



UNIVERSIDAD NACIONAL **UNAM**
AUTÓNOMA DE MÉXICO POSGRADO 

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

INSTITUTO DE QUÍMICA

CLONACIÓN Y EXPRESIÓN DEL ALÉRGENO HEV B 1
DE *Hevea brasiliensis*.
CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

P R E S E N T A:

Biol. Gerardo Vázquez Del Angel.

Tutor: Dra. Adela Rodríguez Romero.
Instituto de Química

MÉXICO, D. F.

NOVIEMBRE 2012



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

PMDCB/157/2012

GERARDO VÁZQUEZ DEL ANGEL

Alumno (a) de la Maestría en Ciencias Bioquímicas

P r e s e n t e

Los miembros del Subcomité Académico en reunión ordinaria del día 13 de Febrero del presente, conocieron su solicitud de asignación de **JURADO DE EXAMEN** para optar por el grado de **MAESTRO EN CIENCIAS (BIOQUÍMICAS)**, con la réplica de la tesis "Clonación y expresión del alérgeno Hev b 1 de *Hevea brasiliensis*. Caracterización bioquímica e inmunológica", dirigida por la Dra. Adela Rodríguez Romero.

De su análisis se acordó nombrar el siguiente jurado:

PRESIDENTE	Dr. Ismael Bustos Jaimes
VOCAL	Dr. Roberto Arreguín Espinosa de los Monteros
VOCAL	Dra. Alejandra Hernández Santoyo
VOCAL	Dr. Horacio Reyes Vivas
SECRETARIO	Dra. Claudia Rodríguez Almazán

Sin otro particular por el momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

Atentamente

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cd. Universitaria, D.F., a 24 de Febrero de 2012.


DR. ROGELIO RODRÍGUEZ SOTRES
COORDINADOR DE ENTIDAD

C.c.p. Archivo

RRS*lgg

*Es muy fácil creer lo que a uno le gusta o le conviene,
es muy difícil creer en la verdad.*

G. Vázquez

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, el lugar que más amo de México, donde he aprendido muchas cosas y he pasado muchos de los mejores momentos en la vida.

Al posgrado de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas.

A la Dra. Adela Rodríguez Romero por su ayuda, consejos y dirección para la realización de esta tesis.

A la Dra. Patricia Cano Sánchez por la ayuda, asesoría y aportaciones recibidas durante la realización de este trabajo.

A la Dra. Romina Rodríguez Sanoja por la ayuda, asesoría recibida y la estancia en su laboratorio durante la realización de este trabajo.

A los miembros del comité tutorial: Dra. Romina Rodríguez Sanoja y Dr. Ignacio Camacho Arroyo.

A los miembros del jurado que revisaron esta tesis, por sus comentarios y aportaciones.

A mis compañeros e investigadores del laboratorio y del Instituto de Química: Gaby, Anayetzin, Ángela, Carmen, Flor, Joanna, Mónica, Siseth, Christian, Efrén, Ernesto, Gabriel, Israel, Dr. Barbarin y otros que no menciono pero que me ayudaron y alentaron gracias por su apoyo, consejos y amistad.

Se agradece al CONACyT por financiar el proyecto con el No. de convenio 82947.

DEDICATORIA

A mi Señor y Dios Hashem Adonai Elohim.

A mi Señor y Dios Ruach Hakodesh.

A mi Señor y Dios Yeshua Ha'Mashiach.

Gracias por la vida, la ciencia, por este planeta y la maravillosa oportunidad de existir en él.

A mis Hijas el motivo de mi felicidad: Zoe, Heli y Mia.

A Gaby, mi esposa, por mi hija y por toda la ayuda en esta tesis.

A mis padres Artemio y Rosa por permitirme la vida y por todo lo que me han enseñado en estos años.

A mis compañeros del instituto, laboratorio y posgrado con mucho cariño.

A mis hermanos, familiares y amigos que con su ayuda me han impulsado a superarme.

A mis hermanos en la fe que siempre han estado ahí bendiciéndome y alentándome a seguir adelante.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	i
DEDICATORIA	ii
ABREVIATURAS	viii
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
Látex y proteínas	2
Alergia al látex.....	3
Proteínas alergénicas	4
Hev b 1.....	6
Factor de elongación del hule.....	7
Hev b 1, uno de los más importantes alérgenos del látex	8
Hev b1 y Hev b 3	10
HIPÓTESIS	12
JUSTIFICACIÓN	13
OBJETIVO	14
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
MATERIAL Y MÉTODOS	15
Clonación del gen de Hev b 1	15
Sobre-expresión de la proteína recombinante MPB-Hev b 1.....	15
Sobre-expresión de la proteína recombinante Trx-Hev b 1	16
Purificación de la proteína recombinante Trx-Hev b 1	16
Corte con enteroquinasa.....	17
Purificación de Hev b 1 por cromatografía líquida de alta presión (HPLC) en fase reversa	17

Caracterización de Hev b 1.....	17
A) <i>Espectrometría de masas</i>	17
B) <i>Dicroísmo circular</i>	18
C) <i>Predicción de estructura terciaria</i>	18
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	19
Diseño de vectores.....	19
Amplificación por PCR del gen de la proteína Hev b 1.....	19
Ligación del gen de Hev b 1 en los vectores de expresión pMALc2X y pET32a	22
Expresión de la proteína pMBP-Hev b 1	25
Expresión de Trx-Hev b 1	27
Dicroísmo circular y predicción de estructura terciaria.....	34
Modelado tridimensional	36
PhCPN de <i>Pyrococcus horikoshii</i> y Hev b 1.....	41
CONCLUSIONES.....	44
PERSPECTIVAS	46
BIBLIOGRAFÍA.....	47
APÉNDICE	56

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Alérgenos de <i>Hevea brasiliensis</i> reconocidos por el Sub-Comité de Nomenclatura de la WHO/IUIS (Modificado de esta misma fuente)	5
Tabla 2. Contenido de estructuras secundarias determinado por el programa SELCON3.....	35

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Secuencia de aminoácidos de Hev b 1	10
Figura 2. Alineamiento de secuencias de aminoácidos obtenidas del GenBank.....	11
Figura 3. Construcciones para la expresión de Hev b 1.....	19
A) Construcción correspondiente a la proteína de fusión MBP-Hev b 1	19
B) Proteína de fusión Trx-Hev b 1	19
Figura 4. Amplificación del gen de Hev b 1	20
Figura 5. Amplificación del gen de Hev b 1 a partir de cDNA-h de hojas jóvenes.....	21
Figura 6. Restricción de vectores y gen de Hev b 1 con EcoR1 y HindIII	22
Figura 7. Análisis por restricción de las clonas obtenidas	24
A) Trx-Hev b 1 digeridas con XbaI y SacI.....	24
B) MBP-Hev b 1 digeridas con DraI y SacI.....	24
Figura 8. Cinética de expresión de MBP-Hev b 1 en BL2 (DE3) pLysS....	25
Figura 9. Espectro de masas MALDI-TOF	26
Figura 10. Cinética de expresión de Trx-Hev b 1 en C41	28
A) Fracción soluble del lisado celular	28

B) Fracción insoluble del lisado celular	28
Figura 11. Solubilización de Trx-Hev b 1	29
Figura 12. Purificación de Trx-Hev b 1.....	30
Figura 13. Espectro de masas MALDI-TOF de Trx-Hev b 1	31
Figura 14. SDS-PAGE Cinética de digestión con enteroquinasa.....	32
Figura 15. Perfil de elución de la cromatografía de fase reversa	33
A) Muestra antes de la digestión.....	33
B) Muestra posterior a la digestión.....	33
Figura 16. Espectro de masas MALDI-TOF de Hev b 1.....	34
Figura 17. Espectro de dicroísmo circular de Hev b 1.....	35
Figura 18. Predicción de estructura secundaria usando el servidor	
XtalPred.....	36
Figura 19. Representación de listón de la estructura tridimensional de	
Hev b 1	37
Figura 20. Representación de la estructura tridimensional de Hev b 1 y	
 su secuencia de aminoácidos	38
A) Modelo tridimensional en representación de listón	38
B) Modelo de superficie	38
C) Secuencia de aminoácidos.....	38
Figura 21. Alineamiento de secuencias de chaperona prefoldina de	
 <i>Pyrococcus horikoshii</i> OT3 y Hev b 1.....	40
Figura 22. Superposición del modelo de Hev b 1y la prefoldina de	
 <i>Pyrococcus horikoshii</i>	41
Figura 23. Modelo de la posible oligomerización del tetramero de Hev b	
1.....	43

ABREVIATURAS

ADN	Ácido Desoxirribonucleico
cADN	Cadena Complementaria de Ácido Desoxirribonucleico
Da	Dalton, unidad de masa equivalente a la doceava parte de la masa de un átomo de carbono 12
DC	Dicroísmo Circular
EK	Enteroquinasa
Fcε RI	Receptor de alta afinidad tipo I del fragmento cristalizable épsilon
IgE	Inmunoglobulina de tipo E
IPTG	Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido
IUIS	International Union Immunological Societies (Unión Internacional de Sociedades Inmunológicas)
LB	Luria Broth
MBP	Maltose Binding Protein (Proteína de Unión a Maltosa)
PCR	Polymerase Chain Reaction (Reacción en Cadena de la Polimerasa)
PFD	Prefoldinas
PhCPN	Chaperona Prefoldina de <i>Pyrococcus horikoshii</i> OT3
pMBP	Plásmido (Proteína de Unión a Maltosa)-Hev b 1
PMSF	Del inglés Phenylmethylsulfonyl fluoride ó Fluoruro de fenilmetilsulfonilo (Inhibidor de Proteasas de Serina)
pTrx	Plásmido (Tiorredoxina)-Hev b 1
REF	Rubber Elongation Factor (Factor de Elongación del Hule)
SB	Spine Bifid (Espina Bífida)
TRX	Tiorredoxina

RESUMEN

A partir del látex del árbol del hule *Hevea brasiliensis* se obtiene el hule natural y todos sus derivados. En este material se ha observado la presencia de hasta 240 proteínas, de las cuales una cuarta parte poseen capacidad alérgica.

Una de las proteínas más alérgicas es Hev b 1, el cual es el principal alérgeno en la población asiática y en niños con espina bífida, siendo un 45% de esta población exclusivamente sensibilizados por este alérgeno.

Hev b 1 es el primer alérgeno reconocido del látex de *H. brasiliensis* y por sus propiedades es conocido como factor de elongación del hule (Rubber Elongation Factor REF). Es una proteína de 14.7 kDa y naturaleza hidrofóbica que se encuentra íntimamente relacionado a la preniltransferasa, siendo indispensable para que esta última cumpla su función.

En este trabajo se expresó al alérgeno Hev b 1 como proteína de fusión con tiorredoxina, utilizando el vector pET32a y la cepa C41. La proteína expresada se agregó formando cuerpos de inclusión, los cuales fueron solubilizados usando Tween 20 al 0.1%. Hev b 1 se liberó de la proteína de fusión mediante enteroquinasa y se purificó por cromatografía de fase reversa en un HPLC. La masa de la proteína se determinó en 14.6 kDa. Hev b 1 se liberó de la proteína de fusión, se purificó, se optimizó su producción estimando el rendimiento en aproximadamente 70 mg por litro de cultivo. Se observó que la estabilidad de la proteína era mayor en 50 mM Tris-HCL pH 7.6, 100 mM NaCl, 0.1% tween 20. Mediante DC el contenido de estructura secundaria de Hev b 1 mostró un predominio de hélices α mayor a 84%.

Utilizando servidores bioinformáticos se obtuvo un modelo tridimensional por homología, el cual utilizó como modelo a la proteína chaperona prefoldina de *Pyrococcus horikoshii*, la que posee un 24% de identidad con Hev b 1, basados en esto se propone una función y forma de oligomerización.

INTRODUCCIÓN

Látex y proteínas

El látex es un líquido blanco, viscoso con importancia industrial. Se extrae del árbol del hule *Hevea brasiliensis* (Siringa), un miembro de la familia Euphorbiaceae originario de la región del Amazonas. Existen registros que indican que este material era utilizado en Mesoamérica en el siglo VI DC y posteriormente fue llevado a Europa e industrializado. En 1840 Goodyear descubre la vulcanización y posteriormente en 1845, con la invención del neumático, se convierte en un material indispensable para la industria automotriz y ha desempeñado importantes funciones en la historia de la humanidad [M J R Loadman, 1995]. El látex crudo está constituido por el citoplasma de las células laticíferas, que se encuentran adyacentes al floema, las partículas de hule, el cual es un polímero del metilbutadieno o cis-isopreno (C₅H₈) cuyo grado de polimerización es de 2500 a 4500 monómeros [Dennis MS y Light DR., 1989] y por los organelos subcelulares, entre ellos los vacuolisomas o lutoides que combinan funciones tonoplásticas y lisosomales. Estos organelos contienen proteínas relacionadas con los mecanismos de defensa de la planta, como la β 1-3 glucanasa y la quitinasa que, sumadas a la heveína, participan también en los procesos de coagulación que se producen cuando el árbol sufre una herida [Dennis MS y Light DR., 1989]. Es importante mencionar que estas proteínas producen reacciones alérgicas o de hipersensibilidad en individuos con predisposición genética como niños con espina bífida [Turjanmaa, *et al.*, 1996].

El látex puede ser separado mediante ultracentrifugación en tres fases: la fracción superior que contiene en su mayoría partículas de hule, la fracción media que es metabólicamente activa, llamada (suero C), y la fracción del fondo que contiene principalmente los lutoides y a la que se le ha denominado suero B [Dennis MS y Light DR., 1989; Soo Kyung Oh, *et al.*, 1999].

Biológicamente, el mecanismo de defensa del árbol se lleva a cabo cuando éste sufre una herida, lo que provoca que la presión generada por el turgor dentro de las células laticíferas expulse al látex, el cual contiene de un 30 a un 50% (m/m) de cis-1,4-poliisopreno [Dennis MS y Light DR., 1989], así como las proteínas de defensa, agua y otros componentes minoritarios. Ya en el exterior de las células, la síntesis del poliisopreno se lleva a cabo sobre la superficie de las partículas de hule, las cuales se encuentran suspendidas en el látex generando una protección para la herida [Soo Kyung Oh, *et al.*, 1999].

Alergia al látex

La hipersensibilidad al látex es un padecimiento que presenta una serie de manifestaciones clínicas como, urticaria, rinitis, conjuntivitis, bronco-espasmos y en los casos más graves anafilaxia [Birgit Wagner, *et al.*, 1999]. En la población se presenta con una prevalencia menor al 2%. En los grupos de riesgo, como los trabajadores al servicio de la salud y personas expuestas frecuentemente al látex, este valor se incrementa a más del 8% [Kelly, K. J , *et al.*, 1994; Turjanmaa, K, *et al.*, 1996], mientras que los pacientes con espina bífida (SB), la cual es una malformación congénita del tubo neural provocado por la deficiencia de ácido fólico durante el embarazo, presentan una prevalencia extremadamente alta con una tasa de sensibilización de entre un 29% a un 72%, con riesgo de sufrir un choque anafiláctico. Los pacientes con SB tienden a ser constantemente expuestos, desde muy temprana edad y a periodos prolongados de tiempo, con material quirúrgico manufacturado con hule natural y por consiguiente con las proteínas alergénicas presentes en este material, debido a que son sometidos a múltiples cirugías [Kelly, K.J, *et al.*, 1994; Turjanmaa, K, *et al.*, 1996; Michael T, *et al.*, 1996; Nieto A, *et al.*, 1996; Cremer R, *et al.*, 1998].

Las reacciones de hipersensibilidad al látex se presentan en individuos con predisposición genética después de la exposición repetida al alérgeno. Los anticuerpos IgE específicos unidos a los receptores de alta afinidad Fcε RI, que se encuentran en la superficie de los mastocitos y basófilos, interactúan con los alérgenos resultando en la activación de estas células y en la liberación de varios

mediadores de inflamación [Abbas, A.K, *et al.*, 1997]. Estos mediadores, como histamina, leucotrienos y prostaglandinas, entre otros, son los responsables de la manifestación de los síntomas clínicos de alergia al látex [Breiteneder, H, *et al.*, 1998]. Así, los epítomos de unión a IgE de los principales alérgenos del látex juegan un papel importante en el mecanismo inmune de sensibilización al látex [Chen Z, *et al.*, 1996].

Proteínas alergénicas

De las más de 240 proteínas o polipéptidos presentes en el látex del árbol del hule *H. brasiliensis*, solamente una cuarta parte tienen capacidad alergénica significativa para iniciar una respuesta en la formación de anticuerpos IgE [Alenius H, *et al.*, 1994; Raulf-Heimsoth M, *et al.*, 2007]. Muchas de estas proteínas pueden soportar el proceso de vulcanización, que involucra la adición de compuestos tales como azufre, óxido de zinc, amoníaco, carbamato, mercaptobenzotiazol y tiourea, entre otros aditivos que pueden ser utilizados dependiendo de las características deseadas en el material procesado, así como a temperaturas que van desde 80 a los 100°C por más de una hora [Mark C. Swanson, *et al.*, 2000; George G., 1954]. Se ha reportado la presencia de proteínas íntegras o con algunos aminoácidos faltantes, fracciones de éstas o pequeños péptidos en los productos derivados del látex [Lee MF, *et al.*, 2010; Yunginger JW, *et al.*, 1994; Baur X, *et al.*, 1997; Chardin H, *et al.*, 1999]. Actualmente existen 14 alérgenos de *H. brasiliensis* reconocidos por el Sub-Comité de Nomenclatura de alérgenos WHO/IUIS por sus siglas en inglés, World Health Organization and International Union of Immunological Societies, [<http://www.allergen.org>], mostrados en la Tabla 1.

Tabla 1. Alérgenos de *Hevea brasiliensis* reconocidos por el Sub-Comité de Nomenclatura de la WHO/IUIS (Modificado de esta misma fuente)

Alérgeno	Nombre del alérgeno	Masa molecular (kDa)	Función
Hev b 1	Factor de elongación del hule	14,6	Biosíntesis de látex
Hev b 2	1, 3 - glucanasa	41,3	Proteína de defensa
Hev b 3	Factor de elongación del hule	23	Biosíntesis de látex
Hev b 4	Complejo de microhélices	50 – 57	Proteína de defensa
Hev b 5	Proteína ácida	16	Función desconocida sin estructura
Hev b 6.01	Proheveína	20	Proteína de defensa
Hev b 6.02	Heveína	4,7	Proteína de defensa
Hev b 6.03	Heveína C-terminal	14	Proteína de defensa
Hev b 7	Homólogo a patatina	42,9	Proteína de defensa / Inhibe la biosíntesis del látex
Hev b 8	Profilina del látex	14	Proteína estructural
Hev b 9	Enolasa del látex	51	-
Hev b 10	Manganeso superóxido dismutasa	26	-
Hev b 11	Quitinasa de clase 1	33	Proteína de defensa (quitinasa)
Hev b 12	Proteína de transferencia de lípidos	9,3	Proteína de defensa
Hev b 13	Esterasa del látex	42	-
Hev b 14	Hevamina	30	Quitinasa

Entre las proteínas alergénicas encontradas en el látex, Hev b 1 y Hev b 3, se caracterizan por ser de las más alergénicas en la población a nivel mundial y particularmente en la población asiática, así como también son los alérgenos más frecuentemente involucrados en la sensibilización de los niños afectados por SB y niños sometidos a múltiples cirugías. Se ha demostrado la relevancia clínica de Hev b 1 por la alta prevalencia de anticuerpos IgE producida en pacientes con SB alérgicos al látex. En estos pacientes Hev b 1 representa un blanco para anticuerpos IgE de hasta un 67 a un 81, siendo el 45% de estos pacientes

exclusivamente sensibilizados por este alérgeno. En trabajadores de la salud sensibilizados por látex la prevalencia de anticuerpos IgE específicos anti Hev b 1 se encontró entre 18 y 49% utilizando diversas muestras de suero y métodos de ensayo. [Czuppon AB, *et al.*, 1993; Yeang HY, *et al.*, 1996; Wagner B, *et al.*, 1999; Alenius H, *et al.*, 1993; Chen Z, *et al.*, 1997; Lee MF, *et al.*, 2010]. Se ha determinado que las IgE del suero de dichos pacientes reconocen a Hev b1 y Hev b 3 [Meeropol E, *et al.*, 1990; Nieto A, *et al.*, 1996; Szépfalusi Z, *et al.*, 1999; Lu LJ, Kurup VP, *et al.*, 1995; Dennis MS, *et al.*, 1989; Alenius H, *et al.*, 1995].

Los alérgenos Hev b 1 a Hev b 14 y sus isoformas han sido aislados por métodos de purificación convencionales (centrifugación y diferentes tipos de cromatografías) a partir del látex de *H. brasiliensis*. También se han obtenido mediante técnicas de biología molecular, con la ventaja de que la preparación de proteínas recombinantes, en contraste con las proteínas nativas, permite la producción a gran escala de una sola isoforma y en general la purificación es más sencilla. La mayoría de los alérgenos de látex han sido clonados y producidos por expresión heteróloga en células de bacteria como *Escherichia coli*, presentando plegamientos nativo y estructuras reconocidas por IgE de pacientes alérgicos y anticuerpos monoclonales contra alérgenos naturales. [Raulf-Heimsoth M, *et al.*, 2007; Rihs HP, *et al.*, 2000; Rihs HP, *et al.*, 2001; Rihs HP, *et al.*, 2003; Kostyal. D. A, *et al.*, 1998].

Hev b 1

Esta proteína fue el primer alérgeno del látex clasificado por el sub-comité de nomenclatura de alérgenos *WHO/IUIS*. Es una proteína altamente hidrofóbica constituida por 138 residuos de aminoácidos con una masa molecular de 14.6 kDa, que se encuentra en la superficie de las partículas del hule asociado mediante interacciones hidrofóbicas a una molécula de poli-cis-isopreno en una relación estequiométrica 1:1 [Rihs HP, *et al.*, 2000]. Este complejo forma una monocapa de proteína fuertemente asociada a las partículas de hule, por lo que no se le observa en el suero C cuando el látex es centrifugado. [Czuppon AB, *et al.*, 1993; Mark S. Dennis y David R. Light., 1989].

La región NH-terminal de la proteína incluye un grupo de residuos ácidos acetilados y la función de esta modificación postraduccional se ha propuesto que es un mecanismo para evitar la proteólisis. Una característica de la proteína es que carece de aminoácidos como cisteína, metionina, histidina y triptófano, mientras que es rica en alanina y valina [Dennis MS, et al., 1989; Lee MF, et al., 2010].

Los productos manufacturados con látex de *H. brasiliensis* como los guantes, colchones, globos, condones, chupones, émbolos de jeringa, tapones de viales y otros enseres de uso cotidiano y médico, se han encontrado fragmentos de Hev b 1 de 8, 11, 14 y 20 residuos de aminoácidos, así como también proteínas de 30, 42 y 58 kDa reconocida por los anticuerpos policlonales y monoclonales anti Hev b 1. Estas proteínas se han secuenciado para corroborar que efectivamente se trata de Hev b 1, por lo que se ha propuesto que Hev b 1 puede presentarse en diversas formas oligoméricas, tales como un dímero de 30 kDa y probablemente como un tetrámero de 58.4 kDa, los cuales pueden ser separados utilizando detergentes [Chardin H, et al., 2000; Anil Kush, et al., 1990]. Estas formas oligoméricas se han logrado observar aun después de los procesos de manufactura, por lo que podrían ser responsables de otorgarle una mayor estabilidad termodinámica al alérgeno. En general se ha observado que los fenómenos de oligomerización ayudan a proteger las regiones menos estables en muchas proteínas [Chan HS y Dill KA., 1991]. También se han observado diferencias en la capacidad antigénica de Hev b 1 aislado del látex comparado con la obtenida con la proteína encontrada en guantes, obteniéndose una mayor capacidad alérgico-antigénica en la proteína y fragmentos encontrados en guantes, lo que ha llevado a pensar en cambios estructurales en estas últimas. También se ha propuesto que pueden existir diferencias de alergenidad entre la proteína en forma monomérica y en forma oligoméricas [Sontimuang C, et al., 2010; Sontimuang C, et al., 2011].

Factor de elongación del hule

Hev b 1 también es conocido como factor de elongación del hule (REF por sus siglas en inglés Ruber Elongation Factor) [Dennis MS y Light DR., 1989; Dennis MS, et al., 1989], debido a que es necesario para que la enzima preniltransferasa lleve a cabo su función. Esta enzima incorpora unidades de cis-isopreno a las cadenas de poliisopreno durante la formación de las partículas del hule. Se ha propuesto que Hev b 1 crea una interface entre la preniltransferasa y las partículas hidrofóbicas de látex de alto masa molecular (1000 kDa) [Dennis MS y Light DR., 1989]. La participación de Hev b 1 en el proceso de polimerización del hule fue observada *in vitro* eliminándolo de las partículas de hule mediante el uso de proteasas. Posteriormente, se adicionó la preniltransferasa y se observó que no se llevaba a cabo la polimerización, mientras que este proceso si se observó cuando se añadió nuevamente Hev b 1. De estos estudios también se estableció la relación estequiométrica preniltransferasa : Hev b 1 es 0.026 nmoles de preniltransferasa por 2.7 nmoles de Hev b 1. Esta relación nos indica que se requiere que actúen varias moléculas de Hev b 1 por cada molécula de preniltransferasa, lo que podría sugiere que Hev b 1 actúa de forma oligomérica o formando complejos.

Hev b 1, uno de los más importantes alérgenos del látex

Desde el punto de vista de la respuesta inmunológica, Hev b 1 es considerado como uno de los más importantes alérgenos del látex [Czuppon AB, et al., 1993]. En 1996 Z. Chen y colaboradores, identificaron las secuencias de aminoácidos que formaban epítomos de IgE sintetizando un conjunto de péptidos sobrelapados y observaron mediante ensayos de ELISA y de inhibición competitiva que la actividad de unión era fuertemente dependiente de los residuos P¹²³, G¹²⁴ y Y¹³⁴ y disminuyó en un 50% al eliminar el aminoácido P¹²³ mientras que el péptido perdía casi toda la actividad de unión a IgE cuando G¹²⁴ ó Y¹³⁴ se encontraban ausentes en la secuencia. Estos resultados sugieren que el epítomo mínimo reconocido por IgEs de suero de pacientes para la región C-terminal contiene la secuencia PGQTKILAKVIFY. En el mismo estudio se reportó a los aminoácidos 121-137 como el epítomo mínimo de reconocimiento cuando se utilizaba suero de conejos sensibilizados [Chen Z, et al., 1996] Figura 1.

El equipo de Raulf- Heimsoth M en 1997 y Chen Z y colaboradores en 1998 identificaron los epítomos para células T en la región 91-109 de Hev b 1 utilizando nueve péptidos sobrelapados, con una longitud de 17 a 19 aminoácidos cada uno que constituían la secuencia completa de Hev b 1, determinando a esta región como la responsable del efecto alergénico. Por otra parte, B. Banerjee y colaboradores en el (2000), identificaron como epítomos de IgE a las secuencias 1-55, 60-75 y 85-110, que corresponden a la región NH-terminal y en un análisis densitométrico de ELISA demuestran seis regiones inmunodominantes en los residuos de aminoácidos 1-75 y otros dos cerca de la región C-terminal, en los residuos 90-108. Sin embargo, la interacción del péptido KYLGFVQDAA (16-25) con anticuerpos IgE reveló que éste es un epítomo específico de unión a IgEs y sólo se presenta en suero de pacientes alérgicos [Banerjee B, *et al.*, 2000].

En este mismo año Rihs HP y Chen Z, utilizaron el método ImmunoCAP system (CAP), que es un fluoroinmunoensayo, que utiliza a rHev b 1 en fase sólida y así determina las IgE específica. En dicho estudio se observó que los determinantes de IgE se encontraron principalmente en el extremo C-terminal y en la secuencia 30-64 en la molécula de Hev b 1 al utilizar fragmentos de la proteína Figura 1.

Utilizando el suero combinado y sueros individuales de pacientes alérgicos al hule natural se demostró mediante *immunoblots* que la remoción de los primeros 28 residuos de aminoácidos no provocaba una diferencia en la intensidad de la interacción con IgE. En contraste, cuando los primeros 77 residuos de aminoácidos de Hev b 1 se encontraron ausentes en el fragmento, éste perdía la capacidad de unión a IgE en la mitad de los sueros de pacientes. Estos resultados indicaron que los epítomos de IgEs se encuentran localizados en los primeros 77 residuos de aminoácidos o que estos residuos son importantes en la estructura del epítomo localizado en la secuencia de esta proteína [Rihs HP, *et al.*, 2000] Figura 1.

Hev b 1 MAEDEDNQGGQGEGL **KYLGFVQDAATYAVTTFSNVYLF**AKDKSGPLQPGVDIIEGPVKNV
 Hev b 1 AVPLYNRFSYIPNGALKFVDSTVVASVTI **DRSLPPIVKDASIQVVSAI**RAAPEAARSLA
 Hev b 1 SSL**PGQTKILAKV**FYGEN

Figura 1. **Secuencia de aminoácidos de Hev b 1.** Las regiones alérgicas/antigénicas según Z. Chen y colaboradores., 1996, se marcan en color azul con los aminoácidos relevantes en color rojo; según M. Raulf-Heimsoth y colaboradores., 1998, en color morado y en verde el epítipo específico, que sólo es reconocido por IgE's de suero de pacientes.

Como se mencionó anteriormente varias formas de Hev b 1, así como productos de su degradación, han sido detectados en artículos manufacturados a partir del hule natural, lo que indica que esta proteína resiste dicho proceso [MF Lee, *et al.*, 2010; Yunginger JW, *et al.*, 1994; Baur X, *et al.*, 1997; Chardin H, *et al.*, 1999; Rihs HP, *et al.*, 2000; Chardin H, *et al.*, 2000]. Es probable que Hev b 1 está asociado fuertemente a las partículas de hule y por lo tanto sea más difícil de lavar durante el proceso de lixiviación, por lo que se podría asumir que Hev b 1 es una de las últimas proteínas de látex en ser eliminada de los productos manufacturados con hule natural. Por consiguiente, el contenido de Hev b 1 puede utilizarse como un criterio para la estimación de la alergenidad de los productos manufacturados con hule natural [Rihs HP, *et al.*, 2000; Chardin H, *et al.*, 2000].

Hev b1 y Hev b 3

Por otra parte, se ha demostrado que Hev b 1 y Hev b 3 son similares en su secuencia de aminoácidos, como se aprecia en el alineamiento de la Figura 2, mostrando un 45% de similitud [Alenius H, *et al.*, 1995]. Los primeros 130 residuos son los que poseen mayor similitud entre ambos [Lu LJ, *et al.*, 1995]. Esta similitud explica la reactividad cruzada que se presenta entre ambos alérgenos ante IgE's de sueros de pacientes alérgicos. B. Banerjee y

colaboradores en el 2000, observaron que cuando utilizaron sueros de pacientes con SB y HCW, preincubados con Hev b 3, se originaba más de un 80% de inhibición de la interacción de IgE con Hev b 1 [Wagner B, *et al.*, 1999; B. Banerjee, *et al.*, 2000]. Es importante mencionar que se ha sugerido que todos los pacientes alérgicos al látex pueden ser diagnosticados utilizando solo Hev b1 y Hev b 3 [Yeang HY, *et al.*, 1996; Hufnagl K, *et al.*, 2003].

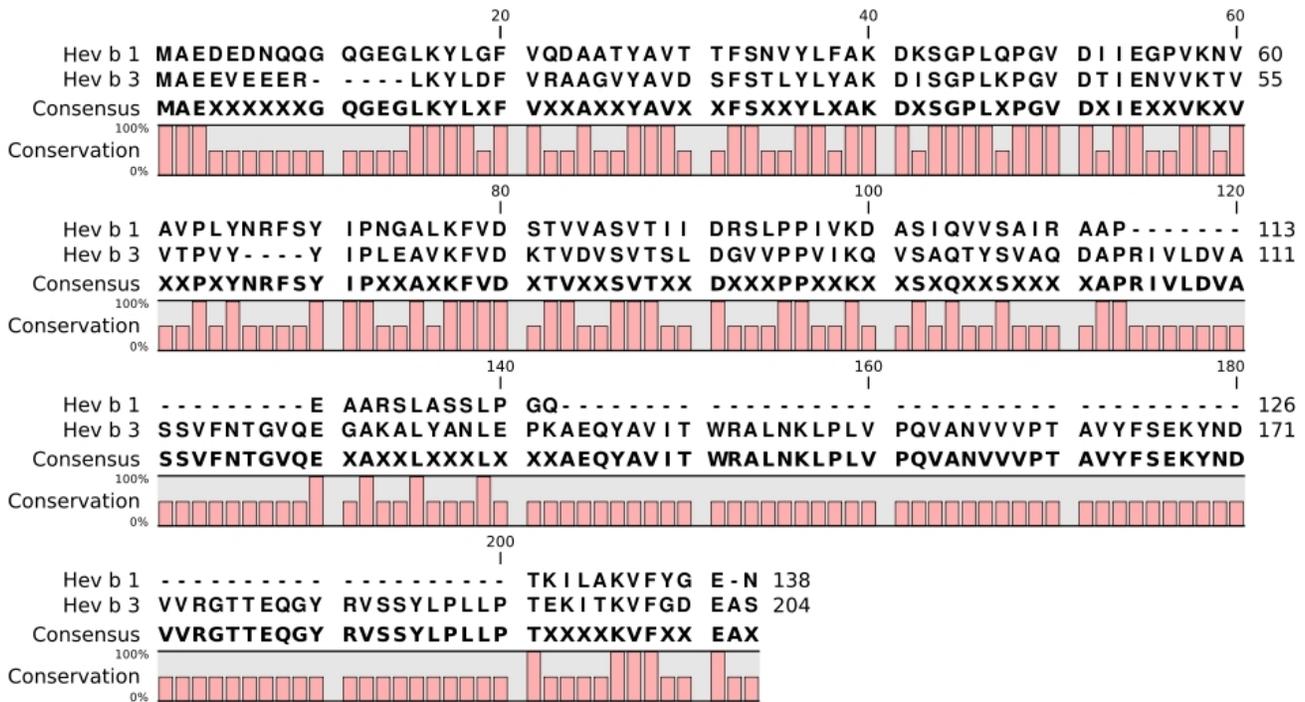


Figura 2. **Alineamiento de secuencias de aminoácidos obtenidas del GenBank.** <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/> mediante el programa CLC sequence viewer.

Cabe mencionar que en nuestro grupo de trabajo se observó que la proteína alergénica Hev b 5 se encuentra desestructurada en su forma nativa, por lo que cabría la posibilidad de que rHev b 1 no presentara una estructura tridimensional o bien careciese de ésta al no encontrarse acoplada a su ligando [Carpio-Rodríguez, 2012].

HIPÓTESIS

La proteína Hev b 1 puede ser producida de forma recombinante y libre de proteínas de fusión manteniendo una estructura secundaria y plegada.

JUSTIFICACIÓN

El número de personas con diversas alergias continúa aumentando en el ámbito internacional, entre estas alergias la provocada por el látex se presenta en la población en general con una prevalencia menor al 2%. En los grupos de riesgo, este valor es mayor al 8% y en los pacientes con espina presentan una prevalencia extremadamente alta de hasta un 72%, con riesgo de sufrir un choque anafiláctico. Hev b 1 es uno de los principales alérgenos del látex de *H. brasiliensis*, implicado en la respuesta alérgica en niños con espina bífida y la población asiática.

Hev b 1 es muy difícil de aislar y purificar a partir del hule y de productos manufacturados con éste, debido a su fuerte asociación con las partículas de poliisopreno. Cabe destacar que diferentes isoformas así como oligómeros de este alérgeno pueden ser encontrados en artículos manufacturados con hule natural.

Actualmente no existen estudios a nivel de estructura secundaria o terciaria de Hev b 1 y la mayoría de los estudios que se han realizado han sido utilizando a Hev b 1 unido a proteínas de fusión, por lo que para su estudio y caracterización es indispensable el poderlo obtener de manera abundante, puro y libre de proteínas de fusión.

OBJETIVO

Clonar y expresar el alérgeno Hev b 1 de *Hevea brasiliensis* y realizar su caracterización bioquímica.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1.- Clonar el alérgeno Hev b 1 del látex de *Hevea brasiliensis*.
- 2.- Sobre-expresar el alérgeno en *Escherichia coli*.
- 3.- Purificar los productos de expresión y evaluar las características bioquímicas del producto obtenido.
- 4.- Comparar el espectro de dicroísmo circular con el modelo teórico obtenido mediante modelado por homología.

MATERIAL Y MÉTODOS

Clonación del gen de Hev b 1

La amplificación del gen de Hev b1 se realizó mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con la polimerasa Phusion (Finnzymes) utilizando como templado cDNA previamente sintetizado a partir de RNA total aislado de hojas o látex del árbol de *Hevea brasiliensis* [Martínez-Caballero, 2009]. La secuencia del cDNA fue sometida a revisión mediante el servidor http://www.bioline.com/calculator/01_11.html para verificar la factibilidad de expresión del gen de Hev b 1 por parte de las cepas bacterianas.

Los iniciadores que se utilizaron para amplificar dicho gen fueron: directo 5'**CTGAATTCGACGACGACGACAAGATGGCTGAAGACGAAGACAACCAACAAGGGCAGGGGGAGGGGTTA3'**, con el sitio de restricción EcoRI en (negritas) y un sitio de corte para enteroquinasa (EK) (subrayado); y reverso 5'**GCAAGCTTTC**CAATTCTCTCCATAAAACACCTTAGC3, con un sitio de restricción HindIII en (negritas) y un codón de paro (subrayado). Ambos se diseñaron tomando como base la secuencia reportada en el Genbank (X56535.1), para su posterior ligación en los vectores de expresión pET32a (Novagen) y pMALc2X (New England Biolabs) utilizando la enzima T4 ligasa (New England Biolabs).

El producto de la reacción de ligación se transformó en células electrocompetentes DH5 α . Los plásmidos aislados de las colonias obtenidas de la transformación, nombrados pMBP (proteína de unión a maltosa)-Hev b 1 y pTrx (tiorredoxina)-Hev b 1, fueron sometidos a un análisis de restricción y a secuenciación (Laragen, Inc) para confirmar la clonación correcta del gen de Hev b 1.

Sobre-expresión de la proteína recombinante MPB-Hev b 1

La sobre-expresión se realizó en dos cepas de expresión, BL21(DE3) pLys y C41 (Novagen). La inducción de la proteína de fusión se monitoreó mediante geles SDS-PAGE.

Sobre-expresión de la proteína recombinante Trx-Hev b 1

Una colonia aislada de la cepa de expresión C41 (Novagen), transformada con el plásmido pTrx-Hev b 1, creció a 37°C toda la noche en medio Luria Broth (LB) con ampicilina (100 µg/ml). Este cultivo se diluyó 1:100 en medio fresco LB con ampicilina y se dejó en agitación continua a 37°C hasta alcanzar una densidad óptica (DO) a 600 nm de 0.6, en este momento se hizo la inducción de la expresión de la proteína con IPTG 0.5 mM y se disminuyó la temperatura del cultivo a 30°C. Con el fin de establecer el tiempo óptimo de expresión de la proteína recombinante se tomaron alícuotas del cultivo a diferentes tiempos. El paquete celular se obtuvo por centrifugación (10 min a 3500 x g, 4°C) y se lisó por sonicación (Misonix 3000) con amortiguador de lisis (50 mM Tris-HCl, pH 7.6, 100 mM NaCl, 1mM PMSF). La fracción soluble se separó de la insoluble por centrifugación (20 min a 23,000 x g, 4°C). La presencia de la proteína recombinante se siguió mediante geles de SDS-PAGE tanto en la fracción soluble como en la insoluble, encontrándose en ésta última. Dado que la proteína recombinante se expresa de manera insoluble, se hicieron lavados con diferentes amortiguadores con la finalidad de solubilizarla y se encontró que con la adición de 0.1% de Tween 20 la proteína se podía obtener soluble.

Purificación de la proteína recombinante Trx-Hev b 1

La purificación de la proteína de fusión se realizó mediante una columna de afinidad metal-quelato, la fracción insoluble del lisado celular se lava dos veces con amortiguador de lisis y una vez con amortiguador de unión (amortiguador de lisis más 0.1% de tween 20 y 20 mM de imidazol), se recupera el sobrenadante el cual se filtra a través de una membrana de 0.45 µm y se hace pasar a través de una columna His Trap FF (GE Healthcare) a un flujo aproximado de 1 ml/min, previamente equilibrada con amortiguador de unión. La columna se lava con 5 volúmenes de columna con el amortiguador de unión y se eluye con dos volúmenes de amortiguador de elución (50 mM Tris-HCL pH 7.6, 100 mM NaCl, 0.1% tween 20, 250 mM imidazol).

Corte con enteroquinasa

La proteína de fusión purificada por columna de afinidad metal-quelato se dializa para eliminar el imidazol y el NaCl contra amortiguador (50mM Tris-HCl pH 7.6, 0.1% tween 20). A la proteína dializada se le agregó CaCl₂ a una concentración final de 1 mM y EKMax (Invitrogen) en una proporción de 1 U de EK por cada 2 mg de proteína de fusión y se incubó a 37°C con agitación de 50 rpm durante 16 h. Al término de la incubación, se filtra través de una membrana de 0.45 µm y se vuelve a realizar otra purificación por columna de afinidad metal-quelato para que en este paso se retenga la Trx en la columna y la Hev b 1 quede en lo que no se une (fracción no retenida).

Purificación de Hev b 1 por cromatografía líquida de alta presión (HPLC) en fase reversa

La fracción no retenida de la purificación metal-quelato mencionada en el párrafo anterior, se filtró a través de una membrana de 22 µm y se inyectó en una columna analítica de fase reversa C3 (Zorbax 300SB). La separación se hizo con un gradiente de 0 a 60% de agua 0.1% TFA / acetonitrilo 0.1% TFA a un flujo de 1 ml/min, durante 60 min a temperatura ambiente, la detección se realizó a 280 y 220 nm simultáneamente. Se concentró la fracción colectada utilizando un concentrador centrífugo a vacío (speed vac) con la finalidad de disminuir la concentración de acetonitrilo.

Caracterización de Hev b 1

A) Espectrometría de masas.

Se obtuvo el espectro de masas, tanto de la proteína de fusión como de la proteína pura, utilizando la técnica de MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization-Time Of Flight). Esta técnica se basa en pulsos cortos de láser en alto vacío aplicados sobre una muestra mezclada con una matriz que evita la destrucción de la muestra y facilita su vaporización y ionización. Cuando la proteína con la matriz adecuada es irradiada con el láser, la energía es convertida en energía de excitación y en transferencia de H⁺ a la muestra

(ionización) formando especies monocargadas. El analizador de tiempo de vuelo (TOF) se basa en la medición del período de tiempo desde la aceleración de los iones en la fuente hasta su impacto en el detector [Vorm O, *et al.*, 1994].

La fracción colectada de la columna de fase reversase diluyó 1:1, 1:5 y 1:10 con la matriz (solución saturada de ácido sinapínico en 2:1 agua:acetonitrilo 0.05% TFA) y se analizó en el espectrómetro de masas MALDI-TOF (MicroFlex, Bruker Esquire).

B) Dicroísmo circular.

Esta técnica se basa en la absorción diferencial de luz circularmente polarizada (izquierda y derecha). Este fenómeno lo presentan las moléculas quirales como las proteínas. En el caso de éstas últimas, esta técnica se utiliza para determinar el contenido de estructura secundaria en la región del UV lejano. [Duward F, *et al* 2004]. Utilizando esta técnica la fracción concentrada se diluyó en agua-acetonitrilo 10% y la medición se realizó en un espectropolarímetro (JASCO J-720) en el intervalo del UV lejano 184 a 260 nm, en intervalos de 1 nm y con un tiempo de integración de 1 s a 25°C, en una celda de cuarzo de 0.1 cm.

C) Predicción de estructura terciaria.

Se utilizaron varios servidores de bioinformática para tratar de obtener un modelo tridimensional a partir de la secuencia de aminoácidos (<http://www.uniprot.org/uniprot/P15252>, <http://www.uniprot.org/uniprot/Q67FW6>). El modelo tridimensional de Hev b 1 se obtuvo mediante el servidor de CPHmodels-3.0 Server de la Technical University of Denmark (<http://www.cbs.dtu.dk>), el cual produce modelos mediante homología basándose en el perfil de alineación guiado por la estructura secundaria, así como la predicción de exposición de los residuos al disolvente. La proteína modelo que utilizó el servidor fue la cadena C de la estructura cristalográfica de la proteína chaperona prefoldina de *Pyrococcus horikoshii* OT3, PDB (2ZDI).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Diseño de vectores

Teniendo en cuenta que los reportes previos indican que Hev b 1 es una proteína muy hidrofóbica [Rihs HP, et al., 2000; Mark S. Dennis y David R. Light. 1989], la clonación del gen que codifica para ésta se hizo en dos vectores de expresión, pET32a y pMALc2X. En ambos casos la proteína clonada se produce como proteína de fusión, con tiorredoxina en el caso de pET32a y con la proteína de unión a maltosa (MBP) en el caso de pMALc2X, proteínas que ayudan a la solubilización de las proteínas que van unidas a ellas [Guan C, et al., 1998; LaValliere E.R, et al 1993; Jeffrey D, et al., 2003].

En la Figura 3 se muestran en forma gráfica las construcciones Trx-Hev b 1 y MBP-Hev b 1. Es importante mencionar que se incluyó en el diseño del iniciador directo un sitio de corte para EK para que la proteína Hev b 1 se obtuviera con su secuencia nativa y sin residuos adicionales en el extremo amino terminal.

A)



B)



Figura 3. **Construcciones para la expresión de Hev b 1.** A) Construcción correspondiente a la proteína de fusión MBP-Hev b 1, donde MBP corresponde a proteína de unión a maltosa y EK al sitio de corte para enteroquinasa. B) Proteína de fusión Trx-Hev b 1, donde Trx corresponde a Tiorredoxina, His-Tag a la secuencia de 6 histidinas y EK = sitio de corte de enteroquinasa.

Amplificación por PCR del gen de la proteína Hev b 1

El producto de la amplificación realizada bajo las condiciones descritas en la metodología mostró una masa aproximado de 400 pb cuando se analizó en un

gel de agarosa (Figura 4), que corresponde con la masa esperada de 414 pb. Algo que llama la atención es que sólo se observó el amplificado en donde se utilizó como molde cDNA de látex (cDNA-l) y no se observó amplificación en el cDNA de hoja (cDNA-h). Cabe mencionar que mediante análisis de Northern blot se ha demostrado que los niveles de transcripción de los genes implicados en la biosíntesis del látex, así como de los implicados en la defensa de la planta son más altos en los conductos laticíferos que en las hojas. Muy probablemente esa haya sido la razón por la cual no se observó amplificación en las reacciones en donde se utilizó cDNA de hoja (cDNA-h) [Anil Kush, *et al.*, 1990].

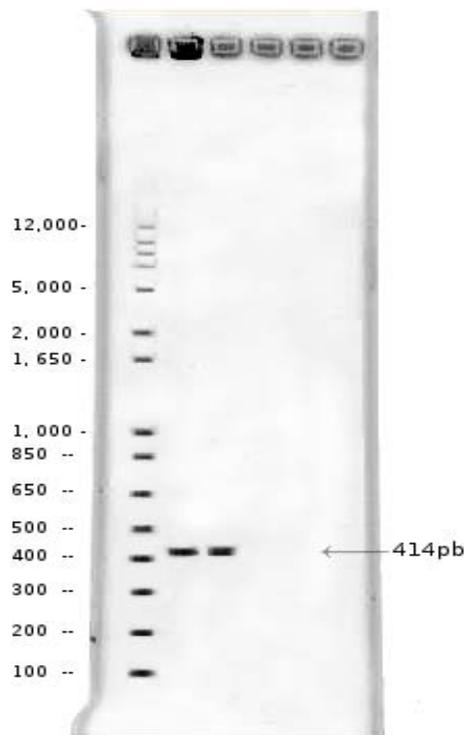


Figura 4. **Amplificación del gen de Hev b 1.** Los productos de PCR se verificaron en un gel de agarosa al 1%. Carril 2, marcador de masa molecular; carril 3 y 4, reacción de PCR utilizando como molde cDNA-h; carril 5 y 6 reacción de PCR utilizando como molde cDNA-1.

Cabe mencionar que el cDNA-h utilizado como molde provenía de RNA aislado de hojas maduras. Cuando se utilizó como molde cDNA sintetizado a partir de RNA aislado de hojas jóvenes, sí se observó un amplificado que corresponde al tamaño esperado, sin embargo, la intensidad de la banda fue

menor que la obtenida para las muestras procedentes de látex, (Figura. 5 carril 2) por lo que se tuvo que hacer una reamplificación (Figura 5 carril 3) para obtener suficiente amplificado y poderlo clonar. Estos resultados sugieren que la expresión de este gen en hojas es menor que en látex, debido muy probablemente a que Hev b 1 es necesario para la polimerización del hule a partir del cis-isopreno presente en el látex. Este último es producido en las células laticíferas, en las que también se han observado los mayores niveles de expresión de Hev b 1. Por lo tanto es lógico observar una mayor expresión de esta proteína en el látex que en las hojas, que poseen una menor cantidad de estas células [Tomoki Sando, *et al.*, 1990].

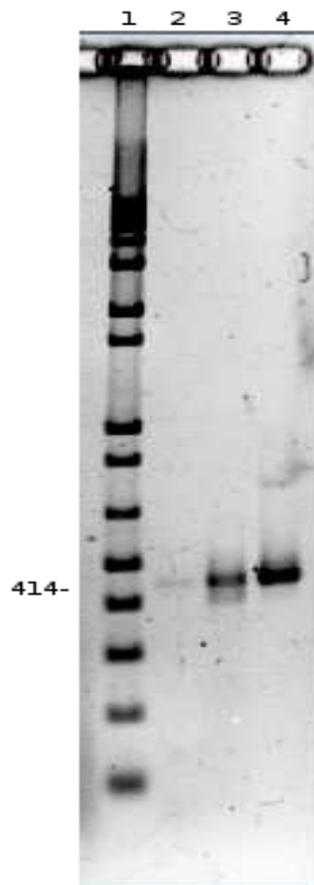


Figura 5. **Amplificación del gen de Hev b 1 a partir de cDNA-h de hojas jóvenes.** El producto de la reacción de PCR se verificó en un gel de agarosa al 1%, carril 1: marcador de masa molecular; carril 2: amplificado de cDNA-h de hojas jóvenes, carril 3: reamplificación de 2 y carril 4: amplificado de látex.

Ligación del gen de Hev b 1 en los vectores de expresión pMALc2X y pET32a

El gen amplificado por PCR tanto de la muestra proveniente de hojas como de látex se purificó utilizando el kit QIAquick PCR purification (Qiagen) siguiendo las indicaciones del proveedor. Posteriormente el gen y los vectores pMALc2X o pET32a se cortaron con las enzimas de restricción *Eco R1* y *Hind III*, la reacción de restricción se verificó mediante un gel de agarosa (Figura 6), para corroborar el corte y la purificación de los mismos, donde se observa en el carril 3 una banda con la masa correspondiente al vector pMALc2X de 6319pb, en el carril 4 una banda correspondiente al gen Hev b 1 de 414pb y en el carril 5 el vector pET32a en 5900pb. En un siguiente paso, el gen cortado y purificado se ligó a los vectores utilizando la enzima T4 ligasa.

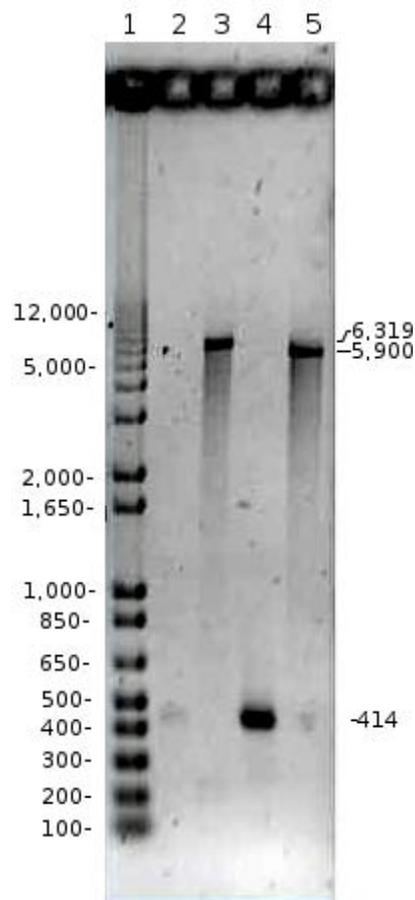


Figura 6. **Restricción de vectores y gen de Hev b 1 con EcoR1 y HindIII.** La restricción de los vectores y el gen de Hev b 1 se monitoreó por gel de agarosa al 1%. 1, marcador de masa molecular; 2, gen de Hev b 1 amplificado de cDNA-l; 3, pMalc2X 4, gen de Hev b 1 amplificado de

cDNA-h; 5, pET32a.

El producto de la reacción de ligación se utilizó para transformar células competentes DH5 α . Los plásmidos purificados de las clonas obtenidas se analizaron por reacciones de restricción, la construcción Trx-Hev b 1 se cortó con las enzimas Xba1 y Sac1. Si el plásmido pET32a tiene el gen de Hev b 1, se deberían de ver dos bandas, una de 5353 pb y otra de 782 bp y si no tuviera el inserto, se observaría una banda de 5353 pb y una de 547 bp (carril 10 de la Figura 7a), en la Figura 7a se observa claramente que todas las clonas analizadas tienen al gen ligado.

La construcción MBP-Hev b 1 se cortó con las enzimas DraI y Sac1, si el vector pMALc2X tiene el gen de Hev b 1 se espera obtener 4 bandas de 4907 pb, 1092 pb, 750 pb y 302 pb y de no tener el inserto se vería 3 bandas de 4907 pb, 1124 pb y 750 pb, (carril 7 de la Figura 7b). Como se aprecia en la Figura 7b 8 de las 10 clonas analizadas contienen el inserto de Hev b 1. Dos clonas de la construcción MBP-Hev b 1 (l y h), así como dos clonas de la construcción Trx-Hev b 1 (l y h), se secuenciaron (Laragen, Inc) para corroborar la correcta ligación del gen de Hev b 1 en los plásmidos de expresión, así como la ausencia de errores en la secuencia del gen. Se decidió realizar la extracción del gen de Hev b 1 de hojas y de látex, ya que en algunos grupos de trabajo, así como en el nuestro, se han obtenido diversas isoformas de los alérgenos [Chardin H, *et al.*, 2000; Anil Kush, *et al.*, 1990; Martínez-Caballero, 2009], también se sabe que la cantidad de los transcritos puede variar entre diversos tejidos [Keng-See Chow, *et al.*, 2007]. *H. brasiliensis* posee dos rutas de síntesis del monómero precursor del hule (isopentil difosfato, IDP); una es la ruta del, 2-C-metil-D-eritrol 4-fosfato (MEP) y otra mediante el mevalonato (MVA) [Skilleter DN, *et al* (1971); Kekwick RGO, *et al.*, 1989]. Los trabajos realizados por Chye y Yortytot en 1992 y 2008 respectivamente, mencionan que existe una diferencia en la expresión de las enzimas implicadas en estas rutas, tanto en diversos tejidos como en diferentes edades de las plantas, mostrando así que ciertas rutas pueden ser favorecidas en diversos tejidos [Yortytot Seetang-Nun, *et al.*, 2008; Chye ML, *et al.*, 1992]. En el látex la ruta del MVA es la más frecuente, mientras que en hojas es la del MEP. También se han observado cambios en la expresión de las proteínas relacionadas

con estas rutas con la edad de las hojas (hojas maduras o jóvenes), por lo que era importante conocer si el gen de Hev b 1, implicado en la síntesis del hule, se podría amplificar de igual manera de las hojas o del látex y sobre todo sería importante analizar la posible presencia de isoformas. Así mismo el equipo de Keng-See Chow en 2007 reportó que entre las proteínas relacionadas con la biosíntesis del hule existen 9 secuencias codificantes para proteínas que se unen a superficie de partículas de hule con masas moleculares de 7.9 a 27 kDa entre las cuales se encontraban Hev b 1 y Hev b 3. Todas estas eran reconocidas por anticuerpos antiHev b 1 y antiHev b 3. En este trabajo se descartó la posibilidad de encontrar diferentes isoformas de Hev b 1, tanto en hojas jóvenes o maduras y en el látex y es importante mencionar que tanto la secuencia del gen obtenida a partir de látex, como la secuencia proveniente de hojas jóvenes y maduras fue idéntica.

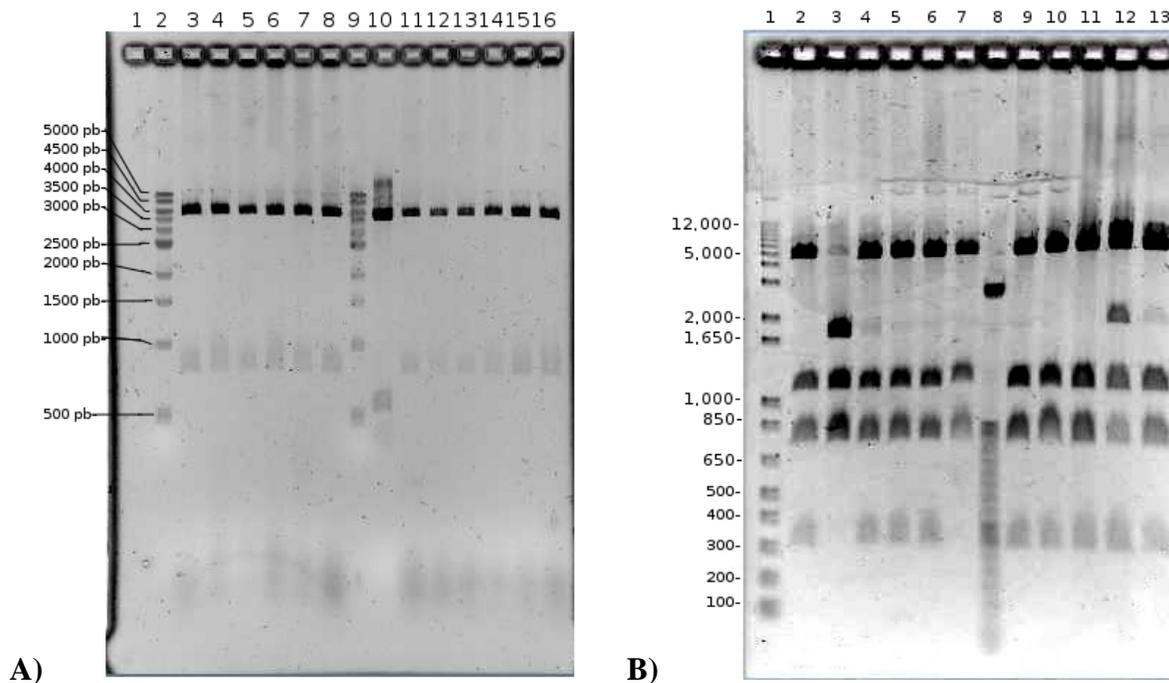


Figura 7. **Análisis por restricción de las clonas obtenidas.** A) Trx-Hev b 1 digeridas con XbaI y SacI. Carriles: 2, Marcador de masa molecular; 3-8, clonas con el gen Hev b 1 amplificado de cDNA-h; 9, marcador de masa molecular; 10, plásmido pET32a; 11-16, clonas con el gen Hev b 1 amplificado de cDNA-l. B) MBP-Hev b 1 digeridas con DraI y SacI. Carriles: 1, Marcador de masa molecular; 2-6, clonas con el gen Hev b 1 amplificado de cDNA-h; 7, pMALc2X 8 marcador de masa molecular; 9-13, clonas con el gen Hev b 1 amplificado de cDNA-l.

Expresión de la proteína pMBP-Hev b 1

La expresión de esta proteína se hizo en las cepas BL21(DE3)pLysS, genotipo: pLysS F- ompT gal dcm lon hsdSB(rB- mB-) ?(DE3) pLysS(cmR). Esta cepa contiene el lisógeno DE3 y el plásmido pLysS que de manera constitutiva expresa niveles bajos de lisozima, la cual inhibe la expresión basal de la polimerasa T7 mientras no haya agente inductor [Guan C, et al., 1998] C41, genotipo: F- ompT gal dcm hsdSB(rB- mB-)(DE3). Esta cepa deriva de BL21(DE3) con la característica de que posee una mutación no caracterizada que le confiere resistencia a la muerte celular asociada con la expresión de ciertas proteínas recombinantes tóxicas [LaValliere E.R, et al., 1993] En ambos casos se observó la producción de una proteína soluble alrededor de la masa molecular esperada que es de 58.25 kDa, como se muestra en la Figura 8.

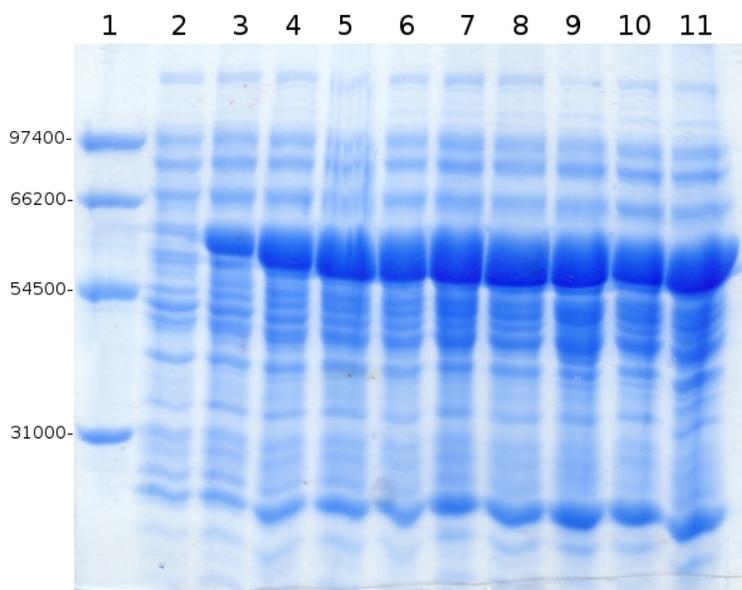


Figura 8. **Cinética de expresión de MBP-Hev b 1 en BL2 (DE3) pLysS.** Fracción soluble del lisado celular, carril 1, marcador de masa molecular; siguientes carriles, 0, 2, 4, 6, 8, 12 y 24 h. después de la adición de IPTG.

Sin embargo, cuando la proteína se purificó utilizando una columna de amilosa y se sometió a un análisis de masas se obtuvo una masa de 57.85 kDa lo que representa una diferencia de 0.39 kDa, lo cual indica que la proteína de

fusión no es la proteína esperada (Figura 9).

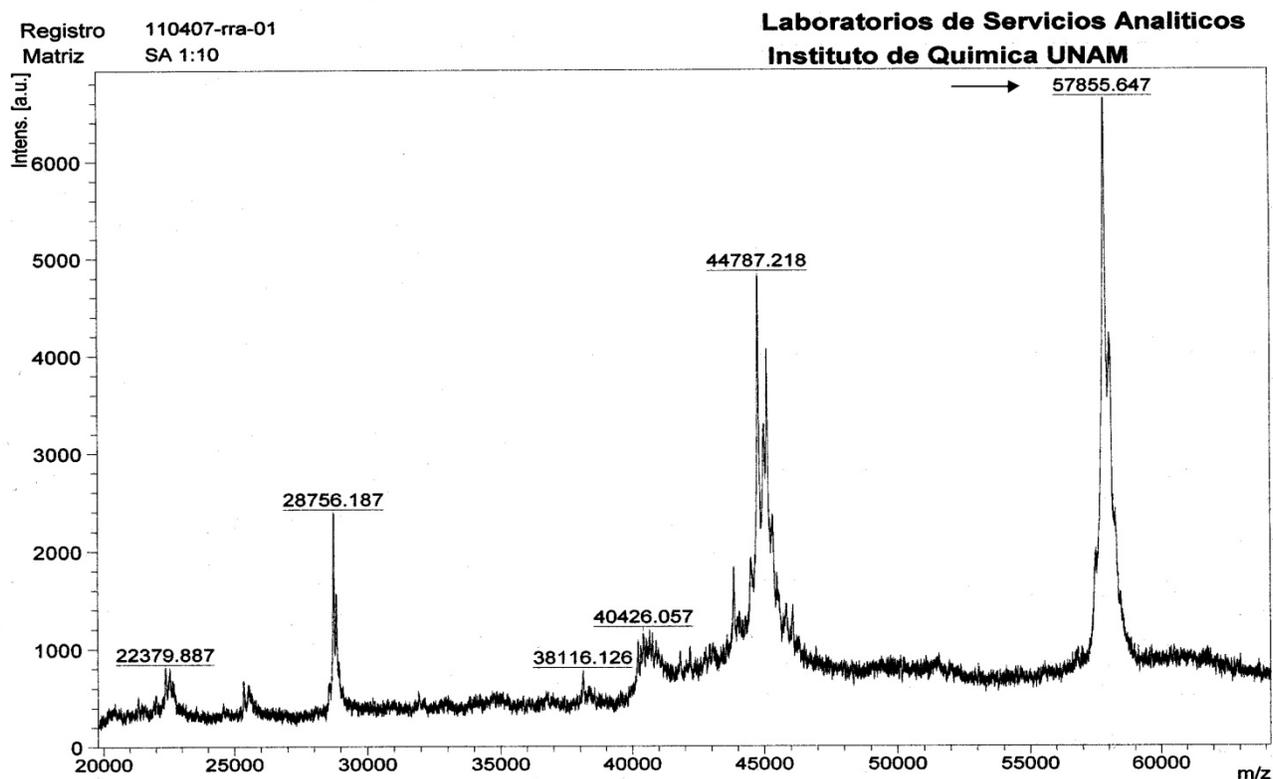


Figura 9. **Espectro de masas MALDI-TOF.** La relación masa/carga obtenida para la proteína de fusión MBP-Hev b 1 fue de 57.85 kDa, mientras que la masa esperada es de 58.25 kDa.

A pesar de haberse obtenido una secuencia de nucleótidos correcta, se observó una diferencia de masa en la proteína obtenida respecto a la esperada, esta diferencia podría ser atribuida a la pérdida de 3 ó 4 aminoácidos. *E. coli* posee una gran cantidad de proteasas que se encuentran localizadas en el citoplasma, así como en la membrana interna y externa [Baneyx, F, et al., 1992]. Podríamos especular que al ser expresada MBP-Hev b 1 de manera soluble quedó expuesta al disolvente y por lo tanto a la acción de las proteasas. La susceptibilidad a las proteasas está relacionada con la secuencia de los aminoácidos en las regiones amino y carboxilo terminal de la proteína recombinante. En una búsqueda sistemática de señales de reconocimiento para las proteasas de *Escherichia coli*, Parsell y colaboradores en 1990 demostraron que una proteína estable puede ser desestabilizada por la adición de etiquetas

consistentes en pentapéptidos no polares en el extremo carboxilo terminal, por lo que la presencia de este tipo de aminoácidos en el extremo carboxilo terminal de Hev b 1 podrían propiciar una mayor cantidad de sitios para la degradación de la proteína reduciendo su tiempo de vida celular, en este caso Val, Phe, Tyr, Gly y Asn. [Savvas C. Makrides, et al., 1996; Christophe Herman, et al., 1998]. Durante la lisis celular se utilizó el fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), el cual es un inhibidor de proteasas serínicas, para intentar disminuir la digestión de las proteínas expresadas. PMSF no inhibe a todos los tipos de proteasas presentes en el lisado celular, [James GT, et al., 1978], por lo que existe una gran posibilidad de que la proteína pudiese ser parcialmente digerida y por lo tanto observamos una masa menor. Como se mencionará más adelante Trx-Hev b 1 se expresó en cuerpos de inclusión y tuvo la masa correcta, muy posiblemente debido a que la formación de los cuerpos de inclusión protegieron a la proteína hasta que ésta fue solubilizada.

Expresión de Trx-Hev b 1

Por otro lado, la expresión de la proteína Trx-Hev b 1 se realizó en las cepas de expresión antes mencionadas, la presencia de la proteína se siguió por SDS-PAGE y no se observó en la fracción soluble del lisado celular (Figura 10a). La proteína con una masa esperada de 33.29 kDa se observó en la fracción insoluble (Figura 10b) lo que indica, dado su carácter hidrofóbico, la formación de cuerpos de inclusión. Cabe mencionar que se probaron diferentes condiciones de expresión, en donde se varió la concentración de IPTG y la temperatura de incubación y en todos los casos la proteína se obtuvo en la fracción insoluble.

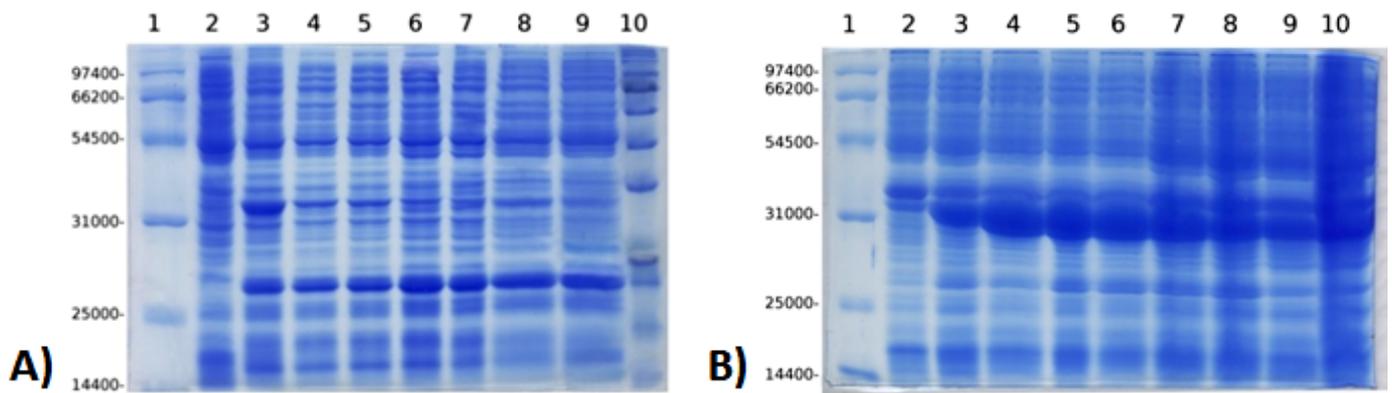


Figura 10. **Cinética de expresión de Trx-Hev b 1 en C41.** La expresión de la proteína Trx-Hev b 1 se siguió mediante SDS-PAGE al 12%. A) Fracción soluble del lisado celular, carril 1, marcador de masa molecular; carriles, 2-9, 0, 2, 4, 6, 8, 12 y 24 h. después de la adición de IPTG. Carril 10, marcador de masa molecular. B) Fracción insoluble del lisado celular, carril 1, marcador de masa molecular, carriles; 2-10, 2, 4, 6, 8, 12, 16, 20 y 24 h después de la adición de IPTG.

La comparación entre las dos cepas de expresión mostró que había una mayor cantidad de proteína en la cepa C41, por lo que se decidió purificar a la proteína utilizando esta cepa de expresión. La fracción insoluble del lisado celular se lavó con diferentes concentraciones de Tween 20 (0.1 - 0.3%) y finalmente se realizó un lavado con urea 8 M (Figura 11).

Durante los lavados con el detergente Tween 20, se observó que se podía obtener a Hev b 1-Trx soluble, por lo que se trabajó con el lavado en el que se observó la mayor pureza y cantidad de proteína. Estos resultados se muestran en la Figura 11.

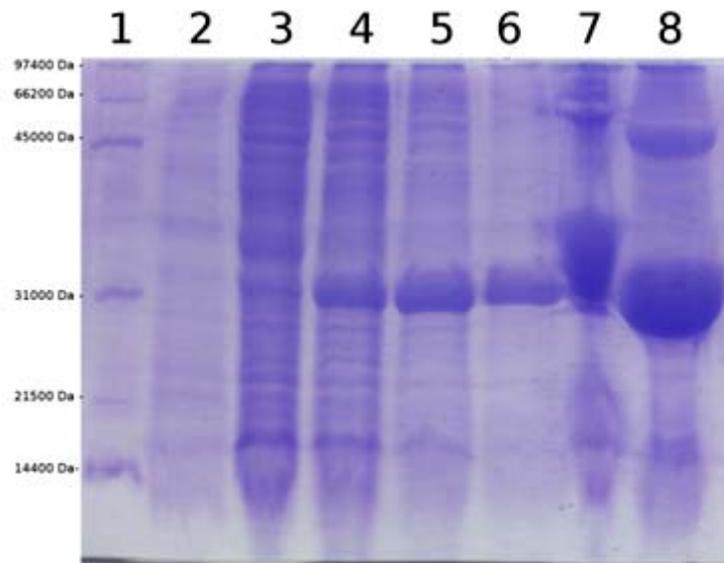


Figura 11. **Solubilización de Trx-Hev b 1.** A través de SDS-PAGE se siguió la solubilización de la proteína Trx-Hev b 1. Carriles: 1, marcador de masa molecular; 2, Fracción soluble del lisado celular; 3, fracción soluble del lavado de los cuerpos de inclusión con 0.1% Tween 20; 4, fracción soluble del lavado de los cuerpos de inclusión con 0.3% Tween 20; 5, fracción soluble del segundo lavado de los cuerpos de inclusión con 0.3 % Tween 20; 6, Tercer lavado con 0.3 % Tween 20; 7, pellet; 8, solubilización con urea 8M.

Existen varios mecanismos conocidos por los que los surfactantes estabilizan las proteínas. Primero, los surfactantes no iónicos como el Tween pueden proteger a las proteínas de la agregación inducida por la interacción entre las regiones hidrofóbicas en la superficie de las proteínas y, por lo tanto, disminuir las interacciones moleculares como puentes de hidrogeno [Danny K Chou, et al., 2005; Bam NB. et al., 1998]. Segundo, la unión de Tween 20 al estado nativo de la proteína también puede minimizar la superficie de la agregación inducida por el aumento de la energía libre de la proteína desplegada y finalmente, los tensoactivos no iónicos pueden actuar como chaperonas químicas, favoreciendo el replegamiento sobre la agregación uniéndose transitoriamente a moléculas de proteínas parcialmente plegadas y obstaculizando estéricamente las interacciones intermoleculares que resultarían en agregación. [Danny K Chou, et al., 2005; Bam NB, et al., 1998]. Por estas razones se probaron los detergentes Tween 20 y Triton X-100 y en ambos casos

se observó la solubilización de Hev b 1 y por motivos prácticos y para el posterior corte con EK y los análisis de DC, se decidió utilizar Tween 20.

Como se aprecia en la Figura 11 la proteína de fusión puede ser solubilizada de cuerpos de inclusión, en presencia del detergente Tween 20, aun sin la necesidad de utilizar un agente desnaturizante.

La muestra obtenida del tercer lavado con 0.3 % Tween 20 (Figura 11, carril 6) se purificó mediante una columna de afinidad Ni²⁺-NTA (GE, Healthcare) previamente equilibrada con amortiguador. La elución se realizó con amortiguador de unión en el cual la concentración de Imidazol se incrementó a 300 mM. La purificación de Trx-Hev b 1 se verificó por SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie (Figura 12).

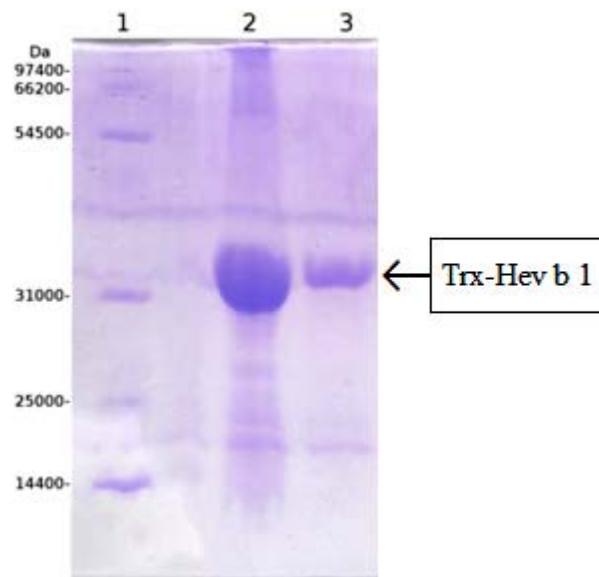


Figura 12. **Purificación de Trx-Hev b 1.** Carriles 1, marcador de masa molecular; 2, elución 1 de la columna de níquel; 3, elución 2.

El rendimiento de Trx-Hev b 1 se estimó en aproximadamente 70 mg por litro de cultivo. El resultado de espectrofotometría de masas MALDI-TOF dio una masa molecular experimental de 33.37 kDa muy cercana a la teórica de 33.29 kDa (Figura 13).

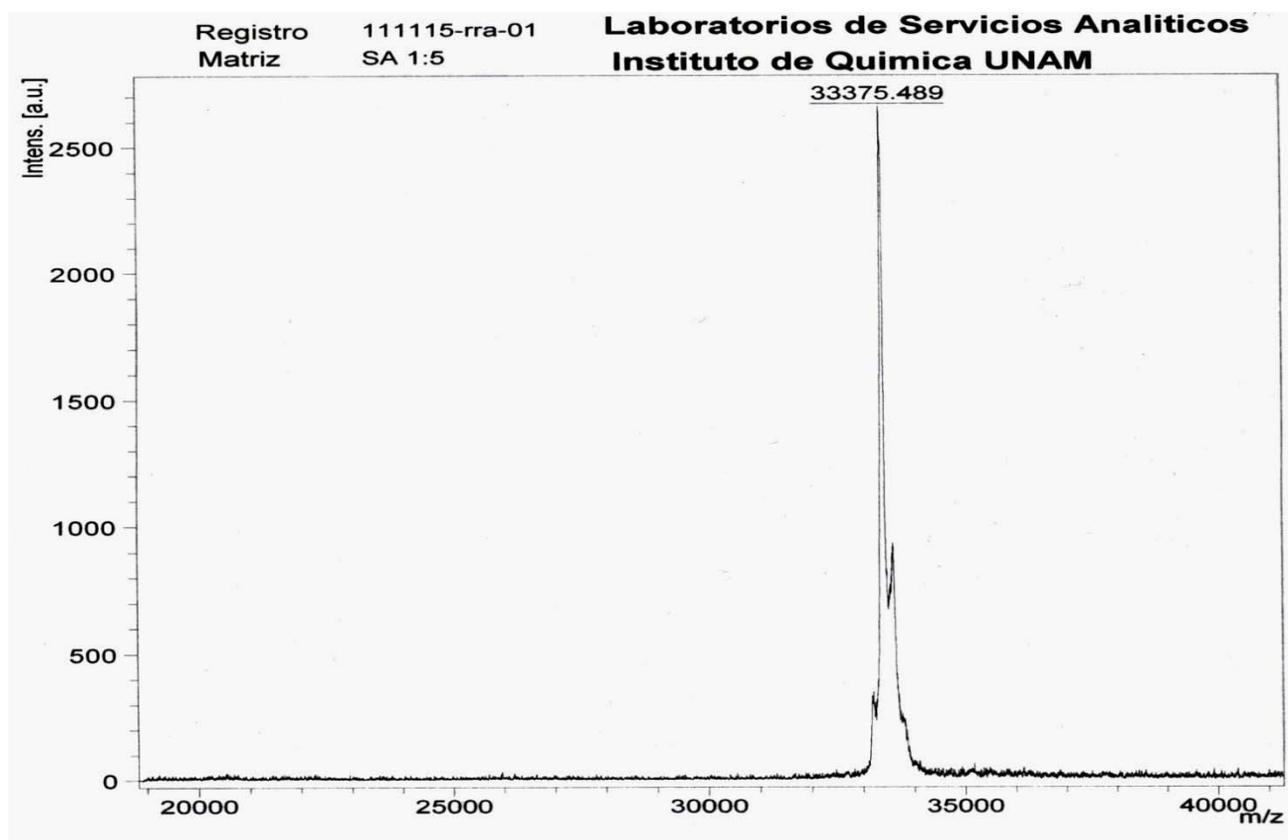


Figura 13. **Espectro de masas MALDI-TOF de Trx-Hev b 1.** En matriz de ácido sinapínico.

Una vez purificada la proteína de fusión, ésta se escindió de la Trx mediante la proteasa EK, para la cual primero se realizó una cinética de digestión con diferentes concentraciones de la proteasa. En la Figura 14 se muestran los resultados de este experimento donde se aprecia que con 0.1 U de enzima la proteína de fusión desaparece y se observan tres bandas producto de la digestión (Figura 14, carril 5). De acuerdo al esquema de la construcción Trx-Hev b 1 (Figura 3b) después del corte con EK se espera obtener tres proteínas, Trx con una masa molecular de 18.58 kDa, Hev b 1 con una masa molecular de 14.72 kDa y una tercera proteína con una digestión incompleta, es decir, sólo en el primer sitio de corte de EK de 16.25 kDa. Se puede apreciar que con 1 U de EK hay una proteólisis en un sitio no deseado (una unidad de enteroquinasa corresponde a 190 unidades de activación de tripsinogeno) Figura 14, carril 6.

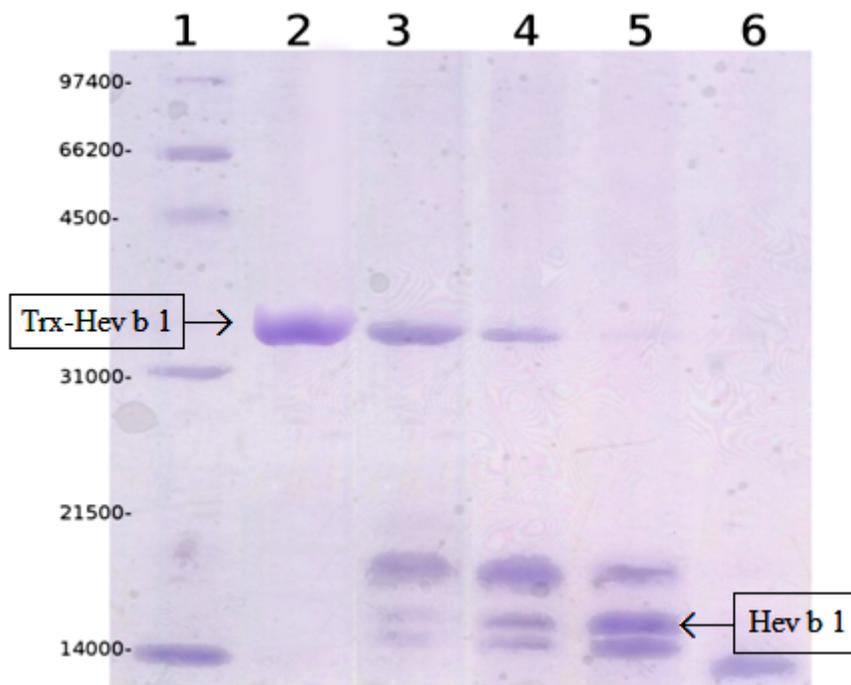


Figura 14. **SDS-PAGE Cinética de digestión con enteroquinasa.** Carriles: 1, marcador de masa molecular; 2, proteína de fusión sin digerir; 3, fracciones obtenidas después de la digestión con enteroquinasa; 4 con 0.001 U; 4, 0.01 U; 5, 0.1 U; 6, con 1 U.

Para obtener la cantidad necesaria de proteína libre de proteína de fusión, se digirieron 5 mg de Trx-Hev b 1 con 2.5 U de EK durante 16 h a 37°C. La proteína se sometió nuevamente a una purificación con cromatografía de afinidad Ni²⁺-NTA para retirar a la proteína de fusión que no fué digerida, así como los fragmentos de tiorredoxina que se obtuvieron después de la digestión con la EK. Finalmente la fracción que no se pega a la columna se purificó por cromatografía de fase reversa en un sistema de alta presión (RP_HPLC) utilizando una columna Zorbax 300SBC3 (Agilent) en un equipo Hewlett Packard 1100. El perfil de elución se muestra en la Figura 15.

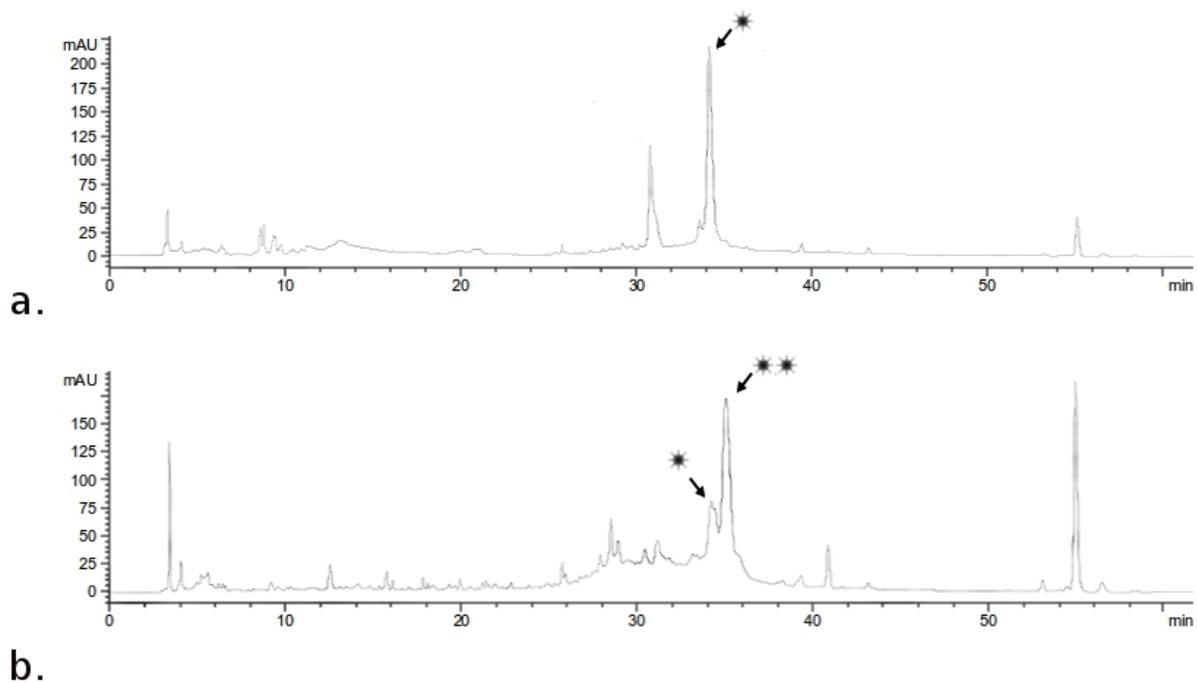


Figura 15. **Perfil de elución de la cromatografía de fase reversa.** A) Muestra antes de la digestión. * Trx-Hev b 1. B) Muestra posterior a la digestión. *Trx-Hev b 1, **Hev b 1.

La fracción retenida a 35 min se colectó y se concentró. La masa molecular se determinó por espectrometría de masas MALDI-TOF. El espectro de masas correspondiente se muestra en la Figura 16, donde se observa una fracción con una masa de 14.75 kDa que corresponde a la proteína Hev b 1 cuya masa calculada es de 14.72 kDa, con una diferencia mínima de 22 Da que se atribuyó a la calibración del espectrómetro. Así mismo, se observó otra fracción con una masa de 16.23 kDa, que corresponde a Hev b 1 más el fragmento de corte del primer sitio de enteroquinasa, como se observa en la Figura 3. El péptido AMADIGSEFDDDDK, se encuentra en la región amino terminal y posee una masa de 15.28 kDa, que junto con la masa de Hev b 1 proporciona la masa de la fracción de menor tamaño de 16.2 kDa. Este péptido representa aproximadamente el 10% de la preparación de Hev b 1. Por lo tanto se sugiere modificar el gradiente de elución en la purificación por RP-HPLC para tratar de separar estas dos proteínas y tener una muestra más enriquecida de Hev b 1.

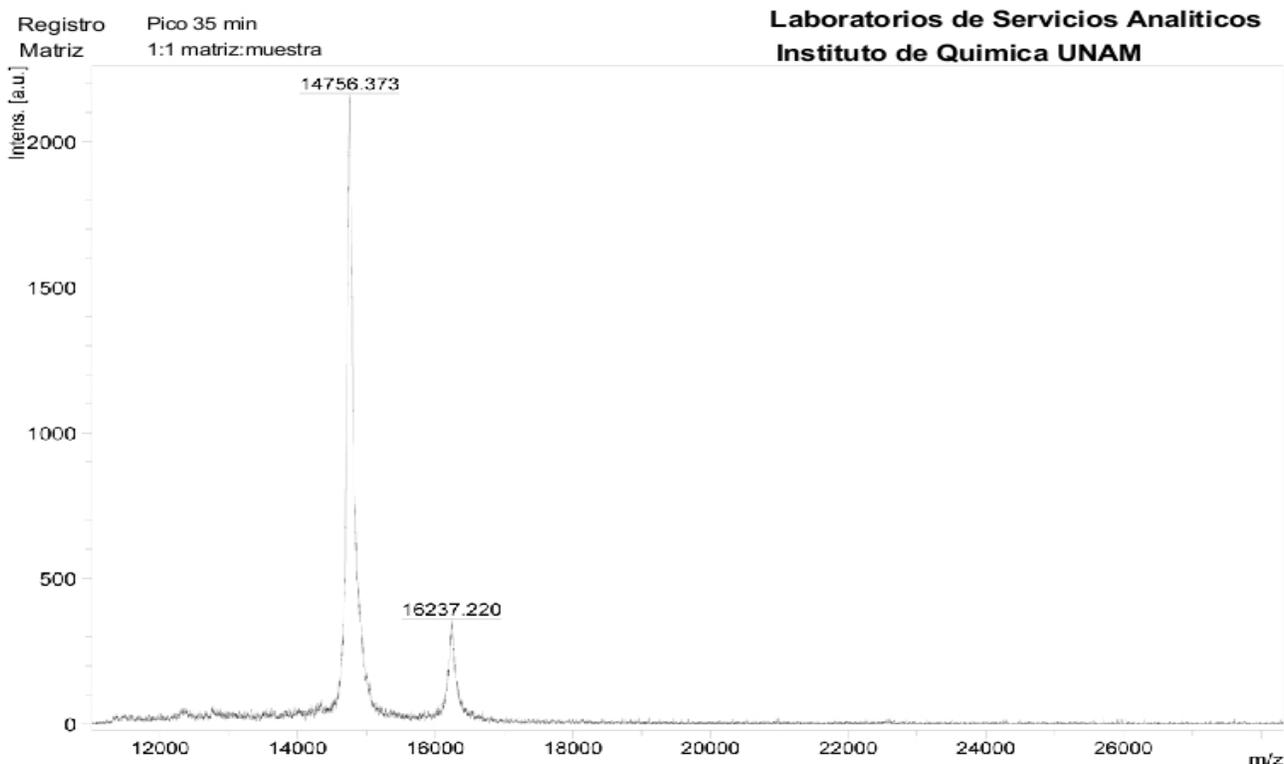


Figura 16. **Espectro de masas MALDI-TOF de Hev b 1.** Espectro de la proteína digerida purificada por cromatografía de alta resolución en fase reversa.

Dicroísmo circular y predicción de estructura terciaria

Con el fin de determinar si la proteína adopta algún tipo de plegamiento, se obtuvo el espectro de dicroísmo circular de Hev b 1 en la región del UV-Lejano (190-260 nm). Como se mencionó anteriormente, Hev b1 es altamente hidrofóbica y se agrega fácilmente en medios acuosos, por lo que se requirió utilizar un disolvente para ayudar a su solubilización. Se utilizó una disolución de la proteína en agua:acetonitrilo 10% y una concentración de 0.26 mg/mL. Cabe mencionar que se probaron diversos amortiguadores y detergentes buscando el mejor disolvente que pudiese permitir la medición del espectro de la proteína sin interferir con éste. Estas condiciones finalmente se encontraron cuando se usó la mezcla (agua 90%, acetonitrilo 10%), que prácticamente no tiene señal en el DC y permite que la proteína se mantenga de forma estable y sin agregación. El espectro que muestra la relación entre la elipticidad molar por residuo medio en

función de la longitud de onda se presenta en la Figura 17; claramente se observan 2 mínimos centrados en 222 y otro en 208, característicos de estructuras donde predomina la hélice- α [Duward F, *et al.*, 2004].

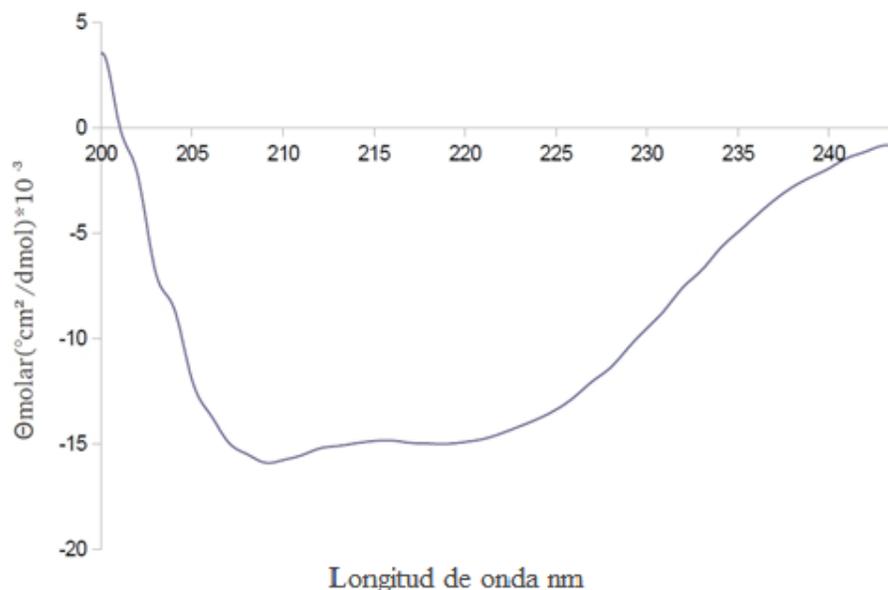


Figura 17. **Espectro de dicroísmo circular de Hev b 1.** La muestra analizada en UV lejano presentó una concentración de 0.26 mg/mL en agua:acetonitrilo al 10%.

Los datos obtenidos mediante dicroísmo circular se sometieron a un análisis usando diversos programas para determinar la proporción de estructuras secundarias que conforman a la proteína.

Los datos que el programa SELCON3 [Sreerama N, *et al.*, 1999] determinó, se muestran en la Tabla 2. Estos datos confirman un contenido de estructura predominantemente hélice α para este alérgeno.

Tabla 2. **Contenido de estructuras secundarias determinado por el programa SELCON3**

Tipo de estructura	Hélice α	Hebra β	Giro β	Poliprolina	Desestructurado
Porcentaje	84.7	0.2	5.5	2	9.1

Estos datos confirman un contenido de estructura secundaria predominante de hélice α para este alérgeno.

Por otra parte, la estructura primaria de Hev b 1 se sometió a varios análisis en servidores de bioinformática para poder estimar su estructura secundaria y terciaria. La estructura secundaria fue predicha por el servidor XtalPred [Slabinski, L, *et al.*, 2007(1); Slabinski, L, *et al.*, 2007(2)] el resultado obtenido se muestra en la Figura 18.

```

1...*...10...*...20...*...30...*...40...*...50
MAEDEDNQGGQGEGLKYLGFVQDAATYAVTTFSNVYLFAKDKSGPLQPGV
...*...60...*...70...*...80...*...90...*...100
DIIEGPVKNVAVPLYNRFSYIPNGALKFVDSTVVASVTIIDRSLPPIVKD
...*...110...*...120...*...130...*...
ASIQVVS AIRAAPEAARSLASSLPGQTKILAKVFYGEN

```

Figura 18. **Predicción de estructura secundaria usando el servidor XtalPred.** En rojo se muestra la estructura hélice α , en negro asa, en azul hebras β y en subrayado estructura desordenada.

Los resultados obtenidos usando este servidor arrojaron la siguiente información: 80% hélice α , 15% de asa, 4% de hebra β y 13% de estructura desordenada. Estos datos son muy semejantes a los datos experimentales obtenidos mediante la técnica de dicroísmo circular (una diferencia aproximada de 4.1%).

Modelado tridimensional

Para obtener un modelo tridimensional se usaron varios servidores que utilizan estructuras tridimensionales experimentales que son similares en secuencia pero la mayoría no logró predecir una, ya que a la fecha prácticamente

no existen estructuras tridimensionales de proteínas que presenten una identidad alta con Hev b 1 en el Banco de Datos de Proteínas (PDB). Utilizando el servidor de CPHmodels-3.0 Server de la Technical University of Denmark (<http://www.cbs.dtu.dk>), se logró obtener un modelo tridimensional de la estructura de Hev b 1. Este servidor utiliza también modelos homólogos, pero se basa en un alineamiento previo de la estructura secundaria, así como en la identificación de los residuos que están expuestos al disolvente, Figuras 19, 20A y 20B.

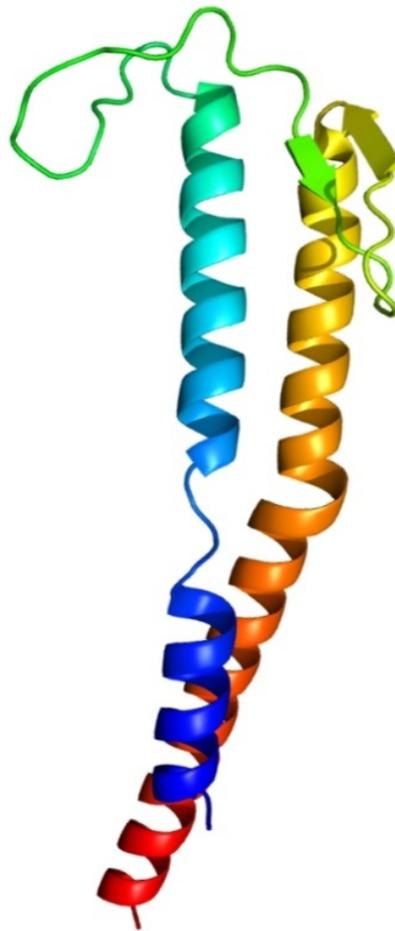
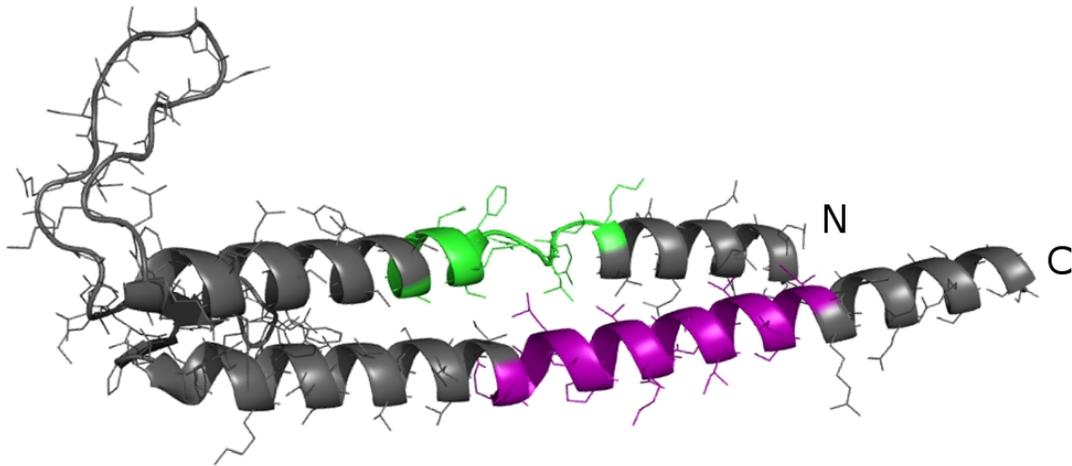
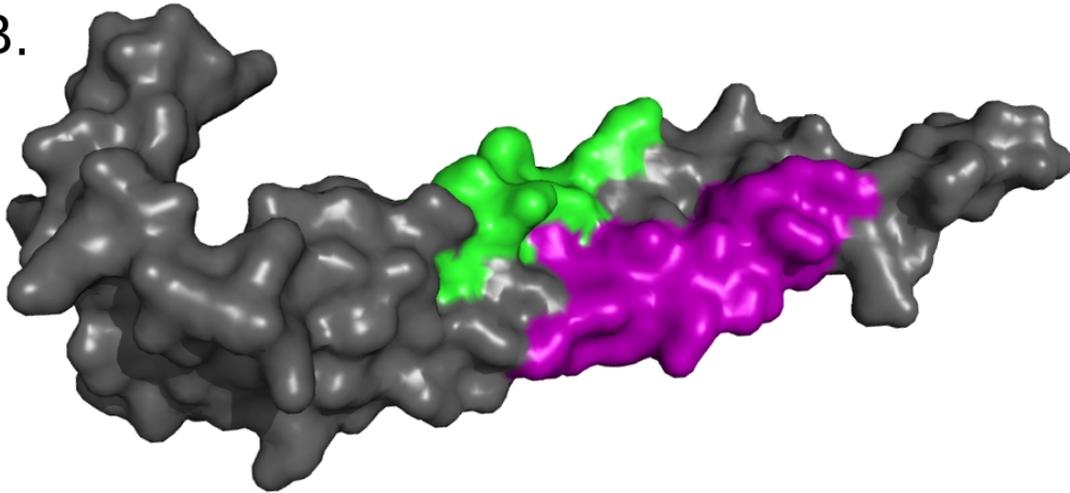


Figura 19. **Representación de listón de la estructura tridimensional de Hev b 1.** La estructura se obtuvo con el servidor de CPHmodels-3.0 Server de la Technical University of Denmark. En color azul se muestra el extremo amino terminal y en rojo el carboxilo terminal.

A.



B.



C.

Hev b 1 MAEDEDNQGGQGEGL KYLGFVQDA TYAVTTFSNVYLF AKDKSGPLQPGVD I I EGPVKNV
Hev b 1 AVPLYNRFSY I PNGALKFVDSTVVASVT I I DRSLPPIVKDAS I QVVSA I RAAPEAARSLA

Figura 20. **Representación de la estructura tridimensional de Hev b 1 y su secuencia de aminoácidos.** A) Modelo tridimensional en representación de listón. B) Modelo de superficie. C) Secuencia de aminoácidos. Se marcan las regiones alérgicas/antigénicas según M. Raulf- Heimsoth y colaboradores, en color morado y en verde el epítipo conformacional, que sólo es reconocido por IgE's de suero de pacientes.

En el modelo tridimensional de la Figura 20 A. Podemos observar que el primer epítipo (en color verde), a partir del extremo amino-terminal se encuentra en la región central de una α hélice y una parte en la región desestructurada que incluye a los aminoácidos Tyr¹⁷ y Phe²⁰ expuestos al disolvente, mientras que el segundo epítipo (en violeta) se encuentra en la segunda hélice, con los aminoácidos Lys⁹⁹ e Ile¹⁰³ como los más expuestos al disolvente. En el modelo de superficie de la Figura 20 B. Se observa que ambos epítipos se encuentran muy cercanos, por lo que se puede especular que toda esta región es un epítipo conformacional que posee capacidad de unión a anticuerpos IgE.

Otra región no mostrada en el modelo debido a que corresponde a una estructura que no presenta homología con ningún modelo actual y que seguramente está desestructurada, se encuentra esencialmente en la región carboxilo terminal [Chen, Z, *et al.*, 1996]. Los aminoácidos que quedarían expuestos de la región PGQTKILAKVIFY, descrita en la introducción, serían esencialmente los que podrían ser reconocidos por las inmunoglobulinas de Tipo I. Según los reportes de Chen, Z y colaboradores en 1996, estos aminoácidos serían P¹²³, G¹²⁴ y Y¹³⁴.

La puntuación del modelo (Z-Score) fue de 4.1, lo que indica que el modelo puede ser variable, en una escala de 1 a 10 donde 10 sería un modelo idéntico y 1 un modelo con muy baja similitud, por lo que el modelo podría tener variaciones respecto a una estructura cristalográfica.

La proteína modelo que utilizó el servidor fue la estructura cristalográfica de la cadena C de la proteína chaperona prefoldina de *Pyrococcus horikoshii* OT3 (PhCPN), PDB (2ZDI), la cual tiene un 24 % de identidad con Hev b 1 como se muestra en la Figura 21.

```

Query: 1  EDEDNQGGQGEGLKYL----GFVQDAATYAVTTFSNVYLFADKSG-----PLQPGV-- 60
Templ: 1  KLAYEYQVLQAQAQILAQNLELLNLAKAEVQTVRETLENLKKIEEEKPEILVPIGAGSFL 60

Query: 61  -DIIIEGPVKNVAVPLYNRFSYIPN-GALKFVDSTVVASVTIIDRSLPPIVKDASIQVVSA 120
Templ: 61  KGVIVDKNNAIVSVGSGYAVERSIDEAISFLEKRLKEYDEAIKK-TQGALAELEKRIGEV 120

Query: 121 IRAAPEAARSLASS 134
Templ: 121 ARKAQEVQQKQSMT 134

```

Figura 21. Alineamiento de secuencias de chaperona prefoldina de *Pyrococcus horikoshii* OT3 (Templ) y Hev b 1 (Query).

En el modelo mostrado en la Figura 19, se puede apreciar que la proteína Hev b 1 presenta fundamentalmente hélice α , como también lo había predicho el servidor para estructura secundaria el espectro de DC observándose un motivo hélice-asa-hélice, característico de proteínas de membrana, así como un par de pequeñas hebras β . Es importante hacer notar que uno de los parámetros obtenidos por los servidores <http://jcmm.burnham.org/>, <http://services.mbi.ucla.edu/> y <http://pepcalc.com/> fue la hidrofobicidad de la proteína obteniéndose un valor de 34% de aminoácidos hidrofóbicos contra un 19% de hidrofílicos. Estos resultados permiten explicar la formación de cuerpos de inclusión, así como la separación exitosa con la columna de fase reversa.

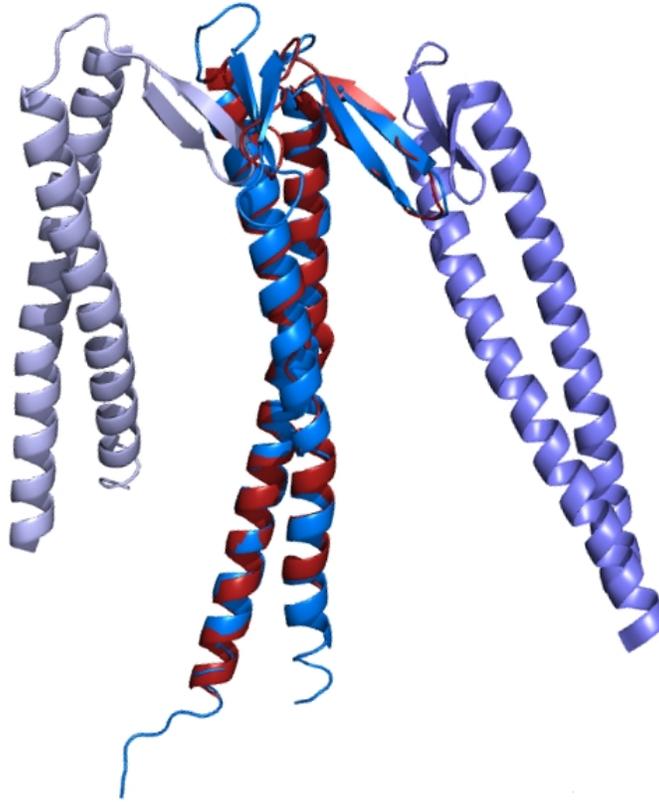


Figura 22. **Superposición del modelo de Hev b 1 y la prefoldina de *Pyrococcus horikoshii*.** En rojo se muestra a Hev b 1 y en azul a la prefoldina, en lila y morado se muestran otras hélices de la prefoldina.

PhCPN de *Pyrococcus horikoshii* y Hev b 1

La chaperonina prefoldina (PhCPN) de la arquea termófila *Pyrococcus horikoshii* OT3, es un homo oligómero que posee una estructura de doble anillo la cual protege las proteínas de la agregación térmica mediante su actividad como chaperona. Las chaperonas moleculares son proteínas ubicuas necesarias para el correcto plegamiento, ensamblaje, transporte y degradación de las proteínas. Las chaperoninas son complejos de 7 a 9 miembros de anillos dobles de 800-1000kDa, que capturan a las proteínas no nativas en una cavidad central que promueve el correcto plegamiento de forma dependiente de ATP. PhCPN se compone de un conjunto de dos barriles β con seis hélices α sobresaliendo de ellas, las regiones distales de las hélices α exponen parches hidrofóbicos que son necesarios para la unión multivalente de las proteínas no nativas. La forma de acción de las PhCPN es mediante la estabilización de las proteínas

desnaturalizadas mediante la interacción de éstas con las puntas de los “tentáculos” que posee en los extremos de las hélices α para posteriormente estabilizar y liberar a las proteínas desnaturalizadas dentro de la cavidad de las chaperoninas (Hsp60) [Jaime Martín-Benito, et al., 2007].

Con base en los antecedentes, en los resultados obtenidos en los experimentos, así como al modelo obtenido basado en la homología estructural con la chaperonina prefoldina de la arquea termófila de *Pyrococcus horikoshii*, se puede especular un poco sobre la función de Hev b 1 en el látex del árbol de *H. brasiliensis*. Como se mencionó en la introducción, existen reportes que indican que Hev b 1 es un conector entre las partículas de hule y la enzima preniltransferasa. Al analizar el modelo tridimensional obtenido por homología y tomando en cuenta las características que posee la proteína chaperona que nos proporcionó el molde para el modelo podríamos proponer la posibilidad de que Hev b 1 se encontrara implicada en el correcto plegamiento o en la activación de la preniltransferasa. Esta propuesta se basa en la alta homología estructural entre Hev b 1 y la chaperona prefoldina (PhCPN) (figura 22) y en los reportes que demuestran que la enzima preniltransferasa pierde su actividad en ausencia de Hev b 1 [Mark S. Dennis y David R. Light. 1989]. También, como se comentó en la introducción, se ha especulado sobre la posibilidad de que Hev b 1 se encuentre formando complejos oligoméricos tetraméricos [Chardin H, et al., 2000; Anil Kush, *et al.*, 1990], lo que estaría apoyado por la similitud con PhCPN la cual forma complejos para realizar su función de chaperona. Por lo anteriormente expuesto proponemos que Hev b 1 podría formar un oligómero que se ancle sobre las partículas de hule y por otro lado sostener y/o estabilizar mediante las hélices α al complejo formado por la preniltransferasa y otras proteínas permitiendo que éstas adopten la estructura correcta para que la enzima pueda realizar su función de polimerización del cis-isopreno durante la síntesis del hule natural, en la Figura 23 se muestra una posible representación del tetrámero.

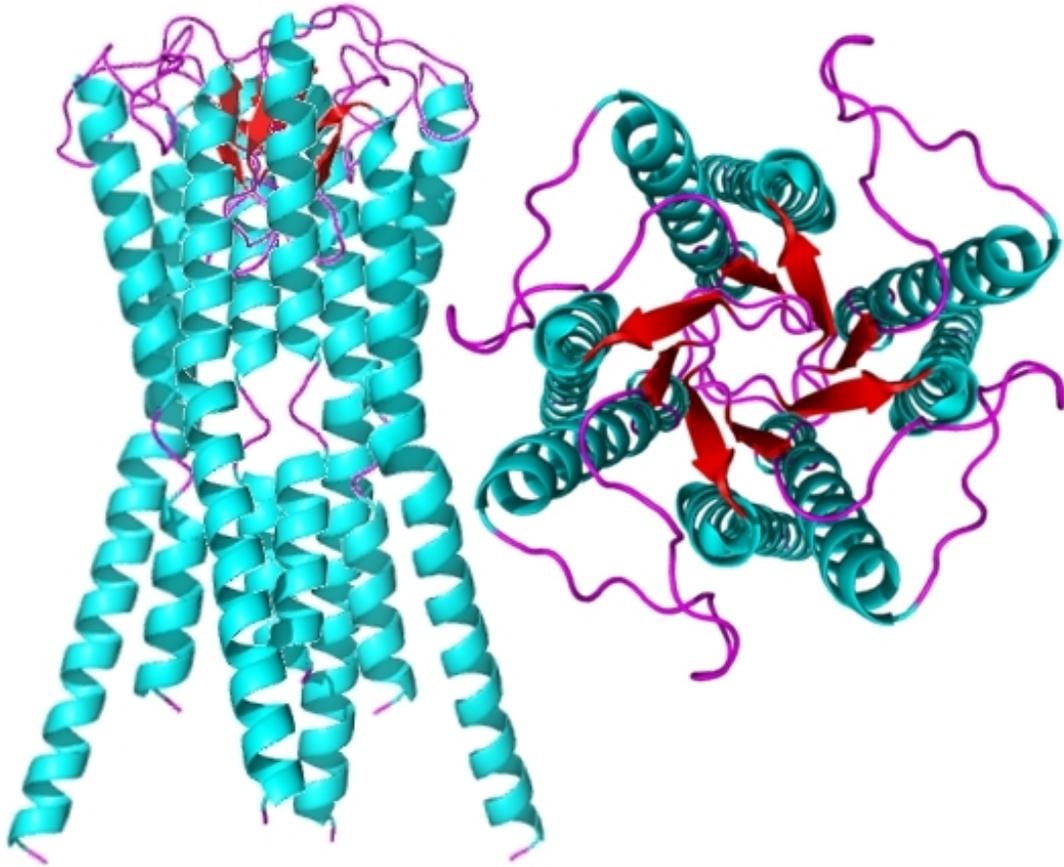


Figura 23. **Modelo de la posible oligomerización del tetramero de Hev b 1.**

CONCLUSIONES

La secuencia de nucleótidos del gen Hev b 1 obtenidos en hoja y en látex es idéntica, observándose una mayor expresión en el látex, mientras que en hojas maduras no se observó expresión.

El vector pET 32a y la cepa *E. coli* C41 fueron eficientes en la transformación y la sobre-expresión de la proteína Hev b 1, obteniéndose una proteína de fusión (Trx-Hev b1) que tiende a formar cuerpos de inclusión con un rendimiento de aproximadamente 72 mg de proteína de fusión por litro de cultivo (aproximadamente 36 mg de Hev b 1 por litro de cultivo).

La proteína puede recuperarse de los cuerpos de inclusión utilizando detergentes (Tritón X-100 y Tween 20) y obtenerse bastante pura, sin necesidad de utilizar agentes desnaturalizantes.

Se logró purificar a la proteína mediante técnicas cromatográficas y liberarla de la proteína de fusión con la enzima EK, verificándose mediante espectrometría de masas que la masa molecular de Hev b 1 coincide con el valor teórico de 14.7kDa.

La proteína se comporta conforme a la predicción de los servidores siendo muy hidrofóbica y presentando poca solubilidad.

Se determinaron las condiciones de mayor estabilidad para las proteínas de fusión y Hev b 1 pura, que fueron. Tris-HCl, pH 8.0, NaCl 300 mM y Tween 20 al 0.1%.

Mediante técnicas de dicroísmo circular se observó que Hev b 1 presenta en su estructura secundaria un alto contenido de hélice α .

La comparación del modelo tridimensional por homología de Hev b 1, así

como las predicciones en los servidores bioinformáticos coincidieron con los resultados obtenidos por dicroísmo circular, mostrando que la proteína exhibe más del 80% de estructura helicoidal.

Mediante el modelo tridimensional obtenido se puede proponer que en los epítomos determinados por M. Raulf- Heimsoth *et al*, los aminoácidos más importantes para la alergenicidad, debido a su exposición al disolvente, serían los aminoácidos Tyr¹⁷ y Phe²⁰, mientras que en el segundo epítomo serían los aminoácidos Lys⁹⁹ e Ile¹⁰³. Además se puede sugerir que Hev b 1 puede funcionar como una chaperonina, que podría ayudar al plegado correcto del complejo de la preniltransferasa.

PERSPECTIVAS

1. Expresión del alérgeno rHev b 1 sin proteína de fusión en cuerpos de inclusión y recuperación mediante detergente.
2. Análisis de parámetros bioquímicos de rHev b 1, así como realizar pruebas de dispersión dinámica de luz para determinar la presencia de oligómeros.
3. Extraer y purificar Hev b 1 de látex para realizar ensayos comparativos con rHev b 1.
4. Realizar ensayos de ELISA con IgEs de suero de pacientes para corroborar la alergenicidad de rHev b 1 y comparar con respecto a la proteína silvestre.
5. Obtener un anticuerpo monoclonal para rHev b 1.
6. Realizar pruebas de cristalización.
7. Si se obtienen cristales adecuados caracterizarlos por técnicas de difracción de rayos X y obtener la estructura terciaria.
8. Realizar ensayos de interacción con la preniltransferasa recombinante.

BIBLIOGRAFÍA

Abbas, A K, Lichtman, A H, Pober, J S. (1997). Cellular and Molecular Immunology, 3rd. W.B. Saunders Company, Philadelphia.

Alenius H, Kalkkinen N, Lukka M, Turjanmaa K, Reunala T, Mäkinen- Kiljunen S. (1995). Purification and partial amino acid sequencing of a 27- kDa natural rubber allergen recognized by latex-allergic children with spina bifida. *Int Arch Allergy Immunol.* 106, 258-62.

Alenius H, Kurup V, Kelly K, Palosuo T, Turjanmaa K, Fink J. (1994). Latex allergy: frequent occurrence of IgE antibodies to a cluster of 11 latex proteins in patients with spina bifida and histories of anaphylaxis. *Lab. Clin. Med.* 123, 712-720.

Alenius H, Palosuo T, Kelly K. (1993). IgE reactivity to 14-kD and 27-kD natural rubber proteins in latex-allergic children with spina bifida and other congenital anomalies. *Int Arch Allergy Immunol.* 102, 61-6.

Anil Kush, Elisabeth Goyvaerts, Mee-Len Chye, and Nam-Hai Chua. (1989). Laticifer-specific gene expression in *Hevea brasiliensis* (rubber tree). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87, 1787-1790.

Bam N B, Cleland J L, Yang J, Manning M C, Carpenter J F, Kelley R F, Randolph T W. (1998). Tween protects recombinant human growth hormone against agitation-induced damage via hydrophobic interactions. *J Pharm Sci.* 87, 1554-1559.

Banerjee B, Kanitpong K, Fink J N, Zussman M, Sussman G L, Kelly K J, Kurup V P. (2000). Unique and shared Ig Eepitopes of Hev b 1 and Hev b 3 in latex allergy. *Mol Immunol.* 37, 789-798.

Baneyx F, Ayling A, Palumbo T, Thomas D, Georgiou G. (1991). Optimization of

growth conditions for the production of proteolytically-sensitive proteins in the periplasmic space of *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 36, 14-20.

Baneyx, F., and Georgiou G. (1992). Degradation of secreted proteins in *Escherichia coli*. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 665, 301-308.

Baur X, Chen Z, Raulf-Heimsoth M, Degens P. (1997). Protein and allergen content of various natural latex articles. *Allergy*. 52, 661-4.

Birgit Wagner, Monika Krebitz, Dietke Buck, Bodo Niggemann, Hong Yeet Yeang, Kyung-Hwan Han, Otto Scheiner and Heimo Breiteneder. (1999). Cloning, expression, and characterization of recombinant Hev b 3, a *Hevea brasiliensis* protein associated with latex allergy in patients with spina bifida. *J Allergy Clin Immunol*. 104, 1084-92.

Breiteneder H, Scheiner O. (1998). Molecular and immunological characteristics of latex allergens. *Int. Arch. Allergy Immunol*. 116, 83-92.

Carpio-Rodríguez. (2012). Caracterización de la proteína recombinante Hev v 5 de *Hevea brasiliensis*. Tesis de maestría. Universidad Nacional Autónoma de México.

Chan H S, Dill K A. (1991). Polymer principles in protein structure and stability. *Annu Rev Biophys Biophys Chem*. 1991, 20, 447-90.

Chardin H, Chen Z, Raulf-Heimsoth M, Mayer C, Sénéchal H, Desvaux F X, Peltre G. (2000). Identification of Hev b1 in natural latex mattresses. *Int Arch Allergy Immunol*. 121, 211-4.

Chardin H, Desvaux F X, Mayer C, Sénéchal H, Peltre G. (1999). Protein and allergen analysis of latex mattresses. *Int Arch Allergy Immunol*. 119, 239-46.

Chen Z, Kampen V, Raulf-Heimsoth M, Baur X. (1996). Allergenic and antigenic determinants of latex allergen Hev b 1: peptide mapping of epitopes recognized by human, murine and rabbit antibodies. *Clin Exp Allergy*. 26, 406-415.

Chen Z, Cremer R, Posch A, Raulf-Heimsoth M, Rihs HP, Baur X. (1997). On the allergenicity of Hev b 1 among health care workers and patients with spina bifida allergic to natural rubber latex. *J Allergy Clin Immunol*. 100, 684-93.

Christophe Herman, Danielle The´venet, Philippe Bouloc, Graham C. Walker, Richard D'Ari. (1998). Degradation of carboxy-terminal-tagged cytoplasmic proteins by the *Escherichia coli* protease HflB (FtsH). *Genes & Development*. 12, 1348-1355.

Chye M L, Tan C T, Chua N H. (1992). Three genes encode 3- hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase in *Hevea brasiliensis*: hmg1 and hmg3 are differentially expressed. *Plant Mol Biol*. 19, 473-84.

Cremer R, Hoppe A, Korsch E, Kleine-Diepenbruck U, Bläker F. (1998). Natural rubber latex allergy: prevalence and risk factors in patients with spina bifida compared with atopic children and controls. *Eur J Pediatr*. 157, 13-6.

Czuppon A B, Chen Z, Rennert S. (1993). The rubber elongation factor of rubber trees (*Hevea brasiliensis*) is major allergen latex. *J Allergy Clin Immunol*. 92, 690-7.

Danny K. Chou, Rajesh Krishnamurthy, Theodore W. Randolph, John F. Carpenter, Mark Cornell Manning. (2005). Effects of Tween 20 and Tween 80 on the Stability of Albutropin During Agitation. *J of Pharmaceutical Sciences*. 94, 1368-1381.

Dennis M S, Henzel W J, Bell J, Kohr W, Light D R. (1989). Amino acid sequence of rubber elongation factor protein associated with rubber particles in Hevea latex. *J Biol Chem.* 264, 118-26.

Duward F. Shriver. (2004). *Química inorgánica.* ed Reverté. 644-646

George G. Winspear. (1954). *The Vanderbilt latex handbook.* 35.

Guan, C., Li, P., Riggs, P.D. and Inouye, H. (1988). Vectors that facilitate the expression and purification of foreign peptides in *Escherichia coli* by fusion to maltose-binding protein. *Gene.* 67, 21-30.

Hufnagl K, Wagner B, Winkler B, Baier K, Hochreiter R, Thalhamer J, Kraft D, Scheiner O, Breiteneder H & Wiedermann U. (2003). Induction of mucosal tolerance with recombinant Hev b 1 and recombinant Hev b 3 for prevention of latex allergy in BALB/c mice. *Clin Exp Immunol.* 133, 170-176

James GT. (1978). Inactivation of the protease inhibitor phenylmethyldulfonyl fluoride in buffers. *Anal Biochem.* 86, 574-579

Jeffrey D. Fox and David S. Waugh. (2003). Maltose-Binding Protein as a Solubility Enhancer. *Methods Mol Biol.* 205, 99-117.

Kekwick RGO d' Auzac J, Jacob JL, Chrestin L. (1989). The formation of isoprenoids in Hevea latex. *Physiology of rubber tree latex, FL: CRC Press.* 145-164.

Kelly, K.J., Pearson, M.L., Kurup, V.P., Havens, P.L., Byrd, R.S., Setlock, M.A., Butler, J.C., Slater, J.E., Grammer, L.C., Resnick, A., Roberts, M., Jarvis, W.R., Davis, J.P., Fink, J.N. (1994). A cluster of anaphylactic reactions in children with spina bifida during general anesthesia: epidemiologic features, risk factors, and

latex hypersensitivity. *J Allergy Clin Immunol.* 94, 53-61.

Keng-See Chow, Kiew-Lian Wan, Mohd. Noor Mat Isa, Azlina Bahari, Siang-Hee Tan, K. Harikrishna, and Hoong-Yeet Yeang. (2007). Insights into rubber biosynthesis from transcriptome analysis of *Hevea brasiliensis* latex. *J of Exp Botany.* 58, 2429-2440.

Kostyal D A, Hickey V L, Noti J D, Sussman G L, Beezhold D H. (1998). Cloning and characterization of a latex allergen (Hev b 7): homology to patatin, a plant PLA₂. *Clin Exp Immunol.* 112, 355-362.

LaVallie, E R, DiBlasio E A, Kovacic S, Grant K L, Schendel P F and McCoy J M. (1993). A thioredoxin gene fusion expression system that circumvents inclusion body formation in the *E. coli* cytoplasm. *Bio/Technology.* 11, 187-193.

Lu L J, Kurup V P, Hoffman D R, Kelly K J, Murali P S, Fink J N. (1995) Characterization of a major latex allergen associated with hypersensitivity in spina bifida patients. *J Immunol.* 155, 2721-8.

M J R Loadman. (1995). *The Exploitation of Natural Rubber.* 1531. 11-22.

Mark C. Swanson, B.A. Charles, E. Reed, M.D. Loren Hunt, M.D. John w. Younginger, M.D. (2000). *Indoor air quality hand book* 41. Latex. 41.1-41.16.

Martín-Benito Jaime, Gómez-Reino Juan, Stirling Peter C, Lundin Victor F, Gómez-Puertas Paulino, Boskovic Jasminka, Chacón Pablo, Fernández José J, Berenguer José, Leroux Michel R, Valpuesta José M. (2007). Divergent substrate-binding mechanisms reveal an evolutionary specialization of eukaryotic prefoldin compared to its archaeal counterpart. *Structure.* 15, 101-110.

Mark S Dennis and David R. Light. (1989). Rubber Elongation Factor from *Hevea brasiliensis*. Identification, Characterization, and role in rubber biosynthesis .

J of Biol Chem. 264, 18608-18617.

Martínez-Caballero. (2009). Clonación y expresión del alérgeno Hev b 11 (quitinasa de clase I) de hevea brasiliensis. Tesis de maestría Universidad Autónoma de México. México Df.

Meeropol E, Kelleher R, Bell S, Leger R. (1990). Allergic reactions to rubber in patients with myelodysplasia. N Engl J Med. 15, 1072.

MF Lee, NM Wang, JL Han, SJ Lin, JJ Tsai, 1 YH Chen. J. Estimating Allergenicity of Latex Gloves Using Hev b 1 and Hevamine. (2010). J Investig Allergol Clin Immunol. 20, 499-505.

Michael T, Niggemann B, Moers A, Seidel U, Wahn U, Scheffner D. (1996). Risk factors for latex allergy in patients with spina bifida. Clin Exp Allergy. 26, 934-9.

Nieto A, Estornell F, Mazón A, Reig C, Nieto A, García-Ibarra F. (1996). Allergy to latex in spina bifida: A multivariate study of associated factors in 100 consecutive patients. J Allergy Clin Immunol. 98, 501-7.

Oh SK, Kang H, Shin DH, Yang J, Chow KS, Yeang HY, Wagner B, Breiteneder H, Han KH. (1999). Isolation, characterization, and functional analysis of a novel cDNA clone encoding a small rubber particle protein from Hevea brasiliensis. J Biol Chem. 274, 17132-8.

Parsell, D.A., K.R. Silber, and R.T. Sauer. (1990). Carboxy-terminal determinants of intracellular protein degradation. Genes & Dev. 4, 277-286.

Raulf-Heimsoth M, Chen Z, Rihs H.-P, Kalbacher H, Liebers V and BAUR X. (1998). Analysis of T-cell reactive regions and HLA-DR4 binding motifs on the latex allergen Hev b 1 (rubber elongation factor). Exp Allergy. 28, 339-348.

Raulf-Heimsoth M, Rihs H.-P, Rozynek P, Cremerw R, Gasparz A, Piresz G, Yeang H. Y, Arif S. A. M, Hamiltonz R. G, Sander I, Lundbergkand M, Brüning T. (2007). Quantitative analysis of immunoglobulin E reactivity profiles in patients allergic or sensitized to natural rubber latex (*Hevea brasiliensis*). *Clin Exp Allergy*, 37, 1657-1667.

Rihs HP, Chen Z, Schumacher S, Rozynek P, Cremer R, Lundberg M, Raulf-Heimsoth M, Petersen A, Baur X. (2000), Recombinant Hev b 1: large-scale production and immunological characterization. *Clin Exp Allergy*. 30, 1285-92.

Rihs HP, Chen Z, Rozynek P, Cremer R. (2001). Allergenicity of rHev b 10 (manganese-superoxid dismutase). *Allergy*. 56, 85-6.

Rihs HP, Dumont B, Rozynek P. (2003). Molecular cloning, purification and IgE-binding of a recombinant class I chitinase from *Hevea brasiliensis* leaves (rHev b 11.0102). *Allergy*. 58, 246-51.

Rodríguez-Romero. (1991). Estructura tridimensional de a Heveina a 2.8Å de resolución. Tesis de doctorado. Universidad Autónoma Metropolitana.

Savvas C. Makrides. (1996). Strategies for Achieving High-Level Expression of Genes in *Escherichia coli*. *Microbiological Reviews*, 60, 512-538

Skilleter DN, Kekwick RGO. (1971). The enzymes forming isopentenyl pyrophosphate from 5-phosphomevalonate (mevalonate-5-phosphate) in the latex of *Hevea brasiliensis*. *Biochem J*. 124, 407-415.

Slabinski L, Jaroszewski L, Rodrigues A P C, Rychlewski L, Wilson I A, Lesley S A, Godzik, A. (2007). The method - The challenge of protein structure determination - lessons from structural genomics. *Protein Science*. 16 ,2472-82.

Slabinski L, Jaroszewski L, Rychlewski L, Wilson I A, Lesley S A, Godzik, A. (2007). XtalPred: The XtalPred server a web server for prediction of protein crystallizability. *Bioinformatics*. 23, 3403-5

Slater J E. (1994). Latex allergy. *J. Allergy Clin Immunol*. 94, 139-149.

Sontimuang C, Suedee R, Canyuk B, Phadoongsombut N, Dickert FL. (2010). Development of a rubber elongation factor, surface-imprinted polymer-quartz crystal microbalance sensor, for quantitative determination of Hev b1 rubber latex allergens present in natural rubber latex products. *Anal Chim Acta*. 687, 184-92.

Sontimuang C, Suedee R, Dickert F. (2011). Interdigitated capacitive biosensor based on molecularly imprinted polymer for rapid detection of Hev b1 latex allergen. *Anal Biochem*. 410,224-33.

Soo Kyung Oh, Hunseung Kang, Dong Ho Shin, Jaemo Yang, Keng-See Chow, HoongYeetYeang, Birgit Wagner, HeimoBreiteneder, and Kyung-Hwan Han. (1999). Isolation, Characterization, and Functional Analysis of a Novel cDNA Clone Encoding a Small Rubber Particle Protein from *Hevea brasiliensis*. *J Biol Chem*. 274, 17132-17138.

Sreerama N, Venyaminov, S.Yu. & Woody, R.W., (1999), Estimation of the number of α -helical and β -strand segments in proteins using CD spectroscopy. *Protein Science*. 8, 370-380.

Szépfolusi Z, Seidl R, Bernert G, Dietrich W, Spitzauer S, Urbanek R. (1999). Latex sensitization in spina bifida appears disease-associated. *J Pediatr*, 134, 344-348.

Tomoki Sando, Tatsushi Hayashi, Tsuyoshi Takeda, Yasunori Akiyama, Yoshihisa Nakazawa, Eiichiro Fukusaki, Akio Kobayashi. (2009). Histochemical study of

detailed laticifer structure and rubber biosynthesis-related protein localization in *Hevea brasiliensis* using spectral confocal laser scanning microscopy. *Planta*, 230, 215–225

Turjanmaa, K., Alenius, H., Makinen-Kiljunen, S., Reunala, T., Palosuo, T. (1996). Natural rubber latex allergy. *Allergy*. 51, 593–602.

Vorm O, Roepstorff P and Mann M. (1994). Improved resolution very high sensitivity in MALDI TOF of matrix surfaces made by fast evaporation. *Anal. Chem.* 66, 3281.

Wagner B, Krebitz M, Buck D, Niggemann B, Yeang H Y, Han K H, Scheiner O, Breitender H. (1999). Cloning, expression, and characterization of recombinant Hev b 3, a *Hevea brasiliensis* protein associated with latex allergy in patients with spina bifida. *J Allergy Clin Immunol.* 104, 1084–1092.

Yeang H Y, Cheong K F, Sunderasan E. (1996). The 14.6 kDa rubber elongation factor (Hev b 1) and 24 kD (Hev b 3) rubber particle proteins are recognized by IgE from patients with spina bifida and latex allergy. *J Allergy Clin Immunol.* 98, 628–639.

Yortyot Seetang-Nun, Thomas D. Sharkey, Wallie Suvachittanont. (2008). Molecular cloning and characterization of two cDNAs encoding 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase from *Hevea brasiliensis*. *J Plant Physiology.* 165, 991-1002.

Yunginger J W, Jones R T, Fransway A F, Kelso J M, Warner M A, Hunt L W. (1994). Extractable latex allergens and proteins in disposable medical gloves and other rubber products. *J Allergy Clin Immunol.* 93, 836-842.

APÉNDICE

Secuencia de nucleótidos y aminoácidos de Hev b 1

Hevea brasiliensis mRNA for rubber elongation factor

X56535 mRNA. Translation: CAA39880.1.

LOCUS X56535 **681 bp** mRNA linear

```
1 ttttgatcctt ccatttttgc aaaaggaaat cttcgattat ggctgaagac gaagacaacc
61 aacaagggca gggggagggg ttaaaatatt tgggttttgt gcaagacgcg gcaacttatg
121 ctgtgactac cttctcaaac gtctatcttt ttgccaaaga caaatctggt ccaactgcagc
181 ctgggtgtcga tatcattgag ggtccggtga agaacgtggc tgtacctctc tataataggt
241 tcagttatat tccaatgga gctctcaagt ttgtagacag cacggttggt gcatctgtca
301 ctattataga tcgctctctt cccccaattg tcaaggacgc atctatccaa gttgtttcag
361 caattcgagc tgccccagaa gctgctcgtt ctctggcttc ttctttgcct gggcagacca
421 agatacttgc taaggtgttt tatggagaga attgagcccc aatttgcacc aattgcttcc
481 aactaagcaa gttaatgata tgctcaagaa tatatatcta ttgtgagctt tttttatggt
541 ctcatcctga gtggtgagac tatgttttcg tttgaatatt atactgtggt ttattatgtg
601 ttttgaatat tcataatgag aataaagggc caattgaatt attggccaat atgtaatgat
661 acataaattt cgtgattgag t
```

```
1 maedednqqg qgegkylgf vqdaatyavt tfsnvylfak dksgplqpgv diiegpvknv
61 avplynrfsy ipngalkfvd stvvasvtii drslppivkd asiqvvsair aapeaarsla
121 sslpgqtkil akvfygen
```

Oligonucleótidos utilizados para la amplificación del gen de Hev b 1

Eco RI sitio de enteroquinasa

5' CTGAATTCGACGACGACGACAAGATGGCTGAAGACGAAGACAACCAACAAGGGCAGGGGGAGGGGTTA 3'

Directo

Hind III Stop

5' GCAAGCTTTCATTCTCTCCATAAAACACCTTAGC 3' Reverso

Condiciones para la reacción de PCR en la amplificación del gen Hev b 1

Enzima polimerasa	0.2µl	
Buffer Phusion 5X	4µl	
cDNA	2µl	
dNTP's 25mM	7.5µl	
Oligo Fwr	1µl	100pmol = 0.1nmol
Oligo Rvs	1µl	100pmol = 0.1nmol
H2O	8.15µl	
Rxn total	21.85µl	

La reacción se llevó a cabo en un termociclador (TC-512, TECHNE)

Temperatura de reacción de la amplificación:

Desnaturalización	98°C / 5 min
Desnaturalización	98°C/ 20s
Templado	55°C/ 30s × 30
Extensión	72°C/ 15s
Extensión final	72°C/ 5 min
Hold	5°C

Secuenciación del producto obtenido del gen amplificado por PCR y clonado en el vector pET 32a (secuenciación Laragen, Inc)

G1T7term NNNNNNNNNCTCNTTCGGGCTTTGTTAGCAGCCGGATCTCAGTGGTGGTGGTGGTGG
 G1T7term TGCTCGAGTGC GGCCGCAAGCTTTC AATTCTCTCCATAAAACACCTTAGCAAGTATC
 G1T7term TTGGTCTGCCCAGGCAAAGAAGAAGCCAGAGAACGAGCAGCTTCTGGGGCAGCTCGA
 G1T7term ATTGCTGAAACAACCTTGGATAGATGCGTCTTGACAATTGGGGGAAGAGAGCGATCT
 G1T7term ATAATAGTGACAGATGCAACAACCGTGCTGTCTACAACTTGAGAGCTCCATTGGGA
 G1T7term ATATAACTGAACCTATTATAGAGAGGTACAGCCACGTTCTTCACCGGACCCTCAATG
 G1T7term ATATCGACACCAGGCTGCAAGTGGACCAGATTTGTCTTTGGCAAAAAGATAGACGTTT
 G1T7term GAGAAGGTAGTCACAGCATAAGTTGCCGCGTCTTGACAAAACCCAAATATTTTAAAC
 G1T7term CCCTCCCCCTGCCCTTGTTGGTTGTCTTCGTCTTCAGCCATCTTGTCTGTCGTCGTCGTCG
 G1T7term AATTCGGATCCGATATCAGCCATGGCCTTGTCTGTCGTCGTCGTTACCCAGATCTGGG
 G1T7term CTGTCNNTGTGCTGGCGTTTCGAATTTAGCAGCANC GGTTTTCTTTCATACCAGAACC
 G1T7term GCGTGNNNCN

Restriction sites indicated in the sequence:

- XhoI** (position 60)
- HindIII** (position 80)
- EcoRV** (position 360)
- PstI** (position 380)
- EcoRI** (position 460)
- EcoRI** (position 520)
- BamHI** (position 520)
- EcoRV** (position 540)
- BglII** (position 560)
- EcoRI** (position 620)

Traducción de la secuenciación

```
G1T7term translation frame -3  XHAVLV* KKTXA AKFERQH XDS PDLGT DDDDKAMAD I GSEF DDDDKMAEDED
                               |         |         |         |         |         |
                               20        40        60        80        100
G1T7term translation frame -3  NQQGQGEGLKYLGFVQDAATYAVTTFSNVYLFAKDKSGPLQPGVD I IEGPVK
                               |         |         |         |         |         |
                               120       140       160       180       200
G1T7term translation frame -3  NVAVPLYNRF SY I PNGALKFVDSTVVASVT I IDRSLPPIVKDASIQVVS AIR
                               |         |         |         |         |         |
                               160       180       200
G1T7term translation frame -3  AAPEAARSLASSLPGQTK I LAKV FYGEN* KLAAALEHHHHHH* DPAANKARX
                               |         |         |         |         |         |
                               160       180       200
G1T7term translation frame -3  XXX
```

Sonicación realizada para la lisis celular

Potencia 4 por 10 segundos 10 veces con descanso de 1 min entre cada sonicación de la muestra.

Buffer de lisis

- 50mM Tris-HCl (pH8)
- 1mM EDTA
- 200mM NaCl

Buffer de lavado

- 50mM Tris-HCl (pH8)
- 1mM EDTA
- 300mM NaCl
- 0.1 %(v/v) Tween 20