separación es de alrededor de 10 Å (Sinnott, 1990).





**Figura 5. Topologías del sitio activo de las glicohidrolasas.** A) Topología tipo bolsillo de la  $\beta$ -galactosidasa de *Lactococcus lactis*, PDB: 3PBG. B) tipo surco de la  $\beta$ -1,3-glucanasa de plátano, PDB: 2CYG. C) Topología tipo túnel presentado por la celobiohidrolasa del hongo *Trichoderma reesei*, PDB: 1QK2.

Las glicohidrolasas han sido agrupadas, según la topología del centro activo, en tres clases generales: bolsillo, surco y túnel (Fig. 5). La topología de bolsillo es óptima para el reconocimiento del extremo no reductor de los azúcares y se encuentra principalmente en monoglicohidrolasas como la  $\beta$ -galactosidasa, la sialidasa y la neuraminidasa, y en algunas exoglicohidrolasas que degradan sustratos con numerosos extremos libres tal como el almidón. La topología de surco permite acceder aleatoriamente a los azúcares internos del polisacárido, por ello es más común en las endopolisacaridasas, como lisozima, endocelulasas, xilanasas, quitinasas,  $\beta$ -1,3-glucanasas y  $\beta$ -1,3-1,4-glucanasas. Por último, la topología en túnel deriva de la tipo surco, pero con variación en la longitud de las asas exteriores del surco los cuales son mayores, llegando a cubrir el centro activo. Esta topología permite a la enzima liberar el producto mientras la cadena del polisacárido permanece firmemente unida y hasta ahora sólo

ha sido observada en Celobiohidrolasas (Davies & Henrissat, 1995).

A la fecha, la  $\beta$ -1,3-glucanasa de *Hordeum vulgare* (EC 3.2.1.39) es una de las más estudiadas a nivel de su mecanismo catalítico. Esta enzima actúa con retención de la configuración anomérica mediante un mecanismo ácido/base general para llevar a cabo la hidrólisis de las uniones glicosídicas, (Hrmova & Fincher, 1993; Chen *et al.*, 1993; Muller *et al.*, 1998). Los estudios realizados de mutaciones dirigidas a sitios específicos en la proteína identificaron cuatro residuos esenciales para la catálisis: Glu231, Glu279, Lys282 y Glu288. Éstos se localizan en la parte profunda del sitio activo, cuya topología como es lo común para todas las endoglicohidrolasas, presenta la forma de un surco (Fig. 5B). Los alineamientos de secuencia primaria entre  $\beta$ -1,3-glucanasa de *H. vulgare* y la de *H. brasiliensis* muestran una identidad del 47% y la conservación de los cuatro aminoácidos catalíticos identificados en la proteína de *H. vulgare*.

Todas las  $\beta$ -1,3-glucanasas tienen selectividad por laminarin, razón por la cual también se les conoce con el nombre de "laminarinasas". El laminarin es un  $\beta$ -glucano del alga café *Laminaria digitata*, el cual está poco ramificado, consta de enlaces  $\beta$ -1,3 y  $\beta$ -1,6-glicosídicos en relación 3:1 y tiene un grado de polimerización variable.

# *ANTECEDENTES*



## II. ANTECEDENTES

La alergia al látex de *H. brasiliensis* o hule natural representa en la actualidad un importante problema de salud pública, debido a que este material es la principal fuente de alérgenos en el ámbito ocupacional, tanto en el personal de salud como en el de la industria del hule. Constituye, además, la segunda causa de anafilaxia perioperatoria (Ranta & Ownby, 2004).

Dentro del repertorio de alérgenos identificados en el hule natural se encuentra Hev b 2, una proteína con actividad de  $\beta$ -1,3-glucanasa la cual presenta varias isoformas, tres de naturaleza ácida localizadas a nivel de citosol y dos básicas, asociadas a vacuolas (Sunderasan *et al.*, 1995; Alenius *et al.*, 1995). Estas últimas son proteínas glicosiladas responsables de más del 70% de las reacciones alérgicas sufridas por los trabajadores del sector salud (Raulf-Heimsoth, *et al.*, 2007), así como de la reactividad cruzada observada entre el látex, frutas, pólenes y algunos venenos de himenópteros (Mahler *et al.*, 2006). En los estudios de Raulf-Heimsoth, Hev b 2 también es considerado como uno de los alérgenos de útil aplicabilidad para el diagnóstico de la alergia al látex, debido a que únicamente en los pacientes que manifestaron síntomas severos al contacto con este material, las IgEs presentaron una alta reactividad a este alérgeno.

Estudios comparativos entre el alérgeno natural y recombinante han demostrado que sólo la proteína natural es reconocida por las IgEs de los pacientes alérgicos, confirmando así la participación de las estructuras glicosídicas como una o la región antigénica de este alérgeno (Calabozo *et al.*, 2002; Iacovacci *et al.*, 2002). Por todo lo anterior, aunado a la nula información que existe a nivel de la estructura terciaria de Hev b 2, nos planteamos la pregunta de qué tipo de estructuras glicosídicas o que características estructurales presentes en el alérgeno natural conllevan al reconocimiento de las IgEs de los pacientes con alergia al látex. Por otra parte, se sabe que la presencia de los carbohidratos en la estructura de un alérgeno no es, sin

embargo, siempre garantía de alergenicidad. Igualmente, es interesante discernir las diferencias en el nivel de reconocimiento entre las dos isoformas básicas de Hev b 2, tanto en su estado nativo como en el desplegado.

Finalmente, es de un amplio conocimiento que además del modo y grado de exposición, las características estructurales de los alérgenos parecen tener un papel importante en la capacidad de la proteína para modular la respuesta inmune hacia las reacciones alérgicas. Sin embargo, hasta ahora no se conoce, en términos generales, ninguna característica estructural común para determinar una proteína como potencialmente alergénica (Aalberse, 2006) y lo único que se ha podido determinar, basados en las pocas estructuras tridimensionales determinadas hasta la fecha, parece ser su forma compacta, que le brinda a la molécula una mayor estabilidad. Por tal motivo es interesante determinar la termoestabilidad de Hev b 2, la cual le conferiría, en principio, resistencia para soportar los procesos drásticos a que se somete el látex y así, permanecer en los productos como un componente alérgicamente activo.

*HIPÓTESIS*

*OBJETIVOS*





### **III. HIPÓTESIS**

La capacidad que presentan algunos alérgenos tal como Hev b 2, de unirse a IgE y de provocar la desgranulación de los basófilos, así como de presentar reactividad cruzada, está determinada principalmente por los aspectos conformacionales de la proteína.

### **IV. OBJETIVOS**

#### **4.1. Objetivo general**

Caracterizar, cristalizar y determinar la estructura tridimensional de la  $\beta$ -1,3-glucanasa de *H. brasiliensis*, una proteína con propiedades alergénicas presente en los productos procesados del hule natural.

#### **4.2. Objetivos específicos**

- Caracterizar bioquímicamente la  $\beta$ -1,3-glucanasa de *H. brasiliensis*, determinando su masa molecular, punto isoeléctrico y patrón de glicosilación.
- Caracterizar enzimáticamente a la  $\beta$ -1,3-glucanasa utilizando como substrato el laminarin.
- Evaluar por ensayos de ELISA el reconocimiento de las IgEs de sueros de pacientes alérgicos al látex de *H. brasiliensis* por Hev b 2.
- Cristalizar y determinar la estructura 3D de la  $\beta$ -1,3-glucanasa de *H. brasiliensis* utilizando la técnica de difracción de rayos X.
- Analizar *in silico* las interacciones de las regiones hidrofóbica y expuestas al solvente de la estructura Hev b 2 determinada en este trabajo, con el objetivo de predecir los epítomos reconocidos por anticuerpos tipo IgE.

## *MÉTODOS*



## V. METODOS

La metodología descrita en esta sección se centra básicamente en los protocolos no reportados en las artículos anexos en esta tesis. Únicamente se repite en este capítulo el protocolo de purificación de las proteínas, el cual también se encuentra en el artículo 2, con el fin de mostrar los resultados de una manera más clara.

### 5.1. Purificación de las isoformas I y II de la $\beta$ -1,3-glucanasa de *H. brasiliensis*

El látex de *H. brasiliensis* proveniente de la plantación "El Palmar" (Veracruz) se fraccionó por centrifugación a 70,000 g durante 45 minutos y 4 °C. El sedimento, en el que se encontraban los lutoides, fue separado y almacenado a -50 °C. La fracción de los lutoides conteniendo las isoformas de Hev b fue homogenizada en una disolución 0.35 M de NaCl (extracto lutoides) y clarificada por centrifugación a 70,000 g. Todos los pasos de purificación se llevaron a cabo a 4 °C. El sobrenadante obtenido (sobrenadante 1) se dializó durante 48 h contra agua. En este paso precipita la glucanasa, la cual se separa por centrifugación a 70,000 g durante 40 min. El precipitado se resuspendió en 20 mM MES, 0.35 M NaCl pH 6.0 (precipitado G) Posteriormente esta muestra se sometió a una cromatografía de exclusión molecular usando Superdex S200 (Pharmacia-LKB Biotechnology, Sweden), obteniendo un pico mayoritario con actividad. Esta fracción se aplicó a una columna de afinidad ConA-sefarosa, eluyendo con metil  $\beta$ -manopiranosido y por último, tanto la fracción retenida en Con A (Isoforma II), como la no retenida (Isoforma I) que mostraron actividad, fueron sometidas a una cromatografía de intercambio catiónico usando una columna Mono S 5/50 GL también de Pharmacia-LKB Biotechnology.

## 5.2. Determinación del contenido de estructura secundaria.

El contenido de estructura secundaria para ambas isoformas se determinó por la técnica de dicroísmo circular (DC). Los espectros se obtuvieron con un espectropolarímetro Jasco J-710 en el UV lejano (190-260 nm), utilizando una cubeta de cuarzo de 0.1 cm de paso óptico. Las isoformas I y II se diluyeron en amortiguador de citrato de sodio 10 mM a pH 5.0 hasta una concentración 0.1 y 0.2 mg/ml respectivamente. La temperatura de la muestra se mantuvo a 25 °C a través de un sistema tipo Peltier, modelo JASCO PTC-343. Todos los espectros finales representan la media de tres acumulaciones individuales realizadas cada 0.2 nm a una velocidad de barrido de 10 nm/min. Los resultados se expresan en valores de elipticidad molar, en unidades de grado·cm<sup>2</sup>/dmol considerando una masa molecular promedio por residuo de 110 g/mol utilizando la ecuación:

$$\theta_{\text{Molar}} = \frac{\theta_{\text{obs}} \cdot \text{Mw}}{[\text{P}] \cdot d}$$

Donde,  $\theta_{\text{Molar}}$  es la elipticidad molar,  $\theta_{\text{obs}}$  es el valor de elipticidad en grados, **Mw** es el peso molecular promedio de los aminoácidos, **[ P ]** es la concentración de proteína en g/cm<sup>3</sup> y **d** es el paso óptico.

La determinación del porcentaje del contenido de estructura secundaria se estimó utilizando tres programas. El primero de ellos, CDNN usa el método de deconvolución basado en redes neuronales que aplican el algoritmo de propagación inversa (Dalmás *et al.*, 1994). SELCON3, que incorpora el método de auto-consistencia junto con un algoritmo de descomposición del valor singular (SVDA) para asignar la estructura secundaria de la proteína (Sreerama & Woody, 2000) y por último el método CONTIN, el cual utiliza el modelo linealizado de van Stokkum para seleccionar un conjunto de proteínas a partir de una base de datos de referencia (van Stokkum *et al.*, 1990). En otras palabras, considera el espectro experimental como una combinación lineal de los espectros registrados de proteínas de referencia con un contenido de estructura secundaria conocido.

### **5.3. Curvas de termoestabilidad.**

La desnaturalización térmica de las isoformas de Hev b 2 se estudió mediante DC, en la región del ultravioleta lejano. Las curvas de termoestabilidad se obtuvieron midiendo de forma continua la variación de la elipticidad a 222 nm, en el intervalo de temperatura de 20 °C a 90 °C, con una velocidad de 1 °C/min. La solución de proteína fue de 0.1 mg/ml en amortiguador citrato de sodio 10 mM pH 5.0.

### **5.4 Ensayos de actividad $\beta$ -1,3-glucosidasa.**

La actividad de  $\beta$ -1,3-glucosidasa se realizó usando 100  $\mu$ l de una disolución con 2 mg/ml de laminarin, en amortiguador acetato de sodio 50 mM, pH 5, como sustrato. El volumen final de la reacción fue de 250  $\mu$ l. La reacción se incubó durante una hora a 37 °C con agitación suave. Posteriormente, se adicionaron 500  $\mu$ l de DNS, se llevó a ebullición durante 10 minutos y se dejó enfriar a temperatura ambiente. A continuación, los tubos se centrifugaron durante 1 minuto a 13,000 rpm y se leyó la absorbancia a 550 nm. La unidad de actividad enzimática se definió como la cantidad de enzima requerida para liberar 1  $\mu$ mol de glucosa por minuto (Miller, 1959).

### **5.5 Determinación del grado de polimerización del laminarin.**

El peso molecular y la determinación del grado de polimerización de este sustrato se realizó por espectrometría de masas MALDI-TOF utilizando un equipo Omniflex (Bruker, Daltonics). La muestra fue disuelta en una disolución saturada de ácido alfa-ciano-4-hidroxicinámico en 30% de acetonitrilo y 0.1% de ácido trifluoroacético. El instrumento se operó en modo lineal positivo.

### **5.6 Actividad vs pH, amortiguadores, temperatura y cantidad de enzima.**

La actividad de la isoenzima II se evaluó en el intervalo de pH de 4.0 a 8.0, con incrementos de 0.5 unidades de pH y usando amortiguadores de sales iónicas (acetato, citrato y fosfato de sodio), así como amortiguadores tipo MES, BIS-TRIS. La actividad en función de la temperatura se determinó desde 30 hasta 70 °C, con incrementos de 0.5 °C. Por último, la dependencia de la actividad con la cantidad de enzima se realizó variando la cantidad de ésta, desde 5 hasta 20 microgramos totales.

### **5.7 Caracterización cinética.**

Los parámetros cinéticos  $K_M$ ,  $k_{cat}$  y  $V_{max}$  de la isoenzima II fueron determinados a partir de ensayos realizados por triplicado a 37 °C en amortiguador citrato de sodio 50 mM, pH 5.0. La concentración de la isoenzima, seleccionada de los ensayos de la actividad en función de la cantidad de enzima, fue de 7.7 µg. Las concentraciones de sustrato se variaron de 0.2 a 1.6 mg/ml. Los datos fueron procesados con OriginPro 7.5, usando el análisis de regresión no lineal basado en la cinética de Michaelis-Menten.

### **5.8 Reconocimiento por anticuerpos tipo IgE.**

El reconocimiento por anticuerpos humanos tipo IgEs de la β-1,3-glucanasa, en sus formas glicosilada y desglicosilada, así como en su estado nativo y desnaturalizado, se realizó mediante ensayos de ELISA. Los detalles de la metodología se describen en la publicación 3. La donación de los sueros de los pacientes voluntarios adultos alérgicos al látex fue llevada a cabo siguiendo los protocolos aprobados por el comité de ética del Instituto Nacional de Pediatría de la Ciudad de México.

## **PUBLICACIONES**

- 1. ENDO- $\beta$ -1,3-glucanasas reconocidas por anticuerpos tipo IgE de sueros de pacientes alérgicos.** *Alerg. Asma Inmunol. Pediatr.* **15**:35-42(2006).
- 2. Crystallization and identification of the glycosylated moieties of two isoforms of the main allergen Hev b 2 and preliminary X-ray analysis of two polymorphs of isoform II.** *Acta Crystallogr.* **F63**:787-91(2007).
- 3. Structural insights into the recognition of the natural glycoallergen Hev b 2 by human basophils.** Sometido a *J. Allergy Clin. Immunol.*





## ENDO- $\beta$ -1,3-glucanasas reconocidas por anticuerpos tipo IgE de sueros de pacientes alérgicos

Deyanira Fuentes-Silva,\* Adela Rodríguez-Romero\*

### RESUMEN

Las  $\beta$ -1,3-glucanasas son proteínas ampliamente distribuidas en plantas implicadas en muchos procesos metabólicos como estrés, infección y procesos de desarrollo. Debido a su capacidad para hidrolizar  $\beta$ -1,3-glucanos, componentes esenciales de la pared celular de hongos y bacterias, han sido designadas como proteínas relacionadas a la patogénesis pertenecientes a la familia 2 (PR-2). A la fecha se han descrito varias  $\beta$ -1,3-glucanasas de plantas como alergénicas, las cuales han sido reconocidas por los anticuerpos tipo IgE de personas con síndrome látex-fruta polen. Estas enzimas también han sido reconocidas como alérgenos implicados en el asma ocupacional. A nivel de secuencia primaria y pese a provenir de diferentes especies, entre estas proteínas se presenta una alta homología. Así mismo, los epítopos lineales que han sido recientemente reportados para la  $\beta$ -1,3-glucanasas de plátano, están muy conservados. Estos epítopos comunes, podrían ser la causa de la reactividad cruzada que se presenta entre muchos alérgenos, lo cual tiene importancia clínica en personas sensibilizadas contra estas estructuras. Este trabajo recopila la información reportada a la fecha acerca de las  $\beta$ -1,3-glucanasas de plantas implicadas en alergias.

**Palabras clave:**  $\beta$ -1,3-glucanasas, anticuerpos IgE, síndrome látex-fruta polen.

### ABSTRACT

*$\beta$ -1,3-glucanases are widely distributed proteins in plants. They are involved in many metabolic processes such as stress, infection and development. They are able to hydrolyze  $\beta$ -1,3-glucans that are essential components of the cell wall in fungi and bacteria. So, they have been designated as pathogenesis-related proteins (Family 2: PR-2). To date, several  $\beta$ -1,3-glucanases of plants have been described, which are recognized by IgE antibodies of people with latex-fruit pollen syndrome. They have also been recognized as allergens involved in occupational asthma. At primary sequence level and despite they are from different species, there are high similarities among these proteins. Besides, the linear sequences recognized by IgE (sequential epitopes that have been reported recently for the banana  $\beta$ -1,3-glucanase) are conserved. These common epitopes could be the cause of crossed reactivity displayed among many allergens. This is relevant for people sensitized against these  $\beta$ -1,3-glucanases structures. This work compiles reported to date information about  $\beta$ -1,3-glucanases from plants implicated in allergies.*

**Key words:**  $\beta$ -1,3-glucanases, IgE antibodies, latex-fruit pollen syndrome.

### INTRODUCCIÓN

Las  $\beta$ -1,3-glucanasas son proteínas ampliamente distribuidas en plantas, varias de las cuales han sido aisladas de tomate, plátano y tabaco, entre otras especies.<sup>1,2</sup> Algunas de estas enzimas han

\* Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México



sido clasificadas como alérgenos o asociadas al síndrome látex-fruta-polen. En términos generales, un alérgeno se ha definido como una sustancia normalmente inocua, capaz de iniciar una reacción alérgica en personas con una predisposición genética. Notablemente, muchos son proteínas de plantas involucradas en el sistema de defensa o almacenamiento, otros son proteínas metabólicas y algunos son proteínas estructurales. La historia de los alérgenos de plantas se inició el siglo pasado entre los años cuarenta y cincuenta con los primeros ensayos realizados para purificar alérgenos de pólenes usando las técnicas clásicas de separación como extracción con fenol, precipitación con sales y electroforesis. A principio de los años sesenta, con el desarrollo de las técnicas cromatográficas, se purificó el primer alérgeno nombrado como "Antígeno E" a partir de la *Ambrosia artemisiifolia* el cual reaccionaba con anticuerpos policlonales anti-*A. artemisiifolia*.<sup>6</sup> Posteriormente, del polen de centeno, Marsh<sup>7</sup> aisló un alérgeno que denominó Ray 1. También describió por primera vez las propiedades moleculares de los alérgenos, los factores involucrados en la alergenidad, la respuesta inmune a los alérgenos y publicó los primeros estudios inmunogénicos de la respuesta IgE frente a los alérgenos purificados de pólenes. Marsh<sup>7</sup> estableció la primera definición clara de un "alérgeno principal", como un alérgeno purificado que produce una respuesta inmediata del 90% o mayor, en individuos alérgicos sometidos a pruebas cutáneas. En contraste, un "alérgeno secundario" es aquel que presenta una respuesta menor al 20% en los pacientes alérgicos sujetos a pruebas cutáneas.

Actualmente, se utiliza un estándar menos rígido, el cual define a un alérgeno principal como aquél en donde un 50% o más de los pacientes alérgicos reaccionan a las pruebas cutáneas. En las últimas décadas han sido purificados muchos alérgenos cuyas fuentes principales han sido plantas, esporas de hongos, insectos y ácaros.

#### ALERGENOS DE PLANTAS

A la fecha, un gran número de proteínas de frutas, legumbres, semillas, pólenes y productos derivados de plantas han sido identificados y caracterizados como alérgenos. Estas proteínas han manifestado la capacidad de inducir en humanos reacciones alérgicas tipo I o inmediata, la cual es mediada por anticuerpos tipo IgE.<sup>8-10</sup> Los pólenes y esporas de las plantas son las principales fuentes de lo que se ha denominado aero-alérgenos, los cuales pueden ser inhalados y son una de las principales causas de la rinitis alérgica y del asma. Este tipo de alergia tam-

bién es llamado "alergia estacional" por presentarse en los periodos de polinización.<sup>11</sup>

La alergia alimenticia por la ingestión de frutas, legumbres y semillas causan manifestaciones digestivas o cutáneas en las personas, con síntomas que pueden variar desde una hinchazón de labios, lengua y paladar, a menudo acompañado por síntomas como ahogo, tos y síntomas gastrointestinales, hasta casos de reacciones sistémicas severas como anafilaxia. La mayoría de estas reacciones alérgicas frente a frutas y vegetales se han asociado con la sensibilización a pólenes.<sup>12,13</sup>

Desde el punto de vista alérgico, el látex del árbol del hule (*Hevea brasiliensis*) y los productos manufacturados del mismo, contienen varias proteínas capaces de unir IgE, las cuales muestran una fuerte reactividad cruzada con diferentes proteínas procedentes de frutas, vegetales y pólenes. Los alérgenos responsables de la mayoría de los casos de reactividad cruzada en el síndrome látex-fruta-polen son: heveína,  $\beta$ -1,3-glucanasas, quitinasas y profilinas, entre otras.<sup>14,15</sup> Estas proteínas representan los alérgenos de contacto más importantes hallados hasta la fecha en plantas. Las manifestaciones clínicas de este tipo de alergia como de las anteriores, dependen de la vía de exposición, la cantidad de alérgeno y la variabilidad individual.<sup>16</sup>

#### CLASIFICACIÓN DE LOS ALERGENOS PROVENIENTES DE PLANTAS

Entre las numerosas proteínas que tienen las plantas, sólo un pequeño número ha sido identificado como alérgenos para los humanos. La mayoría de ellas se expresan en respuesta a la infección por patógenos tales como hongos, bacterias o virus; por lo cual fueron designadas como "Proteínas relacionadas a la patogénesis", PRP.<sup>16,17,19</sup> Estos tipos de proteínas también son expresadas a consecuencias de heridas hechas a la planta o por la aplicación de sustancias químicas como el acetileno o el ácido salicílico, que mimetizan el efecto de infección o inducen estrés.<sup>20</sup> Originalmente las PRP fueron identificadas en tabaco y clasificadas dentro de 5 familias, basadas en la homología de su secuencia de aminoácidos. Estas cinco familias constituían un grupo pequeño de proteínas ácidas y básicas. Generalmente las formas ácidas de estas familias se encontraban en el espacio extracelular y las formas básicas eran transportadas a vacuolas por un péptido señal, localizado en el carboxilo terminal. Este sistema de clasificación posteriormente fue revisado por Van Loon y cols,<sup>21</sup> el cual extendió el número a 14 familias diferentes (*Cuadro I*), entre las que se encuentran: quitinasas, glucanasas, endoproteinasas,



Cuadro I. Familias de proteínas relacionadas a la patogénesis (PRP).

Familia	Masa mol (kDa)	Clasificación
PR-1	15-17	Desconocida
PR-2	25-35	Antifúngica/ $\beta$ -1,3-glucanasas, clase I, II, III
PR-3	25-35	Antifúngica/quitinasas, clase I, II, IV
PR-4	13-19	Antifúngica/quitinasas, clase I, II
PR-5	22-24	Proteínas tipo taumatina
PR-6	6	Inhibidores
PR-7	69	Endoproteasas
PR-8	28	Quitinasas/lisozima, clase III
PR-9	39-40	Peroxidasas
PR-10	17-18	Proteínas homólogas a Bet v 1
PR-II	41-43	Quitinasas, clase I
PR-12	5	Defensinas
PR-13	14	Tioninas
PR-14	7-12	Proteínas transportadoras de lípidos

peroxidasas, así como pequeñas proteínas semejantes a defensinas, tioninas y proteínas transportadoras de lípidos.

Las PRP presentan algunas características bioquímicas comunes relevantes para los alérgenos, como la estabilidad a bajos valores de pH, la resistencia a la proteólisis, masas moleculares entre 5-70 kDa, y suelen pertenecer a una de las familias 2 ( $\beta$ -1,3-glucanasas), 3 (quitinasas, clase I, II y IV), 4 (quitinasas, clase I y II), 5 (proteínas tipo taumatina), 8 (quitinasa-lisozima, clase III), 10 (proteínas homólogas a Bet v 1) ó 14 (proteínas transportadoras de lípidos). Actualmente, se conoce que algunas de las PRP no sólo son inducidas de *novo* por el ataque de patógenos, heridas o estrés físico-químico, sino que son expresadas constitutivamente en algunos órganos o durante cierto estado del desarrollo de la planta; de tal forma que en términos estrictos no son PRP sino que han sido designadas como "PRP-like"

#### FAMILIA PR2: $\beta$ -1,3-GLUCANASAS

La familia PR2 comprende a las enzimas monoméricas  $\beta$ -1,3-glucanasas (glucan endo -1,3- glucosidasas; EC 3.2.1.39) cuyas masas moleculares oscilan entre 25-38 kDa. Estas enzimas han sido implicadas en el sistema de defensa de plantas debido a su capacidad para hidrolizar las uniones endo (1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -glucosídicas de los  $\beta$ -1,3-glucanos, componentes esenciales de la pared celular de hongos y bacterias.<sup>22,29</sup> Las  $\beta$ -1,3-glucanasas de plantas no sólo desempeñan una labor importante en la respuesta

frente a los microbios patógenos y estrés, sino que ellas también están implicadas en numerosos procesos fisiológicos y de desarrollo como la germinación, crecimiento y fertilización, entre otros.<sup>24,25</sup>

Considerando las diferencias en su masa molecular, punto isoeléctrico, estructura primaria, y localización celular, las PR-2 fueron subgrupadas a su vez dentro de 4 clases (I-IV). La clase I está integrada por enzimas básicas con masas moleculares entre 33-38 kDa. Las proteínas de esta clase son transportadas a la vacuola como pre-proteínas formadas por un péptido señal en el extremo N-terminal. Varias  $\beta$ -1,3-glucanasas homólogas de clase I han sido identificadas y aisladas de diversas especies de plantas (Cuadro II). Por ejemplo, la forma básica aislada de los cuerpos lúteos de *Hevea brasiliensis*, es una enzima que presenta varias isoformas y fue primeramente descrita por Sunderasan y cols.<sup>25</sup> y Alenius y cols.<sup>26</sup> Esta proteína tiene una masa de 37 kDa y es reconocida por las IgEs de pacientes con alergia al hule y a frutas. Sunderasan y cols.<sup>25</sup> le asignaron la nomenclatura alérgica de Hev b 2, ya que se demostró que era altamente alérgica. Además, se detectó en productos manufacturados con hule natural.<sup>15</sup>

Las  $\beta$ -1,3-glucanasas de clase II y III son proteínas ácidas con masas moleculares entre 34-36 kDa y secretadas dentro del espacio extracelular.<sup>27</sup> Ensayos *in vitro* han mostrado que las glucanasas de clase I presentan actividad antifúngica, mientras que las clases II y III no inhibieron el crecimiento de hongos. En tabaco se encontró otro tipo de glucanasas designadas como clase IV; esta clase difiere de las anteriores en la especificidad del sustrato.

#### $\beta$ -1,3-GLUCANASAS DE PLANTAS RECONOCIDAS POR ANTICUERPOS IgE

Aun cuando existen numerosas secuencias de  $\beta$ -1,3-glucanasas de plantas depositadas en diversas bases de datos tales como Brenda ([www.brenda.uni-koeln.de](http://www.brenda.uni-koeln.de)), SwissProt ([www.expasy.ch/sprot](http://www.expasy.ch/sprot)), NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)), sólo un grupo reducido de ellas han sido reportadas como proteínas capaces de unir anticuerpos tipo IgE o de ser los alérgenos responsables de desencadenar reacciones de hipersensibilidad inmediata tipo I (Cuadro I). Una proteína de origen vegetal representante de esta clase de alérgenos es la  $\beta$ -1,3-glucanasa de *H. brasiliensis* (Hev b 2) la cual ha sido ampliamente estudiada, debido a su relación con la alergia al látex. Este alérgeno fue inicialmente descrito por Sunderasan y cols.<sup>25</sup> y Alenius y cols.<sup>26</sup> como una proteína reconocida débilmente por las IgEs de pacientes con alergia al hule y a frutas. Posteriormente en Estados Unidos Kurup y


 Cuadro II.  $\beta$ -1,3-glucanasas de plantas reconocidas por anticuerpos tipo IgE de personas con síndrome látex-fruta-polen.

Especie	Nominación alérgica	M. mol (kDa)	Unión a IgE
<i>Hevea brasiliensis</i> (látex)	Hev b 2	37-38	+
<i>Olea europaea</i> (olivo)	Ole 9	46	+
<i>Ordeum vulgare</i> (cebada)	Gl, GII	36	nd
<i>Musa acuminata</i> (plátano)		33	+
<i>Nicotiana tabacum</i> (tabaco)		37	nd
<i>Persea americana</i> (aguacate)		35	+
<i>Actinidia deliciosa</i> (kiwi)		35	+
<i>Capsicum annuum</i> (pimiento)		37	+
<i>Solanum tuberosum</i> (papa)		37	+
<i>Solanum lycopersicum</i> (tomate)		37	+
<i>Betula</i> (abedul)		36	+
<i>Fraxinus excelsior</i> (fresno)		35	+
<i>Ficus carica</i> (higo)		36	nd
<i>Castanea sativa</i> (castaña)		32	+
<i>Oryza sativa</i> (avena)		33	nd

nd. No determinado.

cols.,<sup>28</sup> demostraron por varios ensayos *in vitro*, que Hev b 2 era reconocido fuertemente por las IgEs tanto de pacientes con espina bífida como las de los trabajadores del área de la salud diagnosticados con alergia al látex. Dependiendo del método empleado, la reactividad varió entre 20-61% en los pacientes con alergia al látex. Estudios realizados recientemente en Italia y Singapur con pacientes atópicos, los cuales están en contacto frecuente con productos de látex natural como guantes u otro tipo de productos, también se han manifestado síntomas de alergia por contacto directo o por vía oral al inhalar pequeñas partículas de látex, las cuales causan la patología clínica denominada asma ocupacional.<sup>29,30</sup> En Irlanda e Inglaterra O'Connor y cols.,<sup>31</sup> reportaron por primera vez la asociación entre el asma ocupacional y la exposición a  $\beta$ -1,3-glucanasa. Pruebas cutáneas realizadas mostraron una reacción positiva a esta proteína en concentraciones de 1 mg/mL e igualmente fueron detectados anticuerpos tipo IgE específicos contra  $\beta$ -1,3-glucanasa. Hev b 2 ha sido señalado como un alérgeno relevante al diagnosticar la alergia al látex. En México (Chihuahua, Chih.) Moreno y cols.<sup>32</sup> en el 2005 reportó sólo la prevalencia de la alergia al látex en grupo reducido de trabajadores del área de la salud, utilizando antígenos de látex.

Otro alérgeno de origen vegetal con actividad de  $\beta$ -1,3-glucanasa estudiado es Ole e 9, aislado del polen del árbol *Olea europaea*. Esta proteína de 46 kDa fue reportada como el alérgeno principal del polen de

este árbol. Ole e 9 fue reconocido por más del 65% de los pacientes españoles alérgicos a este polen.<sup>3,11</sup> La expresión recombinante de su extremo carboxilo terminal en *P. pastoris* retuvo más del 50% de la capacidad de unión a IgE que muestra el alérgeno completo y fue reconocido por todos los sueros de pacientes alérgicos al mismo.<sup>33</sup> Posteriormente, Palomares y cols.<sup>34</sup> sugieren la posibilidad de que esta proteína esté implicada en la reactividad cruzada entre látex-fruta y pólenes.

Otra glucanasa de planta que ha sido estudiada es la del arroz (*Oriza sativa*), la cual fue caracterizada bioquímicamente; sin embargo, no se demostró su potencial como alérgeno.<sup>35</sup> Recientemente se reportó la purificación y determinación de la estructura tridimensional de la  $\beta$ -1,3-glucanasa plátano (*Musa acuminata*), la cual fue reconocida por las IgEs de individuos alérgicos al látex.<sup>1,36</sup>

Otros experimentos realizados por varios grupos de investigación, evaluaron la reactividad cruzada entre el látex y varias  $\beta$ -1,3-glucanasas homólogas de plantas utilizando extractos de frutas de tomate, kiwi, castaña, higo, aguacate y pimiento, y extractos de pólenes como abedul, fresno y olivo. Estas pruebas mostraron una señal ubicada entre 38 y 46 kDa reconocida por las IgEs de pacientes alérgicos al látex.<sup>34</sup> Varias investigaciones han demostrado que las  $\beta$ -1,3-glucanasas provenientes de diferentes fuentes pueden estar relacionadas con la reactividad cruzada entre frutas, pólenes y el látex y deben ser consideradas de relevancia clínica al realizar un diagnóstico.<sup>34,37,38</sup>

#### ESTRUCTURA DE $\beta$ -1,3-GLUCANASAS DE PLANTAS Y SUS DETERMINANTES ALERGÉNICOS

Las  $\beta$ -1,3-glucanasas de plantas que son alérgicas, contienen epitopos o determinantes antigénicos formados por grupos de naturaleza glicosídica y/o peptídica, los cuales pueden estar involucrados directamente en la unión a los linfocitos T, a los anticuerpos tipo IgE circulante<sup>39</sup> y/o a los linfocitos B. Los epitopos de naturaleza glicosídica no son muy frecuentes pero adquieren importancia cuando median la reactividad cruzada entre diferentes alérgenos.<sup>36,40-42</sup> La mayoría de los determinantes alérgicos son de naturaleza peptídica y pueden presentar formas moleculares múltiples, lo cual puede influir a nivel conformacional en los epitopos e inducir respuestas inmunes con diferentes características.

Varios grupos de investigación han demostrado que la capacidad alérgica, así como la reactividad cruzada que presentan algunos alérgenos, está determinada por sus aspectos estructurales.<sup>43,44</sup> Dos alérgenos pueden presentar reactividad cruzada si comparten características estructurales, tanto a ni-



Cuadro III. Alineamiento de secuencias de varias  $\beta$ -1,3-glucanasas de plantas. En negrilla se resaltan las quince secuencias de los epitopos lineales propuestos para  $\beta$ -1,3-glucanasa de plátano.

Tomate	-QIGVCYGMGNNLPSHSEVIQLYK-SRNIRRLRLYDPNHGAINALRGSNIEVILGLPNVD
Papa	-QLGVCYGMGNNLPSHSEVIQLYK-SRNIQRLRLYDPNQALNALRGSNIEVILGLPNVD
Tabaco	QSIGVCYGMGLGNLPSHSEVIQLYK-SRNIQRLRLYDPNHGALQALRGSNIEVILGLPNVD
Pimiento	--IGVCYGMGLGNLPPASQVVQLYK-SRNIRRMRLYDPNQALQALRGSNIEVILGLPNVD
Hevea	-QVGVCYGMGNNLPPVSEVIALYK-KSNITRMRLYDPNRVLEALRGSNIEVILGLPNVD
Guisante	--IGVCYGMGNNLPPANEVIALYK-ANNIERMRLYDPNQALNALRGSNIEVILGLPNVD
Plátano	--IGVCYGMGLGNLPPSEVVSLEYK-SNNIARMRLYDPNQALQALRGSNIEVILGLPNVD
Naranja	-QIGVCYGMGLGNLPSKRDVIALYN-QNNIRRMRLYDPNREALEALRGSNIEVILGLPNVD
Betabel	--IGVCFQGMGNNIPNPEVVMFK-QYSIFRMRYGPNPDALNALRGSNIEVILGLPNVD
Cebada	--IGVCYGVIGNLPSRSDDVQLYR-SKGINGMRYFADQALRGSNIEVILGLPNVD
Tomate	VKHISSGMEHARHWQKRVDFWPHVKIKYIAGVNEISFVT-GTSLNLAFFQVVALVNIYKA
Papa	VKHISSGMEHARHWQKRVDFWPHVKIKYIAGVNEISFVT-GTSSLTSFQVVALVNIYKA
Tabaco	VKHISSGMEHARHWQKRVDFWPHVKIKYIAGVNEISFVT-GTSSLTSFQVVALVNIYKA
Pimiento	FETLLPPFNAILG--SKEQNSGHCNLYRVRCCEMKSAALLT-GTSSLTRFLPAMGNIYKA
Hevea	LQSLTNPNSAKW-VQNVVGGPSSVFLFRYIAGVNEISFVNRGTAWLAQVFLPAMGNIYKA
Guisante	LQTLATNQDASQWVQRVNLVYFVSKIKYIAGVNEISFVNG--GSSWLAQVFLPATQVNYQA
Plátano	VQSLA <b>SNPSAA</b> GDWIRRVVVAWPEVSPRYIAGVNEISFV <b>GS</b> ---- <b>D</b> LAQVFLPAMGNIYKA
Naranja	LRRIASNQAEANTWQNVNFMNVKFKYIAGVNEISFV <b>GS</b> ---- <b>N</b> FAQVFLPAMGNIYKA
Betabel	LKRLADSQAEANTWVRDQVQY-NDVRFKYISVGVNEISFV <b>GS</b> ---- <b>P</b> GAALIQAMQMI DRA
Cebada	LNIIAASTSNAASWQNVVRFYFVAVNFKYIAGVNEISFV <b>GS</b> ---- <b>T</b> QGLPAMGNIYKA
Tomate	IGEAGLNDIKVSTSDMTLIGNSYPPSQGSRNDVRFWFTDPIVGLFRDTRAPLLVNIYFY
Papa	VGEAGLNDIKVSTSDMTLIGNSYPPSQGSRNDVRFWFTDPIVGLFRDTRAPLLVNIYFY
Tabaco	IGEAGLNDIKVSTSDMTLIGNSYPPSQGSRNDVRFWFTDPIVGLFRDTRAPLLVNIYFY
Pimiento	ISSAGLNDIKVSTSDMTLIGNSYPPSQGSRNDVRFSDPIVFLRGINSPILLVNIYFY
Hevea	IRSAQLDQIKVSTADLVLVGNVYPPSAGAFRDVRSYLDPIIGFLSIRSPILLVNIYFY
Guisante	IRAQGLHDQIKVSTADLVLVGNVYPPSAGAFRDVRSYLDPIIGFLSIRSPILLVNIYFY
Plátano	LSSAGLNDIKVSTAVDTGVLGTSYPPSAGAFSSAAQAYLSPVQFLASNGAPILLVNIYFY
Naranja	INPAGLNDIKVSTAIETGALGESFPPSRGSRFQYRPIILDPLIRFLNERSPILLVNIYFY
Betabel	LSAAGLNDIKVSTTFMGPENYFPPSRGSRFKDEYRNFQVIGFLVNIYFY
Cebada	LSAAGLGA- <b>I</b> KVSTSDMTLIGNSYPPSAGVFKN--- <b>A</b> YMTDVARLLIATGAPILLVNIYFY
Tomate	FYSYGNPQGISLFPYALFT-APNVVVQD--GSRQYRNLFDAMLDVYAAAMDRT-GGGSVGIV
Papa	FYSYGNPQGISLFPYALFT-APNVVVQD--GSRQYRNLFDAMLDVYAAAMDRT-GGGSVGIV
Tabaco	FYSYGNPQGISLFPYALFT-APNVVVQD--GSRQYRNLFDAMLDVYAAALERS-GGASVGVIV
Pimiento	FYAGNPRDISLFPYALFT-APNVVVQD--GSLGYRNLSDERLDSVTAALSQA-RGGSEIVV
Hevea	FTYAYNPRDISLFPYALFT-SPGVVVQD--GGRGYRNLFDATLDALYSALERA-SGGSLEVIV
Guisante	FPHIGNPRDISLFPYALFT-SPGVVVQD--GPNQYRNLFDAMLDVYAAALDNT-GIGWVNVV
Plátano	FYSYGNPQGISLFPYALFT-ASGVVVQD--GRFSYRNLFDALVDVAAALERS-GGASVGVIV
Naranja	FATAG-NRQISLQYALFR-SQQTVVSD--GSLVYRNLFDALDVAVYAALEKT-GGSLDQIV
Betabel	FGYM--NRQISLQYALFR-SQQTVVSD--GSLVYRNLFDALDVAVYAAALERS-GGSLDQIV
Cebada	FAYRDNPGSISENYATFQ--PGTTVRDQNGLTYSLFDAMVDVYAAALEKA-GAPAVKVV
Tomate	VEESGWPSAGA--FGATHENAQTYLRNLIQHAKA--GSPRKP-PIETYIFAMFENN--
Papa	VEESGWPSAGA--FGATQDNAATYLRNLIQHAKA--GSPRKP-PIETYIFAMFENN--
Tabaco	VEESGWPSAGA--FGATYDNAATYLRNLIQHAKA--GSPRKP-PIETYIFAMFENN--
Pimiento	VEESGWPSAGA--FATTNDAAAYYKLIQHVKR--GSPRRPNKVIETYIFAMFENN--
Hevea	VEESGWPSAGA--FAATFDNGRTYLSNLIQHVKG--GTPKRPNRAIETYIFAMFENN--
Guisante	VEESGWPSDGG--SATSVDNARIYLDNLIRHVKG--GTPRRPW-ATEAYLIFAMFENN--
Plátano	VEESGWPSAGGG--AEASTSNAQTYNQLIRHVGG--GTPRRPGKEIETYIFAMFENN--
Naranja	ISESGWPTAGGDC-ALTNVDNARTYNNLIQHVKR--GSPKKGRPIETYIFAMFENN--K
Betabel	VEESGWPTQGGPG--ASVPAEAAYVNNLRHVKN--GSPKRQ-EAETYIFAMFENAPRQ
Cebada	VEESGWPSAGG--FAASAGNARTYNGQLIRHVGG--GTPKKRE-AETYIFAMFENN--
Tomate	KNP--ELEKHFGLFSP-NKQPKYKLNFGV----SERVWDI----TNSSTASSLISEI----
Papa	KNP--ELEKHFGLFSP-NKQPKYKLNFGV----SERVWDISAE--TNSSTASSLISEM----
Tabaco	KNP--ELEKHFGLFSP-NKQPKYKLNFGV----SGGVWDSVSE--TNATAS-LISEM----
Pimiento	KNP--ELEKHFGLFSP-NKQPKYKLNFGV----SDRFLDI FAENKATSTFFKSDI----
Hevea	KQP--EVEKHFGLFFF-DKRPKYKLNFGV----AEKNWDISTE--ENATILPLKSDM----
Guisante	KSP--ELEKHFGLFSP-NKQPKYKLNFGV----ERRDGEIVGDFPQIVS--LESDM----
Plátano	KAG--GIEQNFGLFSP-NKQPKYKLNFGV----
Naranja	TGP--EIERHWGLFAP-TROPYQINFP----
Betabel	TSPNDEYKYWQMPSPPTTRQLKYGKFPN----
Cebada	KTG-DATERSFGLFNP-DKSPAYNIQF----

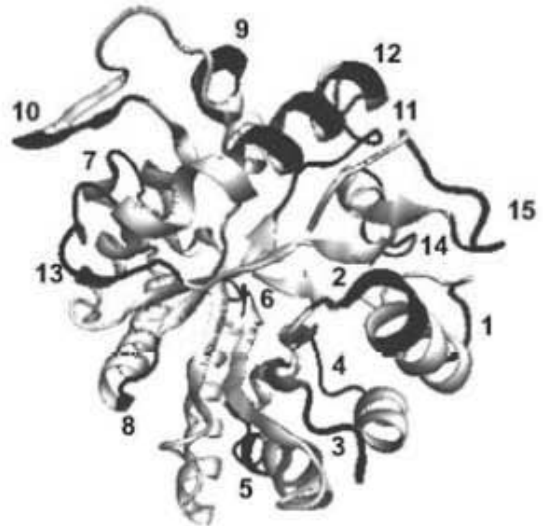


vel de estructura primaria como de estructura terciaria. Se ha observado que todas las proteínas con reactividad cruzada tienen un plegamiento similar, mientras que lo contrario no es cierto; proteínas con plegamiento similar no necesariamente presentan reactividad cruzada.

A la fecha, existen depositadas aproximadamente setenta secuencias homólogas de  $\beta$ -1,3-glucanasas en la base de datos del Swiss-prot ([www.expasy.ch/sprot](http://www.expasy.ch/sprot)) entre las que se encuentran principalmente proteínas de plantas y algunas de hongos. Independientemente de la especie, las  $\beta$ -1,3-glucanasas de plantas son proteínas filogenéticamente conservadas (Cuadro III). Dentro de esta familia sólo dos estructuras tridimensionales han sido resueltas. La primera de ellas fue la  $\beta$ -1,3-glucanasa de *H. vulgare*,<sup>45</sup> la cual no ha sido reportada como proteína alergénica. La segunda y más reciente, es la  $\beta$ -1,3-glucanasa de plátano.<sup>36</sup> Ambas proteínas presentan alto contenido de estructuras secundarias hélice- $\alpha$  y hoja- $\beta$ , adoptando la topología de un barril ( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub> tipo TIM, inicialmente descrito para la triosa fosfato isomerasa.<sup>46</sup> Para la  $\beta$ -1,3-glucanasa de plátano se determinaron quince epítopos lineales de unión a IgE a lo largo de toda la secuencia de aminoácidos, teniendo en cuenta su hidrofiliicidad, flexibilidad y exposición al solvente (Figura 1). Cuando se comparan las secuencias de varias  $\beta$ -1,3-glucanasas de plantas, como por ejemplo las de *H. brasiliensis* (látex), *Musa acuminata* (plátano), *Nicotiniana glauca* (tabaco), *H. vulgare* (cebada), entre otras (Cuadro III), se observa un alto grado en la identidad entre las secuencias, aunado a la conservación de la mayoría de los aminoácidos ubicados en las regiones propuestas como epítopos lineales para la  $\beta$ -1,3-glucanasa de plátano. Esta similitud que existe entre las glucanasas a nivel de epítopos, podría ser la causa de la reactividad cruzada observada entre personas con alergia a pólenes y/o frutas frente al látex, y viceversa. La similitud de epítopos también conlleva a suponer que es la razón por la cual algunas pacientes presentan sensibilización a determinada clase de alérgeno sin haber estado en previo contacto con él.

#### CONCLUSIÓN

Las  $\beta$ -1,3-glucanasas de plantas son proteínas homólogas y filogenéticamente conservadas que se encuentran presentes en frutas, vegetales y semillas. Aun cuando existe escasa información de sus propiedades alergénicas, varios grupos de investigación han demostrado que algunas  $\beta$ -1,3-glucanasas de plantas tienen la particularidad de unirse a IgE y provocar alergia. En México no existe ninguna investigación que relacio-



**Figura 1.** Estructura 3D de la  $\beta$ -1,3-glucanasa de plátano (*Musa acuminata*). El esquema en cintas muestra las estructuras secundarias de las hojas- $\beta$  (interior) rodeadas de hélices- $\beta$  (periferia) formando el barril ( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub> tipo TIM. En negro y enumeradas, se muestran las zonas correspondientes a los epítopos lineales, los cuales se encuentran ubicados en zonas expuestas al disolvente.

ne esta proteína presente en plantas y en otros organismos, con la alergia tipo I. Futuras investigaciones podrían brindar información sobre la relevancia de esta proteína en la alergia en nuestra población.

Los epítopos lineales propuestos para la  $\beta$ -1,3-glucanasa de *Musa acuminata* (plátano) son altamente conservados para proteínas de otras especies como *H. brasiliensis* (látex) y *Capsicum anuum* (pimiento) (Cuadro III). La conservación de estos determinantes antigénicos podrían mediar la reactividad cruzada registrada entre el látex, frutas y pólenes. La reactividad cruzada entre alérgenos se presenta cuando éstos contienen epítopos idénticos o similares y tiene algunas consecuencias desde el punto de vista clínico; por ejemplo, muchos pacientes presentan sensibilización a determinada clase de alérgeno sin haber estado en contacto previo con él.

Futuras investigaciones sobre la determinación estructural de otras  $\beta$ -1,3-glucanasas alergénicas o no, ayudarían a discernir, desde el punto de vista del alérgeno, la razón del por qué algunas de estas enzimas, con igual topología, poseen la característica de provocar alergia y otras no.



## BIBLIOGRAFÍA

1. Peumans WJ, Barre A, Derycke V, Rouge P, Wenting Z, May GD, Delcour JA, Van Leuven F, Van Damme EJM. Purification, characterization and structure analysis of an abundant  $\beta$ -1,3-glucanase from banana fruit. *Eur J Biochem* 2000; 267: 1188-1195.
2. Akiyama T, Shibuya N, Hrmova M, Fincher GB. Purification and characterization of a (1-3)- $\beta$ -D-glucan endohydrolase from rice (*Oryza sativa*) bran. *Carbohydrate Research* 1997; 297: 365-374.
3. Huecas S, Villalba M, Rodríguez R. Ole e 9 a major olive pollen allergen is a 1,3- $\beta$ -glucanase. *J Biol Chem* 2001; 276: 27656-27966.
4. Chumgchow N, Suntaro A, Wittsuwannakul R.  $\beta$ -1,3-glucanase isozymes the latex of *Hevea brasiliensis*. *Phytochemistry* 1995; 39: 505-509.
5. Subroto T, Van Koningsveld GA, Schreuder HA, Soedjanaatmadja UMS, Beintema JJ. Chitinase and  $\beta$ -1,3-glucanase in the luteoid-body fraction of *Hevea latex*. *Phytochemistry* 1996; 43: 29-37.
6. King TP, Norman PS. Isolation of allergens from ragweed pollen. *Biochemistry* 1962; 1: 709-720.
7. Marsh DG, Johnson P. The isolation and characterization of allergens from the pollen of rye grass (*Lolium perenne*). *Eur Polymer J* 1965; 1: 63-77.
8. Beezhold DH, Kostyal DA, Tomazic-Jezic VJ. Measurement of latex proteins and assessment of latex protein exposure. *Methods* 2002; 27: 46-51.
9. Bredehorst R, David K. What establishes a protein as an allergen? *J Chromatography B* 2001; 756: 33-40.
10. Aalberse RC, Akkerdaas JH, Van Ree R. Cross reactivity of IgE antibodies to allergens. *Allergy* 2001; 56: 478-490.
11. Rodríguez R, Villalba M, Batanero E, González EM, Monsalves RI, Huecas S, Tejera ML, Ledesma A. Allergenic diversity of the olive pollen. *Allergy* 2002; 57(Suppl. 71): 6-16.
12. Bircher AJ, Van Melle G, Haller E, Curty B, Frei PC. IgE to food allergens are highly prevalent in patients allergic to pollens, with and without symptoms of food allergy. *Clin Exp Allergy* 1994; 24: 367-374.
13. Wuthrich B, Stager J, Johansson SG. Celery allergy associated with birch and mugwort pollinosis. *Allergy* 1990; 45: 566-571.
14. Susman G, Beezhold DH, Kurup VP. Allergens and natural rubber proteins. *J Allergy Clin Immunol* 2002; 110: 33-39.
15. Rihs-Hans P, Raulf-Heimsoth M. Natural Rubber latex allergens: Characterization and evaluation of their allergenic capacity. *New Horizons Allergy* 2003; 3: 2-8.
16. Van Loon LC, Pierpoint WS, Boller T, Conejero V. Recommendations of naming plant pathogenesis-related proteins. *Plant Mol Biol Rep* 1994; 12: 245-264.
17. Woolhiser MR, Munson AE, Mcade BJ. Immunological responses of mice following administration of natural rubber latex proteins by different routes of exposure. *Toxicological Science* 2000; 55: 343-351.
17. Thanseem I, Joseph A, Thulaseedharan A. Induction and differential expression of  $\beta$ -1,3-glucanase mRNAs in tolerant and susceptible *Hevea* clones in response to infection by *Phytophthora meadii*. *Tree Physiology* 2005; 25: 1361-1368.
18. Hoffmann-Sommergruber K. Pathogenesis-related (PR)-proteins identified as allergens. *Biochemical Society Transactions* 2002; 30: 930-935.
19. Zhao H, Zhao H, Wang J, Wang B, Wang Y. Stress stimulation induced resistance of plant. *Colloids and Surfaces B* 2005; 43: 174-178.
20. Van Loon LC, Van Strien EA. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 types proteins. *Physiol Mol Plant Pathol* 1999; 55: 85-97.
21. Van den Bulcke M, Bauw G, Castresana C, van Montagu M, Vandekerckhove J. Characterization of vacuolar and extracellular  $\beta$ (1,3)-glucanases of tobacco: evidence for a strictly compartmentalized plant defense system. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 2673-2677.
22. Van Kan JAL, Joosten MHJ, Wagemakers CAM, Van den Berg-Velhuis GCM, de Wit PJGM. Differential accumulation of mRNAs encoding extracellular and intracellular PR-proteins in tomato induced by virulent and avirulent races of *Cladosporium fulvum*. *Plant Mol Biol* 1992; 20: 513-527.
23. Vögeli-Lange R, Fründt C, Hart CM, Beffa R, Nagy F, Meins F Jr. Evidence for a role of  $\beta$ -1,3-glucanase in dicot seed germination. *Plant J* 1994; 5: 273-278.
24. Leubner-Metzger O, Fründt C, Vögeli-Lange R, Meins F Jr. Class I  $\beta$ -1,3-glucanase in the endosperm of tobacco during germination. *Plant Physiol* 1995; 109: 751-759.
25. Sunderasan E, Samsidar H, Sharifah H, Ward MA, Yeang HY, Cardoso MJ. Latex B serum  $\beta$ -1,3-glucanase (Hev b 2) and a component of the microhelix (Hev b 4) are major latex allergens. *J Natl Rubb Res* 1995; 10: 82-99.
26. Alenius H, Kalkinen N, Lukka M, Reünala T, Turjanmaa K, Mäeäkinen-Kiljunen S, Yip E, Palosuo T. Prohevein from the rubber tree (*Hevea brasiliensis*) is a major latex allergen. *Clin Exp Allergy* 1995; 25: 659-665.
27. Hoj PB, Fincher GB. Molecular evolution of plant  $\beta$ -glucan endohydrolases. *Plant J* 1995; 7: 367-379.
28. 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 allergens. *Clin Exp Allergy* 2000; 30: 359-369.
29. Asero R, Mistrello G, Roncarolo D, Amato S, Falagiani P. Detection of novel latex allergen associated with clinically relevant allergy to plant-derived foods. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 115: 1312-1314.
30. Koh D, Ng V, Leow Y-H, Goh CL. A study of natural rubber latex allergens in gloves used by health care workers in Singapore. *British Journal of Dermatology* 2005; 153: 954-959.
31. O'connor TM, Bourke JF, Jones M, Brennan N. Report of occupational asthma due to phytase and  $\beta$ -glucanase. *Occup Environ Med* 2001; 58: 417-419.
32. Moreno HL, Avila E, Angulo Y, Portillo J, Moreno L, Reza G, Hernández V, Levario M. Frequency in allergy to proteins of latex in health care workers. *Allergol et Immunopathol* 2005; 33: 210-213.
33. Palomares O, Villalba M, Rodríguez R. The C-terminal segment of the 1,3- $\beta$ -glucanase Ole e 9 from olive (*Olea europaea*) pollen is an independent domain with allergenic activity: expression in *Pichia pastoris* and characterization. *Biochem J* 2003; 369: 593-601.
34. Palomares O, Villalba M, Quiralte J, Polo F, Rodríguez R. 1,3- $\beta$ -glucanase as candidates in latex-pollen-vegetable food cross-reactivity. *Clin Exp Allergy* 2005; 35: 345-351.
35. Akiyama T, Shibuya N, Hrmova M, Fincher GB. Purification and characterization of a (1-3)- $\beta$ -D-glucan endohydrolase from rice (*Oryza sativa*) bran. *Carbohydrate Research* 1997; 297: 365-374.
36. Receveur V, Czjzek M, Barre A, Roussel A, Peumans WJ. Crystal structure at 1.45-Å Resolution of Major Allergen Endo- $\beta$ -1,3-glucanase of Banana as a Molecular basis for the Latex-Fruit Syndrome. *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics* 2006; 63: 235-242.





37. Yagami T, Sato M, Nakamura A, Komiyama T, Kitagawa K, Akasawa A, Ikezawa Z. Plant defense-related enzymes as latex antigens. *J Allergy Clin Immunol* 1998; 101: 379-385.
38. Nieto GA, Mazón RA, Pamies ER, Caballero GL, Oliver JF, Colomer HN. Implicación clínica de la reactividad cruzada entre alérgenos. *Alérgol et Immunopatol* 2004; 32: 124-129.
39. Kurup VP, Sussman GL, Yeang HY, Elms N, Breiteneder H, Arif SAM, Kelly KJ, Bansal NK, Fink JN. Specific IgE response to purified and recombinant allergens in latex allergy. *Clin Mol Allergy* 2005; 3: 1-9.
40. Yagami T, Osuna H, Kouno M, Haishima Y, Nakamura A, Ikezawa Z. Significance of carbohydrate epitopes in a latex allergen with  $\beta$ -1,3-glucanase activity. *Int Arch Allergy Immunol* 2002; 129: 27-37.
41. Thomas WR. How good are carbohydrates as allergens? *Clin Exp Allergy* 2002; 32: 658-661.
42. Calabozo B, Barber D, Pio F. Studies on the carbohydrate moiety of Pla 1 1 allergen. Identification of a major N-glycan and significance for immunoglobulin E-binding activity. *Clin Exp Allergy* 2002; 32: 1628-1634.
43. Aalaberse RC. Structural biology of allergens. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 106: 228-238.
44. Aalaberse RC. Structural features of allergenic molecules. *Chem Immunol Allergy* 2006; 91: 134-146.
45. Varghese JN, Garrett TPJ, Colma PM, Chen L, Hoj PB, Fincher GB. Three-dimensional structure of two plant  $\beta$ -glucan endohydrolases with distinct substrate specificities. *Proc Natl Acad Sci* 1994; 91: 2785-2789.
46. Banner DW, Bloomer AC, Patsko GA, Phillips DC, Pogson CI, Wilson IA, Corran PH, Furth AJ, Milman JD, Offord RE, Priddle JD, Waley SG. Structure of chicken muscle triose phosphate isomerase determined crystallographically at 2.5 angstrom resolution using amino acid sequence data. *Nature* 1975; 255: 609-614.

Dirección para correspondencia:  
Deyanira Fuentes-Silva  
Circuito Exterior, Cd. Universitaria, México,  
D.F. 04510, México.  
Teléfono: (52 5) 55-224568 Fax: (52 555)  
6162217

Acta Crystallographica Section F

Structural Biology  
and Crystallization  
Communications

ISSN 1744-3091

Editors: H. M. Einspahr and J. M. Guss

**Crystallization and identification of the glycosylated moieties of two isoforms of the main allergen Hev b 2 and preliminary X-ray analysis of two polymorphs of isoform II**

**D. Fuentes-Silva, G. Mendoza-Hernández, V. Stojanoff, L. A. Palomares, E. Zenteno, A. Torres-Larios and A. Rodríguez-Romero**

Copyright © International Union of Crystallography

Author(s) of this paper may load this reprint on their own web site or institutional repository provided that this cover page is retained. Republication of this article or its storage in electronic databases other than as specified above is not permitted without prior permission in writing from the IUCr.

For further information see <http://journals.iucr.org/Services/authrights.html>

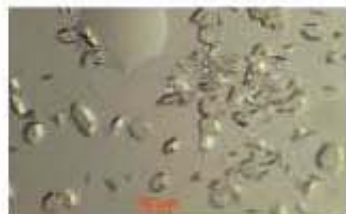
D. Fuentes-Silva,<sup>a</sup> G. Mendoza-Hernández,<sup>b</sup> V. Stojanoff,<sup>c</sup>  
L. A. Palomares,<sup>d</sup> E. Zenteno,<sup>b</sup>  
A. Torres-Larios<sup>e</sup> and  
A. Rodríguez-Romero<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup>Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior s/n, Ciudad Universitaria, Coyoacán, México, DF 04510, México, <sup>b</sup>Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior s/n, Ciudad Universitaria, Coyoacán, México, DF 04510, México,

<sup>c</sup>Brookhaven National Laboratory, National Synchrotron Light Source, Upton, NY, USA, <sup>d</sup>Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior s/n, Ciudad Universitaria, Coyoacán, México, DF 04510, México, and <sup>e</sup>Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior s/n, Ciudad Universitaria, Coyoacán, México, DF 04510, México

Correspondence e-mail: [azela@servidor.unam.mx](mailto:azela@servidor.unam.mx)

Received 3 July 2007  
Accepted 10 August 2007



## Crystallization and identification of the glycosylated moieties of two isoforms of the main allergen Hev b 2 and preliminary X-ray analysis of two polymorphs of isoform II

Latex from *Hevea brasiliensis* contains several allergenic proteins that are involved in type I allergy. One of them is Hev b 2, which is a  $\beta$ -1,3-glucanase enzyme that exists in different isoforms with variable glycosylation content. Two glucanase isoforms were isolated from trees of the GV-42 clone by gel filtration, affinity and ion-exchange chromatography. Isoform I had a carbohydrate content of about 20%, with N-linked *N*-acetyl-glucosamine, *N*-acetyl-galactosamine, fucose and galactose residues as the main sugars, while isoform II showed 6% carbohydrate content consisting of *N*-acetyl-glucosamine, fucose, mannose and xylose. Both isoforms were crystallized by the hanging-drop vapour-diffusion method. Isoform I crystals were grown using 0.2 *M* trisodium citrate dihydrate, 0.1 *M* Na HEPES pH 7.5 and 20% (*v/v*) 2-propanol, but these crystals were not appropriate for data collection. Isoform II crystals were obtained under two conditions and X-ray diffraction data were collected from both. In the first condition (0.2 *M* trisodium citrate, 0.1 *M* sodium cacodylate pH 6.5, 30% 2-propanol), crystals belonging to the tetragonal space group  $P4_1$  with unit-cell parameters  $a = b = 150.17$ ,  $c = 77.41$  Å were obtained. In the second condition [0.2 *M* ammonium acetate, 0.1 *M* trisodium citrate dihydrate pH 5.6, 30% (*w/v*) polyethylene glycol 4000] the isoform II crystals belonged to the monoclinic space group  $P2_1$ , with unit-cell parameters  $a = 85.08$ ,  $b = 89.67$ ,  $c = 101.80$  Å,  $\beta = 113.6^\circ$ . Preliminary analysis suggests that there are four molecules of isoform II in both asymmetric units.

### 1. Introduction

IgE-mediated allergy to natural rubber latex (NRL) has been recognized as an important health problem in developed countries. Manufactured products contain allergenic proteins that are capable of causing IgE-mediated allergy in sensitized patients (Koh *et al.*, 2005; Asero *et al.*, 2005). *Hevea brasiliensis* latex has been reported to contain several allergenic proteins that cause type I hypersensitivity (Breiteneder & Scheimer, 1998; Poley & Slater, 2000; Yeang *et al.*, 2002). Among them, the 1,3- $\beta$ -glucanases (EC 3.2.1.39) are a family of hydrolytic enzymes that belong to the pathogenesis-related proteins (PRP), being expressed in response to microbial attack or tissue wounding (van den Dulcke *et al.*, 1989; van Loon *et al.*, 1994). Latex 1,3- $\beta$ -glucanase is a protein of 36 kDa that has been assigned the allergen name Hev b 2 (Sunderasan *et al.*, 1995; Alenius *et al.*, 1995) and that is recognized by IgEs of latex-allergic patients. This protein has been shown to be one of the most allergenic and both its peptidic and carbohydrate moieties are recognized by IgEs (Kurup *et al.*, 2000, 2005). In general, the allergenic determinants are mainly of peptidic nature and can be linear or conformational epitopes (Dona, López *et al.*, 2004).

Chungchow *et al.* (1995) detected two isoforms of latex 1,3- $\beta$ -glucanase from the vacuoles or luteoids of NRL. Both isoforms were endoglucanases; however, isoform I did not have affinity for concanavalin A (Con A) and did not bind to IgEs from the sera of allergic subjects. In 2002, Yagami and coworkers demonstrated that the

been increasing evidence of IgE antibodies binding to allergenic glycoproteins containing  $\alpha$ 1,3-fucosylated and  $\beta$ 1,2-xylosylated N-glycans of plant and invertebrate origin (van Ree *et al.*, 2000; Wilson *et al.*, 1998; Mahier *et al.*, 2006). Nonetheless, the role of N-glycan-specific IgEs in the clinical manifestations of allergic reactions is still a matter of debate. Batanero *et al.* (1999) and Iacovacci *et al.* (2002) have carried out histamine-release tests and demonstrated that carbohydrates could trigger basophil degranulation. These results suggest that the carbohydrate moieties of the native glycoprotein are important in glucanase allergy.

Knowledge of the three-dimensional structures of native allergens will help in elucidation of the antigenic determinant features of these molecules. However, it is well known that the presence of attached oligosaccharides can negatively influence the crystallizability of proteins. This phenomenon is presumably a consequence of the excess surface conformational entropy exhibited by the sugar chains and of microheterogeneity in glycan chain length and composition. To date, no structures of native 1,3- $\beta$ -glucanases have been reported, but two three-dimensional structures of recombinant enzymes from plants have been published (Receveur-Bréchet *et al.*, 2006; Varghese *et al.*, 1994). They adopt the ( $\beta\alpha$ )<sub>2</sub> topology or TIM-barrel structure. In this paper, we report the purification, glycosylation characterization and crystallization of two glycosylated native isoforms of the Hev b 2 allergen from NRL luteoid particles. Additionally, we report the preliminary X-ray characterization of two isoform II crystals, which crystallized in the tetragonal and monoclinic systems.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Protein purification and characterization

*H. brasiliensis* (clone GV-42) latex was obtained from the El Palmar plantation (Veracruz state, México). The collected latex was separated into rubber particles, C-serum and luteoids (the bottom fraction) by centrifugation at 70 000g for 30 min at 277 K (Rihs & Raulf-Heimsoth, 2003). The luteoid fraction containing the Hev b 2 isoforms was stored at 253 K until use. The following steps were performed at 277 K. Frozen luteoids were homogenized in 0.3 M NaCl solution with a Waring blender. The homogenate was cleared by centrifugation and the resultant supernatant was dialyzed against water for 48 h. The precipitate formed was separated by centrifugation and the pellet was resuspended in 20 ml 50 mM MES buffer pH 6.5, 0.35 M NaCl. The sample was filtered through a 0.22  $\mu$ m Millipore membrane (Millipore, Billerica, USA) and subjected to gel filtration on a HiLoad 16/20 Superdex 200 column equilibrated and eluted with the same buffer in an Akta FPLC System (Pharmacia-LKB Biotechnology, Sweden) at a flow rate of 1 ml min<sup>-1</sup>. Fractions containing  $\beta$ -glucanase activity were pooled, concentrated and dialyzed against 50 mM Tris-HCl pH 8.0 containing 0.5 M NaCl (elution buffer) in Amicon stirred cells through an Amicon membrane with a molecular-weight cutoff of 10 kDa. The activity was measured on laminarin (Miller, 1959). The pooled fraction was loaded onto a Con A Sepharose 4B (Pharmacia) column previously equilibrated with elution buffer and eluted with a linear gradient (0–0.5 M) of methyl- $\alpha$ -D-mannopyranoside (Sigma Chemical Co., St Louis, USA). Both the bound and nonbound fractions of Con A showed activity. Each isoform was purified to homogeneity by cation-exchange chromatography using a Mono S 5/50 GL column (Pharmacia-LKB Biotechnology, Sweden) equilibrated in 50 mM phosphate pH 7.5 and eluted with a linear gradient from 0 to 1 M NaCl. The nonbound fraction was named isoform I, while the bound fraction was named isoform II (Chungchow *et al.*, 1995). The protein concentration was determined

by measuring the absorbance at 280 nm using an extinction coefficient of 1.57 g<sup>-1</sup> ml calculated from the sequence of *H. brasiliensis* endo- $\beta$ -1,3-glucanase deposited in the National Center for Biotechnology Information data bank (accession No. AAG24921).

### 2.2. SDS-PAGE and carbohydrate detection

SDS-PAGE was performed according to the method of Laemmli (1970) under reducing conditions. The separating gel contained 12% acrylamide. The isoforms were stained with Coomassie R-250 Brilliant Blue for determination of their relative molecular weight. Low-molecular-weight standards (Bio-Rad, Hercules, USA) consisting of phosphorylase b (97.4 kDa), bovine serum albumin (66.2 kDa), ovalbumin (45 kDa), carbonic anhydrase (31 kDa), soybean trypsin inhibitor (21.5 kDa) and lysozyme (14.4 kDa) were run with the samples. Carbohydrate detection of isoforms was performed by staining with fuchsin-sulfite reagent (Sigma Chemical Co., St Louis, USA) and dioxygenin (Roche Molecular Biochemicals, East Sussex, England).

### 2.3. N-terminal sequencing

Isoform I was digested with trypsin and sequenced by electrospray ionization quadrupole tandem mass spectrometry using a 3200 QTRAP system (Applied Bioscience/MDS Siox, Ontario, Canada) equipped with a nano-electrospray source and nano-flow LC system (Agilent 1100 nano pump, Waldbrow, Germany). Database searching (NCBItr) and protein identification were performed using Mascot (<http://www.matrixscience.com>). The N-terminal sequence of isoform II and its proteolytic fragments generated by trypsin digestion were determined by Edman degradation using an automatic gas-phase protein sequencer (Model LF 3000, Beckman Instruments, Irvine, USA).

### 2.4. Mass-spectrometric analysis

Spectrometric measurements were performed using a matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight MALDI-TOF Omnilux mass spectrometer from Bruker Daltonics (Bremen, Germany) equipped with a pulsed nitrogen laser ( $\lambda = 337$  nm, 10 ns pulse width). Spectra were acquired in positive-reflection mode with a 19 kV accelerating voltage. The proteins were dissolved in a saturated solution of 3,5-dimethoxy-4-hydroxycinnamic acid (sinapinic acid) in 30% acetonitrile, 0.1% trifluoroacetic acid. Carbonic anhydrase (28 kDa) and bovine serum albumin (66 kDa) were used for internal calibration.

### 2.5. Carbohydrate estimation and monosaccharide composition

The carbohydrate content was determined by means of a Glycoprotein Carbohydrate Estimation kit (Pierce, Rockford, USA) according to the manufacturer's specifications. Additionally, the carbohydrate compositions of both isoforms were determined from the heptafluorobutyrate derivatives of O-methylglycosides obtained after methanolysis with 0.5 N methanol-HCl for 24 h at 373 K by gas chromatography with a capillary column (25  $\times$  0.32 mm) of 5% Silicone OV 210 (Applied Science Laboratories, Buffalo, USA). L-Lysine (Sigma Chemical Co., St Louis, USA) was used as an internal standard. Identification of each sugar residue was confirmed by mass spectrometry using a Finnigan Automass II mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA). The heptafluorobutyrate derivatives of the O-methylglycosides presented relatively high molecular weights: 978 Da for hexoses, 977 Da for hexosamines and 1275 Da for sialic acid (Zanetta *et al.*, 1999).

**Table 1**  
Data-collection statistics of the two Hev b 2 isoform II crystals obtained from *H. brasiliensis*.

Values in parentheses are for the last shell.

Space group	$P4_1$	$P2_1$
Unit-cell parameters ( $\text{\AA}$ , $^\circ$ )	$a = b = 150.17$ , $c = 77.41$	$a = 87.08$ , $b = 89.67$ , $c = 101.40$ , $\beta = 113.6$
Resolution range	43.78–2.65 (2.74–2.65)	44.50–2.55 (2.64–2.55)
Total no. of reflections	244012	177127
No. of unique reflections	49848	45830
Average redundancy	4.99	3.86
Completeness	99 (90.2)	98 (86.6)
$R_{\text{merge}}$	0.109 (0.44)	0.085 (0.16)
$I/\sigma(I)$	8.9 (3.1)	10.6 (4.4)
Solvent content (%)	57	49
Molecules per ASU	4	4

$$\dagger R_{\text{merge}} = \frac{\sum_{\text{cell}} \sum_i |I(hkl) - \langle I(hkl) \rangle|}{\sum_{\text{cell}} \sum_i I(hkl)}$$

**Table 2**  
Sequence of tryptic peptide fragments of Hev b 2 isoforms I and II.

Peptide fragment	Isoform I	Isoform II
1	G <sup>21</sup> FWSSVLFER <sup>27</sup>	G <sup>210</sup> YKNLFDA <sup>217</sup>
2	Y <sup>30</sup> LAVGNEISPVNR <sup>36</sup>	A <sup>170</sup> IETYLFA <sup>207</sup>
3	N <sup>31</sup> LFDAILDVLYSALER <sup>39</sup>	
4	T <sup>35</sup> YLSNLIQIVK <sup>39</sup>	
5	A <sup>37</sup> IETYLFA <sup>43</sup> FENK <sup>49</sup>	
6	Q <sup>37</sup> FGLFFPKWQK <sup>43</sup>	

## 2.6. Crystallization

Each isoform was concentrated and dialyzed to 10 mg ml<sup>-1</sup> in 0.1 M sodium citrate pH 5.0 buffer in an Amicon Ultrafree 0.5 centrifugal filter unit (Millipore) with a molecular-weight cutoff of 10 kDa. The hanging-drop vapour-diffusion method and 24-well Linbro crystallization plates were used in conjunction with Hampton Research Crystal Screen 1 solutions (Hampton Research, Laguna Niguel, USA) to search for suitable crystallization conditions. Solutions with pH values below 8 were selected owing to the basic pI of these proteins. Drops were prepared by mixing 5  $\mu$ l protein solution and 5  $\mu$ l precipitant solution at 291 K. Isoform I crystallized in solution No. 27 [0.2 M trisodium citrate dihydrate, 0.1 M Na HEPES pH 7.5, 20% (v/v) 2-propanol]. Diffraction-quality crystals of isoform II were obtained using two conditions. In the first condition, 0.2 M trisodium citrate dihydrate, 0.1 M sodium cacodylate pH 6.5 and 30% (v/v) 2-propanol (solution No. 8), crystals took six months to grow using either the hanging-drop or the sitting-drop vapour-diffusion method. In the second condition, good-quality crystals grew using 0.2 M ammonium acetate, 0.1 M trisodium citrate dihydrate pH 5.6 and 30% (w/v) polyethylene glycol 4000 (solution No. 9) in approximately one year. For X-ray diffraction data collection, isoform II crystals grown in the first condition were cryoprotected by a quick soak in reservoir solution containing 35% (w/v) trehalose, whereas for crystals grown in the second condition this was not necessary.

## 2.7. Data collection and processing

Firstly, all protein crystals were characterized in the home laboratory using a rotating-anode generator (Cu K $\alpha$ ,  $\lambda = 1.5416 \text{ \AA}$ ) with a Rigaku R-Axis IIC image-plate system (Rigaku, Texas, USA). For isoform II crystals grown in the first condition, X-ray diffraction data were collected to 2.65  $\text{\AA}$  at 100 K on beamline X6A at the National Synchrotron Light Source (Upton, New York, USA). A total of 180 images with a 1.0 $^\circ$  oscillation range per frame were initially integrated and scaled using the *HKL-2000* suite (Otwinowski

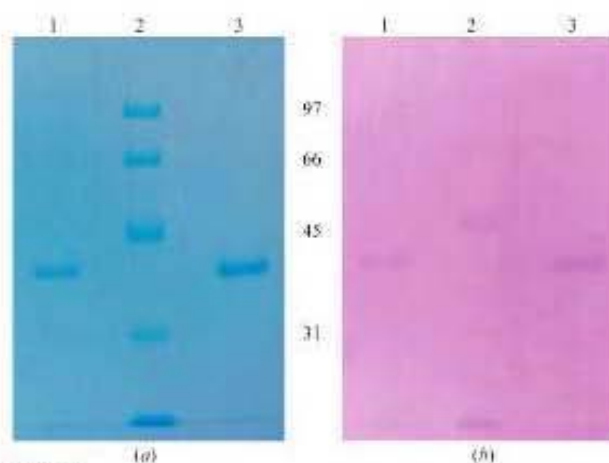
& Minor, 1997). A isoform II crystal obtained using the second condition diffracted to 2.55  $\text{\AA}$  at 100 K on beamline 5-ID at the Dupont Northwestern Dow and Life Science Collaborative Access Team station (DND-CAT) at the Advanced Photon Source, Argonne National Laboratory (Illinois, USA). The raw data from crystals grown under both conditions were finally processed and scaled using the *CrystalClear/DTREK* program suite (Pfugrath, 1999). The data-collection statistics are summarized in Table 1.

## 3. Results and discussion

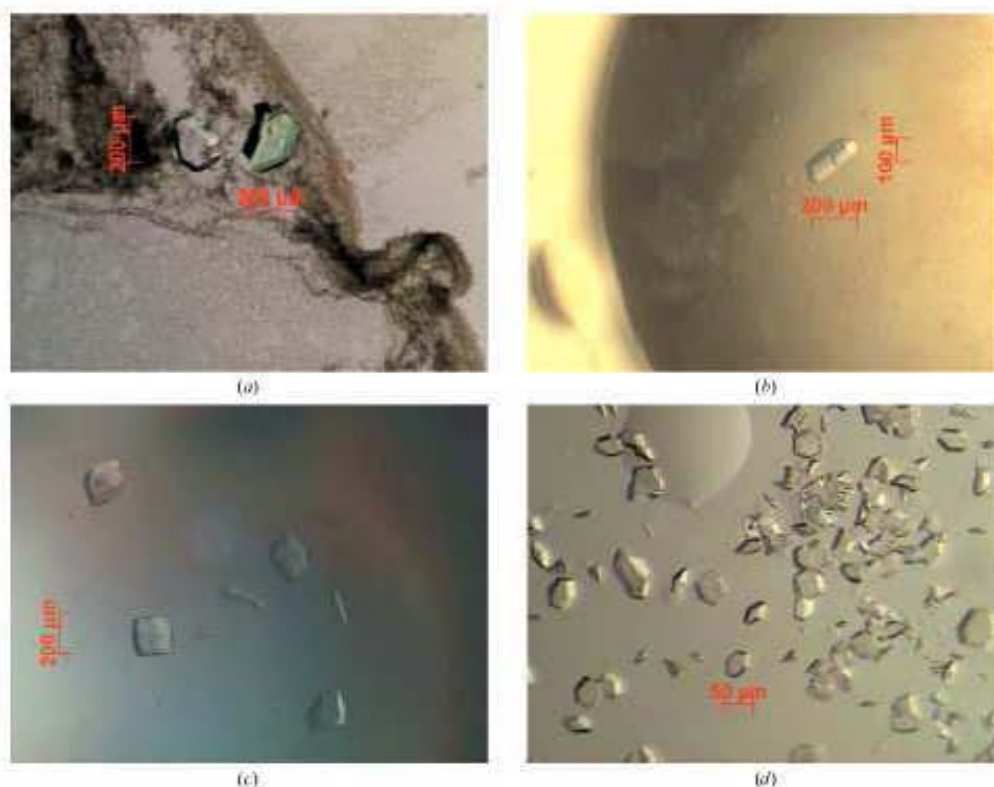
Two isoforms of the allergen Hev b 2 from *H. brasiliensis* latex were purified to homogeneity by several chromatographic steps. Purified isoforms were detected as a single band on SDS-PAGE with an apparent molecular weight of 40 kDa (Fig. 1a). Mass-spectrometric analysis showed an  $m/z$  ratio of 38 397 for isoform I and of 38 093 for isoform II. Six peptidic fragments from isoform I were sequenced by mass spectrometry and analyzed using the *Mascot* search engine (<http://www.matrixscience.com>). They were identified in the Hev b 2 sequence of a Malayan clone with GenBank accession No. AAG24921 (Table 2).

Isoform II had its N-terminal end (Gln1) blocked, as shown by Edman degradation. Two reduced-alkylated peptides obtained after trypsin digestion were sequenced. An eight-amino-acid sequence (G<sup>210</sup>YKNLFDA) and a ten-amino-acid sequence (A<sup>170</sup>IETYLFA<sup>207</sup>) showed identity with the Malayan Hev b 2 sequence and overlap with two other peptidic fragments (3 and 5) of the isoform I sequence (Table 2). Overall, they represent 23% of the whole sequence deposited in the NCBI, which contains two potentially N-glycosylated sites at positions Asn27 and Asn65 as predicted with the help of the *NetNGlyc* server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc>).

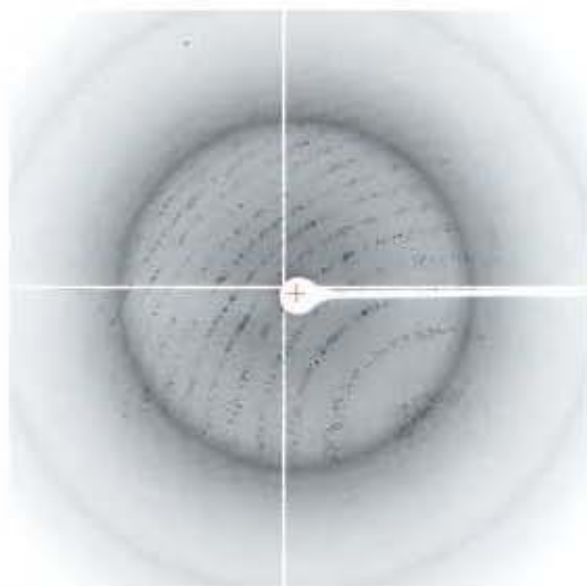
SDS-PAGE stained with fuchsin-sulfite reagent showed that both isoforms are glycosylated (Fig. 1b). However, dioxygenin did not stain isoform I, which was not bound to the Con A column (results not shown). The carbohydrate contents estimated by the Pierce protocol were 19.8% and 5.7% for isoforms I and II, respectively, which justify the molecular-weight differences shown above.



**Figure 1**  
(a) Coomassie Brilliant Blue-stained SDS-PAGE of purified Hev b 2 isoforms. Lane 1, isoform II; lane 2, molecular-weight standards (kDa); lane 3, isoform I. (b) The same SDS-PAGE stained with fuchsin-sulfite reagent. The band stained in the marker lane is ovalbumin (45 kDa), which has a 3% carbohydrate content.



**Figure 2**  
Hev b 2 crystals. (a) Isoform II crystals grown in the first condition (see text). (b) Isoform II crystals obtained in the second condition (see text). (c) Isoform II crystals obtained by the sitting-drop vapour-diffusion method using the first condition. (d) Isoform I crystals. The crystals in (a), (b) and (d) were grown by the hanging-drop vapour-diffusion method.



**Figure 3**  
X-ray diffraction pattern of the isoform II crystal (Fig. 2c) collected to 2.65 Å resolution on beamline X6A, NSLS.

The monosaccharide compositions of the isoforms also differed. Isoform I contained N-linked N-acetyl-glucosamine, N-acetyl-galactosamine, fucose and galactose residues; while isoform II contained N-acetyl-glucosamine, fucose, mannose and xylose residues. The binding of isoform II to Con A suggests that it contains a trimannoside core  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 3)-linked and  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 6)-linked to another mannose residue bound to two N-acetyl- $\beta$ -glucosaminyl residues (Debray *et al.*, 1981). These isoforms are the second NRL allergens whose carbohydrate composition has been reported. Previously, Kolarich *et al.* (2006) described another highly glycosylated NRL allergen, Hev b 4, a glycoprotein with glucosidic activity containing mannose, fucose and xylose residues. The Hev b 4 carbohydrate moiety has been implicated in the binding of IgEs from NRL-allergic patients (Sunderasan *et al.*, 2002).

Both glycosylated isoforms of Hev b 2 were crystallized (Fig. 2). The isoform I crystals were small ( $\sim 25 \times \sim 30 \times \sim 10 \mu\text{m}$ ) and diffracted poorly (Fig. 2d). In contrast, two crystallization conditions were found to produce good-quality crystals of isoform II. The crystals grown in the first condition (Figs 2a and 2c) diffracted to 2.65 Å (Fig. 3) with 99% completeness. They belonged to the primitive tetragonal space group  $P4_1$ , with unit-cell parameters  $a = b = 150.17$ ,  $c = 77.41$  Å. The Matthews coefficient (Matthews, 1968) of  $2.83 \text{ \AA}^3 \text{ Da}^{-1}$  suggests the presence of four molecules in the asymmetric unit, corresponding to a solvent content of 57%. Isoform II crystals grown in the second condition (Fig. 2b) diffracted to 2.55 Å with 98% completeness. The crystals belong to space group  $P2_1$ , with

unit-cell parameters  $a = 87.08$ ,  $b = 89.67$ ,  $c = 101.40$  Å,  $\beta = 113.57^\circ$ . The Matthews coefficient of  $2.63$  Å<sup>3</sup> Da<sup>-1</sup> indicates a solvent content of 49% (Table 1) and again four molecules in the asymmetric unit. In contrast, for other recombinant plant  $\beta$ -1,3-glucanases the asymmetric unit has been reported to be a monomer (Receveur-Bréchet *et al.*, 2006; Varghese *et al.*, 1994). The program *Phaser* (McCoy, 2007) from the *CCP4* suite (Collaborative Computational Project, Number 4, 1994) was employed for molecular-replacement procedures using banana  $\beta$ -1,3-glucanase (PDB code 2cyg) as the search model (Receveur-Bréchet *et al.*, 2006). This model has 59% sequence identity to Hev b 2.

It is interesting to mention that no glycosylated native  $\beta$ -1,3-glucanases have been crystallized to date. In this work, we were able to crystallize two isoforms of native Hev b 2 with different glycosylation patterns, which might be important in IgE recognition from allergenic patients.

The authors thank Dr David W. Krogmann for his valuable comments on the manuscript and MSc Georgina Espinosa Pérez and MSc Carmen Márquez Alonso from the Chemistry Institute and MSc Zoila Vanessa Hernández from the Biotechnology Institute, UNAM, for their technical assistance. This work was supported by DGAPA-UNAM (IN209506-3) and doctoral scholarship PB/0197 from DGEP-UNAM. The X6A beamline is funded by the NIGMS under agreement GM0080. The NSLS is supported by the US DOE contract No. DE-AC02-98CH10886.

## References

- Alerius, H., Kalkkinen, N., Lukka, M., Reunala, T., Turjanmaa, K., Mäkinen-Kiljunen, S., Yip, E. & Palosuo, T. (1995). *Clin. Exp. Allergy*, **24**, 659–665.
- Asero, R., Mistrali, G., Roncarolo, D., Amato, S. & Falagiani, P. (2005). *J. Allergy Clin. Immunol.* **115**, 1312–1314.
- Batanero, E., Crespo, J.F., Monsalvo, R. I., Martín-Esteban, M., Villalba, M. & Rodríguez, R. (1999). *J. Allergy Clin. Immunol.* **103**, 147–153.
- Breiteneder, H. & Scheiner, O. (1998). *Int. Arch. Allergy Immunol.* **116**, 83–92.
- Bulke, M., van den Bauw, G., Castresana, C., van Montagu, M. & Vandekerckhove, J. (1989). *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **86**, 2673–2677.
- Churngchow, N., Santaro, A. & Wittsuwanakul, R. (1995). *Phytochemistry*, **39**, 505–509.
- Collaborative Computational Project, Number 4 (1994). *Acta Cryst.* **D50**, 760–763.
- Debray, H., Decout, D., Strecker, G., Spik, G. & Montreuil, J. (1981). *Eur. J. Biochem.* **117**, 41–55.
- Iucovacci, P., Afferni, C., Butteroni, C., Pironi, L., Puggioni, E. M. R., Orlandi, A., Barletta, B., Tinghino, R., Ariano, R., Panzani, R. C., Di Felice, G. & Pini, C. (2002). *Clin. Exp. Allergy*, **32**, 1620–1627.
- Koh, D., Ng, V., Leow, Y.H. & Goh, C. L. (2005). *Br. J. Dermatol.* **153**, 954–959.
- Kolarich, D., Altmann, F. & Sunderasan, E. (2006). *Biochim. Biophys. Acta*, **1760**, 715–720.
- Kurup, V. P., Sussman, G. L., Yeang, H. Y., Elms, N., Breiteneder, H., Arif, S. A. M., Kelly, K. J., Bansal, N. K. & Fink, J. N. (2005). *Clin. Mol. Allergy*, **3**, 1–9.
- Kurup, V. P., Yeang, H. Y., Sussman, G. L., Bansal, N. K., Beezhold, D. H., Kelly, K. J., Hoffman, D. R., Williams, B. & Fink, J. N. (2000). *Clin. Exp. Allergy*, **30**, 359–369.
- Laemmli, U. K. (1970). *Nature (London)*, **227**, 680–685.
- Loon, L. C. van, Pierpoint, W. S., Boller, T. & Conejero, V. (1994). *Plant Mol. Biol. Rep.* **12**, 245–264.
- McCoy, A. J. (2007). *Acta Cryst.* **D63**, 32–41.
- Mahler, V., Gutgesell, C., Videnta, R. & Fuchs, T. (2006). *Clin. Exp. Allergy*, **36**, 1446–1456.
- Matthews, B. W. (1968). *J. Mol. Biol.* **33**, 491–497.
- Miller, G. L. (1959). *Anal. Chem.* **31**, 426–428.
- Otwinowski, Z. & Minor, W. (1997). *Methods Enzymol.* **276**, 307–326.
- Palomares, O., Villalba, M., Quiralte, J., Polo, F. & Rodríguez, R. (2005). *Clin. Exp. Allergy*, **35**, 345–351.
- Pflugrath, J. W. (1999). *Acta Cryst.* **D55**, 1718–1725.
- Poley, G. E. Jr & Slater, J. E. (2000). *J. Allergy Clin. Immunol.* **105**, 1054–1062.
- Receveur-Bréchet, V., Czjzek, M., Barre, A., Roussel, A. & Peumans, W. J. (2006). *Protein*, **63**, 235–242.
- Ree, R. van, Cabanes-Macheteau, M., Akkerdas, J., Milazzo, J. P., Loutelier-Bourhis, C., Rayon, C., Villalba, M., Koppelman, S., Aalberse, R., Rodríguez, R., Faye, L. & Lerouge, P. (2000). *J. Biol. Chem.* **275**, 11451–11458.
- Reyes-López, C. A., Hernández-Santoyo, A., Pedraza-Escalona, M., Mendoza, G., Hernández-Arana, A. & Rodríguez-Romero, A. (2004). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **311**, 174–30.
- Rihs, H.-P. & Raulf-Heimsoth, M. (2003). *New Horizons Allergy*, **3**, 2–8.
- Sunderasan, E., Chow, K. S., Ward, M. A. & Yeang, H. Y. (2002). *J. Allergy Clin. Immunol.* **109**, S33.
- Sunderasan, E., Samsidar, H., Sharifah, H., Ward, M. A., Yeang, H. Y. & Carlota, M. J. (1995). *J. Nat. Rubber Res.* **10**, 82–99.
- Varghese, J. N., Garrett, T. P. J., Colma, P. M., Chen, L., Høj, P. B. & Fincher, G. B. (1994). *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **91**, 2785–2789.
- Wilson, I. B., Harthill, J. E., Mullin, N. P., Ashford, D. A. & Altmann, F. (1998). *Glycobiology*, **8**, 651–661.
- Yagami, T., Osuna, H., Kouno, M., Hashima, Y., Nakamura, A. & Ikezawa, Z. (2002). *Int. Arch. Allergy Immunol.* **129**, 27–37.
- Yeang, H. Y., Siti-Arija, M., Yusof, F. & Sunderasan, E. (2002). *Methods*, **27**, 32–45.
- Zanetta, J. P., Timmerman, P. & Leroy, Y. (1999). *Glycobiology*, **9**, 255–266.





TITLE PAGE

Original article

Structural insights into the recognition of the natural glycoallergen Hev b 2 by human basophils

Deyanira Fuentes-Silva, PhD<sup>a</sup>, Guillermo Mendoza-Hernández, PhD<sup>b</sup>, , Laura A. Palomares, PhD<sup>c</sup>, Samira Muñoz-Cruz, PhD<sup>d</sup>, Lilian Yépez-Mulía, PhD<sup>d</sup> & Adela Rodríguez-Romero, PhD<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Instituto de Química, <sup>b</sup>Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior, Cd. Universitaria, Coyoacán, México DF, 04510.

<sup>c</sup>Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado postal 510-3, Cuernavaca, Mor. 62250, México.

<sup>d</sup>UMAE-Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS, Av. Cuauhtemoc 330, Col. Doctores, México D.F. 06725.

Corresponding author

Adela Rodríguez-Romero, PhD

Instituto de Química

Universidad Nacional Autónoma de México

Circuito Exterior, Cd. Universitaria, Coyoacán, México DF, 04510.

Telephone: 5255-56224568

Fax: 5255-52162217

E-mail: [adela@servidor.unam.mx](mailto:adela@servidor.unam.mx)

Deyanira Fuentes-Silva, PhD

Instituto de Química

Universidad Nacional Autónoma de México

Circuito Exterior, Cd. Universitaria, Coyoacán, México DF, 04510.

Telephone: 5255-56224568

Fax: 5255-52162217

E mail: [dfuentess@yahoo.com.mx](mailto:dfuentess@yahoo.com.mx).

Total word count: 3453

## Abstract

**Background:** Natural glycosylated Hev b 2 from *Hevea brasiliensis* is a relevant allergen that is recognized by IgEs from patients who suffer from latex allergy. Its sugar moieties are the major IgE-binding epitope and are responsible for its cross-reactivity.

**Objective:** We determined two crystallographic structures of a natural isoform of Hev b 2 to get insight into the key structural features that make it allergenic.

**Methods:** The structures were determined by molecular replacement methods. To analyze the role of carbohydrate moieties in IgE antibody binding and human basophil histamine release, the glycoallergen was enzymatically deglycosylated.

**Results:** The structures of Hev b 2 in two polymorphic crystals belonging to the monoclinic P21 and the tetragonal P41 space groups were solved at resolutions of 2.5 Å and 2.8 Å, respectively. Time-lapse automated video microscopy of basophils stimulated with Hev b 2 not only revealed basophil degranulation, but also provided the first evidence for the formation of structures that are similar to the extracellular traps that have been recently described for neutrophils, eosinophils and mast cells.

**Conclusion:** We present here the 3D-structure of the natural allergen Hev b 2 that shows evidence of three post-translational modifications, a pyroglutamic acid at the N-terminus and two glycosylation sites, one at Asn 27 and the second at Asn 314. These

modifications form a patch on the molecule surface that we propose to be the binding site for IgEs. Our immunological experiments and docking simulations confirm that glycan moieties on Hev b 2 are the most important allergenic IgE epitope.

## Capsule Summary

The 3D-structure of the natural glycoallergen Hev b 2 is reported. Human basophil histamine release and the formation of structures that are similar to the extracellular traps described for other innate cells are also shown.

## Key words

Basophils, extracellular-traps, glycoallergen, glucanase, Hev b 2, latex, 3D-structure.

## Abbreviations used

AU: asymmetric unit

CCD: cross-reactive carbohydrate determinant

ETs: extracellular traps

HWC: health care worker

NRL: natural rubber latex

PRP, pathogenesis-related proteins

pGlu: pyroglutamic acid

SB: spine bifida;

## INTRODUCTION

Type I IgE-mediated natural rubber latex (NRL) hypersensitivity has been studied in detail in the US and the European community over the past two decades, and it continues to be an important occupational health problem.<sup>1-3</sup> The prevalence of IgE-mediated NRL allergy among healthcare workers (HCW) has been estimated to be 3 to 17%, but it is higher in individuals with spina bifida (SB) and in those who have had multiple surgeries.<sup>4-5</sup> These have been identified as the main risk groups. In less-industrialized countries, NRL allergic sensitization is a serious clinical problem<sup>6</sup>, although for some of them its prevalence is not documented in the literature. Previous reports have identified the  $\beta$ -1,3-glucanase (Hev b 2) as a relevant latex allergen that is recognized by IgEs in patients suffering from latex hypersensitivity type I.<sup>7-8</sup> It has also been implicated in serological cross-reactivity between pollens, vegetable foods and insect venoms.<sup>9-10</sup> In luteal extracts from *H. brasiliensis* latex,  $\beta$ -1,3-glucanase exists as two basic isozymes that are N-glycosylated differently.<sup>11</sup> We recently reported the carbohydrate content and monosaccharide composition for these two isoforms. Isoforms I and II contained 20% (w/w) and 6% (w/w) carbohydrate content, respectively. The first one included N-acetyl-glucosamine, N-acetyl-galactosamine, fucose and galactose residues as the main monosaccharides, whereas isoform II presented N-acetyl-glucosamine, fucose, mannose and xylose.<sup>12</sup> Recent evidence has demonstrated that allergens with complex N-glycans containing  $\alpha$ -1,2-L-fucose and  $\beta$ -1,2-D-xylose are recognized by IgEs,<sup>13-15</sup> and are prone to extensive cross-reactivity against carbohydrate determinants (CCDs) from unrelated sources.<sup>16-18</sup> Nonetheless, the role of N-glycan-specific IgEs in allergic reactions is still a matter of debate. Moreover the release of histamine from basophils and mast cells that plays a central role in type I hypersensitivity<sup>19-21</sup> and in parasitic infections<sup>22</sup> is also a complex

biochemical process, but little information about the histamine-releasing activity of such CCDs is available. Few histamine-release studies have shown that the carbohydrate moieties of glycoallergens could trigger basophil and mast cell degranulation, suggesting that these sugars might indeed be biologically active in the allergic response.<sup>23-25</sup> However, there have been no reports on the 3D structures of natural glycoallergens from plants thus far,<sup>26-27</sup> perhaps because they would require the purification of the glycosylated isoforms, whose attached oligosaccharides can negatively influence the solubility and crystallizability of the proteins. In this work, we report the molecular structure of the natural glycosylated isoform II of Hev b 2,  $\beta$ -1,3-glucanase from *H. brasiliensis*, in two polymorphic crystals. Electron density maps allowed the identification of three post-translational modifications located on one side of the molecule. In addition, time-lapse automated video microscopy of basophils stimulated with Hev b 2 unexpectedly provided the first evidence for the formation of structures similar to the extracellular traps described for neutrophils<sup>28-29</sup>, eosinophils<sup>30</sup> and mast cells.<sup>31</sup> Our results, interpreted in the light of immunological and structural analyses, imply that the carbohydrate moieties on the surface of Hev b 2 constitute the major epitope recognized by IgE in the sera of allergic patients.

## METHODS

### Structure determination

The diffraction data of the two Hev b 2 polymorphic crystals obtained as described were reprocessed and scaled with MOSFLM<sup>32</sup> and SCALE<sup>33</sup>, respectively. Initial phases for the P21 crystal were determined by molecular replacement methods using the atomic coordinates of recombinant banana  $\beta$ -1,3 glucanase<sup>27</sup> (PDB code 2CYG) with which it shares 60% sequence identity and the program Phaser<sup>33</sup>. Structure refinement was done with CNS.<sup>34</sup> At the initial stages of refinement, the non-crystallographic symmetry (NCS) constraints were applied. Subsequently, the constraints were substituted by NCS restraints. Iterative cycles of refinement and manual rebuilding in Coot<sup>35</sup> were performed. At the final stages of structure refinement, NCS restraints were removed from the protocol. Carbohydrate and solvent molecules were located on the basis of electron density and suitable interactions. A Hev b 2 monomer of the P21 model was used for the molecular replacement of the protein crystallized in the space group P41. For refinement the same protocol described above was used. Final structures satisfied the PROCHECK<sup>36</sup> criteria at corresponding resolutions. All molecular graphics representations were drawn with Pymol.<sup>37</sup>

### Structure analysis

Molecular surfaces were calculated by the PISA service<sup>38</sup> with a solvent probe radius of 1.4 Å. A standard 2.0 Å Stern layer was used to exclude ions from the molecular surface. Automatic docking studies were performed by means of Hex<sup>39</sup> and PatchDock + FireDock<sup>40</sup> programs choosing the option antibody-antigen complex type. Linear B-cell epitopes were predicted by ABCpred<sup>41</sup> or LEPD<sup>42</sup> servers. Multiple Sequence



alignment of *H. brasiliensis*  $\beta$ -1,3-glucanases was created with ClustalW<sup>43</sup> and the graphic representation prepared using BioEdit.<sup>44</sup>

#### Analysis of the N-linked glycan structures

The N-linked oligosaccharides from denatured Hev b 2 were released by digestion with N-glycosidase F from *Chryseobacterium meningosepticum*. Glycans were labeled with 2-aminobenzamide utilizing the Signal 2AB labeling kit according to the manufacturer's specifications. Labeled glycans were separated by HPLC with a GlycoSep N column utilizing a gradient with acetonitrile and 250 mmol/L ammonium formate pH 4.4, as described previously.<sup>45</sup> Separated glycans were detected in a fluorescence detector with an excitation wavelength of 330 nm and an emission of 420 nm.

#### Direct ELISA Assay

ELISA experiments were carried out in 96-well Nunc Maxisorp microliter plates. Wells were coated with 100  $\mu$ L of allergens in PBS ( $\mu$ g/mL) for 1 hour at 37 °C. After washing with PBS/0.1 % (v/v) Tween-20, plates were blocked with PBS/0.5% (w/v) gelatine during 2 hours at 37°C. Sera of allergic donors were diluted 1:10 and 100  $\mu$ L were added to the wells, the plates were then incubated for 3 hours at 37 °C. Five sera from non-allergic voluntary donors were used as control. The subsequent steps included the addition of biotinylated anti-human IgE at a 1:1000 dilution to the well, and incubation for 1 hour at 37 °C. The enzyme conjugate streptavidin peroxidase (1:2000) was added and incubated for 1 hour at 37°C. The peroxidase reaction was developed

using fresh ortho-phenylene diamine and read at 490 nm with the Elx 808 Ultra Microplate Reader. Each absorbance value was calculated as the mean of three independent determinations.

#### Deglycosylation treatment

Remotion of oligosaccharides without denaturation of the Hev b 2 glycoprotein was performed with the enzymatic deglycosylation N-DEGLY kit (Sigma, St. Louis, MO) according to the manufacturer's specifications. To assess the extent of deglycosylation we determined the molecular mass of Hev b 2 by Bruker MALDI-TOF and the native state of this allergen was verified by means of the protein activity with the dinitrosalicylic acid (DNS) method.<sup>46</sup>

#### Basophil histamine release assay

We isolated human basophils from venous blood from non-atopic donors as previously described.<sup>47</sup> The basophil number was assessed by counting in a Neubauer haemocytometer after 5 minutes of metachromatic staining with 0.5% o-toluidine blue in Tris-HCl pH 6.0. Basophils ( $1 \times 10^5$  cells per tube) were incubated for 2 hours at 37 °C with specific IgE from allergic sera, before being challenged with glycosylated and deglycosylated Hev b 2, Hev b 6.02, and 5  $\mu\text{mol/L}$  of calcium ionophore A23187 for 30 minutes at 37 °C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. The supernatant and cell pellets were separated by centrifugation at 3,000g for 5 minutes at 4 °C. Histamine release was measured in cell pellets and supernatant by an automated fluorometric method previously described.<sup>48</sup> The percentage of histamine release for the different allergens

was determined from the total histamine content from pellet and supernatant tubes. The net histamine release due to each allergen was calculated by subtracting the spontaneous release. Each value was calculated as the mean of three determinations.

#### In vitro confocal laser-scanning microscopy

Basophils were seeded on 35 mm glass bottom microwell dishes and subsequently stimulated with 75 ng/mL of Hev b 6.02, 15  $\mu$ g/mL glycosylated and deglycosylate Hev b 2. Over 13 minutes, time-lapse images were obtained every seven seconds with a Zeiss LSM510 confocal microscopy. For all the experiments, and before the stimulation with the allergens, we left the same period of time to verify that there was not spontaneous release of granules. Human albumin was used as a protein control. Images were acquired using a Zeiss Axiocam HR and LSM 5 Image examiner software.

## Results

Overall structural features of Hev b 2.

Hev b 2 is a basic  $\beta$ -1,3 glucanase that belongs to the glycosyl hydrolase family 17 (GH17). The structures of Hev b 2 in two polymorphic crystals belonging to the monoclinic P21 and the tetragonal P41 space groups were solved using molecular replacement methods at resolutions of 2.5 and 2.8 Å, respectively (see Figure 1A and 1B). Data collection and refinement statistics are summarized in the online repository Table E1. The mature natural protein purified from *H. brasiliensis* clone GV42 consists of 316 residues and was identified among the twelve non-redundant sequences that have been deposited into Gen Bank with the accession code ABN09655.1. Primary structure analysis suggested one potential site for N-glycosylation at Asn 27, and our previous biochemical studies indicated that ~6% (w/w) of the molecular mass can be attributed to the carbohydrates, which matches with ~14 monosaccharide units. Like other hydrolases, Hev b 2 adopts the canonical TIM-barrel structure with a central deep groove along the full length of the upper surface of the molecule (Figure 2A). A structural comparison between Hev b 2 and banana glucanase showed minor variations, with an average RMSD of 0.75 Å. The most notable difference was the insertion of a  $\Omega$ -loop, with the protruding Arg 100, that connects the fourth  $\beta$ -strand with the fourth  $\alpha$ -helix (residues 96-102). There are two cis-peptides in the structure, involving residues Pro 145 and Pro 294, which are located in solvent exposed loops. A third, non-proline cis-peptide between Phe 284 and Ala 285 is found at the bottom of the groove that crosses the structure. N-glycosylation at Asn 27 was evident from electron density maps of the P21 crystal, but the number of sugars modeled in each of the four monomers was different. In monomer c, a branched ManFucGlcNAc<sub>2</sub> tetrasaccharide could be modeled into the

electron density (Fig 3, C). The oligosaccharides attached to the other three monomers were smaller: a single GlcNAc monosaccharide was fitted in monomer a, whereas GlcNAc<sub>2</sub> disaccharide and a ManGlcNAc<sub>2</sub> trisaccharide chains were defined in monomer b and d, respectively. In the P41 cell, we were able to model a single GlcNAc at Asn 27 of monomer b'. Surprisingly, during model building and refinement, we observed a clear excess of electron density at Asn 314 (Figure 3C), which is closed by the C-terminus. At this residue, we could fit a single GlcNAc into the electron density for two monomers in the P21 (c and d) and P41 (b' and d') crystals. Thus, a total of twelve monosaccharides were assigned in the P21 AU, and only three sugar units in the P41 AU. We note that Asn314 was not predicted by the NetNGlyc<sup>49</sup> or GlyProt<sup>50</sup> servers as a N-glycosylation site. In addition, we also determined the N-linked glycan structure that was released by enzymatic digestion and the results indicated that the branched GlcNAcMan<sub>5</sub>XylFucGlcNAc<sub>2</sub> deca-saccharide is one of the oligosaccharide structures of Hev b 2, which has been detected in other plant glycoproteins<sup>51</sup>. However, we could only assign a branched ManFucGlcNAc<sub>2</sub> tetra-saccharide in monomer c of the P21 crystal. Finally, another post-translational modification that was distinguished clearly in both structures was the lactamic ring of pyroglutamic acid (pGlu), positioned in the N-terminus (Figure 3B). All these modifications form a patch of ~250 Å<sup>2</sup> on one side of the molecule that could be a region for interaction with IgE antibodies.

#### Potential IgE-binding epitopes in Hev b 2

The deglycosylated and glycosylated isoforms II of Hev b 2 were analyzed by ELISA,

using 19 sera from symptomatic latex-allergic patients, to determine the contributions of the carbohydrate moieties to the Hev b 2-IgE interactions. The cutoff value (mean OD value + 3 SD) of the binding of five sera from non-allergic control subjects to Hev b 2 was  $0.29 \text{ Å} \pm 0.02$ . As expected, all sera from latex-allergic patients recognized glycosylated protein, whereas the deglycosylated form failed to show significant binding to IgE compared to the control. Nevertheless, the reactivity of IgE to deglycosylated Hev b 2 did not decay to the control level in two sera (Figure 4). These results agree with other published data in which a glycoepitope and/or a combined IgE-binding site, composed by peptidic and carbohydrate regions, is conceivable.<sup>52-54</sup> Therefore, we carried out automatic docking studies using the three-dimensional structures of the human IgE-derived Fab fragments specific for lactoglobulin<sup>55</sup> and Phl p 2<sup>56</sup> to obtain information about the particular way in which IgE antibodies may recognize carbohydrate on Hev b 2. The ten best-scored models, generated by Hex<sup>39</sup> and PatchDock + FireDock<sup>40</sup>, gave similar solutions predicting two different putative binding epitopes on the allergen surface. As expected, the main putative IgE-binding site on Hev b 2 was located around the post-transductional modification patch (Figure 5A). This suggested that the allergen-antibody complex could be stabilized by the numerous hydrogen bonds and ion pairs established between the CDRs of both the light and heavy chains of the antibodies and the glycan moieties, together with some protein-protein interactions (Figure 5C). The docking models allowed the identification of another potential epitope zone on the allergen that included five different, continuous, IgE-binding peptides to generate a potential conformational epitope (Figure 5B). These small sequences consist of several charged amino acid residues located in the fourth

helix, the  $\Omega$ -loop, and the loops containing residues Asp 35, Asn 37, Gln 38, Ser 58, Asn 59, Leu 60, Lys 291, and Gln 293 (Figure 5D). All these fragments overlapped with the linear B-cell epitopes predicted by different servers (data not shown).

Human basophil activation triggered by glycosylated Hev b 2

We investigated the ability of the Hev b 2 glycoallergen and its deglycosylated form to induce histamine release from basophil granules. To enhance the purity, we centrifuged the cells a second time over the appropriate discontinuous gradient of Percoll. The isolated human basophils were viable and appeared morphologically normal. The cells that were purified from non-allergic donors were passively sensitized with the sera from each of the latex-allergic patients (9, 12 and 16) that had been previously tested by ELISA (Figure 4). We calculated the mean spontaneous histamine release from the freshly purified peripheral blood basophils to be  $12 \pm 3\%$  of the total histamine. The percentages of the histamine released on induction by the glycosylated and deglycosylated allergens and the major allergen hevein<sup>57</sup> (Hev b 6.02) are shown in Table I. These values were obtained after subtraction of those caused by spontaneous release. Histamine was secreted more significantly with natural Hev b 2 than with its desglycosylated form. In contrast, the amount of histamine released by the major allergen Hev b 6.02 was approximately twofold higher than that released by glycosylated Hev b 2. In all cases, we observed that histamine secretion was dependent on the concentration of the allergen. These results confirm that N-glycans contribute to the allergenic activity of Hev b 2. We used time-lapse video microscopy with a Zeiss LSM 510 laser-scanning microscope to monitor the basophil degranulation process for 13 minutes after stimulation with the allergen. The number of granules released after stimulation with the desglycosylated protein was slightly higher than the spontaneous

release (Figure 6 B and see Movie E2 in the Online Repository). In contrast, a strong and explosive secretion, of the stored granules, occurred 39 seconds after stimulation with the glycosylated allergen or Hev b 6.02 (see Figure 6A, 6C, Movie E1 and Movie E3 in the Online Repository). Surprisingly, we observed the formation of extracellular-traps like structures (ETs) as early as 23 seconds after challenge with the glycosylated allergen. These ETs have recently been described for neutrophils<sup>28</sup>, eosinophils<sup>30</sup> and mast cells<sup>31</sup>, and have been implicated in the innate immune response to bacterial, fungal and parasitic infections.<sup>58</sup>

## *DISCUSSION*

N-linked glycan moieties of some glycoproteins from NRL, as well as those from vegetables, fruits, pollens and insect venoms, have been demonstrated to be involved in IgE-mediated allergy and cross reactivity.<sup>16-18</sup> To our knowledge, no 3D structures of purified natural glycoallergens have been solved to date. Here we present the first crystal structures of a natural latex glycoallergen, Hev b 2, in two polymorphic crystals. In both the monoclinic and the tetragonal lattices, the AUs show a tetramer assembly, but the quaternary structures are different. The quaternary structures are composed of the same conserved dimer, which has a significant amount of buried surface area at the interface that is stabilized by more interactions when compared to the rest of the assembly. This dimer is a stable association, and was detected only in the crystal forms and without doubt; we believe that it plays an important role in the mechanical stability of the whole crystal packing. The overall fold of the natural form of Hev b 2 is the typical  $(\beta/\alpha)_8$ -barrel, highly conserved in the GH17 family; nonetheless, it has unique structural features. First, Hev b 2 contains an N-terminal pGlu, which is also found in numerous other pathogenesis-related proteins (PRP).<sup>59</sup> The function of this residue in



plant PRP is not clear, but in mammals it is involved in resistance towards proteolysis and in protein-receptor interactions.<sup>60</sup> Second, the structure of Hev b 2 has a prominent  $\Omega$ -loop located at the protein surface that is important for the association of the monomers in the AU. It is worth noting that the side chain of Arg100 is highly exposed and is therefore a possible binding site for IgE. Interestingly, this position is occupied by Gly in most of the other glucanases from *H. brasiliensis*, which suggests that antibodies recognize them differently. Finally, we observed two N-glycosylation sites in Hev b 2. The second site was localized at the sequon Asn 314-Phe 315-Ser 316 at the C-terminus. This is not conserved in most of the *H. brasiliensis* glucanase sequences, which predominantly present the Asn 314-Phe 315-Gly 316 sequon. This additional N-glycosylation site may give rise to a multivalent allergen, possibly increasing the allergenic potency. A Lewis X-type, N-linked branch was identified at Asn 27 on Hev b 2, containing the  $\alpha$ -1,3-Fuc and  $\beta$ 1,2-Xyl residues. The characteristic arrangement of residues found in our sugar structure differs slightly from the highly immunogenic epitope of the Lewis X oligosaccharide, which has the fucose residue  $\alpha$ 1,3-linked to Asn-GalNAc instead of the  $\alpha$ 1,3-fucosylation in Asn-GluNAc. This motif has been identified in tumor antigens,<sup>61</sup> helminthes,<sup>62</sup> insect poison proteins,<sup>15</sup> and in several plant glycoallergens.<sup>17</sup> Our modeling of the interactions between Hev b 2 and IgE allowed us to confirm the presence of an additional binding site located on the glycan moieties. This result is compatible with our immunological results from the IgE-binding ELISA assay and the results of the histamine release obtained with the deglycosylated and glycosylated forms of Hev b 2, which indicate that the carbohydrates are the relevant immunogenic determinants, as has been found for other, unrelated glycoallergens.<sup>23-25</sup>

The most prominent finding of the present study is the formation of extracellular trap structures by basophils, similar to those described for other innate immunity cells in response to bacterial and parasite infections<sup>28-31, 57</sup>. In this work we report, for the first time, ETs-like structures that were observed only when sensitized basophils were stimulated with the glycosylated allergen. Recently, it was shown that Der p 2, a major house dust mite allergen with structural homology to the myeloid differentiation factor 2 (MD-2), was able to directly interact with the toll-like receptor (TLR) 4 complex, thereby facilitating signaling and showing an intrinsic adjuvant activity to the allergenicity.<sup>63</sup> In contrast, we presume that Hev b 2 oligosaccharides interact with the TLR4 complex as Lewis X-type ligands.<sup>64</sup> This can be explained by the structural homology that exists between the glycan moieties on Hev b 2 and the Lewis X motif, which may operate as a structural mimic or as a pathogen-associated molecular pattern (PAMs).<sup>65</sup> Here we suggest that the glycan moieties are likely to play a major role in the stimulation of the TLR4 complex and consequently in the formation of the ETs-like structures that were observed during the stimulation of the basophils with the glycoallergen. Nonetheless, this hypothesis has yet to be demonstrated. In this context, studies using extracts from *Aspergillus fumigatus*,<sup>66</sup> and the *Schistosoma mansoni* egg antigen have also shown that carbohydrates can induce a T helper type 2 (TH2) response. Therefore, the glycoallergens oligosaccharides could be a predominant target, both in the innate immunity and the humoral immune response and should be considered as an important part of the structural and immunochemical characterization. The structure of Hev b 2 presented here is the first of a natural glycosylated allergen that has clinical relevance to latex-allergy and to the cross-reactivity with other plant

glycoallergens and insect venoms. Our data also confirmed glycan moieties on Hev b 2 to be the most important allergenic IgE epitope and a possible elicitor of TLR4 stimulation.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We thank S.P. Rojas-Trejo and Z.V. Hernández from Biotechnology Institute, María T. Ramírez-Apan, A. Nieto-Camacho and G. Espinosa-Pérez from Chemistry Institute, UNAM, for technical assistance; and the secretary A. Cortés-Montes. G.M.-H. thanks Waters Co. (México) for providing the nanoUPLC for this work. We thank Vivian Stojanoff for her help during data collection. The X6A beam line and the National Synchrotron Light Source, Brookhaven National Laboratory, are funded by NIH/NIGMS under agreement GM-0080 and Energy under contract No. DE-AC02-98CH10886, respectively. This work was supported by DGAPA-UNAM (IN209506-3 to A.R.-R.), CONACYT (82947 to A.R.-R.) and doctoral scholarship PB/0197 from DGEP-UNAM.

## References

1. Smedly J, Jury A, Bendall H, Trew A, Coggon D. Prevalence and risk factors for latex allergy: a cross sectional study in a United Kingdom hospital. *Occup Environ Med* 1999;56:833-6.
2. Sinha A, Harrison PV. Latex glove allergy among hospital employees: a study in the north-west of England. *Occup Med* 1998;48:405-10.
3. Garabrant DH, Roth D, Parsad R, Ying G-S, Weiss J. et al. Latex sensitization in health care workers and in the US general population. *Am J Epidemiol* 2001;153:515-22.
4. Niggemann B, Buck D, Michael T, Wahn U. Latex provocation test in patients with spina bifida: Who is at risk of becoming symptomatic? *J Allergy Clin Immunol* 1998; 102:665-70.
5. Szépfalusi Z, Seidl R, Bernert G, Dietrich W, Spitzauer S, Urbanek R. Latex sensitization in spina bifida appears disease-associated. *J pediatr* 1999;134:344-8.
6. Miri S, Pourpak Z, Zarinara A, Heidarzade M, Kazemnejad A, Kardar G, et al. Prevalence of type I allergy to natural rubber latex and type IV allergy to latex and rubber additives in operating room staff with glove-related symptoms. *Allergy Asthm Proc* 2007; 28:557-63.
7. Sunderasan E, Hamzah S, Hamid S, Ward MA, Yeang HY, Cardosa MJ. Latex B-serum beta-1,3-glucanase (Hev b II) and a component of the microhelix (Hev b IV) are major latex allergens. *J Nat Rubb Res* 1995;10:82-99.
8. Alenius H, Kalkkinen N, Lukka M, Reunala T, Turjanmaa K, Mäkinen-Kiljunen S, et al. Protease from the rubber tree (*Hevea brasiliensis*) is a major latex allergen. *Clin Exp Allergy* 1995;24:659-65.

9. Palomares O, Villalba M, Quiralte J, Polo F, Rodríguez R. 1,3- $\beta$ -glucanases as candidates in latex-pollen-vegetable food cross-reactivity Clin Exp Allergy 2005;35:345-51.
10. Mahler V, Gutgesell C, Valenta R, Fuchs T. Natural rubber latex and hymenoptera venoms share immunoglobulin E-epitopes accounting for cross-reactive carbohydrate determinants. Clin Exp Allergy 2006;36:1446-56.
11. Churngchow N, Suntaro A, Wittsuwannakul R.  $\beta$ -1,3-Glucanase isozymes from the latex of *Hevea brasiliensis*. Phytochemistry 1995;39:505-9.
12. Fuentes-Silva D, Mendoza-Hernández G, Stojanoff V, Palomares LA, Zenteno E, Torres-Larios A, et al. Crystallization and identification of the glycosylated moieties of two isoforms of the main allergen Hev b 2 and preliminary X-ray analysis of two polymorphs of isoform II. Acta Crystallogr 2007;F63:787-91.
13. Fötisch K, Vieths S. N- and O-linked oligosaccharides of allergenic glycoproteins. Glycoconj J 2001;18:373-90.
14. van Ree R, Cabanes-Macheteau M, Akkerdaas J, Milazzo JP, Loutelier-Bourhis C, Rayon C, et al.  $\alpha$ -(1,2)-xylose and  $\alpha$ -(1,3)-fucose residues have a strong contribution in IgE binding to plant glycoallergens. J Biol Chem 2000;275: 11451-58.
15. Prenner C, Mach L, Glössl J, März L. The antigenicity of the carbohydrate moiety of an insect glycoprotein, honey-bee (*Apis mellifera*) venom phospholipase A2. The role of  $\alpha$ -1,3-fucosylation of asparagine-bound N-acetylglucosamine. Biochem J 1992;284:377-80.
16. Bonds RS, Midoro-Horiuti T, Goldblum R. A structural basis for food allergy: the role of cross-reactivity. Curr Opin Allergy Clin Immunol 2008;8:82-6.
17. Foetisch K, Westphal S, Lauer I, Retzek M, Altmann F, Kolarich D, et al.

Biological activity of IgE specific for cross-reactive carbohydrate determinants.

J Allergy Clin Immunol 2003;111:889-96.

18. Tretter V, Altmann F, Kubelka V, März L, Becker WM. Fucose  $\alpha$ 1,3-linked to the core region of glycoprotein N-glycans creates an important epitope for IgE from honeybee venom allergic individuals. Int Arch Allergy Immunol 1993;102:259-66.

19. Gauchat JF, Henchoz S, Mazzei G, Aubry JP, Brunner T, Blasey H, et al. Induction of human IgE synthesis in B cells by mast cells and basophils. Nature 1993;365:340-3.

20. Galli S, Nakae S, Tsai M. Mast cells in the development of adaptative immune responses. Nat Immunol 2005;6:135-42.

21. Sokol CL, Barton GM, Farr AG, Medzhitov RA. Mechanism for initiation of allergen-induced T helper type 2 responses. Nat Immunol 2007;9:310-8.

22. Min B, Prout M, Hu-Li J, Zhu J, Jankovic D, Morgan ES, et al. Basophils produce IL-4 and accumulate in tissue after infection with a TH2-inducing parasite. J Exp Med 2004;200:507-17.

23. Iacovacci P, Afferni C, Butteroni C, Pironi L, Puggioni EM, Orlandi A, et al. Comparison between the native glycosylated and the recombinant Cup a 1 allergen: role of carbohydrates in histamine release from basophils. Clin Exp Allergy 2002;32:1620-7.

24. Westphal S, Kolarich D, Foetisch K, Lauer I, Altmann F, Conti A, et al. Molecular characterization and allergenic activity of Lyc e 2 ( $\beta$ -fructofuranosidase), a glycosylated allergen of tomato. Eur J Biochem 2003;270:1327-37.

25. Batanero E, Crespo JF, Monsalve RI, Martín-Esteban M, Villalba M, Rodríguez R. IgE-binding and histamine-release capabilities of the main carbohydrate

- component isolated from the major allergen of olive tree pollen, Ole e 1. *J Allergy Clin Immunol* 1999;103:147-53.
26. Varghese JN, Garrett TP, Colman PM, Chen L, Høj PB, Fincher GB. Three-dimensional structure of two plant  $\beta$ -glucan endohydrolases with distinct substrate specificities. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1994;91:2785-9.
27. Receveur-Bréchet V, Czjzek M, Barre A, Roussel A, Peumans WJ, Van Damme EJ, et al. Crystal structure at 1.45-Å resolution of the major allergen endo $\beta$ -1,3-glucanase of banana as a molecular basis for the latex-fruit syndrome. *Proteins* 2006;63:235-42.
28. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* 2004;303:1532-5.
29. Guimarães-Costa AB, Nascimento MT, Froment GS, Soares RP, Morgado FN, Conceição-Silva F, et al. *Leishmania amazonensis* promastigotes induce and are killed by neutrophil extracellular traps. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009;106:6748-53.
30. Yousefi S, Gold JA, Andina N, Lee JJ, Kelly AM, Kozlowski E, et al. Catapult-like release of mitochondrial DNA by eosinophils contributes to antibacterial defense. *Nat Med* 2008;14:949-953.
31. von Köckritz-Blickwede M, Golmann O, Thulin P, Heinemann K, Norrby-Teglun A, Rhode M et al. Phagocytosis-independent antimicrobial activity of mast cells by means of extracellular trap formation. *Blood* 2008;111:3070-80.
32. Leslie, A.G. MOSFLM-recent changes and future developments. *CCP4 Newsletter on Protein Crystallographic* 1998;35:18-9.
33. Project, C.C. The CCP4 site: programs for protein crystallographic. *Acta Crystallogr* 1994;D 50:760-3.

34. Brünger AT, Adams PD, Clore GM, DeLano WL, Gros P, Grosse-Kunstleve RW, et al. Crystallography & NMR system: A new software suite for macromolecular structure determination. *Acta Crystallogr* 1998;D54:905-21.
35. Emsley P, Cowtan K. Coot: Model-Building Tools for Molecular Graphics. *Acta Crystallogr* 2004;D 60:2126-32.
36. Laskowski RA, MacArthur MW, Moss DS, Thornton JM. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J Appl Crystallogr* 1993;26:283-91.
37. DeLano, W.L. The PyMOL Molecular Graphics System. 2002.  
<http://www.pymol.org>.
38. Krissinel E, Henrick K. Inference of macromolecular assemblies from crystalline state. *J Mol Biol* 2007;372:774-97.
39. Ritchie DW, Kozakov D, Vajda S. Accelerating and focusing protein-protein docking correlations using multi-dimensional rotational FFT generating functions. *Bioinformatics* 2008;24:1865-73.
40. Schneidman-Duhovny D, Inbar Y, Nussinov R, Wolfson HJ. PatchDock and SymmDock: servers for rigid and symmetric docking. *Nucl Acids Res* 2005;33: W363-367.
41. Saha S, Raghava GPS. Antigenic sequences using Physico-chemical properties. In: Nicosia G, Cutello, V, Bently PJ, Timis J, editors. BcePred: Prediction of continuous B-Cell Epitopes. ICARIS; 2004. p. 197-204.
42. Chang, H.T. et al. A reinforced merging methodology for mapping unique peptide motifs in members of protein families. *BMC Bioinformatics* 2006;7.
43. Larkin. M.A. et al. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*



2007;23:2947-8.

44. Hall TA, BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucl Acids Symp Ser 1999;41:95-8.
45. Guile GR, Rudd PM, Wing DR, Dwek RA. In A Laboratory Guide to Glycoconjugate Analysis. In Jackson P, Clark DS, editors. HPLC strategies for profiling and sequencing oligosaccharides. Basel, Switzerland: Birkhäuser Verlag; 1997. p. 199-234.
46. Miller GL. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Anal Chem 1959;31:426-8.
47. Leonard EJ, Roberts RL, Skeel A. Purification of human blood basophils by single step isopycnic banding on Percoll. J Leukocyte Biol 1984;35:169-77.
48. Siraganian, R.P. An automated continuous-flow system for the extraction and fluorometric analysis of histamine. Anal Biochem 1974;57:383-94.
49. Gupta R, Jung E, Brunak S. Prediction of N-glycosylation sites in human proteins.2004. (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc>)
50. Bohne-Lang A, von der Lieth C-W. GlyProt: in silico glycosylation of proteins. Nucleic Acids Res 2005;33:W214-W219.
51. Wilson IB, Zeleny R, Kolarich D, Staudacher E, Stroop CJ, Kamerling JP, et al. Analysis of Asn-linked glycans from vegetable foodstuffs: widespread occurrence of Lewis a, core  $\beta$ -(1,3)-linked fucose and xylose substitutions. Glycobiology 2001;11:261-74.
52. Yagami T, Osuna H, Kouno M, Haishima Y, Nakamura A, Ikezawa Z. Significance of carbohydrate epitopes in a latex allergen with beta-1,3-glucanase activity. Int Arch Allergy Immunol 2002;129:27-37.

53. Kurup VP, Sussman GL, Yeang HY, Elms N, Breiteneder H, Arif SA, et al. Specific IgE response to purified and recombinant allergens in latex allergy. *Clin Mol Allergy* 2005;3.
54. Raulf-Heimsoth M, Rihs HP, Kozynek P, Cremer R, Gaspar A, Pires G, et al. Quantitative analysis of immunoglobulin E reactivity profiles in patients allergic or sensitized to natural rubber latex (*Hevea brasiliensis*). *Clin Exp Allergy* 2007;37:1657-67.
55. Niemi M, Jylh   S, Laukkanen ML, S  derlund H, Mäkinen-Kiljunen S, Kallio J, et al. Molecular interactions between a recombinant IgE antibody and the  $\beta$ -lactoglobulin allergen. *Structure* 2007;15:1413-21.
56. Padavattan S, Flicker S, Schirmer T, Madritsch C, Randow S, Reese G, et al. High-affinity IgE recognition of a conformational epitope of the major respiratory allergen Phl p 2 as revealed by X-ray crystallography. *J. Immunol* 2009;182:2141-51.
57. Reyes-López CA, Hernández-Santoyo A, Pedraza-Escalona M, Mendoza G, Hernández-Arana A, Rodríguez-Romero A. Insights into a conformational epitope of Hev b 6.02 (hevein). *Biochem Biophys Res Commun* 2004;314:123-30.
58. Brinkmann V, Zychlinsky A. Beneficial suicide: Why neutrophils die to make NETs. *Nat Rev Microbiol* 2007;5:577-82.
59. Rep M, Dekker HL, Vossen JH, de Boer AD, Houterman PM, Speijer D, et al. Mass spectrometric identification of isoforms of PR proteins in xylem sap of fungus-infected tomato. *Plant Physiol* 2002;130:904-17.
60. Morty RE, Bulau p, Pell   R, Wilk S, Abe K. Pyroglutamyl peptidase type I from *Trypanosoma brucei*: a new virulence factor from African trypanosomes that

deblocks regulatory peptides in the plasma of infected hosts. *Biochem. J* 2006;394:635-45.

61. Sakamoto J, Furukawa K, Cordon-cardo C, Yin BW, Rettig WJ, Oettgen HF, et al. Expression of Lewis<sup>a</sup>, Lewis<sup>b</sup>, X and Y blood group antigens in human colonic tumors and normal tissue and in human tumor-derived cell lines. *Cancer Res* 1986;46:1553-61.

62. Wuhrer M, Balog CI, Catalina MI, Jones FM, Schramm G, Haas H, et al. IPSE/alpha-1, a major secretory glycoprotein antigen from schistosome eggs, expresses the Lewis X motif on core-difucosylated N-glycans. *FEBS J* 2006;273:2276-92.

63. Trompette A, Divanovic S, Visintin A, Blanchard C, Hegde RS, Madan R, et al. Allergenicity resulting from functional mimicry of a Toll-like receptor complex protein. *Nature* 2009;457:585-8.

64. Thomas PG, Carter MR, Atochina O, Da'Dara AA, Piskorska D, McGuire E, et al. Maturation of dendritic cell 2 phenotype by helminth glycan uses a toll-like receptor 4-dependent mechanism. *J Immunol* 2003;171:5837-41.

65. Miller SI, Ernst RK, Bader MW. LPS, TLR4 and infectious disease diversity. *Nature Rev* 2005;3:36-46.

66. Yamashita Y, Okano M, Yoshino T, Hattori H, Yamamoto T, Watanabe T, et al. Carbohydrates expressed on *Aspergillus fumigatus* induce in vivo allergic Th2-type response. *Clin Exp Allergy* 2002;32:776-82.

677 **Table I.** Induction of the basophil histamine release with the glycosylated  
 678 and deglycosylated forms of Hev b 2.

Patient	Allergen ( $\mu\text{g/ml.}$ )	Histamine release			
		Hev b 2	Deglyco-Hev b 2	Hev b 6.02	
		Histamine (%)	Histamine (%)	( $\mu\text{g/ml.}$ )	Histamine (%)
P9	2.5	17 $\pm$ 2	6 $\pm$ 2	2.5	28 $\pm$ 3
	5	36 $\pm$ 2	11 $\pm$ 4	5	53 $\pm$ 3
P12	2.5	17 $\pm$ 8	5 $\pm$ 3	2.5	21 $\pm$ 2
	5	33 $\pm$ 8	9 $\pm$ 3	5	38 $\pm$ 3
P16	2.5	19 $\pm$ 2	5 $\pm$ 2	2.5	ND
	5	27 $\pm$ 3	7 $\pm$ 1	5	ND

679

680

681

682

683

684

685

686

687

688

691 **Figure legends**

692 **Figure 1.** Quaternary structure adopted by the polymorphs of natural Hev b 2. **A,**  
693 Ribbon diagram of the tetrahedric AU arrangement in the monoclinic  $P2_1$  crystal. The  
694 tetramer consists of monomers **a** (green), **b** (gold), **c** (violet) and **d** (cyan). **B,** Ribbon  
695 diagram of the  $P4_1$  AU that consists of a planar square assembly of two similar dimers  
696 **a+d** shown in **A**.

697 **Figure 2.** Dimer association. **A,** Superposition of the  $P2_1$  dimer assembly **a+d** (green),  
698 with dimers **a'+b'** (red) and **c'+d'** (gold) of the  $P4_1$  lattice. **B,** Interactions at the  
699 symmetrical dimer interface. The twofold axis (in black), salt bridges and hydrogen  
700 bonds (dotted lines) are presented. Residues implicated in these interactions are labeled  
701 and colored according to the monomers where they belong.

702 **Figure 3.** **A,** Ribbon representation of a biological unit of Hev b 2 (Monomer **c** of the  
703 Figure 1A). **B, C,**  $2Fo-Fc$  maps contoured at  $1.0\sigma$  show the pGlu1 and the carbohydrate  
704 moieties at the two glycosylation sites, respectively. **D,** Sequence alignment of *H.*  
705 *brasiliensis*  $\beta$ -1,3-glucanases. Residues at position 100 and 316 are indicated with an  
706 asterisk (\*), which can influence allergenic potency.

707 **Figure 4.** Enzymatic *N*-deglycosylation of Hev b 2 revealed that glycan moieties  
708 produced a decay of the allergen-specific IgE-binding. Black bars indicate IgE reactivity  
709 against the glycosylated Hev b 2, whereas white bars show the IgE-binding for its  
710 deglycosylated form. White bar **c** is the control. For these ELISA experiments sera from  
711 latex-allergic subjects were used. Data are means of triplicate experiments.

712 **Figure 5.** Ribbon representation of two Hev b 2-IgE docking models. **A**, Lactoglobulin-  
713 IgE/Hev b 2 complex docked in the carbohydrates region. **B**, Phl p 2-IgE/Hev b 2  
714 complex docked in a second conformational epitope. **C**, Detail view of the plausible  
715 interactions within the Hev b 2-IgE complex shown in **A**. **D**, Close-up view of the  
716 binding site shown in **B**.

717

718 **Figure 6. A**, Confocal images of human basophil cells at different times upon  
719 stimulation with glycosylated Hev b 2. **A1**, Immediately after stimulus. **A2**, After 29  
720 seconds the liberation of granules (white arrows) and ETs-like structures (black arrows)  
721 were observed. **A3**, After 39 seconds only ETs-like structures were visualized. **B, C**,  
722 Basophils stimulated with deglycosylated Hev b 2 and Hev b 6.02, respectively.

723

Figure No.1  
[Click here to download high resolution image](#)

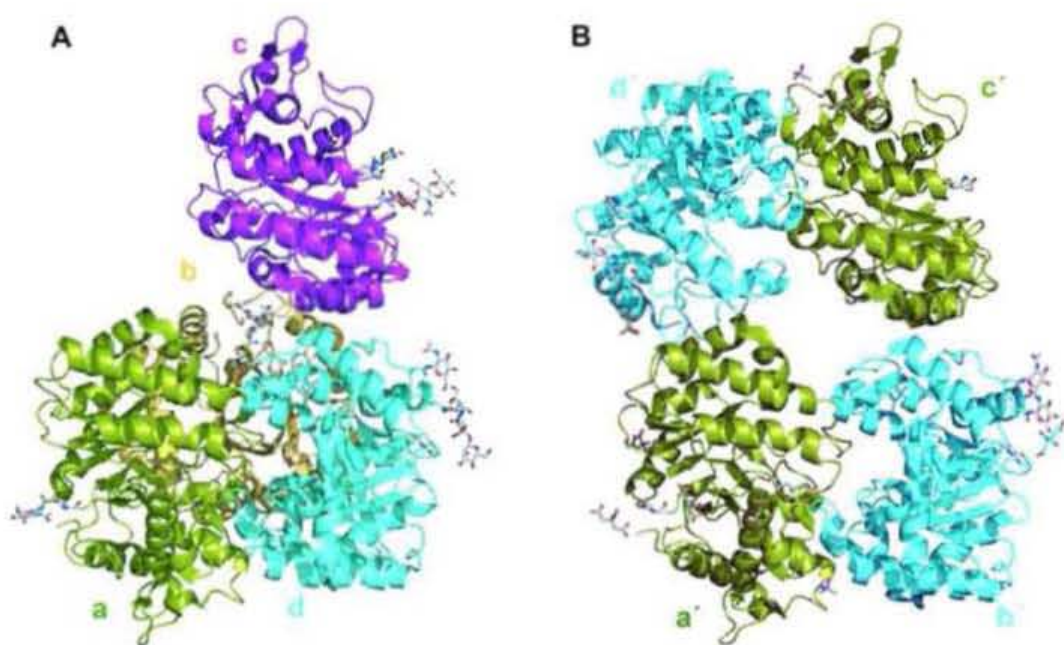
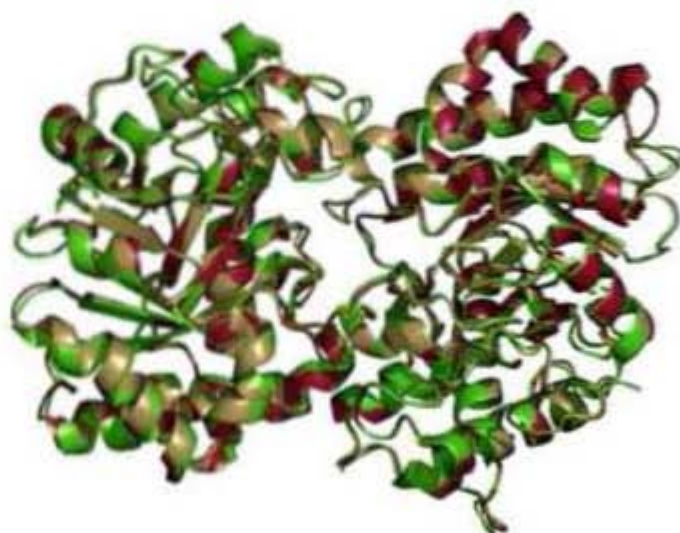
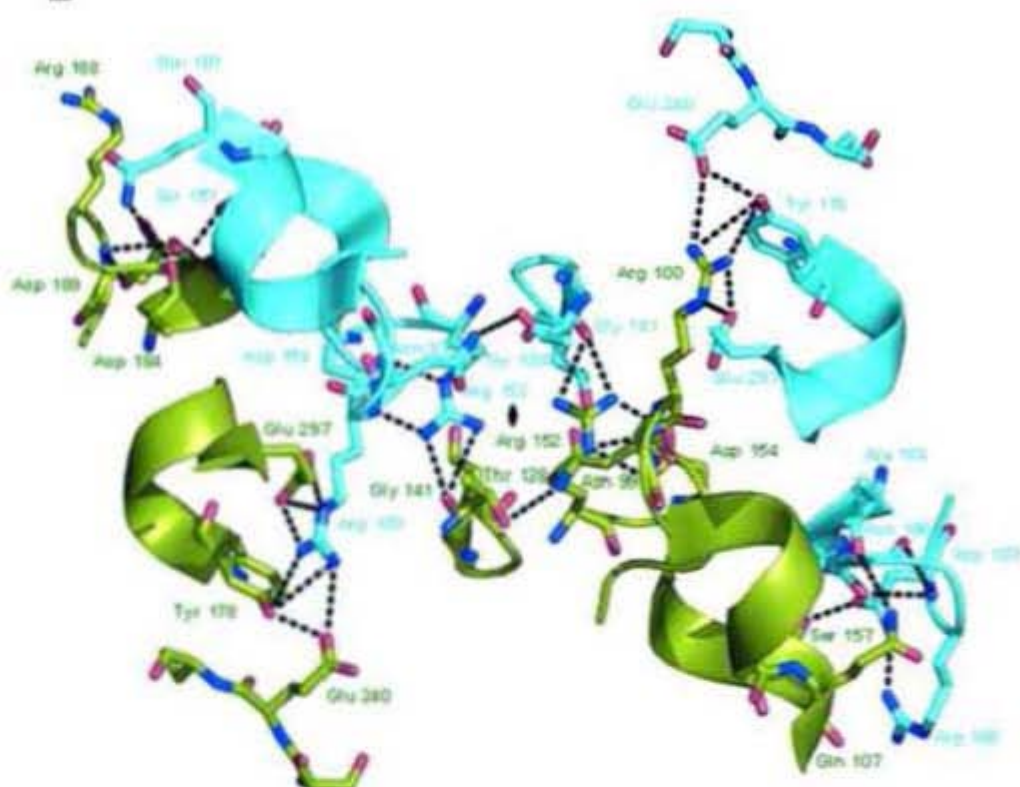


Figure No.2  
[Click here to download high resolution image](#)

A



B





**Figure No.3**  
[Click here to download high resolution image](#)

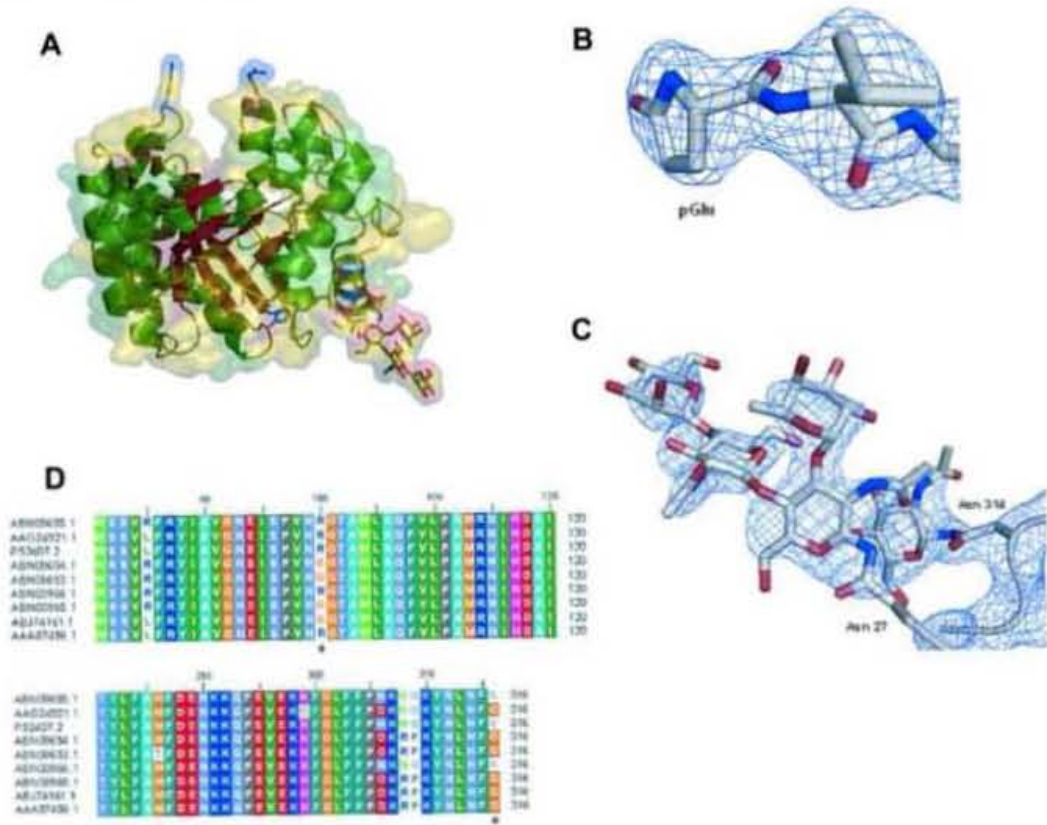


Figure No.4  
[Click here to download high resolution image](#)

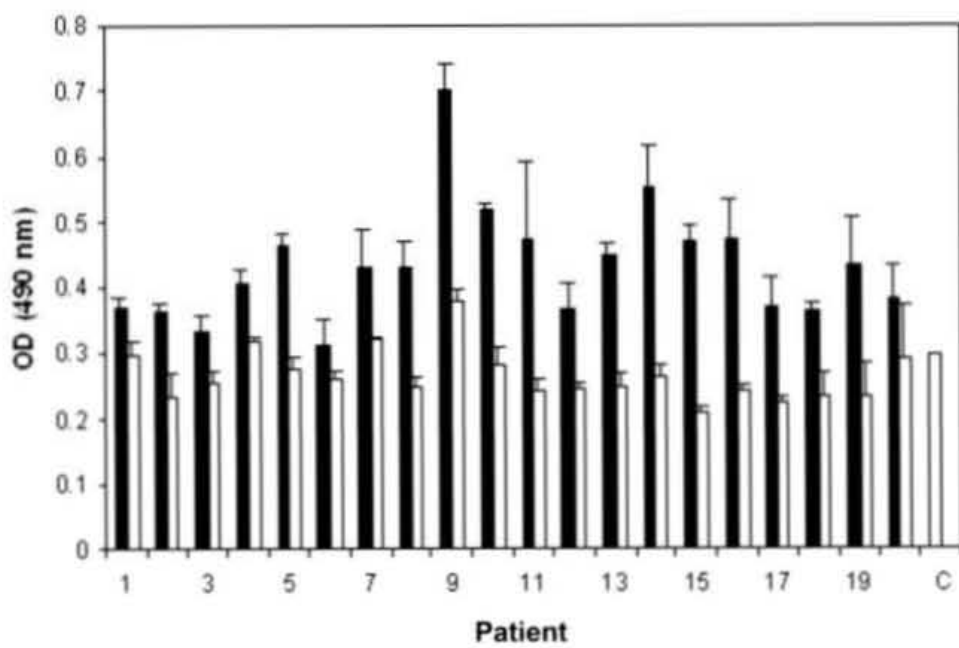
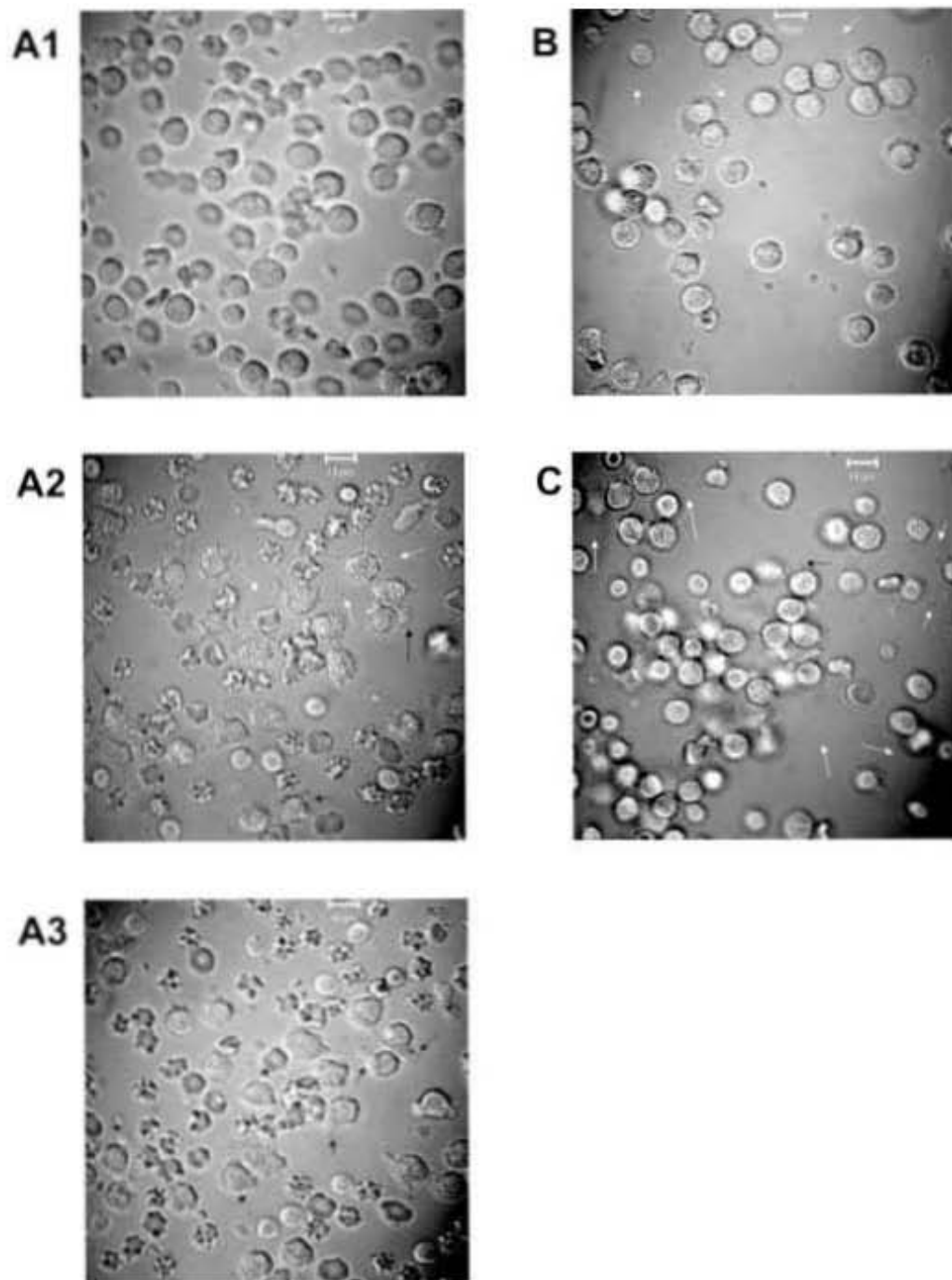




Figure No.6  
[Click here to download high resolution image](#)



1 **ONLINE REPOSITORY**

2

3 **TITLE PAGE**

4

5 **Original Article**

6

7 **Structural insights into the recognition of the natural glycoallergen Hev b 2 by human**  
8 **basophils**

9

10 Deyanira Fuentes-Silva, PhD<sup>a</sup>, Guillermo Mendoza-Hernández, PhD<sup>b</sup>, Samira Muñoz-Cruz,  
11 PhD<sup>c</sup>, Laura A. Palomares, PhD<sup>d</sup>, Lilian Yépez-Mulia, PhD<sup>e</sup> & Adela Rodríguez-Romero,  
12 PhD<sup>f</sup>

13

14 <sup>a</sup>Instituto de Química, <sup>b</sup>Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México,  
15 Circuito Exterior, Cd. Universitaria, Coyoacán, México DF, 04510.

16 <sup>c</sup>UMAE-Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS, Av.

17 Cuauhtemoc 330, Col. Doctores, México D.F. 06725.

18 <sup>d</sup>Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado postal  
19 510-3, Cuernavaca, Mor. 62250, México.

20

21 **Corresponding author**

22 Adela Rodríguez-Romero, PhD

41 **Table E1.** Data collection and refinement statistics

	P2 <sub>1</sub> crystal	P4 <sub>1</sub> crystal
<b>Data collection</b>		
Cell dimensions		
<i>a, b, c</i> (Å)	87, 89.7, 101.4	150, 150, 77.3
$\alpha, \beta, \gamma$ (°)	90, 113.5, 90	90, 90, 90
Resolution (Å)	26-2.5 (2.64-2.5)*	47-2.8 (2.95-2.8)
<i>R</i> <sub>merge</sub> <sup>†</sup>	8.3 (15.9)	8.5 (35.6)
<i>I</i> / $\sigma$ <i>I</i>	14.9 (4.5)	17 (3.9)
Completeness (%)	96.7 (81.6)	82.1 (81.6)
Redundancy	4.0 (2.8)	4.7 (4.7)
<b>Refinement</b>		
Resolution (Å)	26-2.5	47-2.8
Reflections Working set	48026 (2425)	35192 (1786)
(test set)		
<i>R</i> <sub>work</sub> / <i>R</i> <sub>free</sub> <sup>‡</sup>	23.8/28.4	21.8/25.5
No. atoms		
Protein	9988	9988
Sugars	158	42
PEG <sup>§</sup> /FLC <sup>§</sup> /CAC <sup>††</sup>	14/0/0	0/91/10
Waters	47	95
B-factors (Å <sup>2</sup> )		

Protein	40.9	47.9
Sugar	72.5	82.2
PEG/FLC/CAC	70.1/0/0	0/87.7/78.1
Water	33.3	35.8
R.m.s deviations		
Bond lengths (Å)	0.007	0.007
Bond angles (°)	1.4	1.4

42

43 \*Highest resolution shell is shown in parenthesis.

44  $R_{\text{merge}} = \frac{\sum_{hkl} \sum_i |I_i(hkl) - \langle I(hkl) \rangle|}{\sum_{hkl} \sum_i I_i(hkl)}$ 45 <sup>a</sup>PEG, <sup>b</sup>FLC, <sup>c</sup>CAC correspond to the three-letter code that the PDB uses for  
46 di(hydroxyethyl) ether, citrate and cacodylate ions, respectively.

47

48

49

50

51

52

53

..

58 **Movie legends**

59 **Movie E1.**

60 Visualization of the human basophil degranulation event, and the *in vitro* formation of ETs-  
61 like structures stimulated with the natural latex-allergen Hev b 2. Cells were challenged  
62 with 0.15 µg/mL the glycosylated allergen. The degranulation event and the ETs-like  
63 structures formation were visualized by real-time microscopy.

64

65 **Movie E2.**

66 Human basophil granule release, *in vitro*, after stimulation with the deglycosylated Hev b 2.  
67 Cells stimulated with 0.15 µg/mL of the glycosylated allergen were monitored by real-time  
68 microscopy. Few granules were released and ETs-like structures were not observed during  
69 the experiment.

70

71 **Movie E3.**

72 Human basophil granule release, *in vitro*, after stimulation with the major latex-allergen  
73 Hev b 6.02. Cells were stimulated with 75 ng/mL of hevein and the immediate granule  
74 release was observed by real-time microscopy.



*RESULTADOS*

*DISCUSIÓN*



## **VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

**(No incluidos en los artículos)**

### **6.1. Purificación y caracterización de las isoformas de Hev b 2**

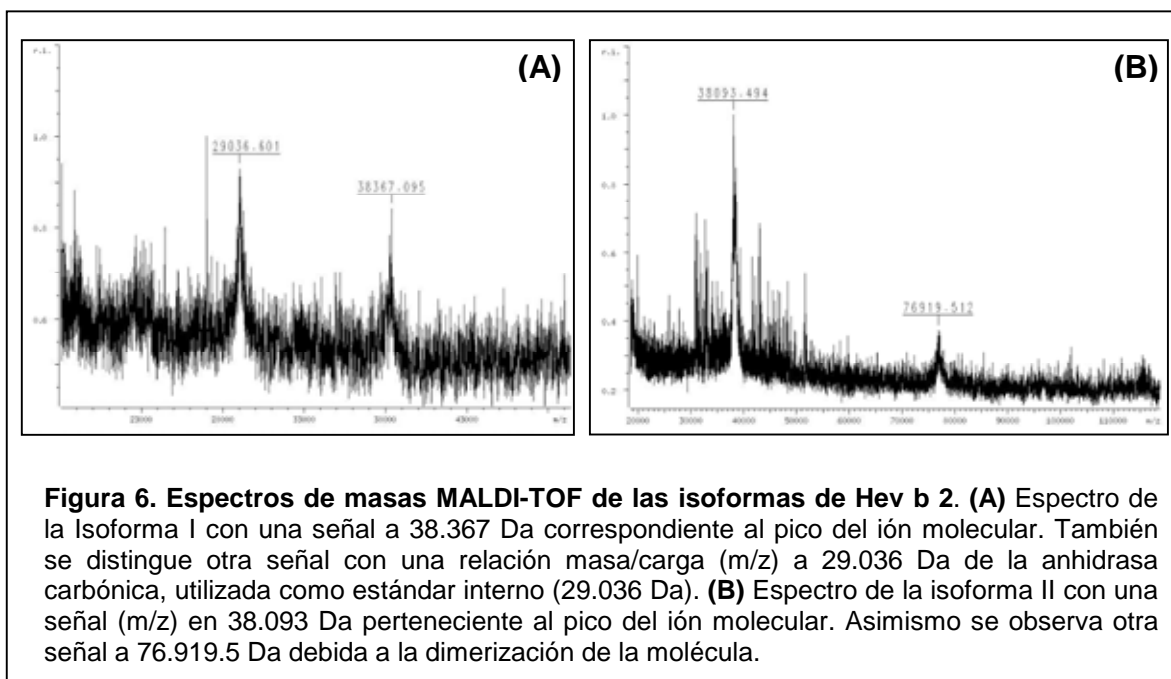
Las dos isoformas básicas y glicosiladas de la  $\beta$ -1,3-glucanasa (Hev b 2) analizadas en este trabajo se purificaron a homogeneidad mediante el protocolo descrito en el segundo artículo de la sección de publicaciones contenida en esta tesis. Para la purificación de las isoformas se inició, en promedio, con 20 g de la fracción de lutoides. Los criterios empleados para evaluar su grado de pureza fueron su comportamiento electroforético en PAGE-SDS, así como sus espectros de masas (Fig. 6).

El rendimiento obtenido para ambas isoformas se mejoró con respecto al protocolo previamente descrito por Churngchow *et al.* (1995); no obstante fue bajo, probablemente debido a que esta enzima es sólo sobreexpresada en condiciones de estrés, infección o en la etapa de desarrollo de la planta. La cantidad promedio total obtenida de las isoformas I y II fue de 0.7 y 2.5 mg, respectivamente. La tabla III muestra el rendimiento en cada una de las etapas de purificación. Las unidades de actividad se definieron como los micromoles de sustrato liberados en un minuto y la actividad específica de  $\beta$ -1,3-glucanasa, como las unidades por miligramo de proteína.

**Tabla III. Análisis de recuperación de los pasos de purificación de las isoformas I y II de la  $\beta$ -1,3-glucanasa de *H. brasiliensis***

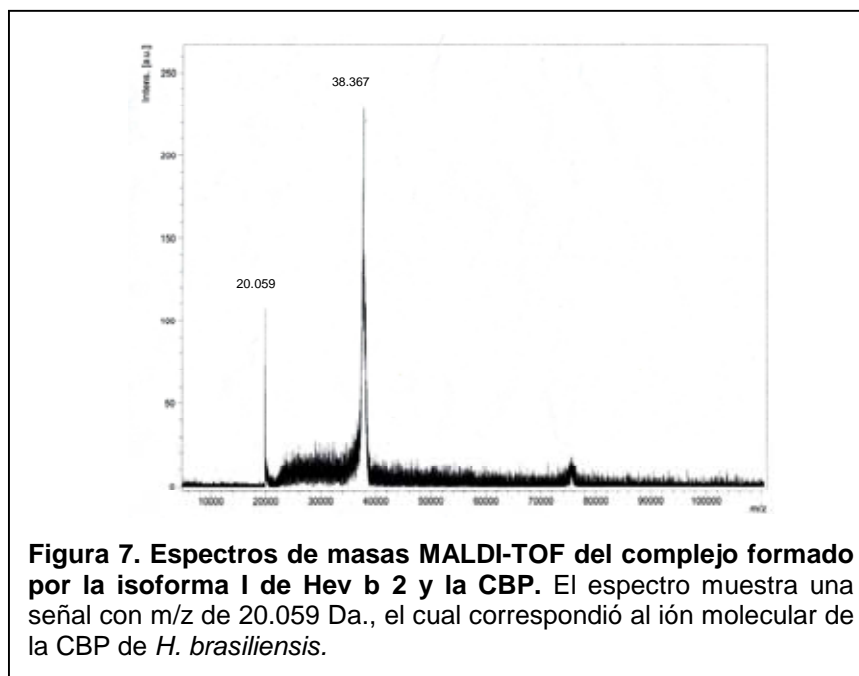
<b><i>Etapas de purificación</i></b>	<b>PROTEÍNA</b>	<b>ENZIMA</b>		
	<b><i>mg totales</i></b>	<b><i>A. Esp (U/mg)</i></b>	<b><i>Rendimiento (%)</i></b>	<b><i>FP</i></b>
Extracto lutoides	2600	$2.1 \times 10^2$	100	1
Sobrenadante 1	1627.5	$2.8 \times 10^2$	62.6	1.3
Precipitado G	102.8	$4.6 \times 10^3$	4.0	21
Exclusión molecular	19.1	$3.0 \times 10^3$	0.73	14
Afinidad a ConA	4.4	$2.6 \times 10^3$	0.17	12
Mono S (isoforma-I)	0.7	$13.6 \times 10^4$	0.027	647
Mono S (isoforma-II)	2.5	$3.5 \times 10^4$	0.096	166

FP, Factor de purificación



El bajo rendimiento obtenido de la isoforma I limitó la realización de los análisis cinéticos y se enfocó principalmente a la caracterización de la proteína y la obtención de los cristales de la misma. Curiosamente, en algunas ocasiones cuando la purificación de esta isoforma no se realizó de manera inmediata, y no obstante de obtener una sola banda que migró con un peso molecular aparente alrededor de 42 kDa en el perfil electroforético en geles de poliacrilamida-SDS, esta muestra resultó ser un complejo compacto y fuertemente unido, formado por la proteína de unión a citrato (CBP) y la isoforma I de la  $\beta$ -1,3-glucanasa de *H. brasiliensis*. Este complejo pudo ser observado por espectrometría de masas (Fig. 7) y la identidad de la CBP fue corroborada posteriormente por el Dr. Guillermo Mendoza de la Facultad de Medicina mediante secuenciación. La proteína de unión a citrato pertenece a las alginato liasas, enzimas que degradan el alginato, un polisacárido lineal de monosacáridos del ácido  $\beta$ -1,4-D-manurónico y su epímero, el ácido  $\alpha$ -1,4-L-gulurónico. Por tanto, es muy probable que el complejo formado por la asociación de la isoforma I y la proteína de unión a citrato, se establezca a través de la interacción entre los carbohidratos de esta isoforma y el sitio de reconocimiento a azúcares de la CBP, sin hidrolizar a los glicanos de la

isoforma I. La caracterización de los azúcares de las isoformas analizadas en este trabajo se reportan en la publicación 2, adjunta en esta tesis.

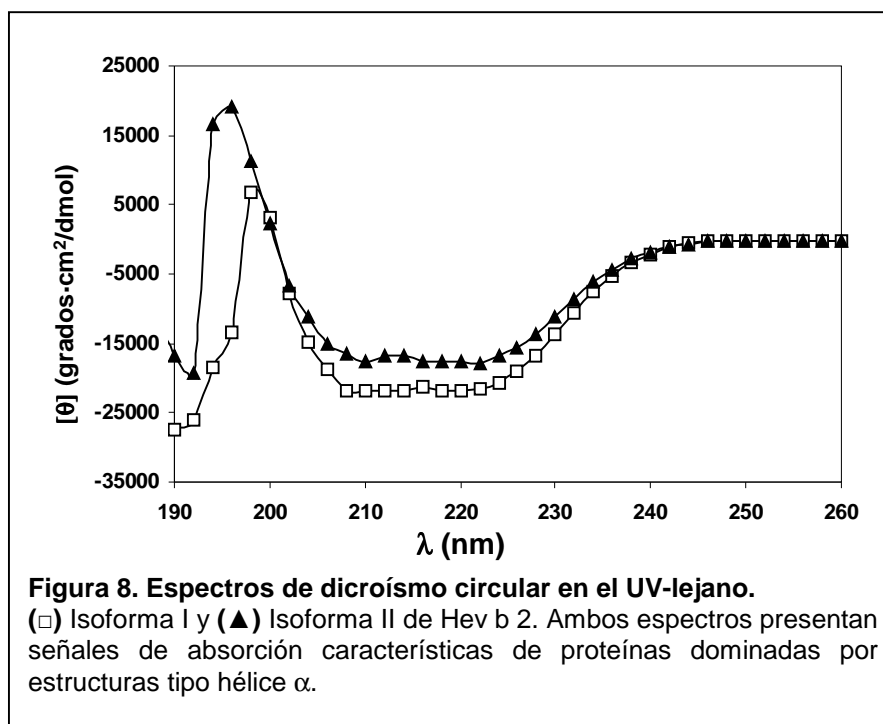


## 6.2 Análisis estructural por DC

La figura 7 muestra los espectros de dicroísmo circular en la región del UV lejano de las dos isoformas de Hev b 2. Ambos espectros de absorción presentan perfiles similares, con las señales características exhibidas por estructuras secundarias tipo hélice  $\alpha$  (Woody, 1995). Éstos presentan dos señales negativas, de magnitud similar, alrededor de  $208 \pm 1$  y  $222 \pm 1$  nm y un máximo positivo alrededor de los  $195 \pm 1$  nm. La estructura tridimensional de Hev b 2, determinada en este trabajo (ver publicación 3), correspondió a la de un barril  $(\beta/\alpha)_8$  tipo TIM. Este resultado confirma lo observado en los espectros DC obtenidos en ambas isoformas, los cuales se encuentran dominados por las señales de las estructuras secundarias tipo hélice  $\alpha$ .

Los resultados del análisis de los espectros DC, para estimar el contenido de estructura secundaria, por los tres procedimientos mencionados en las sección de métodos se muestran en la Tabla IV. Estos indicaron que las

isoformas de Hev b 2 corresponden a proteínas de estructura tipo alfa-beta, con un contenido medio del 35% de hélices  $\alpha$  y 10% de hojas  $\beta$  para la isoforma I, mientras que la isoforma II presentó un contenido de estructura secundaria tipo hélice  $\alpha$  y hoja  $\beta$ , del 29% y 13% respectivamente (Tabla IV). Estos resultados son cercanos a los obtenidos de la estructura tridimensional determinada en este trabajo (ver publicación 3).



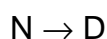
Un aspecto a considerar de los análisis por DC fue el hecho que éstos no mostraron diferencias significativas en las señales de absorción debido al grado de *N*-glicosilación presentado por las isoformas (ver publicación 2), lo que sugiere que modificaciones como la *N*-glicosilación, no provocan grandes cambios en la estructura secundaria de las isoformas de Hev b 2 y, en consecuencia, los espectros DC no presentan diferencias significativas en sus señales de absorción.

**Tabla IV. Comparación del contenido de estructura secundaria entre las isoformas de Hev b 2 a partir de los espectros de DC**

	ISOFORMA I		ISOFORMA II	
	%Hélice $\alpha$	%Hoja $\beta$	%Hélice $\alpha$	%Hoja $\beta$
<b>DCNN</b>	30.2	13	32	16
<b>SELCON3</b>	43.7	10	23	17
<b>CONTIN</b>	43	8.0	33	7
<b>Media</b>	<b>39±7.6</b>	<b>10.3±2.5</b>	<b>29.3±7.5</b>	<b>13.3±5.5</b>
<b>Estructura 3D</b>			<b>38</b>	<b>16</b>

### 6.3. Desnaturalización térmica de las isoformas de Hev b 2

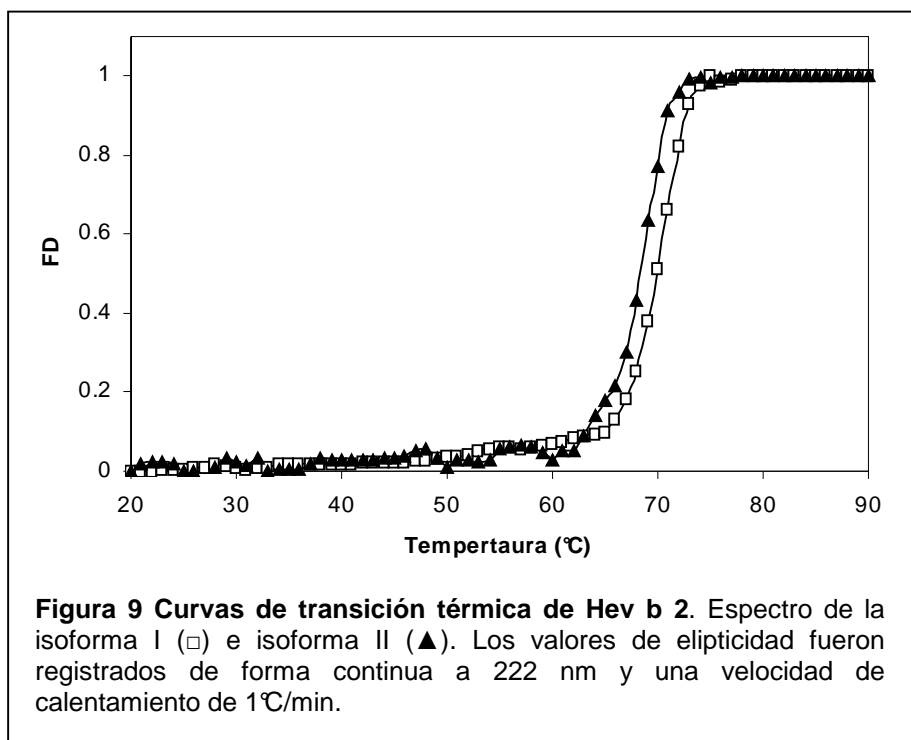
Debido a que Hev b 2 es un alérgeno que se encuentra presente en los productos manufacturados de látex (Yeang *et al.*, 2000), se realizaron curvas de desnaturalización térmica de ambas isoformas a partir de mediciones de DC con el fin de obtener información acerca su estabilidad. La desnaturalización térmica de las isoformas I y II de Hev b 2 a pH 5.0 siguió un proceso irreversible, que para efectos de cálculos, supusimos un modelo sencillo de una etapa:



Del análisis de las curvas de desnaturalización térmica, sólo pudimos deducir el valor de la temperatura media aparente de desnaturalización ( $T_m$ ) de ambas isoformas transformando el valor de las elipticidad observadas a 222 nm por su equivalente fracción desnaturalizada  $F_D$ , utilizando la siguiente fórmula:

$$F_D = \frac{\theta_T - \theta_N}{\theta_D - \theta_N}$$

$\theta_T$  es la elipticidad a una temperatura particular,  $\theta_N$  y  $\theta_D$  corresponden a los valores de dicha variable en el estado nativo y desnaturalizado, respectivamente.

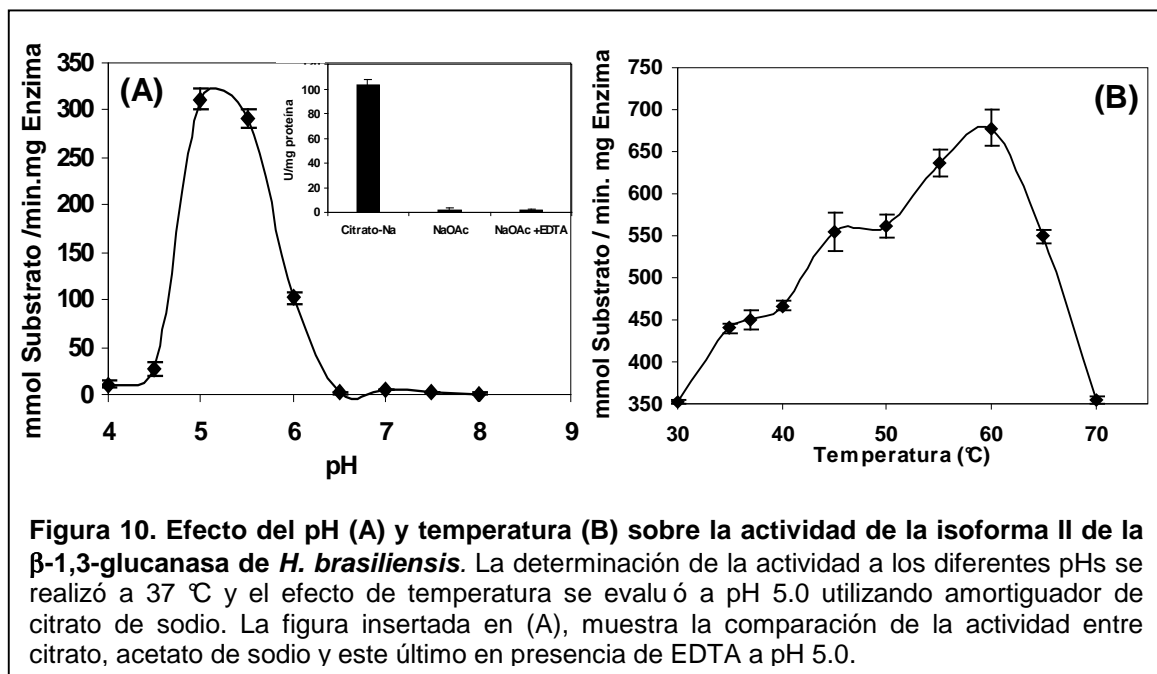


La figura 9 muestra la gráfica de la fracción de proteína desnaturizada en función de la temperatura obtenida para las isoformas de Hev b 2, a partir de los espectros DC en el UV lejano al variar la temperatura de 20 a 90 °C a pH 5.0. Como se puede observar en la figura, ambas proteínas presentan transiciones térmicas únicas entre 62 y 75 °C, con temperaturas aparentes de desnaturalización de 69.8 y 68.4 °C para las isoformas I y II, respectivamente. El valor más alto obtenido en la temperatura media de desnaturalización fue para la isoforma I, con 1.4 °C superior a la T<sub>m</sub> de la isoforma II, lo cual refleja un aumento en la estabilidad cinética frente a la temperatura de la primera. Asimismo, los valores obtenidos de T<sub>m</sub> correlacionan con el grado de glicosilación entre las isoformas, el cual es mayor para la isoforma I. No obstante esta diferencia, ambas isoformas presentan altos valores de T<sub>m</sub> comparados con el valor obtenido para la proteína homóloga recombinante de *Olea europaea* (Palomares *et al.*, 2005).



#### 6.4 Actividad en función del pH.

La actividad de  $\beta$ -1,3-glucanasa se midió por triplicado a valores de pH entre 4 y 6 con amortiguador de citrato de sodio y a pHs entre 6.5 y 8 con fosfato de sodio. Se probaron otros tipos de reguladores como MES (pH entre 4.5 y 6.5), bis-tris-propano (pH entre 7 y 8). Con el fin de comparar, se midió la actividad usando amortiguador acetato de sodio a pH 5.0, tal como se reporta para la  $\beta$ -1,3-glucanasa de ésta y otras fuentes. La figura 9(A) muestra la actividad específica en función del pH. El máximo valor de la actividad específica se obtuvo a pH 5.0 utilizando como amortiguador citrato de sodio. Por encima de 5.5 la actividad decae rápidamente y a valores de pH entre 6.5 y 8.0 utilizando fosfato de sodio, ésta se pierde. Con MES y bis-tris-propano no se detectó la actividad en todo el intervalo de pH evaluado. Lo anterior implica que MES y bis-tris-propano no son buenos amortiguadores para el desempeño catalítico de la enzima. Curiosamente, la actividad con acetato de sodio a pH 5.0 fue mucho menor que con citrato de sodio a este mismo valor de pH.



Esta diferencia sugería la posibilidad de un efecto inhibitor por cationes divalentes como  $Hg^{+2}$ ,  $Fe^{2+}$  y  $Cu^{2+}$  (Shu *et al.*, 2006; Witek *et al.*, 2008), los

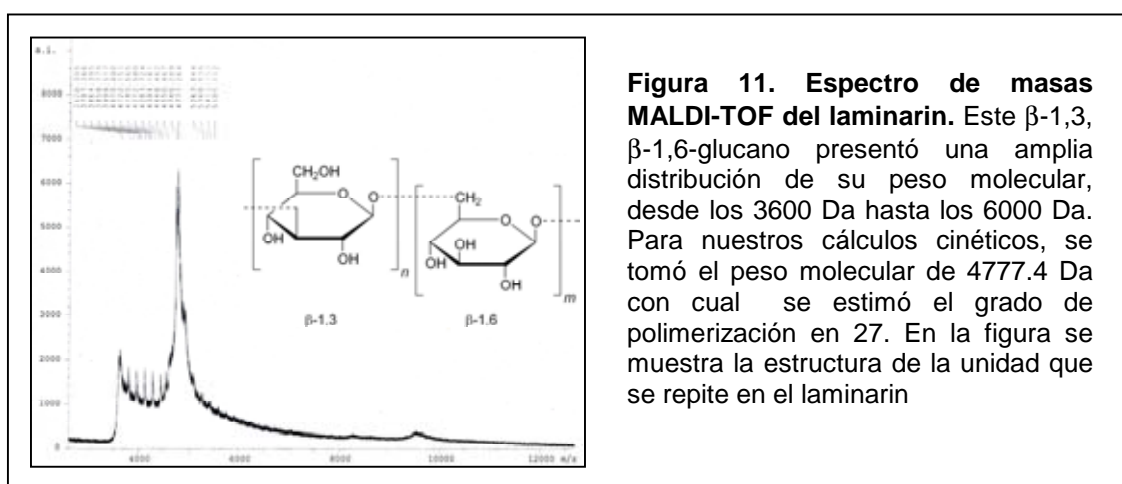
cuales en presencia de citrato pudieran ser secuestrados por el efecto quelante de este último. Sin embargo, al utilizar EDTA 1 mM en amortiguador de acetato de sodio la actividad de la enzima no se incrementó (ver inserto en la figura 10A). Por lo tanto, sugerimos que el incremento de la actividad de esta proteína por efecto del citrato se podría deber a cambios conformacionales sutiles que favorecen la afinidad y/o hidrólisis del sustrato por la enzima (Benitez Cardoza CG, 2009).

### 6.5 Actividad en función de la temperatura.

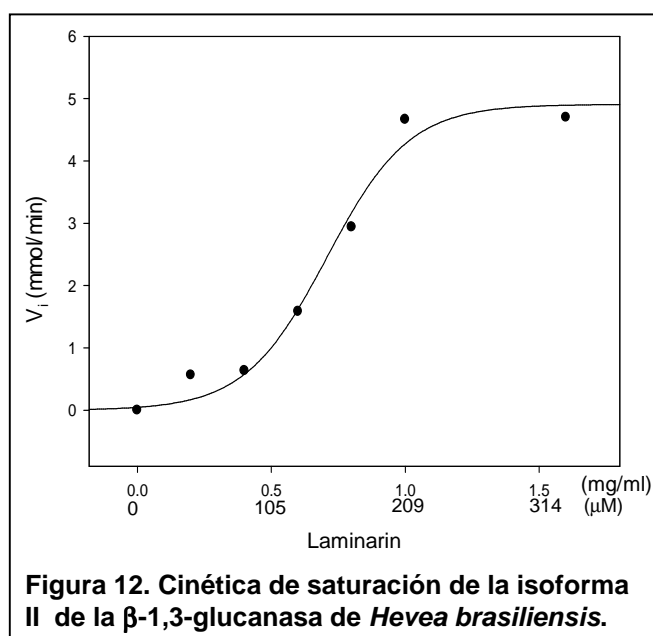
La actividad de la  $\beta$ -1,3-glucanasa se midió sobre laminarin por triplicado variando la temperatura desde 30 °C hasta 70 °C. El pH de la reacción fue de 5 y se usó como amortiguador citrato de sodio. La figura 10(B) muestra la actividad específica en función de la temperatura, en ella se observa un suave incremento de la actividad desde los 30 °C hasta los 60 °C. A temperaturas mayores de 60 °C la actividad empieza a decaer. Estos resultados son coherentes con lo citado por Churngchow *et al.*, (1995), quienes inicialmente reportaron que la enzima mantenía la actividad hasta los 60 °C. En 70 °C la actividad fue de sólo el 3% mientras que a 80 °C la enzima se inactivó.

### 6.6 Determinación de los parámetros cinéticos.

Previo a la determinación de los parámetros cinéticos de la isoforma II, se determinó la masa molecular del sustrato para poder expresar los parámetros cinéticos en valores de molaridad.



La figura 11 muestra el espectro de masas obtenido para el laminarin, en donde se observa un pico mayoritario ubicado en 4777.4 Da. Igualmente, para determinar la cantidad de enzima a utilizar en los ensayos cinéticos se determinó la velocidad de hidrólisis del laminarin en función de la concentración de enzima a 37 °C. Con base en los resultados se decidió trabajar con una cantidad total de enzima de 7.7 µg (velocidad de hidrólisis de 1.22 µmoles de sustrato por minuto) para continuar con la determinación de las constantes cinéticas debido a que es la menor cantidad de proteína necesaria para obtener una velocidad cercana a la velocidad máxima de la enzima.



La figura 12 revela un comportamiento sigmoide de la velocidad de hidrólisis de la enzima en función de concentración laminarin. La mayoría de las enzimas alostéricas presentan este tipo de curvas como consecuencia de la existencia de cooperatividad en la unión del sustrato. Sin embargo, estas cinéticas no sólo son producidas por este tipo de enzimas, existen otros mecanismos que originan cinéticas sigmoideas (Laidler & Bunting, 1973), que se citan a continuación:

- Cuando la enzima contiene impurezas, las cuales se pueden unir irreversiblemente al sustrato.

- Por la existencia de dos formas de la enzima con diferente actividad.
- Por la unión de dos moléculas de sustrato a una molécula de enzima.
- Por la presencia de dos o más vías alternativas de reacción.
- Cuando el sustrato actúa como un modificador de la enzima.
- Por la enzima contiene varias subunidades que interaccionan entre sí.
- Por la presencia de sistemas complejos de dos sustratos.

**Tabla VI. Constantes cinéticas**

Enzima	Vmax	Km	kcat (s <sup>-1</sup> )	1/kcat (s)	kcat/Km (s <sup>-1</sup> M <sup>-1</sup> )
<i>Isoforma II</i>	13 μkat <sup>‡</sup>	0.13 mg/ml <sup>‡</sup> (26.7 μM)	6.5x10 <sup>4</sup> <sup>‡</sup>	1.5x10 <sup>-5</sup> <sup>‡</sup>	2.4x10 <sup>9</sup> <sup>‡</sup>
<i>Isoforma II<sup>a</sup></i>	2.65 nkat	1.33 mg/ml	ND	ND	ND
<i>G-I H.vulgare<sup>b</sup></i>		0.7 mg/ml (172 μM)	155	6.5x10 <sup>-3</sup>	9x10 <sup>-5</sup>
<i>G-II H.vulgare<sup>b</sup></i>		0.8 mg/ml (208 μM)	130	7.6x10 <sup>-3</sup>	6x10 <sup>-5</sup>
<i>G-III H.vulgare<sup>b</sup></i>		0.7 mg/ml (180 μM)	36	2.7x10 <sup>-3</sup>	2x10 <sup>-5</sup>

‡ Parámetros cinéticos de la isoforma II obtenidos en este trabajo de tesis.

a, dato reportado por Churngchow *et al.*, (1995).

b, dato reportado por Hrmova & Fincher.

G-I, -II, -III, isoformas de la β-1,3-glucanasa de cebada (*Hordeum vulgare*).

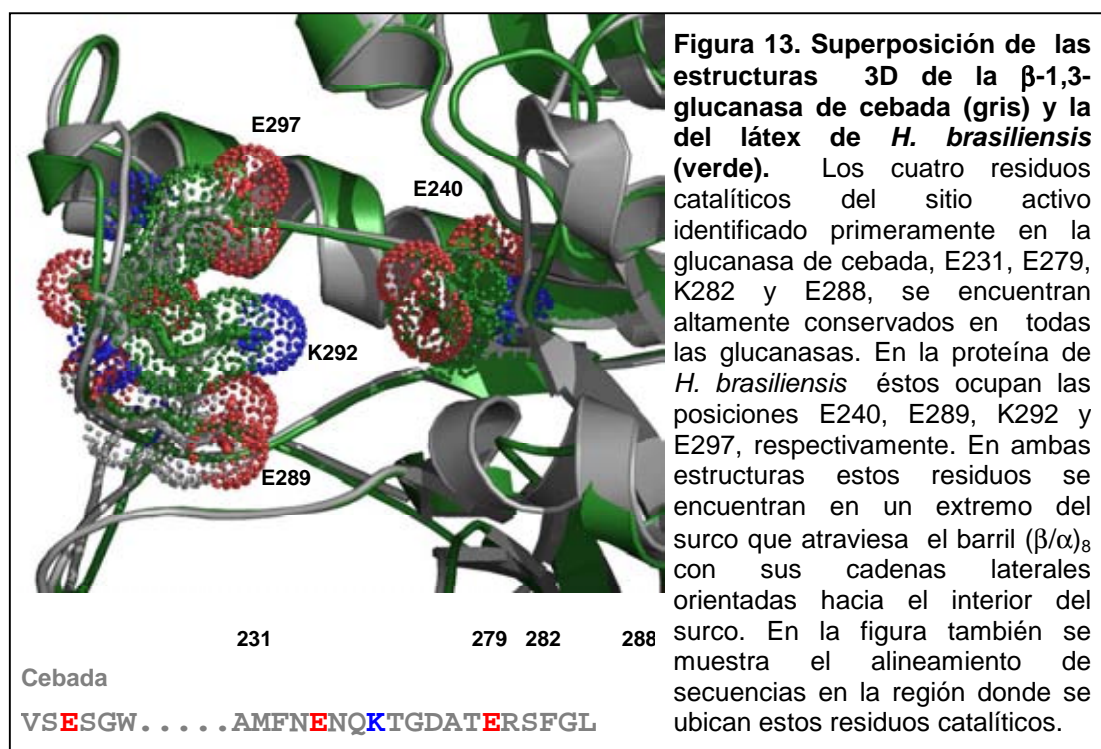
ND, valor no determinado.

Katal (kat): unidad derivada del Sistema Internacional de Unidades para medir la actividad catalítica.

Se define como la actividad catalítica responsable de transformar un mol de sustrato por segundo.

La cinética sigmoideal obtenida en este trabajo la atribuimos a la presencia de un sistema complejo de dos sustratos, ya que el laminarin es un β-glucano lineal con enlaces β-1,3 y β-1,6-glicosídicos en una relación 1:3. Estos enlaces son hidrolizados por las β-1,3-glucanasas a diferentes velocidades, lo cual podría explicar el comportamiento sigmoideal en la cinética de reacción (Atkinson & Walton, 1965; Giese *et al.*, 2006). Curiosamente, ninguna de las caracterizaciones enzimáticas publicadas para las β-1,3-glucanasas ha reportado este tipo de comportamiento, no obstante de usar el laminarin como sustrato. Por todo lo anterior, para calcular los parámetros  $V_{max}$  y  $K_m$  se consideraron sólo los puntos experimentales a las concentraciones de laminarin de 0.4 a 1 mg/ml, es decir cuando la enzima se encuentra cerca de la

saturación, y con estos puntos se realizó la transformación lineal de la velocidad/concentración de sustrato vs concentración de sustrato (Dowd & Riggs, 1965; Laidler & Bunting, 1973). La  $K_m$  obtenida para la isoforma II en este trabajo fue de  $0.132 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  ( $26.7 \text{ }\mu\text{M}$ ), un orden de magnitud menor a la constante aparente estimada por Churngchow *et al.*, (1995). Igualmente, la velocidad máxima  $V_m$  de la enzima, bajo las condiciones de reacción establecidas en este trabajo fue de 13 microkatal tres órdenes de magnitud mayor a la reportada el mismo grupo a  $35^\circ\text{C}$  (Tabla V I).

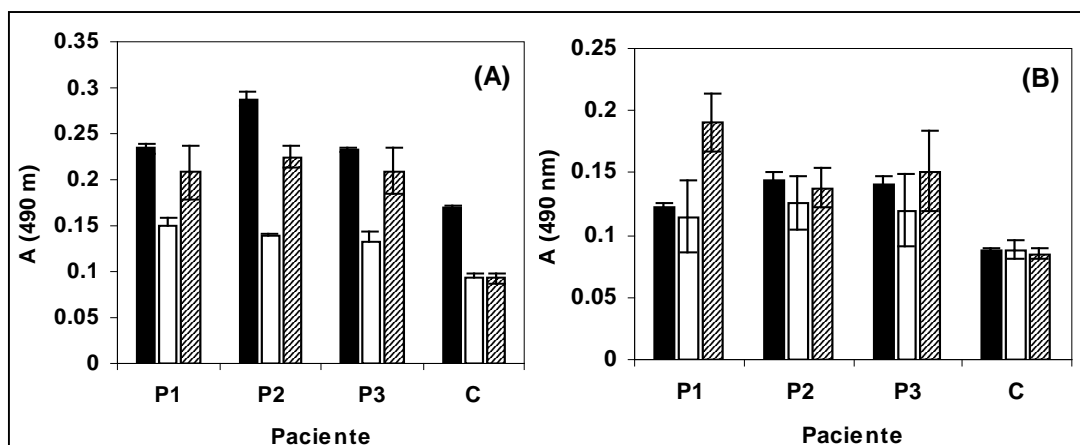


La comparación de los valores de los parámetros cinéticos obtenidos para la isoforma II, con respecto a lo reportado para tres  $\beta$ -1,3-glucanasas de cebada (*Hordeum vulgare*) muestra valores igualmente superiores. Por otra parte y a nivel estructural, los aminoácidos catalíticos identificados en la proteína de cebada, se encuentran muy conservados entre las glucanasas de eucariotes, cuya masa molecular oscila entre los 30 y 38 kDa. En la glucanasa de *H. brasileinsis*, estos aminoácidos se encuentran en posiciones equivalentes

dentro de la estructura del barril tipo TIM (Fig. 13). Éstos corresponden a los ácidos glutámicos 240, 289 y 297, así como la lisina 292, los cuales se encuentran cercanos en la estructura tridimensional para poder llevar a cabo el mecanismo catalítico, con retención en la configuración del carbono anómero. Este mismo mecanismo es el que presenta la enzima de cebada (Chen *et al.*, 1993).

### 6.7 Reconocimiento de las isoformas I y II de Hev b 2 por IgEs.

La capacidad antigénica de la glicosilación de la isoforma II de Hev b 2 se comprobó con 19 sueros de pacientes alérgicos al látex, como se reporta en la Figura 4 de la publicación 3 anexa en esta tesis. En este mismo sentido y teniendo en cuenta la disponibilidad de material suficiente, se realizó la caracterización de la isoforma I en estado nativo glicosilado y desglicosilado, así como en su estado desplegado y utilizando tres sueros de pacientes alérgicos (Fig. 14A). El mismo ensayo se repitió para la isoforma II (Fig. 14B). Como control se utilizaron dos sueros de personas no alérgicas y se promediaron los valores obtenidos.



**Figura 14. Evaluación del reconocimiento de Hev b 2 por anticuerpos tipo IgE.** Tres sueros P1, P2 y P3 de individuos diagnosticados con alergia al látex fueron seleccionados para evaluar la unión de las IgEs hacia las isoformas I (A) y II (B) glicosilada (barras negras), desglicosilada (barras blancas) y en estado desplegado (barras a rayas). C representa el control.

Como se aprecia, ambas isoformas en su estado nativo y glicosilado cuentan con el mayor reconocimiento por parte de las IgEs de los sueros

utilizados, y entre ellas, la isoforma I fue la más antigénica. Por otra parte, el reconocimiento de las formas nativas y desglicosiladas, decayó hasta un nivel ligeramente superior del obtenido por el control. Esto implica que además de la existencia de un sitio antigénico glicosídico, como previamente fue sugerido por Yagami *et al.*, (2002), la molécula contiene un sitio antigénico de origen peptídico. A la luz de los resultados de este trabajo (publicación 3), nosotros proponemos que la región del asa gamma, altamente expuesta al disolvente y conteniendo a la Arg100, podría ser la otra región antigénica importante sobre Hev b 2. Por último, se observó que las formas desnaturalizadas y desglicosiladas de ambas isoformas tienen mayor reconocimiento que la formas nativas y desglicosiladas. Este resultado se puede explicar por la exposición de regiones antigénicas en la proteína desplegada que en la proteína nativa encuentran internas y poco accesibles.

## *CONCLUSIONES*



## CONCLUSIONES

- Las 2 isoformas básicas de la  $\beta$ -1,3-glucanasa presente en el látex de *Hevea brasiliensis* se purificaron con un alto grado de homogeneidad, lo que permitió su cristalización. Sin embargo, sólo fue posible coleccionar datos de difracción de rayos X de la isoforma II para su elucidación estructural, debido a la mayor estabilidad de sus cristales. Cabe mencionar que esta isoforma cristalizó en presencia de citrato de sodio en dos redes diferentes o cristales polimorfos, uno monoclinico y otro tetragonal.
- Cristales de la isoforma I se obtuvieron en diferentes condiciones. Sin embargo, éstos difractaron a 4.5 Å de resolución probablemente debido a su alto contenido de azúcares, lo que influencia negativamente su cristalización. Esta baja resolución puede deberse posiblemente a un exceso de entropía conformacional exhibida por las cadenas glicosídicas o a un alto contenido de disolvente en el cristal.
- Los cristales monoclinico y tetragonal de la isoforma II difractaron a una resolución 2.5 y 2.8 Å respectivamente, lo cual permitió determinar la estructura 3D de ambos polimorfos. Al igual que otras  $\beta$ -1,3-glucanasas de plantas, la de *H. brasiliensis* se pliega adoptando la topología de un barril  $(\beta/\alpha)_8$ . Las diferencias más significativas entre ésta y sus homólogos de plátano y cebada radican en la presencia de una asa tipo  $\Omega$ , que en *H. brasiliensis* se encuentra muy expuesta en la superficie. Además se determinó la presencia del anillo lactámico del residuo de ácido piroglutámico en el amino terminal. Asimismo, los mapas de densidad electrónica permitieron identificar claramente, además, dos sitios de glicosilación, uno de ellos no reportado en la literatura.
- El alineamiento estructural de la cadena principal, sin incluir las cadenas laterales, de los monómeros presentes en la celda monoclinica produjo un RMSD 0.32 Å. Para lo monómeros de la celda tetragonal este valor fue de 0.23 Å. Al comparar los correspondientes monómeros de la celda

monoclínica con los de la celda tetragonal este valor fue de 0.33 Å. Esto nos indica que la estructura molecular es esencialmente idéntica en ambos polimorfos.

- Las diferencias más sobresalientes entre las isoformas I y II de la  $\beta$ -1,3-glucanasa fueron su patrón de glicosilación y contenido de azúcares, el cual correlacionó con la mayor termoestabilidad de la proteína. Esta característica podría explicar la presencia de este

- alérgeno en los productos manufacturados con látex natural.

- Se comprobó que el reconocimiento de la isoforma II por IgEs de sueros de pacientes alérgicos al látex de *H. brasiliensis* está dirigido esencialmente hacia los carbohidratos contenidos en la estructura. Éstos pueden estar constituyendo un glicótopo por sí mismo, o ser parte fundamental de un epítipo compartido entre una parte glicosídica y otra proteica.

- La cuantificación de los niveles de histamina liberada al estimular basófilos humanos sensibilizados al alérgeno y los ensayos *in vitro* de desgranulación de éstas células, por microscopía confocal en tiempo real, confirmaron la capacidad de la isoforma II glicosilada para inducir la desgranulación de los basófilos y por ende, la liberación de los mediadores de la respuesta alérgica como histamina, entre muchos otros.

- Por primera vez se observó la liberación de estructuras tipo NETs (*Neutrophil extracellular traps*), al estimular los basófilos humanos con la forma glicosilada de la isoforma II. Estas estructuras resultaron ser de similar naturaleza a las producidas tanto por neutrófilos, como por otras células de la inmunidad innata en respuesta a patógenos. Hasta este trabajo, este tipo de respuesta sólo se había reportado como un mecanismo de defensa contra parásitos y bacterias y no se había relacionado a una respuesta alérgica.

- La actividad enzimática de la isoforma II sobre laminarin mostró un incremento significativo al utilizar el amortiguador de citrato de sodio. Este efecto se debe posiblemente a los cambios sutiles inducidos por el anión citrato, el cual estaría favoreciendo la interacción de la proteína con el sustrato. Esto se ve reflejado en la disminución de  $K_m$  y el incremento en  $k_{cat}$ , al comparar con los valores reportados para la misma enzima cuando se usa regulador de acetato de sodio al mismo pH.
- La cinética enzimática mostró un comportamiento sigmoide, que podría atribuirse a la complejidad del sustrato utilizado, ya que se ha reportado que este tipo de enzimas también hidroliza las uniones  $\beta$ -1,6-glicosídicas.

*PERSPECTIVAS*



## **PERSPECTIVAS**

### **1. Caracterizar la interacción anticuerpo-Hev b 2.**

En este trabajo se demostró el papel importante que tiene la región de los carbohidratos en el reconocimiento a anticuerpos humanos tipo IgE, también se propuso un modelo de esta interacción (artículo 3). Sin embargo, la forma contundente de demostrar que los oligosacáridos contenidos en la estructura de Hev b 2 conforman el principal sitio de reconocimiento a anticuerpos, es cristalizando el complejo alérgeno-IgE como en los casos de la lactoglobulina (Niemi *et al.*, 2007) y del alérgeno del polen *Phleum pratense* Phl p 2 (Padavattan *et al.*, 2008).

### **2. Determinar la estructura tridimensional de la isoforma I y del complejo formado por ésta y la CBP.**

Es de gran interés determinar la estructura de la isoforma I debido a su patrón de glicosilación, el cual no interacciona con la concanavalina A. Esto sugiere la existencia de un arreglo en la estructura de los azúcares verdaderamente nuevo y desconocido. Por otra parte, sería interesante cristalizar el complejo constituido entre la isoforma I y la CBP, debido a la naturaleza de la interacción carbohidrato-proteína, que se establece para esta asociación.

### **3. Corroborar si la formación de estructuras tipo-traps, observadas al estimular basófilos con la isoforma II, también se producen al estimular con la isoforma I.**

De manera inesperada, en este trabajo se encontró que al estimular células basófilos de humanos con la isoforma II glicosilada, éstos producían además de la desgranulación, la formación de estructuras extracelulares similares a las producidas por neutrófilos, mastocitos y eosinófilos al contactar algún patógeno. Es de gran interés demostrar si la glicosilación, un tanto diferente de la isoforma I, también produce estas estructuras.

#### **4. Caracterizar los parámetros cinéticos de ambas isoformas con algún otro sustrato**

La caracterización de los parámetros cinéticos realizados en este trabajo, se limitó al uso del sustrato laminarin, el cual es el único utilizado a la fecha para determinar la actividad de este tipo de enzimas. Sería interesante determinar los parámetros cinéticos de ambas isoformas utilizando un sustrato sintético constituido sólo de uniones  $\beta$ -1,3-glicosídicas o  $\beta$ -1,6-glicosídicas, con el fin de discriminar la velocidad de hidrólisis para cada tipo de enlace. Además, podríamos determinar si existen diferencias en la actividad de cada isoforma, que se podrían correlacionar con el ambiente estructural del sitio catalítico.

## *REFERENCIAS*





## X. +REFERENCIAS

**Abbas** AK, Lichtman AH, & Pillai S. Immediate Hypersensitivity. In Cellular and Molecular Immunology, 6th Edition. China, Saunders (2007).

**Aalberse** RC. Structural features of allergenic molecules. *Chem.Immunol.Allergy*. **91**:134-46(2006).

**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.* **271**:25389-93(1996).

**Alenius** H, Kalkkinen N, Lukka M, Reunala T, Turjanmaa K, Mäkinen-Kiljunen S, *et al.* Prohevein from the rubber tree (*Hevea brasiliensis*) is a major latex allergen. *Clin.Exp.Allergy*. **25**:659-65(1995).

**Alenius** H, Paluoso T, Kelly K, Kurup V, Reunala T, Mäkinen-Kiljunen S, *et al.* IgE reactivity to 14-kD and 27-kD natural rubber proteins in latex-allergy children with spina bifida and other congenital anomalies. *Int.Arch.Allergy Immunol.* **102**:61-6(1993).

**Andersen** NH, Cao B, Rodríguez-Romero A & Arreguin B. Hevein: NMR assignment and assessment of solution-state folding for the agglutinin-toxin motif. *Biochemistry*. **32**:1407-22(1993).

**Archer** BL. The proteins of *Hevea brasiliensis* Latex. 4. Isolation and characterization of crystalline hevein. *Biochem.J.* **75**:236-40(1960).

**Arif** SA, Hamilton RG, Yusof F, Chew NP, Loke YH, Nimkar S, *et al.* Isolation and characterization of the early nodule-specific protein homologue (Hev b 13), an allergenic lipolytic esterase from *Hevea brasiliensis* latex. *J.Biol.Chem.* **279**:23933-41(2004).

**Atkinson** DE & Walton GM. Kinetics of regulatory enzymes. *Escherichia coli* phosphofructokinase. *J.Biol.Chem.* **240**:757-63(1965).

**Beezhold** DH, Sussmann GL, Kostyal DA & Chang NS. Identification of a 46-kd latex protein allergen in health care workers. *Clin.Exp.Immunol.* **98**:408-13(1994).

**Beezhold** DH, Hickey VL, Kostyal DA, Puhl H, Zuidmeer L, van Ree R & Sussman GL. Lipid transfer protein from *Hevea brasiliensis* (Hev b 12), a cross-reactive latex protein. *Ann.Allergy Asthma Immunol.* **90**:439-45(2003).

**Benitez** Cardoza CG. Flexibilidad estructural y plasticidad funcional de enzimas metabólicas: conformación, asociación y plegamiento de la enolasa. Segundo congreso de la rama de fisicoquímica, estructura y diseño de proteínas. México, (2009).

**Brown** RH, Hamilton RG, Mintz M, Jedlicka AE, Scott AL & Kleeberger SR. Genetic Predisposition to Latex Allergy: Role of Interleukin 13 and Interleukin 18. *Anesthesiology*. **102**:496-502(2005).

**Calabozo** B, Barber D & Polo F. Studies on the carbohydrate moiety of Pla I 1 allergen. identification of a major N-glycan and significance for the immunoglobulin E-binding activity. *Clin.Exp.Allergy*. **32**:1628-34(2002).

**Chen L**, Fincher GB & Høj PB. Evolution of polysaccharide hydrolase substrate specificity. Catalytic amino acids are conserved in barley 1,3-1,4- and 1,3-beta-glucanases. *J.Biol.Chem.* **268**:13318-26(1993).

**Churngchow N**, Suntaro A & Wittsuwannakul R.  $\beta$ -1,3-glucanase isozymes from the latex *Hevea brasiliensis*. *Phytochemistry.* **39**:505-9(1995).

**Dalmas B**, Hunter GJ & Bannister WH. Prediction of protein secondary structure from circular dichroism spectra using artificial neural network techniques. *Biochem.Mol.Biol.Int.* **34**:17-26(1994).

**Davies G** & Henrissat B. Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. *Structure.* **3**:853-9(1995).

**Davis PJ** & Williams SC. Protein modification by thermal processing. *Allergy.* **53**(46 Suppl):102-5(1998).

**Dennis M** & Light J. Rubber elongation factor from *Hevea brasiliensis*. Identification, characterization and role in rubber biosynthesis. *J.Biol.Chem.* **264**:18608-17(1989).

**Devalapalli AP**, Leshner A, Shieh K, Solow JS, Everett ML, Edala AS, *et al.* Increased levels of IgE and autoreactive, polyreactive IgG in wild rodents: Implications for hygiene hypothesis. *Scand.J.Immunol.* **64**:125-36(2006).

**De Swert LF**. Risk factors for allergy. *Eur.J.Pediatr.* **158**:89-94(1999).

**Down JE** & Riggs D. A comparison of estimates of Michaelis-Menten kinetic constants from various linear transformation. *J.Biol.Chem.* **240**:863-9(1965).

**Drew AC**, Eusebius NP, Kenins L, de Silva HD, Suphioglu C, Rolland JM & O'hehir RE, Hypoallergenic variants of the major latex allergen Hev b 6.01 retaining human T lymphocyte reactivity, *J.Immunol.* **173**:5872-9(2004).

**Gajhede M**, Osmark P, Poulsen FM, Ipsen H, Larsen JN, Joost van Neerven RJ, *et al.* X-ray and NMR structure of Bet v 1, the origin of birch pollen allergy. *Nat.Struct.Biol.* **3**:1040-5(1996).

**Galli SJ**. Allergy. *Curr.Biol.* **10**: R93-5 (2000).

**Gell PGH** & Coombs RRA, eds. Clinical Aspects of Immunology. 1st ed. Oxford, England, Blackwell(1963).

**Giese EC**, Govizzi LG, Dekker RFH, Monteiro NK, Corradi da Silva ML & Barbosa AM. Enzymatic hydrolysis of botryosphaeran and laminarin by  $\beta$ -1,3-glucanase produced by *Botryosphaeria rhodina* and *Trichoderma harzianum* Rifai. *Process Biochem.* **41**:1265-71(2006).

**Gilliland FD**, Li YF, Saxon A & Diaz-Sanchez D. Effect of glutathione-S-transferase M1 and P1 genotypes on xenobiotic enhancement of allergic responses: randomised, placebo-controlled crossover study. *Lancet.* **363**:119-25(2004).

**Hawrylowicz CM**. Regulatory T cells and IL-10 in allergic inflammation. *J.Exp.Med.* **202**:1459-63(2005).

**Henrissat B**. A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem.J.* **280**:309-16(1991).

**Høj PB** & Fincher GB. Molecular evolution of plant beta-glucan endohydrolases. *Plant.J.* **7**:367-79(1995).

**Hrmova M** & Fincher GB. Purification and properties of three (1 $\rightarrow$ 3)-beta-D-glucanase isoenzymes from young leaves of barley (*Hordeum vulgare*). *Biochem.J.* **289**:453-61(1993).

**Iacovacci P**, Afferni C, Butteroni C, Pironi L, Puggioni EM, Orlandi A, *et al.* Comparison between the native glycosylated and the recombinant Cup a1 allergen: role of carbohydrates in the histamine release from basophils. *Clin.Exp.Allergy*. **32**:1620-7(2002).

**Karisola P**, Mikkola J, Kalkkinen N, Airene KJ, Laitinen OH, Repo S, *et al.* 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.Immunol*. **172**:2621-8(2004).

**Kindt TJ**, Goldsby RA & Osborne BA. Reacciones de Hirpesencibilidad. En Inmunología de Kuby. 6 edición, México McGraw-Hill (2007).

**King TP**, Hoffman D, Lowenstein H, Marsh DG, Platts-Mills TAE & Thomas W. Allergen Nomenclature. *Int.Arch.Allergy Appl.Immunol*. **105**:224-33(1994)

**Kostyal DA**, Hickey VL, Noti JD, Sussmann GL & Beezhold DH. Cloning and characterization of a latex allergen (Hev b 7). Homology to patatin, a plant PLA2. *Clin.Exp.Immunol*. **112**:355-62(1998)

**Laidler KJ** & Bunting PS. Sigmoid kinetics and allostery. In The chemical kinetics of enzyme actions. Oxford Press, England (1958).

**Landsteiner K** & Chase MW. Experiments on transfer of cutaneous sensitivity to simple compounds. *Proc.Soc.Exp.Biol.Med*. **49**:688(1942).

**Leibowitz U**, Atonovsky A, Medalie JM, Smith HA, Halpern L & Alter M. Epidemiological study of multiple sclerosis in Israel. II. Multiple sclerosis and level of sanitation. *J.Neurol.Neurosurg Psychiatry*. **29**:60-8(1966).

**Li M**, Gustchina A, Alexandratos J, Wlodawer A, Wünschmann S, Kepley CL, *et al.* Crystal structure of a dimerized cockroach allergen Bla g 2 complexed with a monoclonal antibody. *J.Biol.Chem*. **283**:22806-14(2008).

**Liss GM**, Sussman GL, Deal K, Brown S, Cividino M, Siu S, *et al.* Latex allergy: epidemiological study of 1351 hospital workers. *Occup.Environ.Med*. **54**:335-42(1997).

**Mahoney NM**, Rozwarski DA, Fedorov E, Fedorov AA & Almo SC. Profilin binds proline-rich ligands in two distinct amide backbone orientations. *Nat.Struct.Biol*. **6**:666-71(1999).

**Menéz A**, Bontems F, Roumestand C, Gilquin B & Toma F. Structural basis for functional diversity of animal toxins. *Agreedings of The Royal Society of Edinburgh*, **99B**:83-103(1992).

**Miller GL**. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal.Chem*. **31**:426-8(1959).

**Miri S**, Pourpak Z, Zarinara A, Heidarzade M, Kazemnejad A, Kardar G, *et al.* Prevalence of type I allergy to natural rubber latex and type IV allergy to latex and rubber additives in operating room staff with glove-related symptoms. *Allergy Asthma Proc*. **28**:557-63(2007).

**Müller JJ**, Thomsen KK & Heinemann U. Crystal structure of barley 1,3-1,4-beta-glucanase at 2.0-Å resolution and comparison with Bacillus 1,3-1,4-beta-glucanase. *J.Biol.Chem*. **273**:3438-46(1998).

**Niemi M**, Jylhä S, Laukkanen ML, Söderlund H, Mäkinen-Kiljunen S, Kallio JM *et al.* Molecular interactions between a recombinant IgE antibody and the beta-lactoglobulin allergen. *Structure*. **15**:1413-21(2007).

**Niggemann B** & Breiteneder H. Latex allergy in children. *Int.Arch.Allergy Immunol.* **121**:98-107(2000).

**Nuter AF.** Contact urticaria to rubber. *Br.J.Dermatol.* **101**:597-8( 1979).

**O'Riordain G,** Radauer C, Hoffmann-Sommergruber K, Adhami F, Peterbauer CK, Blanco C, *et al.* Cloning and molecular characterization of the Hevea brasiliensis allergen Hev b 11, a class I chitinase. *Clin.Exp.Allergy.* **32**:455-62(2002).

**Ownby DR,** Tomlanovich M, Sammons N, & McCullough J. Anaphylaxis associated with latex allergy during barium enema examinations. *AJR Am.J.Roentgenol.* **156**:903-8(1991)

**Padavattan S,** Flicker S, Schirmer T, Madritsch C, Randow S, Reese G, *et al.* High-affinity IgE recognition of a conformational epitope of the major respiratory allergen Phl p 2 as revealed by X-ray crystallography. *J.Immunol.* **182**:2141-51(2009).

**Pallaghy PK,** Nielsen KJ, Craik DJ & Norton RS. A common structural motif incorporating a cystine knot and a triple-stranded beta-sheet in toxic and inhibitory polypeptides. *Protein Sci.* **3**:1833-9(1994).

**Palomares O,** Villalba M, Quiralte J, Polo F & Rodríguez R. 1,3- $\beta$ -glucanases as candidates in latex-pollen-vegetable food cross-reactivity. *Clin.Exp.Allergy.* **35**:345-51(2005).

**Posch A,** Chen Z, Wheeler C, Dunn MJ, Raulf-Heimsoth M & Baur X. Characterization and identification of latex allergens by two-dimensional electrophoresis and protein microsequencing. *J.Allergy Clin.Immunol.* **99**:385-95(1997).

**Poulter LW,** Seymour GJ, Duke O, Janossy G & Panayi G. Immunohistological analysis of delayed-type hypersensitivity in man. *Cell Immunol.* **74**: 358-69(1982).

**Radauer C,** Willeroider M, Fuchs H, Hoffmann-Sommergruber K, Thalhamer J, Ferreira F, *et al.* Cross-reactive and species-specific immunoglobulin E epitopes of plant profilins: an experimental and structure-based analysis. *Clin.Exp.Allergy.* **36**:920-9(2006).

**Rajan TV.** The Gell-Coombs classification of hypersensitivity reactions: a re-interpretation. *Trends Immunol.* **24**:376-9(2003).

**Ranta PM** & Ownby DR. A review of natural-rubber latex allergy in health care workers. *Clin.Infect.Dis.* **38**:252-6(2004).

**Raulf-Heimsoth M,** Rihs HP, Rozynek P, Cremer R, Gaspar A, Pires G, *et al.* Quantitative analysis of immunoglobulin E reactivity profiles in patients allergic or sensitized to natural rubber latex (*Hevea brasiliensis*). *Clin.Exp.Allergy.* **37**:1657-67(2007).

**Receveur-Bréchet V,** Czjzek M, Barre A, Roussel A, Peumans WJ, Van Damme EJ & Rougé P. Crystal structure at 1.45-Å resolution of the major allergen endo-beta-1,3-glucanase of banana as a molecular basis for the latex-fruit syndrome. *Proteins.* **63**:235-42(2006).

**Reyes-López CA,** Pedraza-Escalona M, Mendoza G, Hernández-Santoyo A & Rodríguez-Romero A. A single amino acid substitution on the surface of a natural hevein isoform (Hev b 6.0202), confers different IgE recognition. *FEBS Lett.* **580**:2483-7(2006).

**Reyes-López CA,** Hernández-Santoyo A, Pedraza-Escalona M, Mendoza G, Hernández-Arana A & Rodríguez-Romero A. Insights into a conformational epitope of Hev b 6.02 (hevein). *Biochem.Biophys.Res.Comm.* **314**:123-30(2004).

**Rodríguez-Romero A,** Ravichandran KG & Soriano-García M. Crystal structure of hevein at 2.8 Å resolution. *FEBS Lett.* **291**:307-9(1991).

**Sánchez-Palacios**, A. Alergia al látex. Diagnóstico y aspectos terapéuticos. *Allerol et immunopathol.* **29**:212-21(2001).

**Shu** C-H, Xu C-J & Lin E-S. Production, purification and partial characterization of a novel endo- $\beta$ -1,3-glucanase from *Agaricus brasiliensis*. *Process Biochemistry.* **41**:1229-33(2006).

**Sinnott** ML. Catalytic mechanism of enzymic glycosyl transfer. *Chem.Rev.* **90**:1171-202(1990).

**Slater** JE, Vedvick T, Arthur-Smith A, Trybul DE & Kekwick RG. Identification, cloning, and sequence of a major allergen (Hev b 5) from natural rubber latex (*Hevea brasiliensis*). *J.Biol.Chem.* **271**:25394-9(1996)

**Sreerama**, N. & Woody, R. W. Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra: comparison of CONTIN, SELCON, and CDSSTR methods with an expanded reference set. *Anal.Biochem.* **287**:252-60(2000).

**Strachan** DP. Hay fever, hygiene, and household size. *BMJ.* **299**:1259-60(1989).

**Sunderasan** E, Hamzah S, Hamid S, Ward MA, Yeang HY & Cardoso MJ. Latex B-serum beta-1,3-glucanase (Hev b II) and a component of the microhelix (Hev b IV) are major latex allergens. *J.Nat.Rubb.Res.* **10**:82-99(1995)

**Sussman** GL, Beezhold DH & Kurup VP. Allergens and natural rubber proteins. *J.Allergy Clin. Immunol.* **110**(2 Suppl):S33-9(2002).

**Szépfalusi** Z, Seidl R, Bernert G, Dietrich W, Spitzauer S & Urbanek R. Latex sensitization in spina bifida appears disease-associated. *J.Pediatr.* **134**:344-8(1999).

**Turjanmaa** K. Allergy to natural rubber latex: a growing problem. *Ann.Med.* **26**:297-300(1994)

**Vallier** P, Balland S, Harf R, Valenta R & Deviller P. Identification of profilin as an IgE-binding component in latex from *Hevea brasiliensis*: clinical implications. *Clin.Exp.Allergy.* **25**:332-9(1995).

**Valls** A, Pascual CY, Caballero MT & Martín EM. Latex allergy. *Allergol Immunopathol.* **32**:295-305(2004).

**van Stokkum**, I. H., Spoelder, H. J., Bloemendal, M., van Grondelle, R. & Groen, F. C. Estimation of protein secondary structure and error analysis from circular dichroism spectra. *Anal.Biochem* **191**:110-8(1990).

**Witek** AI, Witek K & Hennig J. Conserved Cys residue influences catalytic properties of potato endo-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -glucanase GLUB20-2. *Acta Biochim.Pol.* **55**:791-7(2008)

**Woody**, R. W. Circular dichroism. *Methods Enzymol.* **246**:34-71(1995).

**Yagami** T, Osuna H, Kouno M, Haishima Y, Nakamura A & Ikezawa Z. Significance of carbohydrate epitope in latex allergen with  $\beta$ -1,3-glucanase activity. *Int.Arch.Allergy Immunol.* **129**:27-37(2002).

**Yeang** HY, Chow KS, Yusof F, Arif SA, Chew NP, Loke YH. Appraisal of latex glove proteins in the induction of sensitivity to multiple latex allergens. *J.Investig.Allergol.Clin.Immunol.* **10**:215-22(2000).