



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
QUÍMICAS**

**Expresión, purificación y cristalización del alérgeno
proteico Hev b 8. 0102 (profilina)**

TESIS
PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

Q.F.B. JOSÉ ISRAEL MARES MEJÍA

TUTOR: DRA. ADELA RODRÍGUEZ ROMERO

AÑO: 2011





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.

Jurado asignado.

Presidente: **Dr. Rafael Arturo Zubillaga Luna**

Vocal: **Dr. José Federico del Río Portilla**

Vocal: **Dr. Abel Moreno Cárcamo**

Vocal: **Dra. Silvia del Socorro Pérez Casas**

Secretario: **Dra. Nuria Sánchez Puig**

El proyecto de tesis se realizó en el Departamento de Química de Biomacromoléculas del Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

- Laboratorio No.3
- Laboratorio de Biología Molecular
- Laboratorio de Estructura de Proteínas que también forma parte del Laboratorio Nacional de Estructura de Macromoléculas

Presentación del trabajo: “Expresión, purificación y cristalización del alérgeno Hev b 8 (profilina) de *Hevea brasiliensis*” dentro de la modalidad de cartel.

- XXVIII Congreso Nacional de Bioquímica del 7 al 12 de noviembre del 2010 en Tuxtla Gutiérrez, Chiapas.
- QUIMIUNAM 2010 del Posgrado en Ciencias Químicas del 24 al 26 de noviembre del 2010 en Ciudad Universitaria, México D.F.

Participación en el proyecto académico: Estudio de proteínas responsables de la alergia al látex del árbol del hule (*Hevea brasiliensis*).

- Primer Congreso de Alumnos de Posgrado de la UNAM del 18 al 20 de mayo del 2011 en Ciudad Universitaria, México D.F.

Q.F.B. José Israel Mares Mejía
Sustentante

Dra. Adela Rodríguez Romero
Tutor

Agradecimientos.

A la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) y a la Coordinación de Estudios de Posgrado.

A la Dra. Adela Rodríguez Romero por el apoyo para la realización de este trabajo de tesis.

A los Doctores Patricia Cano Sánchez, Abel Moreno Cárcamo y Deyanira Fuentes Silva por sus aportaciones y comentarios.

A los técnicos académicos del Instituto de Química: M. en C. Georgina Espinosa Pérez (Laboratorio de rayos X), Q. Eréndira García Ríos (Laboratorio de cromatografía) y a la Lic. Sandra Gpe. Rosas Poblano (Biblioteca).

A mis compañeros de laboratorio por sus consejos y amistad.

Al CONACYT por el apoyo económico al proyecto 82947 y DGAPA-UNAM IN209506-3

Dedicatoria.

Gracias Dios padre por brindarme estos momentos de vida y darme la fuente de inspiración en las personas que llevo siempre conmigo.

ÍNDICE

Resumen	1
Introducción	2
Justificación y Objetivos	11
Metodología	12
Resultados y Discusión	19
Conclusiones	35
Perspectivas	36
Bibliografía	37

Índice de figuras.

Figura 1. Sitios de interacción de la profilina.

Figura 2. Superposición de una profilina de planta Hev b 8 vs profilina humana.

Figura 3. Epítomos conformacionales y lineales para Hev b 8 mediante análisis bioinformático.

Figura 4. Secuencia de aminoácidos obtenida para la isoforma rHev b 8. 0102.

Figura 5. Gel SDS-PAGE al 15%. Pruebas de diferentes cepas de *E coli* para la expresión de rHev b 8. 0102.

Figura 6. Cinética de inducción de rHev b 8. 0102 en rosetta (DE3).

Figura 7. Perfil de elución de la columna de afinidad a Ni²⁺ y Gel SDS-PAGE.

Figura 8. Perfil cromatográfico de exclusión molecular.

Figura 9. Gel SDS-PAGE del corte con enterocinasa.

Figura 10. Cromatografía de afinidad a Ni²⁺ después de la reacción de corte con enterocinasa.

Figura 11. Gel SDS-PAGE para el seguimiento de la purificación de rHev b 8. 0102.

Figura 12. Espectro de masas de rHev b 8. 0102.

Figura 13. Cisteínas conservadas de Hev b 8.

Figura 14. Espectro de D.C. para rHev b 8. 0102.

Figura 15. Espectros de D.C. de diferentes profilinas alergénicas.

Figura 16. Evaluación del reconocimiento mediante ELISA de rHev b 8. 0102 por anticuerpos IgE.

Figura 17. Cristalización de rHev b 8. 0102.

Figura 18. Variación de la temperatura en la cristalización de rHev b 8.

Figura 19. Patrón de difracción de rHev b 8. 0102.

Índice de tablas.

Tabla I. Tipos de Hipersensibilidad.

Tabla II. Alérgenos reportados del látex por la IUIS.

Tabla III. Profilinas implicadas en la alergia.

Tabla IV. Isoformas reportadas para Hev b 8 por la IUIS.

Tabla V. Condiciones de cristalización para rHev b 8. 0102.

Tabla VI. Datos cristalográficos de rHev b 8. 0102 en la condición cuatro del Crystal Screen.

Abreviaturas.

AAAAI	Academia Americana de alergia, asma e inmunología (American Academy of Allergy Asthma & Immunology).
ADN	Ácido desoxirribonucleico.
ARN	Ácido ribonucleico.
EDTA	Ácido etilendiamino tetraacético.
EK	Enterocinasa.
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas.
FC ϵ RI	Receptor tipo I de la fracción cristalizable tipo épsilon de la IgE.
IgE	Inmunoglobulina tipo E.
UI	Unidades internacionales.
IL	Interleucina.
IPTG	Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido.
IUIS	Unión Internacional de Sociedades Inmunológicas (The International Union of Immunological Societies).
kDa	Kilo-Daltones.
LB	Luria Bertani.
MALDI-TOF	Desorción/ionización láser asistida por matriz (Matrix-Assited Laser Desorption/ionization) Tiempo de vuelo (Time Of Flight).
MW	Masa molecular.
nsLTP	Proteínas de transferencia de lípidos no específicas.
OD	Densidad óptica.
OPD	Orto-fenilendiamina.
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida.
PBS	Amortiguador de fosfato salino.
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (Polimerase Chain Reaction).
PDB	Banco de datos de proteínas (Protein Data Bank).
PEG	Polietilenglicol.
PIP ₂	Fosfatidilinositol 2-4-bifosfato.
PLP	Poli L-Prolina.
PMSF	Fluoruro de fenil-metil-sulfonilo.
rpm	Revoluciones por minuto.
SDS	Dodecil sulfato de sodio.
TFA	Ácido trifluoroacético.
T _{H2}	Linfocitos T ayudadores del tipo II.
UV	Ultravioleta.

Resumen.

La alergia es una reacción de hipersensibilidad de tipo I provocada por la exposición a una sustancia extraña (alérgeno) en personas con predisposición genética. En el látex del árbol del hule *Hevea brasiliensis* se encuentran un gran número de proteínas alergénicas. Una de ellas es la profilina o Hev b 8, que en combinación con proteínas del mismo tipo presentes en otras plantas son denominadas panalérgenos, responsables del síndrome alérgico polen-fruto-látex. Este tipo de proteínas es similar en masa molecular y en sus secuencias de aminoácidos donde tienen una identidad superior al 75%; además comparten una estructura tridimensional similar y poseen sitios conservados de unión a actina como función principal. Hev b 8 se ha reportado como alérgeno en varios estudios de reactividad cruzada; sin embargo, no se ha descrito completamente su respuesta ante IgEs de sueros de pacientes, como tampoco se ha reportado su prevalencia y la diferenciación de sus isoformas. En este trabajo se sobre-expresó, purificó, caracterizó y cristalizó al alérgeno rHev b 8.0102 (profilina) de *H. brasiliensis*. La expresión se realizó en *E.coli* Rosetta (DE3) junto con el vector pET28-rHev b8 con una mutación en el amino terminal (T2S). Para la purificación se usaron cromatografías de afinidad y exclusión molecular. Para la caracterización de la proteína se determinó la relación masa/carga mediante espectrometría de masas MALDI-TOF encontrándose una masa idéntica a la determinada mediante la secuencia de aminoácidos. También se obtuvo el espectro de dicroísmo circular determinándose el contenido de estructura secundaria de la misma. Se llevaron a cabo pruebas de cristalización obteniéndose cristales en 3 condiciones, en una de ellas los cristales difractaron a 3.1 Å de resolución en el equipo de difracción de rayos X del Laboratorio de Estructura de Proteínas del Instituto de Química, UNAM. Otros cristales fueron difractados en el sincrotrón del Brookhaven National Laboratory en Upton, New York obteniéndose una resolución de 2.9 Å. Además se realizaron pruebas de ELISA con el alérgeno usando suero de pacientes alérgicos, obteniendo una respuesta menor comparado con el suero C de látex de la fuente natural. La determinación de la estructura tridimensional de esta isoforma de Hev b 8 nos ayudará a tener una mejor comprensión de la reactividad de este alérgeno.

Introducción.

Alergia o Hipersensibilidad tipo I.

Alergia es una palabra compuesta, de origen griego, que significa “una reacción extraña”. Por definición es una respuesta del sistema inmunológico a una partícula o sustancia denominada antígeno, y más específicamente alérgeno, con el que se ha tenido contacto. Los alérgenos son principalmente moléculas de origen proteico que pueden estar asociados a moléculas como azúcares o lípidos y que teniendo propiedades definidas pueden desencadenar una respuesta de tipo inmune.

En la actualidad, cuando hablamos de alergia nos referimos a la hipersensibilidad tipo I de acuerdo a la clasificación realizada por P.H.G. Gell y Robins en 1963, en la que se describen cuatro tipos (Tabla I), con base en el tiempo de respuesta, los mecanismos y los mediadores de cada una. En el 2003 Rajan y colaboradores anexaron un quinto tipo.

Tabla I. Tipos de Hipersensibilidad.

Tipo	Nombre	Mediadores
I	Hipersensibilidad anafiláctica o inmediata	anticuerpos IgE
II	Hipersensibilidad citotóxica o anticuerpo dependiente.	IgG o IgM
III	Enfermedad del complejo inmune	IgG y complemento
IV	Citotóxica o hipersensibilidad retardada	Células T
V	Estimuladora o neutralizante	Anticuerpos IgG

Tomando en cuenta los mecanismos por los cuales se presenta la hipersensibilidad tipo I, se define como una reacción alérgica que desencadena una respuesta inmediata por la exposición a un alérgeno. Esta se presenta por la activación de los linfocitos T_H2 que estimulan la producción de IgE específicas de manera descontrolada rebasando las 100 U.I. establecidas (1 U.I. equivale a 2.4 ng), favorecida por la secreción de citocinas como IL-4 y IL-13. Esta clase de anticuerpos se unen, a través de su región constante (Fc), a los receptores FcεRI que se encuentran en la superficie de los mastocitos y basófilos. En subsecuentes exposiciones al alérgeno, éste se une a las IgE las cuales activan a los mastocitos entrecruzando a las

moléculas FcεRI en la superficie, provocando la desgranulación de la célula así como la secreción de mediadores farmacológicamente activos, tales como la histamina, leucotrieno y prostaglandina. La liberación de estos mediadores produce vasodilatación y la contracción del músculo liso (Abbas AK., 2007).

El origen de la alergia puede deberse a diferentes factores, no descritos en su totalidad; pero, en términos generales pueden ser individuales y ambientales. Los individuales están ligados a la herencia, edad, raza y sexo. Dentro de los factores ambientales se encuentran la contaminación, la exposición a ciertos alérgenos o microbios, así como a cambios en la alimentación. En la actualidad la alergia afecta en promedio al 54.6% de la población en EU que tienen respuesta positiva al menos a uno o más alérgenos, agrupándose de acuerdo al origen en rinitis alérgicas, sinusitis, alergias a fármacos, alimentos, alergias de la piel, alergias a picaduras de insectos y alergia al látex según la AAAAI (American Academy of Allergy Asthma & Immunology 2009).

El látex del árbol del hule *Hevea brasiliensis*.

El látex es una suspensión coloidal que poseen cerca de 12,000 especies vegetales (Yeang *et al.*, 2002), siendo el principal el que se obtiene del árbol *H. brasiliensis* perteneciente a la familia Euphorbiaceae. Este árbol es originario de la Cuenca baja del río Amazonas en Brasil, desde donde se ha extendido su cultivo hacia las áreas tropicales de algunos países, tales como Tailandia, Indonesia Malasia, Sri Lanka, India China, Vietnam, Libia, Camerún, Guatemala y México, entre otros.

El látex de *H. brasiliensis* es el citoplasma de las células laticíferas donde encontramos diferentes componentes como son: el cis-1,4-poliisopreno o hule natural que comprende un 55 a 65% de su peso, carbohidratos, lípidos y proteínas las cuales comprenden entre 1-2% del peso del látex. Además contiene organelos de origen vacuolar denominados lutoides, los cuales son ricos en proteínas alergénicas. Cabe mencionar que cuando el látex fresco es sometido a ultracentrifugación, éste se separa en tres fracciones principales: la superior, que contiene al poliisopreno, la intermedia o suero C y el sedimento o suero B, que contiene a los lutoides.

El uso de látex, en la población en general, ha ido en aumento durante las últimas décadas debido a las propiedades elásticas y de barrera que éste posee. Como materia prima se ha destinado a la fabricación de más de 40,000 productos, muchos de estos de uso cotidiano y en algunos instrumentos quirúrgicos (Cheng *et al.*, 1999). En la última década se ha demostrado que existe una cantidad considerable de proteínas y péptidos de origen alérgico en algunos productos quirúrgicos (Lee *et al.*, 2010; Mabe *et al.*, 2009; Koh *et al.*, 2005), por lo que su uso constante desencadena la alergia por sensibilización al látex. Los grupos con mayor vulnerabilidad son los pacientes con espina bífida debido a las múltiples intervenciones quirúrgicas a las que son sometidos y presentan una prevalencia entre 24 y 60%, los trabajadores al servicio de la salud con prevalencia del 5 al 15% (Poley *et al.*, 2000) y aquellas personas con antecedentes de atopia y alergia a frutas (Niggemann *et al.*, 2000).

En el látex de hule natural se han descrito más de 200 proteínas distintas, de estas 50 son reconocidas por IgEs de pacientes con historia de alergia al látex. A la fecha catorce alérgenos de tipo proteico del látex de *H. brasiliensis* (Tabla II) se han clasificado en la base de datos (www.allergen.org/allergen.aspx) establecida por el Subcomité de Nomenclatura de la Unión Internacional de Sociedades Inmunológicas (IUIS).

Tabla II. Alérgenos del látex reportados por la IUIS.

Alérgeno	Nombre	Función	MM por SDS-PAGE (kDa)	PI
Hev b 1	Factor de elongación	Biosíntesis del látex	14	4.9
Hev b 2	Beta-1-3-glucanasa	Defensa	38	9.5
Hev b 3	Homólogo de factor de elongación	Biosíntesis del látex	24	4.8
Hev b 4	Proteína microhélice	Estructural	53-55	4.5
Hev b 5	Proteína ácida	Desconocida	16	3.5
Hev b 6	Proheveína	Defensa	20	5.06
Hev b 6.02	Heveína	Defensa	4.7	4.9
Hev b 7	Patatina	Estructural	42	4.8
Hev b 8	Profilina	Estructural y señalización	15	4.9
Hev b 9	Enolasa	Biosíntesis de nutrientes	51	5.6
Hev b 10	Superóxido-dismutasa	Eliminación de radicales libres	26	6.3
Hev b 11	Quitinasa clase I	Defensa	30	5.1
Hev b 12	Proteína de transferencia de lípidos	Transferencia de lípidos	9.3	-
Hev b 13	Proteína nódulo	Esterasa	42	-
Hev b 14	Hevamina	Defensa	30	-

Como se muestra en la Tabla II los alérgenos del látex llevan a cabo diferentes funciones biológicas y su capacidad de activar una respuesta alérgica es variable por lo que algunos de ellos son reportados como alérgenos principales, como Hev b 6.02 (Reyes-López *et al.*, 2004) y otros como alérgenos menores. Dentro de estos últimos encontramos a la profilina, considerada como el principal panalérgeno (Hauser *et al.*, 2010). Este tipo de proteínas son responsables de la reactividad cruzada con IgEs, por lo que se encuentran relacionadas con una gran variedad de fuentes alergénicas.

Reactividad Cruzada y Panalérgenos.

En la alergia comúnmente se han reportado casos en los cuales los pacientes presentan reacciones alérgicas al polen, así como a distintos tipos de alimentos y que se relacionan también con la alergia al látex (Ganglberger *et al.*, 2001). Es difícil que un individuo presente hipersensibilidad a una sola fuente de alérgenos, la mayoría de los individuos son alérgicos a más de una. Este fenómeno se puede explicar por la reactividad cruzada que presentan ante las IgE, las cuales están dirigidas contra un tipo de alérgenos, por lo que cuando están en contacto con moléculas relacionadas estructuralmente e independiente del tipo de fuente del alérgeno pueden desencadenar una alergia de tipo I (Hauser *et al.*, 2010). A este tipo de moléculas se les ha denominado panalérgenos, las cuales se relacionan en cuanto su función y estructura, y se han clasificado en familias como profilinas, polcalcinas, proteínas de transferencia de lípidos no específicas (nsLTP), y en un grupo de proteínas de defensa relacionadas a Bet v 1 (*Betula verrucosa* o abedul), el principal panalérgeno reportado hasta el momento.

Tabla III. Profilinas implicadas en la alergia.

Fuentes del alérgeno profilina							
Polen			Alimentos				Producto
Arboles	Pastos	Yerbas	Frutas	Vegetales	Legumbres	Frutos secos y Semillas	Látex
Bet v 2	Cyn d 12	Amb a 8	Act d 9	Api g 4	Gly m 3	Ara h 5	Hev b 8
Car b 2	Lol p 12	Art v 4	Ana c 1	Cap a 2		Cor a 2	
Cor a 2	Orys s 12	Che a 2	Cit s 2	Dau c 4		Pru du 4	
Fra e 2	Phl p 12	Hel a 2	Cuc m 2	Liy e 1			
Ole e 2	Poa p 12	Mer a 1	Fra a 4				
Pho d 2	Zea m 12	Par j 3	Lit c 1				
			Mal d 4				
			Mus xp 1				
			Pru du 4				
			Pru av 4				
			Pru p 4				
			Pyr c 4				

En la tabla III se presentan a todas las profilinas que están implicadas en la alergia de acuerdo a su origen. La nomenclatura designada por la IUIS comienza con las tres primeras letras del género seguida por la inicial de la especie y el número corresponde al orden en que fueron reportados para su especie.

Profilina y Hev b 8.

La profilina es una proteína citosólica de baja masa molecular (~12-16 kDa) que se encuentra en todos los organismos eucarióticos (Pollard *et al.*, 2000). Esta proteína presenta tres sitios de unión a ligandos que se encuentran conservados y que le permiten interactuar con el fosfatidilinositol 2-4-bifosfato (PIP₂) *in vitro* (Lassing & Lindberg, 1985), con los monómeros de actina (Schluter *et al.*, 1997) y con péptidos de poli L-prolina (PLP) (Mahoney *et al.*, 1997; Schluter *et al.*, 1997) (Figura 1), por lo que puede interactuar con proteínas que contienen regiones ricas en este aminoácido (Fabre *et al.*, 2006; Schluter *et al.*, 1997). Estas

características son importantes para el intercambio dinámico y la re-estructuración del citoesqueleto de actina, implicada en el transporte de moléculas al exterior de la membrana, así como en cerca de 50 vías de señalización de las células en mamíferos (Walter Witke, 2004).

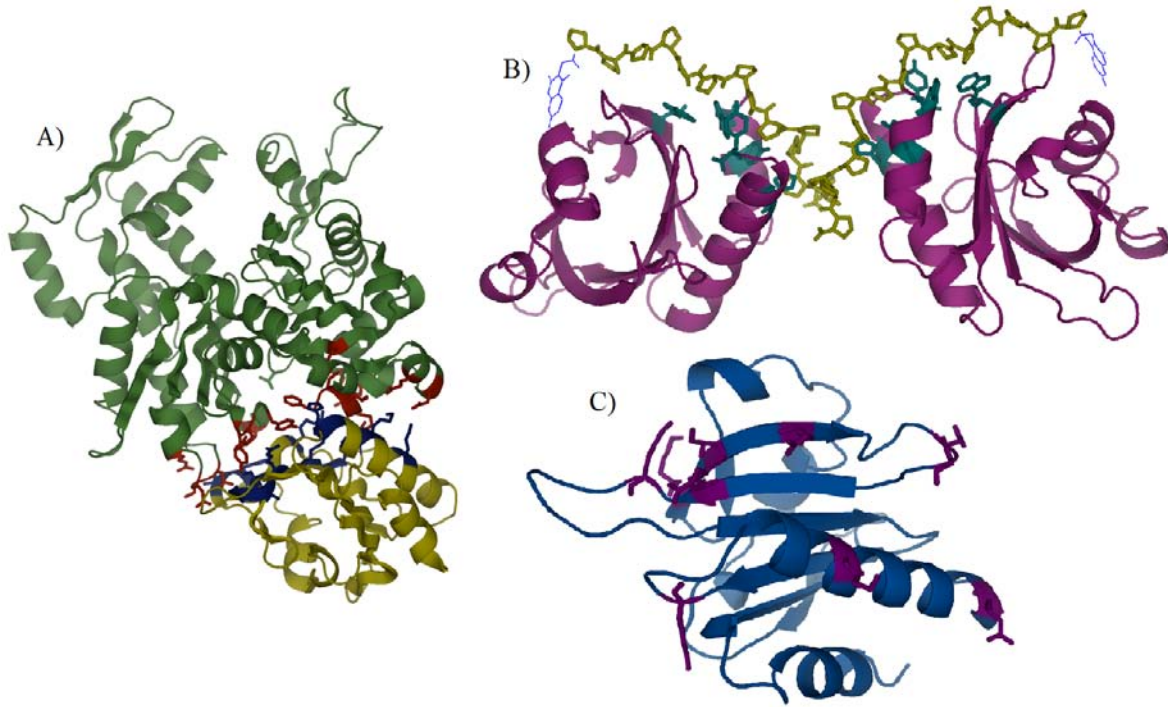


Figura 1. Sitios de interacción de la profilina. A) Interacción profilina (amarillo) – Actina (verde) la zona de la interface muestra en azul los residuos de la profilina y en rojo los residuos de la actina. PDB: 2BTF. B) Interacción profilina (morado) – Poli-Pro₁₅ iodo tirosina (amarillo) los residuos de la profilina que participan en la interacción (verde) PDB: 1CJF. C) Profilina (azul) y los residuos involucrados en la interacción con PIP₂ (purpura) PDB: 1FIL.

En la familia de las profilinas existen 290 miembros que han sido aislados de diferentes organismos eucarióticos. En el Protein Data Bank (PDB) sólo se han reportado las estructuras cristalográficas de doce de ellas. El análisis de la comparación de estructuras ha permitido demostrar que las isoformas de profilina vegetales tienen una alta similitud estructural con las isoformas aisladas en otros eucariontes. Estos resultados no concuerdan con los resultados de comparación de secuencias, ya que su identidad oscila entre un 5 y 35% entre un reino y otro. A pesar de la alta similitud estructural, las estructuras terciarias de las profilinas vegetales presentan algunas diferencias cuando se comparan con las profilinas de animales, como ejemplo se muestra en la figura 2, donde un aza de la profilina humana es más larga que el de plantas.

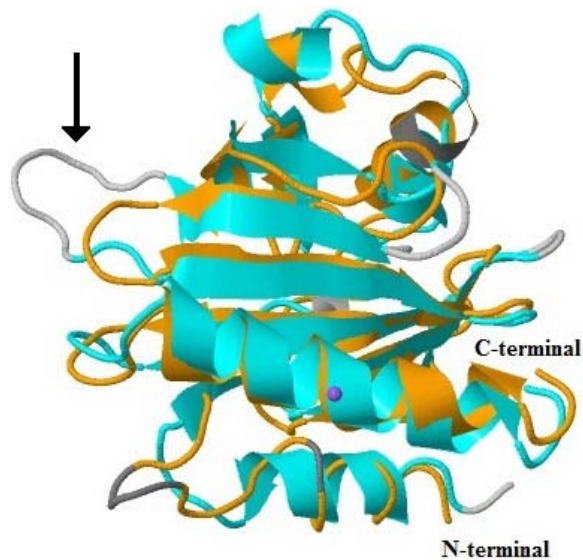


Figura 2. Superposición de las cadenas principales de una profilina de planta Hev b 8 (PDB: 1G5U) (naranja) vs la profilina humana (PDB: 1FIL) (verde).

Sin embargo, las profilinas que tienen un origen en común, tienen una alta identidad, superior al 75%. En general, se ha descrito un plegamiento común para las profilinas de origen vegetal, el cual se compone de dos hélices alfa y cinco hebras beta antiparalelas (Hauser *et al.*, 2008). Por lo tanto, la alta identidad y la conservación de varios sitios de reconocimiento a ligandos específicos podrían ser clave en el fenómeno de reactividad cruzada con IgE de sueros de pacientes alérgicos al polen, al látex y a las frutas. La hipersensibilidad de tipo I fue descrita por primera vez para la profilina de abedul Bet v 2 (Valenta *et al.*, 1991 & 1992) y hasta la fecha se ha comprobado que posee reactividad cruzada con varias profilinas de diferentes fuentes (Tordesillas *et al.*, 2010).

Hev b 8.

En genomas de eucariotes los genes que codifican a esta proteína consisten de variantes multicopia, los cuales se traducen en varias isoformas. La profilina del látex de *H. brasiliensis* (Hev b 8) es una proteína polimórfica que consiste de seis isoformas. Estas fueron descritas en el suero C del látex y hojas como se muestra en la tabla IV (Nieto *et al.*, 1998; Rihs *et al.*, 2000; Ganglberger *et al.*, 2001; Gen-bank).

Tabla IV. Isoformas reportadas para Hev b 8 por la IUIS.

Isoforma	GenBank Nucleotide	UniProt	PDB	% Identidad vs rHev b 8.0102
Hev b 8.0101	Y15042	O65812		90 %
Hev b 8.0102	AJ132397	Q9STB6		100 %
Hev b 8.0201	AF119365	Q9M7N0		81 %
Hev b 8.0202	AF119366	Q9M7M9		81 %
Hev b 8.0203	AF119367	Q9M7M8	1G5U	81 %
Hev b8.0204	AJ243325	Q9LEI8		81 %

A la fecha se ha reportado la estructura cristalográfica de una sola isoforma de la profilina de látex con el código PDB 1G5U y corresponde a la isoforma Hev b 8. 0203. La estructura se determinó a una resolución baja y existen inconsistencias en los datos estadísticos de la estructura. Diversos grupos de investigación han realizado análisis bioinformáticos usando como modelos a esta isoforma y a siete profilinas de diferentes fuentes, prediciendo tres epítomos lineales y once epítomos conformacionales, como se muestra en la Figura 3. Para esta predicción se consideraron únicamente las áreas expuestas al disolvente y lo que se pudo observar fue que algunas de estas zonas son altamente conservadas y otras están relacionadas con la función de la profilina, como el sitio de unión actina, a PIP₂ y a poli-prolina (Ganglberger *et al.*, 2001; Radauer *et al.*, 2006).

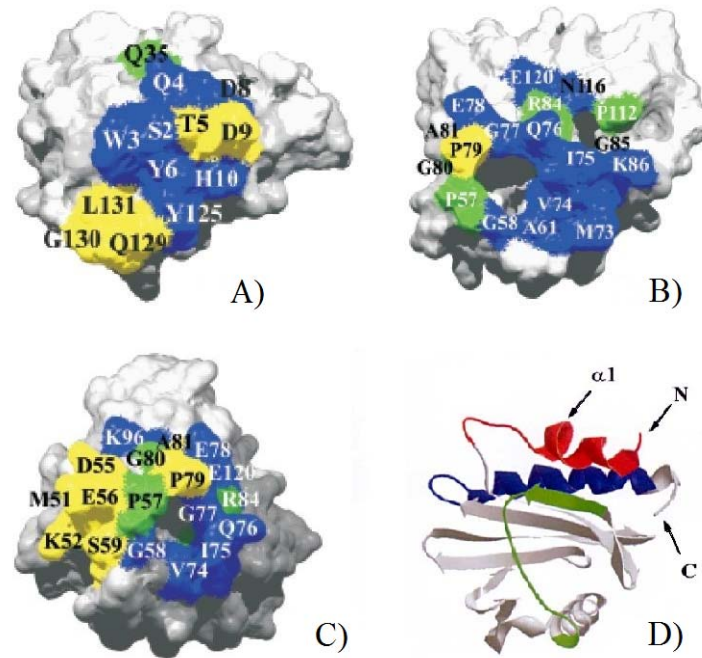


Figura 3. En los paneles A), B) y C) se muestran los epítomos conformacionales para Hev b 8 comparados con los de siete profilinas de plantas (azul: residuos idénticos, verde: residuos conservados y amarillo: residuos variables). D) Se muestran los epítomos lineales, en rojo se presenta el extremo amino-terminal, en azul la hélice alfa del carboxilo-terminal que comparte sitios de unión a poliprolina y en verde un aza que se encuentra expuesto al solvente.

Además, se ha determinado que Hev b 8 es capaz de inducir una respuesta inmune en pacientes con antecedentes de múltiples alergias y que los sueros de pacientes sensibilizados con profilinas de otras plantas también reconocen a Hev b 8 (Vallier *et al.*, 1995; Nieto *et al.*, 2002). Estos datos muestran la relevancia de este tipo de alérgenos, que son considerados como de menor importancia; no obstante, juegan un papel importante en las reacciones de reactividad cruzada. Por lo anteriormente mencionado consideramos que el estudio de la estructura de profilinas juega un papel importante en la comprensión de las reacciones de hipersensibilidad tipo I.

Justificación.

El látex de *Hevea brasiliensis* contiene varias isoformas de profilina, las cuales pueden ser reconocidas por IgEs de sueros de pacientes alérgicos y presentar reactividad cruzada con otras profilinas de plantas. La caracterización estructural e inmunológica de rHev b 8.0102 permitirá determinar su importancia en la hipersensibilidad de tipo I.

Objetivo principal.

Evaluar si la proteína rHev b 8. 0102 es alérgica y encontrar las condiciones de cristalización para poder realizar estudios estructurales por difracción de rayos X.

Objetivos específicos.

- Clonar, sobre-expresar y purificar a rHev b 8.0102.
- Caracterización de la proteína recombinante utilizando técnicas espectroscópicas.
- Evaluar el reconocimiento de esta isoforma utilizando sueros de pacientes alérgicos.*
- Buscar condiciones óptimas de cristalización variando agentes precipitantes, concentración de proteína y temperatura.
- Caracterización de los cristales por técnicas de difracción de rayos X.

*Protocolo aprobado por el comité de ética del Instituto Nacional de Pediatría

Metodología

Aislamiento de RNA total y síntesis de cDNA.

El RNA total se extrajo de hojas jóvenes de un árbol de *H. brasiliensis* clona RRIM600. Un gramo de hojas congeladas con nitrógeno líquido se trituraron hasta obtener un polvo fino, siendo resuspendidas en 2 volúmenes de amortiguador de extracción (0.1M NaCl, 10mM Tris pH 7.4, 1mM EDTA, 1% SDS y 1% β -mercaptoetanol) y un volumen de una mezcla Fenol-Cloroformo-Isoamílico (FCI) (25:24:1). La fase acuosa conteniendo al RNA se colectó y la extracción orgánica con FCI se repitió hasta que no se observó una interfase. El RNA total se precipitó con acetato de sodio y etanol, y el precipitado se colectó por centrifugación y se lavó con etanol al 70%, el cual se dejó evaporar, y entonces se resuspendió en agua libre de RNAsa. Para reprecipitar el RNA se usaron 0.1 volúmenes de 4 M LiCl. Este precipitado se colectó por centrifugación después de un período de 12 horas a 4 °C y se lavó con etanol al 70%. El precipitado se resuspendió con 300 μ l de agua libre de RNAsa y se llevó a cabo una extracción orgánica con FCI. La fase acuosa se colectó y se repitió el paso de precipitación con acetato de sodio y etanol. El RNA total se resuspendió entonces con un total 50 μ l de agua libre de RNAsa. La concentración del RNA se determinó espectrofotométrica a 260 nm y su pureza mediante la relación (A_{280}/A_{260}). El cDNA se sintetizó a partir de 5 μ g de RNA total con el kit de síntesis de cDNA protcript (New England Biolabs) siguiendo las indicaciones del fabricante y usando primers o cebadores.

Nota: 1volumen equivale a 1 ml para 1 g de muestra.

Clonación y expresión de Hev b 8.

La amplificación del gen de Hev b 8. 0102 se hizo mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando 5 μ l del cDNA y los cebadores específicos que se diseñaron de acuerdo a la secuencia previamente reportada por Rihs *et al.*, 2000:

FwdProf 5`-cgcgatccgacgacgacgacaagatgacgtggcagggctacgtagatgatcat-3` con la enzima *BamHI* y un sitio de reconocimiento de la enterocinasa subrayado, y

Reverso: RvsProf 5`-ggtaagcctttaatagccctgatcaatgaggtta-3` con un codón de paro y un sitio de corte *HindIII* (subrayado). La reacción de PCR se llevó a cabo en 50 μ l de la mezcla Accuprime pfx supermix (Invitrogen) con 30 ciclos de amplificación (95 °C durante 15 s, 60 °C por 30 s, y 68 °C por 60 s) usando el termociclador TC-512 (Techne). El producto de PCR

se ligó al vector pET28 (Novagen CA, USA) usando T4 DNA ligasa y posteriormente fue transformado en células de *E. coli* DH5 α . para obtener el vector pET28-rHev b8. Las clonas positivas se seleccionaron por restricción y el DNA de éstas se envió a un servicio de secuenciación (Laragen Inc).

La sobre-expresión de la proteína se realizó en las cepas de *E. coli* Rosetta (DE3) Cam y BL21 (DE3) PLYS. El medio de cultivo utilizado para el crecimiento fue el Luria Bertani (LB), suplementado con los antibióticos apropiados. Un litro de LB inoculado con el cultivo de toda la noche de las células correspondientes, se incubó a una temperatura de 37 °C, hasta tener una densidad óptica de 0.7 a 600 nm (OD₆₀₀). La inducción se llevó a cabo con isopropil β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) 0.5 mM a una temperatura de 30° C por 12 hrs. Después de este tiempo se centrifugó a 4500 rpm por 10 min, a 4°C, para obtener el paquete celular.

Purificación.

El paquete celular obtenido en la expresión se resuspendió en un amortiguador de lisis 50mM Tris, 0.3 M NaCl pH 8, y 1mM fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF). Las células se lisaron en un sonicador Misonix 3000 en intervalos de 10 segundos con potencia 4 y un tiempo de espera de 30 seg hasta completar 5 min. Después, el lisado se centrifuga a 10000 rpm a 4 °C por 30 min. El sobrenadante se filtró en una membrana de 0.22 μ m millipore y se aplicó a una columna de afinidad a Ni²⁺ His Trap (Invitrogen) de 5 ml. La elución de la muestra se realizó con un escalamiento por pasos de imidazol comenzando en 10 mM para eliminar todo lo que se pegó de manera inespecífica a la columna, y después usando concentraciones de imidazol de 50, 100, 200 y 250 mM. La muestra se cargó con un flujo de 0.5 ml/min y la elución se realizó con un flujo de 1 ml/ min.

Con el fin de seguir a la proteína expresada en cada paso de elución se realizó un gel de electroforesis SDS PAGE al 15 %, detectando aquellas fracciones donde se tuviera una mayor concentración de la proteína de interés. La muestra siempre se almacenó y transportó en frío.

Determinación de la concentración de proteína por espectroscopia UV.

Los cálculos de concentración de proteína se realizaron considerando el coeficiente de extinción teórico de la isoforma de profilina. El coeficiente de extinción (ϵ), también llamado coeficiente másico de atenuación o coeficiente másico de absorción, y el coeficiente molar de extinción son parámetros que definen la capacidad de una sustancia para absorber la luz a una longitud de onda dada, por unidad de masa o por concentración molar, respectivamente. Este valor varía para cada proteína y con base en la secuencia de aminoácidos se calculó en el servidor <http://expasy.org/tools/protparam.html>. Los valores del coeficiente de extinción a 280 nm para la construcción completa de la rHev b 8.0102, mas el péptido con histidinas, es $1.090 \text{ ml} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ y para la rHev b 8.0102 es de $1.408 \text{ ml} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, asumiendo en ambos casos que los residuos de cisteína se encuentran reducidos. Tomando en cuenta lo anterior se calculó la concentración de proteína en mg/ml tomando el coeficiente de extinción teórico y la medida de su absorbancia a 280 nm.

De acuerdo a la ley de Beer 's $A_{\lambda} = \epsilon c l = \epsilon c$ Cuando $l = 1 \text{ cm}$

$$\text{Por lo tanto } c = A / \epsilon^{0.1\%} = \text{mg} / \text{ml}$$

Cromatografía de exclusión.

Unas vez obtenidas las fracciones de la cromatografía de afinidad se concentraron a no más de 8 mg/ ml ya que puede haber agregación de proteína y se filtraron por membrana de 0.22 μm millipore. La separación se realizó en una columna HiLoad 16/60 superdex 75, la cual está acoplada a un sistema de purificación de proteínas (FPLC-Fast Liquid Protein Chromatography). La columna se equilibró con amortiguador Tris-HCl 50 mM pH 7.5, realizando una elución isocrática a un flujo de 0.7 ml/min. El pico mayoritario conteniendo a la proteína de interés se concentró en un sistema amicon con membrana de 10,000 MW (Millipore) hasta un valor no mayor de 1 mg/ml para realizar el corte con enterocinasa.

Corte con Enterocinasa.

Éste se realizó de acuerdo a las indicaciones del proveedor EKMax™ enterokinase de Invitrogen ocupando 1U de la enzima. Para el corte se recomienda solo utilizar la cantidad necesaria de proteína y con la modificación de cambiar Tween 20 por 0.1 % Triton X-100 (Sigma).

Separación de rHev b 8 después del corte por cromatografía de afinidad.

Una vez que se realizó el corte se prepara la muestra filtrándola por 0.22 µm y se carga a una columna de afinidad a Ni²⁺ HiTrap de 5 ml. La elución en la columna comienza con amortiguador Tris-HCl 50 mM pH 7.5 adicionando 100 y 150 mM de imidazol para el lavado. En la primera fracción sin imidazol recuperamos a la profilina pura, y en el lavado obtenemos la proteína que no se cortó más el fragmento que tiene la His-tag. Posteriormente se recupera la proteína sin cortar, utilizando una membrana de ultrafiltración con tamaño de poro de 5000 Da (Millipore), se dializó contra el amortiguador para eliminar el fragmento de histidinas así como el imidazol que tiene esta fracción y poder repetir el paso de corte con enterocinasa. La profilina pura se concentra de 5 a 10 mg/ml para llevar a cabo las pruebas de cristalización.

Caracterización de la proteína.**Determinación del contenido de estructura secundaria.**

El contenido de estructura secundaria se determinó por Dicroísmo Circular (D.C.). La muestra se preparó dializando la proteína pura contra amortiguador de fosfato de Na 50 mM pH 7.5 y ajustando su concentración a 0.2 mg/ml. El espectro se obtuvo en un espectropolarímetro Jasco J-710 en el UV lejano (190-260nm), a temperatura constante de 25°C, utilizando una cubeta de cuarzo de 0.1 cm de paso óptico. El espectro final representa el promedio de tres acumulaciones individuales realizadas cada 1 nm a una velocidad de barrido de 20 nm/min. El resultado se expresa en valores de elipticidad (Θ) molar, (grado*cm²/dmol) considerando una masa molecular promedio por residuo de 110 g/mol utilizando la ecuación:

$$\theta_{Molar} = \frac{\theta_{obs} * MW}{[P] * d}$$

Donde Θ molar es elipticidad molar, Θ_{obs} es el valor de la elipticidad en mdeg (miligrados), MW es el peso molecular promedio de los aminoácidos, [P] es la concentración de proteína en mg /cm³ y d es el paso óptico en cm. El procesamiento de los datos se realizó con el software CDNN que utiliza un método de deconvolución de datos basado en redes neurales que aplican el algoritmo de propagación inversa (Dalmas *et al.*, 1994).

Determinación de la masa molecular.

El espectrómetro masas fue obtenido en el sistema MALDI-TOF (Matriz Assisted Laser Desorption / Ionization-time of flight), principalmente por las aplicaciones que éste tiene ya que nos da información acerca de la estructura primaria, masa molecular exacta, la huella peptídica de la macromolécula, entre otras aplicaciones combinadas con bases de datos. Esta técnica está basada en la formación de una red de cristales producidos por matrices sólidas que favorecen la desabsorción e ionización del analito a través de pulsos de láser rápidos. En los instrumentos de tiempo de vuelo (TOF), los iones positivos se producen periódicamente por bombardeo de la muestra con impulsos de electrones, de iones secundarios o de fotones generados por láser. Los instrumentos de MALDI-TOF tienen un “espejo de iones”, el cual desvía los iones con un campo eléctrico, modificando la trayectoria de vuelo del ion y aumentando la resolución. Este tipo de técnicas se emplea principalmente en el análisis de biomoléculas, desde azúcares de menos de 1000 Da, hasta proteínas de 300 kDa.

La muestra de profilina pura se preparó a una concentración de 1mg/ml, utilizando como matriz ácido sinapínico en 30% acetonitrilo/70% agua/0.1% ácido trifluoro acético (TFA). Los controles utilizados para calibrar el equipo son proteínas estándar como: ubiquitina (8000 Da) y Mioglobina (16950 Da). La relación masa/carga (m/z) para el ion molecular se obtuvo utilizando un espectrómetro MALDI-TOF Microflex Bruker Daltonics.

Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA).

Estas pruebas se realizaron para comprobar que la profilina recombinante tiene la capacidad de unirse a IgEs de sueros de pacientes alérgicos. Para comprobar que el suero C del látex es capaz de provocar una respuesta alérgica se probó también un extracto que se encuentra enriquecido en profilina.

La profilina recombinante se preparó a una concentración de 8 µg/ml. Además, el suero C del látex se sometió a ultrafiltración utilizando una membrana con un corte molecular entre 10,000 Da, para eliminar proteínas y péptidos menores a este peso y 40,000 Da para proteínas más grandes; el extracto semipurificado se llevó a una concentración de 100 µg/ml de proteína total, el mismo procedimiento se realizó para el extracto de Kiwi (*Actinidia deliciosa*) donde se ha reportado la presencia de una profilina alergénica (Act d 9), ambas muestras se prepararon en PBS. En cada pozo de la placa de poliestireno (NUNC™ Apogent) se depositan 200 µl de cada una de las muestras de proteína preparadas para sensibilizarlos, las pruebas se realizaron por triplicado con un control negativo (albumina). Después las placas se incubaron por una hora y los pozos se lavaron con amortiguador de lavado (PBS + 0.1% de tween 20) tres veces. Los sitios vacíos en el pozo se bloquearon con una solución de gelatina al 5% en PBS durante dos horas y la placa se lavó con amortiguador de lavado tres veces. Se prepararon los sueros de once pacientes alérgicos y uno no alérgico como control negativo en una relación 1:10 con PBS. Estos se distribuyen en los pozos de la placa adicionando 100 µl de cada uno, se dejan en incubación durante doce horas a 4°C. Una vez transcurrido este tiempo se incubaron durante una hora para reactivar la reacción. Después se lavan con amortiguador de lavado tres veces y se adicionan 100 µl del anticuerpo biotina ε-específica (anti-IgE de humano) en una dilución 1:1000 en PBS, se incubó durante una hora y media, se lava y se adiciona 100 µl de estreptavidina unida a peroxidasa en una dilución 1:2000 en PBS, se incubó durante una hora y media se lavaron con amortiguador de lavado. Después del lavado se preparó una solución de orto-fenilendiamina (OPD) 10 mg en 25 ml de amortiguador de citrato sódico 0.15 M pH 5; se añaden 25 µl de peróxido de hidrógeno al 30%. De esta solución que sirve como sustrato se adicionaron 100 µl a cada pozo, se dejó la reacción durante 15 min a oscuridad, pasado este tiempo la reacción se paró con 50 µl de HCL 6N en cada pozo. Las muestras se leen en un lector automatizado para placas de ELISA a 490 nm.

Nota: Todas las incubaciones se realizaron a 37 °C.

Cristalización del alérgeno Hev b 8. 0102.

La cristalización de proteínas es un proceso en el que las moléculas se agrupan de manera ordenada en una red cristalina tridimensional a partir de la formación de centros de nucleación. Se han propuesto diferentes métodos para la formación de cristales, en los que se varían diferentes factores como la concentración de proteína, la temperatura, el pH y

diferentes agentes precipitantes. Otros factores como la pureza, el grado de dispersión y la edad de la proteína son importantes para lograr cristalizarla.

Para las pruebas de cristalización se concentró la proteína en un sistema Microcon de 5mg/ml a 10 mg/ml en amortiguador Tris-HCl 50 mM pH 7.5. La técnica para cristalizar es difusión directa en fase de vapor utilizando la modalidad de gota colgante a 18°C. Se probaron dos kits de HAMPTON (Crystal Screen y Crystal Screen 2) los cuales están diseñados para proteínas, péptidos, y ácidos nucleicos. En total se probaron 98 condiciones siguiendo el mismo procedimiento para cada una.

Se colocaron 400 μ l de cada una de las disoluciones con el agente precipitante en los pozos de las cajas limbro de cultivo de tejidos. En el cubreobjetos siliconizado se colocaron 3 μ l a esta gota se le adicionan 3 μ l de la solución de proteína. El cubreobjetos se invierte sobre el pocillo, sellando con grasa de silicona. Se registró el tiempo de cristalización observando desde el inicio de la prueba. Aquellas condiciones en las que se obtuvieron cristales se registraron y se implementaron diferentes estrategias para optimizar el crecimiento de los cristales variando concentración de agente precipitante, concentración de proteína, temperatura o adicionando una mezcla de aceites para hacer más lenta la cristalización. En este trabajo para la variar la temperatura se utilizó un equipo TG40 de CENTEO Biosciences probando temperaturas desde los 18° a 22° C con intervalos de 2° C. La temperatura de cristalización en el laboratorio comúnmente utilizada es 18° C.

Caracterización de los cristales.

Para llevar a cabo la caracterización de los cristales, estos se seleccionaron con base en su morfología y dimensiones aproximadas en décimas o centésimas de mm. Se probaron soluciones crioprotectoras de glicerol al 15% y 30%, así como PEG-4000 al 20%, en el líquido madre. Los cristales en la solución crioprotectora se montan en un asa y enfrían en un flujo de nitrógeno líquido a -170° C en el gonióstato de un equipo Micromax007, con detector de imagen fosforescente RAXIS IV++. Los manchas o spots en el detector fueron medidas en dos fotografías con ángulos de rotación ϕ de 0° y 90° usando radiación de Cu (1.54 Å). El programa para coleccionar y analizar los datos fue CrystalClear (D*Trek).

Resultados y Discusión.

En la actualidad la producción de proteínas recombinantes se ha convertido en una herramienta útil para el estudio de su actividad y estructura. Debido a que en algunas ocasiones los organismos donde encontramos a las proteínas de interés no las producen en cantidades suficientes o se presentan varias isoformas de la misma, lo que complica su separación, o bien porque su purificación por los métodos convencionales resulta costosa y casi imposible, entonces se recurre al uso de la biología molecular para clonarlas y sobreexpresarlas. En este trabajo decidimos clonar y expresar a la profilina del hule, ya que en la fuente natural es poco abundante y además existen seis isoformas reportadas. Un error en el diseño de los oligonucleótidos dio lugar a una mutación al azar en el aminoácido S2T, comparada con la reportada en el GenBank, esta mutación no representa un cambio determinante ya que son aminoácidos del mismo tipo, al presentar un grupo hidroxilo.



Figura 4. Secuencia de aminoácidos obtenida para la isoforma rHev b 8.0102 con una mutación en S2T.

El producto de PCR obtenido se ligó entre los sitios *BamHI* y *HindIII* del vector pET28. La construcción diseñada para la expresión de rHev b 8.0102 se muestra en la figura 4, la cual tiene un Histag para facilitar su purificación y un sitio de enterocinasa para que después del corte se elimine el péptido de histidinas. Para la construcción se obtuvo un total de 170 aminoácidos con una masa molecular teórica de 18297.5 Da y se realizó su transformación en dos cepas diferentes de *E. coli* para probar la eficiencia en su sobreexpresión. Las cepas utilizadas fueron rosetta (DE3) y BL21 (DE3) PLYS, recomendadas en la expresión de proteínas heterólogas y porque en este tipo de sistemas de expresión aseguramos tener un

buen control en la transcripción y traducción de la proteína de interés. En este tipo de sistemas el vector de expresión pET incorpora una región promotora o promotor T7 reconocida por la T7 RNA polimerasa de esta manera tras la adición del IPTG, la T7 RNA polimerasa expresada desde el cromosoma bacteriano induce la sobre-expresión de la proteína a partir del vector.

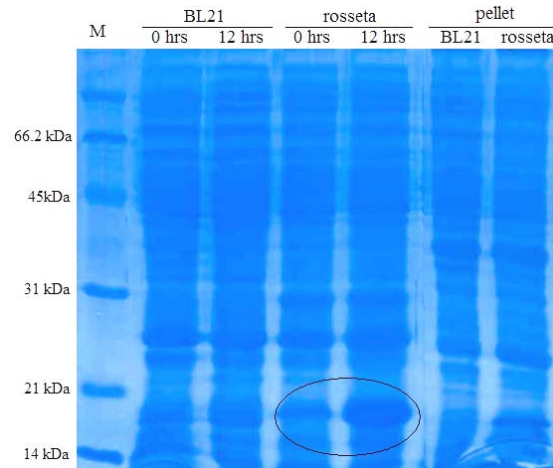


Figura 5. Gel SDS-PAGE al 15%. Pruebas de diferentes cepas de *E coli* para la sobre-expresión de rHev b 8. 0102.

Se tomaron muestras al tiempo 0 y a las 12 hrs de iniciada la sobre-expresión como se muestra en la figura 5. Donde se observa que la mejor expresión se obtuvo con la cepa rosetta (DE3) encerrada en la elipse, encontrando a la proteína justo por abajo del marcador de 21.5 kDa que corresponde a una masa aproximada de 19 kDa, otro punto importante es que la mayor parte de la proteína se encuentra en la fracción soluble. Para determinar el tiempo al cual tenemos la mayor expresión de la proteína se realizó una cinética de inducción que se muestra en la figura 6.

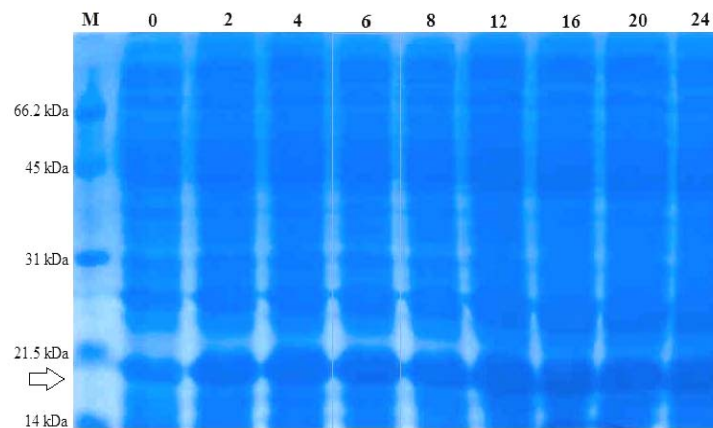


Figura 6. Gel SDS-PAGE 15 %. Cinética de inducción de rHev b 8.0102 con IPTG del tiempo 0 a las 24 Hrs.

En el gel para la cinética de inducción con IPTG se puede observar que con 4 hrs es suficiente para tener un rendimiento óptimo en la sobre-expresión, pero tomando en cuenta los tiempos para todo el proceso de sobre-expresión, por comodidad podemos dejar transcurrir 12 hrs.

Sobre-expresión y purificación.

La sobre-expresión de la proteína se realizó durante 12 hrs, y a partir de de un litro de medio LB se obtuvieron 2.6 g de paquete celular. Éste se resuspendió en 80 ml de amortiguador de lisis con el PMSF 1mM, se sónico, se centrifugó, el sobrenadante se filtró por una membrana 0.22 μm y se aplicó a una columna de Ni^{2+} Hi Trap. La figura 7 muestra el perfil de elución obtenido en la columna de afinidad donde tenemos dos máximos que corresponden a la fracción retenida.

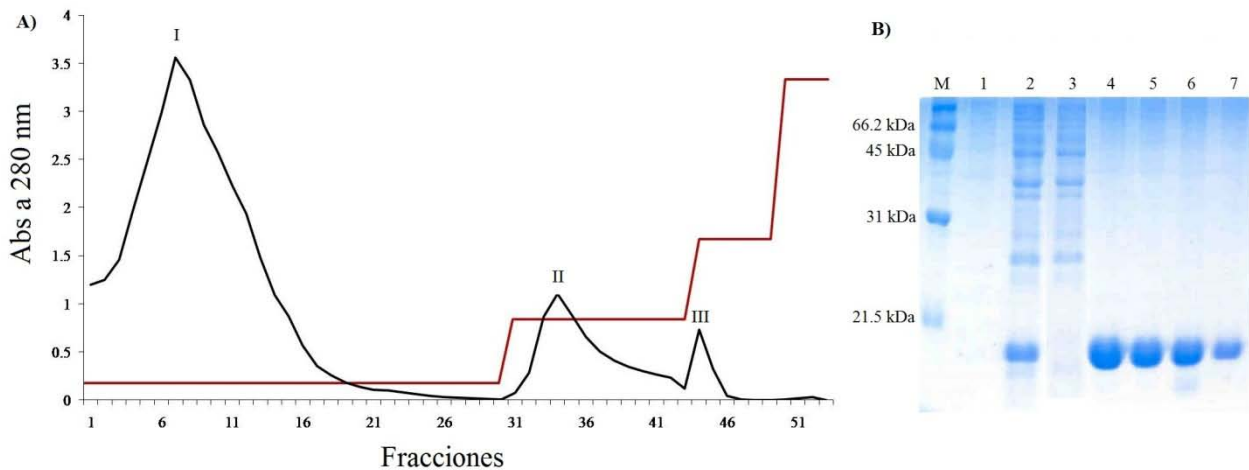


Figura 7. **A.** Perfil de elución de la columna de afinidad a Ni^{2+} . La línea roja muestra la absorbancia a 280 nm y las etapas del escalamiento de imidazol en la línea azul. **B.** Gel SDS-PAGE al 15% en donde tenemos los marcadores de peso molecular; carril 1, extracto celular sin inducir; carril 2, la inducción del extracto a las 12 hrs; carril 3, lavado con amortiguador con 10 mM imidazol; carriles 4 y 5, lavado con 50 mM imidazol; carriles 6 y 7, lavado con 100 mM imidazol.

Como se puede apreciar en el gel (fig.7 B), en el primer lavado con 10 mM de imidazol se eliminaron varias impurezas que corresponde a la fracción no retenida (carril 3, fig. 7 B). Después se utilizaron diferentes concentraciones de imidazol para obtener a la proteína retenida en la columna de afinidad en los picos II y III del cromatograma (fig.7 A). La presencia de la profilina más el péptido con histidinas, se observa de los carriles cuatro al siete de la figura B, donde encontramos una banda por abajo del indicador de peso molecular de

21.5 kDa. Resulta importante resaltar que en el extracto celular de *E. coli* encontramos diferentes proteínas, que tienen la capacidad unirse a la columna de afinidad por su contenido de histidinas. Estas últimas no se encuentran en cantidades importantes, pero fue necesario eliminarlas de las fracciones, ya que pueden provocar agregación o degradación de la proteína de interés.

La fracción que contiene a la proteína de interés se aplicó una columna de exclusión molecular, para eliminar varios componentes que se pegaron inespecíficamente a la columna de afinidad. El perfil de elución se muestra en la figura 8 donde se observa un pico mayoritario que corresponde a rHev b 8.0102 Por lo tanto, se colectaron las fracciones y se preparó la reacción de corte con enterocinasas.

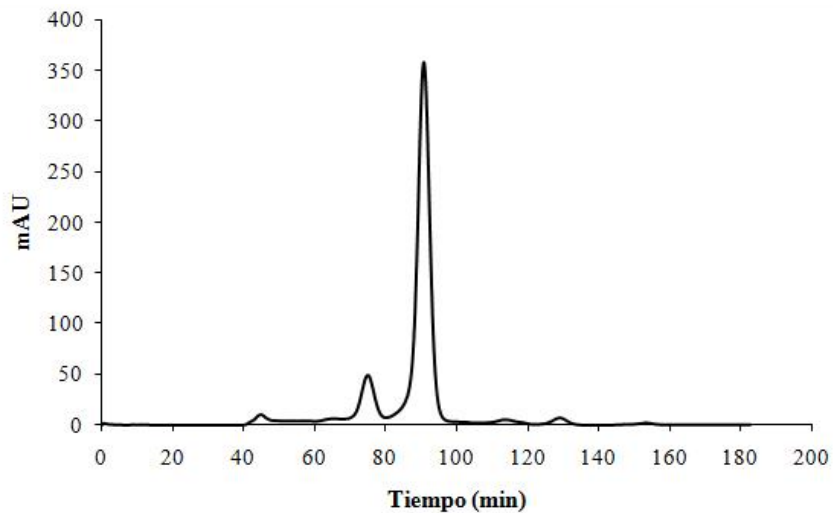


Figura 8. Perfil cromatográfico de exclusión molecular para la fracción representativa de rHev b 8 en una columna superdex™ 75 10/300. El pico mayoritario corresponde a las fracciones 29-31.

Corte con enterocinasa.

Las pruebas de corte con EK-Max se realizaron con el amortiguador Tris-HCl 50 mM pH 7.5; adicionando al paso final de la reacción 10mM CaCl₂ y tween 20 o Triton X-100 al 0.1%, incubando por un tiempo de 18 hrs a 37° C (figura 9). Esto para determinar la eficiencia de la enzima y las cantidades necesarias de rHev b 8.0102.

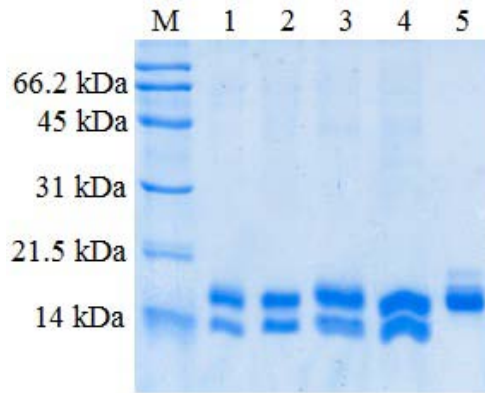


Figura 9. Gel SDS-PAGE del 15%. Carril 1) 0.1 U de EK-Max + tween 20, carril 2) 0.1 U de EK-Max + triton X-100, carril 3) 1 U de EK-Max + tween 20, carril 4) 1 U de EK-Max + triton X-100, carril 5) rHev b 8 más péptido con Histag.

Se realizaron primero las pruebas de corte variando la concentración de la enzima y utilizando tween 20 al 0.1%; sin embargo, no se tuvieron buenos resultados ya que la eficiencia del corte fue menor al 50%. Por lo tanto se probó otro agente surfactante como el triton X-100 con el cual el corte con la enzima fue un poco mayor al 50% de eficiencia. Entonces, si se requiere 1 mg de profilina tendríamos que utilizar 50 unidades de enterocinasa. El bajo rendimiento se puede deber a que el sitio de corte para la enzima pudiera no estar expuesto y una forma de relajar el plegamiento es con la adición de un agente caotrópico disminuyendo las interacciones entre grupos hidrofóbicos. Cabe mencionar que también se modificaron otros factores como la temperatura, tiempo de incubación y un aumento en la concentración de CaCl₂ para incrementar la actividad de la enterocinasa. Una vez establecidas las condiciones de corte del Histag de rHev b 8 el siguiente paso fue una segunda cromatografía de afinidad a Ni²⁺ para separar a la profilina del péptido poli-histidina. En la figura 10 se presenta el perfil de elución de este segundo paso por columna de afinidad en las mismas condiciones.

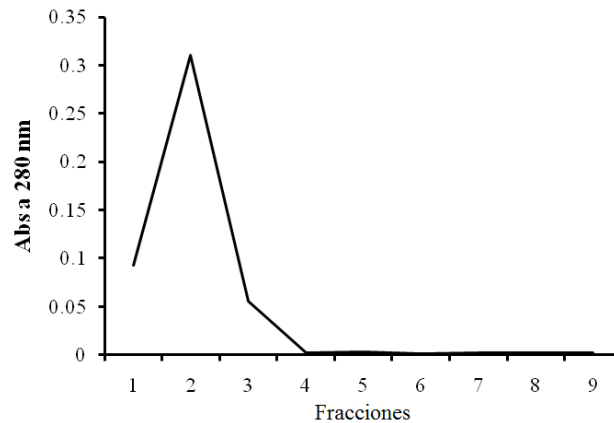


Figura 10. Cromatografía de afinidad a Ni^{2+} , después de la reacción de corte con enterocinasa de rHev b 8 más el péptido con Histag. El pico obtenido corresponde a rHev b 8. 0102 que se encuentra en la fracción no retenida.

En este caso se retuvo el péptido con el Histag en la columna de afinidad a Ni^{2+} y se recuperó a la proteína recombinante en la fracción no retenida. Sin embargo, una fracción de la proteína retenida también contiene a la profilina con el péptido de histidinas, por lo que se eluyó con imidazol 100 mM, se dializó con membrana de 10,000 MWCO eliminando el fragmento pequeño e imidazol y recuperando a la proteína más el péptido con el Histag para su posterior procesamiento con la enzima. Para corroborar la purificación en cada uno de los pasos se realizó un gel de seguimiento de la purificación, el cual se muestra en la figura 11.

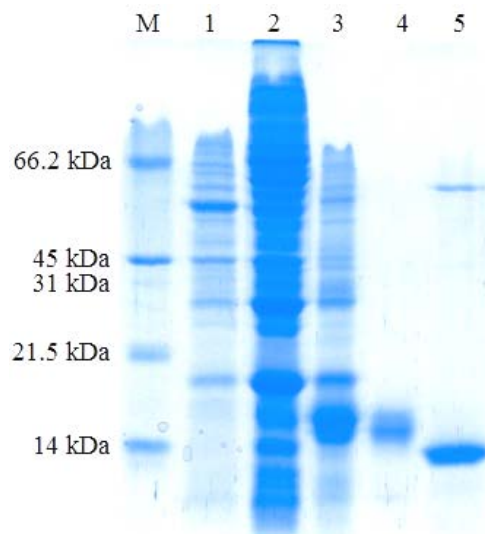


Figura 11. Gel SDS-PAGE del 15%, Carril 1) marcadores; carril 2) Cultivo sin inducir; carril 3) cultivo inducido con IPTG; carril 4) Cromatografía de afinidad a Ni^{2+} ; carril 5) Proteína más péptido con histag después de cromatografía de exclusión; carril 6) rHev b 8 después de la reacción de corte pasando por cromatografía de afinidad a Ni^{2+} .

De acuerdo a la figura 11 se puede observar una banda por debajo del marcador de peso molecular de 66.2 kDa, lo que sugiere que la proteína pura presenta cierto grado de oligomerización. Este oligómero correspondería a un tetrámero, que probablemente sea muy estable ya que se encuentra en condiciones desnaturalizantes en el gel. Por lo tanto, consideramos importante verificar este punto por espectrometría de masas MALDI-TOF.

El rendimiento total de la expresión, a partir de 1 L de cultivo es de 15.2 mg de rHev b 8 más el péptido con histag, lo que se traduce en un 1.4% , de la proteína soluble que se expresó en *E. coli*, y aproximadamente 10 mg de la proteína sin el péptido poli-His. Este rendimiento es mayor si se compara con lo reportado para profilinas de plantas (Vrtala *et al.*, 1996). Es importante mencionar en este punto que en esta purificación de profilina no se utilizó una columna de afinidad a poli-prolina, por la que presenta alta afinidad, (Lu J, Pollard TD, 2001; Kasina *et al.*, 2005) como se había reportado por otros grupos de trabajo para diferentes tipos de profilinas de tipo recombinante. En estos casos, eluyen a la profilina utilizando urea 6 M y posteriormente la renaturalizan dializando y bajando lentamente la concentración de urea (Ganglberger *et al.*, 2001; Lind SE *et al.*, 1987), lo que posiblemente afecte su plegamiento.

Caracterización de la proteína.

Determinación de la masa molecular.

La masa molecular teórica de acuerdo a la secuencia de aminoácidos de rHev b 8. 0102 es de 14165.2 Da para el monómero y la relación m/z por espectrometría de masas para el ion molecular (MH^+) fue de 14164.7 y de 7082.8 para el ion MH_2^{2+} como se muestra en la figura 12.

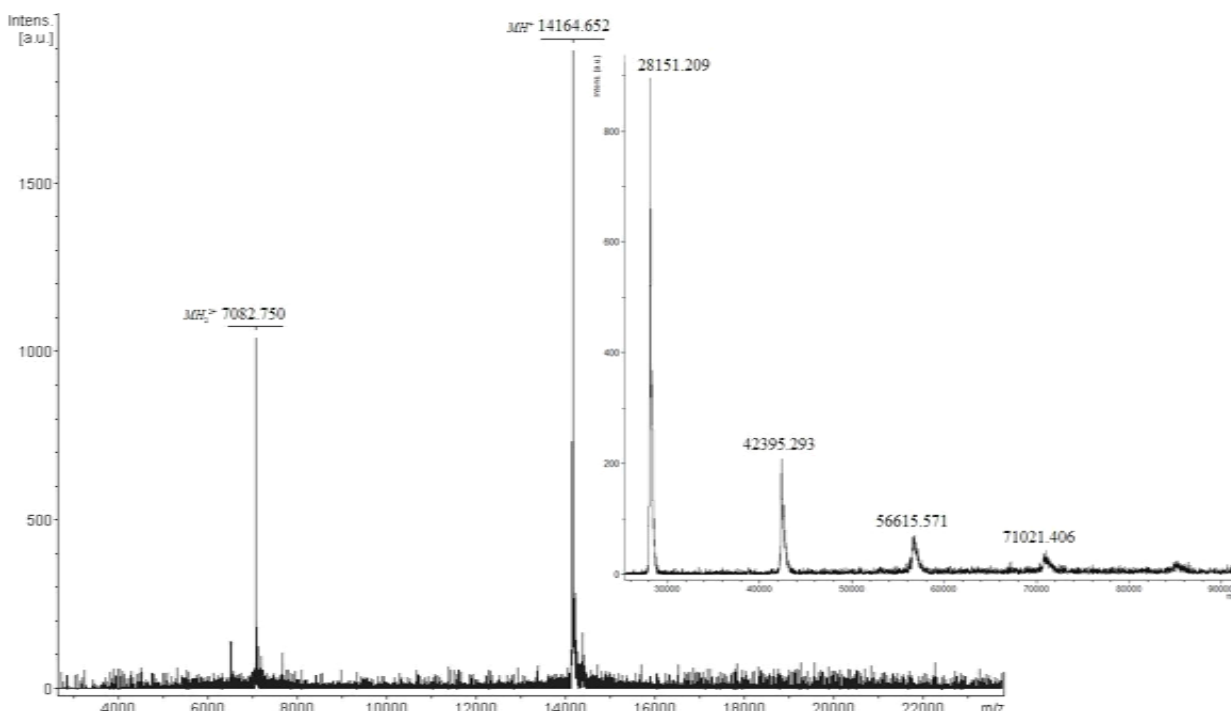


Figura 12. Espectro de masas de la profilina donde el pico base corresponde a la relación m/z 14164.65.

Abriendo la ventana en el espectro de masas encontramos la presencia del dímero con una relación m/z de 28151.2, hasta la forma hexamérica de la proteína. La forma tetramérica presenta una estabilidad clara, ya que estando en condiciones desnaturalizantes no se logra deshacer el oligómero, como se muestra en el gel de la figura 11. Existen evidencias de que algunas profilinas se encuentran como dímero o tetramero, ya sea por unión covalente entre puentes disulfuro o por interacciones iónicas (Korupolu RV *et al.*, 2009). Los factores que pueden influir en la oligomerización son distintos como son: el amortiguador, el grado de interacción entre residuos que generen enlaces covalentes como cisteínas de diferentes monómeros, temperatura, pH, entre otros. En este caso, una posible explicación sería que la

profilina pudiera estar formando uniones covalentes a través de puentes disulfuro entre diferentes cadenas polipeptídicas, por medio las cisteínas libres y conservadas en todas las isoformas (figura 13). La cisteína trece del amino-terminal al encontrarse más expuesta puede ser la que esté interaccionando; sin embargo, también pueden haber interacciones más débiles y que en conjunto le den mayor estabilidad a estos oligómeros. Dando como resultado diferentes estados de oligomerización, como se muestra en el espectro de masas (figura 12).

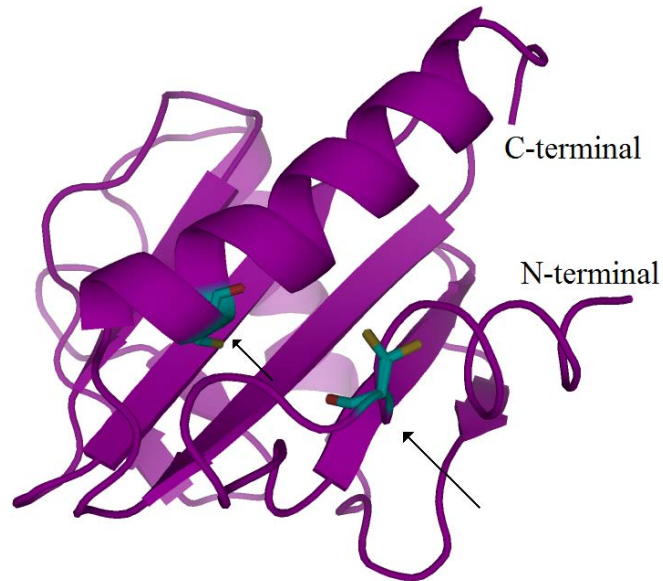


Figura 13. Cisteínas conservadas de Hev b 8.

Determinación del contenido de estructura secundaria.

La muestra se preparó a una concentración de 0.2 mg/ml y se utilizó para la línea base Amortiguador de fosfato de Na. El espectro de dicroísmo circular fue obtenido por el promedio de tres repeticiones en un equipo jasco J-710 con un termostato 423S. El cálculo de contenido de estructura secundaria se realizó con el software CDNN.

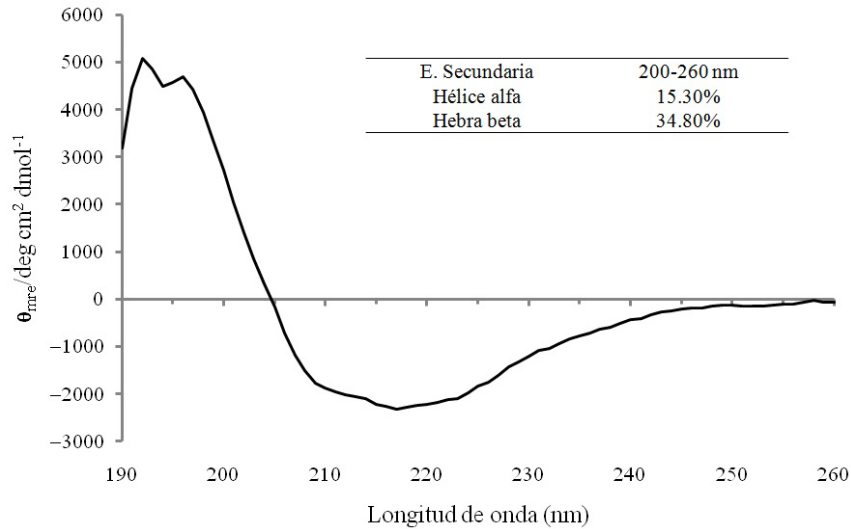


Figura 14. Espectro de D. C. de la profilina pura. Temperatura 20°C, amortiguador de fosfato de Na 10mM pH 7, celda con un paso óptico de 0.1 cm. velocidad 20nm/min., Intervalos de una unidad de 190 a 260 de nm.

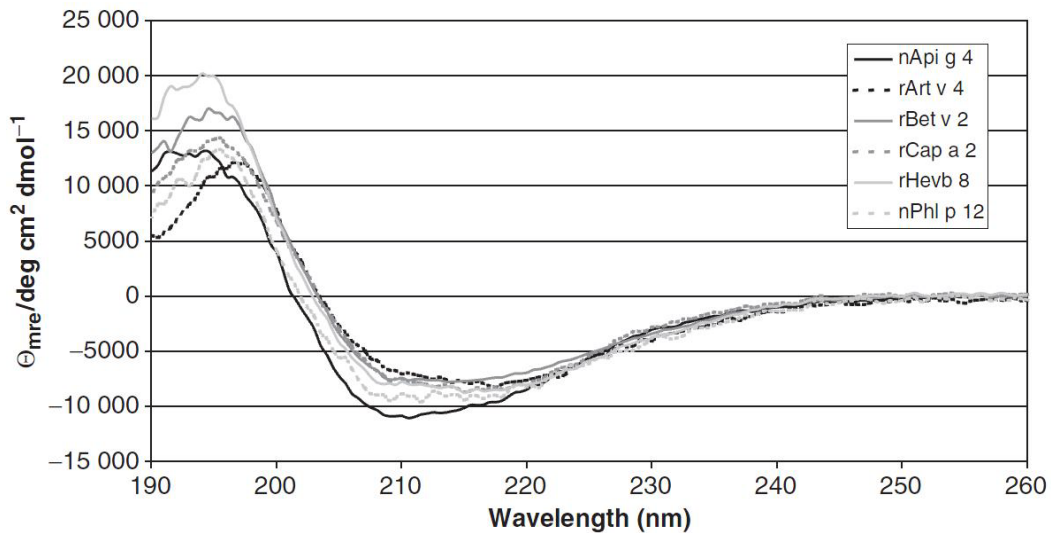


Figura 15. Espectros de D.C. de diferentes profilinas alergénicas. El espectro se obtuvo con una concentración de 0.1 mg/ml a temperatura ambiente. Los datos son el promedio de 3 acumulaciones (Radauer *et al.*, 2006).

En el espectro de dicroísmo en la figura 14 se pueden observar un máximo positivo entre 190-200 nm y que corresponden a una transición $\pi \rightarrow \pi^*$ para hélice alfa y hoja beta respectivamente. Las señales no se intensificaron tanto para los mínimos característicos, que son 208 y 222 nm para transiciones $\pi \rightarrow \pi^*$ y $n \rightarrow \pi^*$ respectivamente, y que corresponden a hélice alfa. Así mismo la señal que va de 215-220 nm para una transición $n \rightarrow \pi^*$ nos indica la existencia de hoja beta. La magnitud y posición de las señales indican un contenido de estructura secundaria similar al reportado en la estructura tridimensional para la isoforma de Hev b 8 (código PDB: 1G5U) resuelta a 3.2 Å de resolución, con un 24% hélice alfa y 21% hoja beta. Comparado el espectro que obtuvimos para rHev b 8.0102 (figura 14) con los reportados para diferentes profilinas clasificadas como alérgenos de la figura 15 (Radauer *et al.*, 2006), se observa una gran similitud; sin embargo, estas últimas fueron purificadas utilizando una columna de poli-prolina, por lo que su plegamiento podría ser diferente. Otro punto importante es que el espectro obtenido para rHev b 8.0102 es típico de proteínas con una estructura alfa + beta, de acuerdo a la clasificación de la base de datos SCOP (<http://scop.mrc-lmb.cam.ac.uk/scop/>).

Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA).

Para medir la capacidad de unión de la profilina rHev b 8.0102 a IgEs de pacientes alérgicos al hule se realizaron ELISAs (figura 16). Así mismo, se realizaron experimentos paralelos con extractos semipurificados conteniendo profilina tanto de látex de *H. brasiliensis* como de kiwi comparando los resultados obtenidos en todos los casos.

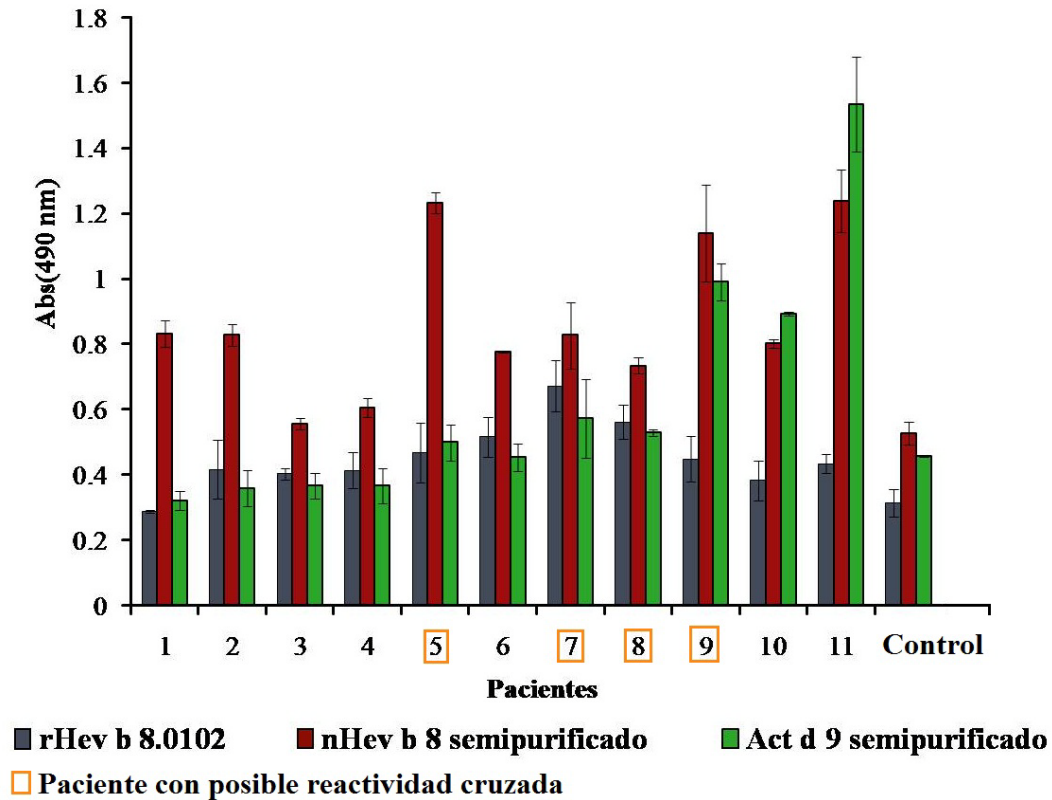


Figura 16. Evaluación del reconocimiento mediante ELISA de rHev b 8 por anticuerpos tipo IgE.

Se seleccionaron 11 sueros de pacientes alérgicos (1-11) y un individuo no-alérgico como control y se evaluó la respuesta de éstos ante rHev b 8.01.02, nHev b 8 semipurificado de suero C de látex y Act d 9 extracto semipurificado de kiwi. Tomando como criterio tres desviaciones estándar por arriba de la media de la respuesta del control, para cada paciente, consideramos el resultado como positivo. El reconocimiento de rHev b 8. 0102 por IgE tuvo una respuesta del 45.5% de los pacientes, que es un valor esperado, cuando consideramos a las profilinas como alérgenos menores (Hauser *et al.*, 2010). Para el nHev b 8 semipurificado del suero C tenemos una respuesta del 81.8%, esto se puede deber a la presencia de Hev b 5 (proteína ácida del látex) y en menor cantidad a Hev b 1, los cuales tienen masas moleculares

similares y son considerados como alérgenos principales, además de otras proteínas que podrían incrementar el reconocimiento por las inmunoglobulinas. El mismo fenómeno se presenta en el extracto de kiwi que tiene una respuesta del 54.5% donde aparte de Act d 9, también encontramos otra proteína que tiene una identidad del 45% con Hev b 5 (Slater *et al.*, 1996) por lo cual se ve incrementada su respuesta. El suero de cuatro de los once pacientes tuvieron respuesta ante las tres “fuentes de alérgeno,” esto posiblemente se puede deber a reactividad cruzada. En este caso, los anticuerpos IgE aparentemente reconocen a la profilina o bien a otra proteína que presente determinantes antigénicos similares, y que se encuentren en los extractos semipurificados del suero c y de kiwi.

Cristalización del alérgeno Hev b 8.0102.

Se probaron todas las condiciones del Crystal Screen y Crystal Screen 2 de HAMPTON, utilizando el método de difusión directa en fase de vapor en la modalidad de gota colgante. La concentración de proteína fue de 10.6 mg/ml en amortiguador Tris-HCl 50 mM pH 7.5. Se obtuvieron cristales a los cinco días en tres condiciones del crystal screen (Figura 17).

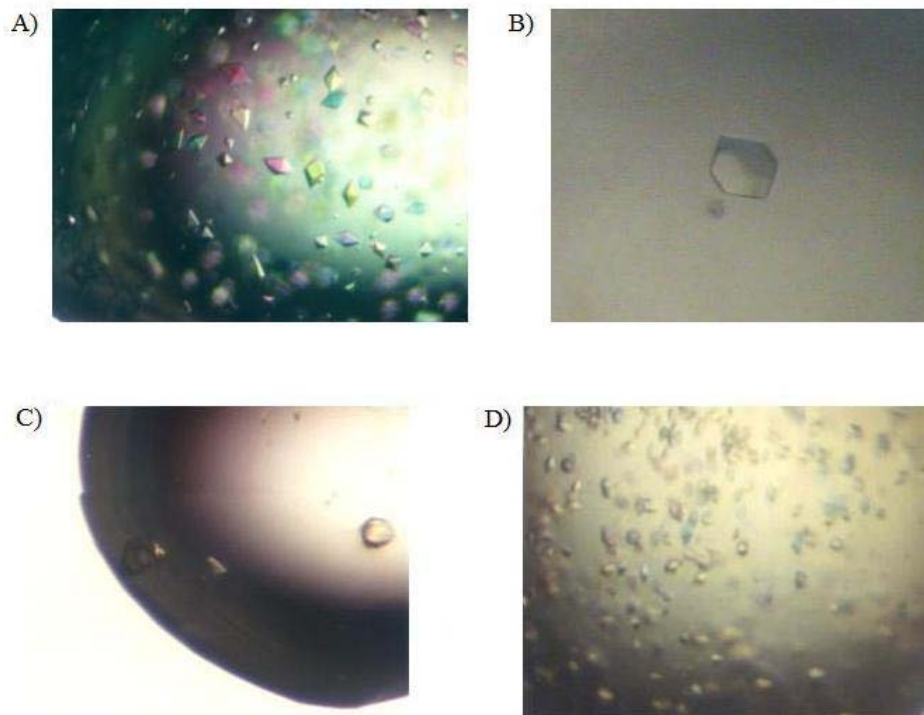


Figura 17. Cristales de rHev b 8.0102 obtenidos en diferentes condiciones: A) Sol. 4 de crystal screenTM, B) Condición A+ Capa de aceites (Silicon y parafina 1:1) en el pozo, C) Sol. 29 de crystal screenTM, D) Sol. 38 de crystal screenTM.

Tabla V. Condiciones de cristalización para rHev b 8. 0102.

Condición	Agente precipitante
4 Crystal Screen	Tris 0.1 M pH 8.5 y sulfato de amonio 2 M
29 Crystal Screen	HEPES 0.1 M pH 7.5 y tartrato de sodio y potasio *4H ₂ O 0.8 M
38 Crystal Screen	HEPES 0.1 M pH 7.5 y citrato de sodio 1.4 M

Como se puede observar en la figura 17 en panel A se obtuvieron cristales pequeños de una morfología octaédrica. Al adicionar una capa de aceites en el pozo y hacer más lenta la evaporación de la gota que contiene a la proteína en una concentración menor (5 mg/ml) los cristales aumentaron de tamaño como se muestra en el panel B. Los cristales mostrados en el panel C tienen un mejor tamaño y se encuentran en menor número; sin embargo, se formó una nata sobre la gota lo que dificulta su manipulación. Finalmente en el panel D se observan cristales más pequeños que los observados en el panel A.

Teniendo en cuenta que la temperatura es un factor importante para la cristalización (Shmit, 2010) se realizó una variación de ésta en la condición 4 del crystal screen. En los límites de temperatura entre 14 °C y 20 °C. Se observa un mejor tamaño de los mismos a 20 °C como se muestra en la figura 18.

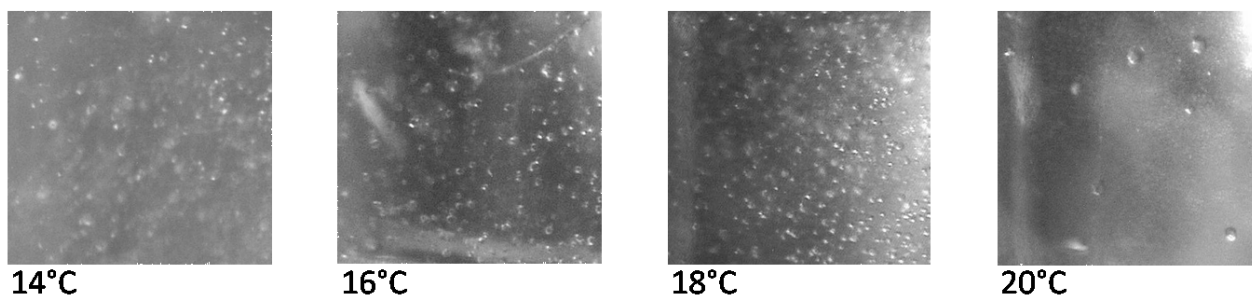


Figura 18. Variación de la temperatura para la condición 4 del crystal screen. El experimento se realizó en un equipo TG40 de CENTEO Biosciences.

En los cuatro experimentos se disminuyó la concentración de proteína a 5 mg/ml, adicionando solo 1µl de la muestra más un 1µl de la solución precipitante. Las imágenes de los cristales se adquirieron al quinto día de iniciada la prueba en un microscopio Stemi SV 11 objetivo S 2,5X. En 14 y 16 °C el tamaño de los cristales no cambió mucho con respecto a la temperatura de cristalización del laboratorio que es de 18 °C; sin embargo, sólo 2° C por arriba de esta temperatura el tamaño mejora. Está descrito que al cambiar la temperatura se puede modificar la solubilidad de la proteína lo que puede a su vez afecta el crecimiento o formación de los cristales (Landsberg *et al.*, 2006).

Caracterización de los cristales.

Los cristales seleccionados para su caracterización fueron los que se crecieron en la condición cuatro del crystal screen (panel A de la figura 17), utilizando técnicas de difracción de rayos X. Se probaron varias soluciones crioprotectoras, resultando la más adecuada la de glicerol al 30% en el líquido madre. Un cristal en solución crioprotectora fue montado en una asa y enfriado en un flujo de nitrógeno líquido a -170 C en el gonióstato de un equipo Micromax007, con detector de imagen fosforescente RAXIS IV++. Los cristales difractaron a 3.1 \AA de resolución y a 2.9 \AA con radiación de sincrotrón; siendo estables en ambas condiciones. El programa para coleccionar y analizar los datos fue Crystal Clear (D*Trek). La red cristalina probable es tetragonal, teniendo hasta el momento dos posibles grupos espaciales:

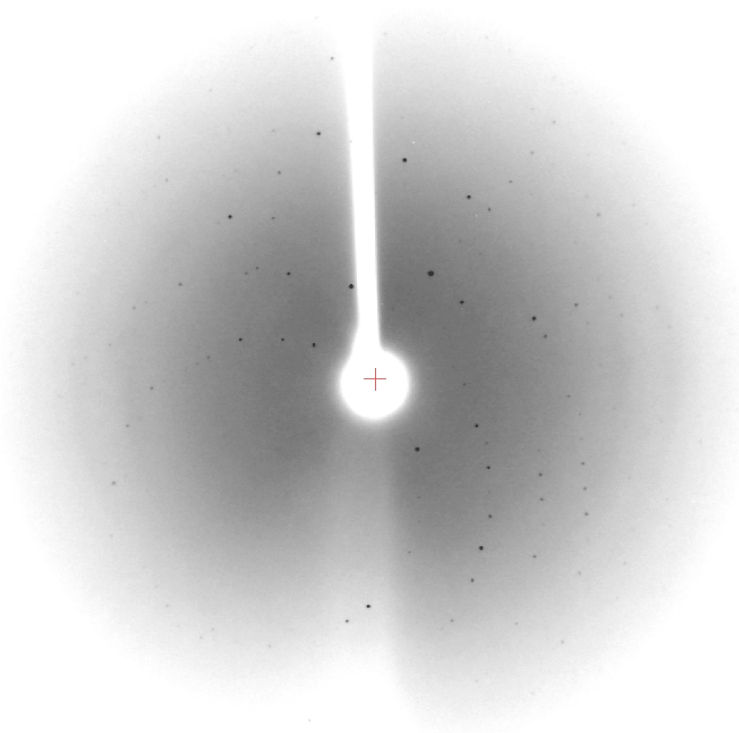


Figura 19. Patrón de difracción de rHev b 8. 0102.

Tabla VI. Datos cristalográficos de los posibles grupos espaciales para el cristal de la condición 4 del Crystal Screen.

Grupo espacial	P 4 2 2	P 4 ₃ 2 ₁ 2
Promedio de la celda unitaria	a=57.58, b= 57.58, c=131.95	a=57.58, b= 57.58, c=131.90
Rango de resolución	43.38-2.86 (3.01-2.86)	43.37-2.89 (3.05-2.89)
Total de reflexiones	27277	30207
Total de reflexiones únicas	5396	5386
R _{merge}	0.085 (0.886)	0.085 (0.793)
Integridad	97.1 (98.6)	99.7 (98.9)
Multiplicidad	5.1 (5.1)	5.6 (5.7)
Promedio de (I)/ σ (I)	17.1 (1.7)	18.7 (2.0)

Los datos mostrados fueron obtenidos en la línea X6A del sincrotrón Brookhaven National Laboratory en Upton, New York. Cabe señalar que estos son los datos preliminares de un solo tipo de cristal, falta probar los cristales obtenidos en las otras dos condiciones y seleccionar los mejores para obtener la estructura tridimensional. Además se buscará optimizar el crecimiento y calidad de los cristales variando los agentes precipitantes, concentración de los mismos, así como temperatura y adición de aditivos.

Conclusiones.

El sistema de expresión pET28, *E coli* rosetta (DE3) es eficiente para la sobre-expresión de la proteína Hev b 8.0102. Se logró obtener una buena cantidad de proteína soluble y sin utilizar condiciones agresivas que resultaran desfavorables en el plegamiento de la cadena polipeptídica. El rendimiento es de 10 mg por litro de cultivo.

Teniendo como base la secuencia de los aminoácidos de esta isoforma se realizó una caracterización por espectrometría de masas en la que se demostró que el peso molecular del monómero de rHev b 8. 0102 coincide con el teórico de 14.16 kDa. Se apreció un proceso de oligomerización, tanto en el espectro de masas como en los geles de SDS-PAGE, siendo la forma tetramérica muy estable aun en condiciones desnaturalizantes. Con la obtención de los espectros de D.C. se demostró que rHev b 8. 0102 posee un plegamiento característico para proteínas $\alpha+\beta$ con un porcentaje de estructura secundaria similar al descrito para este tipo de proteínas.

Mediante una prueba serológica por ELISA se demostró que existe 45.5 % de reconocimiento del alérgeno rHev b 8. 0102 por las IgEs de sueros de pacientes alérgicos. Esta respuesta puede estar relacionada a la reactividad cruzada por la sensibilización con profilina.

Se encontraron tres condiciones propicias para la cristalización del alérgeno Hev b 8. 0102. Con los cristales obtenidos en la condición cuatro del Crystal Screen se demostró que la temperatura es un factor determinante en el crecimiento y se obtuvieron los primeros datos de difracción de rayos X para dicha condición. Los datos obtenidos demuestran que estos cristales difractan a una resolución media.

Perspectivas.

En la purificación de la proteína se pretende agregar una pequeña concentración de algún agente reductor para evitar la posible formación de enlaces disulfuro entre las cisteínas presentes en la proteína. Esto con el fin de realizar nuevamente pruebas de corte con la enterocinasa, esperando que mejore el rendimiento.

Corroborar con un gel nativo la presencia de oligómeros y mediante pruebas de dispersión dinámica de luz medir el grado de oligomerización mixta de la proteína en solución. Probar diferentes amortiguadores o soluciones, esto con el fin de encontrar el medio en el que tengamos a la proteína monodispersa y tener una mejora en la calidad de los cristales.

Caracterizar los cristales que se han obtenido hasta el momento en las otras condiciones, por las técnicas de difracción de rayos X ya descritas. Optimizar las condiciones de cristalización mediante la adición de otros agentes precipitantes o aditivos o bien variando su concentración, para tratar de mejorar la calidad de los cristales y por lo tanto la resolución a la cual difractan los rayos X. Determinar la estructura de rHev b 8. 0102 a partir de los datos de difracción de los cristales de mejor calidad.

Bibliografía.

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

Aparicio-Fabre R, Guillén G, Estrada G, Olivares-Grajales J, Gurrola G, Sánchez F. (2006). Profilin tyrosine phosphorylation in poly-L-proline-binding regions inhibits binding to phosphoinositide 3-kinase in *Phaseolus vulgaris*. *The Plant Journal*, 47: 491–500.

Cheng L, Lee D. (1999). Review of latex allergy. *J Am Board Fam Pract*, 12: 285-92.

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

Ganglberger E, Radauer C, Wagner S, Ríordáin GO, Beezhold DH, Brehler R, Niggemann B, Scheiner O, Jensen-Jarolim E, Breiteneder H.(2001). Hev b 8, the *Hevea brasiliensis* Latex Profilin, Is a Cross-Reactive Allergen of Latex, Plant Foods and Pollen. *Int Arch Allergy Immunol*, 125: 216-227.

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

Hauser M, Egger M, Wallner M, Wopfner N, Schmidt G, Ferreira F.(2008). Molecular Properties of Plant Food Allergens: A Current Classification into Protein Families. *The Open Immunology Journal*, 1: 1-12.

Hauser M, Roulias A, Ferreira F, Egger M. (2010). Panallergens and their impact on the allergic patient. *Allergy, Asthma & Clinical Immunology*, 6:1

Kasina S, Rizwani W, Radhika KV, Singh SS. (2005). Nitration of Profilin Effects Its Interaction with Poly(L-proline) and Actin. *J. Biochem.*, 138: 687-695.

Koh D, Ng V, Leow YH, Goh CL.(2005). A study of natural rubber latex allergens in gloves used by healthcare workers in Sengapore. *Br J Dermatol*, 153(5): 954-9.

Korupolu RV, Achary MS, Aneesa F, Sathish K, Wasia R, Sairam M, Nagarajaram HA, Singh SS. (2009). Profilin oligomerization and its effect on poly (L-proline) binding and phosphorylation. *Int J Biol Macromol*. Oct 1; 45(3):265-73.

Kurup VP, Sussman GL, Yeang HY, Elms , Breiteneder H, Arif SA, Kelly KJ, Bansal N, Fink J N.(2005). Specific IgE response to purified and recombinant allergens in latex allergy. *Clinical and Molecular Allergy*, 3:11.

-
-
- Landsberg MJ, Bond J, Gee CL, Martina JL, Hankamera B. (2006). A method for screening the temperature dependence of three-dimensional crystal formation. *Acta Cryst*, D62: 559–562.
- Lassing I. & Lindberg U. (1985). Specific interaction between phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and profilactin. *Nature*, 314: 472-474.
- Lee MF, Wang NM, Han JL, Lin SJ, Tsai JJ, Chen YH. (2010). Estimating allergenicity of latex gloves using Hev b 1 and hevamine. *J Investig Allergol Clin Immunol*, 20(6): 499-505.
- Lind SE, Janmey PA, Chaponnier C, Herbert TJ, Stossel TP. (1987). Reversible binding of actin to gelosin and profilin in human platelet extracts. *J. Cell Biol*, 105: 833-842.
- Lu J, Pollard TD, (2001). Profilin Binding to poly-L-proline and Actin Monomers along with Ability to Catalyze Actin Nucleotide Exchange is Required for Viability of Fission Yeast. *Molecular Biology of the Cell*, 12: 1161-75.
- Mabe DO, Singh TS, Bello B, Jeebhay MF, Lopata AL, Wadee A. (2009). Allergenicity of latex rubber products used in South African dental schools. *S Afr Med J*, 99(9): 672-4.
- Mahoney NM, Janmey PA, Almo SC. (1997). Structure of the profilin-poly-L-proline complex involved in morphogenesis and cytoskeletal regulation. *Nature Structural & Molecular Biology*, 4: 953-960.
- Nieto A, Mazón A, Estornell F, et al. (1998). Profilin, a relevant allergen in latex allergy (abstract) *J. Allergy. Clin. Immunol*, 101: S207.
- Nieto A, Mazón A, Boquete M, Carballada F, Asturias JA, Martínez J, Martínez A. (2002). Assessment of profilin as an allergen for latex-sensitized patients. *Allergy*, 57: 776–784.
- Niggeman B & Breiteneder H. (2000). Latex allergy in children. *Int. Arch. Allergy Immunol*, 121: 98-107.
- Poley GE, Slater JE. (2000). Latex Allergy. *J Allergy Clin. Immunol*, 105 (6-1): 1054-1062.
- Pollard TD, Blanchoin L, Mullins RD. (2000). Molecular mechanisms controlling actin filament dynamics in nonmuscle cells. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, 29: 545-576.
- Radauer C, Willerroider H, Fuchs H, Hoffmann-Sommergruber K, Thalhamer J, Ferreira F, Scheiner O, Breiteneder H. (2006). Cross-reactive and species-specific immunoglobulin E epitopes of plant profilins: an experimental and structure-based analysis. *Clin. Exp. Allergy*, 36: 920-929.
-
-

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

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

Rinhs HP, Chen Z, Rozynek P, Baur X, Lundberg M, Cremer R. (2000). PCR-based cloning, isolation, and IgE-binding properties of recombinant latex profilin (rHev b 8). *Allergy*, 55: 712-717.

Schluter K, Jockusch BM, Rothkegel M. (1997). Profilins as regulators of actin dynamics. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1359: 97-109.

Schmit JD, Dill KA. (2010). The Stabilities of Protein Crystals. *J. Phys. Chem. B*, 114: 4020–4027.

Slater JE, Vedvick T, Smith AA, Trybul DE, Kekwick GO. (1996). Identification, Cloning, and Sequence of a Major Allergen (Hev b 5) from Natural Rubber Latex (*Hevea brasiliensis*). *The journal of Biological Chemistry*, 271-41: 25394-99.

Tordesillas L, Pacios LF, Palacín A, Cuesta-Herranz J, Madero M, Díaz-Perales A. (2010) Characterization A. of IgE epitopes of Cuc m 2, the major melon allergen, and their role in cross-reactivity with pollen profilins. *Clinical & Experimental Allergy*, 40: 174-181.

Valenta R, Duchene M, Pettenburger K, Sillaber C, Valent P, Bettelheim P, Breitenbach M, Rumpold H, Kraft D, Sheiner O. (1991). Identification of Profilin as a Novel Pollen Allergen; IgE Autoreactivity in Sensitized Individuals. *Science*, 253: 557-560.

Valenta R, Duchene M, Ebner C, Valent P, Sillaber C, Devillar P, Ferreira F, Tejkl M, Edelmann H, Kraft D, Sheiner O. (1992). Profilins constitute a novel family of functional plant pan-allergens. *J. Exp. Med*, 175: 377-385.

Vallier P, Balland S, Harf R, Valenta R, Deviller P. (1995). Identification of profilin as an IgE-binding component in latex from *Hevea brasiliensis*, *Clin. Exp. Allergy*, 25: 332-339.

Vrtala S, Wiedemann P, Mittermann I, Eichler HG, Sperr WR, Valent P, Kraft D, Valenta R. (1996). High-level Expression in *Escherichia coli* and Purification of Recombinant Plant Profilins: comparison of IgE-Binding Capacity and Allergenic Activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 226: 42-50.

Witke W. (2004). The role of profilin complexes in cell motility and other cellular processes. *TRENDS in Cell Biology*, 14-8 : 461.469.

Wopfner N, Willeroider M, Hebenstreit D, Van Ree R, Aalbers M, Briza P, Thalhamer J, Ebner C, Richter K, Ferreira F. (2002). Molecular and immunological characterization of profilin from mugwort pollen. *Biol. Chem*, 383(11): 1779-89.

Yeang HY, Arif SAM, Yusof F, Sundereasan E. (2002). Allergenic proteins of natural rubber latex. *Methods*, 27: 32-45.

[www.allergen.org/allergen \(aspx\)](http://www.allergen.org/allergen.aspx).

<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>

<http://scop.mrc-lmb.cam.ac.uk>

<http://expasy.org/tools/protparam.html>

AAAAI-American Academy of Allergy Asthma & Immunology 2009