



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Posgrado en Ciencias Biomédicas

Instituto de Química

**ANÁLISIS ESTRUCTURAL DEL ALÉRGENO Hev b 8. 0102 Y ASIGNACIÓN DE
REGIONES RECONOCIDAS POR ANTICUERPOS**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

José Israel Mares Mejía

TUTOR PRINCIPAL:

Dra. Adela Rodríguez Romero

Instituto de Química

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

Dr. Enrique Ortega Soto

Instituto de Investigaciones Biomédicas

Dr. José Federico Del Río Portilla

Instituto de Química

Ciudad Universitaria, Cd. Mx., febrero 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



INSTITUTO DE QUÍMICA

PDCB/grad/063/SEP/2016

C. P. AGUSTÍN MERCADO

Director de Certificación y Control
Documental Escolar, UNAM
Presente

Nos permitimos informarle que el Comité Académico de DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS, en su reunión 394ª del 07 de septiembre de 2016 designó el siguiente jurado para examen de DOCTOR EN CIENCIAS de JOSÉ ISRAEL MARES MEJÍA, con número de cuenta 509018496, con la tesis titulada "Análisis estructural del alérgeno Hev b 8.0102 y asignación de regiones reconocidas por anticuerpos", dirigida por la Dra. Adela Rodríguez Romero.

Presidente: Dr. Luis Felipe Montaña Estrada
Secretario Dra. Gohar Gevorgyan Markosian
Vocal: Dr. Héctor Viadiú Ibarraza
Vocal: Dra. Emma Berta Gutiérrez-Cirlos Madrid
Vocal: Dr. Alejandro Sosa Peinado

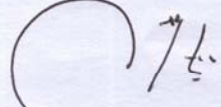
Comité Académico, aprobó que la integración del jurado se realizará a solicitud del alumno, **con cinco sinodales**, en apego a la nueva normatividad, acogándose al artículo **QUINTO TRANSITORIO**, con base a lo establecido en el **Artículo 31** del Reglamento General de Estudios de Posgrado.

Atentamente

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cd. Universitaria, a 07 de septiembre de 2016


DRA. AUREA OROZCO RIVAS
COORDINADORA


DR. MARIANO MARTÍNEZ
VÁZQUEZ
RESPONSABLE DE ENTIDAD

Unidad de Posgrado Coordinación del Posgrado en Ciencias Biomédicas Edificio B, 1er. Piso Circuito
de Posgrado y de la Delegación Universitaria Delegación Coyoacán C.P. 04510 México, D.F. Tel: 5623 0222 Ext. 37001
<http://www.pdcb.unam.mx> E-mail: pdcb@unam.mx

Dedicatoria

“A mi Familia por todos los años de apoyo incondicional, su confianza y por todo ese amor que es la fuente de inspiración que me motiva a seguir este camino”

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México y al programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas.

A mi tutora

Dra. Adela Rodríguez Romero por permitirme ser parte de este gran grupo de trabajo, por sus enseñanzas, por apoyarme en todo momento, por la confianza, además de los consejos que siempre llevare conmigo.

A los Miembros del comité tutor

Dr. Enrique Ortega Soto por ser un excelente colaborador y abrirme las puertas de su laboratorio, además de compartir su experiencia, enseñanzas y consejos.

Dr. José Federico del Río Portilla por sus enseñanzas, comentarios y sugerencias durante este proyecto.

A los técnicos académicos porque su trabajo es parte fundamental de este trabajo

Instituto de Química, UNAM

Dra. Carol Siseth Martínez Caballero por ser el mejor ejemplo de superación, esfuerzo y dedicación, por todo tu apoyo y porque el conocerte es lo mejor que me ha pasado en esta etapa de mi vida.

Dra. Patricia Cano Sánchez por sus consejos y enseñanzas en el laboratorio de biología molecular.

M. en C. Georgina Espinoza Pérez por su apoyo técnico en el laboratorio de rayos X.

Q. Eréndira García Ríos por su apoyo para la realización de los experimentos de espectrometría de masas.

Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

Dra. Claudia Angélica Garay Canales por hacerme parte de su grupo, por su dedicación a este trabajo, las enseñanzas y por su amistad.

M.V.Z. Georgina Díaz Herrera. Por su apoyo técnico en la Unidad de Modelos Biológicos.

Al Dr. Alfredo Torres Larios del Instituto de Fisiología Celular, por la realización de los experimentos de interacción, así como a sus alumnos M. en C. Daniel Eduardo Rodríguez Chamorro y el M. en C. Ezequiel Alejandro Madrigal Carrillo por el apoyo técnico.

Al Dr. Luis Manuel Terán Juárez, Dra. Ma. De la Luz Hortensia García Cruz y Dr. René Daniel Ruíz Morales del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER), además de la Dra. Socorro Orozco Martínez del Instituto Nacional de Pediatría (INP) por su apoyo con la donación del suero de individuos alérgicos.

A todos mis compañeros de laboratorio por su amistad, por los ratos de esparcimiento, por su apoyo y por esa retroalimentación a través de las críticas constructivas sobre el verdadero trabajo de laboratorio y las enseñanzas que nos ha dejado.

A los miembros del jurado del examen de grado que revisaron esta tesis por su acertados comentarios y sugerencias.

Al laboratorio Nacional de Estructura de Macromoléculas (LANEM) por la realización de los experimentos de difracción de rayos X.

Al CONACYT por la beca doctoral 347432 y por los proyectos 221169 para A.R.R. y 178803 para E.O.S.

A DGAPA-UNAM por los apoyos PAPIIT IN207613 para A.R.R. y IN210314 para E.O.S.

Índice

Resumen	1
Introducción	3
Características generales y multifuncionalidad de las profilinas	
Estructura de la profilina	
Unión a actina	
Unión a Poli-L-prolina (PLP)	
Interacción con fosfatidilinositol	
Alergia (Respuesta mediada por inmunoglobulinas tipo E)	
El papel de las profilinas como alérgenos y la reactividad cruzada	
Efecto de la oligomerización en los alérgenos	
Inducción de la tolerancia inmunológica en alergia	
Antecedentes	18
Justificación	21
Hipótesis	21
Objetivos	22
Materiales y Métodos	23
Resultados y Discusión	36
Conclusiones	70
Perspectivas	72
Bibliografía	73
Anexo I	84
Anexo II	89

Índice de Figuras y Tablas

- Figura 1.** Estructura general de la profilinas
- Figura 2.** Función de la profilina en la polimerización de la actina.
- Figura 3.** Profilina alergénica Amb a 8 en complejo con poli-L-prolina.
- Figura 4.** Principales regiones de interacción de profilina con PIP₂
- Figura 5.** Mecanismo de la respuesta alérgica
- Figura 6.** Estructuras de las inmunoglobulinas
- Figura 7.** Mecanismo de la tolerancia en alergia
- Figura 8.** Esquema del experimento de inhibición para el suero de pacientes por BLI
- Figura 9.** Obtención del RNA y amplificación con cebadores específicos para los genes de profilina
- Figura 10.** Cinética de sobre-expresión de los alérgenos
- Figura 11.** Alineamiento de secuencias para los alérgenos rHev b 8. 0102 y rZea m 12. 0105
- Figura 12.** Purificación de los alérgenos recombinantes rHev b 8 y rZea m 12
- Figura 13.** Optimización de los cristales del alérgeno profilina
- Figura 14.** Alineamiento estructural de los alérgenos rHev b 8 y rZea m 12
- Figura 15.** Comparación de las estructuras 3D de los alérgenos rHev b 8 y rZea m 12
- Figura 16.** Análisis de la estructura cristalográfica del dímero de rHev b 8 (P3₂)
- Figura 17.** Análisis estructural de los dímeros de profilina formados con las moléculas relacionadas por simetría
- Figura 18.** Análisis de la interfaz de los dímeros transitorios en profilinas
- Figura 19.** Caracterización de las formas oligoméricas de los alérgenos rHev b 8 y rZea m 12
- Figura 20.** Evaluación de los niveles de anticuerpos IgE e IgG al final del esquema de inmunización en ratones con el alérgeno rHev b 8
- Figura 21.** SDS-PAGE al 12 % del conjunto de anticuerpos murinos anti-rHev b 8 (Profilina)
- Figura 22.** Reconocimiento de los alérgenos rHev b 8 y rZea m 12 por los mAbs anti-profilina por ELISA indirecta
- Figura 23.** Ensayos de competencias entre los anticuerpos monoclonales murinos por el alérgeno rHev b 8 por BLI

-
-
- Figura 24.** Determinación de los niveles de IgE e IgG4 en una mezcla de sueros de individuos alérgicos
- Figura 25.** Experimentos de BLI para determinar la inhibición del reconocimiento del suero de pacientes por rHev b 8 mediante el uso de mAbs bloqueadores
- Figura 26.** Experimentos de BLI para determinar la inhibición del reconocimiento del suero de pacientes por el alérgeno rZea m12 con el uso de mAbs bloqueadores
- Figura 27.** Inhibición de la unión de los anticuerpos policlonales suero de individuos alérgicos por la mezcla de los mAbs 1B4 y 2D10
- Figura 28.** Reconocimiento de los monómeros y dímeros de rHev b 8 y r Zea m 12 por IgEs humanas
- Figura 29.** Efecto de la dimerización del alérgeno rHev b 8 en el reconocimiento por mAbs por ELISA
- Figura 30.** Determinación de la interacción del mAb 2F5 con los receptores de alta afinidad FcεRI por citometría de flujo
- Figura 31.** Ensayo de degranulación de las células RBL-2H3 medido a través de la actividad de la enzima β-Hexosaminidasa
- Figura 32.** Esquema de la respuesta inducida por el alérgeno rHev b 8
- Tabla 1.** Profilinas reportadas como alérgenos por la OMS/IUIS
- Tabla 2.** Oligonucleótidos para amplificar los genes de los alérgenos rHev b 8 y rZea m 12
- Tabla 3.** Esquema de inmunización con el alérgeno rHev b 8
- Tabla 4.** Datos estadísticos del procesamiento de los datos de difracción de rayos X y del afinamiento de las estructuras
- Tabla 5.** Caracterización y título de los anticuerpos monoclonales
- Tabla 6.** Ensayos de competencia entre los anticuerpos monoclonales anti rHev b8 mediante ELISA
- Tabla 7.** Resultados de la cinética de unión de los mAbs a rHev b 8 por BLI
- Tabla 8.** Resultados de la cinética de unión de los mAbs a rZea m 12 por BLI
- Tabla 9.** Ensayos de inhibición de la unión de IgE e IgG4 humanas de individuos alérgicos a rHev b 8 por los anticuerpos monoclonales anti-profilina mediante ELISA
-
-

Abreviaturas

ABP: Actin Binding Proteins (proteínas de unión actina)

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

AIT: Inmunoterapia con alérgenos (allergen immunotherapy por sus siglas en inglés)

ARN: Ácido ribonucleico.

BLI: Biolayer Interferometry (Interferometría de bicapa)

CMH: complejo mayor de histocompatibilidad

CPA: célula presentadora de antígeno

DNP: 2, 4-Dinitrofenol

ELISA: Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas

Fc: fragmento cristizable de anticuerpo

FcεRI: Receptor de alta afinidad para inmunoglobulina E

FcεRII: Receptor de baja afinidad para inmunoglobulina E (CD23)

IgE: Inmunoglobulina del tipo E

IgG: Inmunoglobulina del tipo G

IL: Interleucina

IUIS: Unión Internacional de Sociedades Inmunológicas (The International Union of Immunological Societies).

ka: Constante de velocidad de asociación

kd: Constante de velocidad de disociación

KD: Constante de disociación o constante de afinidad

mAb: anticuerpo monoclonal murino

MALDI-TOF: Matrix-assisted laser desorption-Time of flight por sus siglas en inglés

OMS: Organización Mundial de la salud

PDB: Banco de datos de proteínas (Protein Data Bank)

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa (Polimerase Chain Reaction)

PIP: Fosfatidilinositol

PLP: Poli-L-Prolina

RMN: Resonancia Magnética Nuclear

SEC: Size Exclusion Chromathography (cromatografía de exclusión molecular)

Th2: Linfocitos T ayudadores del tipo II

Abstract

Latex allergy is an important health problem that has arisen along with food allergies. In latex a large number of allergenic proteins have been described, of which fifteen have been classified by the International Union of Immunological Societies (IUIS) Nomenclature Subcommittee. One of these allergens is rHev b 8 belonging to the profilin family, which have been termed as panallergens and are responsible for the pollen-fruit-latex allergic syndrome. Profilins have a molecular mass between 11 and 18 kDa, exhibiting a high degree of similarity in primary structure, which can be higher than 75% in phylogenetically related organisms like plants, and also display a very similar 3D folding. These proteins possess conserved binding sites to actin, phosphatidylinositol and to proline-rich ligands, therefore, they are involved in different cellular processes and signaling pathways in cells. The study of type I hypersensitivity reactions from the structural point of view helps us to describe some of the mechanisms involved in the allergic response, including the recognition of allergens by IgE antibodies. Allergens may share some structural identity among them, which favors cross-reactivity in allergic individuals generating the pollen-fruit-latex syndrome. Through the use of immunoassays or *in silico* analysis, IgE recognition sites have been defined in profilins. These regions are mainly found in conserved areas on the surface of the allergens and sharing certain structural identity with other allergens favors cross-reactivity. In this work, the three-dimensional structure of the allergens from Hevea and Maize (rHev b 8 and rZea m 12) was determined. A dimer of rHev b 8 that was characterized by different techniques produced a more efficient activation of the IgE response in rat basophilic cells. Besides, a set of murine monoclonal antibodies of the IgG types and a novel IgE antibody targeting the profilin molecule were obtained and characterized, which allowed us to define two regions on the surface of the allergen that are important for the recognition of antibodies through solution interaction studies and tested in a *vitro* model of the IgE-mediated responses using rat basophilic leukemia cells.

Resumen

La alergia al látex del árbol del hule de *Hevea brasiliensis* es un importante problema de salud que ha surgido junto con otro tipo de alergias como las alimentarias. En el látex se ha descrito un gran número de proteínas alergénicas, de las cuales quince han sido clasificados por el Subcomité de Nomenclatura de la Unión Internacional de Sociedades Inmunológicas (IUIS). Uno de estos alérgenos es rHev b 8 que pertenece a la familia de las profilinas las cuales se han denominado como panalérgenos y son responsables del síndrome alérgico polen-fruto-látex. Las profilinas poseen una masa molecular entre 11 y 18 kDa, presentando una alta identidad en su secuencia de aminoácidos, que puede llegar a ser superior al 75%, cuando hablamos de organismos relacionados filogenéticamente como las plantas y tienen una alta similitud en su estructura tridimensional manteniendo el mismo tipo de plegamiento entre todas ellas. Estas proteínas poseen sitios conservados de unión a actina, fosfatidilinositol y a ligandos ricos en prolina, por consiguiente, están involucradas en diferentes procesos celulares y vías de señalización en las células. El estudio de las reacciones de hipersensibilidad de tipo I, desde el punto vista estructural nos ayuda a describir algunos de los mecanismos involucrados en la respuesta alérgica, entre los que se encuentran el reconocimiento de los alérgenos mediado por los anticuerpos tipo IgE. Los alérgenos pueden compartir cierta identidad estructural entre ellos lo que favorece la reactividad cruzada en individuos alérgicos generando el síndrome polen-fruto-látex. Mediante el uso de inmunoensayos o análisis *in silico* se han definido sitios de reconocimiento por IgE en las profilinas. Estas regiones se encuentran principalmente en zonas conservadas en la superficie del alérgeno y al compartir cierta identidad estructural con otros alérgenos se favorece la reactividad cruzada. En este trabajo se determinó la estructura tridimensional de los alérgenos rHev b 8 y rZea m 12, además de un dímero de rHev b 8 el cual se caracterizó por activar de manera más eficiente la respuesta IgE. Además, se obtuvo y caracterizó un conjunto de anticuerpos monoclonales murinos de los tipos IgG y una novedosa IgE específicos contra la molécula de profilina, que nos permitieron encontrar dos regiones importantes para el reconocimiento de anticuerpos mediante estudios de interacción en solución y probados en un modelo *in vitro* de las respuestas mediadas por IgE con las células RBL.

Introducción

Características generales y multifuncionalidad de las profilinas

Las profilinas son una familia de proteínas pequeñas (11-18 kDa), ubicuas, que se encuentran tanto en células eucariotas (Witke 2004), (células animales, vegetales, protozoos, levaduras), como en virus (Machesky *et al.* 1994). Estas proteínas son solubles y se encuentran implicadas en diferentes procesos celulares como citocinesis, tráfico membranal y motilidad celular siendo parte fundamental en el control de una amplia red de interacciones en la célula. Para cumplir con todos estos procesos los organismos pueden expresar diferentes isoformas de profilina (Ren & Xiang 2007; Staiger *et al.* 1993; Lambrechts *et al.* 2000), siendo las plantas las que mayor número pueden tener (5-10). Estas isoformas pueden sufrir modificaciones post-traduccionales como la fosforilación en residuos de serina, treonina y tirosina, lo que incrementa su diversidad, especificidad y la forma en que regulan su función (Singh *et al.* 1996; Guillén *et al.* 2001; Limmongkon *et al.* 2004). La función principal de la profilina es la unión a actina, interacción que fue descrita por primera vez por Carlsson *et al.* 1977 en bazo de ternera. Posteriormente se describió su presencia en otros organismos como amibas (Reichstein & Korn 1979), levaduras (Oechsner *et al.* 1987), moscas (Cooley *et al.* 1992) y plantas (R Valenta *et al.* 1991) y también se ha descrito que une otros ligandos como proteínas con regiones ricas en segmentos de poliprolina, así como fosfatidilinositol (Jockusch *et al.* 2007). En plantas superiores las profilinas forman parte de familias multigénicas, con diferentes patrones de expresión que varían dependiendo del tipo de tejido y la etapa de desarrollo en que se encuentran (Staiger *et al.* 1993; Kandasamy *et al.* 2002). La interacción de la profilina a sus diferentes ligandos está regulada por interacciones competitivas y alostéricas en procesos dinámicos en el que participan principalmente regiones conservadas en esta familia de proteínas. Por otra parte, y de manera importante se ha determinado su acción como alérgeno principalmente del polen de plantas sin embargo por su alta conservación se han establecido reacciones de reactividad cruzada con alimentos y látex (Santos & Van Ree 2011).

Estructura de la profilina

En general las profilinas de diferentes organismos poseen una baja identidad en su secuencia, que es cercana al 20 %, mientras que, para organismos del mismo reino como las plantas, esta identidad es superior al 70 %. Inclusive se ha reportado que isoformas de un organismo mantienen el mismo grado de identidad con profilinas de organismos relacionados (Jimenez-Lopez *et al.* 2012). La variabilidad en la expresión y el número de isoformas presentes en plantas superiores correlaciona con la complejidad de la familia de proteínas relacionadas a la actina, siendo mayor en plantas cuando se compara con otros reinos (McDowell *et al.* 1996). A pesar de la divergencia en la identidad de secuencias de las profilinas, el plegamiento se ha mantenido conservado a través de la evolución. En el banco de datos de proteínas (PDB) están reportadas las estructuras tridimensionales de seis profilinas de plantas y aproximadamente de 20 profilinas de diversas fuentes y, en general, se ha descrito un plegamiento común para todas ellas, independiente de su origen. Dicho plegamiento consiste en una hoja-beta central formada por siete hebras- β (β 1- β 7), dos hélices- α que están localizadas en una cara de la molécula (α 1 en el extremo amino-terminal y α 3 que corresponde al extremo carboxilo-terminal) (Fig. 1A). En la cara contraria de la molécula se encuentran una hélice- α 2 corta, y una cavidad característica, presente únicamente en las estructuras de profilinas de plantas (Thorn *et al.* 1997) (Fig. 1B).

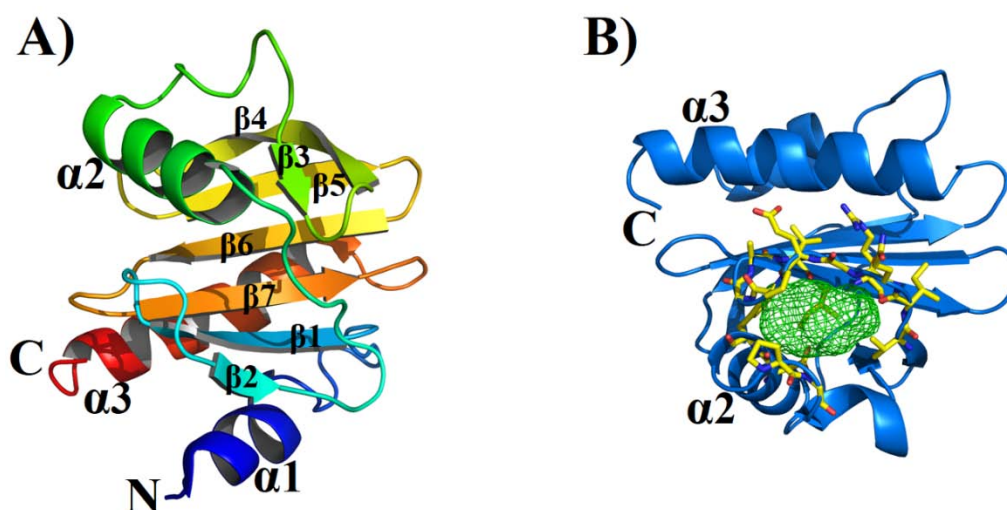


Figura 1. Estructura general de la profilinas (PDB:5FDS). **A)** Representación en listones del plegamiento común para profilinas alfa-beta-alfa. **B)** En verde la cavidad exclusiva para profilinas de plantas y en amarillo los residuos que la constituyen y pueden participar en la interacción con ligandos (Asp53, Phe54, Pro57, Gly58, Val74, Ile75, Gln76, Gly77, Glu78, Pro79, Gly80, Ala81, Val82, Ile83 y Arg84); que se determinaron usando el servidor FTsite (Kozakov *et al.* 2015).

Unión a actina

La actina es una familia de proteínas multifuncionales a la que se une el nucleótido de adenosina, con actividad de ATPasa, y que forma filamentos. En condiciones fisiológicas la actina monomérica (G-actina) polimeriza reversiblemente para formar una cadena doble de filamento de actina (F-actina). *In vitro*, el ensamblaje de los microfilamentos de actina necesita de energía, por lo que se requiere ATP durante el ciclo de polimerización. A la fecha se han descrito más de 70 miembros de la familia de proteínas de unión a actina (ABPs por sus siglas en inglés), las cuales se encargan de la regulación de la dinámica del ciclo de ensamblaje de la actina, pudiendo interactuar entre sí (Lu & Pollard 2001). Entre estas proteínas que han evolucionado junto con la actina encontramos a la profilina, que se encarga de mantener una regulación positiva y negativa, ya sea favoreciendo la despolimerización por la unión a G-actina (forma libre de la actina) para formar complejos 1:1 en la ruta de intercambio de nucleótido en actina (Pantaloni & Carlier 1993; Perelroizen *et al.* 1996), o bien secuestrando la G-actina en la nucleación espontánea durante la polimerización (Fig. 2). El complejo profilina-actina promueve y mantiene la polimerización de G-actina ocupando el extremo “barbado” de los filamentos de actina cuando aumenta la concentración de esta proteína. Además, la unión de profilina a actina incrementa el intercambio de ADP a ATP (Mockrin & Korn 1980; Korenbaum *et al.* 1998), debido a que mantiene abierto el sitio de unión al nucleótido (Chik *et al.* 1996; Porta & Borgstahl 2012). La región de interacción a actina entre profilinas de distintos reinos es el menos conservado estructuralmente y en él participan las hebras- β 4, 5, 6 y parte de la hélice- α 3 del carboxilo terminal. Los residuos involucrados en la unión fueron caracterizados para la isoforma I de la profilina de *Arabidopsis thaliana* y estos corresponden a la Ala61, Pro62, Met73, Asn76, Val82, Arg84, Lys86, Lys87, Thr111, Gly112, Gly113, Asn116, Leu117 y Gly121 (Thorn *et al.* 1997). En profilinas de plantas el sitio de unión a actina presenta solamente dos residuos conservados Lys87 y Gly121, los cuales se encuentran en la cara opuesta al sitio de unión a poli-L-prolina; sin embargo, la distribución de cargas en esta región es similar en ambas. Estas características pueden explicar las diferencias entre las distintas isoformas en un mismo organismo en cuanto a su afinidad por la actina (Fedorov *et al.* 1997; Kovar *et al.* 2000).

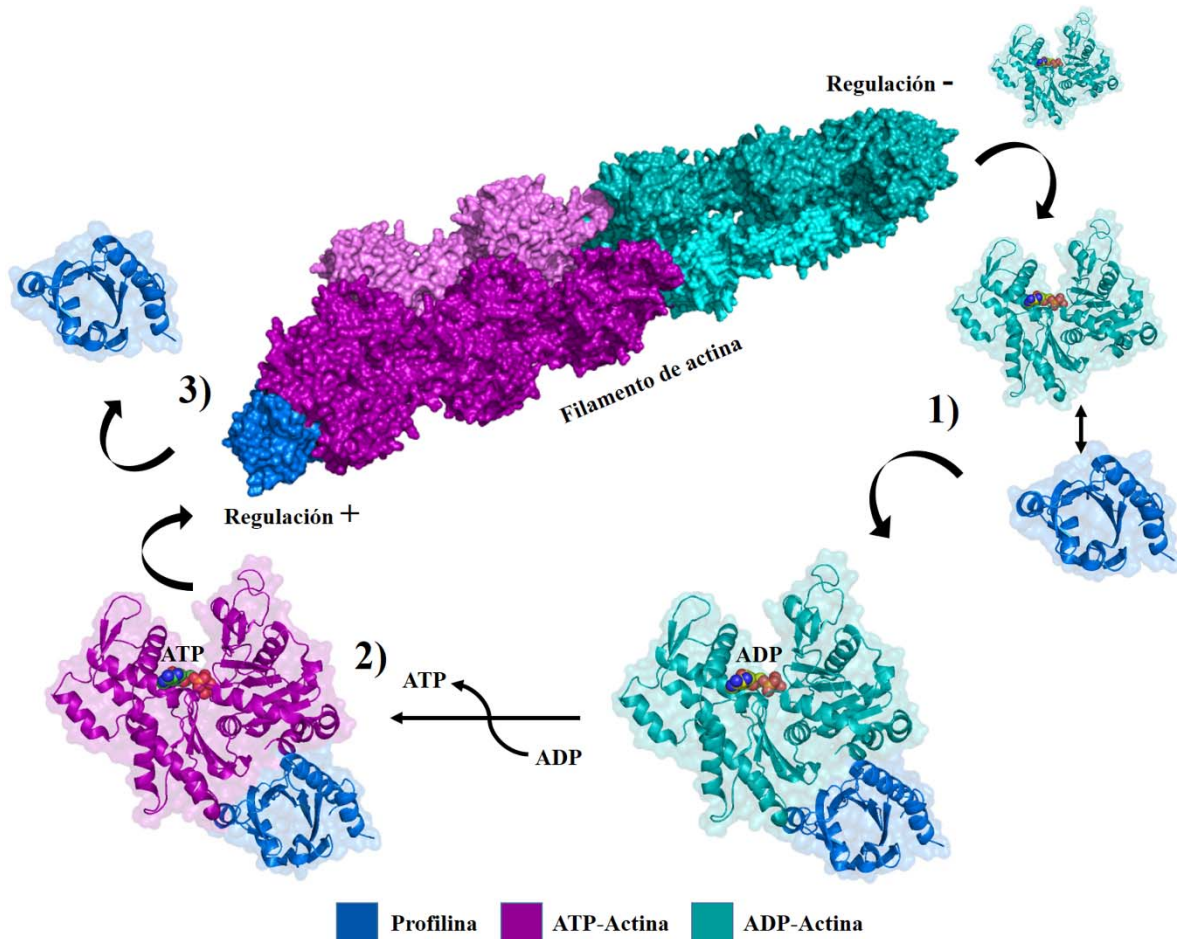


Figura 2. Función de la profilina en la polimerización de la actina. El filamento de actina consiste en un arreglo hélice-alfa (PDB: 5ADX). Las tres principales funciones de la profilina en la polimerización de la actina son: **1)** Unir y secuestrar monómeros de actina, por lo que disminuyen la concentración de actina libre que puede ser viable para la elongación del microfilamento (PDB: 3UB5). **2)** Promover la concentración de actina monomérica unida a ATP (violeta), por el incremento en el intercambio de ADP-ATP 1000 veces más rápido comparado con el intercambio por simple difusión. **3)** En complejo con actina-ATP interacciona con el borde del filamento y adiciona el monómero de actina-ATP para el crecimiento del filamento. Por consecuencia, la elongación del filamento consiste de actina-ATP a través del filamento, el ATP es lentamente hidrolizado por la actividad de ATPasa intrínseca de la actina, generando actina-ADP (Cian) hacia el final del filamento, el cual es liberado lentamente por despolimerización o su vez este proceso puede ser acelerado por otras proteínas de unión a actina (ABPs) (no mostradas).

Unión a poli-L-prolina (PLP)

La familia de las profilinas puede reconocer motivos de PLP de 5 a 10 residuos, los cuales son comunes en un extenso número de proteínas, que varían en su localización, organización estructural y función. La región de unión a PLP es la más conservada entre todas las profilinas, excepto en las de virus y en la isoforma IIB de ratón (Machesky *et al.* 1994; Di Nardo *et al.* 2000), las cuales no interactúan con estos motivos PLP. Kaiser *et al.* 1989 describieron por primera vez la unión de este ligando con la profilina I humana. Tiempo después se determinó la estructura del complejo profilina humana de plaquetas con un decámero de PLP (Mahoney *et al.* 1997), sugiriendo un mecanismo para la localización celular específica de profilina, de acuerdo al tipo de moléculas que presentan estos motivos ricos en prolina. Mediante experimentos de RMN (Resonancia Magnética Nuclear) usando la profilina de polen del abedul se corroboró su interacción con la fosfoproteína estimulada por un vasodilatador (VASP por sus siglas en inglés), la cual tiene un motivo PLP (Domke *et al.* 1997). Holt y Koffer en 2001 designaron secuencias consenso en las proteínas ricas en dominios poli-prolina y para las que interactúan con profilina describieron un motivo XPPPPP, donde X puede ser Gly, Ser, Ala, Ile o Leu. Posteriormente se determinó la estructura cristalográfica de la profilina 2a de ratón en complejo con dos ligandos importantes; un homólogo del dominio 1 de la formina (mDia1) y el dominio rico en prolina de VASP que participan en el mecanismo de regulación de la polimerización de la actina (P. Kursula *et al.* 2008). Los mismos autores reportaron la estructura de la profilina de *Plasmodium falciparum* en complejo con un octa-péptido de prolina mostrando que el mecanismo de unión difería un poco con el reportado anteriormente. Esto último está relacionado a la unión de ligandos específicos del organismo, como dominios FH1 de forminas de *Plasmodium* (I. Kursula *et al.* 2008). Recientemente se determinó la estructura de una profilina alérgica (Amb a 8) en complejo con PLP₁₀ y PLP₁₄ (Offermann *et al.* 2016). Una de las regiones más conservadas en estas proteínas es el sitio de unión a poli-L-prolina, que es una región hidrofóbica en la superficie localizada entre el extremo amino-terminal (hélice- α 1) y el extremo carboxilo terminal (hélice- α 3) (Fig. 3A), y se observó que el mecanismo de unión a PLP es similar al de las profilinas de mamíferos y protozoarios, y que los residuos que participan son altamente conservados (Fig. 3B).

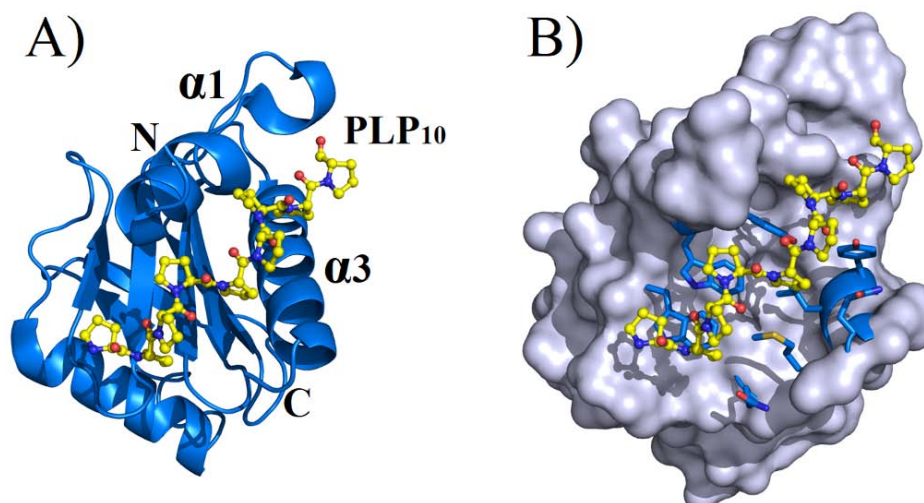


Figura 3. Profilina alergénica Amb a 8 (PDB: 5VE0) en complejo con poli-L-prolina (10).

A) Representación de listón de la profilina (azul) y PLP (amarillo) mostrando la región de interacción altamente conservada. **B)** Superficie de interacción de profilina (blanco) con PLP (amarillo) y en azul los residuos Trp3, Tyr6, Trp35, Gln101, Tyr127, Leu128, Gln131, Met133 que participan en la interacción.

Interacción con fosfatidilinositol

Los lípidos de fosfatidilinositol juegan un papel importante en diversos procesos celulares en eucariontes, incluyendo la motilidad celular, la regulación del citoesqueleto, el tráfico a través de la membrana, la apoptosis, y el desarrollo celular (Richer *et al.* 2009). Estas moléculas son reconocidas por distintos dominios de proteínas (Balla 2005), así como también por proteínas que contienen parches ricos en residuos básicos en su superficie (Lorenz *et al.* 2008). La profilina es uno de los principales mediadores en la interacción de la membrana con el citoesqueleto, por su capacidad de reconocer fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PIP₂) (Lassing & Lindberg 1985; Goldschmidt-Clermont *et al.* 1990), y también puede interactuar con múltiples lípidos equivalentes, de manera específica (Lu *et al.* 1996; Lambrechts *et al.* 2002; Sathish *et al.* 2004). Por lo tanto, la localización y las propiedades de unión de la profilina a estas moléculas, sugieren que ésta actúa de manera relevante en el control de diferentes vías de señalización en la membrana plasmática. En profilinas de mamíferos se han propuesto dos regiones que median la interacción con lípidos derivados del fosfatidilinositol, una se localiza cerca del sitio de unión con PLP (Schlüter *et al.* 1997), en la que participan los residuos Trp3, Asp8, Lys125, Arg135, Arg136. La otra región se encuentra situada en uno de los giros β característicos de profilinas de plantas, traslapándose con el sitio de unión a actina y los residuos que conforman esta región son Lys69, Arg74, Arg88, Lys90 (Skare & Karlsson 2002) (Fig. 4).

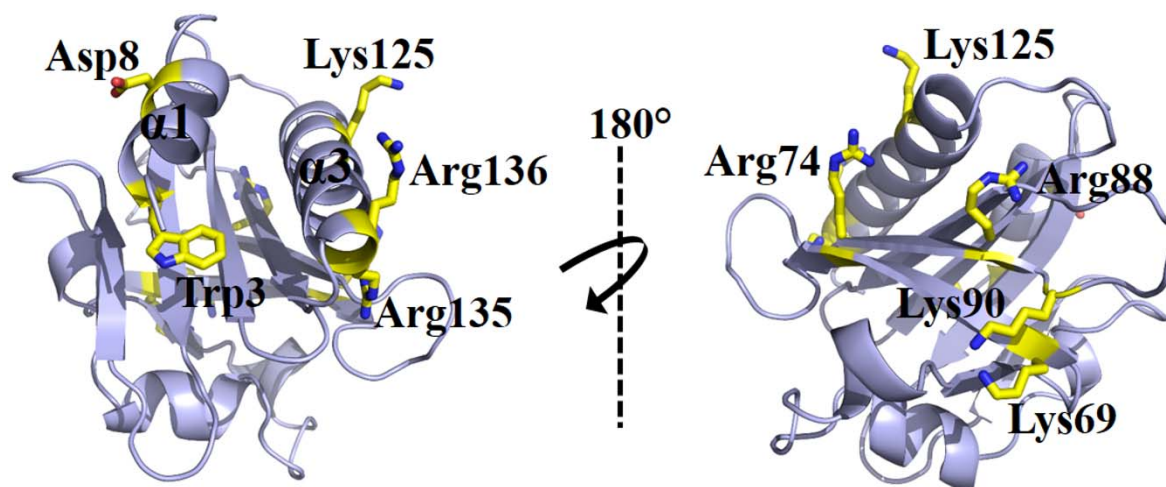


Figura 4. Principales regiones de interacción de profilina con PIP_2 . Representación en listones de la profilina humana (PDB: 1FIL). En amarillo las cadenas laterales de los residuos que interaccionan con PIP_2 , a la izquierda la región que traslapa con el sitio de unión a PLP y del lado derecho la región que traslapa con el sitio de unión a actina.

Alergia (Respuesta mediada por inmunoglobulinas tipo E)

El término alergia fue propuesto por Clemens von Pirquet en 1906, para referirse a una disposición inusual de algunos individuos a desarrollar signos y síntomas de reactividad, o “reacciones de hipersensibilidad” cuando se exponen a ciertas sustancias (Wagner 1964). Más recientemente, el término alergia se describe como una respuesta inmune adaptativa anormal dirigida contra sustancias no infecciosas del ambiente (alérgenos), incluyendo componentes no infecciosos de ciertos patógenos (Galli *et al.* 2008). La clasificación realizada por Gell-Coombs propone a la alergia como reacciones de hipersensibilidad de tipo I (inmediata), mediadas por inmunoglobulinas de tipo E (IgE) (Rajan 2003). Existen factores genéticos que predisponen a los individuos a desarrollar alergias (atopia) en función de los factores ambientales. Las enfermedades mediadas por IgE fueron definidas por la organización mundial de la salud e incluyen la rinitis alérgica, asma alérgica, dermatitis atópica, y la alergia a alimentos (Bousquet *et al.* 2015). Estas enfermedades tienen actualmente una prevalencia del 5 al 30 % en países industrializados, por lo tanto, ha sido considerada un problema de salud pública en la última década (Pawankar 2014). De acuerdo con informes de la Organización Mundial de la Salud (OMS) al menos un tercio de la población del mundo podría desarrollar síntomas de esta enfermedad en alguna etapa su vida.

La alergia se caracteriza por inflamación y pueden manifestarse por una variedad de síntomas que dependen del órgano con el alérgeno tuvo contacto. Los alérgenos aéreos como los antígenos del ácaro del polvo y el polen pueden afectar los ojos, nariz y vías aéreas; dando lugar a síntomas de rinitis alérgica aguda incluyendo estornudos, irritación nasal y rinorrea. Reacciones alérgicas más severas pueden ser causadas por fármacos, picaduras de insecto y alimentos los cuales pueden provocar anafilaxia, que es una reacción alérgica rápida iniciada por la degranulación de mastocitos (principales células efectoras) y la liberación de los mediadores de la inflamación como citocinas, histamina, leucotrienos, prostaglandinas, enzimas, entre otros, causando una obstrucción respiratoria, presión arterial reducida y hasta la muerte (Hodge & Sayers 2013). El mecanismo de la respuesta alérgica se muestra la en la figura 5.

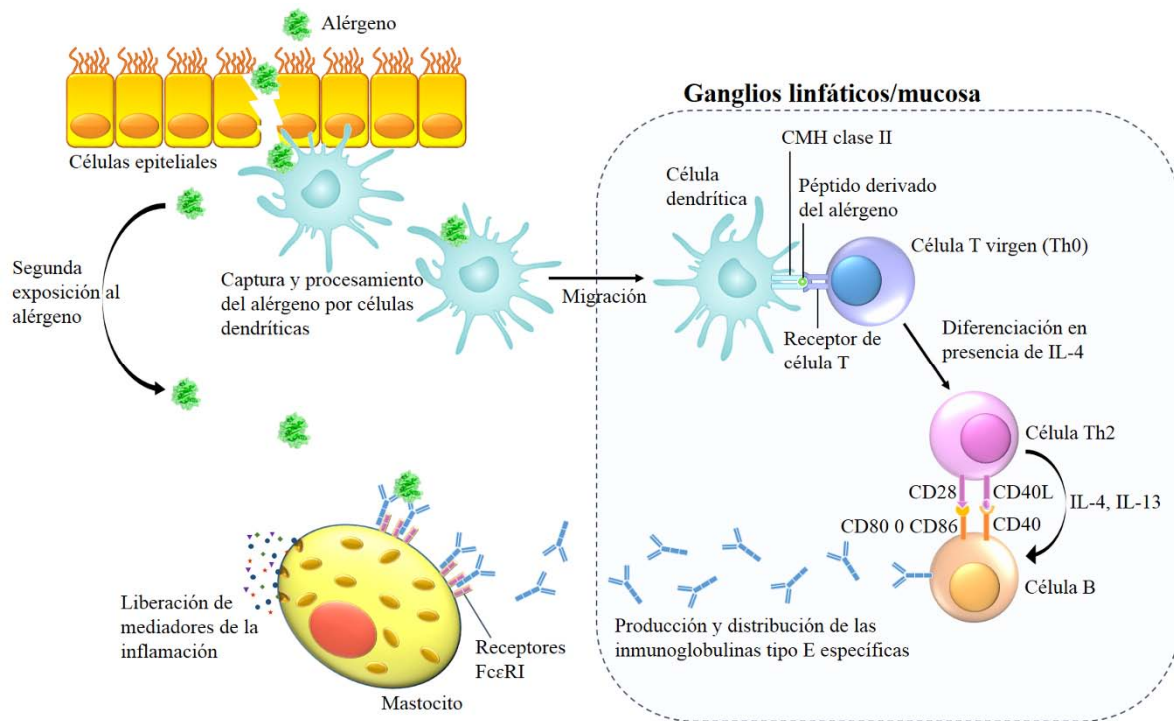


Figura 5. Mecanismo de la respuesta alérgica. El procesamiento del alérgeno se da a partir de su captura por las células dendríticas (CD) desde su contacto con las células epiteliales las cuales pudieron haber sufrido daño para permitir el acceso del alérgeno. Las células dendríticas activadas maduras migran hacia los ganglios linfáticos o hacia regiones específicas en la mucosa, donde éstos presentan los péptidos derivados del procesamiento del alérgeno a través del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) clase II a los receptores de las células T vírgenes (Th0). En la presencia de interleucina 4 (IL-4), la cual puede ser expresada por varias células efectoras incluyendo, basófilos, mastocitos, eosinófilos, células NKT (natural killer por sus siglas en inglés) y células T, favorece que las células Th0 adquieran las características de una célula cooperadora tipo 2 (Th2). Estas células producen IL-4 y IL-13 que junto con la interacción favorable de moléculas coestimuladoras (CD40 con el ligando de CD40, y CD80 o CD86 con CD28), promueven el cambio de isotipo por recombinación en células B, en el que los segmentos de

genes que codifican para la cadena pesada de inmunoglobulina sufren un rearrreglo que lleva a la producción de anticuerpos IgE. Los basófilos y los mastocitos también pueden producir IL4 y IL13, y pueden estimular a las células B a través de CD40. Una vez producidas las IgE específicas difunden localmente e ingresan a los vasos linfáticos, subsecuentemente entran al torrente sanguíneo donde son distribuidas sistémicamente. Una vez que las IgE específicas se encuentran con las células efectoras se unen a los receptores FcεRI para sensibilizarlas ante la respuesta a un segundo contacto con el alérgeno. Cuando este último paso ocurre se lleva a cabo la degranulación de las células, liberando los mediadores de la inflamación que producen los síntomas característicos de la alergia.

La respuesta alérgica se divide en dos fases. La fase de inducción o sensibilización, en la cual el sistema inmune forma anticuerpos IgE en respuesta a una exposición inicial al alérgeno. Cuando un alérgeno entra en contacto con el sistema inmune por primera vez es capturado y procesado por las células presentadoras de antígeno (CPA) las cuales migran del sitio inicial de contacto al tejido linfático o mucosa bajo la influencia de quimiocinas. Entonces ocurre una presentación para células T CD4+ (Th0), donde se exponen los determinantes antigénicos de los alérgenos procesados, en asociación con el complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) clase II y moléculas coestimuladoras. En presencia de las interleucinas IL-4 e IL-13 las células Th0 pueden diferenciarse en células Th2 las cuales producen a su vez citosinas como IL-3, IL-4 y IL-13 que estimulan a las células B a el cambio (switching) para producir la clase de inmunoglobulina IgE específica para alérgenos tanto por células B o a través de su diferenciación en células plasmáticas. En los linfocitos B las IgE a través de procesos de hipermutación somática y expansión clonal dirigen a una maduración de la afinidad produciendo linfocitos B de memoria, que son parte importante del reconocimiento y es entonces que los anticuerpos IgE producidos por estas células, migran a través del torrente sanguíneo para llegar a los órganos que son parte de la barrera inmunológica. Posteriormente se incorporan a la superficie de las células efectoras a través de sus receptores específicos el FcεRI de alta afinidad y FcεRII (CD23) (Gould & Sutton 2008). La segunda fase reactiva, en la cual el alérgeno es reconocido en un segundo contacto por los anticuerpos IgE específicos previamente unidos a los receptores FcεRI en la superficie de mastocitos y basófilos, promueve el entrecruzamiento del complejo y activa la vía de señalización, que da lugar a la respuesta de las células con la liberación del contenido de los gránulos. Estos últimos contienen potentes mediadores de la inflamación preformados (Galli *et al.* 2008) que dan lugar a los síntomas característicos de la alergia.

Existen cinco isotipos de anticuerpos en humanos, algunos con diferentes subclases: IgM, IgD, IgG (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), IgA (IgA1, IgGA2) y IgE. Todos tienen una estructura similar que consiste de dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) con regiones variables (V) y regiones constantes (C) conectadas entre sí por puentes disulfuro lo que les confiere parte de su estabilidad (Fig. 6A). Las cadenas pesadas difieren en el número de dominios CH, con tres para IgD, IgG, IgA y cuatro para IgM, IgE. Cada dominio posee alrededor de 110 aminoácidos dispuestos en un plegamiento tipo sándwich con dos hojas- β antiparalelas muy cercanas entre sí (Fig. 6B). La identidad menos conservada en las secuencias de aminoácidos de anticuerpos está localizada en el dominio variable del extremo amino-terminal de las cadenas pesada y ligera, mientras que la diversidad en los dominios constantes se observa solo entre los isotipos.

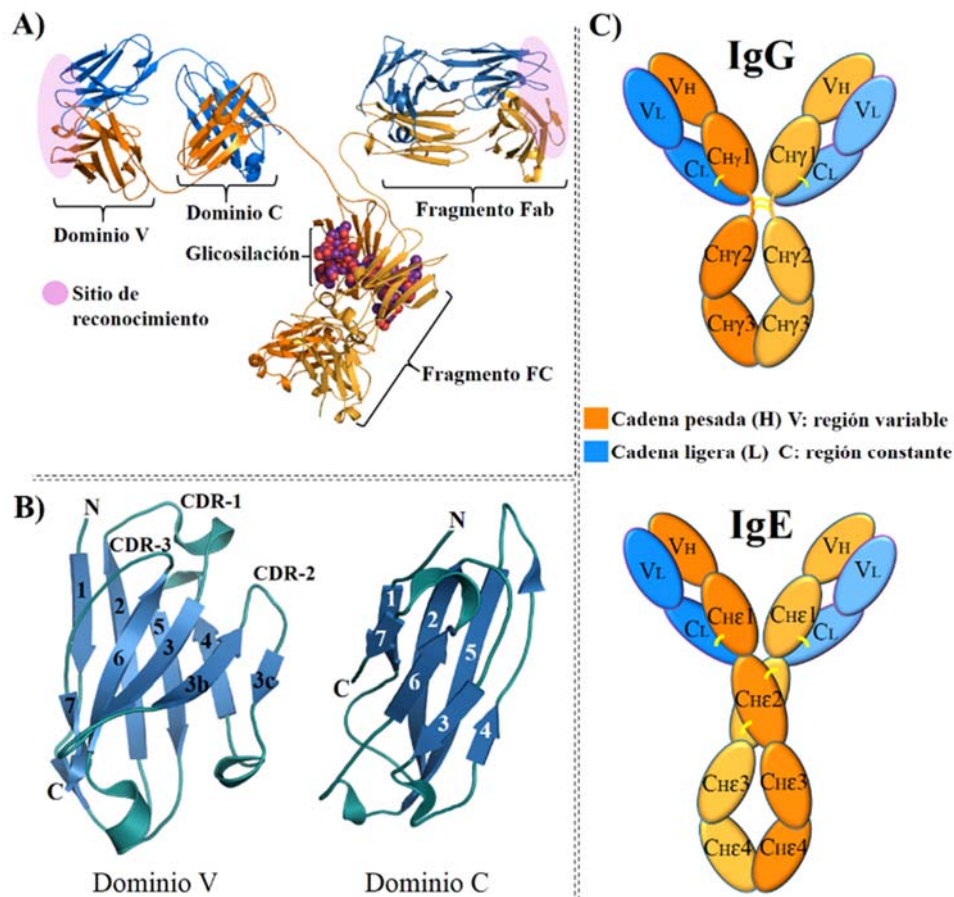


Figura 6. Estructuras de las inmunoglobulinas. **A)** Representación en listones de una estructura tridimensional completa de un anticuerpo IgG (PDB: 1IGT) en azul la cadena ligera y en naranja la cadena pesada. **B)** Representación en listones de los dominios de inmunoglobulina (V: variable, C: constante) que conforman a las inmunoglobulinas. **C)** Principales diferencias entre los anticuerpos IgE e IgG que son el tamaño de la cadena pesada, la disposición de los puentes de disulfuro para la unión de la cadena pesada y ligera, y el porcentaje de glicosilación, el cual es mayor en IgE (no mostrado).

Las inmunoglobulinas del tipo IgE son los mediadores clave en la respuesta alérgica (hipersensibilidad de tipo I). De todos los isotipos de inmunoglobulina en mamíferos, es la que se encuentra en menor concentración en sangre (50-200 ng/mL) en individuos sanos, tienen un tiempo de vida corto comparado con el de otras inmunoglobulinas (Wu & Zarrin 2014). La diferencia estructural más importante entre las IgE y las IgG es su región Fc (Fig. 6C), a través de la cual se unen a los receptores FcεRI (k_a de 10^{10} M^{-1}) de las células efectoras, como los mastocitos que se encuentran principalmente en mucosas, donde se favorece la síntesis y secreción de las IgE y la alta afinidad por su receptor promueve su rápida unión a las células (Gould *et al.* 2003). Además de su papel en las reacciones alérgicas la alta concentración de IgE se ha relacionado a enfermedades parasitarias donde ejerce una función de protección, como por ejemplo en la esquistosomiasis (Capron & Capron 1994).

El papel de las profilinas como alérgenos y la reactividad cruzada

Muchos de los alérgenos responsables de generar las respuestas mediadas por IgE son derivados de plantas, animales, insectos y hongos. La nomenclatura de los alérgenos ha sido desarrollada y se mantiene por la OMS y la IUIS (www.allergen.org) (Chapman *et al.* 2007). Los alérgenos son nombrados usando las tres primeras letras del género (ejemplo: Hev de *Hevea*), la primera letra de la especie (ejemplo: b de *brasiliensis*) y un número de acuerdo al orden consecutivo de cómo fue reportado. Varios compuestos químicos unidos a un acarreador (usualmente proteínas) pueden actuar como haptenos, comportándose como alérgenos y por tanto provocando una respuesta IgE. Un ejemplo de estos haptenos es el DNP (2, 4-Dinitrofenol) que unido a albúmina actúa como un potente alérgeno.

En general, las profilinas han sido consideradas como unos de los alérgenos principales del polen siendo relevantes en alergias respiratorias vinculadas a este material y en particular pueden llegar alcanzar una prevalencia de hasta el 60% en regiones donde la presencia de polen es mayor (Barber-Hernández 2015). Debido a la alta identidad en secuencias, lo que a su vez se puede ver reflejado en la conservación de la estructura tridimensional, así como a su extensa distribución en diferentes organismos, a las profilinas se les ha denominado panalérgenos, del prefijo griego “pan” que significa “todo” enfatizando la distribución ubicua de estas proteínas (Valenta *et al.* 1992). Es poco probable que un individuo alérgico presente hipersensibilidad a una sola fuente de alérgenos, la mayoría presenta sensibilidad a más de una. Esta respuesta se

logra explicar por la presencia de proteínas homólogas como las profilinas, en diferentes organismos no relacionados, pero en los que mantienen una función conservada. El reconocimiento de este tipo de proteínas por anticuerpos IgE provoca “reacciones de reactividad cruzada” a través de los determinantes antigénicos que se mantienen entre los alérgenos debido a su relación estructural (Hauser *et al.* 2010). Existe muchas proteínas las cuales son consideradas panalérgenos y están implicadas en múltiples reacciones de reactividad cruzada entre organismos filogenéticamente distantes y no relacionados. Entre estas reacciones se pueden incluir las alergias a diversos pólenes, alimentos como los frutos, látex, insectos y mariscos (Aalberse *et al.* 2001). Entre los panalérgenos más importantes en plantas se encuentran consideradas las profilinas, las polcalcinas, las proteínas transferidoras de lípidos no-específicas, y las proteínas relacionadas a patogénesis (McKenna *et al.* 2016). A la fecha se han reportado cerca de 44 profilinas alérgicas de acuerdo a la OMS/IUIS las cuales se muestran en la tabla 1. Uno de los síndromes más importantes para este tipo de reacciones de reactividad cruzada es el de polen-látex-frutos y en cual participan las profilinas de plantas. La hipersensibilidad de tipo I provocada por una profilina fue descrita por primera vez para la de polen de abedul (Bet v 2) (Rudolf Valenta *et al.* 1991) y a la fecha se ha comprobado que ésta posee reactividad cruzada con varias profilinas de diferentes fuentes (Tordesillas *et al.* 2010).

Tabla 1. Profilinas reportadas como alérgenos por la OMS/IUIS.

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

*Alérgenos analizados en este trabajo.

Efecto de la oligomerización en los alérgenos

La máxima valencia de un antígeno está relacionada con el tamaño de su superficie, cuando en ésta podemos encontrar al menos un determinante antigénico (epítipo), siendo un factor clave en el reconocimiento por anticuerpos (Pauling 1940). El mecanismo clave en la respuesta alérgica, es la activación de la degranulación por el entrecruzamiento de al menos dos moléculas del complejo IgE-FcεRI en la superficie de las células efectoras (Segal *et al.* 1977). Para que la condición anterior se pueda llevar a cabo que el alérgeno debe presentar por lo menos dos epítopos para IgE (multivalente), los cuales, en algunos casos pueden estar repetidos en la misma estructura como para el alérgeno tropomiosina (Pen a 1) de camarón (Ayuso *et al.* 2002) o para Hev b 5 del látex (Beezhold *et al.* 2004). La especificidad de los anticuerpos en la región hipervariable (paratopo) debe ser complementaria a los epítopos presentes en el alérgeno. Otro factor es la relación del tamaño entre un anticuerpo (IgE: ~180 kDa) y un alérgeno que comúnmente tienen un tamaño entre 3 a 50 kDa (Woodfolk *et al.* 2015); por ejemplo; el alérgeno principal del polen de abedul Bet v 1 (17 kDa), proteínas transferidoras de lípidos (9 kDa), alérgeno principal de la leche bovina β-lactoglobulina Bos d 5 (18.3 kDa). Esto sugiere que la mayoría de los alérgenos deberían tener al menos dos epítopos para IgE para poder llevar a cabo el entrecruzamiento con los receptores y este factor puede ser limitante para algunos de ellos ya que habría un impedimento estérico para la unión simultánea de dos anticuerpos. Sin embargo, la reactividad de un alérgeno se puede ver compensada por fenómenos de oligomerización en donde formas diméricas y oligoméricas de un alérgeno sean capaces de inducir una respuesta mediada por IgE por el reconocimiento de epítopos no traslapantes expuestos en su superficie.

Además de participar en la regulación de la función en proteínas y generar estructuras de un orden más complejo (Ali & Imperiali 2005), la oligomerización se ha descrito comúnmente para los alérgenos como un mecanismo que promueve su capacidad alérgica además de generar nuevos sitios de reconocimiento para anticuerpos. Las consecuencias de la oligomerización se ha descrito para varios alérgenos tales como: proteína relacionada a patogénesis Bet v 1 (Schöll *et al.* 2005; Kofler *et al.* 2014), β-lactoglobulina bovina Bos d 5 (Niemi *et al.* 2007), Hemocianina de cucaracha americana Per a 3 (Bellinghausen *et al.* 2008; Mindykowski *et al.* 2010) alérgeno de zanahoria Dau c 1 (Reese *et al.* 2007), Proteasa aspártica de cucaracha Bla g 2 (Li *et al.* 2008), vicilina Ara h 1 (Chruszcz *et al.* 2011), legumina Ara h 3

(Yusnawan *et al.* 2012) de cacahuete y la proteína tipo barril- β de hongo Alt a 1 (Chruszcz, Chapman, *et al.* 2012). Otro fenómeno que ha tomado importancia es la formación de estructuras diméricas transitorias en los alérgenos (Rouvinen *et al.* 2010), y su descripción se ha llevado a cabo a través del análisis cristalográfico de las estructuras tridimensionales de los alérgenos, con el cual podríamos confirmar la formación de estructuras de mayor orden. El ejemplo más claro corresponde para el alérgeno β -lactoglobulina (Bos d 5) en donde la dimerización favorece el reconocimiento por anticuerpos, por la unión a una región expuesta en la superficie del homo-dímero. La formación de estas estructuras transitorias para Bos d 5 es dependiente de la concentración y pueden existir en solución como una mezcla de monómeros y dímeros (Niemi *et al.* 2007). Recientemente los mismos autores investigaron la prevalencia en la formación de dímeros transitorios para la familia de los alérgenos lipocalinas corroborando sus datos con experimentos en solución usando espectrometría de masas nativa (Niemi *et al.* 2015). Esto sugiere que la capacidad de los alérgenos para formar dímeros u oligómeros podría favorecer el reconocimiento por anticuerpos IgE para la activación de la respuesta en las células efectoras.

Inducción de la tolerancia inmunológica en alergia

La inmunoterapia con alérgenos (AIT por sus siglas en inglés) fue empleada en la práctica clínica hace más de un siglo con el objetivo de “vacunar” contra hipotéticas “toxinas aerogénicas”. A pesar de tener una justificación errónea, la inmunoterapia subcutánea con extractos de polen fue eficaz en la reducción de los síntomas de la fiebre del heno (Noon & Cantab 1911). Es importante encontrar una vía adecuada para inmunoterapia y dentro de todas las posibilidades, las que mejores resultados han presentado son la inmunoterapia sublingual y en menor medida la inmunoterapia subcutánea (Passalacqua & Canonica 2016). No obstante, estas prácticas pueden dar lugar a la inducción de la tolerancia, la cual involucra características estructurales del alérgeno, dosis, ruta y tiempo a su exposición, la existencia de una respuesta inmune innata contra el alérgeno y la susceptibilidad genética del individuo. Dependiendo del tipo de protocolo de AIT, la desensibilización al alérgeno, la tolerancia inmune alérgeno-específica y la supresión de la inflamación alérgica aparecen en cuestión de horas (Jutel *et al.* 2016). Se ha sugerido que la respuesta tolerogénica se encuentra mediada por un cambio en la memoria inmunológica (Fig. 7), por consecuencia una inmunoterapia efectiva está asociada

con la inducción de distintas subpoblaciones de células T reguladoras (Tregs) que dirigen a una tolerancia periférica (Palomares 2013). La inducción de este tipo de células se lleva a cabo por la secreción de IL-10 y el factor de transcripción de crecimiento (TGF)- β , y estas células son capaces de reconocer los mismos determinantes antigénicos en los alérgenos que las IgEs (Kaczorowski & Jutel 2013; Akdis & Akdis 2014). La expresión fenotípica de células B reguladoras cuando su producción se induce y mantiene por la presencia de IL-10 juega un papel importante en la respuesta alérgica (Stanic *et al.* 2015). El incremento en la producción de IL-10 da lugar al cambio de isotipo para la expresión de IgG4 así como también de IgA bloqueadores específicos contra los alérgenos, como parte del mecanismo de inducción en las células B reguladoras que conlleva a la supresión de la producción de IgE (Chesné *et al.* 2016). La aparición de IgG4 es de particular importancia en la inmuno-tolerancia contra los alérgenos porque este isotipo en particular apaga la señalización de las reacciones de degranulación mediadas por Fc ϵ RI-IgE de los mastocitos, basófilos y eosinófilos (Santos *et al.* 2015)

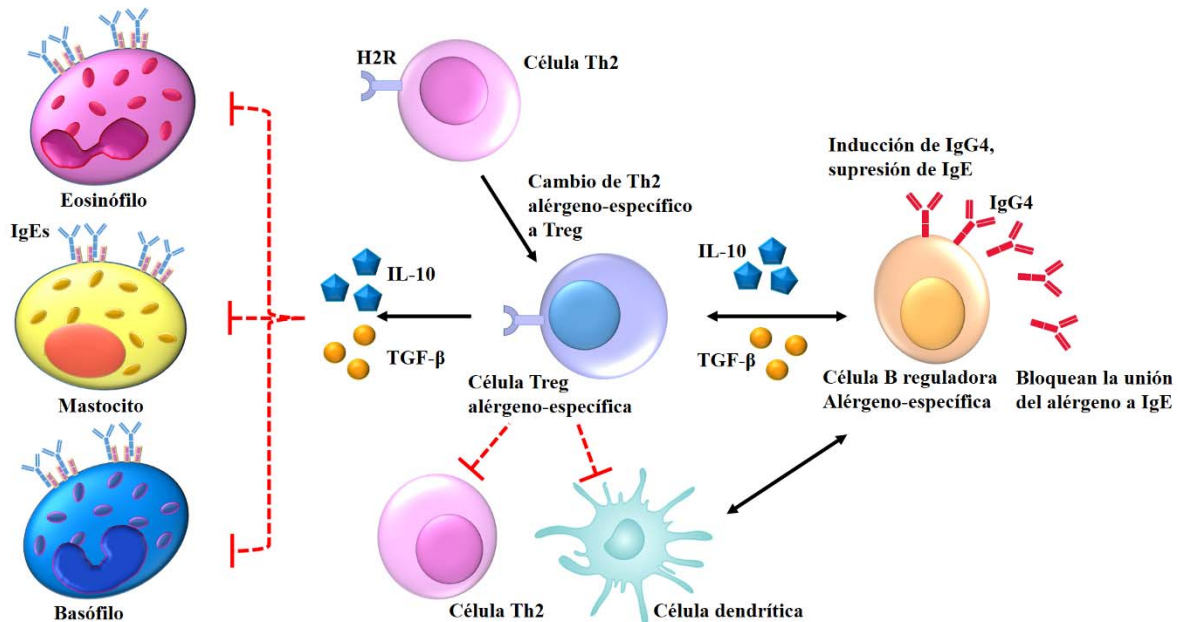


Figura 7. Mecanismo de la tolerancia en alergia. La inducción de células Treg alérgeno-específicas, se originan a partir de células Th2 específicas de la respuesta alérgica, siendo uno de los eventos iniciales en la generación de la tolerancia para alérgenos. Las células efectoras de la respuesta alérgica (eosinófilos, mastocitos y basófilos), están reguladas por la función supresora de las Treg por diferentes vías, como la secreción de IL-10, TGF- β , supresión de las células Th2 y sus citosinas, impidiendo el suministro de factores de supervivencia para las células efectoras. A su vez IL-10 y TGF- β suprimen la producción de IgE por linfocitos B y además IL-10 induce la producción de IgG4. Las células B reguladoras (Bregs) producen también IL-10 y juegan un papel importante en la supresión de las células T alérgeno-específicas y principalmente promueven el cambio a IgG4 en células plasmáticas. H2R juega un papel importante en la supresión de las células Th2, células dendríticas inflamatorias y basófilos (Adaptado de Akdis & Akdis 2014).

Antecedentes

El estudio de las profilinas como alérgenos inició hace 26 años, cuando se describió su papel en la alergia al polen de *Betula verrucosa*. Por otra parte, se observó que la profilina podría ser causa de autoinmunidad en individuos susceptibles, sensibilizados a este alérgeno (R Valenta *et al.* 1991). Ahora sabemos que enzimas como la alfa-quimasa que son liberadas en el proceso de degranulación de mastocitos y basófilos, podrían disminuir la unión de la profilina a inmunoglobulinas de tipo E, debido a que estas hidrolizan regiones específicas de las profilinas, incluyendo las isoformas humanas (Mellon *et al.* 2002). No obstante, esta familia de panalérgenos exhibe una prevalencia de casi el 30% en pacientes alérgicos al polen y alimentos (Orovitg *et al.* 2011).

Los análisis más recientes indican que las predicciones de epítomos para inmunoglobulinas de tipo E, basadas en modelos por homología, necesitan ser interpretadas con cautela. Por ejemplo, para la profilina de cacahuate (Ara h 5), donde se utilizaron como modelo los datos de estructuras reportadas en el PDB, incluyendo la de látex, dio lugar a un modelo teórico que resultó ser diferente a la estructura tridimensional determinada usando técnicas de difracción de rayos X a 1.1 Å de resolución. Por lo tanto, el análisis bioinformático usando un modelo teórico para determinar los posibles epítomos de reconocimiento por IgE no fue confiable, ya que la disposición de cargas y otras características en la superficie de los alérgenos pueden cambiar significativamente dicho reconocimiento (Wang *et al.* 2013). El mapeo de epítomos mediante otras técnicas como los métodos de competición, los de modificación de antígeno, los de fragmentación, así como el uso de péptidos sintéticos o librerías de péptidos son esencialmente funcionales para un acercamiento o aproximación (Morris 2007) y son complementarios al análisis bioinformático. Las técnicas experimentales que permiten obtener estructuras tridimensionales como lo son la difracción de rayos x, la resonancia magnética nuclear, así como la microscopía electrónica son fundamentales en los estudios de interacción proteína-proteína, y por lo tanto son en la actualidad los más usados y confiables para el mapeo de epítomos de proteínas. A la fecha se han determinado once estructuras de complejos alérgeno-anticuerpo, comprobando que la integridad de la estructura del alérgeno es necesaria para el reconocimiento por anticuerpos cuando se da a través de epítomos conformacionales (Pomés *et al.* 2015). Dos de estos complejos fueron formados entre

el Fab de IgE obtenidos de una combinatoria de librerías de pacientes alérgicos y los alérgenos β -lactoglobulina Bos d 5 (Niemi *et al.* 2007) y un alérgeno del polen de pasto Phl p 2 (Padavattan *et al.* 2009). Otros complejos descritos en la literatura son entre Fab de IgG y los alérgenos Bet v 1 (Mirza *et al.* 2000), y el alérgeno de veneno de abeja Api m 2 (Padavattan *et al.* 2007). En años recientes se realizó un extenso análisis de los determinantes antigénicos en los alérgenos de cucaracha y ácaro logrando obtener cristales para los complejos entre fragmentos de anticuerpo y los alérgenos Bla g 2 (Li *et al.* 2008; Li *et al.* 2011), Der p 1 y Der f 1 (Chruszcz, Pomés, *et al.* 2012). En el alérgeno Bla g 2 se observó que los carbohidratos participan en reconocimiento por anticuerpos además de estar involucrados en el reconocimiento por IgE. Para el caso de los alérgenos de ácaro Der p 1 y Der f 1 se comprobó mediante mutagénesis dirigida e interacción anticuerpo-alérgeno la reactividad cruzada entre ambos. También recientemente se han aislado anticuerpos contra alérgenos que han sido cristalizados, entre estos se incluyen, un anti-Bla g 1 IgG scFv, un anti-Bet v 1 IgE scFv y tres anti-Der p 1 IgG Fab (Chruszcz, Pomés, *et al.* 2012; Mueller *et al.* 2014; Levin *et al.* 2014). Para complementar la caracterización de estos últimos anticuerpos específicos, se realizaron mutaciones y experimentos unión de péptidos para poder definir las regiones inmuno-dominantes en la superficie de los alérgenos. Por lo tanto, la determinación de los residuos involucrados en el reconocimiento entre el complejo alérgeno-IgE es la clave para tener un análisis más exitoso en la búsqueda de los determinantes antigénicos y posibles responsables de la reactividad cruzada en familias de proteínas homólogas en los organismos.

Otro fenómeno poco estudiado, pero de gran relevancia es la oligomerización de las profilinas. Como por ejemplo para las isoformas de la profilina humana PFN1 y PFN2 este fenómeno se ha implicado en la regulación y unión de la G-actina, donde PFN1 actúa como un tetramero (Babich *et al.* 1996), también se ha reportado que dímeros de estas isoformas humanas unen péptidos de VASP afectando la regulación de la polimerización de la G-actina (Jonckheere *et al.* 1999), también se ha caracterizado su regulación para otros ligandos como mDial (P. Kursula *et al.* 2008) y más recientemente por ingeniería de proteínas para ver el efecto de la dimerización de la profilina de Plasmodium a través de una región que la diferencia de otros organismos (Bhargav *et al.* 2015). Estos reportes muestran la importancia de los fenómenos de oligomerización en la familia de las profilinas y cómo se puede ver afectada su

función en la dinámica de interacción con otras proteínas. Estudios sobre cómo estos fenómenos afectan su capacidad como alérgeno se han limitado a describir que tienen capacidad de formar dímeros y tetrámeros como es el caso de las profilinas de abedul (Bet v 2), maíz (*Zea m 12*) y del polen de artemisa (*Art v 4*), donde el reconocimiento entre isoformas y sus diferentes formas oligoméricas por IgE no se ve afectado (Mittermann *et al.* 1998; Psaradellis *et al.* 2000; Wopfner *et al.* 2002). Estos autores sugieren que las formas oligoméricas de las profilinas pueden tener una ventaja en el reconocimiento por anticuerpos generando nuevos sitios o siendo más reactivas que los monómeros. También mencionaron que la formación de los dímeros podría estar regulada por diferentes interacciones como puentes disulfuro o interacciones iónicas (Wopfner *et al.* 2002). Estudios de este tipo usando profilinas proporcionarán un panorama nuevo sobre su reconocimiento por IgE y su efecto en la reactividad cruzada entre esta familia de proteínas alérgicas. Otro aspecto importante y del cual no existen estudios al respecto son los efectos que pueden tener las modificaciones postraduccionales que presentan las profilinas, tales como la fosforilación (Aparicio-Fabre *et al.* 2006), así como en su reconocimiento por anticuerpos. Se ha observado que cuando una proteína se encuentra fosforilada disminuye su reconocimiento por anticuerpos, como es el caso de las caseínas de la leche de cabra y oveja (Cases *et al.* 2011). Por lo tanto, la alta identidad y la conservación de varios sitios de reconocimiento a ligandos específicos expuestos en la superficie de la molécula podrían ser clave en el fenómeno de reactividad cruzada con las IgE de pacientes alérgicos al polen, al látex y a las frutas.

Justificación

Las profilinas son panalérgenos que pueden ser utilizados como marcadores de reactividad cruzada, ya que están relacionados filogenéticamente y presentan estructuras terciarias similares. Los estudios que permitan determinar su interacción con anticuerpos son fundamentales para la comprensión de la reactividad cruzada con IgEs.

Hipótesis

Si las características inmunogénicas del alérgeno profilina dependen del número de los determinantes antigénicos en la superficie de su estructura tridimensional y de los fenómenos de oligomerización, entonces en conjunto pueden favorecer las respuestas mediadas por IgE.

Objetivo general

Describir las consecuencias de la dimerización del alérgeno Hev b 8 en el reconocimiento por anticuerpos y sus principales determinantes antigénicos con el uso de anticuerpos monoclonales murinos.

Objetivos específicos

- Determinar la estructura tridimensional de los alérgenos rHev b 8 y rZea m 12 a partir de datos de difracción de rayos X.
- Obtener un conjunto de anticuerpos monoclonales murinos específicos anti-rHev b 8.
- Caracterizar el reconocimiento de los anticuerpos monoclonales mediante ensayos inmuno-químicos y biofísicos.
- Evaluar la reactividad cruzada entre rHev b 8 y rZea m 12 utilizando los anticuerpos monoclonales y el suero de individuos con alergia específica a profilina.
- Caracterizar las diferencias en el reconocimiento entre ambos alérgenos con los anticuerpos monoclonales y evaluar capacidad bloqueadora o neutralizante de la respuesta mediada por anticuerpos humanos.

Materiales y Métodos

Obtención del RNA total y síntesis de cDNA para la amplificación de los genes codificantes

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

Clonación, sobre-expresión, y purificación de los alérgenos recombinantes Hev b 8 y Zea m 12

La amplificación del gen de Hev b 8 se hizo mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando 5 μ L del cDNA y los cebadores específicos que se diseñaron para la secuencia previamente reportada por Rihs *et al.* 2000. que corresponden para la isoforma Hev b 8. 0102 (Gen Bank: CAB51914.1). Para la profilina de maíz los cebadores fueron diseñados para la isoforma Zea m 12. 0105 reportada por Kovar *et al.* 2000 (GenBank: AAG35601.1). Las construcciones de los sistemas para la expresión de las proteínas recombinantes se incluyen en la figura 1 del Anexo 1.

Tabla 2. Oligonucleótidos para amplificar los genes de los alérgenos rHev b 8 y rZea m 12.

rHev b 8	rZea m 12
Forward: 5'-CGC GGATCC GACGACGACGACAAGATGA CGTGGCAGGCGTACGTAGATGATCAT-3' Sitio: BamHI Sitio: Enterocinasa	Forward: 5'-TAC AGATCT GAAAACCTGTATTTCAGGG C ATGTCGTGGCAGGCGTACGTTCGATGACCA CCTGCTGTGCGACATC-3' Sitio: BglII Sitio: TEV
Reverse: 5'-GGTA AAGCTT TTAATAGCCCTGATCAATGA GGTA-3' Sitio: Hind III	Reverse: 5'-GGTA AAGCTT TTAGAAGCCCTGTTTCGATCA GGTA-3' Sitio: Hind III

La reacción de PCR se llevó a cabo en 50 μ L de la mezcla Accuprime pfx supermix (Invitrogen) con 30 ciclos de amplificación (95 °C durante 15 s, 60 °C por 30 s, y 68 °C por 60 s) usando el termociclador TC-512 (Techne). El producto de PCR se ligó al vector pET28c (Novagen CA, USA) usando T4 DNA ligasa y posteriormente fue transformado en células de *E. coli* DH5 α , para obtener los vectores pET28c-rHev b8 y pET28c-rZea m 12. Las clonas positivas se seleccionaron por restricción y el DNA de éstas se envió a un servicio de secuenciación (Laragen Inc).

La sobre-expresión de las proteínas se realizó en la cepa de *E. coli* Rosetta (DE3) Cam. El medio de cultivo utilizado para el crecimiento fue el Luria Bertani (LB), suplementado con los antibióticos apropiados. Un litro de LB inoculado con el vector correspondiente en la cepa de *E. coli*, se incubó a una temperatura de 37 °C, hasta tener una densidad óptica de 0.7 a 600 nm (OD₆₀₀). La inducción se llevó a cabo con isopropil β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) 0.5 mM a una temperatura de 30 °C por 6-8 hrs. Después de este tiempo se centrifugó a 4500 rpm por 10 min, a 4 °C, para obtener el paquete celular, el cual se resuspendió en un amortiguador de lisis Tris-HCl 50mM, 0.3 M NaCl pH 8, y 1mM fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF). Las células se lisaron en un sonicador Misonix 3000 usando intervalos de 10 segundos con potencia 4 y un tiempo de espera de 30 seg hasta completar 10 min. Después, el lisado se centrifugó a 10000 rpm a 4 °C por 30 min. El sobrenadante se filtró en una membrana de 0.22 μ m millipore y se aplicó a una columna de afinidad a Ni²⁺ His Trap (Invitrogen) de 5 mL. La elución de la

muestra se realizó con un gradiente de imidazol por pasos comenzando en 15 mM para eliminar todo lo que se pegó a la columna de manera inespecífica, y después usando concentraciones de 100, y 250 mM. Las muestras de proteína se cargaron a la columna con un flujo de 0.5 mL/min y la elución se realizó con un flujo de 1 mL/ min.

La reacción de corte de la etiqueta de histidinas para rHev b 8 se llevó a cabo con enterocinasa (Ekmax, Invitrogen), de acuerdo a las instrucciones del proveedor. Posteriormente la muestra hidrolizada se dializó y se aplicó una vez más a la columna de afinidad a Ni²⁺. Finalmente, la muestra se aplicó a una columna mono Q HR 5/5 de intercambio iónico, en un equipo ÄKTA FPLC (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden). Para la construcción con la proteína rZea m 12 el corte del tallo de histidinas se realizó con la enzima TEV utilizando una relación 30:1 proteína-enzima, en un amortiguador 50 mM tris-HCl pH 8.0. durante 12 hrs a 4 °C. Finalizada la digestión, la muestra se aplicó a la columna de afinidad a Ni²⁺ eluyendo la proteína en la fracción no unida. Ambas proteínas (rHev b 8 y rZea m 12) se dializaron contra un amortiguador 50 mM Tris-HCl pH 7.5 y se almacenaron a -20°C. La concentración de proteína se calculó utilizando el coeficiente de extinción molar teórico a 280 nm de 19940 M⁻¹cm⁻¹ para rHev b 8 y 16960 M⁻¹cm⁻¹ para rZea m 12.

Cristalización

Las proteínas recién purificadas se dializaron contra un amortiguador 50 mM Tris-HCl pH 7.5 +/- 1 mM DTT y se llevaron a una concentración de 5 y 10 mg/mL por separado. A partir de las condiciones iniciales de cristalización, en las que se utilizaron los kits de Hampton (crystal screen I y II) mediante la técnica de difusión en fase de vapor por gota colgante, a 18°C, se optimizó el proceso de cristalización en la condición con 0.1 M Tris-HCl pH 8.5, 2 M de sulfato de amonio, variando la concentración de proteína, el agente precipitante y el pH. Para Hev b 8 se obtuvieron dos formas cristalinas.

Colecta de datos, determinación de la estructura y afinamiento

Los datos de difracción para las dos formas cristalinas de rHev b 8 se obtuvieron de la siguiente manera: Para el cristal trigonal (P3₂) se utilizó un generador de ánodo rotatorio (Cu K α , λ = 1.5416 Å) con un detector Rigaku R-AXIS IIC (Rigaku, Texas, EUA), este cristal contenía dos

moléculas en la unidad asimétrica. Para los cristales tetragonales ($P4_32_12$) de rHev b 8 y de rZea m 12 con una molécula en la unidad asimétrica, se usó un difractor Rigaku MicroMax 007 HF de ánodo rotatorio y un detector R-Axis IV⁺⁺ a 103 °K. La solución crio-protectora se preparó con la solución madre y 30% de glicerol para todos los casos. Los datos colectados fueron indexados e integrados usando el software XDS (Kabsch 2010), y posteriormente se escalonaron usando SCALA en la suite de CCP4 (Winn *et al.* 2011). El cristal P3₂ era gemelo merohedral, por lo que fue necesario usar un operador para este corregir defecto al final de afinamiento. Las estructuras tridimensionales fueron resueltas usando reemplazo molecular con el programa Phaser de la suite Phenix (Adams *et al.* 2010) y usando las coordenadas de la profilina de *Arabidopsis thaliana* (código PDB: 3NUL). Para la proteína de maíz se usó como modelo inicial el monómero de Hev b 8. El proceso de afinamiento de las estructuras se realizó con el programa phenix-refine (Afonine *et al.* 2012) y los mapas de densidad electrónica (2Fo-Fc y Fo-Fc) fueron examinados manualmente con Coot (Emsley & Cowtan 2004). Las estructuras fueron validadas con MolProbity (Chen *et al.* 2010).

Análisis bioinformático de la secuencias y estructuras cristalográficas

El alineamiento de secuencias se realizó con el servidor PRALINE (Simossis & Heringa 2005), incorporando todas las secuencias de alérgenos de profilina debido a la alta redundancia sobre la conservación de residuos (porcentaje de identidad en secuencia), usando un análisis por pares y uno global. Los tres modelos finales de la estructura tridimensional fueron comparados usando el software PYMOL (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.8 Schrödinger, LLC). El análisis de potencial electrostático de superficie fue calculado con el software Poisson Boltzmann (APBS) (Baker *et al.* 2001). El análisis de interfaces de las estructuras cristalográficas fue calculado usando el servidor PISA (European Bioinformatics Institute) (Krissinel & Henrick 2007). Sumado a este análisis de interfaces se utilizó el servidor EPPIC que incluye además un alineamiento múltiple que evalúa la conservación y variabilidad de residuos por entropía de Shannon en la estructura cristalográfica (Baskaran *et al.* 2014).

Caracterización de los oligómeros de rHev b 8 y rZea m 12

Para separar las formas oligoméricas de los alérgenos, se usaron las fracciones purificadas en dos concentraciones (5 y 10 mg/mL) y se almacenaron durante una semana a 4 °C. Las muestras se cargaron en una columna de exclusión molecular Superdex™75 en un sistema AKTA, FPLC (Amersham Pharmacia Biotech, AB, Sweden). La columna fue equilibrada con Tris-HCl 50 mM, pH 7.5, y se usaron para su calibración los siguientes estándares: mioglobina (16.95 kDa), α -quimotripsina (25 kDa), y albúmina de suero bovino (BSA, por sus siglas en inglés) (66.43 kDa).

Mediante espectrometría de masas MALDI-TOF (Matrix-assisted laser desorption-Time of flight por sus siglas en inglés), en un espectrómetro Microflex Bruker, se determinaron los diferentes estados oligoméricos de las muestras a una concentración de 10 mg/mL. Los estándares para la calibración fueron: mioglobina (16.95 kDa), citocromo C (12.38 kDa), y BSA (66.43 kDa). La matriz usada fue una solución saturada de ácido sinapínico en acetonitrilo al 40% (v/v), y ácido trifluoroacético al 0.1% (v/v). Las muestras se analizaron con el software Flex analysis 3.0™ de Bruker y editados en el software de acceso libre mMass (Strohalm *et al.* 2010).

Producción de anticuerpos monoclonales IgG e IgE a partir de un modelo murino

Cinco ratones hembra Balb/c de ocho semanas de edad fueron inmunizados con 50 μ g de rHev b 8 los cuales fueron absorbidos en 200 μ L de alúmina ($Al(OH)_3$) o emulsificados con adyuvante incompleto de Freund's, de acuerdo al siguiente esquema (Tabla 3). El Protocolo con ID 98, fue aprobado por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) del Instituto de Investigaciones Biomédicas-UNAM.

Tabla 3. Esquema de inmunización con el alérgeno rHev b 8.

Día	Vía de administración	Dosis
0	Subcutánea	50 μ g
15	Subcutánea	50 μ g
30	Subcutánea	50 μ g
45	Subcutánea	50 μ g
60	subcutánea	50 μ g
4 semanas de espera		
3 días antes de la fusión	Intraperitoneal * Sin adyuvante	25 μ g

Al final del esquema y tres días antes del proceso de fusión, se administraron dos inmunizaciones con 25 μ g del alérgeno en PBS. Al final del esquema de inmunización, el suero

de los ratones fue evaluado por ELISA para determinar los niveles de IgE e IgG producidos usando un anticuerpo monoclonal de rata anti-IgE-ratón (específico para cadena épsilon) marcado con peroxidasa de rábano (HRP por sus siglas en inglés) (Abcam Inc. Cambridge, U.K.) y un anticuerpo policlonal de cabra anti-ratón IgG H+L marcado con HRP (Pierce Thermo-scientific, IL, USA). Los ratones con la respuesta positiva más alta fueron seleccionados para la fusión.

Las células de hibridoma fueron derivadas a partir de la fusión celular de una línea de mieloma de ratón P3X63Ag8.653 y las células del bazo de los ratones que fueron seleccionados de la inmunización en una relación 1:5 respectivamente en la presencia de 41% de poli-etilenglicol (PEG) 1550. Las células de la fusión fueron sembradas en placas de 96 pozos de fondo plano en una densidad de 1×10^5 células en medio RPMI-1640 y fueron seleccionados usando medio HAT (Hipoxantina-aminopterina-timidina) (Eshhar 1985). Diez días después de la fusión, los sobrenadantes de los hibridomas fueron evaluados por ELISA para corroborar la presencia de anticuerpos IgE e IgG, con reconocimiento específico a rHev b 8, utilizando los anticuerpos secundarios descritos anteriormente. El resultado de la selección fue el aislamiento de un hibridoma secretando un anticuerpo tipo IgE y varios hibridomas secretando IgG, los cuales fueron clonados por dilución limitante. El isotipo de los anticuerpos monoclonales fue determinado usando el kit mouse immunoglobulin isotyping (Invitrogen, CA, USA).

La producción de anticuerpos monoclonales se realizó creciendo las células de los hibridomas en medio RPMI-1640, suplementado con L-glutamina, y 3% de suero fetal bovino (SFB) en una atmósfera húmeda a 37°C con 5% de CO₂. Los anticuerpos fueron purificados a partir del sobrenadante colectado para cada una de los hibridomas seleccionados. Este sobrenadante se centrifugó a 2000 g durante 20 min, se filtró por una membrana de 0.22 µm y se aplicó a una columna de afinidad a rHevb 8 unido a una resina Affi-gel 15 (Biorad, CA, USA). Dicha columna se preparó usando las instrucciones del proveedor y equilibrando con amortiguador PBS. La elución de los anticuerpos se realizó mediante el cambio de pH utilizando un amortiguador de glicina-HCl 0.2 M pH 2.8 y aumentado la fuerza iónica con gradientes de NaCl hasta 1M. Las muestras fueron recibidas en fracciones de Tris HCl 2.0 M pH 8.0 (0.2mL) para neutralizar el pH. La pureza de los anticuerpos fue verificada por geles SDS-PAGE. Los anticuerpos monoclonales purificados se dializaron contra PBS, se concentraron a 1 mg/mL y

se almacenaron a -20 °C. La concentración fue determinada de acuerdo al isotipo de anticuerpo, para los IgG se utilizó un coeficiente de extinción de ($A_{280nm}^{0.1\%}$) 1.4 mL mg⁻¹ cm⁻¹ (por convención) y para el anticuerpo IgE se utilizó un coeficiente de extinción de ($A_{280nm}^{0.1\%}$) 1.62 mL mg⁻¹ cm⁻¹ calculado a partir de un IgE anti-DNP murino (Liu F T *et al.* 1980). Todos los procedimientos fueron realizados a 4 °C.

Cinética de unión de los diferentes anticuerpos a rHev b 8 y rZea m 12 usando interferometría de bicapa (Biolayer interferometry, BLI)

Para determinar la afinidad de los anticuerpos monoclonales por los alérgenos rHev b 8 y rZea m 12 se realizaron diferentes cinéticas de titulación, usando bio-sensores de estreptavidina en un sistema de interferometría de biocapa HTX Red96 Octet (FortéBio Inc., CA, USA). Los alérgenos se biotinilaron en condiciones libres de grupos amino, por lo que ambas proteínas fueron dializadas en un amortiguador MOPS 0.1 M pH 7.2, el exceso de los grupos éster reactivos fue bloqueado con la adición de etanolamina y eliminados por diálisis extensa para eliminar las moléculas pequeñas. El primer paso en los ensayos de unión por interferometría consiste en establecer una línea base usando sólo amortiguador PBS pH 7.4 tween 20 0.05%, BSA al 0.5% y 1M NaCl por 60 seg. En el segundo paso se une el alérgeno biotinilado al sensor de estreptavidina por 300 seg activándolo, se lava con el amortiguador usado en el primer paso para eliminar el pegado inespecífico y se genera una nueva línea base. El siguiente paso consiste en determinar la constante de asociación (k_a) de cada uno de los anticuerpos monoclonales purificados y seleccionados con base en su reconocimiento a profilina, al alérgeno unido al biosensor usando al menos cinco diferentes concentraciones del Ab. El tiempo de captura de datos puede variar para cada anticuerpo. El último paso, que consiste en determinar la constante de disociación (k_d) del complejo alérgeno-anticuerpo, presenta tiempos de adquisición de datos más largos y las condiciones pueden variar de acuerdo a la afinidad de la unión. BSA fue usada como control negativo y un nuevo biosensor de estreptavidina se usó para cada experimento. Los datos fueron procesados en el software FortéBio Data Acquisition, usando un ajuste global apropiado para la unión (modelo 2:1). Todos los experimentos se realizaron a 25 °C.

Reconocimiento de rHev b 8 y rZea m 12 por anticuerpos monoclonales murinos e IgE humanas a través de ELISA indirecta

Los experimentos se realizaron en microplacas de 96, las cuales fueron sensibilizadas utilizando 100 μ L del alérgeno en PBS pH 7.4 a una concentración de 8 μ g/mL, por cada pozo durante 2 hrs a 37 °C. Transcurrido este tiempo, los pozos se lavaron con PBS + 0.1% tween 20 (amortiguador de lavado), y se bloquearon con PBS, 1% BSA por 2 hrs a 37 °C. Los anticuerpos primarios (suero de pacientes y anticuerpos monoclonales) se diluyeron en PBS de acuerdo al objetivo de cada experimento como se describe a continuación:

- Determinación de IgE en suero de pacientes dilución 1:10
- Determinación de IgG4 en suero de pacientes dilución 1:20
- Los anticuerpos monoclonales murinos anti-profilina se utilizaron en diferentes concentraciones usando como mínimo 2 μ g/mL

Se agregaron 100 μ L de cada anticuerpo primario por pozo y se incubaron por 3 hrs a 37 °C. Después del tiempo de incubación se lava la placa con amortiguador de lavado tres veces. Dependiendo el anticuerpo primario utilizado se usaron los siguientes anticuerpos secundarios marcados con HRP.

- IgE en suero de pacientes, se utilizó un anticuerpo anti-IgE cadena- ϵ específico humano producido en cabra marcado con HRP (Sigma-Aldrich, MO, US)
- IgG4 en suero de pacientes se utilizó un anticuerpo monoclonal murino anti-IgG4 Fc humano marcado con HRP (Abcam Inc., MA, US)
- IgE en suero de ratones e identificación de hibridoma se utilizó un anticuerpo monoclonal murino anti-IgE Fc ϵ específico (Abcam Inc., Cambridge, U.K.)
- IgG en suero de ratones e identificación de Hibridomas de los mAbs monoclonales se utilizó un anticuerpo de cabra anti-IgG murino Cadena H+L marcado con HRP (Pierce Thermo-scientific, IL, US)

Los anticuerpos secundarios marcados se incubaron durante 1 hr a 37°C. La reacción de peroxidasa se desarrolló usando ABTS (Invitrogen, CA, USA) como sustrato, del cual se agregaron 100 μ L, se dejó durante 20 min. y se realizó la lectura a 405 nm en un lector de placas

(BioTek Instruments Inc, VT, US). Cada valor de absorbancia fue calculado del promedio de tres experimentos independientes, así como la desviación estándar. El suero de individuos alérgicos y los controles (no-alérgicos) fue proporcionado por el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias “Ismael Cosío Villegas” (INER), Ciudad de México; con la aprobación de un protocolo interno de ética de la institución y el consentimiento de los individuos que participaron.

Ensayos de competencia entre los anticuerpos monoclonales por el alérgeno rHev b 8

Mediante ELISA de competencia entre los anticuerpos monoclonales obtenidos se determinó si existe un efecto sinérgico entre ellos. Para este objetivo se realizó la sensibilización con 100 μL alérgeno rHev b 8 a una concentración de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (0.71 μM) en placas de 96 pozos y se bloqueó con 150 μL de albúmina al 1%. En tubos Eppendorf por separado se mezclaron concentraciones equimolares (1 μM , un exceso de la concentración del alérgeno), de la combinación por pares de los anticuerpos monoclonales (36 combinaciones) como control se realizó una muestra con el doble de concentración de cada anticuerpo y un control individual de cada mAb como control positivo y referencia. Los pasos subsecuentes son los de la ELISA indirecta como se describió anteriormente.

Por BLI se realizó la caracterización de la unión de los mAbs IgG seleccionados para corroborar los datos obtenidos por ELISA y determinar el tipo de unión que predomina en la interacción por el alérgeno. Para ello se realizó el procedimiento como se indica en la cinética de unión ocupando una concentración equimolar, 125 nM del alérgeno y 125 nM para cada mAb en amortiguador PBS pH 7.4 + 0.5% BSA + 0.05% tween 20. Se realizó la unión del alérgeno biotinilado al biosensor de streptavidina (300 seg) se genera una línea base (100 seg) y la primera unión con un mAb (500 seg), enseguida un tiempo de estabilización (100 seg) y para finalizar la interacción del segunda mAb (500 seg) y una disociación de (100 seg). Los datos fueron procesados con el software FortéBio Data Acquisition.

Ensayos de inhibición de los mAbs-anti profilina sobre de la respuesta por anticuerpos del suero de pacientes

La inhibición se realizó con una mezcla del suero de 20 individuos con historia de alergia y por ELISA fueron positivos para IgE y IgG4 específica a profilina. La sensibilización de los pozos se realizó con 100 μ L alérgeno rHev b 8 a una concentración de 10 μ g/mL (0.71 μ M) y se bloqueó con 150 μ L de albúmina al 1%. Se realizó una primera incubación con los anticuerpos monoclonales (1B4, 1G4, 2D10, 4B2, 4C4 y 2F5) con un exceso del doble de la concentración molar del alérgeno, de forma individual y con una combinación por pares de ellos (15 combinaciones) durante 1 hr a 37 °C con agitación constante. Se realizaron tres lavados de las placas para retirar el exceso de anticuerpo. Después de los lavados se agregaron 100 μ L del suero de los individuos en dos diluciones, para IgE 1:5 en PBS pH 7.4 y para IgG4 en una dilución 1:25, se incubaron durante 2 hrs a 37 °C. Los pasos subsecuentes son los mismos que para la ELISA indirecta descrita anteriormente utilizando los anticuerpos secundarios dependiendo el isotipo de anticuerpo humano a monitorear.

Por BLI se realizó la biotilación de los alérgenos y se probaron los anticuerpos monoclonales derivados de la última selección por ELISA. El amortiguador es PBS pH 7.4, 0.5% BSA, tween 20 0.05%. El experimento se diseñó de acuerdo al esquema de la figura 8. Se realizó la unión del alérgeno biotilado al biosensor de estreptavidina (300 seg) se genera una línea base (100 seg), la primera unión con un mAb inhibidor (200 seg), enseguida un tiempo de estabilización (200 seg) y por último la interacción del suero de individuos con alergia específica a profilina (800 seg) y una disociación de (100 seg). Se realizaron al menos tres repeticiones de cada experimento. Los datos fueron procesados con el software FortéBio Data Acquisition. Los tiempos de unión, línea base, disociación son los mismos para todos los ensayos y el control positivo es la respuesta del suero sin la unión de los mAbs. Como controles del experimento se probó una mezcla del suero de individuos sin historia de alergia a profilina. también se probó el biosensor de estreptavidina sin unir al alérgeno biotilado para corroborar que no hubiese pegado inespecífico del suero.

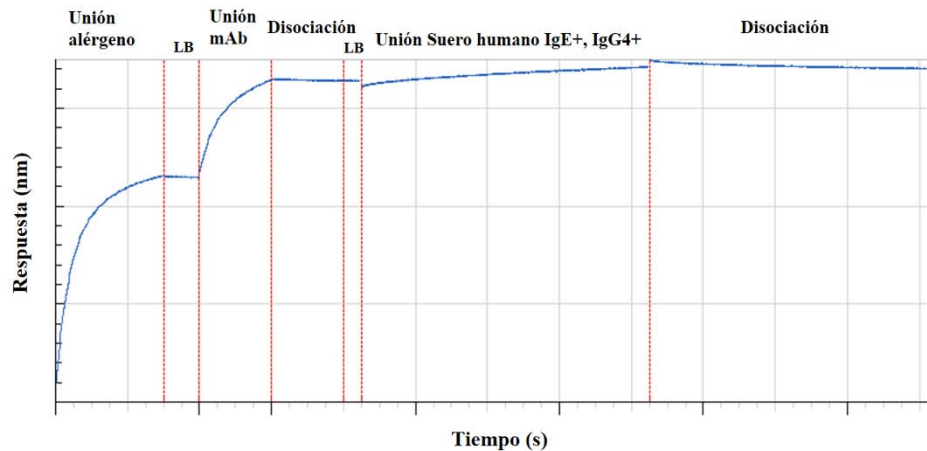


Figura 8. Esquema del experimento de inhibición para el suero de pacientes por BLI.

Ensayos de competencia mediante ELISA entre monómeros/dímeros de rHes b 8 y rZea m 12

Las competencias entre monómeros y dímeros de profilina se realizaron utilizando una mezcla de suero de pacientes alérgicos a profilina y los anticuerpos monoclonales. Los pozos se sensibilizaron con los alérgenos en su estado monomérico a una concentración 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y se bloquearon con 1 % BSA en PBS. En tubos por separado la mezcla del suero de pacientes (diluido 1:10 en PBS/0.1 % BSA/0.05% Tween 20) y los anticuerpos monoclonales en una concentración (0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) fueron incubados con diluciones seriales de los alérgenos en su forma dimérica y como control positivo la forma monomérica del alérgeno por 1 hr a 37 °C, en todos los casos la albúmina corresponde al control negativo. Después de este tiempo se tomaron 50 μL de las muestras incubadas y se adicionaron a los pozos de las placas previamente sensibilizadas durante 1 hr a 37 °C. El resto del procedimiento se llevó a cabo como en un experimento de ELISA.

Interacción de los receptores Fc ϵ RI de las células RBL (rat basophilic leukemia cells) con los anticuerpos monoclonales IgE

Mediante citometría de flujo se determinó el reconocimiento de los receptores Fc ϵ RI, que expresan las células RBL-2H3 en su superficie, por los anticuerpos monoclonales IgE mAb 2F5 y como control positivo se usó un anticuerpo antidinitrofenol IgE (SPE) el cual se une a los receptores de dichas células. Se utilizó un anticuerpo anti Ig murino H+L marcado con isotiocianato de fluoresceína (FITC, por sus siglas en inglés). En placas de 96 pozos de fondo U

se agregaron tres diferentes diluciones de los anticuerpos monoclonales IgE (mAb 2F5 o SPE) en 100 μ L. Previamente se crecieron las células RBL-2H3 en medio mínimo Eagle's con sales de Earle's (MEM) suplementado con 10% de suero fetal bovino, las células se recolectaron, se contaron y se lavaron en amortiguador A (PBS, SFB 5%, azida de sodio 0.1%). Se realizó una incubación de las células en hielo por 5 minutos y se resuspendieron con el amortiguador A en una concentración de 4×10^5 células en 100 μ L/tubo. Esta suspensión de células se colocó en las placas de 96 pozos en U con el primer anticuerpo y se incubó en hielo entre 30 min a 1 hr con agitación ocasional. Después de este tiempo se lavaron tres veces las células con 200 μ L del amortiguador A, centrifugando a 2000 rpm por 3 min durante cada lavado. Se agregó el anticuerpo anti Ig murino H+L marcado con FITC (Abcam Inc. Cambridge, U.K.), en una dilución 1:400 en 300 μ L de amortiguador A, se incubó durante 30 min en hielo (protegido de la luz) con agitación adicional. Terminado este tiempo se lava dos veces con 200 μ L del amortiguador A y una vez con PBS frío. Las células se resuspenden en 200 μ L de amortiguador B (PBS, paraformaldehído 1%), se incuban por 20 min en hielo protegido de la luz. Por último, se lavaron con PBS frío y se resuspendieron en 200 μ L de PBS, las muestras se transfirieron a viales de 0.5 mL para leer en un equipo FACSCALIBUR utilizando láser azul (488nm) con un filtro en el canal FL-1 (515-545 nm), los datos obtenidos se procesaron utilizando el software Attune® Cytometric, version 1.2.5 de Appliedbiosystems.

Degranulación en basófilos (RBL-2H3) determinada por la liberación de la enzima β -hexosaminidasa

Las células efectoras de la respuesta mediada por IgE contienen en sus gránulos un conjunto de diferentes mediadores, entre ellos la enzima β -hexosaminidasa, la cual fue monitoreada por su actividad para estos ensayos. Las células de basófilos fueron sembradas en placas de cultivo de 96 pozos en una densidad de 1×10^5 células en 100 μ L de medio mínimo Eagle's con sales de Earle's (MEM) suplementado con 10% de suero fetal bovino, y se incubaron por 5 hrs en una atmosfera húmeda a 37 °C con 5% de CO₂. Las células fueron sensibilizadas con la IgE monoclonal (mAb 2F5) y con la IgE monoclonal anti-DNP como control positivo, por separado utilizando 50 μ L a 2 μ g/mL en medio MEM por pozo durante 12 hrs en atmosfera húmeda a 37 °C con 5% CO₂. Las monocapas de células fueron lavadas tres veces con amortiguador Tyrode's

para eliminar el exceso de los anticuerpos con el que fueron sensibilizadas. Los alérgenos fueron adicionados en diferentes concentraciones hasta determinar el máximo de la respuesta de degranulación seguido por la actividad enzimática de la β -hexosaminidasa. Los controles positivos utilizados se probaron como un indicador de activación a través del entrecruzamiento de los receptores para medir la degranulación. Para ello se utilizaron un anticuerpo monoclonal de ratón anti- Fc ϵ RI (F4) (Ortega *et al.* 1988) (en células no sensibilizadas), el anticuerpo anti-IgE H&L, cuando se sensibilizó con los anticuerpos monoclonales IgE (mAb2F5 anti-Hev b 8 y SPE-anti-DNP) y éstos estaban unidos al receptor Fc ϵ RI de las células RBL. La actividad total de la enzima β -hexosaminidasa fue determinada por el contenido total de la enzima en las células que fueron tratadas con el amortiguador de lisis (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, y 1% Triton X-100 pH 7.5 con un coctel de inhibidor de proteasas). La profilina de maíz (rZea m 12) se utilizó como control negativo, ya que no es reconocida por el mAb 2F5. Después de los tratamientos indicados para cada experimento, el estímulo para la degranulación se dejó durante 30 min. a 37 °C. Se tomaron tres alícuotas de 25 μ L de cada pozo, se transfirieron a una placa por separado y se adicionaron 50 μ L de solución con el sustrato (1.3 mg/mL de p-nitrofenil-N-acetil- β -D-glucosamina en citratos 0.1 M pH 4.5) las placas se incubaron durante 90 min. a 37 °C. La reacción se detuvo con 150 μ L de glicina 0.2 M pH 10.4, y se determinó la absorbancia a 405 nm en un lector de placas. Los resultados se expresaron como el porcentaje del total de la actividad enzimática β -hexosaminidasa presente en las células. La liberación espontánea en ausencia de estímulo fue restada del valor promedio de cada experimento.

Análisis estadístico de los datos experimentales

Los análisis estadísticos de los datos de ELISA y de la degranulación se realizaron usando el análisis de varianza de una vía (ANOVA), seguido por un procedimiento de comparación múltiple entre todos los pares (método Holm- Šídák). Un valor de $P < 0.05$ fue considerado estadísticamente significativo. El análisis estadístico se realizó con el software SigmaPlot 12.0.

Resultados y Discusión

Clonación y expresión de los genes codificantes para rHev b 8 y rZea m 12

El cDNA fue amplificado a partir del RNA mensajero, extraído de las hojas del árbol del hule (*Hevea brasiliensis*), como describe Martínez-Caballero *et al.* 2014 y de hojas de Maíz (*Zea mays*), como se muestra en la Figura 9A. A partir del cDNA y con los cebadores diseñados para ambos genes se obtuvieron los productos que migraron aproximadamente a 400 pb (Fig. 9B). Estos fueron secuenciados, corroborando la presencia de dos profilinas: una profilina que pertenece a *H. brasiliensis* (Hev b 8.0102) y otra a *Z. mays* (Zea m 12.0105), ambas profilinas se encuentran en diferentes tejidos de la planta, así como en el polen por lo que son consideradas constitutivas.

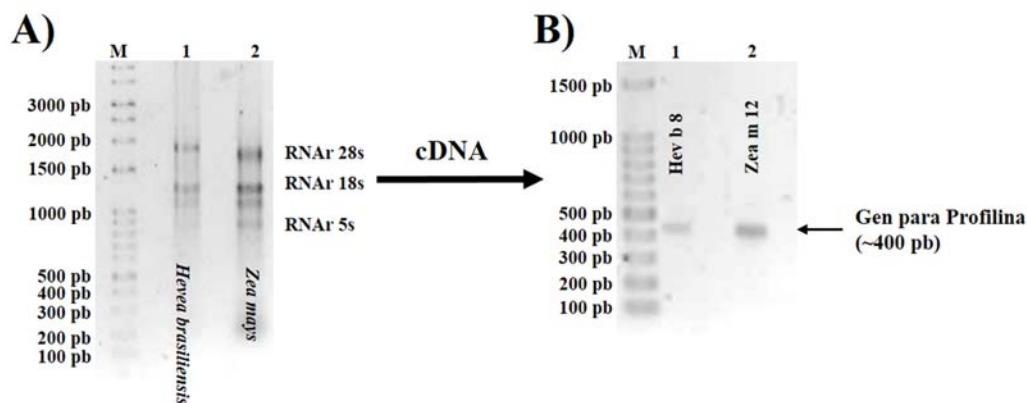


Figura 9. Obtención del RNA y amplificación con cebadores específicos para los genes de profilina. Geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio. **A)** carril 1: corresponde al RNA_{Total} extraído de *H. brasiliensis* y carril 2: corresponde al RNA_{Total} de *Z. mays*. **B)** Carril 1: Gen para Hev b 8 y en el carril 2: gen para Zea m 12.

Ambos genes Hev b 8 y Zea m 12 se clonaron en el vector pET28 c, utilizando dos construcciones diferentes, variando el sitio de corte con proteasa para eliminar el tallo de histidinas. Las condiciones de sobreexpresión fueron optimizadas en la cepa *E. coli* Rosseta como se muestra en la figura 10 para las fracciones solubles de ambas cinéticas.

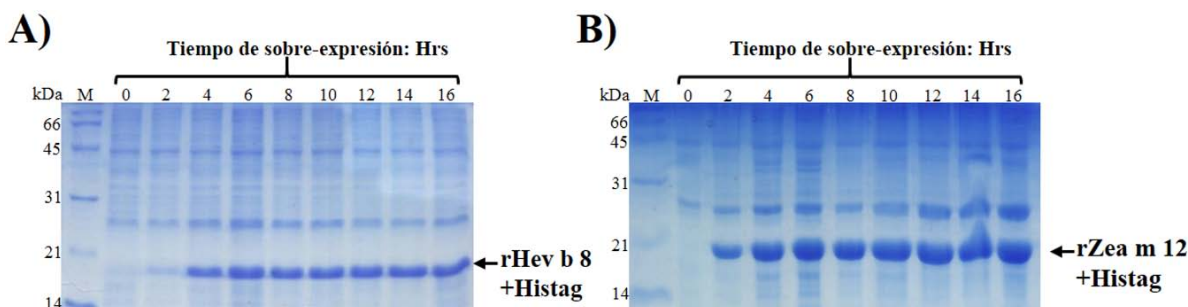


Figura 10. Cinética de sobre-expresión de los alérgenos A) rHev b 8 y B) rZea m 12. Electroforesis en geles SDS-PAGE al 12 %. M corresponde al marcador de peso molecular.

Se obtuvo una buena sobre-expresión de ambas proteínas con solo 6 hrs después de la inducción, sin observar cambios a tiempos más largos. Una parte de la proteína se va a cuerpos de inclusión, sin ser significativa en las primeras 12 hrs.

El análisis de secuencias de ambas proteínas muestra una identidad del 79 % con cambios más evidentes en regiones no conservadas (Fig. 11). La figura 2 del anexo 1 muestra un análisis comparativo de las secuencias de todas las profilinas de plantas reportadas como alérgenos, donde se aprecia un alto grado de conservación en esta familia de proteínas principalmente en las regiones amino y carboxilo terminal.

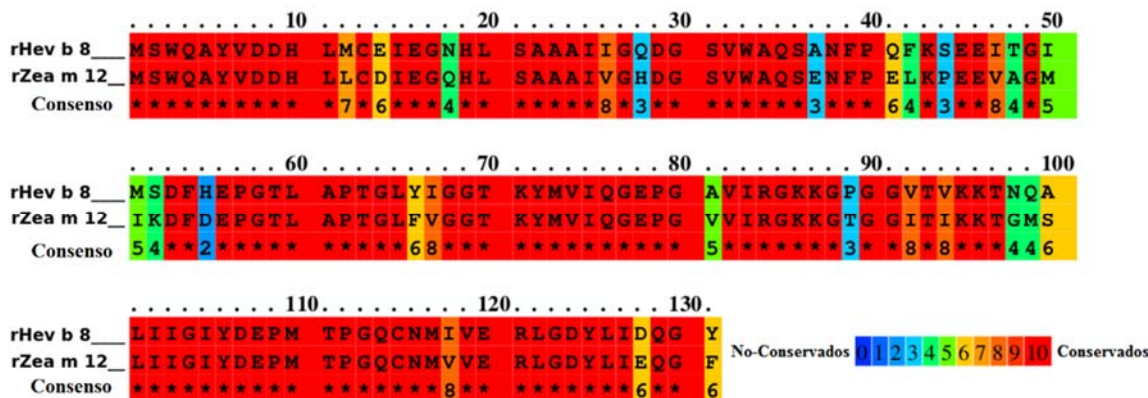


Figura 11. Alineamiento de secuencias para los alérgenos rHev b 8. 0102 y rZea m 12. 0105. Se utilizó el servidor PRALINE el índice de conservación va de azul a rojo como no conservado a conservado, respectivamente.

Es importante resaltar que los cambios encontrados entre las diferentes isoformas de profilina en una especie son resultado del polimorfismo que existe en esta familia de proteínas (Jimenez-Lopez *et al.* 2013). Sin embargo, éstas poseen residuos altamente conservados y que son importantes para el mantenimiento de su estructura tridimensional, de acuerdo a las estructuras depositadas en el PDB. También se han definido regiones que son determinantes

para la interacción con sus ligandos naturales como son la actina, la poli-L-prolina, así como el PIP_2 y que debido al polimorfismo pueden existir diferencias sutiles entre isoformas, que no modifican las características de estas regiones, las cuales se mantienen aún entre diferentes especies. Sin embargo, el caso más representativo es el de reconocimiento de PIP_2 debido a que los residuos que pueden ser modificados por cinasas, se encuentran presentes en estas regiones de alta variabilidad.

Purificación y cristalización de los alérgenos rHev b 8 y rZea m 12

La expresión fue similar para ambos alérgenos teniendo un rendimiento de ~40 mg por litro de cultivo. Se utilizaron dos construcciones diferentes para ambas profilinas, lo que implicó cambiar el sitio de corte utilizando EKmax para rHev b 8 y TEV para rZea m 12. La purificación de rHev b 8 tuvo una eficiencia de corte del 50% utilizando una relación (1:50, enzima : proteína), por otra parte para rZea m 12 tuvo una eficiencia del 100% utilizando la misma relación de enzima : proteína. Por lo tanto, el sistema que mejor funcionó fue el utilizado para rZea m 12 y requirió menos pasos de purificación. Este sistema sólo deja una glicina en el amino-terminal por el sitio de corte TEV, que no afecta el plegamiento o función de la proteína. La purificación de ambos alérgenos se muestra en los geles SDS-PAGE de la figura 12.

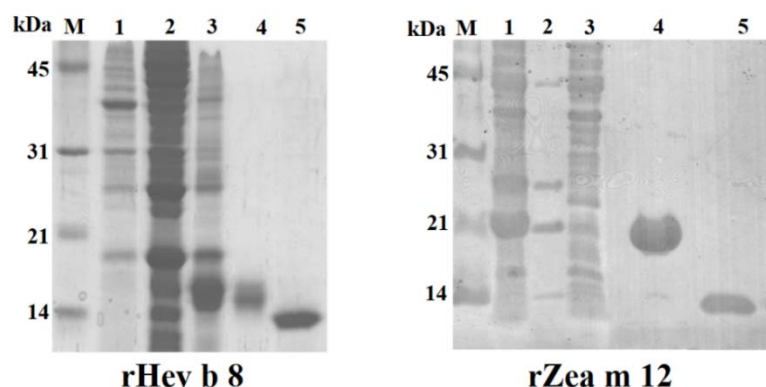


Figura 12. Purificación de los alérgenos recombinantes rHev b 8 y rZea m 12. Gel SDS-PAGE al 12 %. Izquierda: purificación de rHev b 8, carril 1: lavado inespecífico, carril 2: extracto total, carril 3: primer lavado de la columna, carril 4: lavado final de rHev b 8+histag y carril 5: después del corte con la enzima enterocinasas. Derecha: purificación de rZea m 12, carril 1: extracto total, carril 2: primer lavado, carril 3: lavado inespecífico, carril 4: lavado final de rZea m 12+histag y carril 5: después del corte con la enzima TEV.

Los experimentos de cristalización se realizaron a partir de las condiciones iniciales encontradas para el alérgeno rHev b 8 (Tris-HCl 50 mM pH 8, 2.0M de sulfato de amonio) en la que se obtuvieron cristales que difractaron a 3.0 Å de resolución. Esta condición fue

optimizada, realizando variaciones de pH, concentración del agente precipitante y concentración de las proteínas. Los cristales optimizados presentaron mejor calidad y tamaño, como se muestra en la figura 13.

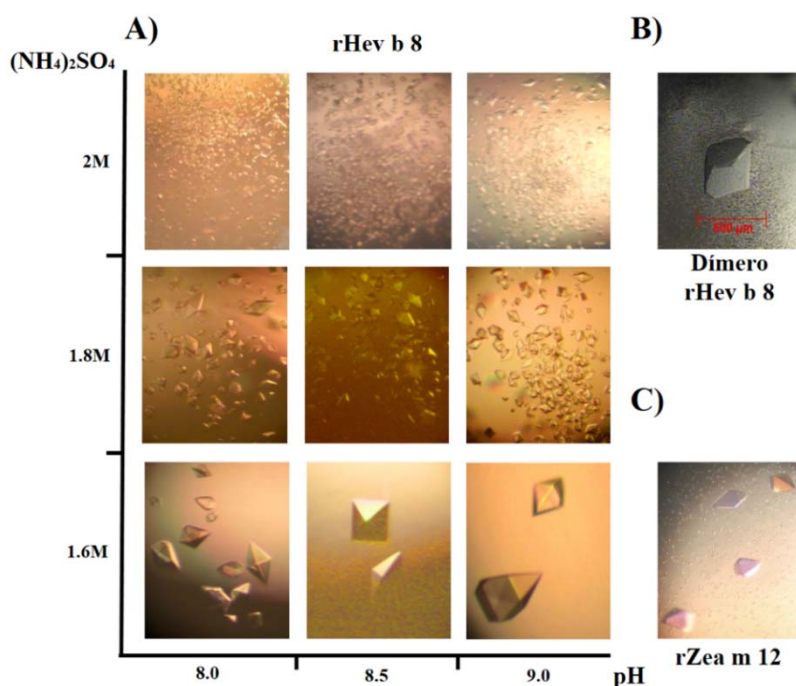


Figura 13. Optimización de los cristales del alérgeno profilina. **A)** Cristales de rHev b 8 variando la concentración de agente precipitante y pH. **B)** Cristal del dímero de rHev b 8. **C)** Cristales de rZea m 12.

Determinación y análisis de la estructura 3D de los alérgenos rHev b 8 y rZea m 12

Para caracterizar los cristales se colectaron datos de difracción de rayos X de algunos de ellos. El mejor resultado se observó para los cristales obtenidos a pH 9, con una influencia positiva al disminuir la concentración del agente precipitante (1.6 M de sulfato de amonio) ya que difractaron a 1.8 Å de resolución. La misma condición se usó para cristalizar a la profilina de maíz (rZea m 12), y los cristales difractaron a 2.2 Å. Sin embargo, para rHev b 8 como dímero se obtuvo un solo cristal a una concentración de 10 mg/mL, que difractó a 2.8 Å. Este cristal contenía dos moléculas en la unidad asimétrica unidas por un puente disulfuro que se establece con la Cys13 de cada monómero, en un arreglo estructural no reportado antes para esta familia de proteínas.

Con los datos de rayos X colectados a partir de los cristales antes mencionados se determinó la estructura tridimensional de los alérgenos y los datos estadísticos del

procesamiento y el afinamiento se muestran en la tabla 4, donde se incluyen los códigos PDB para cada una de las estructuras.

Tabla 4. Datos estadísticos del procesamiento de los datos de difracción de rayos X y del afinamiento de las estructuras.

	rHev b 8 Dimérico	rHev b 8 Monomérico	rZea m 12 Monomérico
Código PDB	5FEG	5FDS	5FEF
Colecta de datos			
Grupo espacial	P3 ₂	P4 ₃ 2 ₁ 2	P4 ₃ 2 ₁ 2
Dimensiones de celda			
<i>a, b, c</i> (Å)	58.56, 58.56, 87.34	59.04, 59.04, 132.89	58.53, 58.53, 135.20
γ (°)	120		
Resolución (Å)	33.09-2.8 (2.95-2.8)*	33.22-1.9 (2.0-1.9)*	44.25-2.2 (2.32-2.2)*
No. reflexiones únicas	8077 (1168)	19125 (2665)	12489 (1745)
$R_{\text{merge}}^{\dagger}$ (%)	6.8 (47.5)	5.1 (44.7)	5 (48)
$I/\sigma I$	8.9 (2.1)	18.9 (3.7)	17.2 (3.2)
Completeness (%)	98.1 (97.6)	99.2 (98.2)	99.2 (98.2)
Redundancia	2.6 (2.5)	4.9 (4.9)	4.5 (4.6)
Factor B (gráfico de Wilson) (Å ²)	58.1	25.38	42.4
Afinamiento			
$R_{\text{work}}/R_{\text{free}}^{\ddagger}$	20.78/24.95	17.3/19.7	21.8/24.5
No. átomos	1914	1187	1073
Proteína	1914	1045	1011
Agua	-	131	32
Ligandos	-	11	30
RMS-enlaces (Å)	0.009	0.007	0.008
RMS-ángulos (°)	1.26	1.06	1.24
Mean <i>B</i> -factor (Å ²)	51.98	27.74	48.04
Proteína	51.98	26.29	47.13
Ligandos	-	65.85	78.73
Agua	-	36.11	48.11
Ramachandran			
favorecidos/Permitidos/No-favorecidos (%)	87/11/2	97/3/0	98/2/0

* La resolución más alta en la última capa, se muestra en paréntesis.

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

$\ddagger R_{\text{work}} = \sum_{\text{hkl}} \left(|F_{\text{obs}}| - |F_{\text{calc}}| \right) / \sum_{\text{hkl}} |F_{\text{obs}}|$. R_{free} es el valor R que corresponde a una selección del 5% del total de las reflexiones elegidas al azar y que están excluidas del afinamiento.

El plegamiento que muestran las estructuras de rHev b 8 (Código PDB: 5FDS) y rZea m 12 (Código PDB: 5FEF) corresponde al ya descrito para la familia de profilinas alfa-beta-alfa. Éste se encuentra compuesto por 3 hélices alfa, siete hebras beta que conforman una hoja beta anti-paralela, además de diez giros beta y tres asas (Fig. 14A). Como se muestra en el alineamiento de la cadena principal (C α) de ambos alérgenos (fig. 14B), la raíz cuadrada de la desviación media (rmsd) de ambas estructuras es de 0.27 Å. Sin embargo, las principales diferencias entre los modelos se encuentran en las cadenas laterales de los residuos (Fig. 14C),

que de acuerdo al análisis de secuencia realizado en el servidor PRALINE son parte de la región del asa más larga que conecta a la hebra- $\beta 2$ con la hélice- $\alpha 2$; estas dos secuencias son $^{37}\text{ANFPQFKSEEITGIMSDFH}^{55}$ para rHev b 8 y $^{37}\text{ENFPELKPEEVAGMIKDFD}^{55}$ para rZea m 12. Otros cambios significativos se encuentran en asas que conectan la hebra- $\beta 1$ con la hebra- $\beta 2$, la hebra- $\beta 5$ con la hebra- $\beta 6$ y ésta a su vez con la hebra- $\beta 7$.

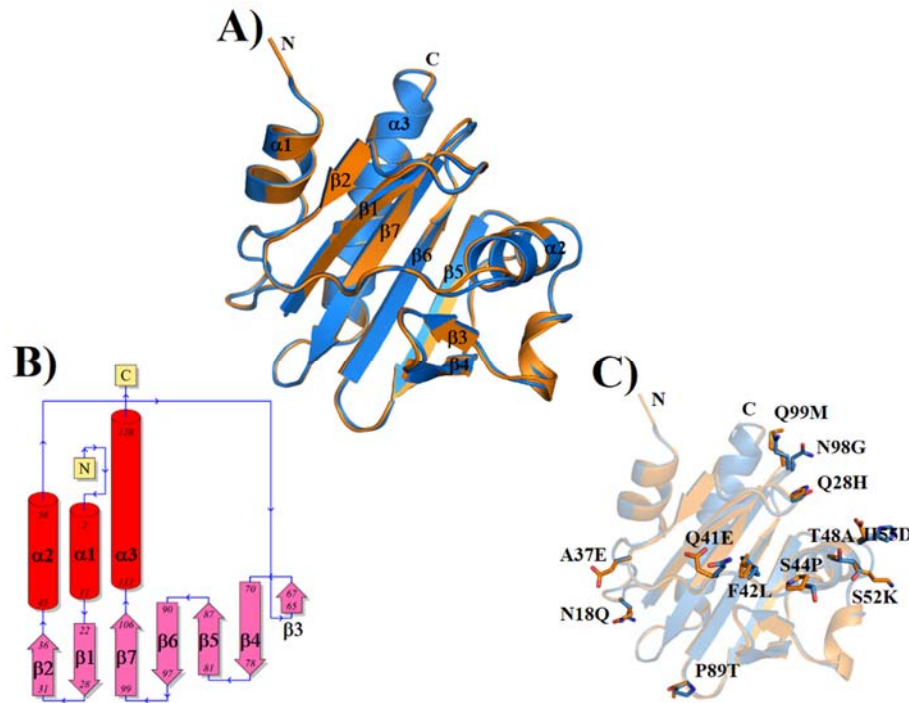


Figura 14. Alineamiento estructural de los alérgenos rHev b 8 y rZea m 12. **A)** Representación de listón del alineamiento de ambos alérgenos, rHev b 8 en azul y rZea m 12 en naranja donde se muestra el plegamiento característico y los elementos de estructura secundaria de ambos modelos. **B)** Conectividad entre los elementos de estructura secundaria de ambos alérgenos hebras- β en rosa, Hélices- α en rojo **C)** Cadenas laterales de los residuos diferentes en las dos estructuras.

Un aspecto importante es que la mayoría de los residuos que son diferentes en las secuencias de ambos alérgenos se encuentran expuestos al disolvente, en las proteínas plegadas, como se muestra en el cálculo de la entropía para un alineamiento múltiple de secuencias (120 secuencias) de profilinas de plantas realizado para cada una de las estructuras (Fig. 15A) (centro). Podemos observar que una de las regiones en las que existe mayor variabilidad en la conservación de residuos pertenece al fragmento que va de los residuos 37 al 55 en ambas secuencias. Además, se realizó un análisis del potencial electrostático en la superficie molecular en las dos estructuras para comparar cómo se afecta la carga debido a las contribuciones de los residuos, especialmente en la región donde observamos las diferencias en las secuencias. Como

se observa en la figura 15A (derecha), es evidente una distribución de carga negativa mayor para la profilina de maíz (rZea m 12) en dicha región. Esta familia de proteínas se caracteriza porque su estructura y función son muy conservadas en todos los organismos. Además, pueden presentar varias isoformas, que es una característica más frecuente en plantas, lo que las hace multifuncionales. Ambos análisis demuestran que las regiones relacionadas a su función, como la de unión a poli-L-prolina y la de unión a actina mantienen una alta conservación de residuos y una distribución de cargas similar (Fig. 15B y C).

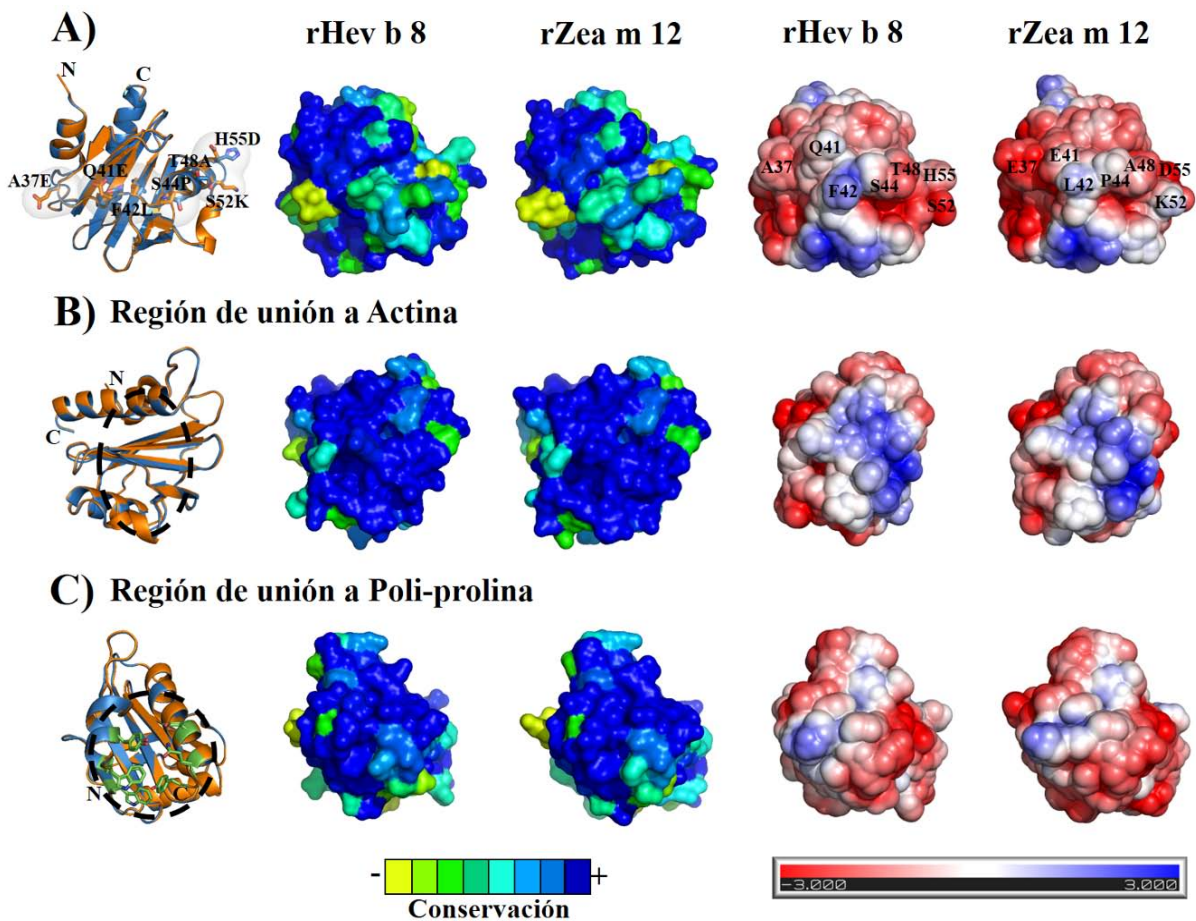


Figura 15. Comparación de las estructuras 3D de los alérgenos rHev b 8 y rZea m 12. **A)** Alineamiento de ambos alérgenos mostrando la región con más variabilidad (superficie transparente) y resaltando los residuos que son diferentes para ambas estructuras (Ala37-His55 en rHev b 8 y Glu37-Asp55 en rZea m12). Al centro se muestra una comparación por entropía de Shannon de un alineamiento múltiple entre 120 secuencias de profilina de plantas, donde el grado de variabilidad de los residuos va de amarillo (no conservado) a azul (conservado) y a la derecha un análisis del potencial electrostático de ambos alérgenos en la misma región. **B)** Región de unión a actina encerrada en un círculo, con el mismo análisis para ambos alérgenos. **C)** Región de unión a poli-L-prolina para profilinas de plantas (círculo), en verdes se muestran las cadenas laterales de los residuos conservados que participan en la unión en profilinas.

Es importante mencionar que en este trabajo se reporta por primera vez la estructura de un dímero de profilina (Fig. 16A, PDB: 5FEG), el cual se encontró en la unidad asimétrica del cristal con simetría trigonal (grupo espacial $P3_2$). El dímero se establece principalmente por la formación de un puente disulfuro intermolecular entre las Cys13 de ambos monómeros (Fig. 16B), sin modificar el plegamiento de la proteína, por el contrario, es a través de la simetría $C2$ que se presenta entre las dos moléculas que se favorecen interacciones adicionales entre los dos monómeros, las cuales fueron determinadas usando el servidor PISA. La región descrita para la interfaz tiene un área de 674.3 \AA^2 por cada monómero e involucra principalmente la región entre la hélice- $\alpha1$ y la hélice- $\alpha3$. Es relevante mencionar que la cisteína 13, mediante la cual se forma el puente disulfuro, está conservada en todas las profilinas de plantas (Jimenez-Lopez *et al.* 2012). Las interacciones más relevantes que se favorecen en el dímero se llevan a cabo entre los residuos Glu16, Gln114, Tyr125 y Gln129 (Fig. 16C), los cuales se encuentran conservados en ambos alérgenos y forman parte de la región de interacción con poli-L-prolina. Esta última se caracteriza por tener un ambiente hidrofóbico, debido la contribución de residuos aromáticos que se encuentran expuestos en esta región y que permiten la interacción con cinasas (Offermann *et al.* 2016). Por lo tanto, al formarse el dímero éste puede limitar la interacción con poli-L-prolina por impedimento estérico y actuar como un mecanismo de auto-regulación relacionado a la función de la proteína. De acuerdo con Aparicio-Fabre *et al.* 2006, la interacción de profilina con la fosfoinositol 3-quinasa podría afectar varias interacciones proteína-proteína, las cuales son importantes para la regulación de diversas funciones celulares como su actividad, localización subcelular, y asociación con otras proteínas involucradas en la regulación de la dinámica de actina y endocitosis, así como en otros procesos.

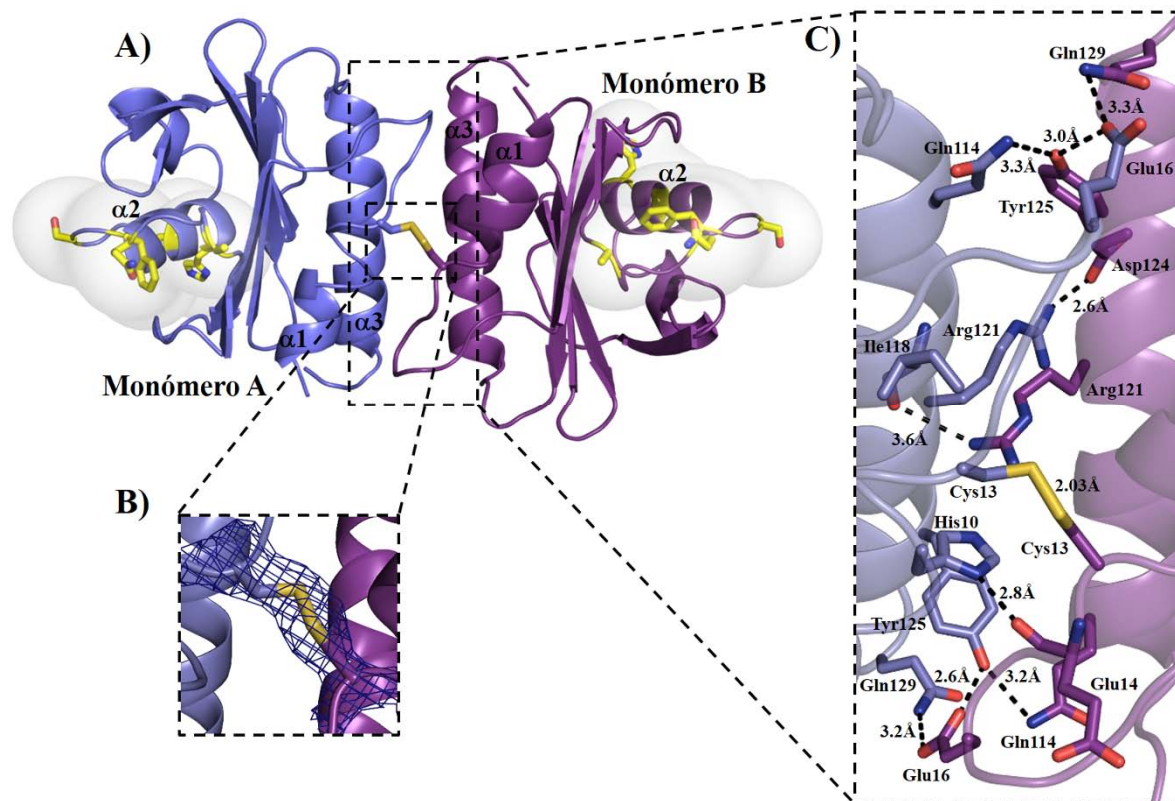


Figura 16. Análisis de la estructura cristalográfica del dímero de rHev b 8 ($P3_2$). **A)** Representación en listones de la estructura del dímero de rHev b 8, resaltado en superficie transparente la región con más variabilidad y en amarillo las cadenas laterales de los residuos de rHev b 8 que difieren con rZea m 12. **B)** Mapa de densidad electrónica $2Fo-Fc$ ($\sigma=1$), para el puente disulfuro entre las Cys13 en la interfaz del homo-dímero. **C)** Acercamiento de la región de la interfaz, donde se muestran las diferentes interacciones entre los residuos clave para la estabilización del dímero de rHev b 8.

El análisis del arreglo cristalino de rHev b 8 y rZea m 12 en sus formas monoméricas (grupo espacial $P4_32_12$), utilizando los servidores PISA y EPPIC, permitieron definir una interfaz similar a la formada por el dímero real. Este análisis se llevó a cabo también para varias estructuras de profilinas depositadas en el PDB. En la figura 17A se muestra como el empaquetamiento de los alérgenos rHev b 8 y rZea m 12 en el cristal permite el establecimiento de diferentes contactos con las moléculas relacionadas por simetría y éstos son los mismos en ambas estructuras. Un alineamiento de estos dímeros (Fig. 17B), en donde se incluye al monómero de la molécula relacionada por simetría, muestra que las interfaces formadas se ven favorecidas por un arreglo similar al descrito para el dímero, aunque no se establece el puente disulfuro. Cuando se realiza una búsqueda de estructuras de profilinas depositadas en el PDB, se encontró que las profilinas de levaduras (Códigos PDB: 1K0K, 1YPR, 3D9Y, 3DAV), otra isoforma de profilina de *Hevea brasiliensis* (Código PDB: 1G5U), así como las estructuras

reportadas en este trabajo (Códigos PDB: 5FDS y 5FEF), muestran el mismo arreglo (Fig. 17C), a pesar de que los cristales se obtuvieron en diferentes condiciones de cristalización y con diferentes grupos espaciales.

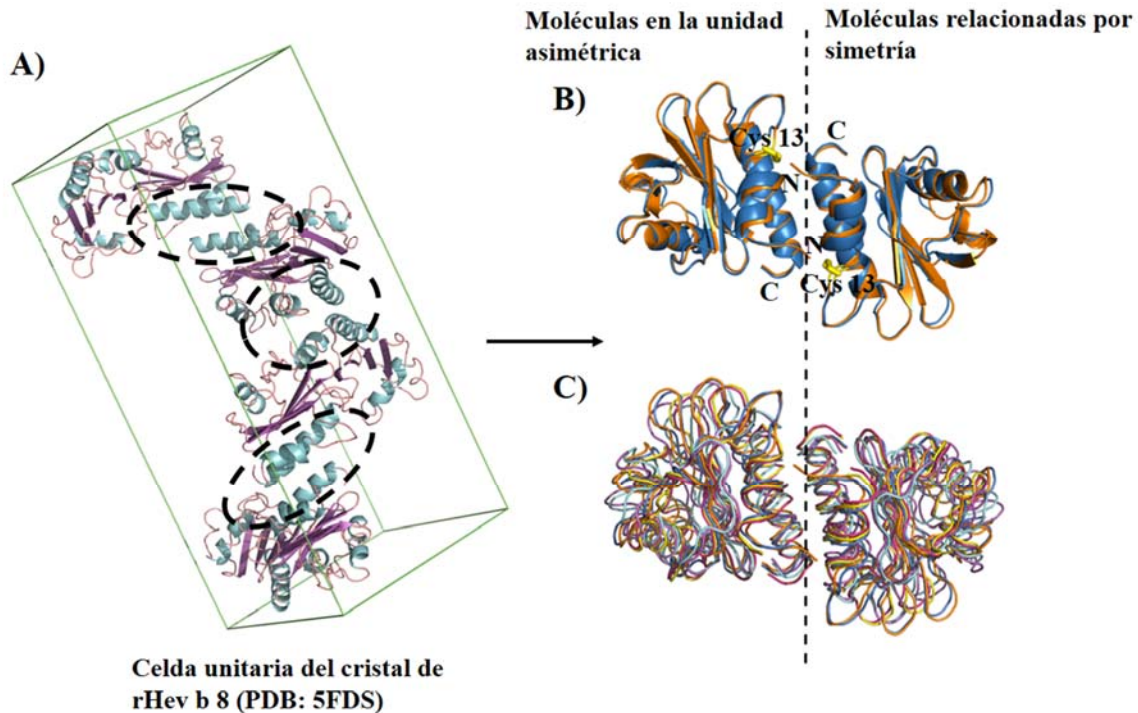


Figura 17. Análisis estructural de los dímeros de profilina formados con las moléculas relacionadas por simetría. **A)** Arreglo cristalográfico para rHev b 8 en la celda unitaria ($P4_32_12$), en círculos se muestran una interfaz similar a la del dímero observado en la celda unitaria del cristal con simetría $C2$. **B)** Alineamiento de la molécula de la unidad asimétrica con la molécula relacionada por simetría para el arreglo cristalográfico de ambos alérgenos. **C)** Alineamiento estructural múltiple observado en interfaces similares de profilinas monoméricas depositadas en el PDB.

Particularmente las profilinas de levadura no poseen la Cys13 que se encuentra conservada en plantas, por lo que su capacidad para interactuar entre ellas no depende de dicho residuo. Un análisis de las interfaces de los dímeros transitorios (Fig. 18) muestra que estos tienen un área en promedio de $\sim 500 \text{ \AA}^2$, que es un factor importante para la interacción en la formación de dímeros cristalográficos. La interfaz muestra un apilamiento entre los residuos aromáticos que comprenden esta región, principalmente una interacción de apilamiento entre la tirosina 125 de cada monómero, favorecido por la simetría del arreglo en el cristal, así como interacciones entre los residuos His10, Arg121, Tyr125 Asp128/Glu128, para ambos alérgenos (rHev b 8 y rZea m 12). Por lo tanto, podríamos proponer que la formación de dímeros transitorios en la familia de las profilinas, es un fenómeno que se ve favorecido cuando

la concentración de la proteína se incrementa, permitiendo las interacciones en regiones conservadas entre ellas, en un sistema dinámico entre las cadenas laterales de los residuos. Existen otras interfaces que se ven favorecidas en los arreglos cristalinos, y que explicarían la presencia de formas oligoméricas más complejas, sin embargo, se necesitan más datos experimentales para corroborar su formación.

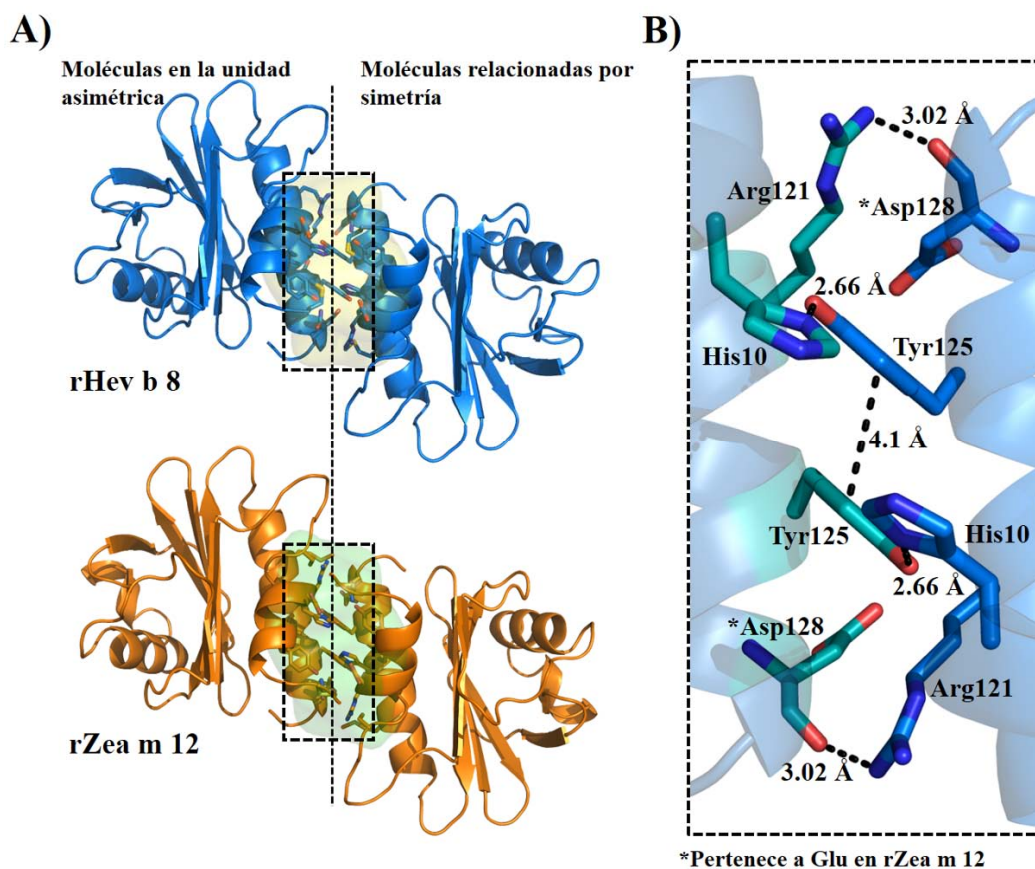


Figura 18. Análisis de la interfaz de los dímeros transitorios en profilinas. **A)** Representación en listones del dímero transitorio designado por el servidor EPPIC para ambos alérgenos. **B)** Acercamiento de la interfaz promedio del dímero transitorio de ambas estructuras, donde se muestran las principales interacciones entre los residuos, calculados con el servidor PISA.

Caracterización del proceso de oligomerización en profilina

La oligomerización de las profilinas se ha caracterizado en otros trabajos mediante geles SDS-PAGE, en condiciones reductoras y no reductoras o mediante cromatografía de exclusión analítica por HPLC (Wopfner *et al.* 2002). A la fecha no existen reportes sobre el tipo de interacciones que se establecen entre los residuos que forman estos oligómeros y tampoco se había propuesto el tipo de fenómenos que dirigen el auto-ensamblaje en esta familia de proteínas. En este trabajo se separaron estas formas oligoméricas mediante cromatografía de

exclusión molecular (SEC), aprovechando el alto rendimiento que se obtuvo en la sobre-expresión y purificación de ambos alérgenos, por lo cual, se logró determinar el efecto de la concentración de la proteína en este fenómeno. Además, monómeros y oligómeros se caracterizaron mediante espectrometría de masas MALDI-TOF y SDS-PAGE, como se muestra en la figura 19.

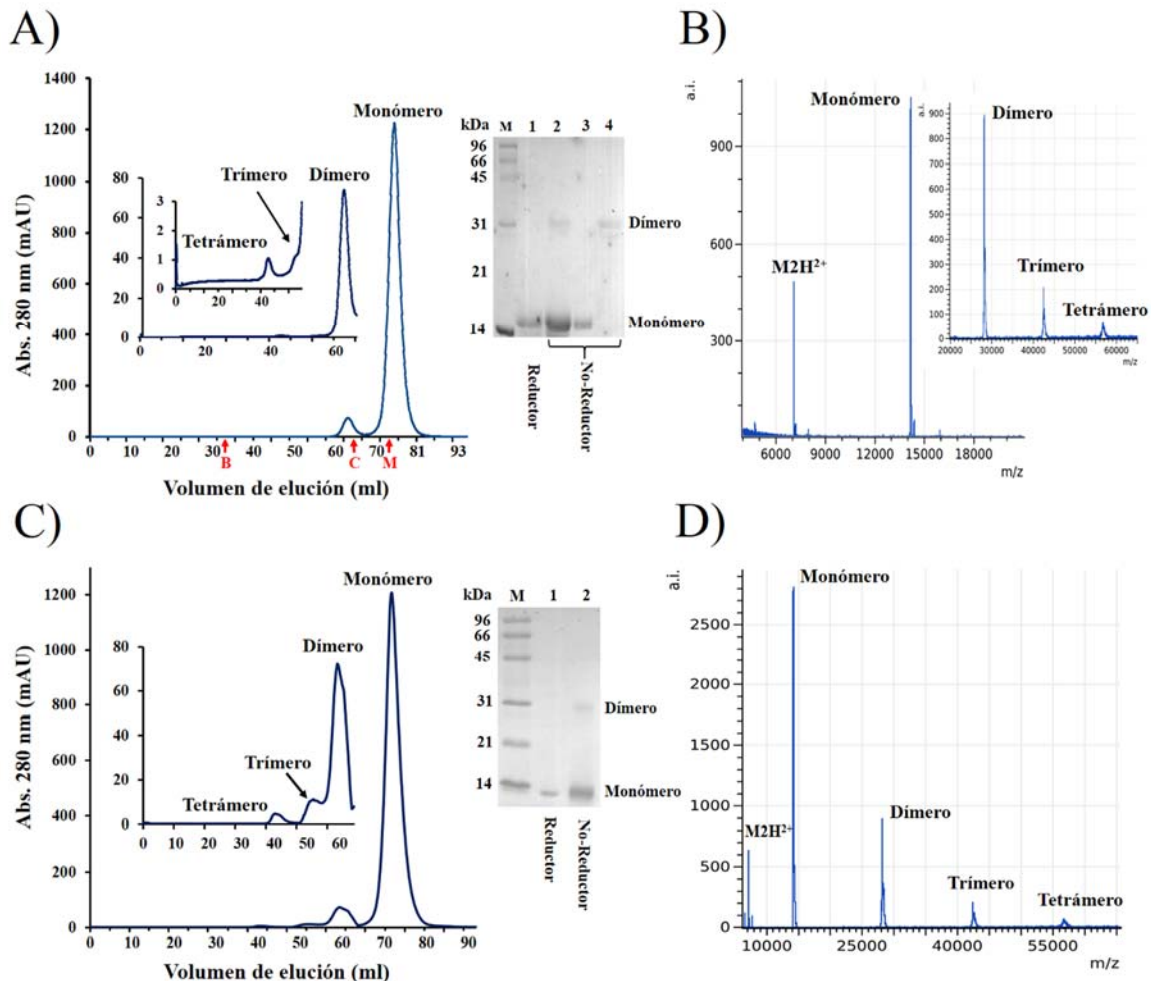


Figura 19. Caracterización de las formas oligoméricas de los alérgenos rHev b 8 y rZea m 12. **A)** Cromatografía de exclusión molecular del alérgeno rHev b 8 purificado a una concentración de 10 mg/mL. *Inserto de la izquierda* muestra las fracciones que eluyeron antes que el monómero y que corresponden de acuerdo al volumen de elución al dímero, trímero y tetramero. Los controles para calibrar la columna se muestran en rojo: M (mioglobina), C (α -quimiotripsina), B (BSA). *Inserto de la derecha* muestra el gel SDS-PAGE al 12% de las fracciones eluidas, carril 1: rHev b 8 (10 mg/mL); carril 2: la misma muestra en condiciones no-reductoras; línea 3: y 4, monómero y dímero después de la separación en condiciones no-reductoras. **B)** Espectro MALDI-TOF para rHev b 8, el cual se muestran los picos correspondientes al monómero (m/z 14.1 kDa) y el ion M2 que corresponde a la mitad de la relación m/z del monómero; la ampliación muestra los picos que corresponden al dímero (28.3 kDa), trímero (42.4 kDa), y al tetramero (56.5 kDa). **C) y D)** Muestran los mismos experimentos para rZea m 12. Para el gel SDS-PAGE se muestra la proteína (10 mg/mL) que se aplicó en la columna de exclusión molecular en condiciones reductoras y no-reductoras.

De acuerdo a los resultados obtenidos por SEC, al incrementar la concentración de ambos alérgenos puros a 10 mg/mL, se comprueba la presencia de tres picos que eluyeron primero de la columna de exclusión (Fig. 19A, panel izquierdo) y que corresponden a las distintas formas oligoméricas de ambos alérgenos, siendo la forma dimérica la predominante (~2% del total de proteína). El análisis de los geles SDS-PAGE (Fig. 19A, panel derecho) en condiciones reductoras y no reductoras sugiere que las formas diméricas se encuentran estabilizadas mediante un puente disulfuro entre la cisteína 13 de ambos alérgenos, hecho que se confirmó en la estructura tridimensional del dímero de rHev b 8. Cada una de las formas oligoméricas presentes en las muestras con una concentración de 10 mg/mL, fueron caracterizadas por espectrometría de masas MALDI-TOF (Fig. 19B). Los espectros mostraron el mismo patrón de separación que el observado en los experimentos de SEC, corroborando el efecto de la concentración en la formación de las diferentes especies oligoméricas también para rZea m 12 (Fig. 19C, D).

Con el objetivo de caracterizar los determinantes antigénicos de la profilina y estudiar las consecuencias de la dimerización en la respuesta mediada por IgE se buscó obtener y caracterizar un conjunto de anticuerpos monoclonales que cumplieran con estos objetivos.

Inducción de la respuesta inmune para la generación de anticuerpos monoclonales murinos anti-profilina

Después de la inmunización de ratones con el alérgeno rHev b 8, utilizando dos adyuvantes diferentes como la alúmina y el adyuvante incompleto de Freund's (AIF), se realizaron pruebas de ELISA al inicio y al final del esquema de inmunización para determinar los niveles de la respuesta de anticuerpos IgE e IgG.

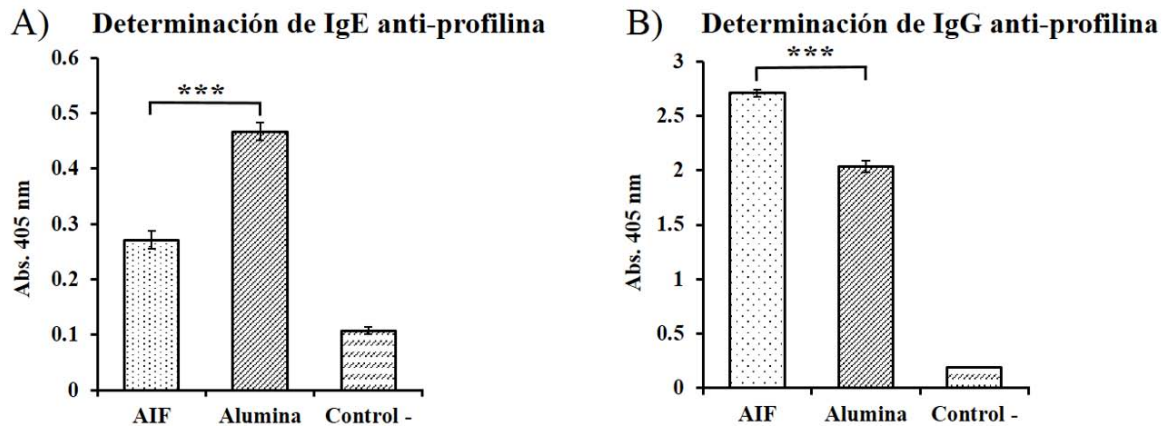


Figura 20. Evaluación de los niveles de anticuerpos IgE e IgG al final del esquema de inmunización en ratones con el alérgeno rHev b 8. **A)** Experimentos de ELISA para la determinación de IgE murina con los dos adyuvantes usados (adyuvante incompleto de Freund's y alúmina), y el control negativo que corresponde a un ratón no inmunizado. **B)** Experimento de ELISA para la determinación de IgG murina (***) = $P < 0.001$).

Al final del esquema de inmunización con el alérgeno rHev b 8 los niveles en suero de anticuerpos IgE fue más alto utilizando alúmina como adyuvante, comparando con los niveles de IgG, como se observa en la figura 20A, esto se debe a que la alúmina favorece una respuesta Th2 (Lindblad 2004; Chesné *et al.* 2016). El AIF incrementa la producción de anticuerpos del tipo IgG (Fig. 20B), en respuesta a una continua administración del antígeno. Cabe mencionar que el sistema inmune puede generar tolerancia contra los alérgenos generando anticuerpos bloqueadores o neutralizantes de la respuesta IgE (Berin & Mayer 2013).

Basados en los resultados obtenidos con los ratones inmunizados, se escogieron aquellos con la respuesta más alta para IgE o IgG, dependiendo del isotipo de anticuerpo a seleccionar en los hibridomas obtenidos mediante la fusión de las células del bazo (linfocitos B) con la línea celular de mieloma de ratón Ag8. Al final de las diferentes rondas de selección se generó una biblioteca de 8 hibridomas, siete para IgG y uno produciendo IgE, los cuales en una primera instancia se seleccionaron por su capacidad de reconocer específicamente al

alérgeno rHev b 8 y por el nivel de la respuesta en ELISA. Es importante resaltar que la IgE se obtuvo en una relación 1:1000 sobre todos los hibridomas probados.

Los hibridomas que se seleccionaron por su capacidad para producir los anticuerpos murinos (mAb, por sus siglas en inglés) específicos contra rHev b 8, se crecieron y mantuvieron de acuerdo a las indicaciones descritas en la metodología. Utilizando el sobrenadante de los hibridomas clonados se realizó la caracterización del isotipo de los anticuerpos y se obtuvo el título por dilución seriada para cada uno de ellos (Tabla 5). El título se expresa como el inverso de la mayor dilución que mantiene un resultado positivo.

Tabla 5. Caracterización y título de los anticuerpos monoclonales.

mAbs	Isotipo	Tipo de Cadena ligera	Título por ELISA
1B4	IgG 1	Kappa (κ)	1:2560
1F6			1:1280
1G4			1:1280
2D10			1:5120
4B2			1:1280
4C4			1:2560
4F9			1:1280
2F5	IgE	Kappa (κ)	1:1280

De acuerdo a la tabla 5 el isotipo de anticuerpo IgG 1 es el que predomina como resultado a la inmunización con el alérgeno rHev b 8 y confirma lo observado para otros alérgenos en una administración prolongada y, en general, en la expresión de los anticuerpos protectores o bloqueadores (Chen *et al.* 2012). El título más alto se obtuvo para el anticuerpo 2D10 seguido por los anticuerpos 1B4, 4C4, lo cual demuestra una alta afinidad por el alérgeno. La purificación de los anticuerpos se obtiene en un solo paso, utilizando columnas de afinidad a rHev b 8. Durante la purificación dos anticuerpos (1B4, 4B2) mostraron una mayor afinidad en la columna de rHev b 8, por lo que para eluirlos fue necesario un incremento en la fuerza iónica hasta 1M de NaCl, además del cambio de pH que se realiza comúnmente. En la figura 21 se muestra un gel SDS-PAGE con todos los mAbs purificados, donde se aprecia la diferencia en peso en la cadena pesada de la IgE murina, debido a que posee un dominio C ϵ 2 adicional (Gould & Sutton 2008). El rendimiento fue diferente para cada uno de los anticuerpos por cada 250 mL se obtuvieron para cada uno: 1B4 (1.5 mg), 1F6 (1.2 mg), 1G4 (1.6 mg), 2D10 (2.0 mg), 4B2 (0.8 mg/mL), 4C4 (1.6 mg), 4F9 (0.7 mg) y del 2F5 (1.2mg).

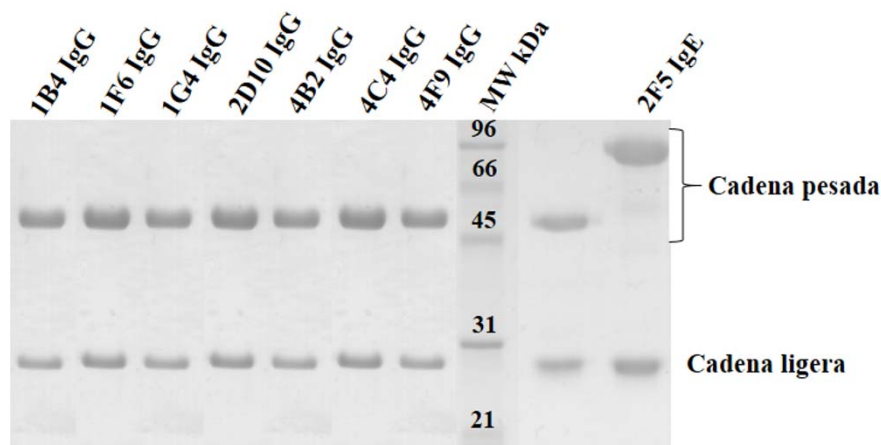


Figura 21. SDS-PAGE al 12 % del conjunto de anticuerpos murinos anti-rHev b 8 (Profilina). MW corresponde al marcador de peso molecular. Todos los mAbs fueron purificados en una columna de afinidad a rHev b 8.

Caracterización de la interacción de los anticuerpos monoclonales anti-rHev b 8 y la reactividad cruzada con rZea m 12

Con el propósito de comparar el reconocimiento de los anticuerpos monoclonales por los alérgenos rHev b 8 y rZeam 12 se evaluó su interacción mediante ELISAs, lo que nos permitió seleccionarlos con base en las diferencias de la respuesta por ambos alérgenos. Los resultados mostrados en la figura 22 muestran una variabilidad moderada en el reconocimiento de rHev b 8 y una gran variabilidad en presencia de rZea m 12.

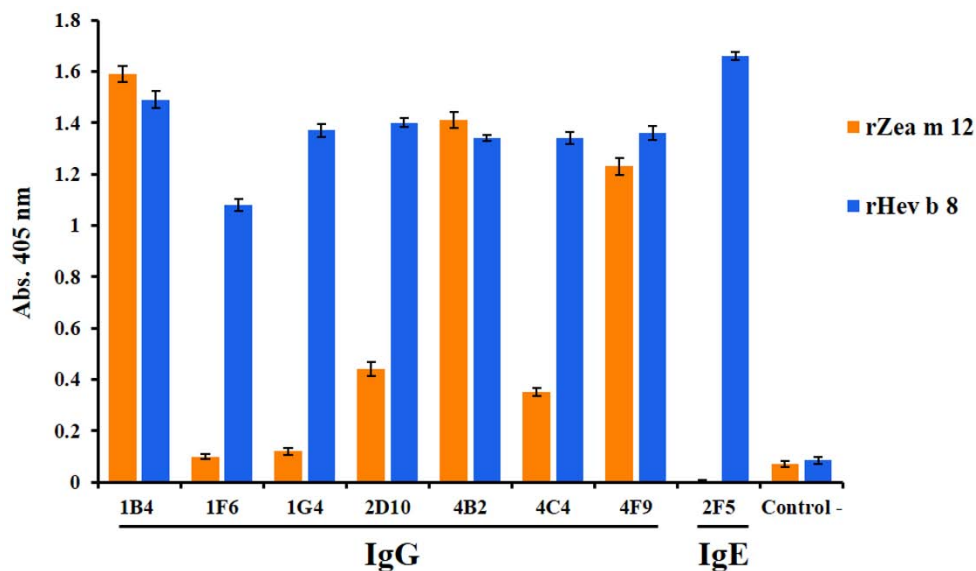


Figura 22. Reconocimiento de los alérgenos rHev b 8 y rZea m 12 por los mAbs anti-profilina por ELISA indirecta. Todos los valores son el promedio de tres experimentos por separado, considerando la desviación estándar y restando el blanco de pozos sin sensibilizar; el control negativo corresponde a un mAb no relacionado para estos alérgenos.

A partir de los resultados observados en la figura 22 podemos sugerir que los anticuerpos monoclonales 1B4, 4B2, 4F9 reconocen regiones similares en ambos alérgenos y que esta respuesta es producto de la reactividad cruzada, debida a la alta identidad en secuencia, así como a la conservación de su estructura tridimensional. Por otra parte, los anticuerpos 1F6, 1G4, 2D10, 4C4 muestran diferencias importantes en su reconocimiento por ambos alérgenos, siendo el más relevante el del anticuerpo monoclonal IgE 2F5 ya que éste no interacciona con el alérgeno rZea m 12. Esto último sugiere que existen cambios en la superficie de ambos alérgenos que afectan significativamente el reconocimiento por IgE. A partir de la estructura de ambos alérgenos podemos decir que el epítipo para el mAb 2F5 es de tipo conformacional. En la figura 15A, que muestra la región en la superficie de los alérgenos rHev b 8 y rZea m 12, que tiene la variabilidad más alta en composición de residuos de acuerdo al análisis de secuencias, así como una distribución de la carga diferente entre ambos alérgenos, establecida por el potencial electrostático.

Un análisis para definir si las regiones o epítipos que reconocen los anticuerpos monoclonales son similares o traslapantes entre ellos es la competencia por el alérgeno (rHev b 8). Se realizó un primer proceso de selección mediante ELISA de competencia que se resumen en la tabla 6.

Tabla 6. Ensayos de competencia entre los anticuerpos monoclonales anti rHev b 8 mediante ELISA.

mAbs	Valor individual	1B4	1F6	1G4	2D10	4B2	4C4	4F9	2F5
1B4	1.3 ±0.006	1.35 ±0.06							
1F6	0.91 ±0.008	1.58 ±0.085	0.92 ±0.062						
1G4	1.46 ±0.012	1.75 ±0.035	1.48 ±0.095	1.42 ±0.028					
2D10	1.55 ±0.008	2.1 ±0.027	1.5 ±0.047	1.62 ±0.094	1.48 ±0.042				
4B2	1.19 ±0.016	1.4 ±0.064	1.42 ±0.059	1.72 ±0.103	1.81 ±0.064	1.21 ±0.032			
4C4	1.48 ±0.005	1.97 ±0.043	1.55 ±0.063	1.41 ±0.075	1.6 ±0.083	1.78 ±0.043	1.51 ±0.028		
4F9	0.97 ±0.002	1.23 ±0.076	1.35 ±0.078	1.37 ±0.138	1.48 ±0.095	1.32 ±0.075	1.44 ±0.078	1.05 ±0.055	
2F5	1.53 ±0.018	1.3 ±0.105	1.4 ±0.116	1.25 ±0.132	1.39 ±0.115	1.44 ±0.148	1.34 ±0.11	1.26 ±0.136	1.55 ±0.04

Las lecturas se realizaron a una longitud de onda de 405 nm, cada valor corresponde al promedio de tres repeticiones y ± la desviación estándar. La concentración de los anticuerpos y el alérgeno rHev b 8 se consideró en una relación equimolar (300 nM). Los valores en color naranja corresponden al control de la competencia entre el mismo mAb. En azul los valores positivos más altos de la mezcla de dos mAbs.

El propósito del experimento fue corroborar que, mediante la competencia entre dos anticuerpos, éstos podrían aumentar la respuesta por la unión simultánea al alérgeno, que se

ve favorecida por la presencia de dos epítomos diferentes. Para ello se realizaron todas las combinaciones posibles entre los anticuerpos monoclonales como se muestra en la tabla 6, usando como control en la competencia el mismo anticuerpo (cuadros en color naranja), valor que es igual al de su promedio individual (primera columna). Los anticuerpos que no-compiten por regiones similares son los marcados en azul. En estos casos el valor obtenido de la combinación, de dos mAbs está por arriba del valor promedio individual, por lo que se podría considerar como una respuesta a la unión de más de un solo sitio siendo este valor estadísticamente significativo ($P > 0.01$). Sin embargo, entre los ocho anticuerpos involucrados en el aumento de la respuesta por competencia podemos sugerir que los mAbs 1B4, 4B2, y 4F9 compiten por regiones similares en la superficie del alérgeno, al no haber un aumento significativo en la respuesta en la combinación por pares, comparando con la del promedio individual. Estos datos corroboran los obtenidos en la ELISA de la figura 22, donde se sugiere que regiones conservadas de los alérgenos participan en la unión a estos anticuerpos. El mismo fenómeno ocurre con los mAbs 1F6, 1G4, 2D10, 4C4, donde regiones con mayor variabilidad entre los dos alérgenos pueden contribuir a las diferencias en la unión de los mAbs. Por lo tanto, podemos tener dos grupos de anticuerpos que compiten por dos regiones diferentes del alérgeno.

Un comportamiento diferente se observó para el anticuerpo IgE 2F5, ya que la unión de cualquiera de los otros mAbs tipo IgG afecta al primero. A partir de todos estos datos, en los que evaluamos el rendimiento, el nivel de respuesta por alérgeno y la competencia entre ellos se decidió generar y purificar a los anticuerpos IgG (1B4, 1G4, 2D10, 4B2 y 4C4), que presentaron una mayor respuesta al probarlos de manera simultánea. El anticuerpo monoclonal IgE 2F5 es relevante por el hecho de ser una molécula mediadora en las reacciones de hipersensibilidad de tipo I o alergia.

Una vez seleccionados y purificados los anticuerpos 1B4, 1G4, 2D10, 4B2 y 4C4 se evaluó la afinidad por el alérgeno rHev b 8 mediante interferometría de bicapa (BLI por sus siglas en inglés). Esta técnica utiliza el mismo fundamento que la resonancia de superficie de plasmones (SPR por sus siglas en inglés, BiaCore), en la que se mide el índice de refracción de la luz en una superficie por la unión del ligando (alérgeno) a su analito (mAbs). En este caso se

establecieron las condiciones que permitieron medir la interacción del alérgeno rHev b 8 con los cinco mAbs IgG seleccionados; siendo necesario usar incrementos en la fuerza iónica con 1M de NaCl, para calcular la curva de disociación de los anticuerpos. Estos experimentos nos permitieron determinar los siguientes parámetros de la cinética de unión la K_D (constante de afinidad), k_a (constante de velocidad de asociación) y k_d (constante de velocidad de disociación) para cada uno de los anticuerpos y se resumen en la tabla 7. Los interferogramas de las cinéticas de unión para cada uno de los cinco anticuerpos, se incluyen en el material suplementario (Fig. 3, Anexo 1).

Tabla 7. Resultados de la cinética de unión de los mAbs a rHev b 8 por BLI.

mAbs	K_D (M)	k_a ($M^{-1}s^{-1}$)	k_d (s^{-1})	χ^2	R^2
1B4	1.60E-12	4.94E+05	7.88E-07	0.10	0.99
1G4	9.00E-10	4.64E+04	4.17E-05	0.68	0.99
2D10	8.33E-11	3.33E+04	2.77E-06	0.14	1
4B2	7.84E-10	5.42E+04	4.25E-05	0.42	0.99
4C4	8.18E-09	4.95E+03	4.05E-05	0.61	0.99
2F5	1.67E-09	1.90E+05	3.17E-04	0.71	0.99

$K_D = k_d/k_a$, R^2 = Porcentaje de variación de la respuesta (mayor al 0.95%, índice de confianza de los ajustes), χ^2 Comparación de la distribución observada con una distribución esperada de los datos (menor a 1, índice aceptable de confianza).

Los valores de K_D reportados para anticuerpos monoclonales presentan límites que van de nM a pM (Reverberi & Reverberi 2007). Los mAbs que mostraron una afinidad aparente más alta por el alérgeno rHev b 8 fueron el 1B4, 2D10, aun incrementando la fuerza iónica durante el experimento de unión para reducirla, ésta se mantiene en el orden de nano a picomolar. De acuerdo a los datos obtenidos para cada anticuerpo y las curvas de asociación y disociación (Anexo 1) se observó que los anticuerpos 1B4 y 2F5 tienen una constante de velocidad de asociación más rápida (k_a), sin embargo, para el caso del anticuerpo 2F5 la constante de velocidad de disociación (k_d) es más rápida, lo que determina que su constante de afinidad K_D sea dos órdenes de magnitud menor, contrario a lo que se observó para el anticuerpo 2D10 donde la disociación es más lenta. Es importante resaltar que hay muy pocos estudios en la literatura donde se haya caracterizado o descrito un anticuerpo monoclonal IgE murino o

humano producidos por diferentes técnicas. El primer reporte de un mAb IgE derivado de un hibridoma fue un anticuerpo anti-2,4-dinitrofenol (DNP), para el cual reportaron una K_D de 1.4×10^{-8} M (Liu F T *et al.* 1980). Para alérgenos se han reportado dos anticuerpos IgE recombinantes dirigidos contra Bos d 5 (β -lactoglobulina) (Niemi *et al.* 2007) y Phl p 2 (alérgeno de pasto) (Padavattan *et al.* 2009), los cuales tienen K_D s de 1.4×10^{-9} M y 1.1×10^{-10} M respectivamente. Por lo tanto, podemos decir que el mAb 2F5 tiene una afinidad dentro de los límites reportados para otros anticuerpos del isotipo IgE. Los resultados obtenidos en las ELISA de competencia (Tabla 6) fueron comprobados por interferometría (Fig. 23).

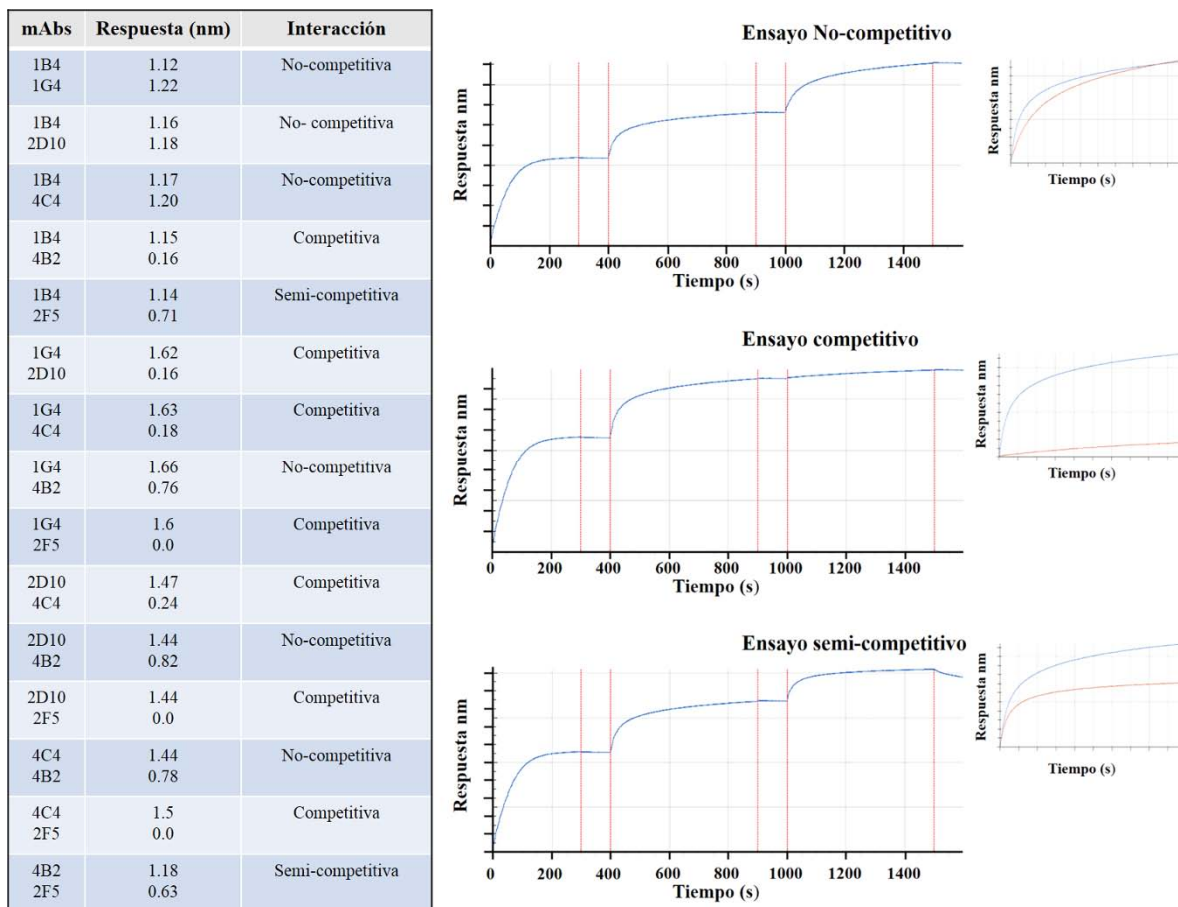


Figura 23. Ensayos de competencias entre los anticuerpos monoclonales murinos por el alérgeno rHev b 8 por BLI. En la tabla se muestra la combinación por pares de los mAbs el valor de la respuesta (nm) y el análisis de la interacción. Los gráficos representan los tres tipos de interacción con el alérgeno rHev b 8.

A partir de los datos mostrados en la figura 23 se establecen tres tipos de interacción entre el alérgeno rHev b 8, que se basan en los cambios de las curvas de asociación (k_a) y los posibles cambios de la respuesta por interferometría de la competencia por pares de los anticuerpos monoclonales:

La competitiva: cuando los mAbs reconocen regiones similares o traslapantes entre ellos y la unión del primer anticuerpo afecta considerablemente la unión del segundo.

La no-competitiva: Cuando los epítomos en la superficie del alérgeno quedan disponibles para ambos mAbs y la unión del primero no afecta la unión del segundo.

La semi-competitiva: Cuando por impedimento estérico o un cambio en la superficie del alérgeno afecta la unión del segundo anticuerpo y la respuesta es menos de la mitad del promedio de unión de éste.

Con base en estos resultados, podemos clasificar a los cinco anticuerpos seleccionados en dos grupos: 1B4 y 4B2 reconocen una región similar o traslapante entre ellos. La búsqueda de esta región es más extensa en la superficie de la proteína ya que se encuentra en regiones conservadas; que pueden responsables de la reactividad cruzada entre los dos alérgenos como se observa en las pruebas de ELISA (Fig. 22). De igual forma demostramos por ELISA y BLI que para los anticuerpos 2D10, 1G4, 4C4 hay una clara disminución en la unión con el alérgeno rHev b 8 cuando compiten entre ellos (Tabla 6, Fig. 23). La región que reconoce el mAb IgE 2F5 parece ser similar a la que reconocen los mAbs 2D10, 1G4, 4C4 y ésta es la menos conservada entre los dos alérgenos, cuando comparamos las diferencias sobre la superficie de ellos (Fig. 15A) y que da lugar a la variabilidad en la respuesta por ELISA (Fig. 22). Una vez caracterizada la cinética de unión de cada uno de los mAbs con rHev b 8, se analizó su unión con el alérgeno rZea m 12 y se decidió continuar caracterizando los mAbs 1B4, 2D10 y 2F5, ya que son los que presentan mayor afinidad y pueden reconocer regiones similares y distintas simultáneamente en la superficie entre los dos alérgenos.

La afinidad de los anticuerpos 1B4 y 2D10 por el alérgeno rZea m 12 se determinó realizando cinéticas de unión mediante BLI (Anexo 1) y los resultados se resumen en la tabla 8. También se corroboró mediante experimentos de BLI que el mAb IgE 2F5 no reconoce a este alérgeno (Fig. 4, Anexo 1).

Tabla 8. Resultados de la cinética de unión de los mAbs a rZea m 12 por BLI.

mAbs	K_D (M)	k_a ($M^{-1}s^{-1}$)	k_d (1/s)	χ^2	R^2
1B4	3.39E-11	4.10E+05	1.39E-05	0.70	0.99
2D10	1.57E-09	1.06E+06	1.66E-03	0.0785	0.99
2F5	-	-	-	-	-

$K_D = k_d/k_a$, R^2 = Porcentaje de variación de la respuesta (mayor al 0.95%, índice de confianza de los ajustes), χ^2 Comparación de la distribución observada con una distribución esperada de los datos (menor a 1, índice aceptable de confianza).

Los resultados de la cinética de unión muestran que la afinidad del anticuerpo monoclonal 2D10 por el alérgeno rZea m 12, es menor que la obtenida para rHev b 8 ($K_D = 8.33 \times 10^{-11}$ M). Este resultado corrobora los datos obtenidos por ELISA (Fig. 22), los cuales sugieren que el epítipo que reconoce este mAb se traslapa con la región donde observamos más cambios entre los residuos para las dos estructuras (Fig. 15A), porque además compite con el mAb 2F5. Sin embargo, mantiene buena parte de su afinidad por el alérgeno. El anticuerpo 1B4 no muestra un cambio significativo en su afinidad por el alérgeno rZea m 12. Por lo tanto, podemos sugerir que reconoce una región conservada entre ambos alérgenos.

Efecto de la reactividad cruzada de rHev b 8 y rZea m 12 en individuos alérgicos

Para este estudio se usaron los sueros de individuos con un historial clínico de alergia del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER) y del Instituto Nacional de Pediatría (INP) con el fin de determinar su respuesta específica a profilinas. Se seleccionaron los sueros de 20 individuos que presentaron diferentes respuestas positivas de IgE e IgG4 contra los alérgenos rHev b 8 y rZea m 12. Al analizar los resultados obtenidos con la mezcla de estos sueros por ELISA se observa claramente la reactividad cruzada que presentan ambos alérgenos, tanto para IgE como para IgG4 (Fig. 24).

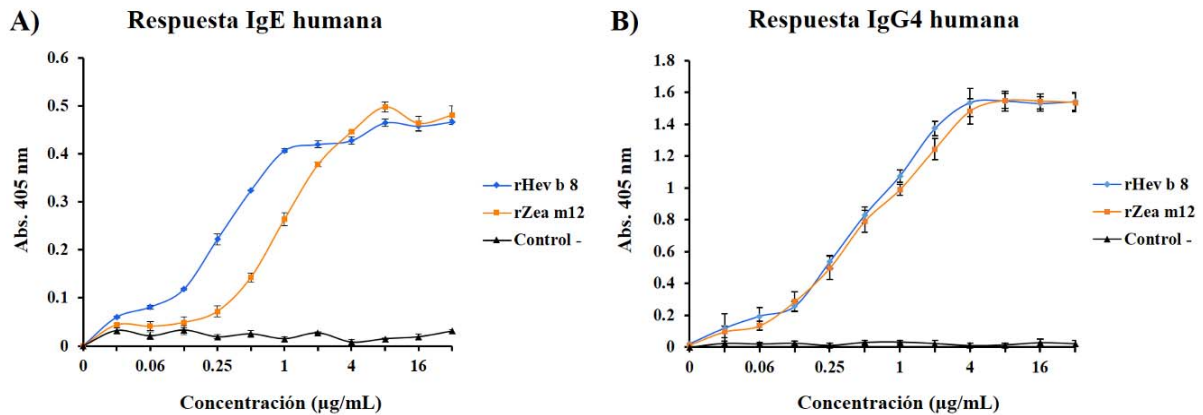


Figura 24. Determinación de los niveles de IgE (A) e IgG4 (B) en una mezcla de sueros de individuos alérgicos. El control negativo corresponde a una mezcla de sueros de individuos no-alérgicos (n=3) $P < 0.01$ para A.

De acuerdo a los resultados mostrados en la figura 24A, la respuesta IgE por el alérgeno rHev b 8 es más sensible que para rZea m 12; sin embargo, podemos observar que ambos alérgenos presentan reactividad cruzada con el suero de individuos con alergia específica a profilina, ya que ambos alérgenos mantienen una alta homología en varias regiones en su superficie lo que favorece que puedan compartir determinantes antigénicos entre ellos. Los resultados para IgG4 (Fig. 24B) son todavía más claros, ya que no existe una diferencia significativa en la reactividad con cada uno de los alérgenos, por lo que podemos sugerir que los epítomos para una respuesta en la que participan los anticuerpos policlonales IgG4 son más conservados entre ambas profilinas. Otro factor que influye en el reconocimiento es la avididad de los anticuerpos y la afinidad con la que se unen a su antígeno. En los mecanismos de la respuesta Th2, los anticuerpos del tipo IgG4 se han propuesto como aquellos que se generan por la tolerancia que desarrolla el sistema inmune de un individuo a la continua exposición a los alérgenos, cuando nos referimos a alergia. En este punto es importante señalar que no todos los individuos que tienen niveles de IgE positivos a un alérgeno necesariamente deben tener IgG4 o viceversa, esto se debe a la incapacidad de desarrollar una tolerancia al alérgeno. Por lo tanto, es importante mantener un registro individual de cada paciente cuando se realizan inmunoterapias, con el propósito de corroborar el progreso que presentan los pacientes por la generación de anticuerpos neutralizantes o bloqueadores de IgE.

Caracterización del efecto neutralizante o bloqueador de los anticuerpos monoclonales murinos anti-profilina (IgE e IgG4 de suero de individuos alérgicos)

Estos experimentos se realizaron utilizando un conjunto de cinco mAbs IgG1 (1B4, 1G4, 2D10, 4B2, 4C4) y el mAb 2F5 para determinar si bloquean la unión de rHev b 8 a las IgE e IgG4 del suero de individuos con alergia específica a profilina. Los resultados de la inhibición de forma individual y en combinación por pares de los mAbs se muestra en la tabla 9.

Tabla 9. Ensayos de inhibición de la unión de IgE e IgG4 humanas de individuos alérgicos a rHev b 8 por los anticuerpos monoclonales anti-profilina mediante ELISA.

mAbs	Inhibición IgE humana (%)
1B4	24.7±3.2
1G4	33.1±2.5
2D10	34.4±1.8
4B2	21.8±4.2
4C4	33.9±3.6
2F5	36.4±2.7

Combinación	1B4	1G4	2D10	4B2	4C4
1B4					
1G4	58.27±3.5				
2D10	62.5±4.1	35.88±2.3			
4B2	23.9±3.6	60.7±5.4	61.98±3.4		
4C4	63.85±3.7	33.28±4.8	35.15±2.7	50.89±4.9	
2F5	58.78±5.2	34.85±2.6	32.98±4.7	57.61±4.5	35.03±3.4

mAbs	Inhibición IgG 4 humana (%)
1B4	44.7±8.2
1G4	45.5±6.3
2D10	43.8±7.7
4B2	41.8±6.2
4C4	39.7±7.4
2F5	11.5±3.8

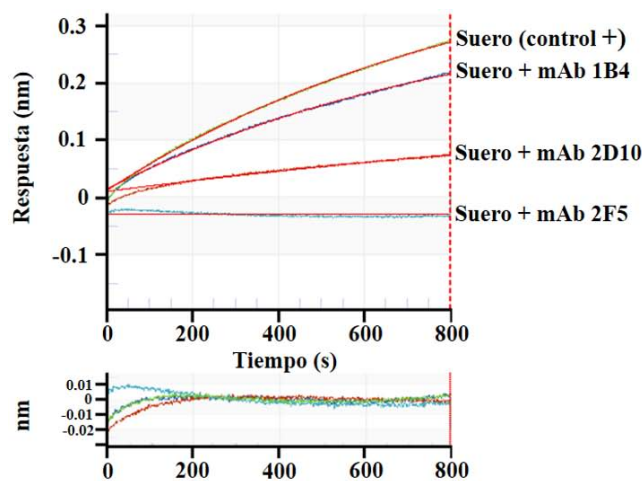
Combinación	1B4	1G4	2D10	4B2	4C4
1B4					
1G4	78.6±11.5				
2D10	82.5±9.1	48.6±9.5			
4B2	45.5±7.6	80.7±10.2	87.9±9.4		
4C4	83.4±10.7	49.3±8.6	47.15±8.2	90.1±12.6	
2F5	50.7±8.9	48.6±8.6	51.4±5.7	57.61±10.2	43.8±8.6

Las lecturas se realizaron a una longitud de onda de 405 nm, cada valor corresponde al promedio de tres repeticiones y \pm la desviación estándar. La concentración de los anticuerpos y el alérgeno rHev b 8 se consideró en una relación equimolar (300 nM). El control positivo individual de cada alérgeno es la primera columna. El control negativo es una mezcla (n=3) de individuos no alérgicos restado del valor para cada ensayo.

Los resultados de la tabla 9, muestran que entre los anticuerpos monoclonales murinos IgG1 hay una diferencia significativa en la inhibición del reconocimiento a rHev b 8 por el suero de individuos con IgE positiva, entre los dos grupos descritos en la sección de competencia [1B4, 4B2] con un 10% menos de inhibición comparado con 1G4, 2D10, 4C4 y que de acuerdo a los resultados por ELISA para cada uno de ellos (Fig. 22), se encuentra en alguna de las regiones más conservadas, al mantener una respuesta alta entre los dos alérgenos. La diferencia más significativa entre las dos respuestas mostró que la unión de IgE humana se inhibe en menor medida que IgG4, ésto se puede deber a que en la respuesta en ratones se ha

observado principalmente que los anticuerpos IgG1 responden a una administración constante del alérgeno manteniendo una respuesta Th2 (Williams *et al.* 2012). Por lo tanto, podemos sugerir que la inhibición de una respuesta IgG4 es más parecida a la respuesta por IgG1 en ratones ya que no hay reportes de que estos últimos expresen el isotipo IgG4. Sin embargo, el promedio la inhibición de los anticuerpos monoclonales se encuentra del rango medio de inhibición considerando que el alérgeno posee al menos tres regiones inmuno-dominantes, donde la superficie del alérgeno permita su interacción (Braden & Poljak 1995; Sela-Culang *et al.* 2013).

La ELISA se considera un método más sensible que la BLI (Sanders *et al.* 2016); sin embargo, tanto los diferentes pasos de lavado como una menor superficie de contacto con el alérgeno puede desfavorecer la unión de los anticuerpos monoclonales antes de incorporar el suero de individuos alérgicos. Además, en la ELISA, se necesita más tiempo y cantidad de muestra para estandarizar los experimentos. Por tales motivos se usó BLI para realizar los ensayos de inhibición de la unión a profilina por las inmunoglobulinas policlonales del suero de individuos alérgicos, tanto IgE+, IgG4+, u otro isotipo de anticuerpos específico contra profilina. Además, por esta técnica se puede determinar cómo se inhibe la unión de los anticuerpos específicos del suero de pacientes al alérgeno por la unión de los mAbs bloqueadores en tiempo real y en solución.



mAbs	Respuesta (nm)	Porcentaje de inhibición (%)
1B4	0.21	23
2D10	0.07	74
2F5	0	100
Control (+)	0.27	-

$$\% \text{ Inhibición} = \left[1 - \left(\frac{R. Problema}{R. Suero} \right) \right] \times 100$$

Figura 25. Experimentos de BLI para determinar la inhibición del reconocimiento del suero de pacientes por rHev b 8 mediante el uso de mAbs bloqueadores. El control corresponde a una mezcla del suero de 20 individuos con respuesta específica de IgE e IgG4 a profilina. El suero de individuos no alérgicos (control negativo), no presentó unión al biosensor.

La figura 25 muestra que el mAb 2F5 inhibe un 100% el reconocimiento de rHev b 8 por las inmunoglobulinas del suero de individuos alérgicos, lo que refleja la unión por las regiones inmuno-dominantes de tipo conformacional en profilina. Una inhibición del 74% por el mAb 2D10 (IgG1) fue también considerable y se explica porque este anticuerpo compite con el 2F5 (Fig. 23). Por otra parte, el mAb 1B4 aunque tiene una afinidad alta por el alérgeno no compite de manera tan eficiente con el suero de individuos alérgicos inhibiendo solo un 23%. Esto sugiere que la región donde se une el mAb 1B4 no tiene efecto determinante en el reconocimiento por anticuerpos relacionados a la respuesta alérgica donde participan las IgE e IgG4 en una respuesta por tolerancia.

También se evaluó el efecto sobre el alérgeno rZea m 12, obteniendo los resultados mostrados en la figura 26.

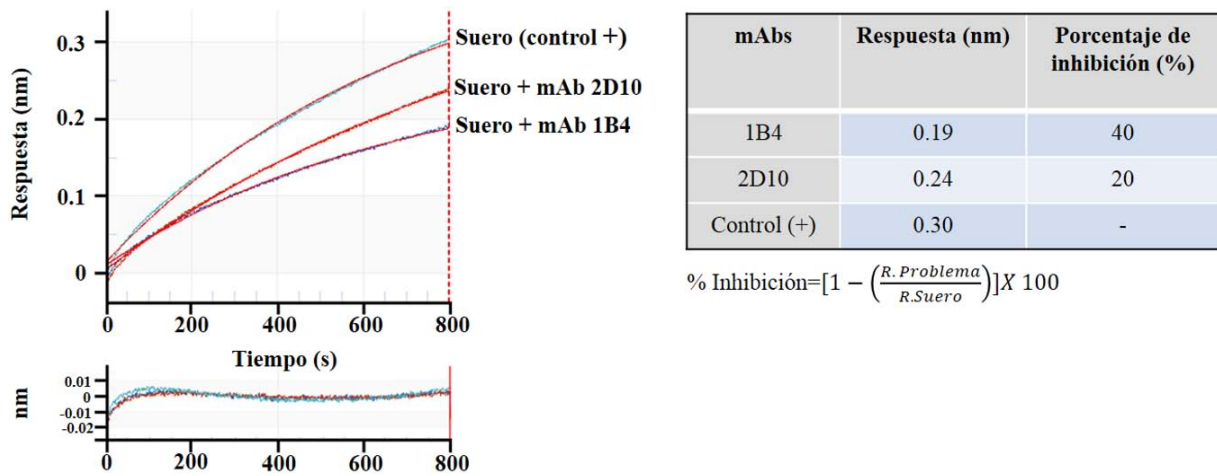
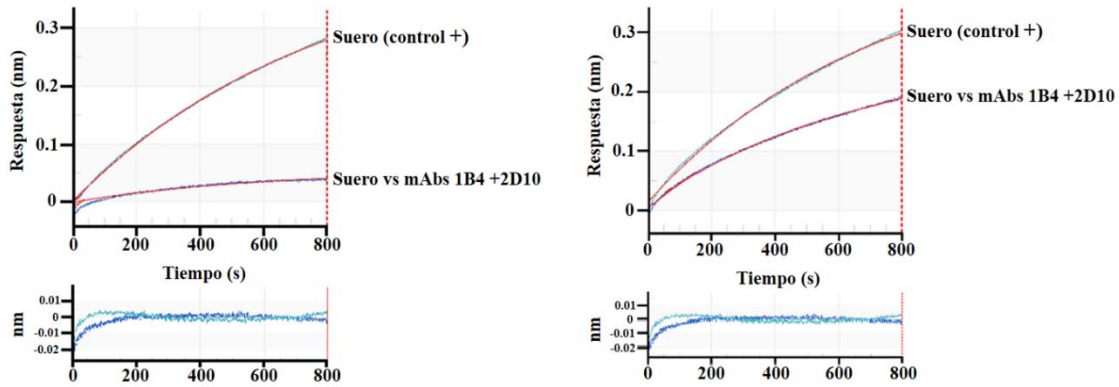


Figura 26. Experimentos de BLI para determinar la inhibición del reconocimiento del suero de pacientes por el alérgeno rZea m12 con el uso de mAbs bloqueadores. El control corresponde a una mezcla del suero de 20 individuos con respuesta específica de IgE e IgG4 a profilina. El suero de individuos no alérgicos (control negativo), no presentó unión al biosensor.

Los datos obtenidos para el alérgeno rZea m12 corroboran los datos obtenidos en ELISA y BLI en ensayos de competencia, donde el anticuerpo 1B4 reconoce una región más conservada entre ambos alérgenos observándose un valor similar en la inhibición del suero de pacientes. Para el mAb 2D10 se observa una diferencia significativa comparado con la del alérgeno rHev b 8 y se debe a la variabilidad que hay en la región que comprende del asa que inicia en la hebra-β2 hasta la hélice-α2 de ambos alérgenos (Fig. 15A) y que son compartidas con el mAb 2F5 como se demostró en los ensayos de competencia. Para evaluar cuál es el efecto

de la combinación de los dos mAbs IgG (1B4, 2D10), sobre la inhibición del reconocimiento de los anticuerpos policlonales del suero de individuos alérgicos, se realizaron los mismos experimentos anteriormente descritos sobre ambos alérgenos. Los resultados de cómo se afecta la cinética de unión se ilustran en la figura 27.



Alérgeno	Combinación mAbs	Respuesta (nm)	Porcentaje de inhibición (%)
rHev b 8	1B4 + 2D10	0.03	90
	Control (+)	0.28	-
rZea m 12	1B4 + 2D10	0.19	40
	Control (+)	0.30	-

$$\% \text{ Inhibición} = \left[1 - \left(\frac{R_{\text{Problema}}}{R_{\text{Suero}}} \right) \right] \times 100$$

Figura 27. Inhibición de la unión de los anticuerpos policlonales con el suero de individuos alérgicos por la mezcla de los mAbs 1B4 y 2D10. El control corresponde a una mezcla del suero de 20 individuos con respuesta específica de IgE e IgG4 a profilina. El suero de individuos no alérgicos (control negativo), no presentó unión al biosensor.

La mezcla de los mAbs en los ensayos de interferometría dio como resultado un incremento considerable de la inhibición de la respuesta policlonal contra el alérgeno rHev b 8. Al comparar la respuesta de este último contra la del alérgeno rZea m 12, con el que comparte un 79 % de identidad, se observó que la combinación de los dos mAbs incrementa la inhibición comparada con la unión de uno solo. La región de unión para el mAb 2D10 en la superficie del alérgeno es de mayor relevancia en la inhibición de una respuesta policlonal y podríamos considerar a esta como el sitio inmuno-dominante más importante en la unión a anticuerpos y que además es compartida con la del mAb 2F5 como demostramos en los ensayos de competencia (Fig. 25). Es importante resaltar que esta inhibición es contra todos los isotipos de anticuerpos que hay en una mezcla de sueros con una respuesta específica a profilina y que en promedio tienen una alta afinidad por su antígeno, que varía del rango de nM a pM (Estep *et al.* 2013).

Reconocimiento de anticuerpos por monómeros y dímeros de profilina.

Varios autores (Schöll *et al.* 2005; Mindykowski *et al.* 2010; Rouvinen *et al.* 2010; Kofler *et al.* 2014; Niemi *et al.* 2015) han sugerido que formas oligoméricas de los alérgenos podrían tener la capacidad de aumentar el reconocimiento en una respuesta policlonal, de suero de pacientes, por la generación de nuevos determinantes antígenicos (epítomos). Para evaluar estas diferencias se probó la mezcla de sueros de individuos con alergia específica a profilina usando ambos alérgenos y comparando la respuesta entre dímeros (D) y monómeros (M). Los resultados de la respuesta por IgE humana y las competencias se muestran en la figura 28.

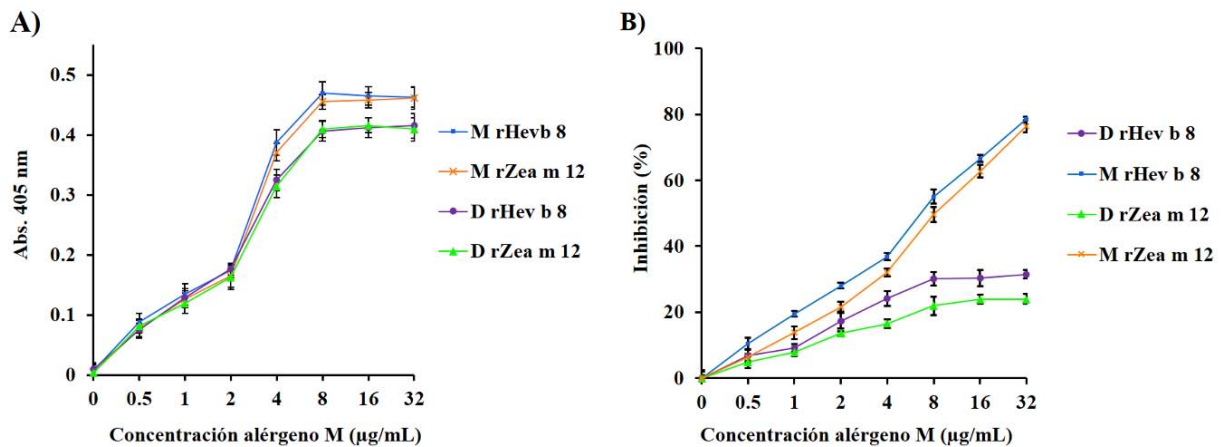


Figura 28. Reconocimiento de los monómeros y dímeros de rHev b 8 y rZea m 12 por IgEs humanas. Mediante ELISAs se registró el incremento de la respuesta (Abs₄₀₅ nm) en función de la concentración de los alérgenos. **A)** Respuesta policlonal IgE de la mezcla de sueros de 20 individuos alérgicos a profilina ($P < 0.001$); cada punto corresponde al promedio de tres repeticiones con su respectiva desviación estándar **B)** Ensayo de inhibición de la respuesta IgE del monómero de cada alérgeno, el control positivo es el mismo monómero para cada alérgeno y la respuesta a seguir es el dígmero de ambos ($P < 0.001$); cada punto corresponde al promedio de tres repeticiones con su respectiva desviación estándar.

A partir de los datos obtenidos en la figura 28 podemos establecer que ambos alérgenos son igualmente reconocidos por el suero de individuos alérgicos. Ésto se debe al efecto de la respuesta policlonal y que involucra más de una región inmuno-dominante en la estructura del alérgeno. Los niveles de IgE en suero de individuos alérgicos por ELISA indirecta, así como en el porcentaje de inhibición muestran una diferencia significativa entre dímeros y monómeros, lo que sugiere que los residuos involucrados en la interfaz del homo-dígmero, forman parte de una región de reconocimiento de anticuerpos (Fedorov *et al.* 1997). Dicha región que se encuentra altamente conservada es la que participa en la unión a poli-L-prolina y puede ser importante en la reactividad cruzada entre esta familia de alérgenos.

Por la tanto se evaluó la importancia de la dimerización del alérgeno rHev b 8 sobre el reconocimiento por los anticuerpos monoclonales realizando ELISAs de inhibición entre dímero y monómeros como se muestra en la figura 29.

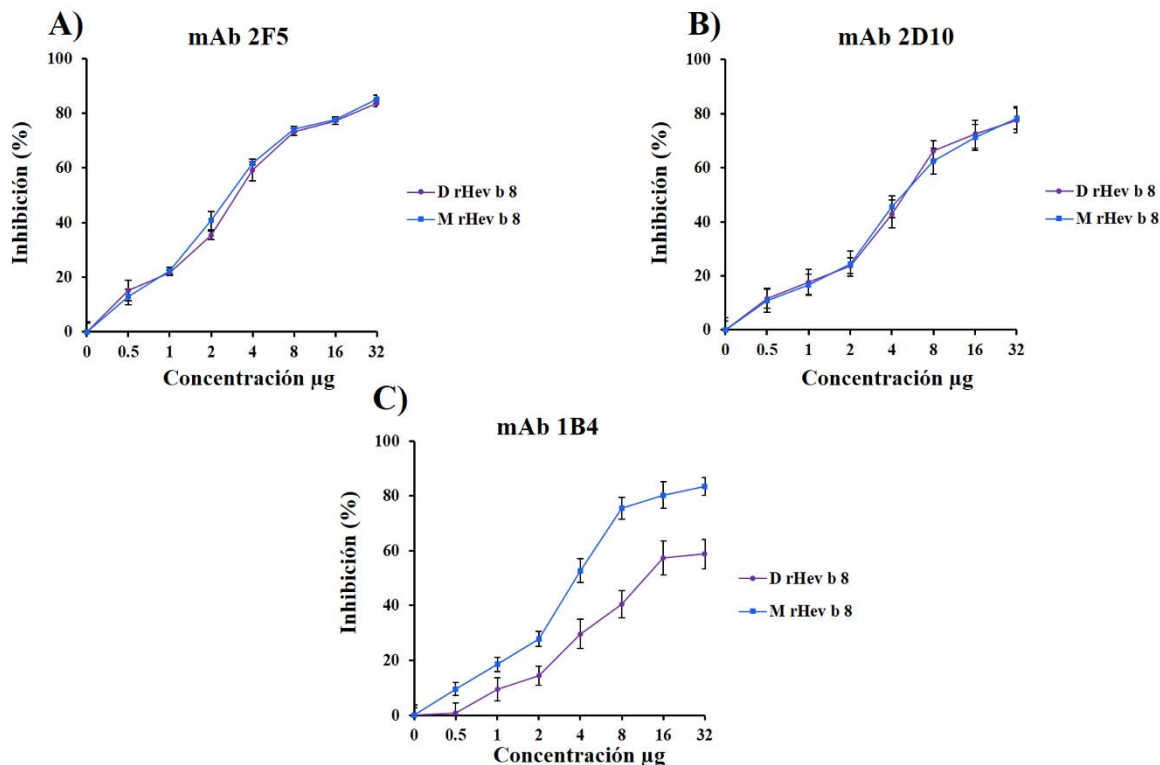


Figura 29. Efecto de la dimerización del alérgeno rHev b 8 en el reconocimiento por mAbs por ELISA. La placa se sensibilizó con incrementos de la concentración del alérgeno M rHev b 8. **A)** Efecto de la inhibición del mAb 2F5. **B)** Efecto de la inhibición del mAb 2D10. **C)** Efecto de la inhibición del mAb 1B4. Cada punto corresponde al promedio de tres experimentos y su respectiva desviación estándar.

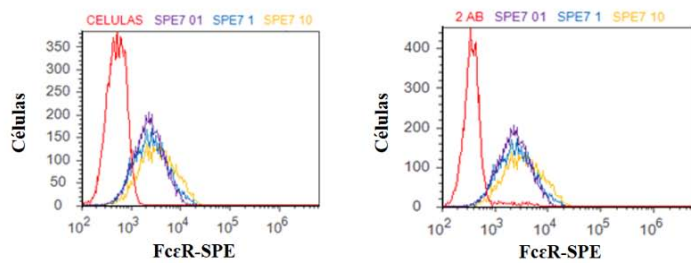
La dimerización del alérgeno rHev b 8 no tuvo un efecto significativo sobre el reconocimiento de los mAbs 2F5 y 2D10 como se observa en la figura 29A y B. Sin embargo, sí se observó una disminución en el reconocimiento del mAb 1B4, que puede ser debido a un impedimento estérico causado por la dimerización en el alérgeno. Por lo tanto, podemos sugerir que la región de la interfaz entre las dos moléculas del alérgeno rHev b 8 no participa en el reconocimiento de los tres mAbs seleccionados (1B4, 2D10 y 2F5), por lo que este alérgeno puede tener al menos dos regiones inmuno-dominantes expuestas en su superficie cuando se encuentra como dímero. Para el alérgeno rZea m 12 demostramos, basándonos en los resultados de ELISAs y BLI de competencia que al presentar regiones con una identidad alta con rHev b 8, se favorece el reconocimiento de los anticuerpos monoclonales del isotipo IgG1.

Lo contrario ocurre con el mAb 2F5 donde cambios sutiles en la composición de los residuos en la superficie de los alérgenos afecta totalmente su reconocimiento.

Interacción del mAb 2F5 con los receptores FcεRI de basófilos (células RBL-2H3)

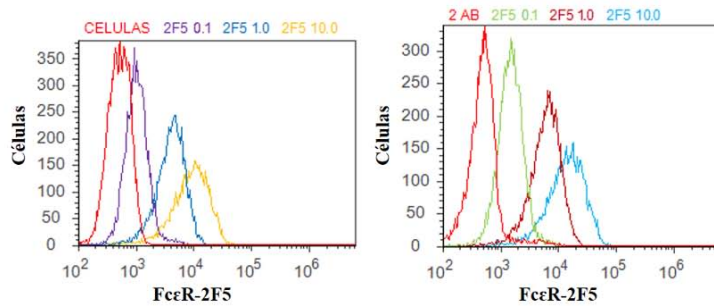
Una parte esencial en el establecimiento de la respuesta alérgica es la sensibilización de las células efectoras (mastocitos o basófilos), la cual se establece por la interacción de los anticuerpos tipo IgE específicos, a través del fragmento cristizable (Fc) de la cadena pesada sobre sus receptores de alta afinidad FcεRI. Para evaluar la unión del mAb 2F5 a dichos receptores y corroborar su especificidad se realizaron experimentos de citometría de flujo (Fig. 30).

A) mAb SPE IgE anti-DNP (control positivo)



Muestra	Células	Promedio FcεR-SPE*
Células	12 833	736
2Ab	10000	794
SPE 0.1 (µg/µL)	10000	5559
SPE 1.0 (µg/µL)	10000	8667
SPE 10.0 (µg/µL)	10000	12955

B) mAb 2F5 IgE anti-rHev b 8



Muestra	Células	Promedio FcεR-2F5*
Células	12 833	736
2Ab	10000	794
2F5 0.1 (µg/µL)	10000	1865
2F5 1.0 (µg/µL)	10000	8963
2F5 10.0 (µg/µL)	10000	29186

*Moléculas de anticuerpo detectadas
Controles negativos: Células y 2Ab

Figura 30. Determinación de la interacción del mAb 2F5 con los receptores de alta afinidad FcεRI por citometría de flujo. **A)** Histogramas representativos de la formación de los complejos FcεRI-mAb SPE; Por separado se muestran el control negativo de las células (fluorescencia intrínseca) (Izquierda), el control negativo de la unión del segundo anticuerpo (2AB) marcado con FITC (derecha) y la tabla con los valores de cada uno de los controles, las diferentes concentraciones probadas del mAb SPE indicando el número de eventos y el promedio de complejos detectados. **B)** Histogramas representativos para el mAb 2F5.

Como ya se había descrito, el anticuerpo monoclonal SPE (Eshhar *et al.* 1980), interacciona con los receptores FcεRI de las células RBL-2H3, por lo que se usó como control positivo (Fig. 30A) observando que a diferentes concentraciones del anticuerpo se aumenta el

número de moléculas detectadas. Cuando se usó el anticuerpo 2F5 aumentó el número de moléculas que se unen al receptor específico FcεRI, como se observa en el histograma de la figura 30B. Esto confirmó la naturaleza de la unión del anticuerpo IgE a su receptor y por tanto ayudó a proponer los experimentos de degranulación utilizando como principal mediador el mAb 2F5.

Modelo de respuesta mediada por IgE (2F5) para el alérgeno profilina y su inhibición por anticuerpos neutralizantes (2D10, 1B4)

A partir de la caracterización de los mAbs murinos anti-profilina y la estabilización del dímero del alérgeno rHev b 8 se diseñaron una serie de experimentos para la caracterización de la respuesta sobre las células RBL-2H3 siguiendo la liberación y actividad de la enzima β-hexosaminidasa que se encuentra contenida en los gránulos preformados de las células efectoras. Los resultados de los diferentes estímulos sobre las células RBL-2H3 se resumen en la figura 31.

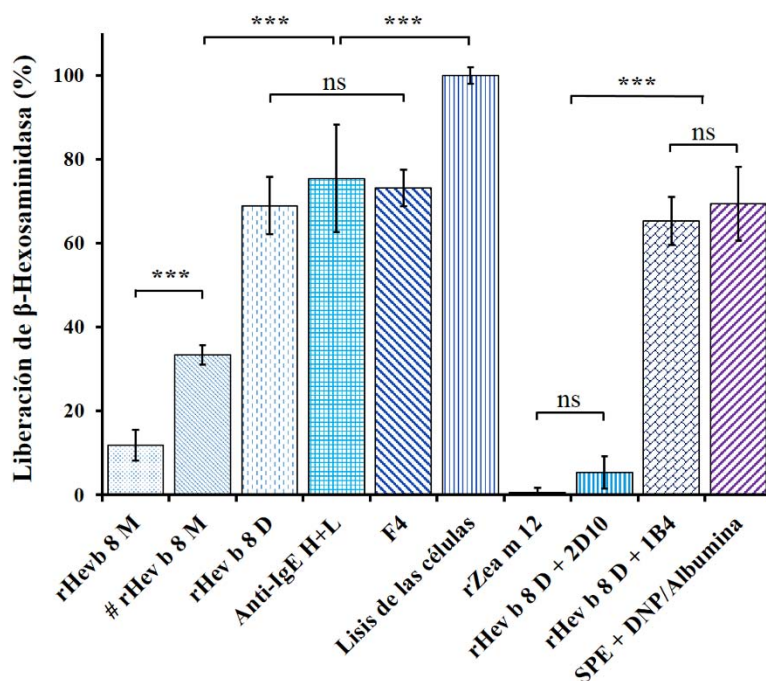


Figura 31. Ensayo de degranulación de las células RBL-2H3 medido a través de la actividad de la enzima β-Hexosaminidasa. Estímulos: rHev b 8 M, forma monomérica (130 nM), # rHev b 8 M forma monomérica al doble de concentración (260 nM), rHev b 8 D forma dimérica (130 nM), anti-IgE H+L (133.3 nM, control positivo), F4 (66.7 nM, control positivo), lisis de las células como el 100% de la actividad enzimática, rZea m 12 (260 nM, control negativo), rHev b 8 D+2D10 corresponde al dímero preincubado con el mAb 2D10 en un relación equimolar (130 nM), rHev b 8 D+1B4 corresponde al dímero preincubado con el mAb 1B4 en una relación equimolar (130 nM), SPE + DNP/Albumina (control positivo). Los datos estadísticos corresponden ns= como no significativo y ***= $P < 0.001$.

En la figura 31 se muestran los resultados de la estimulación de las células RBL-2H3 con el monómero y el dímero de rHev b 8, así como la capacidad neutralizante de los mAbs IgG1 2D10 y 1B4. Como puede apreciarse, la activación de la respuesta con el dímero es similar a la obtenida con los controles positivos, los cuales fueron seleccionados para estimular de manera distinta la respuesta en las células. El anti IgE H+L se une al mAb 2F5 favoreciendo el entrecruzamiento del anticuerpo unido a su receptor específico y activando la respuesta. El mAb F4 es un anti-FcεRI que entrecruza directamente a los receptores y promueve la degranulación de las células. También incluimos un control de un modelo de activación ya reportado (Collins *et al.* 1995; Xu *et al.* 1998), se utilizó el mAb SPE IgE anti-DNP, el hapteno se encuentra unido a albúmina como acarreador (24 moléculas de DNP por molécula de albúmina), convirtiendo a ésta en un antígeno multivalente, y con éste se observó una respuesta similar a la obtenida por el dímero. Un dato importante es que al duplicar la concentración del alérgeno monomérico (rHev b 8 M-130 nM, # rHev b 8 M-260 nM) se activa la respuesta de las células de manera significativa. El alérgeno rZea m 12 se usó como un control negativo debido a que por ELISA indirecta y BLI demostramos que no es reconocido por el mAb 2F5. Con estos resultados comprobamos que la dimerización del alérgeno efectivamente favorece la activación de la respuesta en las células RBL y que el asa que conecta la hebra-β2 con la hélice-α2 queda expuesta en la superficie del dímero de rHev b 8 de una manera simétrica (Fig. 16A, superficie transparente) lo que permite establecer su interacción con el mAb 2F5. De esta forma corroboramos las predicciones realizadas por López-Torrejón *et al.* 2007, que consideraban a esta región del asa como un determinante antigénico. Es importante mencionar que esta región es la que presenta más variabilidad al comparar con el alérgeno rZea m 12 y estructuralmente podemos sugerir que el mAb 2F5 reconoce un epítipo conformacional (Fig. 15A) que presenta una disposición de cargas en la superficie de la molécula que es fundamental para el establecimiento de las interacciones epítipo-paratopo.

Por otra parte, es importante señalar que el dímero estabilizado por la Cys13 y la simetría C2 del complejo monómero-monómero favorecen la formación de varias interacciones en la interfaz (Fig. 16C). Por otro lado, se describieron las interacciones presentes en los dímeros transitorios, los cuales han sido reportados para diferentes alérgenos (Rouvinen *et al.* 2010). El análisis del empaquetamiento cristalino de varias estructuras cristalográficas de

profilinas depositadas en el PDB, incluidos los monómeros descritos en este trabajo (Fig. 17B y C), nos permite sugerir que cuando la concentración del alérgeno aumenta, las interacciones proteína-proteína se ven favorecidas dando lugar a dímeros transitorios a través de las regiones más conservadas en esta familia de proteínas (hélice- α 1 y hélice- α 3). En general, se ha establecido que la concentración de proteínas esenciales para el mantenimiento de la homeóstasis en las células se encuentra en los límites de nanomolar a micromolar, sin embargo, la colocalización por interacciones no específicas podría incrementar esta concentración hasta valores superiores a 1mM (Kuriyan & Eisenberg 2007). La profilina es una proteína abundante en el polen de plantas, con una concentración celular (10-80 μ M) cercana a la de la actina en algunas especies (Staiger *et al.* 1997; Pernier *et al.* 2016). El efecto de la respuesta en las células RBL por la unión de los monómeros en una alta concentración se pueden explicar si consideramos la formación de dímeros transitorios, así como el efecto de colocalización por la disposición de los receptores en la membrana de las células los cuales se agrupan en clústeres (Schweitzer-Stenner *et al.* 1997; Barua & Goldstein 2012). Por lo tanto, la proximidad de los receptores con los anticuerpos IgE unidos a través de su fragmento Fc, puede favorecer el acercamiento de los alérgenos una vez que se encuentran unidos a al anticuerpo específico IgE. Este acercamiento puede permitir el establecimiento de interacciones débiles entre moléculas de rHev b 8, de una forma más rápida y específica que en solución, activando el entrecruzamiento de los receptores y generando el estímulo necesario para desencadenar la respuesta de degranulación en las células RBL como se observó para los monómeros de rHev b 8.

Un aspecto importante para inmunoterapia específica es la generación de anticuerpos que bloquean o neutralizan la respuesta alérgica inhibiendo la unión a IgE que es el principal mediador (Philips *et al.* 1999; Santos *et al.* 2015; Dodev *et al.* 2015). En ese sentido se probaron los anticuerpos 1B4 y 2D10 por su capacidad de inhibir el reconocimiento de profilina por IgE e IgG4 de suero de individuos alérgicos (Fig. 25, 26 y 27). Para inhibir la degranulación de las células RBL sensibilizadas con el mAb 2F5 se incubaron los dímeros de rHev b 8 con los mAbs para bloquear las regiones de reconocimiento. Los resultados muestran que el mAb 2D10 es capaz de inhibir la respuesta de las células al estímulo con el dímero confirmando los resultados por BLI y ELISA de competencia en los se propone, que ambos anticuerpos se unen a una región

similar del alérgeno rHev b 8. Por el contrario, con el mAb 1B4 no se observó inhibición, ya que este anticuerpo reconoce un epítopo diferente en el alérgeno lo que confirma la naturaleza multivalente de la profilina.

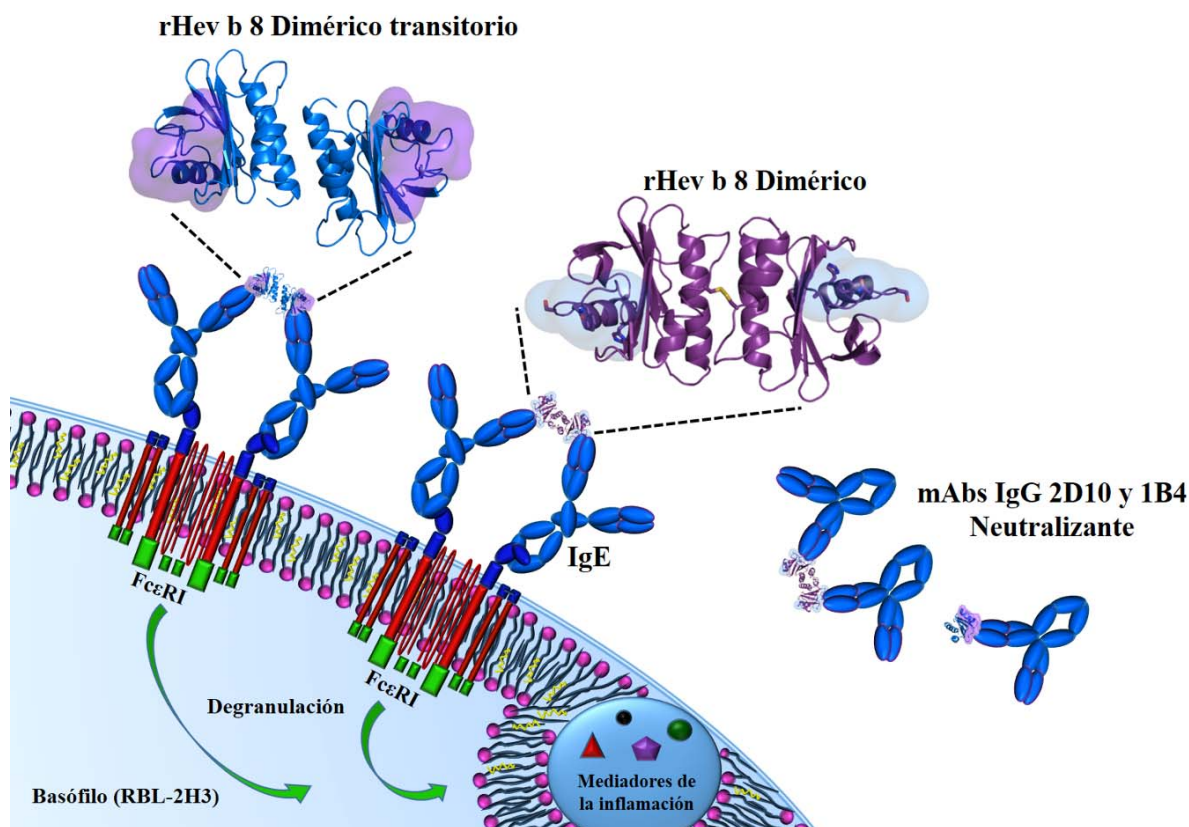


Figura 32. Esquema de la respuesta inducida por el alérgeno rHev b 8, en su forma dimérica estabilizada y en su forma monomérica transitoria sobre las células efectoras y la inhibición por anticuerpos neutralizantes.

Estudios recientes sugieren la importancia de la dimerización de los alérgenos en el reconocimiento por IgE unidos a sus receptores específicos. En este trabajo hemos caracterizado estructuralmente un dímero de profilina reportando por primera vez el tipo de interacciones que participan su estabilización. También se determinó que la formación de dímeros transitorios es suficiente para activar la respuesta de las células efectoras y se evaluaron las consecuencias de su reconocimiento por un mAb IgE unido al receptor de alta afinidad FcεRI. Nuestros datos indican que diferencias sutiles entre profilinas de plantas, principalmente en regiones no conservadas, pueden afectar significativamente el reconocimiento por anticuerpos IgE. Sin embargo, con el uso de anticuerpos monoclonales logramos corroborar que las regiones conservadas en esta familia de proteínas son un factor importante para provocar las reacciones de reactividad cruzada en el síndrome polen-látex-alimentos.

Conclusiones

Los alérgenos rHev b 8 (código PDB: 5FDS, resolución: 1.9 Å) y rZea m 12 (código PDB: 5FEF, resolución: 2.2 Å) presentaron una alta homología en su plegamiento demostrado por las estructuras tridimensionales en su forma monomérica, sin embargo, cambios sutiles en la composición de residuos les confieren características particulares en la superficie de ambos.

Se determinó por primera vez la estructura de un dímero estabilizado de profilina (rHev b 8, código PDB: 5FEG) y se caracterizaron el tipo de interacciones que llevan a su formación, sugiriendo que todas las profilinas de plantas pueden formar dímeros debido a la alta conservación de los residuos que participan en la interfaz. Un análisis del arreglo cristalográfico, sugiere además que otro tipo de interacciones en la misma región que el dímero estabilizado pueden estar sujetas a la formación de dímeros transitorios.

A través de la tecnología del hibridoma se obtuvo un conjunto de anticuerpos monoclonales anti-profilina y mediante la caracterización de la interacción de éstos con los alérgenos rHev b 8 y rZea m 12 se logró determinar que existen dos regiones inmuno-dominantes para ambos alérgenos.

A pesar de la complejidad de obtener anticuerpos del tipo IgE, en éste trabajo se aisló uno (mAb 2F5) por primera vez contra el alérgeno Hev b 8. La diferencia notable en el reconocimiento por el alérgeno Zea m 12 nos permite confirmar una región importante para el reconocimiento por este tipo de anticuerpos, que además no es parte de la interfaz entre el homo-dímero de profilina.

Se propuso un modelo *in vitro* para caracterizar las consecuencias de la dimerización del alérgeno profilina en una respuesta mediada por IgE. Observando que las formas diméricas promueven una mayor respuesta debido a la estabilidad y disposición que en conjunto caracterizan el complejo formado (FcεRI-IgE [mAb 2F5]-rHev b8) para la activación de la respuesta en las células efectoras. Sin embargo, se observó que el efecto de la concentración del alérgeno puede promover una respuesta aun cuando hablamos de una respuesta monoclonal, dirigida por varios fenómenos como son la colocalización y la formación de dímeros transitorios.

Se confirma que existe una similitud en el reconocimiento entre las IgG4 e IgE por el alérgeno profilina mediante su inhibición, empleando los mAbs IgG1 anti-rHev b 8 y el mAb IgE 2F5, por lo tanto, esto sugiere que los mAbs pueden usarse como bloqueadores de la respuesta específica en alergia.

Perspectivas

Purificar los complejos Fab (1B4, 2D10, 2F5)-rHev b 8, Fab (1B4, 2D10)-rZea m 12, para determinar mediante cristalografía de rayos X los residuos involucrados en la interacción alérgeno-anticuerpo. Poder generar variantes hipo-alérgicas de profilina que sirvan para una inmunoterapia específica más segura.

Aprovechar la naturaleza del anticuerpo mAb 2F5 IgE para hacer una descripción más detallada de las interacciones que rigen el reconocimiento por éste tipo de anticuerpos, para continuar con una línea de investigación que ayude a describir mejor los fenómenos de activación de la respuesta alérgica.

Confirmar usando profilinas de diferentes fuentes, como por ejemplo las del polen, el fenómeno de reactividad cruzada que lleva a esta familia ser considerada uno de los panalérgenos más importantes.

Bibliografia

- Aalberse, R.C., Akkerdaas, J.H. & Van Ree, R., 2001. Cross-reactivity of IgE antibodies to allergens. *Allergy*, 56, pp.478–490.
- Adams, P.D. *et al.*, 2010. PHENIX: A comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 66(2), pp.213–221.
- Afonine, P. V. *et al.*, 2012. Towards automated crystallographic structure refinement with phenix.refine. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 68(4), pp.352–367.
- Akdis, C.A. & Akdis, M., 2014. Mechanisms of immune tolerance to allergens: Role of IL-10 and Tregs. *Journal of Clinical Investigation*, 124(11), pp.4678–4680.
- Ali, M.H. & Imperiali, B., 2005. Protein oligomerization: How and why. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 13(17), pp.5013–5020.
- Aparicio-Fabre, R. *et al.*, 2006. Profilin tyrosine phosphorylation in poly-L-proline-binding regions inhibits binding to phosphoinositide 3-kinase in *Phaseolus vulgaris*. *Plant Journal*, 47(4), pp.491–500.
- Ayuso, R., Lehrer, S.B. & Reese, G., 2002. Identification of continuous, allergenic regions of the major shrimp allergen pen a 1 (Tropomyosin). *International Archives of Allergy and Immunology*, 127(1), pp.27–37.
- Babich, M. *et al.*, 1996. Profilin forms tetramers that bind to G-actin. *Biochemical and biophysical research communications*, 218(1), pp.125–31.
- Baker, N.A. *et al.*, 2001. Electrostatics of nanosystems: application to microtubules and the ribosome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(18), pp.10037–41.
- Balla, T., 2005. Inositol-lipid binding motifs: signal integrators through protein-lipid and protein-protein interactions. *J. Cell. Sci.*, 118(Pt 10), pp.2093–2104.
- Barber-Hernández, D., 2015. Could profilin be a “canary in a coal mine” of the increasing allergy epidemic? *International Archives of Allergy and Immunology*, 168(1), pp.1–2.
- Barua, D. & Goldstein, B., 2012. A mechanistic model of early FcεRI signaling: lipid rafts and the question of protection from dephosphorylation. *PLoS ONE*, 7(12), p.e51669.

-
-
- Baskaran, K. *et al.*, 2014. Open Access A PDB-wide , evolution-based assessment of protein – protein interfaces. , pp.1–11.
- Beezhold, D.H. *et al.*, 2004. The Latex Allergen Hev b 5 Is an Antigen with Repetitive Murine B-Cell Epitopes. *International Archives of Allergy and Immunology*, 134(4), pp.334–340.
- Bellinghausen, I. *et al.*, 2008. Allergological implication of the quaternary hexameric structure of the cockroach allergen Per a 3. *Clinical & Experimental Allergy*, 38(3), pp.539–548.
- Berin, M.C. & Mayer, L., 2013. Can we produce true tolerance in patients with food allergy? *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 131(1), pp.14–22.
- Bhargav, S.P. *et al.*, 2015. Two independently folding units of Plasmodium profilin suggest evolution via gene fusion. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 72(21), pp.4193–4203.
- Bousquet, J. *et al.*, 2015. Are allergic multimorbidities and IgE polysensitization associated with the persistence or re-occurrence of foetal type 2 signalling? the MeDALL hypothesis. *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 70(9), pp.1062–1078.
- Braden, B.C. & Poljak, R.J., 1995. Structural features of the reactions between antibodies and protein antigens. *The FASEB journal*, 9(1), pp.9–16.
- Capron, M. & Capron, A., 1994. Immunoglobulin E and effector cells in schistosomiasis. *Science*, 264(5167), pp.1876–1877.
- Carlsson, L. *et al.*, 1977. Actin polymerizability is influenced by profilin, a low molecular weight protein in non-muscle cells. *Journal of Molecular Biology*, 115(3), pp.465–483.
- Cases, B. *et al.*, 2011. Phosphorylation reduces the allergenicity of cow casein in children with selective allergy to goat and sheep milk. *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology*, 21(5), pp.398–400.
- Chapman, M.D. *et al.*, 2007. Nomenclature and structural biology of allergens. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 119(2), pp.414–420.
- Chen, K.W. *et al.*, 2012. Carrier-bound nonallergenic Der p 2 peptides induce IgG antibodies blocking allergen-induced basophil activation in allergic patients. *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 67(5), pp.609–621.
- Chen, V.B. *et al.*, 2010. MolProbity: All-atom structure validation for macromolecular crystallography. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 66(1), pp.12–21.
-
-

-
-
- Chesné, J., Schmidt-Weber, C.B. & Esser von-Bieren, J., 2016. The use of adjuvants for enhancing allergen immunotherapy efficacy. *Immunology and Allergy Clinics of North America*, 36(1), pp.125–145.
- Chik, J.K., Lindberg, U. & Schutt, C.E., 1996. The structure of an open state of β -actin at 2.65 Å resolution. *Journal of Molecular Biology*, 263(4), pp.607–623.
- Chruszcz, M., Chapman, M.D., *et al.*, 2012. Alternaria alternata allergen Alt a 1: A unique β -barrel protein dimer found exclusively in fungi. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 130(1), pp.241–247.
- Chruszcz, M., Pomés, A., *et al.*, 2012. Molecular determinants for antibody binding on group 1 house dust mite allergens. *Journal of Biological Chemistry*, 287(10), pp.7388–7398.
- Chruszcz, M. *et al.*, 2011. Structural and immunologic characterization of Ara h 1, a major peanut allergen. *Journal of Biological Chemistry*, 286(45), pp.39318–39327.
- Collins, A.M., Thelian, D. & Basil, M., 1995. Antigen valency as a determinant of the responsiveness of IgE-sensitized rat basophil leukemia cells. *International Archives of Allergy and Immunology*, 107(4), pp.547–556.
- Cooley, L., Verheyen, E. & Ayers, K., 1992. chickadee encodes a profilin required for intercellular cytoplasm transport during Drosophila oogenesis. *Cell*, 69(1), pp.173–184.
- Dodev, T.S. *et al.*, 2015. Inhibition of allergen-dependent IgE activity by antibodies of the same specificity but different class. *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 70(6), pp.720–724.
- Domke, T. *et al.*, 1997. Birch pollen profilin: Structural organization and interaction with poly-(L-proline) peptides as revealed by NMR. *FEBS Letters*, 411(2–3), pp.291–295.
- Emsley, P. & Cowtan, K., 2004. Coot: Model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 60(12 I), pp.2126–2132.
- Eshhar, Z., 1985. *Hybridoma Technology in the Biosciences and Medicine* 1st edition. T. A. Springer, ed., Boston, MA: Springer US.
- Eshhar, Z., Ofarim, M. & Waks, T., 1980. Generation of hybridomas secreting murine reagenic antibodies of anti-DNP specificity. *The Journal of Immunology*, 124(2), pp.775–780.
- Estep, P. *et al.*, 2013. High throughput solution-based measurement of antibody-antigen affinity and epitope binning. *mAbs*, 5(2), pp.270–278.
- Fedorov, A.A. *et al.*, 1997. The molecular basis for allergen cross-reactivity: crystal structure and IgE-epitope mapping of birch pollen profilin. *Structure*, 5(1), pp.33–45.
-
-

-
-
- Galli, S.J., Tsai, M. & Piliponsky, A.M., 2008. The development of allergic inflammation. *Nature*, 454(7203), pp.445–54.
- Goldschmidt-Clermont, P.J. *et al.*, 1990. The actin-binding protein profilin binds to PIP2 and inhibits its hydrolysis by phospholipase C. *Science*, 247(4950), pp.1575–1578.
- Gould, H.J. *et al.*, 2003. The biology of IgE and the basis of allergic disease. *Annual Review of Immunology*, 21(1), pp.579–628.
- Gould, H.J. & Sutton, B.J., 2008. IgE in allergy and asthma today. *Nature reviews. Immunology*, 8(3), pp.205–17.
- Guillén, G. *et al.*, 2001. Biochemical characterization of profilin from seeds of *Phaseolus vulgaris* L. *Plant & cell physiology*, 42(1), pp.54–62.
- Hauser, M. *et al.*, 2010. Panallergens and their impact on the allergic patient. *Allergy, asthma, and clinical immunology*, 6(1), pp.1–14.
- Hodge, E. & Sayers, I., 2013. Allergy. *eLS*, 1, pp.1–12.
- Holt, M.R. & Koffer, A., 2001. Cell motility: Proline-rich proteins promote protrusions. *Trends in Cell Biology*, 11(1), pp.38–46.
- Jimenez-Lopez, J.C. *et al.*, 2012. Characterization of profilin polymorphism in pollen with a focus on multifunctionality. *PLoS ONE*, 7(2), p.e30878.
- Jimenez-Lopez, J.C., Rodríguez-García, M.I. & Alché, J.D., 2013. Analysis of the effects of polymorphism on pollen profilin structural functionality and the generation of conformational, T- and B-cell epitopes. *PLoS ONE*, 8(10), p.e76066.
- Jockusch, B.M., Murk, K. & Rothkegel, M., 2007. The profile of profilins. *Review in physiological Biochemistry Pharmacology*, 159, pp.131–149.
- Jonckheere, V. *et al.*, 1999. Dimerization of profilin II upon binding the (GP5)3 peptide from VASP overcomes the inhibition of actin nucleation by profilin II and thymosin β 4. *FEBS Letters*, 447(2–3), pp.257–263.
- Jutel, M. *et al.*, 2016. International consensus on allergen immunotherapy II: Mechanisms, standardization, and pharmacoeconomics. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 137(2), pp.358–368.
- Kabsch, W., 2010. Xds. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 66(2), pp.125–132.
- Kaczorowski, M. & Jutel, M., 2013. Human T regulatory cells: On the way to cognition. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, 61(3), pp.229–236.
-
-

-
-
- Kaiser, D.A. *et al.*, 1989. Characterization of renatured profilin purified by urea elution from poly-L-proline agarose columns. *Cell motility and the cytoskeleton*, 14(2), pp.251–62.
- Kandasamy, M.K., McKinney, E.C. & Meagher, R.B., 2002. Plant profilin isovariants are distinctly regulated in vegetative and reproductive tissues. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, 52(1), pp.22–32.
- Kofler, S. *et al.*, 2014. Stabilization of the dimeric birch pollen allergen Bet v 1 impacts its immunological properties. *Journal of Biological Chemistry*, 289(1), pp.540–551.
- Korenbaum, E. *et al.*, 1998. The role of profilin in actin polymerization and nucleotide exchange. *Biochemistry*, 37(26), pp.9274–9283.
- Kovar, D.R., Drøbak, B.K. & Staiger, C.J., 2000. Maize profilin isoforms are functionally distinct. *The Plant cell*, 12(4), pp.583–98.
- Kozakov, D. *et al.*, 2015. The FTMap family of web servers for determining and characterizing ligand-binding hot spots of proteins. *Nature protocols*, 10(5), pp.733–55.
- Krissinel, E. & Henrick, K., 2007. Inference of macromolecular assemblies from crystalline state. *Journal of Molecular Biology*, 372(3), pp.774–797.
- Kuriyan, J. & Eisenberg, D., 2007. The origin of protein interactions and allostery in colocalization. *Nature*, 450(7172), pp.983–90.
- Kursula, I. *et al.*, 2008. Structural basis for arsite-specific functions of the divergent profilin of Plasmodium falciparum. *Structure*, 16(11), pp.1638–1648.
- Kursula, P. *et al.*, 2008. High-resolution structural analysis of mammalian profilin 2a complex Formation with Two physiological ligands: The formin homology 1 domain of mDia1 and the proline-rich domain of VASP. *Journal of Molecular Biology*, 375(1), pp.270–290.
- Lambrechts, A. *et al.*, 2002. Mutational analysis of human profilin I reveals a second PI(4,5)-P2 binding site neighbouring the poly(L-proline) binding site. *BMC biochemistry*, 3, pp.1–12.
- Lambrechts, A. *et al.*, 2000. Profilin II is alternatively spliced, resulting in profilin isoforms that are differentially expressed and have distinct biochemical properties. *Molecular and cellular biology*, 20(21), pp.8209–8219.
- Lassing, I. & Lindberg, U., 1985. Specific interaction between phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and profilactin. *Nature*, 314(4), pp.472–474.
- Levin, M. *et al.*, 2014. Human IgE against the major allergen Bet v 1 - defining an epitope with limited cross-reactivity between different PR-10 family proteins. *Clinical and Experimental Allergy*, 44(2), pp.288–299.
-
-

-
-
- Li, M. *et al.*, 2011. Carbohydrates contribute to the interactions between cockroach allergen Bla g 2 and a monoclonal antibody. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 186(1), pp.333–340.
- Li, M. *et al.*, 2008. Crystal structure of a dimerized cockroach allergen Bla g 2 complexed with a monoclonal antibody. *Journal of Biological Chemistry*, 283(33), pp.22806–22814.
- Limmongkon, A. *et al.*, 2004. MAP kinase phosphorylation of plant profilin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 324(1), pp.382–386.
- Lindblad, E.B., 2004. Aluminium compounds for use in vaccines. *Journal of pharmaceutical sciences*, 82, pp.497–505.
- Liu, F.T. *et al.*, 1980. Monoclonal dinitrophenyl-specific murine IgE antibody: preparation, isolation, and characterization. *Journal of immunology*, 124(6), pp.2728–2737.
- López-Torrejón, G. *et al.*, 2007. An experimental and modeling-based approach to locate IgE epitopes of plant profilin allergens. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 119(6), pp.1481–1488.
- Lorenz, C.D., Faraudo, J. & Travesset, A., 2008. Hydrogen bonding and binding of polybasic residues with negatively charged mixed lipid monolayers. *Langmuir*, 24(5), pp.1654–1658.
- Lu, J. & Pollard, T.D., 2001. Profilin Binding to Poly-L-Proline and Actin Monomers along with Ability to Catalyze Actin Nucleotide Exchange Is Required for Viability of Fission Yeast. *Molecular Biology of the Cell*, 12(4), pp.1161–1175.
- Lu, P.J. *et al.*, 1996. Lipid products of phosphoinositide 3-kinase bind human profilin with high affinity. *Biochemistry*, 35(44), pp.14027–14034.
- Machesky, L.M. *et al.*, 1994. Vaccinia virus expresses a novel profilin with a higher affinity for polyphosphoinositides than actin. *Biochemistry*, 33(35), pp.10815–10824.
- Mahoney, N.M., Janmey, P. a & Almo, S.C., 1997. Structure of the profilin-poly-L-proline complex involved in morphogenesis and cytoskeletal regulation. *Nature structural biology*, 4(11), pp.953–960.
- Martínez-Caballero, S. *et al.*, 2014. Comparative study of two GH19 chitinase-like proteins from *Hevea brasiliensis*, one exhibiting a novel carbohydrate-binding domain. *FEBS Journal*, 281(19), pp.4535–4554.
- McDowell, J.M. *et al.*, 1996. Structure and evolution of the actin gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics*, 142, pp.587–602.
-
-

-
-
- McKenna, O.E. *et al.*, 2016. How relevant is panallergen sensitization in the development of allergies? *Pediatric Allergy and Immunology*, 27(6), pp.560–568.
- Mellon, M.B., Frank, B.T. & Fang, K.C., 2002. Mast cell alpha-chymase reduces IgE recognition of birch pollen profilin by cleaving antibody-binding epitopes. *Journal of immunology*, 168(1), pp.290–297.
- Mindykowski, B. *et al.*, 2010. Cockroach allergens Per a 3 are oligomers. *Developmental and Comparative Immunology*, 34(7), pp.722–733.
- Mirza, O. *et al.*, 2000. Dominant Epitopes and Allergic Cross-Reactivity: Complex Formation Between a Fab Fragment of a Monoclonal Murine IgG Antibody and the Major Allergen from Birch Pollen Bet v 1. *The Journal of Immunology*, 165, pp.331–338.
- Mittermann, I. *et al.*, 1998. Oligomerization of profilins from birch, man and yeast. Profilin, a ligand for itself? *Sexual Plant Reproduction*, 11(4), pp.183–191.
- Mockrin, S.C. & Korn, E.D., 1980. Acanthamoeba profilin interacts with G-actin to increase the rate of exchange of actin-bound adenosine 5'-triphosphate. *Biochemistry*, 19(23), pp.5359–5362.
- Morris, G., 2007. Epitope Mapping: B-cell Epitopes. *Encyclopedia of Life Sciences*, (1), pp.1–3.
- Mueller, G.A. *et al.*, 2014. Characterization of an anti-Bla g 1 scFv: Epitope mapping and cross-reactivity. *Molecular Immunology*, 59(2), pp.200–207.
- Di Nardo, a *et al.*, 2000. Alternative splicing of the mouse profilin II gene generates functionally different profilin isoforms. *Journal of cell science*, 113 Pt 21, pp.3795–3803.
- Niemi, M. *et al.*, 2015. Dimerization of lipocalin allergens. *Scientific Reports*, 5, p.5:13841. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/srep13841>.
- Niemi, M. *et al.*, 2007. Molecular interactions between a recombinant IgE antibody and the β -Lactoglobulin allergen. *Structure*, 15(11), pp.1413–1421.
- Noon, L. & Cantab, B., 1911. Prophylactic inoculation againts Hay fever. *The Lancet*, 177(4580), pp.1572–1573.
- Oechsner, U., Magdolen, V. & Bandlow, W., 1987. The cDNA and deduced amino acid sequence of profilin from *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Research*, 15(21), p.9078.
- Offermann, L.R. *et al.*, 2016. Structural, functional, and immunological characterization of profilin panallergens Amb a 8, Art v 4, and Bet v 2. *Journal of Biological Chemistry*, 291(30), pp.15447–15459.
-
-

-
-
- Orovitg, A. *et al.*, 2011. Enhanced diagnosis of pollen allergy using specific immunoglobulin E determination to detect major allergens and panallergens. *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology*, 21(4), pp.253–259.
- Ortega, E., Schweitzer-Stenner, R. & Pecht, I., 1988. Possible orientational constraints determine secretory signals induced by aggregation of IgE receptors on mast cells. *The EMBO journal*, 7(13), pp.4101–4109.
- Padavattan, S. *et al.*, 2009. High-affinity IgE recognition of a conformational epitope of the major respiratory allergen Phl p 2 as revealed by X-ray crystallography. *Journal of immunology*, 182(4), pp.2141–2151.
- Padavattan, S. *et al.*, 2007. Identification of a B-cell epitope of hyaluronidase, a major bee venom allergen, from its crystal Structure in Complex with a Specific Fab. *Journal of Molecular Biology*, 368(3), pp.742–752.
- Palomares, O., 2013. The role of regulatory T cells in IgE-mediated food allergy. *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology*, 23(6), pp.371–382.
- Pantaloni, D. & Carlier, M.F., 1993. How profilin promotes actin filament assembly in the presence of thymosin β 4. *Cell*, 75(5), pp.1007–1014.
- Passalacqua, G. & Canonica, G.W., 2016. Allergen Immunotherapy: History and Future Developments. *Immunology and Allergy Clinics of North America*, 36(1), pp.1–12.
- Pauling, L., 1940. A Theory of the Structure and Process of Formation of Antibodies *. *Journal of the American Chemical Society*, 62(10), pp.2643–2657.
- Pawankar, R., 2014. Allergic diseases and asthma: a global public health concern and a call to action. *World Allergy Organization Journal*, 7(1), p.12.
- Perelroizen, I. *et al.*, 1996. Role of nucleotide exchange and hydrolysis in the function of profilin in actin assembly. *Journal of Biological Chemistry*, 271(21), pp.12302–12309.
- Pernier, J. *et al.*, 2016. Profilin interaction with actin filament barbed end controls dynamic instability, capping, branching, and motility. *Developmental Cell*, 36(2), pp.201–214.
- Philips, J.R. *et al.*, 1999. The effectiveness of different rat IgG subclasses as IgE-blocking antibodies in the rat basophil leukaemia cell model. *Immunology and Cell Biology*, 77(2), pp.121–126.
- Pomés, A. *et al.*, 2015. Interfaces between allergen structure and diagnosis: Know your epitopes. *Current Allergy and Asthma Reports*, 15(8), pp.1–13.
-
-

-
-
- Porta, J.C. & Borgstahl, G.E.O., 2012. Structural basis for profilin-mediated actin nucleotide exchange. *Journal of Molecular Biology*, 418(1–2), pp.103–116.
- Psaradellis, T., Kao, N.L. & Babich, M., 2000. Recombinant *Zea mays* profilin forms multimers with pan-allergenic potential. *Allergology International*, 49(1), pp.27–35.
- Rajan, T. V., 2003. The Gell-Coombs classification of hypersensitivity reactions: A re-interpretation. *Trends in Immunology*, 24(7), pp.376–379.
- Reese, G. *et al.*, 2007. Allergenicity and antigenicity of wild-type and mutant, monomeric, and dimeric carrot major allergen Dau c 1: Destruction of conformation, not oligomerization, is the roadmap to save allergen vaccines. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 119(4), pp.944–951.
- Reichstein I and Korn ED, 1979. Acanthamoeba Profilin. *The journal of Biological Chemistry*, 254(13), pp.6174–6179.
- Ren, H. & Xiang, Y., 2007. The function of actin-binding proteins in pollen tube growth. *Protoplasma*, 230(3), pp.171–182.
- Reverberi, R. & Reverberi, L., 2007. Factors affecting the antigen-antibody reaction. *Blood Transfusion*, 5(4), pp.227–240.
- Richer, S.M. *et al.*, 2009. High affinity binding to profilin by a covalently constrained, soluble mimic of phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate micelles. *ACS Chemical Biology*, 4(9), pp.733–739.
- Rihs, H.P. *et al.*, 2000. PCR-based cloning, isolation, and IgE-binding properties of recombinant latex profilin (rHev b 8). *Allergy*, 55(8), pp.712–717.
- Rouvinen, J. *et al.*, 2010. Transient dimers of allergens S. Zhang, ed. *PLoS ONE*, 5(2), p.e9037.
- Sanders, M. *et al.*, 2016. Comparison of Enzyme-linked Immunosorbent assay, surface plasmon resonance and biolayer interferometry for screening of deoxynivalenol in Wheat and Wheat Dust. *Toxins*, 8(4), pp.1–14.
- Santos, A. & Van Ree, R., 2011. Profilins: Mimickers of allergy or relevant allergens? *International Archives of Allergy and Immunology*, 155(3), pp.191–204.
- Santos, A.F. *et al.*, 2015. IgG4 inhibits peanut-induced basophil and mast cell activation in peanut-tolerant children sensitized to peanut major allergens. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 135(5), pp.1249–1256.
- Sathish, K. *et al.*, 2004. Phosphorylation of profilin regulates its interaction with actin and poly (L-proline). *Cellular Signalling*, 16(5), pp.589–596.
-
-

-
-
- Schlüter, K., Jockusch, B.M. & Rothkegel, M., 1997. Profilins as regulators of actin dynamics. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1359(2), pp.97–109.
- Schöll, I. *et al.*, 2005. Dimerization of the major birch pollen allergen Bet v 1 is important for its in vivo IgE-cross-linking potential in mice. *The Journal of Immunology*, 175(10), pp.6645–6650.
- Schweitzer-Stenner, R., Tamir, I. & Pecht, I., 1997. Analysis of Fc(epsilon)RI-mediated mast cell stimulation by surface-carried antigens. *Biophysical journal*, 72(6), pp.2470–2478.
- Segal, D.M., Taurog, J.D. & Metzger, H., 1977. Dimeric immunoglobulin E serves as a unit signal for mast cell degranulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74(7), pp.2993–2997.
- Sela-Culang, I., Kunik, V. & Ofran, Y., 2013. The structural basis of antibody-antigen recognition. *Frontiers in Immunology*, 4, pp.1–13.
- Simossis, V.A. & Heringa, J., 2005. PRALINE: A multiple sequence alignment toolbox that integrates homology-extended and secondary structure information. *Nucleic Acids Research*, 33, pp.289–294.
- Singh, S.S. *et al.*, 1996. Profilin and Gelsolin stimulate phosphatidylinositol 3-kinase activity †. *Biochemistry*, 35(51), pp.16544–16549.
- Skare, P. & Karlsson, R., 2002. Evidence for two interaction regions for phosphatidyl(4,5)-bisphosphate on mammalian profilin I. *FEBS Lett*, 522, pp.119–124.
- Staiger, C.J. *et al.*, 1997. Profilin and actin-depolymerizing factor: modulators of actin organization in plants. *Trends in Plant Science*, 2(7), pp.275–281.
- Staiger, C.J. *et al.*, 1993. The profilin multigene family of maize: differential expression of three isoforms. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, 4(4), pp.631–41.
- Stanic, B. *et al.*, 2015. IL-10-overexpressing B cells regulate innate and adaptive immune responses. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 135(3), pp.771–780.
- Strohalm, M. *et al.*, 2010. MMass 3: A cross-platform software environment for precise analysis of mass spectrometric data. *Analytical Chemistry*, 82(11), pp.4648–4651.
- Thorn, K.S. *et al.*, 1997. The crystal structure of a major allergen from plants. *Structure*, 5, pp.19–32.
- Tordesillas, L. *et al.*, 2010. Characterization of IgE epitopes of Cuc m 2, the major melon allergen, and their role in cross-reactivity with pollen profilins. *Clinical and Experimental Allergy*, 40(1), pp.174–181.
-
-

-
-
- Valenta, R. *et al.*, 1991. Identification of profilin as a novel pollen allergen; IgE autoreactivity in sensitized individuals. *Science*, 253(5019), pp.557–560.
- Valenta, R. *et al.*, 1992. Profilins Constitute a Novel Family of Functional Plant Pan-allergens. *Journal. Exp. Med.*, 175(February), pp.377–385.
- Valenta, R. *et al.*, 1991. Recombinant allergens for immunoblot diagnosis of tree-pollen allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 88(6), pp.889–894.
- Wagner, R., 1964. Clemens Von Pirquet, Discoverer of the Concept of Allergy. *Bulletin of the New York Academy of Medicine*, 40(3), pp.229–235.
- Wang, Y. *et al.*, 2013. Crystal structure of peanut (*Arachis hypogaea*) allergen Ara h 5. *Journal of agricultural and food chemistry*, 61(7), pp.1573–1578.
- Williams, J.W., Tjota, M.Y. & Sperling, A.I., 2012. The contribution of allergen-specific IgG to the development of th2-mediated airway inflammation. *Journal of allergy*, p.236075.
- Winn, M.D. *et al.*, 2011. Overview of the CCP4 suite and current developments. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 67(4), pp.235–242.
- Witke, W., 2004. The role of profilin complexes in cell motility and other cellular processes. *Trends in Cell Biology*, 14(8), pp.461–469.
- Woodfolk, J.A. *et al.*, 2015. Allergens , sources , particles , and molecules : Why do we make IgE responses ? *Allergology International*, 64(4), pp.295–303.
- Wopfner, N. *et al.*, 2002. Molecular and immunological characterization of profilin from mugwort pollen. *Biological Chemistry*, 383(11), pp.1779–1789.
- Wu, L.C. & Zarrin, A. a, 2014. The production and regulation of IgE by the immune system. *Nature reviews. Immunology*, 14(4), pp.247–259.
- Xu, K. *et al.*, 1998. Kinetics of multivalent antigen DNP-BSA binding to IgE-Fc ϵ RI in relationship to the stimulated tyrosine phosphorylation of Fc ϵ RI. *Journal of immunology*, 160(7), pp.3225–3235.
- Yusnawan, E., Marquis, C.P. & Lee, N.A., 2012. Purification and characterization of Ara h1 and Ara h3 from four peanut market types revealed higher order oligomeric structures. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(41), pp.10352–10358.

Anexo 1



*Ek: Enterocinasa



*TEV: Tobacco Etch Virus

Figura 1. Construcciones para la obtención de los alérgenos recombinantes en el sistema pET28c.

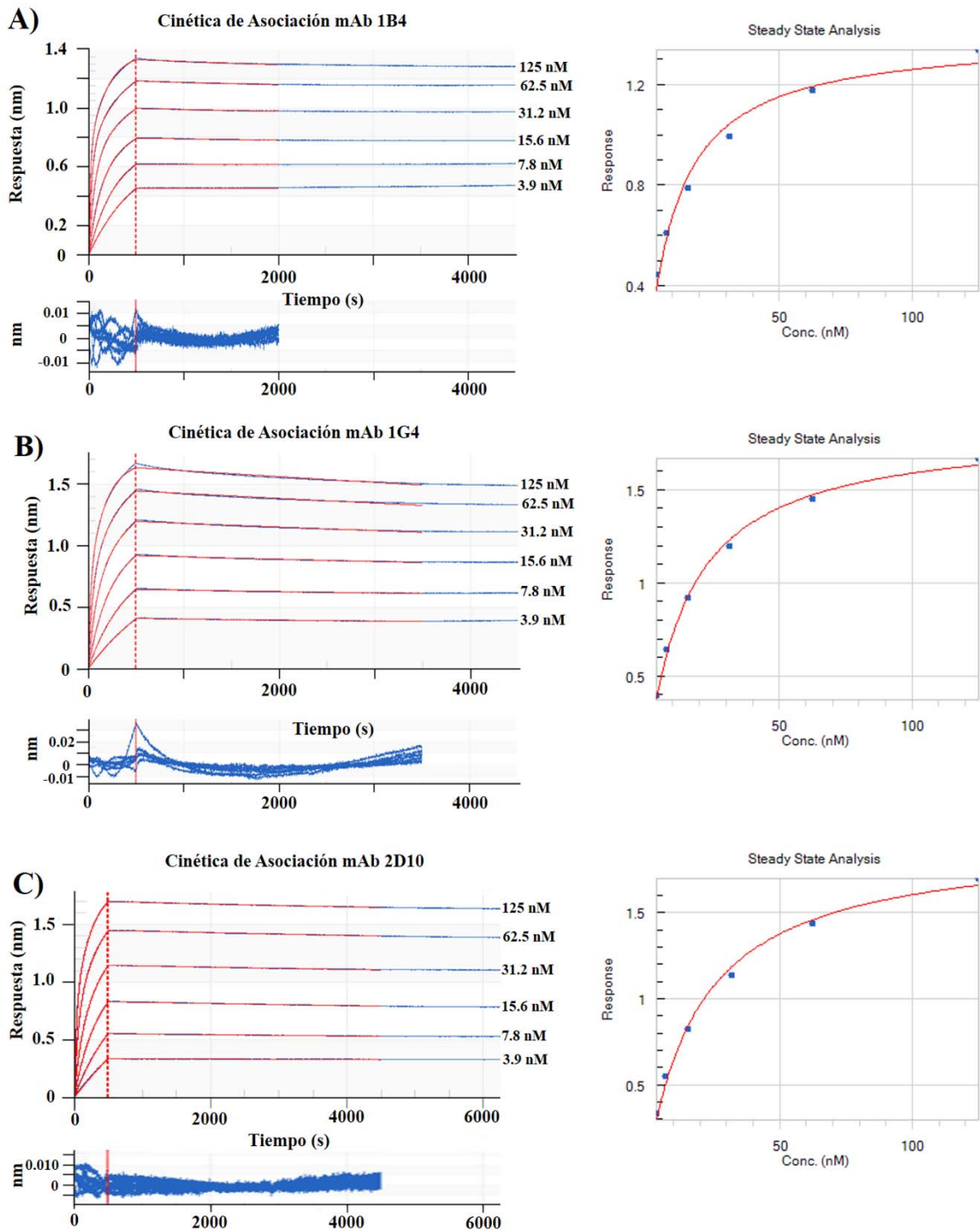


Figura 3. Cinéticas de unión entre el alérgeno rHes b 8 y los mAbs 1B4, 1G4 y 2D10 por BLI. A la izquierda Se muestran los interferogramas con diferentes concentraciones de cada uno de los anticuerpos y a la derecha el ajuste en el estado estacionario.

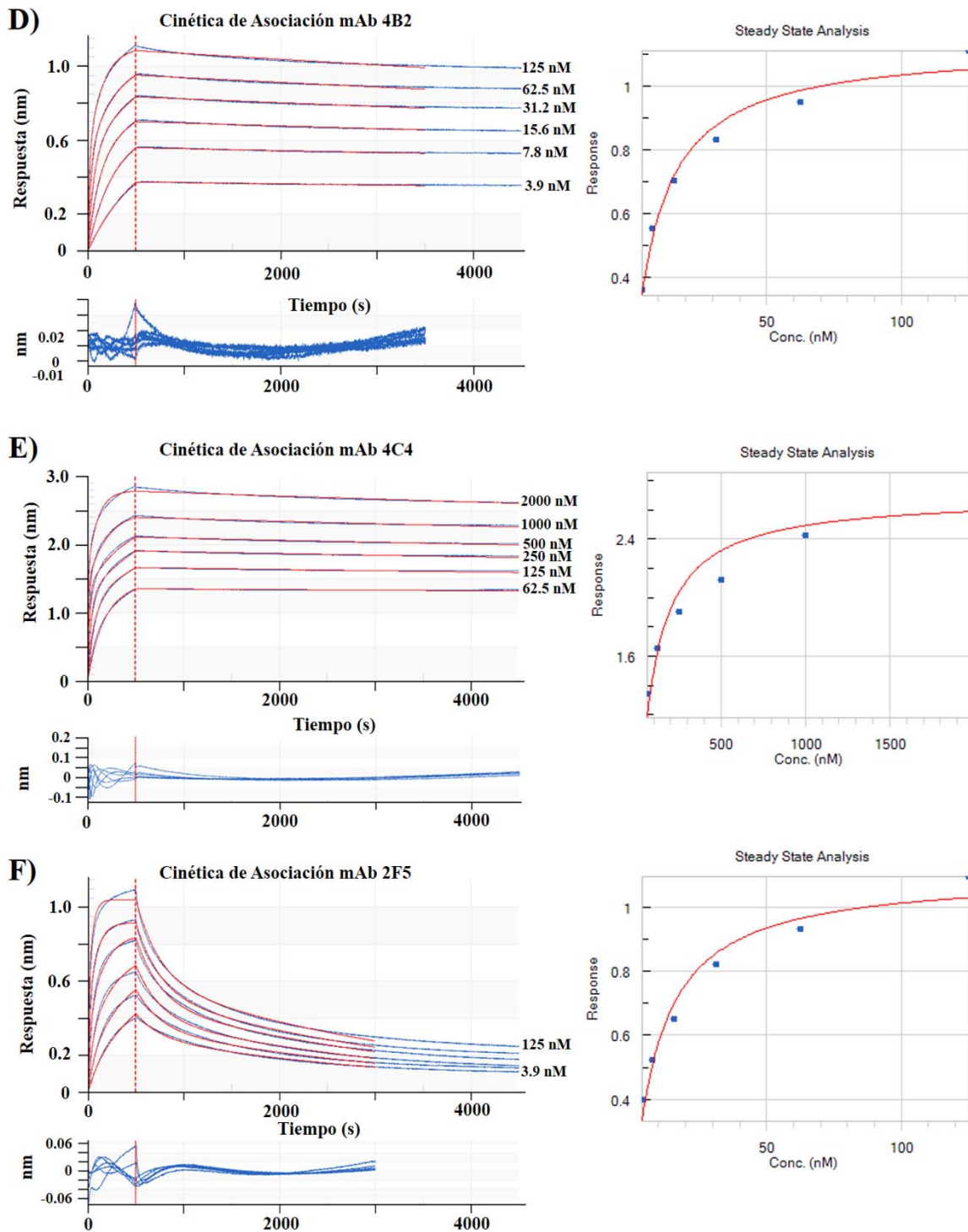


Figura 3 (continuación). Cinéticas de unión entre el alérgeno rHes b 8 y los mAbs 4B2, 4C4 y 2F5 por BLI. A la izquierda Se muestran los interferogramas con diferentes concentraciones de cada uno de los anticuerpos y a la derecha el ajuste en el estado estacionario.

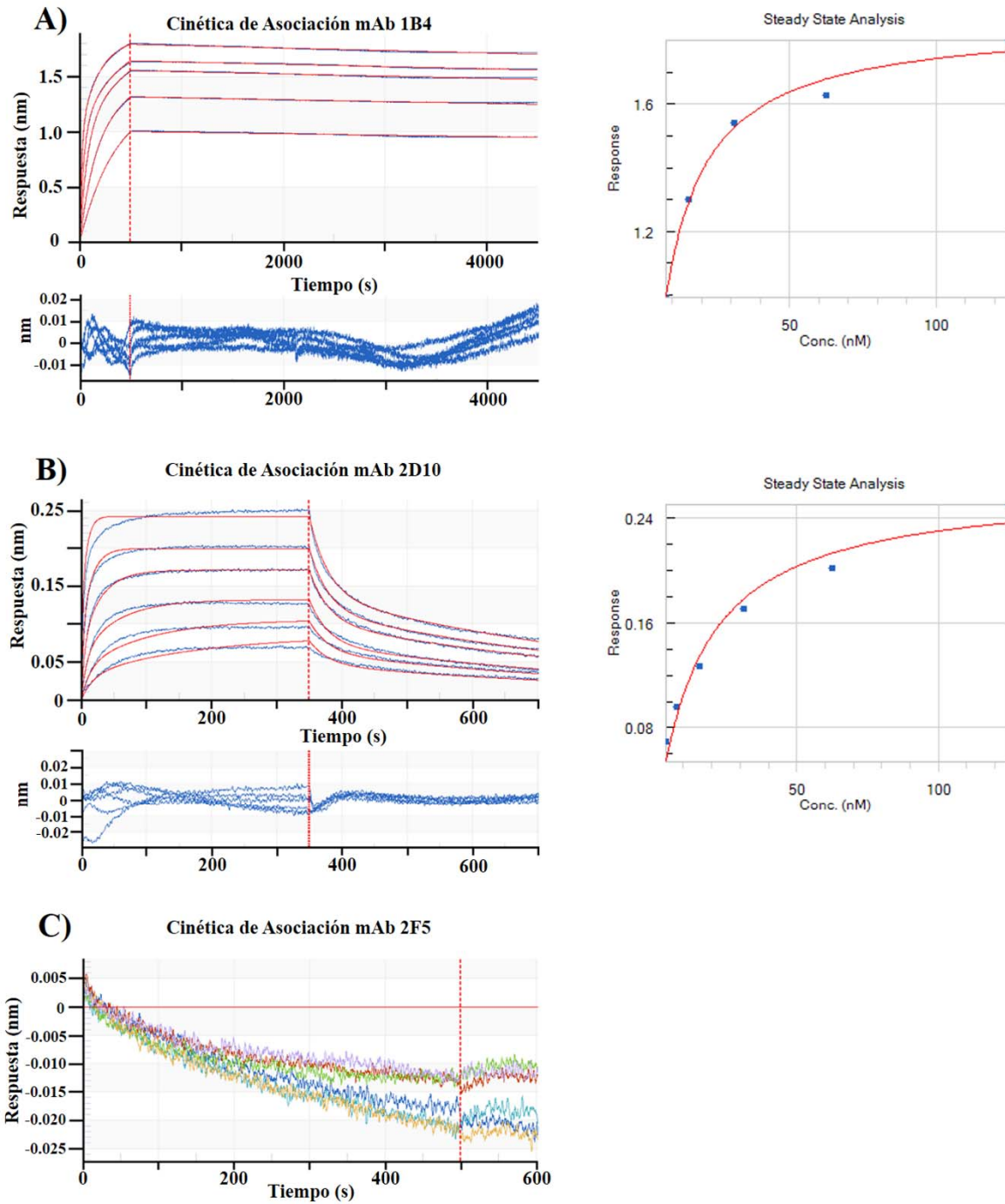


Figura 4. Cinéticas de unión entre el alérgeno rZea m 12 y los mAbs 1B4, 2D10 y 2F5 por BLI. A la izquierda Se muestran los interferogramas con diferentes concentraciones de cada uno de los anticuerpos y a la derecha el ajuste en el estado estacionario.

SCIENTIFIC REPORTS



OPEN

Structural insights into the IgE mediated responses induced by the allergens Hev b 8 and Zea m 12 in their dimeric forms

Israel Mares-Mejía¹, Siseth Martínez-Caballero¹, Claudia Garay-Canales², Patricia Cano-Sánchez¹, Alfredo Torres-Larios³, Samuel Lara-González⁴, Enrique Ortega² & Adela Rodríguez-Romero¹

Received: 23 March 2016

Accepted: 09 August 2016

Published: 02 September 2016

Oligomerization of allergens plays an important role in IgE-mediated reactions, as effective crosslinking of IgE- FcεRI complexes on the cell membrane is dependent on the number of exposed B-cell epitopes in a single allergen molecule or on the occurrence of identical epitopes in a symmetrical arrangement. Few studies have attempted to experimentally demonstrate the connection between allergen dimerization and the ability to trigger allergic reactions. Here we studied plant allergenic profilins rHev b 8 (rubber tree) and rZea m 12 (maize) because they represent an important example of cross-reactivity in the latex-pollen-food syndrome. Both allergens in their monomeric and dimeric states were isolated and characterized by exclusion chromatography and mass spectrometry and were used in immunological *in vitro* experiments. Their crystal structures were solved, and for Hev b 8 a disulfide-linked homodimer was found. Comparing the structures we established that the longest loop is relevant for recognition by IgE antibodies, whereas the conserved regions are important for cross-reactivity. We produced a novel monoclonal murine IgE (mAb 2F5), specific for rHev b 8, which was useful to provide evidence that profilin dimerization considerably increases the IgE-mediated degranulation in rat basophilic leukemia cells.

It has been recognized that the study of protein oligomerization is relevant from several perspectives, since this phenomenon can regulate the function of the protein or can create higher-order structures¹. An important implication of protein oligomerization has been acknowledged in type I hypersensitivity reactions, where the effect of allergen dimerization and their multivalent characteristics promotes its recognition by specific IgE antibodies bound to high affinity FcεRI receptors on the surface of mast cells and basophils². This interaction triggers the cross-linking of FcεRI on the effector cell membranes, and a concomitant activation of biochemical pathways leads to degranulation and the release of various mediators such as histamine and lipids, which cause inflammatory reactions³. Oligomerization phenomena and its consequences have been explained for some allergens such as Ara h 1 (cupin; vicillin-type protein)⁴, Ara h 3 (cupin; legumin-type protein)⁵, Bos d 5 (β-lactoglobulin)⁶, Bet v 1 (pathogenesis-related protein)^{7,8}, Alt a 1 (β-barrel protein)⁹, Bla g 2 (aspartic proteinase from the cockroach)¹⁰, and Per a 3 (hemocyanin from the American cockroach)¹¹.

Profilin is an ubiquitous cytoskeletal protein that interacts with several molecules, such as actin, proline-rich ligands, and phosphoinositides to perform several cellular functions. For the human profilin isoforms PFN1 and PFN2, oligomerization has been implicated in their regulation and binding to G-actin, where PFN1 acts as a tetramer¹². It has also been reported that dimers of these human isoforms bind peptides derived from the vasodilator-stimulated phosphoprotein, thus affecting the regulation of G-actin polymerization¹³. These reports provide evidence that the oligomerization of profilin confers different properties by affecting its binding to

¹Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior, Cd. Universitaria, Coyoacán, Ciudad de México, 04510. ²Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Escolar, Cd. Universitaria, Coyoacán, Ciudad de México, 04510. ³Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior, Cd. Universitaria, Coyoacán, Ciudad de México, 04510. ⁴Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, Camino a la Presa San José 2055, Col. Lomas 4a. Sección, San Luis Potosí, México, 78216. Correspondence and requests for materials should be addressed to A.R.-R. (email: adela@unam.mx)

different ligands. Profilin is also an important allergen present in pollen grains, food plants, and rubber tree, and it is considered a pan-allergen, because it is present in all eukaryotic cells and is therefore involved in allergic cross-reactions. It has recently been reported that in areas with high pollen exposure, profilin prevalence can reach 60% in allergic individuals^{14,15}, and in those regions this allergen can induce severe food-allergic reactions, even at very low concentrations. Studies concerning the oligomerization of this plant allergen are scarce; however, it has been shown that two profilin isoforms (Art v 4.01 and Art v 4.02) from mugwort pollen form dimers and tetramers that are stabilized by disulfide bonds or ionic interactions, and it was postulated that the oligomerization of these molecules increased their allergenicity¹⁶. The same authors found, in western blot experiments, that oligomers of these profilin isoforms did not differ in their ability to bind serum IgE from allergic patients; when compared with the results obtained with the monomers; however, they proposed that oligomers would have additional epitopes, which would increase their allergenic potential.

Even though there have been some investigations describing profilin oligomers related to their function or in allergy, mainly using bioinformatics tools, the structural characterization of a dimeric form of a plant profilin allergen and the description of its ability to induce IgE mediated responses has not been experimentally demonstrated thus far. Here we isolated the monomeric and dimeric species of the recombinant profilin allergens rHev b 8 and rZea m 12 and obtained their crystallographic 3D structures. These two profilin allergens have a high sequence identity (79.4%) that is comparable with the differences that may exist between isoforms of the same organism. We described the molecular interactions at the interface of dimeric rHev b 8, which exhibited a disulfide bridge between the Cys-13 of both monomers that is located in a highly conserved region of the plant profilin family. A murine monoclonal IgE (mAb 2F5) specific for rHev b 8 was generated, which exhibited high affinity as determined by biolayer interferometry. A comparison of the mAb 2F5 interactions with both allergens in their monomeric and dimeric forms showed that it only recognized rHev b 8, whereas IgEs from sera of allergic individuals showed a similar recognition for both allergens in their monomeric form demonstrating cross-reactivity. Finally, we demonstrated that the dimeric form of rHev b 8 is more efficient than the monomeric form promoting significant degranulation in rat basophilic leukemia cells (RBL-2H3).

Results

Biochemical and structural characterization of rHev b 8 and rZea m 12. The production of recombinant profilins and the purification strategies implemented in this work, substitute the poly (L-proline) affinity columns that commonly use 3–6 M urea to elute the protein¹⁷, which could affect the refolding and crystallization of these proteins. The final yield for both allergens was approximately 40 mg/L of culture.

The rHev b 8 and rZea m 12 crystals (5 mg/mL) were obtained using the conditions described in the materials and methods section. These crystals diffracted to resolutions of 1.9 and 2.2 Å, respectively, and belonged to the P4₃,2₁2 space group. When the protein concentration was increased to 10 mg/mL, only one crystal of rHev b 8 was obtained, which contained two molecules in the asymmetric unit, as indicated by a Matthews coefficient of 3.06 Å³/Da and solvent content of 59.9%. This crystal belonged to the space group P3₂ and diffracted to a 2.8 Å resolution. Table 1 shows the data collection statistics for the three crystals.

Overall, the rHev b 8 (PDB code 5FDS) and rZea m 12 (PDB code 5FEF) structures show the canonical fold common to all profilins, with three α helices, seven β strands in an antiparallel β-sheet, ten β-turns, and three loops. A backbone alignment of the two 3D-structures reveals that they adopt the same conformation, with a root-mean-square-deviation (rmsd) of 0.27 Å (Fig. 1a). The two conserved regions important for actin (Fig. 1b) and poly-proline binding exhibit a similar charge distribution (Fig. 1c). The sequence alignment shows that the principal differences are between residues ³⁷ANFPQFKSEEITGIMSDFH⁵⁵ for rHev b 8 and ³⁷ENFPELKPEEVAGMIKDFD⁵⁵ for rZea m 12 (Fig. 1d). These residues are structurally located in a region exposed to the solvent, mainly in the loop that connects β-strand 2 and α-helix 2, but some also belong to α-helix 2. The electrostatic potential surfaces of both structures display the most significant differences (Fig. 1a) that lead to a more electronegative surface on rZea m 12. In addition, slight differences occur between the two proteins in some of the residues exposed to the solvent, mostly in the β-turns that connect β-strands 5 with 6 and 6 with 7 (Fig. 1a).

An analysis of the dimer interface of rHev b 8 (PDB code 5FEG) using the PISA (protein interfaces, surfaces, and assemblies) server showed an area of 674.3 Å² in each monomer that includes the conserved α-helices 1 and 3. Figure 2a illustrates this interface that comprises a disulfide bridge between the conserved Cys13 of both monomers. The C2 symmetry of the dimer favors hydrogen bond interactions between some of the residues involved in binding poly-proline regions, such as Glu16, Gln114 and Tyr125 and Gln129, which are conserved residues in both allergens (Fig. 2 left insert). In addition, Arg121 in α-helix 3 of monomer A forms a salt bridge with Asp124 of monomer B in α-helix 3 (Fig. 2 right insert). Analyzing crystal packing, it was evident that α-helices 1 and 3 are important for the establishment of this interface, even in the monomeric crystal structures of rHev b 8 and rZea m 12 (5FDS and 5FEF respectively). In these two crystals, α-helices 1 and 3 are relatively closed to the symmetry-related molecule, albeit the disulfide bond is not established (Fig. 2b). It is also interesting to note that in both sequences, the residues that differ are exposed on the surface of the homodimer (Fig. 2a), which affect the electrostatic potential in each allergen (Fig. 1a). The assemblies searching for similar arrays in PISA showed that this interface is favorable for different yeast and plant profilin structures (PDB codes 1K0K, 1YPR, 3D9Y, 1G5U), even though the yeast profilins do not have the conserved Cys13 residue. Crystal packing analysis showed that the mean interface area for these structures, including 5FDS and 5FEF from this work, is approximately 562 Å², which can be considered a medium size interface.

Characterization of oligomeric profilins. Our experimental results in solution suggested that both profilins oligomerize, usually as dimers. When the proteins purified by Ni-affinity chromatography were applied to a size exclusion chromatography (SEC) column using concentrations of 10 mg/mL, there was an increase of one fraction that corresponds to a profilin dimer (Fig. 3a). Low intensity peaks corresponding to the trimer, and tetramer were eluted first from the column (Fig. 3a left insert). SDS-PAGE of the monomeric and dimeric forms

	Dimeric rHev b 8	Monomeric rHev b 8	Monomeric rZea m 12
PDB code	5FEG	5FDS	5FEF
Data collection			
Space group	P3 ₂	P4 ₃ 2 ₁ 2	P4 ₃ 2 ₁ 2
Cell dimensions			
<i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> (Å)	58.56, 58.56, 87.34	59.04, 59.04, 132.89	58.53, 58.53, 135.20
γ (°)	120		
Resolution (Å)	33.09-2.8 (2.95-2.8)*	33.22-1.9 (2.0-1.9)*	44.25-2.2 (2.32-2.2)*
No. unique reflections	8077 (1168)	19125 (2665)	12489 (1745)
<i>R</i> _{merge} [†] (%)	6.8 (47.5)	5.1 (44.7)	5 (48)
<i>I</i> / <i>σI</i>	8.9 (2.1)	18.9 (3.7)	17.2 (3.2)
Completeness (%)	98.1 (97.6)	99.2 (98.2)	99.2 (98.2)
Redundancy	2.6 (2.5)	4.9 (4.9)	4.5 (4.6)
B factor from Wilson plot (Å ²)	58.1	25.38	42.4
Refinement			
<i>R</i> _{work} / <i>R</i> _{free} [‡]	20.78/24.95	17.3/19.7	21.8/24.5
No. atoms	1914	1187	1073
Protein	1914	1045	1011
Water	0	131	32
Ligand molecules	0	11	30
RMS-bonds (Å)	0.009	0.007	0.008
RMS-angles (°)	1.26	1.06	1.24
Mean <i>B</i> -factor (Å ²)	51.98	27.74	48.04
Protein	51.98	26.29	47.13
Ligand	0	65.85	78.73
Water	0	36.11	48.11
Ramachandran favored/outliers (%)	87/2.3	97/0	98/0

Table 1. Data collection and refinement statistics. *Highest resolution shell is shown in parenthesis.

[†] $R_{\text{merge}} = \frac{\sum_{\text{hkl}} \sum_i |I_i(\text{hkl}) - \langle I(\text{hkl}) \rangle|}{\sum_{\text{hkl}} \sum_i I_i(\text{hkl})}$. [‡] $R_{\text{work}} = \frac{\sum_{\text{hkl}} ||\text{Fobs}| - |\text{Fcalc}||}{\sum_{\text{hkl}} |\text{Fobs}|}$. *R*_{free} is the corresponding R-factor value for a randomly chosen 5% of the reflections excluded from the refinement.

rHev b 8 before and after the SEC, under non-reducing and reducing conditions, is shown in Fig. 3a (right insert). It is evident that when the protein reaches a concentration of 10 mg/mL and under non-reducing conditions a homodimer covalently bound by a disulfide-bond was maintained. The mass spectra of these samples confirmed the presence of monomeric, dimeric, trimeric, and even tetrameric species (Fig. 3b). The SEC, mass spectrum and SDS-PAGE for rZea m 12 also confirmed the presence of oligomeric species (Fig. 3c,d).

Generation of a high affinity mouse monoclonal IgE anti-profilin antibody (mAb 2F5). An interesting observation in this work was the response of the Balb/c mice upon immunization with rHev b 8 in the presence of either alum or IFA as an adjuvant. The results of the indirect ELISAs to measure the IgE and IgG levels in the sera of the immunized mice showed that higher levels of IgE were produced with alum than with IFA or no adjuvant (negative control). Conversely, when the immunization included IFA as the adjuvant, the generation of mouse IgG was predominant (Fig. 4a). The difference in the IgE response between the two adjuvants is significant with $P < 0.001$. Using the fusion of splenocytes from the mouse immunized with rHev b 8 adsorbed on alum, with the Ag8 cell line we obtained a hybridoma producing an IgEκ monoclonal antibody (mAb 2F5). SDS-PAGE of this IgE showed a band of ~75 kDa, which corresponds to the molecular mass of the epsilon heavy chain (Fig. 4b), whereas the gamma heavy chain of an anti-Hev b 8 murine monoclonal IgG1 is ~50 kDa.

We used biolayer interferometry to obtain the kinetic association and dissociation constants (k_a , k_d and K_D) for the interaction between rHev b 8 and mAb 2F5 (Fig. 5). A high correlation ($R^2 = 0.99$) between the different curves demonstrated a fast association rate (150 seg; $k_a = 3.66 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$), and a slow dissociation rate (1200 seg; $k_d = 4.94 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$) when using an ionic strength of 0.75 M NaCl at 25 °C. These rate constants result in an equilibrium dissociation constant (K_D) of $1.35 \times 10^{-9} \text{ M}$, which indicates a high affinity of the mAb 2F5 for rHev b 8.

Differences in the recognition of rHev b 8 and rZea m 12 by mAb 2F5 and a pool of allergic patients' sera. An indirect ELISA was used to compare the binding of mAb 2F5 and a pool of sera from profilin allergic individuals ($n = 20$) to rHev b 8 and rZea m 12, in their monomeric and dimeric forms. The assays showed that mAb 2F5 specifically recognizes monomeric rHev b 8, even at a low concentration (2 μg/mL) (Fig. 6a); conversely, mAb 2F5 showed no reactivity towards monomeric rZea m 12, suggesting that this IgE recognizes a conformational epitope on the surface of rHev b 8 that is not shared with rZea m 12.

Competition assays with dimeric and monomeric rHev b 8 indicated there was no significant difference in their recognition by mAb 2F5 (Fig. 6b). When the pool of sera from profilin-allergic patients was used we found that both profilins were recognized to a similar extent, even though a lower concentration of rHev b 8 was required to obtain the

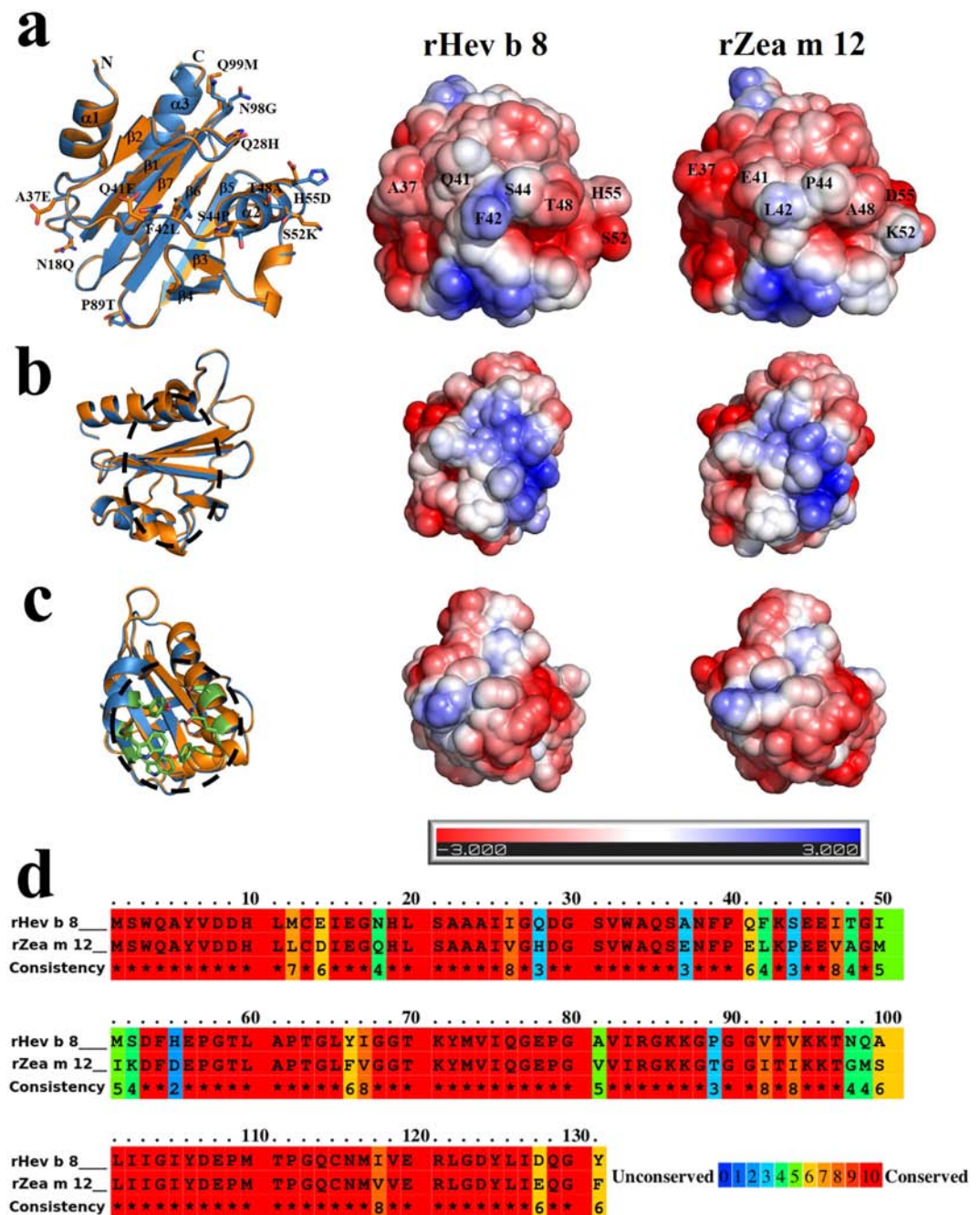


Figure 1. Structural comparisons of rHev b 8 and rZea m 12. (a) Three-dimensional alignment of rHev b 8 (blue) and rZea m 12 (orange) reveals a high structural similarity (rmsd 0.27 Å); sticks show residues that differ between the chains. The two right figures show the surface electrostatic potential of both allergens, depicting different side chains of the loop (residues Ala37 to His55 in rHev b 8 and Glu37 to Asp55 in rZea m 12). (b) On the left, C α alignment of rHev b 8 and rZea m 12 showing the region of actin interaction (dashed circle); on the right, the surface electrostatic potential of both allergens in this region. (c) On the left, C α alignment of rHev b 8 and rZea m 12 depicting residues involved in the poly-proline binding site (green sticks), and the comparison of the surface electrostatic potentials on the right. (d) Amino acid sequence alignment between rHev b 8 and rZea m 12, conserved residues are shown as a gradient from red to blue.

maximum response ($P=0.001$) (Fig. 6c). Competitive ELISAs using the IgEs from patients' sera with both allergens, in their monomeric and dimeric forms, showed a similar recognition (Fig. 6d). However, between the monomeric and dimeric forms of both allergens we observed a significant difference in the IgE binding ($P<0.001$), which suggests that the monomer has additional IgE epitopes in the region that establishes the homodimer interface. These results confirm the presence of a conformational epitope in the poly-proline binding region of profilins, as was proposed by Fedorov *et al.*¹⁸.

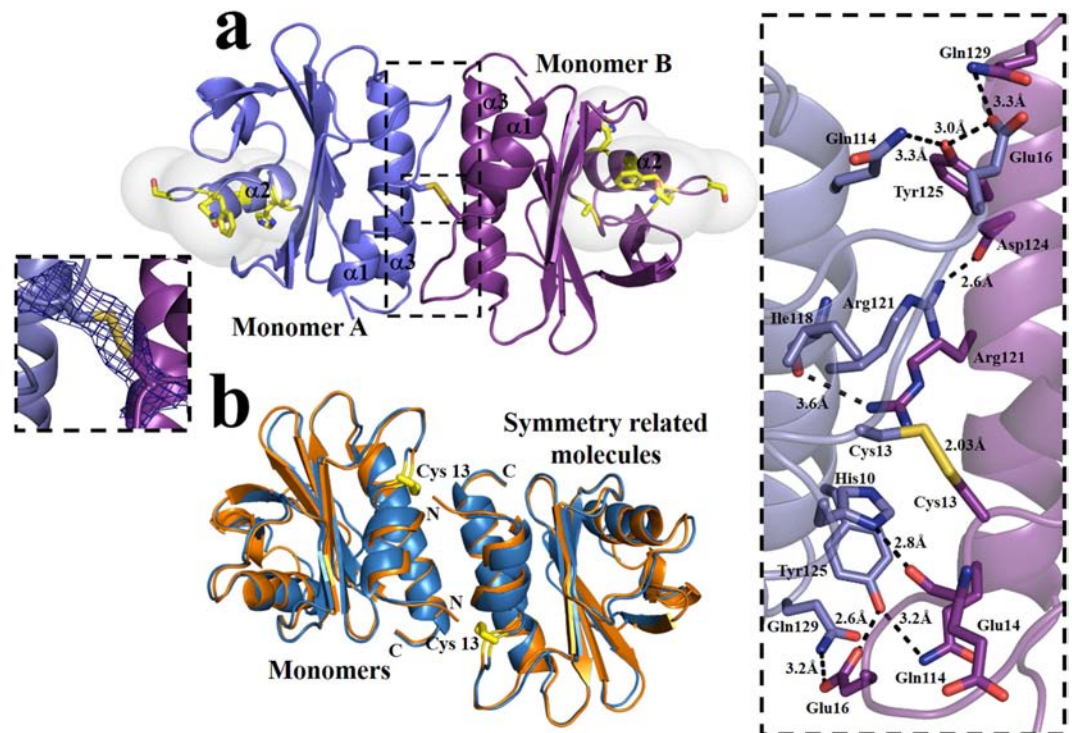


Figure 2. Interactions in the dimeric structures of profilin allergens. (a) Ribbon representation of the dimeric rHev b 8 in the asymmetric unit of the P₃ crystal, transparent surfaces show the residues (as sticks) that differ from rZea m 12. **Left insert**, 2F_o-F_c density map ($\sigma = 1$) of the disulfide bridge at the interface. **Right insert**, Close-up view of the dimer interface, the key residues involved in interactions are shown as sticks (PISA server). (b) 3D alignment of the monomers of rHev b 8 (blue) and rZea m 12 (orange) in the asymmetric units showing the symmetry related molecules that form monomer-monomer interfaces.

IgE-mediated degranulation of RBL-2H3 cells induced by dimeric rHev b 8. RBL-2H3 cells sensitized with mAb 2F5 degranulate upon stimulation with the monomeric and dimeric forms of rHev b 8 profilin (Fig. 7). This degranulation response, as measured by the release of β -hexosaminidase, was significant (~70%) when dimeric rHev b 8 (130 nM) was used, and of a similar magnitude to the response obtained with either IgE complexed with an anti-IgE secondary antibody (133.3 nM), or the anti-Fc ϵ RI murine IgG (F4) antibody (66.7 nM) (positive controls). When the cells were stimulated with monomeric rHev b 8 using the same and two fold the concentration of the dimer (130 and 260 nM, respectively) the release of β -hexosaminidase reached near half of the homodimer, and the positive controls responses $P < 0.001$ (Fig. 7). The negative control was monomeric rZea m 12 (260 nM), which was not recognized by mAb 2F5, as established by indirect ELISA (Fig. 6a).

Discussion

There has recently been an increased interest in analyzing allergen structures in their oligomeric forms and how oligomerization affects their recognition by different antibodies^{2,19}. In this work, we focus on the study of two plant pan-allergens, profilins from the rubber tree (rHev b 8) and maize (rZea m 12), in their monomeric and dimeric forms. Using SEC we isolated dimeric species of both allergens and observed the presence of other oligomeric species, confirmed by mass spectrometry (Fig. 3). Analyzing the different SEC fractions by SDS-PAGE in non-reducing conditions we observed mainly monomers and dimers, whereas reducing conditions cause the disappearance of the 28-kDa band. These results suggest that both profilins self-assemble to form a covalent bond, but also noncovalent interactions are established that explain the presence of transient oligomers when the protein concentration is high and protein-protein interactions are favored. Likewise, the presence of endogenous profilin oligomers in yeast, human and plants has already been demonstrated²⁰.

In this study, we determined the tridimensional structure of a dimeric rHev b 8 stabilized by a disulfide bridge and compared it with the structures of the monomeric forms of the same allergen and that of rZea m 12. At the structural level, the sequence alignment and 3D structures of both allergens (Fig. 1) revealed that the secondary structure elements and protein folding were maintained, with slight differences between the monomers. Interestingly, the dimeric structure of rHev b 8 displays a medium size interface stabilized through a disulfide bond that is formed between the two Cys13 residues of each monomer, which is conserved in all plant profilins²¹. In addition, there are several hydrophobic and polar interactions between residues of α -helix 3 at the C-terminus and α -helix 1 at the N-terminal region (Fig. 2a right insert). Even though most of the profilin structures reported in the PDB show one protein chain in the asymmetric unit, when we analyzed the crystal contacts we found that the two helices at the N- and C-terminal regions are involved in a similar interface. For example, the profilins from yeast do not have Cys 13, but crystal contacts with symmetry related molecules revealed the presence of

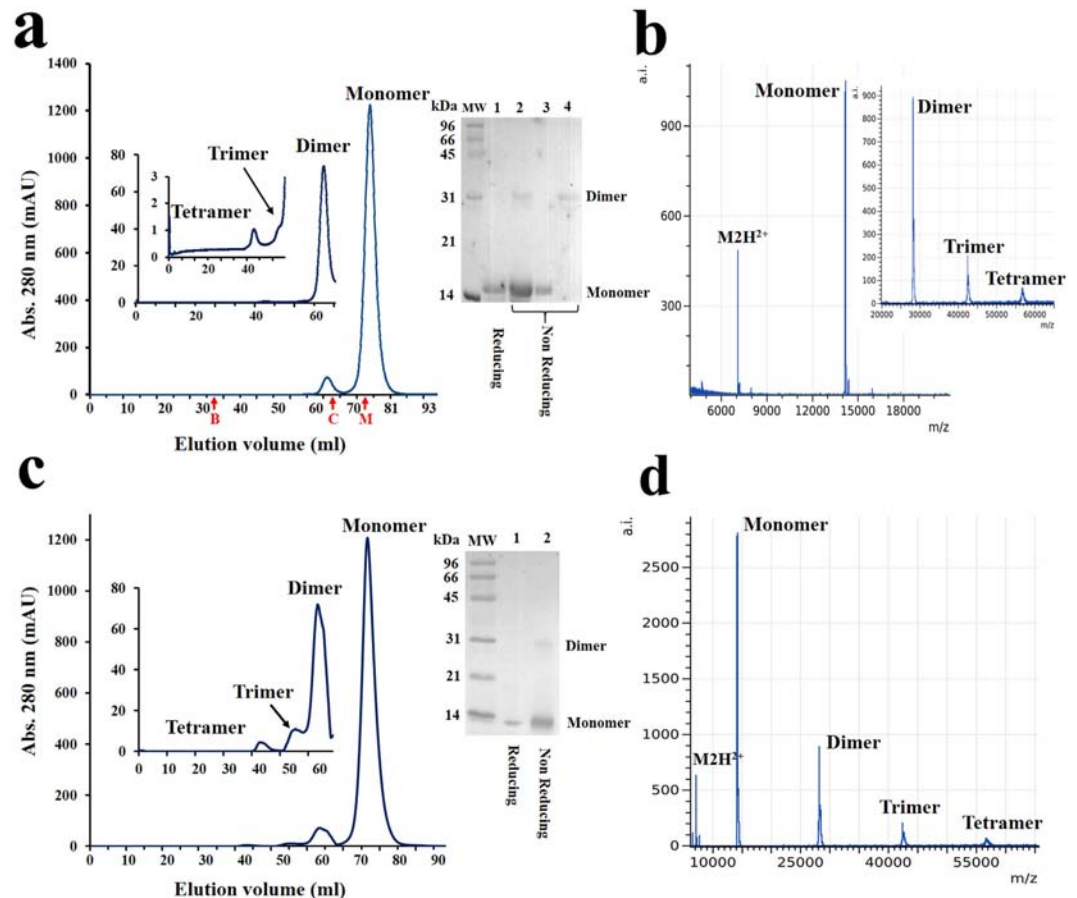


Figure 3. Characterization of profilin oligomers. (a) Size exclusion chromatogram of rHev b 8 applied to the column at a concentration 10 mg/mL. **Left inserts** show the fractions that eluted before the monomer and correspond to the dimer, trimer, and tetramer. Elution volumes for the controls are shown in red: M (Myoglobin), C (α -Chymotrypsin), B (BSA). **Right insert**, SDS-PAGE gel. Lane 1, rHev b 8 (10 mg/mL); Lane 2, the same sample in non-reducing conditions; Lanes 3 and 4, monomer and dimer after SEC under non-reducing conditions. (b) MALDI-TOF spectrum for rHev b 8, showing the peak corresponding to the monomer (m/z 14.1 kDa), the insert shows peaks corresponding to the dimer (28.3 kDa), trimer (42.4 kDa) and even the tetramer (56.5 kDa). (c) and (d) depict the same experiments for rZea m 12. For this protein lanes 1 and 2 in the SDS-PAGE show the sample before applied to the SEC column (10 mg/mL) under reducing and non-reducing conditions.

transient dimers¹⁹ with an interface that exhibits similar non-covalent interactions involving α -helices 1 and 3. From a functional point of view, the hydrophobic N- and C-terminal regions of the profilin structures are very important for their interaction with proline-rich proteins, such as kinases^{22,23}. This region is blocked when the dimer is formed; therefore, interactions with kinases could be limited²⁴. According to Aparicio-Fabre R, *et al.*²⁵ the interaction of profilin with a phosphoinositide 3-kinase could affect several protein-protein interactions, which are important to regulate diverse cellular functions, including protein activity subcellular localization and association with proteins involved in the regulation of actin dynamics and endocytosis, among others. As observed in our dimer structure the interface blocks the kinase recognition region; therefore, we can suggest that the dimerization process might then have an auto-regulatory function for the members of the profilin family. In general, the most important structural differences between rHev b 8 and rZea m 12 are the contributions of some side-chains that alter the surface charge, essentially at the loop that has been considered important for antibody recognition (Fig. 1a)^{26–28} and it is exposed on the surface of the dimer structure (Fig. 1b).

To gain insight into the allergen-antibody interactions and how these might affect hypersensitivity reactions, we produced a murine IgE monoclonal antibody (mAb 2F5) that specifically recognizes the allergen rHev b 8. There are only a few studies in the literature that describe human and murine IgE antibodies produced by various techniques. The first reported monoclonal IgE derived from a hybridoma was an antibody anti-2,4-dinitrophenyl, which exhibited a K_D of 1.4×10^{-8} M²⁹. Two IgE monoclonal antibodies raised against different allergens have also been reported, the anti-Bos d 5 (β -lactoglobulin)⁶ and an anti-Phl p 2 (grass pollen allergen)³⁰, with K_D s of 1.4×10^{-9} M and 1.1×10^{-10} M, respectively. In our study, we used biolayer interferometry to characterize the kinetic binding of mAb 2F5 to rHev b 8, which produced a high apparent affinity constant ($K_D = 1.3 \times 10^{-9}$ M) that is comparable to those reported previously for allergen-IgE complexes. However, in this

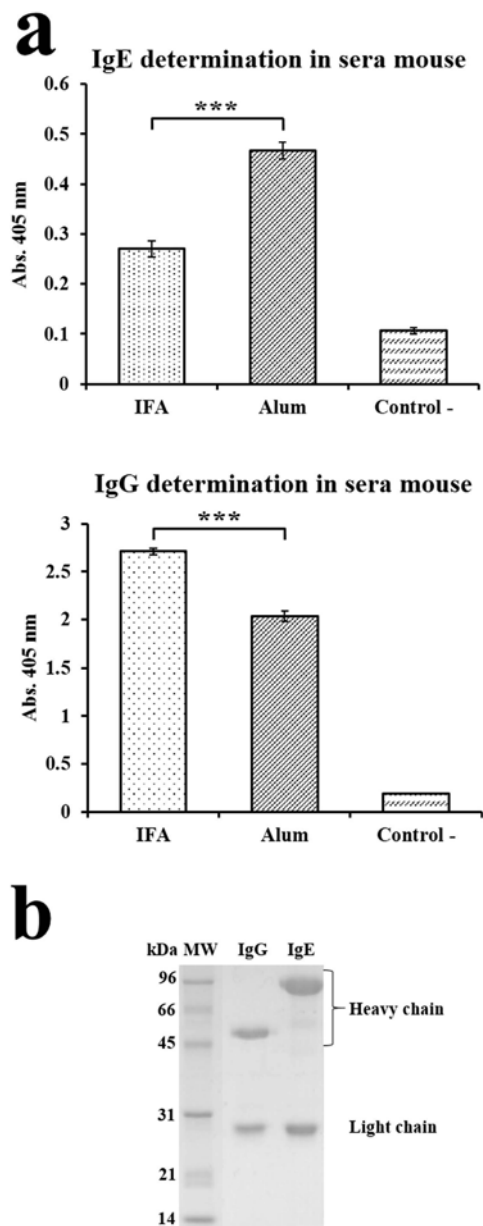


Figure 4. Determination of specific IgE and IgG mice serum antibodies at the end of the immunization protocol with rHev b 8. (a) ELISA experiments for class determination for the two adjuvants used (Incomplete Freund's and alum). The negative control corresponds to the mouse without sensitization (***) ($P < 0.001$). (b) SDS-PAGE of the IgE (mAb 2F5) and a IgG mouse purified by an affinity column with rHev b 8.

study it was necessary to increase the ionic strength in order to measure the dissociation rate, suggesting that the affinity may be even higher at physiological ionic strengths.

From the immunological standpoint, it is relevant to note that mAb 2F5 only recognized rHev b 8, but not rZea m 12 (Fig. 6a), even though the sequence identity is 79.4% and the folding is very similar (rmsd of 0.27 Å for C α). The main differences were observed in a flexible loop that connects the β -strand 2 with α -helix 2 (Fig. 1a), where the charge distribution could affect the IgE binding. In addition, the α -helix 2 in both profilins has several different side chains, which could affect interactions with the antibody mAb 2F5, corroborating the predictions by López-Torrejón *et al.*²⁷. Interestingly, the flexible loop and α -helix 2 do not participate in the establishment of the rHev b 8 dimer interface (Fig. 2a) and the competitive ELISAs between monomeric and dimeric rHev b 8 (Fig. 6b) confirmed that this region is exposed for interaction with mAb 2F5. Nonetheless, when we evaluated the recognition by IgE in patients' sera (polyclonal response), we demonstrated that both allergens in their monomeric and dimeric forms showed cross-reactivity (Fig. 6c,d), which could be explained by the presence of conserved regions related to their function (Fig. 1b,c) that have been reported as IgE epitopes^{18,21,31–33}. Moreover, we confirmed that profilin monomers are multivalent, since they were recognized by polyclonal IgEs in competition assays with the

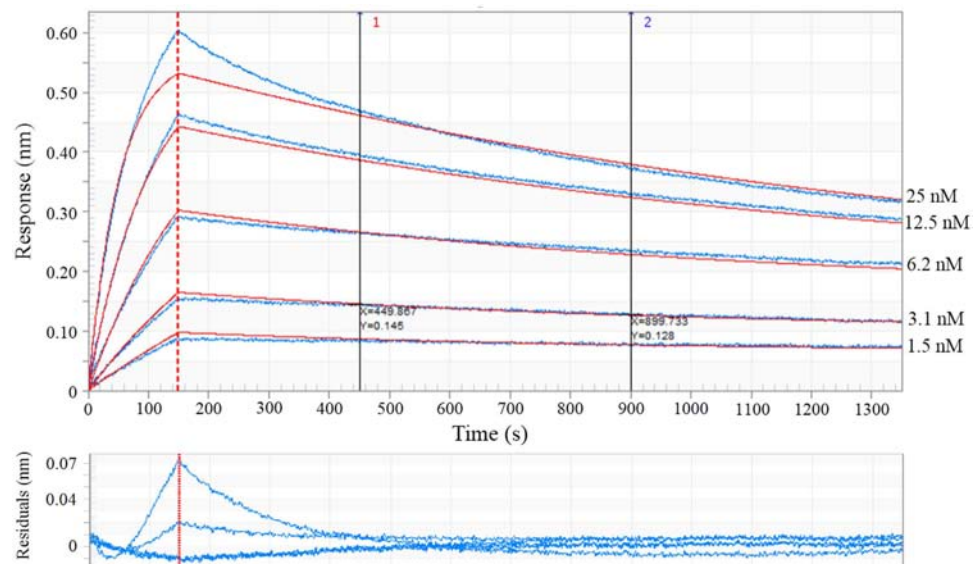


Figure 5. Biolayer interferometry sensorgram of rHev b 8 binding to mAb 2F5. Five different concentrations of mAb 2F5 were used. The red lines indicate the fits, whereas the sensorgram is in blue for each concentration. The residual of the fit is plotted below the sensorgram. The global quality average values are shown with the R^2 (0.9945) and X^2 (0.7173) considering a 2:1 model. All steps were performed at 25°C.

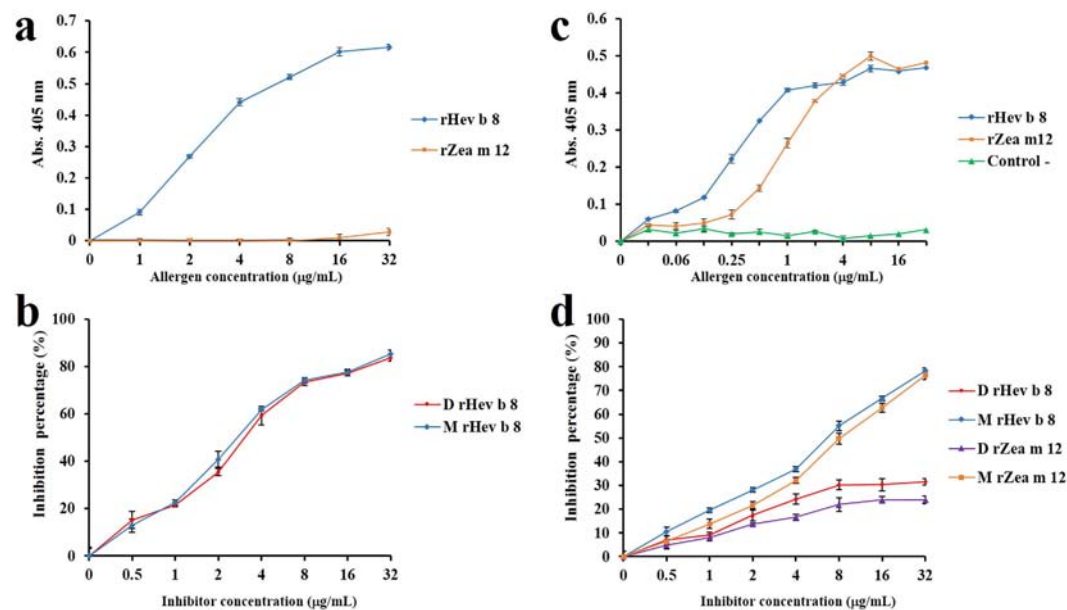


Figure 6. Immunological characterization of rHev b 8 and rZea m 12 allergens using mAb 2F5 and IgE from patients' sera. (a) Recognition of the two allergens by mAb 2F5 using increasing concentrations of the allergens ($P < 0.001$). (b) Competitive ELISA experiment for mAb 2F5 binding to the monomer of rHev b 8 (coated in plate) in the presence of increasing concentrations of monomeric and dimeric rHev b 8 as competitor. (c) Recognition of rHev b 8 and rZea m 12 by a pool of patients' sera (polyclonal IgEs). Control (non-allergic individuals) ($P < 0.001$). (d) Competitive ELISA experiments for human IgEs between monomers (coated in plate) and increasing concentration of monomeric and dimeric rHevb8 and rZea m 12, separately. However, there is a significant difference between monomer and dimers for both allergens ($P < 0.001$).

dimeric forms of both allergens (Fig. 6d), which could mask some IgE epitopes in their interface; however, maintained other regions exposed for the recognition by antibodies.

We also analyzed the ability of mAb 2F5 to release allergic mediators from RBL-2H3 cells in response to monomeric and dimeric rHev b 8. Notably, we observed a significant degranulation response to dimeric rHev b 8,

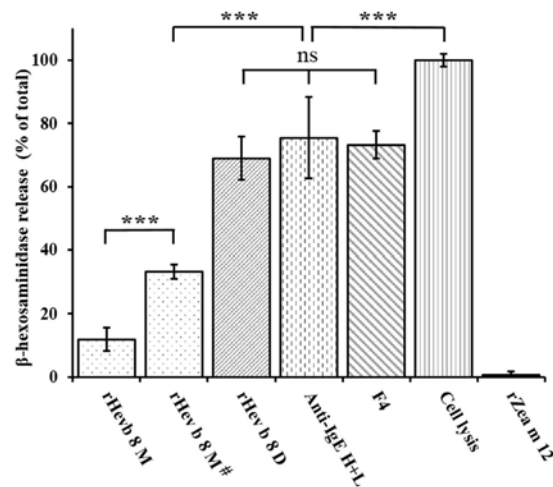


Figure 7. RBL-2H3 cell mediator release assay. Cell lysis represents 100% of the total content of β -hexosaminidase in the cells. Bars show the percentage of the enzyme induced by each stimulus. Direct (mAb F4 anti Fc ϵ RI receptor) and Indirect (Anti-IgE H + L) controls were included. The negative control used is rZea m 12, which is not recognized by mAb 2F5. The first two bars correspond to monomeric rHev b 8 at two concentrations (130 nM y 260 nM[#]) and the third one corresponds to dimeric rHev b 8 (130 nM) (ns = not significant, *** = $P < 0.001$).

equivalent to the release induced by the positive controls (mAb F4 and anti-IgE) (Fig. 7). These results demonstrate that dimeric rHev b 8 efficiently stimulate the cross-linking of pre-bound mAb 2F5 to Fc ϵ RI receptors, activating degranulation. We also determined cell degranulation activity in the presence of the profilin monomer, at two different concentrations, which could be the result of a local increased protein concentration and explained by the colocalization phenomena. While it is true that only a minor fraction of Hev b 8 in solution forms dimers, it is very plausible that by binding to the IgE bound to the Fc ϵ RI on the cell surface, the Hev b 8 concentration increases in the immediate vicinity of the membrane, facilitating the formation of “transient dimers”, that not necessarily involves the establishment of a disulfide bridge, as has been observed in the crystal contacts of other profilin structures including our monomeric structures (rHev b 8 and rZea m 12) (Fig. 2b). Moreover, because of the very high affinity of mAb 2F5 for Hev b 8, two monomers bound to different IgE-Fc ϵ RI complexes, would be able to form dimers at a much higher rate than two monomers in solution, as their being bound to the cell surface would dramatically increase their concentration and reduce their motion to the lateral diffusion of the complexes on the cell membrane. In general, it has been established that protein concentration within cells is in the nanomolar to micromolar range; however, colocalization by nonspecific interactions may locally increase this concentration up to 1 mM³⁴. Profilin is an abundant protein in pollen with a cellular concentration that is nearly equimolar to actin in some species²². Therefore, it is probable that profilins oligomerize *in vivo* similarly to what we observed in our solution experiments. This suggests that the response mediated by IgE antibodies using *in vitro* tests is established through the molecular recognition of profilin monomers or oligomers and the affinity and specificity that contribute to the allosteric properties of these antibodies when they are bound to Fc ϵ RI receptors.

Recent studies have suggested the importance of allergen dimerization in their recognition by IgE bound to specific receptors; thus, we produced, stabilized, and structurally characterized a profilin dimer, and determined the consequences of oligomerization regarding its recognition by murine monoclonal and human polyclonal IgE antibodies. Based on the results we suggest that differences in the immunological response among profilins from different sources are due to their multivalent characteristics that can be enhanced by the existence of dimeric species. Besides, the information about the localization of specific IgE epitopes on profilin and how these are exposed on the dimers surfaces is important for the determination of cross-reactivity among the members of this family of panallergens. Our data indicate the relevance of slight changes in the sequence of plant profilins, mainly in non-conserved regions, which significantly affect their recognition by IgE antibodies. However, we also stress that the conserved regions related to the biological function of these proteins are also immunogenic epitopes that can be responsible for allergic cross-reactions in the pollen-latex-food syndrome, as we could determine with the profilins from the rubber tree and maize, thus contributing to the design of effective diagnostic tools and immunotherapy strategies considering the important increase of allergies in recent years.

Materials and Methods

Cloning, expression, and the purification of profilins from *Hevea brasiliensis* (rHev b 8) and *Zea mays* (rZea m 12). Total RNA was extracted from the young leaves of the rubber tree *H. brasiliensis*, clone RRIM600, as previously reported³⁵ and from *Z. mays* leaves with the TRizol Plus RNA Purification Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA), as described by the manufacturer. The cDNA was synthesized from total RNA using the cDNA synthesis kit (New England Biolabs, MA, USA) and amplified with oligo-dT primers. PCR was carried out using specific primers (Supplementary Table S1) for the isoform Hev b 8.0102 (named here rHev b 8), which were designed to amplify the gene according to the sequence reported by Rihs *et al.*³⁶ (GenBank accession

number CAB51914.1). This isoform is different to the one previously reported in the PDB (Hev b 8.0203, PDB code 2G5U). Primers for Zea m 12.0105 (rZea m 12) amplification (Supplementary Table S1) were designed using the sequence reported by Kovar *et al.*³⁷ (GenBank accession number AAG35601.1). The PCR product was ligated into the pET28c vector (Novagen EMD Biosciences, WI, USA) using T4 DNA ligase and then transformed into *E. coli* DH5 α and sequenced (Laragen, CA, USA).

For the expression of proteins the pET28c-rHev b 8 and pET28c-rZea m 12 vectors were cloned separately in *E. coli* Rosetta (DE3) cells. These were grown in Luria broth (LB) medium supplemented with 30 μ g/mL kanamycin at 37 °C with shaking. When the optical density at 600 nm reached 0.6, the expression of both proteins was induced with Isopropyl-thio- β -D-1-galactopyranoside 0.5 mM and growth was continued for 6 h at 30 °C. Cells were harvested by centrifugation (15,300 g, 4 °C, 20 min). SDS-PAGE analysis on a 15% gel was performed to estimate the expression levels of both proteins. The cell pellets were resuspended in a lysis buffer (50 mM Tris pH 8.0, 0.3 M NaCl, 1 mM PMSF) and then subjected to sonication (60 cycles in 10 s intervals, with a stop time of 30 s to complete 10 min, 4 °C). The lysate was clarified by centrifugation (26,000 g, 4 °C, 30 min); the supernatant was filtered and loaded into a 5 ml Ni-NTA affinity column. This was equilibrated with 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 20 mM imidazole buffer and bound proteins were eluted with an imidazole gradient. rHev b 8 and rZea m 12 proteins were dialyzed against 50 mM Tris-HCl pH 7.5 buffer. Protein concentration was estimated by Abs₂₈₀, using a molar extinction coefficient of 19940 M⁻¹cm⁻¹ for rHev b 8 and 16960 M⁻¹cm⁻¹ for rZea m 12. The allergen rHev b 8 was separated from the His₆ tag by incubating with enterokinase (Invitrogen, CA, USA) overnight at 37 °C, according to the manufacturer's instructions. The final purification step of the recombinant rHev b 8 was performed using anion exchange chromatography with a mono Q HR 5/5 column in an ÄKTA FPLC (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden). For the rZea m 12 construction, the Histag was cleaved overnight at 4 °C using a recombinant tobacco virus protease (TEV) in 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.5 mM EDTA and 1 mM DTT buffer. An additional Gly residue was left at the N-terminus after digestion with TEV in rZea m 12. The protein mixture was dialyzed against 50 mM Tris-HCl pH 7.5 buffer and then loaded onto a 5 ml Ni-NTA affinity column equilibrated with the same buffer. The purified rZea m 12 did not bind to the column and was eluted. The pure allergens rHev b 8 and rZea m 12 were dialyzed against 50 mM Tris-HCl pH 7.5 and store at -20 °C.

Isolation and characterization of rHev b 8 and rZea m 12 oligomers. To separate oligomers of the two purified profilin samples we used a HiLoad 16/60 SuperdexTM 75 size exclusion chromatography (SEC) column in an ÄKTA FPLC system (Amersham Pharmacia Biotech, AB, Sweden). After equilibration of the column with 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, protein samples incubated for 1 week at 4 °C at two different concentrations (5 and 10 mg/mL) were applied. The column was calibrated using the molecular weight standards Myoglobin (M_r 16.95 kDa), α -chymotrypsin A (M_r 25 kDa), and bovine serum albumin BSA (M_r 66.43 kDa).

Matrix-assisted laser desorption/ionization-Time of flight (MALDI-TOF) Mass Spectrometry was used for determining molecular masses of the recombinant proteins using a Microflex Bruker spectrometer. One μ l of each recombinant protein (10 mg/mL) was used for the analysis. Standards for mass calibration were myoglobin (M_r 16.95 kDa); cytochrome C (M_r 12.38 kDa); and BSA (M_r 66.43 kDa). The matrix used was a saturated solution of sinapinic acid in 40% (v/v) aqueous acetonitrile, 0.1% (v/v) trifluoroacetic acid. Samples were analyzed with the software Flex analysis 3.0TM (Bruker).

Crystallization. The proteins rHev b 8 and rZea m 12 were dialyzed against a 0.05 M Tris HCl pH 7.5 buffer, with and without 1 mM DTT, using an ultrafiltration membrane with a MWCO of 5 kD and concentrated to 5 mg/mL and 10 mg/mL. The hanging-drop vapor-diffusion method and 24-well Linbro plates were used in conjunction with solutions of the Hampton Research Crystal Screens I and II (Hampton Research, CA, USA) to search for suitable crystallization conditions. The final optimized crystallization condition for both allergens was 0.1 M Tris HCl (pH 9.0) and 1.6 M ammonium sulfate with a protein concentration of 5 mg/mL. These protein crystals belong to the space group P₄₃₂₁₂. Only one crystal grew for the allergen rHev b 8 using a protein concentration of 10 mg/mL that belonged to the space group P₃₂.

Data collection, structure determination and refinement. Diffraction data for the rHev b 8 trigonal (P₃₂) crystal was collected using a rotating-anode generator (Cu K α , λ = 1.5416 Å) with a Rigaku R-AXIS IIC image-plate detector (Rigaku, TX, USA). This crystal contained two molecules in the asymmetric unit. For the rHev b 8 and rZea m 12 tetragonal crystals (P₄₃₂₁₂) that contained a monomer in the asymmetric unit, diffraction data were collected on a Rigaku MicroMax-007 HF rotating anode (Rigaku, TX, USA) at 103°K with an oscillation of 0.5°/frame on an R-AXIS IV++ image plate detector. Mother liquor including 30% glycerol was used as cryoprotectant in all cases. All data sets were indexed and integrated using XDS³⁸, and reflections merged and scaled with Scala in the CCP4 suite³⁹. The correct space groups were determined in all cases with Pointless⁴⁰. The 3D structures were solved using molecular replacement techniques with the program Phaser in the Phenix suite⁴¹. For the monomeric rHev b 8 (P₄₃₂₁₂) we used as a template the structure of profilin I from *Arabidopsis thaliana* (PDB code 3NUL), and the final refined model of this crystal (PDB code 5FDS) was used as template for determining the structures of the dimeric rHev b 8 and of rZea m 12. In all cases, map inspection and subsequent model building were performed with COOT⁴², and the resulting models were refined with phenix-refine⁴³. The P₃₂ crystal exhibited merohedral twinning, but refinement was more stable when the twinning operator was included. The final structures satisfied the MolProbity criteria at the corresponding resolutions⁴⁴.

Structures analysis. The three final models were drawn and compared using PYMOL v.1.7.x (Schrödinger)⁴⁵, and the electrostatic surface potentials were obtained at pH 7.0 with the Adaptive Poisson-Boltzmann Solver (APBS)⁴⁶ software package. Sequence alignment was performed using the PRALINE server⁴⁷. Analysis of the

dimer interface and the search of similar assemblies for the comparison with other profilins were performed using the PISA web server (European Bioinformatics Institute)⁴⁸.

Ethics Statements. All animal handling and experimental procedures were performed in accordance with the recommendations in the Guide for Care and Use of Laboratory Animals and the Mexican Official Norm NOM: 062-ZOO-1999. The protocol was approved by the “Comité Institucional para el Cuidado y Uso de animales de laboratorio (CICUAL)” of the Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (Permission number CICUAL Protocol ID 98).

Human sera from control and profilin-allergic individuals with medical records of pollen, fruits and latex allergies were provided by the Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias “Ismael Cosío Villegas” (INER), México. The institutional Ethical Committee approved the study and all subject provided an informed consent. Experimental protocols were performed in accordance with the approved guidelines of the Institution.

Murine monoclonal antibody production and purification. Female Balb/c mice (eight weeks old) were subcutaneously immunized with 50 µg of rHev b 8 either adsorbed in 200 µL of alum (Al(OH)₃) or emulsified with incomplete Freund’s adjuvant (IFA), every two weeks during 2 months. Two additional intraperitoneal immunizations with 25 µg of allergen in PBS were applied, 3 and 4 days prior to the fusion process. Sera of the immunized mice were tested with an indirect ELISA using a rat monoclonal [23G3] anti-mouse IgE (epsilon chain-specific) secondary antibody labeled with Horseradish peroxidase (HRP) (Abcam Inc. Cambridge, U.K.), and also using a goat anti-Mouse IgG H+L secondary antibody HRP (Pierce Thermo-scientific, IL, USA). The mouse with a positive IgE response to the allergen was selected for cell fusion.

The hybridoma cells were derived by somatic cell hybridization of P3 × 63Ag88.653 mouse myeloma cell line to spleen cells from the selected immunized mouse at a ratio of 1:5 in the presence of 41% polyethylene glycol (PEG) 1550. The fusion cells were plated on 96-well flat-bottom plates at a density of 1×10^5 cells in RPMI-1640 medium and were selected by Hypoxanthine-Aminopterin-Thymidine (HAT) medium as previously described⁴⁹. Ten days after the fusion, the supernatants of hybridoma cells were tested for the presence of IgE or IgG antibodies that recognized rHev b 8 bound to an ELISA plate. We isolated one clone secreting IgE anti-profilin antibody (mAb 2F5) and several clones secreting IgG antibodies. Hybridomas secreting rHev b 8-specific IgE or IgG antibodies were cloned by limiting dilution. The isotype of the monoclonal antibodies was determined using the mouse immunoglobulin isotyping kit (Invitrogen, CA, USA).

For monoclonal antibody production, hybridoma cells were grown in RPMI-1640 media supplemented with L-glutamine, and 3% of fetal bovine sera (FBS). The mAb 2F5 IgE was purified from the centrifuged and filtered (0.22 µm membrane) supernatant by affinity chromatography with rHev b 8-Affi-gel 15 column (Biorad, CA, USA) equilibrated with PBS buffer. The monoclonal IgE antibody was eluted from the column using 0.2 M Glycine-HCl pH 2.8 and received in 2 M Tris-HCl pH 8.0 for neutralization of the pH. The purified IgE was dialyzed against PBS, concentrated to 1 mg/mL and stored at -20 °C. The concentration was determined using an extinction coefficient²⁹ ($A_{280nm}^{0.1\%}$) of 1.62 mL mg⁻¹ cm⁻¹ for an IgE murine anti-DNP. All procedures were performed at 4 °C.

Binding kinetics using biolayer interferometry (BLI). To determine the affinity of the mAb 2F5 IgE for the allergen rHev b 8, a kinetic titration was performed at 25 °C using streptavidin biosensors in the HTX Red384 Octec systems (FortéBio Inc., CA, USA). Biotin was coupled to rHev b 8 using amino reactive-free conditions with 0.1 M 3-morpholinopropane-1-sulfonic acid, pH 7.2, as the coupling buffer with excess reactive esters blocked with ethanolamine. The first step consisted of establishing a zero baseline using the BLI buffer [phosphate buffered saline (PBS), pH 7, 0.05% Tween 20, 0.5% bovine serum albumin (BSA)] for 60 s. The second step entailed loading biotinylated rHev b 8 and capturing it for 300 s to activate the sensor, after which a new baseline was obtained. To determine the association constant (k_a), five different concentrations of purified mAb 2F5 were bound to the immobilized rHev b 8 for 150 s. Finally, the dissociation constant (k_d) of the antibody-allergen complex was determined over 1200 s using the BLI buffer with different concentrations of NaCl. Immobilized BSA was used as a negative control, and a new biosensor tip was used for each run. The Octec data were processed with the FortéBio data acquisition software using a global fitting approach.

Recognition of rHev b 8 and rZea m 12 by mAb 2F5 and human IgE using indirect ELISA. Enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) were performed in 96-well microplates. The wells were coated with 100 µL of each allergen in PBS pH 7.4 (8 µg/mL) for 2 hours at 37 °C. After washing with PBS/0.1% Tween 20, the plates were blocked with PBS/1% BSA for 2 hours at 37 °C. One hundred microliters of sera from profilin allergic individuals diluted 1:10, sera from immunized mice diluted at either 1:10 (IgE determination) or 1:100 (IgG determination), and mAb 2F5 IgE (2 µg/mL) were added to their corresponding wells. The plates were then incubated for 3 hours at 37 °C. Depending on the antibody being tested, the subsequent steps included the addition of anti-human IgE-horseradish peroxidase (HRP; 1:1000), anti-mouse IgE (epsilon specific chain)-HRP (1:1000) or Anti IgG mouse H&L-HRP (1:5000) before incubating for 1 hour at 37 °C. The peroxidase reaction was developed using 2, 2'-azino-di-(3-ethyl-benzthiazoline-6-sulphonic acid) and was read at 405 nm in a microplate reader. Each absorbance value was calculated from the mean of three independent determinations and standard deviation was determined.

Recognition of rHev b 8 and rZea m 12 and their dimeric forms by competitive ELISA. We used a pool of sera from twenty patients allergic to profilin and the purified mAb 2F5, separately. Microwells were coated with monomeric rHev b 8 or rZea m 12 (8 µg/mL) and blocked with 1.0% BSA in PBS. In separate tubes the pool of patients’ sera (diluted 1:10 in PBS/0.1% BSA/0.05% Tween 20) and the mAb 2F5 (0.5 µg/mL) were

incubated with serial dilutions of the competing dimeric rHev b 8 or rZea m 12 at 37 °C for 1 h, in both cases BSA was used as negative control. Then, 50 µl of the incubated samples were added to the plates and incubated to 37 °C for 1 h. The rest of the procedure was performed as described above for the indirect ELISA.

Degranulation of basophils (RBL-2H3) determined by β-hexosaminidase release. The enzymatic activity of β-hexosaminidase that is contained in the cell's granules was monitored. The cells were seeded in 96-well tissue-culture plates at 1×10^5 cells in 100 µL of Eagle's minimal essential medium with Earle's salt (MEM) supplemented with 10% fetal bovine serum, and incubated at 37 °C in 5% CO₂ for 5 h. Then sensitization of the cells with IgE was performed by the addition of 50 µL of the mAb 2F5 (2 µg/mL) in MEM per/well and the plate was incubated for 12 hours at 37 °C in 5% CO₂. The monolayers were washed three times with Tyrode's buffer to eliminate the mAb 2F5 excess. Allergens were added to the washed monolayers at different concentration to get the maximum degranulation. As positive controls for the cell's FcεRI-mediated degranulation, we stimulated them with either a mouse monoclonal anti-FcεRI (F4) antibody⁵⁰ (in non-sensitized cells) or with a Goat anti-mouse IgE H&L when the mAb 2F5 was already bound to the cells. Total β-hexoaminidase activity was determined in wells where the cells were treated with lysis buffer (Tris-HCl 50 mM, 150 mM NaCl, and 1% Triton X-100 to pH 7.5 with cocktail of proteases inhibitors). The rZea m 12 was used as a negative control. After the treatments indicated for each experiment, secretion was allowed to proceed for 30 min at 37 °C. From each well, three aliquots of 25 µL were transferred to a separate plate and 50 µL of the substrate solution (1.3 mg/mL p-nitrophenyl-N-acetyl-β-D-glucosamine in 0.1 M citrate, pH 4.5) was added before incubating the plates for 90 min at 37 °C. The reaction was stopped with 150 µL of 0.2 M glycine (pH 10.4), after which the absorbance was measured at 405 nm. The results are expressed as a percentage of the total β-hexosaminidase activity present in the cells. The spontaneous release observed in the absence of stimulus was subtracted from each experimental value.

Statistical analysis of experimental data. The statistical analysis of the ELISA and degranulation data was performed using the one way-analysis of variance (ANOVA), followed by an all-pairwise multiple comparison procedures (Holm-Šidák method). A *P*-value < 0.05 was considered statistically significant. All summary statistics and analyses were performed using the software SigmaPlot 12.0 (www.sigmaplot.com).

References

1. Ali, M. H. & Imperiali, B. Protein oligomerization: How and why. *Bioorg Med Chem.* **13**, 5013–20 (2005).
2. Rouvinen, J. *et al.* Transient Dimers of Allergens. *PLoS ONE* **5**, e9037 (2010).
3. Gould, H. J. & Sutton, B. J. IgE in allergy and asthma today. *Nature Rev. Immunol.* **8**, 205–217 (2008).
4. Chruszcz, M. *et al.* Structural and Immunologic Characterization of Ara h 1, a Major Peanut Allergen. *J. Biol. Chem.* **286**, 39318–39327 (2011).
5. Yusnawan, E., Marquis, C. P. & Lee, N. A. Purification and Characterization of Ara h 1 and Ara h 3 from Four Peanut Market Types Revealed Higher Order Oligomeric Structures. *J. Agric. Food. Chem.* **60**, 10352–10358 (2012).
6. Niemi, M. *et al.* Molecular interactions between a recombinant IgE antibody and the β-lactoglobulin allergen. *Structure.* **15**, 1413–1421 (2007).
7. Schöll, I. *et al.* Dimerization of the Major Birch Pollen Allergen Bet v 1 Is Important for its *In Vivo* IgE-Cross-Linking Potential in Mice. *J Immunol.* **175**, 6645–6650 (2005).
8. Kofler, S. *et al.* Stabilization of the Dimeric Birch Pollen Allergen Bet v 1 Impacts Its Immunological Properties. *J. Biol. Chem.* **289**, 540–551 (2014).
9. Chruszcz, M. *et al.* *Alternaria alternata* allergen Alt a 1: A unique β-barrel protein dimer found exclusively in fungi. *J. Allergy Clin. Immunol.* **130**, 241–247 (2012).
10. Li, M. *et al.* Crystal Structure of a Dimerized Cockroach Allergen Bla g 2 Complexed with a Monoclonal Antibody. *J. Biol. Chem.* **283**, 22806–22814 (2008).
11. Bellinghausen, I. *et al.* Allergological implication of the quaternary hexameric structure of the cockroach allergen Per a 3. *Clin. Exp. Allergy.* **38**, 539–548 (2007).
12. Babich, M., Foti, L. R., Sykaluk, L. L. & Clark, C. R. Profilin Forms Tetramers That Bind to G-Actin. *Biochem. Bioph. Res. Co.* **218**, 125–131 (1996).
13. Jonckheere, V., Lambrechts, A., Vandekerckhove, J. & Ampe, C. Dimerization of profilin II upon binding the (GP₃)₃ peptide from VASP overcomes the inhibition of actin nucleation by profilin II and thymosin β₄. *FEBS Lett.* **447**, 257–263 (1999).
14. Hauser, M., Roulias, A., Ferreira, F. & Egger, M. Panallergens and their impact on the allergic patient. *Allergy Asthma. Clin. Immunol.* **18**, 6(1): 1 (2010).
15. Barber Hernández, D. Could Profilin Be a 'Canary in a Coal Mine' of the Increasing allergy epidemic?. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **168**, 1–2 (2015).
16. Wopfner, N. *et al.* Molecular and Immunological Characterization of Profilin from Mugwort Pollen. *Biol. Chem.* **383**, 1779–1789 (2002).
17. Vrtala, S. *et al.* High-Level Expression in *Escherichia coli* and Purification of Recombinant Plant Profilins: Comparison of IgE-Binding Capacity and Allergenic Activity. *Biochem. Bioph. Res. Co.* **226**, 42–50 (1996).
18. Fedorov, A. A., Ball, T., Mahoney, N. M., Valenta, R. & Almo, S. C. The molecular basis for allergen cross-reactivity: crystal structure and IgE-epitope mapping of birch pollen profilin. *Structure.* **5**, 33–45 (1997).
19. Niemi, M. H. *et al.* Dimerization of lipocalin allergens. *Sci. Rep.* **8**(5), 13841 (2015).
20. Mittermann, I. *et al.* Oligomerization of profilins from birch, man and yeast. Profilin, a ligand for itself? *Sex Plant Reprod.* **11**, 183–191 (1998).
21. Jimenez-Lopez, J. C. *et al.* Characterization of profilin polymorphism in pollen with a focus on multifunctionality. *PLoS ONE.* **7**, e30878 (2012).
22. Staiger, C. J., Gibbon, B. C., Kovar, D. R. & Zonia, L. E. Profilin and actin-depolymerizing factor: modulator of actin organization in plants. *Trends Plant Sci.* **2**, 275–281 (1997).
23. Offermann, L. R. *et al.* Structural, functional and immunological characterization of profilin panallergens amb a 8, Art v 4, and Bet v 2. *J Biol Chem.* **291**(30), 15447–15459 (2016)
24. Korupolu, R. V. *et al.* Profilin oligomerization and its effect on poly (L-proline) binding and phosphorylation. *Int. J. Biol. Macromol.* **45**, 265–273 (2009).
25. Aparicio-Fabre, R. *et al.* Profilin tyrosine phosphorylation in poly-L-proline regions inhibits binding to phosphoinositide 3-kinase in *phaseolus vulgaris*. *Plant J.* **47**(4), 491–500 (2006).

26. Ganglberger, A. *et al.* Hev b 8, the *Hevea brasiliensis* latex profilin, is a cross-reactive allergen of latex, plant foods and pollen. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **125**, 216–222 (2001).
27. López-Torrejón, G. *et al.* An experimental and modeling-based approach to locate IgE epitopes of plant profilin allergens. *J. Allergy Clin. Immunol.* **119**, 1481–1488 (2007).
28. Jimenez-Lopez, J. C., Rodríguez-García, M. I. & Alché, J. D. Analysis of the Effects of Polymorphism on Pollen Profilin Structural Functionality and the Generation of Conformational, T- and B-Cell Epitopes. *PLoS ONE* **8**, e76066 (2013).
29. Liu, F. T. *et al.* Monoclonal dinitrophenyl-specific murine IgE antibody: preparation, isolation, and characterization. *J. Immunol.* **124**, 2728–2737 (1980).
30. Padavattan, S. *et al.* High-affinity IgE recognition of a conformational epitope of the major respiratory allergen Phl p 2 as revealed by X-ray crystallography. *J. Immunol.* **182**, 2141–2151 (2009).
31. Asturias, J. A. *et al.* Molecular and structural analysis of the panallergen profilin B cell epitopes defined by monoclonal antibodies. *Int. Immunol.* **14**, 993–1001 (2002).
32. Radauer, C. *et al.* Cross-reactive and species-specific immunoglobulin E epitopes of plant profilins: an experimental and structure-based analysis. *Clin. Exp. Allergy.* **36**, 920–929 (2006).
33. Cabanos, C. *et al.* Expression, purification, cross-reactivity and homology modeling of peanut profilin. *Protein Express. Purif.* **73**, 36–45 (2010).
34. Kuriyan, J. & Eisenberg, D. The origin of protein interactions and allostery in colocalization. *Nature.* **450**, 983–990 (2007).
35. Tang, C., Qi, J., Li, H., Zhang, C. & Wang, Y. A convenient and efficient protocol for isolating high-quality RNA from latex of *Hevea brasiliensis* (para rubber tree). *J. Biochem. Biophys. Methods.* **70**, 749–754 (2007).
36. Rihs, H. P. *et al.* PCR-based cloning, isolation, and IgE-binding properties of recombinant latex profilin (rHev b 8). *Allergy.* **55**, 712–717 (2000).
37. Kovar, D. R., Drobak, B. K. & Staiger, C. J. Maize profilin isoforms are functionally distinct. *The Plant Cell.* **12**, 583–598 (2000).
38. Kabsch, W. XDS. *Acta Cryst.* **D66**, 125–132 (2010).
39. Winn, M. D. *et al.* Overview of the CCP4 suite and current developments. *Acta Cryst.* **D67**, 235–242 (2011).
40. Evans, P. R. Scaling and assessment of data quality. *Acta Cryst.* **D62**, 72–82 (2006).
41. Adams, P. D. *et al.* PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Cryst.* **D66**, 213–221 (2010).
42. Emsley, P. & Cowtan, K. Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Cryst.* **D60**, 2126–2132 (2004).
43. Afonine, P. V. *et al.* Towards automated crystallographic structure refinement with phenix.refine. *Acta Cryst.* **D68**, 352–367 (2012).
44. Chen *et al.* MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. *Acta Cryst.* **D66**, 12–21 (2010).
45. Schrödinger. The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.7.x Schrödinger, LLC.
46. Baker, N. A., Sept, D., Joseph, S., Holst, M. J. & McCammon, J. A. Electrostatics of nanosystems: application to microtubules and the ribosome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 10037–10041 (2001).
47. Simossis, V. A. & Heringa, J. PRALINE: a multiple sequence alignment toolbox that integrates homology-extended and secondary structure information. *Nucleic Acids Res.* **33**, W 289–294 (2005).
48. Krissinel, E. & Henrick, K. Inference of macromolecular assemblies from crystalline state. *J. Mol. Biol.* **372**, 774–797 (2007).
49. Eshhar, Z. *Hybridoma technology in the bio-sciences and medicine.* (1st edition) 3–41 (New York: Plenum Press, 1985).
50. Ortega, E., Schweitzer-Stenner, R. & Pecht, I. Possible orientational constraints determine secretory signals induced by aggregation of IgE receptors on mast cells. *EMBO J.* **7**, 4101–4109 (1988).

Acknowledgements

This work was supported by DGAPA-UNAM (Grant PAPIIT-IN207613 to A.R.-R. and IN210314 to E.O.), CONACyT (Grant 221169 to A.R.-R. and 178803 to E.O.), and is part of the PhD thesis of Mares-Mejía I. student from Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) and received fellowship 347432 from CONACyT. We thank Dra. Ma. de la Luz Hortensia García Cruz, Dr. René Daniel Ruíz Morales and Dr. Luis M. Terán Juárez from Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias “Ismael Cosío Villegas” (INER), México, for providing patients’ sera. We also thank to M.V.Z. Georgina Díaz Herrera from IIB-UNAM, Q. Eréndira García Ríos, M. C. Georgina Espinoza Pérez from IQ-UNAM, M.C. Daniel Eduardo Rodríguez Chamorro from IFC-UNAM, for technical assistance and finally to the Laboratorio de Estructura de Proteínas LANEM-UNAM.

Author Contributions

I.M.-M. and A.R.-R. initiated the project; I.M.-M., S.M.-C., C.G.-C., P.C.-S., A.T.-L., S.L.-G., E.O. and A.R.-R. designed and performed the experiments; I.M.-M., S.M.-C., A.T.-L., E.O. and A.R.-R. analyzed data and wrote the manuscript.

Additional Information

Accession codes: Coordinates and structure factors have been deposited in the Protein Data Bank (PDB) with accession codes: 5FDS, 5FEF, and 5FEG.

Supplementary information accompanies this paper at <http://www.nature.com/srep>

Competing financial interests: The authors declare no competing financial interests.

How to cite this article: Mares-Mejía, I. *et al.* Structural insights into the IgE mediated responses induced by the allergens Hev b 8 and Zea m 12 in their dimeric forms. *Sci. Rep.* **6**, 32552; doi: 10.1038/srep32552 (2016).



This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License. The images or other third party material in this article are included in the article’s Creative Commons license, unless indicated otherwise in the credit line; if the material is not included under the Creative Commons license, users will need to obtain permission from the license holder to reproduce the material. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

© The Author(s) 2016