



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Análisis bioquímico-estructural del alérgeno recombinante Hev b 7 (patatina) del látex de
Hevea brasiliensis

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

Miguel Alejandro Ramírez Rodríguez

TUTOR PRINCIPAL

Dra. Adela Rodríguez Romero
[Instituto de Química](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dr. Ismael Bustos Jaimes
[Facultad de Medicina](#)

Dr. Horacio Reyes Vivas
[Instituto Nacional de Pediatría](#)

Ciudad de México. Septiembre, 2022



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.

RAMÍREZ RODRÍGUEZ MIGUEL ALEJANDRO
Estudiante de Maestría en Ciencias Bioquímicas
P R E S E N T E

Los miembros del Subcomité Académico en reunión ordinaria del día **16 de mayo de 2022**, conocieron su solicitud de asignación de **JURADO DE EXAMEN** para optar por el grado de **Maestro en Ciencias**, con la réplica de la tesis "**Análisis bioquímico-estructural del alérgeno recombinante Hev b 7 (patatina) del látex de Hevea brasiliensis**", dirigida por el/la Dr(a). **RODRÍGUEZ ROMERO ADELA**.

De su análisis se acordó nombrar el siguiente jurado integrado por los doctores:

AYALA ACEVES MARCELA	PRESIDENTE
RODRÍGUEZ SOTRES ROGELIO	SECRETARIO
FARRÉS GONZÁLEZ SARABIA AMELIA	VOCAL
GARZA RAMOS MARTÍNEZ GEORGINA	VOCAL
MUÑOZ CLARES ROSARIO ADELAIDA	VOCAL

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

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 23 de mayo de 2022



Coordinadora
Dra. Claudia Lydia Treviño Santa Cruz

Agradecimientos

Agradezco primeramente a Dios por el milagro de la vida, por la salud, los familiares, amigos y experiencias maravillosas que puso en mi camino.

Agradezco a mi madre Doris Zenaida Rodríguez Rosales y mi padre Wilmer Enrique Ramírez Carrero por las enseñanzas, la crianza que me dieron, el apoyo durante toda mi vida y su cariño incondicional.

A mi hermana Karen Zenaida Ramírez Rodríguez por su cariño y aprecio. Un gran abrazo en la distancia.

A María Coromoto Pereira Ruiz por el cariño durante toda mi infancia, por escucharme durante tantos años, siempre se le recuerda con un inmenso cariño. Siempre serás mi segunda madre.

A la profesora Mirangel García por ser esa mano amiga cuando más lo necesite.

A todos mis familiares, amigos y gente de mi pueblo Bailadores en Venezuela por el apoyo durante todos estos años para alcanzar mis metas.

A mis tíos Raiza Rodríguez y Henry Caridad por el apoyo económico y emocional durante todo el proceso para el ingreso a este posgrado. Un gran saludo hasta Argentina.

Al Proyecto Órbita C.I. 130, particularmente a Gerardo García por las experiencias, las personas que conocí, por el apoyo durante muchos años y para el ingreso a este posgrado.

A la Dra. Yris Martínez, la Dra. María Angelica Sánchez y la Dra. Patricia Rosenzweig por su apoyo y cartas de recomendación para el ingreso a este posgrado.

A la Sra. Mercedes Medina e Ignacio Gonzalez por el apoyo y asesoría durante mi llegada a México. Infinitamente agradecido por ese primer empujón en este país.

A la Dra. Adela Rodríguez Romero por su paciencia, apoyo y asesoría durante estos años, por aceptarme como su estudiante de maestría y poder formar parte de este hermoso grupo de trabajo. Esto me ha permitido desarrollarme tanto en el ámbito académico como personal, infinitamente agradecido.

A la Dra. Annia Rodríguez Hernández por el apoyo, enseñanzas y amistad durante mi estancia, se le tiene un gran aprecio.

A todos los integrantes del Laboratorio de Biomacromoléculas 3: Lic. María Gabriela Terán, M. en C. Jessica Loera, M. en C. Jeanette Loera, M. en C. Jessica Terron, Dr. Benjamín García, Dr. Israel Mejía, M. en C. Arely Martínez, M. en C. Areli Silva, Lic. Francisco Olvera, Dr. Homero Gómez, Dr. Adrián Quintana y Dra. Alejandra Hernández Santoyo; por todas las enseñanzas, apoyo, paciencia y comidas durante mi llegada y estancia en el laboratorio.

A la Universidad Nacional Autónoma de México y el Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas por aceptarme entre sus estudiantes, en especial a Julio Palacio y la M. en C. Norma Trejo por su paciencia y ayuda con los tramites durante toda la maestría.

A México y su maravillosa gente por hacerme sentir como en casa y por las hermosas experiencias que me han permitido vivir.

Agradezco a Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para la realización de esta maestría con número de apoyo: 736508 (CVU: 968051) y los apoyos otorgados al laboratorio (Proyectos 221169, 301120 y CF 2019-87163)

Agradecimiento a DGAPA-UNAM por el apoyo al laboratorio (PAPIIT-IN207613).

Agradecimiento al Laboratorio Nacional de Estructura de Macromoléculas (LANEM-IQ) y la M. en C. Georgina Espinosa Pérez por los intentos de coleccionar patrones de difracción con los microcristales obtenidos.

Agradezco a la Dra. Patricia Cano por la paciencia y apoyo en el área de biología molecular para el desarrollo de este trabajo.

Agradezco a los miembros de mi Comité Tutor: Dr. Ismael Bustos Jaimes y el Dr. Horacio Reyes Vivas por el apoyo y asesoría durante la realización de este proyecto.

Agradecimiento a todos los miembros de mi Comité Jurado: Dra. Ayala Aceves Marcela, Dr. Rodríguez Sotres Rogelio, Dra. Farrés González Sarabia Amelia, Dra. Garza Ramos Martínez Georgina y Dra. Muñoz Clares Rosario Adelaida, por su paciencia en la lectura y corrección del presente manuscrito.

Contenido

Resumen	10
Abstract	12
1. Introducción	14
2. Marco teórico	15
2.1 Sistema Inmune	15
2.2 Inmunoglobulinas	15
2.3 Alergia	16
2.4 Alérgenos	16
2.5 Alérgenos del látex	17
2.6 Lipasas	18
2.7 Patatinas	20
3. Antecedentes	24
3.1 Alérgeno Hev b 7	24
4. Justificación del problema	27
5. Hipótesis	27
6. Objetivo general	27
7. Objetivos específicos	27
8. Materiales y métodos	28
8.1 Diseño del plásmido para expresión de rHev b 7	28
8.2 Propagación del plásmido con <i>E. coli</i> DH5 α	29
8.3 Cinéticas de expresión de Trx-rHev b 7 en <i>E. coli</i>	29
8.4 Expresión de Trx-rHev b 7 en <i>E. coli</i>	30
8.5 Solubilización asistida por sonicación de Trx-rHev b 7	30
8.6 Cuantificación de las proteínas	30
8.7 Purificación mediante cromatografía de afinidad a Ni ²⁺ de Trx-rHev b 7 solubilizada	31
8.8 Espectrometría de masas MALDI-TOF de Trx-rHev b 7	31
8.9 Estudio de Trx-rHev b 7 en solución mediante dispersión dinámica de luz (DLS)	31
8.10 Cristalización de Trx-rHev b 7	31
8.11 Corte de la proteína de fusión Trx-rHev b 7 con la proteasa TEV	31
8.12 Purificación mediante cromatografía de afinidad a Ni ²⁺ de rHev b 7 tras el corte con la proteasa TEV	32
8.13 Actividades enzimáticas de Trx-rHev b 7 y rHev b 7 usando palmitato de p-nitrofenilo como sustrato	32
8.14 Actividad enzimática como fosfolipasa de rHev b 7 con suspensión de yema de huevo como sustrato	32
8.15 Estudios de estabilidad de Trx-rHev b 7 mediante ensayos de fluorimetría diferencial de barrido (FDB)	33
8.16 Espectros de dicroísmo circular en el UV lejano de Trx-rHev b 7 y rHev b 7	33
8.17 Reconocimiento de rHev b 7 por IgE en sueros de pacientes alérgicos al látex	33
8.18 Modelos estructurales	34
8.19 Evaluación de calidad y ortodoxia de los modelos estructurales	34
8.20 Predicción de epítomos	34
9. Resultados y discusión	35

9.1	Propagación del plásmido con <i>E. coli</i> DH5 α	35
9.2	Cinéticas de expresión de Trx-rHev b 7 en <i>E. coli</i>	35
9.3	Expresión en <i>E. coli</i> y solubilización mediante sonicación de Trx-rHev b 7	36
9.4	Purificación mediante cromatografía de afinidad a Ni ²⁺ de Trx-rHev b 7 solubilizada	37
9.5	Espectro de masas MALDI-TOF de Trx-rHev b 7	38
9.6	Estudio de Trx-rHev b 7 en solución mediante dispersión dinámica de luz (DLS)	39
9.7	Cristalización de Trx-rHev b 7	41
9.8	Corte de la proteína de fusión Trx-rHev b 7 con la proteasa TEV	42
9.9	Purificación mediante cromatografía de afinidad a Ni ²⁺ de rHev b 7	42
9.10	Actividades enzimáticas de Trx-rHev b 7 y rHev b 7 usando palmitato de p-nitrofenilo como sustrato	43
9.11	Actividad enzimática como fosfolipasa de rHev b 7 con suspensión de yema de huevo como sustrato	44
9.12	Estudios de estabilidad de Trx-rHev b 7 mediante ensayos de fluorimetría diferencial de barrido	45
9.13	Espectros de dicroísmo circular en el UV lejano de Trx-rHev b 7 y rHev b 7	46
9.14	Reconocimiento de rHev b 7 por IgE en sueros de pacientes alérgicos al látex	47
9.15	Modelo estructural de Robetta	49
9.16	Modelo estructural de AlphaFold-Multimer	53
9.17	Superposición de los modelos estructurales de Robetta y AlphaFold-Multimer	55
9.18	Evaluación de calidad y ortodoxia de los modelos estructurales de Hev b 7 mediante PROCHECK	62
9.19	Evaluación de calidad y ortodoxia de los modelos estructurales de Hev b 7 mediante MOLPROBITY	64
9.20	Predicción de epítomos lineales mediante Bepipred Linear Epitope Prediction 2.0	69
9.21	Predicción de epítomos conformacionales mediante DiscoTope 2.0	70
10.	Conclusiones	74
11.	Referencias	75

Índice de figuras.

Figura 1. Estructura de GIVA PLA ₂ (PDB:1CJY)	19
Figura 2. Estructura tridimensional de Pat17 en diagrama de listones y diagrama topológico de Richardson comparativo con el plegamiento α/β -hidrolasa canónico	20
Figura 3. Sitio activo y canales en la estructura de Pat17	21
Figura 4. Interacciones en el sitio activo de Pat17 con los inhibidores DFP y MAFP	22
Figura 5. Modelo del arreglo hipotético de POPC en Pat17	22
Figura 6. Alineamiento de las secuencias aminoacídicas de distintas patatinas con el Servidor PRALINE	23
Figura 7. Mapa del plásmido pET-32a(+), señalando la región donde se insertó el gen de Hev b 7 y diagrama de la proteína de fusión Trx-rHev b 7 a ser expresada por este plásmido	28
Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de la digestión del plásmido pET32a(+)-rHev b 7 con las enzimas de restricción BglII y NotI	35
Figura 9. Perfil electroforético SDS-PAGE (10% T) de las fracciones solubles e insolubles de los extractos de <i>E. coli</i> BL21(DE3) y Rosetta-gami transformadas con el plásmido pET-32a(+)-rHev b 7, las cuales fueron inducidas con IPTG para seguir la cinética de expresión de Trx-rHev b 7 (60 kDa) a 25°C con los tiempos 0h, 12h y 24 h	36
Figura 10. Perfil electroforético SDS-PAGE (12% T) del fraccionamiento de extractos de <i>E. coli</i> BL21(DE3) transformada con el plásmido pET-32a(+)-rHev b 7 (carril 1 y 5) y lavados consecutivamente con: Tritón X-100 al 2% (2 y 6), agua (3 y 7), fosfatos 10 mM pH 8 y 0.5 mM de DTT con sonicación (4), los carriles. Las fracciones 1 a 4 son los sobrenadantes y 5 a 7 son precipitados	37
Figura 11. Perfil electroforético SDS-PAGE (12% T) de la fracción soluble de la sonicación en fosfatos 10 mM pH 8 con 0.5 mM de DTT del cuerpo de inclusión de Trx-rHev b 7 lavado en el paso anterior (carril 1) y la purificación de la proteína mediante cromatografía de afinidad a Ni ²⁺ , siendo eluida con 300 mM de imidazol a una pureza electroforética del 97% (carril 2) y debido a la alta concentración con la que eluyó esta proteína parte de ella se agregó, este agregado de igual forma fue analizado (carril 3)	38
Figura 12. Espectro de masas MALDI-TOF de Trx-rHev b 7	39
Figura 13. Datos de dispersión dinámica de luz (DLS) de Trx-rHev b 7 en solución, mostrando un gráfico de la distribución por volumen del tamaño de partícula	40
Figura 14. Estructura tridimensional del octámero de la proteína Trx-Puf60 (PDB:3DXB), poseyendo cada subunidad un color distinto, las esferas rojas corresponden a moléculas de agua y las esferas verdes a iones cloruro	40
Figura 15. Microcristales en gota de Trx-rHev b 7 obtenidos con la condición B3 del kit Morpheus Complete III, observándose un precipitado en el cual crecieron cristales que interactúan con la luz polarizada pasando de un aspecto opaco (imagen a) a un aspecto brillante (imagen b) al girar 90° el polarizador. Las flechas rojas señalan algunos microcristales	41
Figura 16. Perfil electroforético SDS-PAGE (10% T) de la proteína Trx-rHev b 7 solubilizada (carril 1) y su ensayo de corte con la proteasa TEV (carril 2)	42
Figura 17. Perfil electroforético SDS-PAGE (15% T) de rHev b 7 (43 kDa)	43
Figura 18. Estudios de desnaturalización de Trx-rHev b 7 mediante fluorometría diferencial de barrido a distintos valores de pH	46
Figura 19. Espectros de dicroísmo circular (DC) en el UV lejano de Trx-rHev b 7 (línea azul) y rHev b 7 (línea naranja)	47

Figura 20. Reconocimiento de rHev b 7 por IgE en sueros de pacientes alérgicos al Látex	48
Figura 21. Modelo estructural de Hev b 7 obtenido mediante el servidor Robetta, resaltando los canales hacia el sitio catalítico	51
Figura 22. Modelo estructural del dímero de Hev b 7 obtenido mediante Robetta, resaltando los residuos de la intercara	52
Figura 23. Modelo estructural de Hev b 7 en forma de dímero obtenido mediante AlphaFold-Multimer	54
Figura 24. Superposición de los modelos estructurales de Hev b 7 obtenidos mediante Robetta y AlphaFold-Multimer (RMSD de 6.151 Å), resaltando las regiones distintas entre ambos modelos	56
Figura 25. Comparación de los modelos estructurales de Hev b 7 obtenidos mediante Robetta y AlphaFold-Multimer, resaltando el canal 2 hacia la diada catalítica y las regiones distintas entre ambos modelos	57
Figura 26. Comparación de los modelos estructurales de Hev b 7 obtenidos mediante Robetta y AlphaFold-Multimer, enfatizando las diferencias conformacionales en el asa 273-282, la His326 y la hélice 100-105	58
Figura 27. Comparación entre los modelos estructurales de Hev b 7 obtenido mediante Robetta y AlphaFold-Multimer, resaltando los cambios en el arreglo del asa 255-259	60
Figura 28. Comparación entre los modelos estructurales de Hev b 7 obtenido mediante Robetta y AlphaFold-Multimer, resaltando los cambios en el arreglo de la región 347-361	61
Figura 29. Diagrama de Ramachandran obtenido mediante PROCHECK para el modelo de Robetta	63
Figura 30. Diagrama de Ramachandran obtenido mediante PROCHECK para el modelo de AlphaFold-Multimer	64
Figura 31. Epítomos lineales predichos para Hev b 7.01 y Pat17 según el servidor Bepipred Linear Epitope Prediction, señalando los posibles epítomos comunes entre Hev b 7 y Pat17	69
Figura 32. Epítomos conformacionales (color amarillo) predichos mediante el servidor DiscoTope 2.0 para el modelo estructural de Hev b 7 obtenido mediante Robetta	71
Figura 33. Epítomos conformacionales (color amarillo) predichos mediante el servidor DiscoTope 2.0 para el modelo estructural de Hev b 7 obtenido mediante AlphaFold-Multimer y comparados con los epítomos lineales predichos por Bepipred	72

Índice de tablas.

Tabla 1. Tabla con los alérgenos del látex de <i>Hevea brasiliensis</i> según la IUIS	18
Tabla 2. Actividades enzimáticas como lipasas de Trx-rHev b 7 y rHev b 7 con el palmitato de p-nitrofenilo como sustrato	44
Tabla 3. Actividad enzimática como fosfolipasa de rHev b 7 con suspensión de yema de huevo como sustrato	45
Tabla 4. Elementos de estructura secundaria calculados con el servidor BestSel a partir de los espectros de dicroísmo circular en el UV lejano de las proteínas Trx-rHev b 7 y rHev b 7	47
Tabla 5. Interacciones tipo puente de hidrógeno y puente salino en la intercara del dímero del modelo de Robetta	52
Tabla 6. Interacciones tipo puente de hidrógeno y puente salino en la intercara del dímero del modelo de AlphaFold-Multimer	55
Tabla 7. Residuos de aminoácidos con conformaciones fuera de lo permitido por el Ramachandran para el modelo de Robetta según MOLPROBITY	65
Tabla 8. Colisiones entre residuos en el modelo de Robetta según MOLPROBITY	66
Tabla 9. Residuos de aminoácidos con conformaciones fuera de lo permitido por el Ramachandran para el modelo de AlphaFold-Multimer según MOLPROBITY	67
Tabla 10. Colisiones entre residuos en el modelo de AlphaFold-Multimer según MOLPROBITY	68

Resumen

Hev b 7 es uno de los alérgenos presentes en el látex de *Hevea brasiliensis*, que se ha clasificado como una patatina con base en su secuencia de aminoácidos. Las patatinas presentan actividad hidrolítica sobre sustratos de naturaleza lipídica, y algunos miembros de esta familia son fosfolipasas, como la patatina de *Solanum tuberosum*.

El alineamiento de las secuencias de varias patatinas demuestra regiones conservadas, como los motivos Gly-X-Ser-X-Gly y Asp-Gly-X, característicos de la diada catalítica Ser-Asp de este tipo de enzimas. Hev b 7 posee una identidad del 43% con Pat17, la patatina cuya estructura tridimensional ha sido determinada (PDB: 1OXW), por lo que podrían existir diferencias estructurales significativas entre ambas proteínas en regiones no conservadas y expuestas al solvente.

En este trabajo se diseñó un protocolo de expresión, solubilización y purificación a partir de los cuerpos de inclusión de la proteína de fusión tiorredoxina-rHev b 7 (Trx-rHev b 7) empleando el plásmido pET-32a(+) en *Escherichia coli* BL21(DE3). La solubilización de Trx-rHev b 7 se logró usando sonicación en un amortiguador de baja fuerza iónica, siendo purificada en un solo paso mediante cromatografía de afinidad a Ni²⁺, con rendimientos de hasta 100 mg de Trx-rHev b 7 por litro de cultivo bacteriano. Los espectros de dicroísmo circular en el UV lejano y ensayos de actividad con palmitato de p-nitrofenilo y suspensión de yema de huevo demostraron el correcto plegamiento de la proteína Trx-rHev b 7. Los ensayos de fluorimetría diferencial de barrido revelaron la estabilidad de esta proteína y el estudio por dispersión dinámica de la luz demostró la monodispersidad de la muestra. Por lo tanto, se montaron pruebas de cristalización de Trx-rHev b 7, a una concentración de 20 mg/mL. Estos ensayos dieron resultados prometedores al obtenerse cristales no salinos en algunas condiciones, las cuales podrían ser optimizadas.

La proteína rHev b 7 escindida a partir de Trx-rHev b 7 es inestable y se agrega, una vez purificada, en un lapso de 24h. Por este motivo, rHev b 7 se empleó en ensayos de actividad, los cuales revelaron una mayor actividad de la enzima con una suspensión de yema de huevo que con el sustrato sintético palmitato de p-nitrofenilo, lo que sugiere una preferencia de esta enzima por los lípidos de la yema, los cuales en su mayoría son fosfolípidos. Con esta información se piensa que rHev b 7 es una fosfolipasa como otros miembros de la familia de las patatinas.

Con base en la secuencia de aminoácidos de Hev b 7 (GenBank: AAC27724.1) se obtuvieron modelos tridimensionales usando Robetta y AlphaFold-Multimer. Ambos servidores indican un plegamiento tipo α/β típico de hidrolasas, con una hoja β compuesta por 5 hebras β paralelas y una antiparalela, rodeada por hélices α y una horquilla β , con una diada catalítica Ser61-Asp205 y un puente disulfuro Cys125-Cys175. Además, se predice un dímero obligado con un área de intercara mayor a los 3000 Å². Ambos modelos difieren sustancialmente en las asas y hélices α expuestas al solvente que rodean la diada catalítica. En el modelo de Robetta se forman tres canales que conducen al sitio catalítico, donde se podría acomodar un fosfolípido tipo glicerofosfolina. Por otra parte, el modelo de AlphaFold-Multimer no da lugar a ningún canal que conduzca al sitio catalítico. Estos resultados sugieren una posible conformación cerrada predicha por AlphaFold-Multimer y una abierta predicha por Robetta. La validación de los modelos arrojó algunos problemas de conformación de residuos, según el gráfico de Ramachandran, y algunas colisiones entre residuos, siendo mayor el número de estos problemas en el modelo de AlphaFold-Multimer. Sin embargo, estos problemas, no parecen

afectar las regiones que rodean al sitio activo de la enzima y se concentran en la intercara del dímero, el extremo N-terminal y algunas asas expuestas al solvente.

rHev b 7 se empleó en estudios de reconocimiento por anticuerpos IgE de sueros de pacientes alérgicos al látex. Los resultados de ELISA indicaron una mayor prevalencia alérgica hacia Hev b 7 en los trabajadores del área de salud. Con los modelos de Robetta y AlphaFold-Multimer se hizo un análisis de los posibles epítomos responsables de este reconocimiento, usando los servidores Bepipred Linear Epitope Prediction 2.0 y Discotope 2.0. El análisis de los resultados sugiere que la región antigénica más importante de Hev b 7 se encuentra cercana al sitio activo, provocando una posible correlación alergenidad-actividad enzimática.

Abstract

Hev b 7 is one of the allergens present in the latex of *Hevea brasiliensis*, which has been classified as a patatin based on its amino acid sequence. Patatins have hydrolytic activity on lipid substrates, and some members of this family are phospholipases, such as patatin from *Solanum tuberosum*.

The alignment of the sequences of several patatins shows conserved regions, such as the Gly-X-Ser-X-Gly and Asp-Gly-X motifs, characteristic of the Ser-Asp catalytic dyad of this type of enzyme. Hev b 7 has a 43% identity with Pat17, the patatin whose three-dimensional structure has been determined (PDB: 1OXW), so there could be significant structural differences between both proteins in non-conserved and solvent-exposed regions.

In this work, an expression, solubilization, and purification protocol was designed from the inclusion bodies of the fusion protein thioredoxin-rHev b 7 (Trx-rHev b 7) using the plasmid pET-32a(+) in *Escherichia coli* BL21. (DE3). The solubilization of Trx-rHev b 7 was achieved using sonication in a low ionic strength buffer, being purified in a single step by Ni²⁺ affinity chromatography, with yields of up to 100 mg of Trx-rHev b 7 per liter of bacterial culture. Circular dichroism spectra in the far UV and activity assays with which substrate or which type demonstrated the correct folding of the Trx-rHev b 7 protein. Thermal shift assays revealed this protein's stability, and the dynamic light scattering study showed the monodispersity of the sample. Therefore, crystallization tests of Trx-rHev b 7 were set up at a concentration of 20 mg/mL. These tests gave promising results as non-saline crystals were obtained under some conditions, and these conditions could be optimized.

The rHev b 7 protein cleaved from Trx-rHev b 7 is unstable and aggregates, once purified, within 24h. For this reason, rHev b 7 was used in activity assays. Activity assays revealed higher enzyme activity with an egg yolk suspension than with the synthetic p-nitrophenyl palmitate substrate, suggesting a preference of this enzyme for yolk lipids, mostly phospholipids. With this information, rHev b 7 is thought to be a phospholipase like other members of the patatin family.

Based on the amino acid sequence of Hev b 7 reported in GenBank: AAC27724.1, three-dimensional models were obtained using Robetta and AlphaFold-Multimer. Both servers indicate a typical α/β -type fold of hydrolases, with a β -sheet composed of 5 parallel β -strands and one antiparallel, surrounded by α -helices and a β -hairpin, with a Ser61-Asp205 catalytic dyad and a Cys125-Cys175 disulfide bridge. Furthermore, a dimer with an interface area greater than 3000 Å² is predicted. Both models differ substantially in the solvent-exposed loops and α -helices surrounding the catalytic dyad. In the Robetta model, three channels are formed that lead to the catalytic site, where a glycerophosphocholine-type phospholipid could be accommodated.

On the other hand, the AlphaFold-Multimer model does not give rise to any channel leading to the catalytic site. These results suggest a possible closed conformation predicted by AlphaFold-Multimer and an open conformation predicted by Robetta. The validation of the models showed some residue conformation problems, according to the Ramachandran plot, and some collisions between residues, the number of these problems being higher in the AlphaFold-Multimer model. However, these problems do not seem to affect the regions surrounding the active site of the enzyme. They are concentrated in dimer interface, the N-terminus, and some loops exposed to the solvent.

rHev b 7 was used in IgE antibody recognition studies of sera from patients allergic to latex. ELISA results indicated a higher prevalence of allergies to Hev b 7 among health care workers. With the Robetta and AlphaFold-Multimer models, the possible epitopes responsible for this recognition were analyzed using the Bepipred Linear Epitope Prediction 2.0 and Discotope 2.0 servers. The analysis of the results suggests that the most crucial antigenic region of Hev b 7 is close to the active site and has a possible allergenicity-enzymatic activity correlation.

1. Introducción

El árbol *Hevea brasiliensis*, también conocido como el árbol del hule o caucho, es originario de Sudamérica, específicamente de la zona amazónica. Las plantas del género *Hevea* son conocidas por el látex que producen, el cual es usado en la manufactura de una gran variedad de productos de uso común. El látex es una suspensión coloidal que se caracteriza por ser uno de los materiales más elásticos conocidos, por lo que se utiliza en la fabricación de materiales en la industria sanitaria, fotográfica, textil, neumática, entre otros. Sin embargo, existe un problema persistente al usar productos manufacturados con látex, que es la respuesta alérgica generada en seres humanos por las proteínas alergénicas presentes en este material (Posch *et al.*, 1998).

El árbol *H. brasiliensis* ha sido objeto de múltiples estudios para determinar la naturaleza de los alérgenos presentes en el látex que produce. Entre estos se encuentra una proteína de 43 kDa cuyo nombre como alérgeno es Hev b 7. Esta proteína ha ido objeto de diversos estudios, lo que ha permitido conocer su cDNA y su secuencia de aminoácidos (Kostyal *et al.*, 1998). Hev b 7 es miembro de la familia de las patatinas y muestra actividad de lipasa contra el palmitato de p-nitrofenilo (Sowka *et al.*, 1998). Las patatinas son una familia de proteínas de alrededor de 40 kDa que funcionan como proteínas de almacenamiento y de defensa en tubérculos como la papa, poseyendo actividad hidrolítica sobre lípidos, particularmente fosfolípidos (Hirschberg *et al.*, 2001).

Por otra parte, un estudio en Finlandia sobre la reactividad de Hev b 7 frente a las IgE de adultos y niños alérgicos al látex indicó que esta proteína es importante en la reacción alérgica, principalmente de adultos trabajadores del área de salud (Seppälä *et al.*, 2000).

A la fecha, no se conoce la estructura tridimensional de Hev b 7, que es fundamental para comprender la funcionalidad de la proteína y los mecanismos mediante los cuales induce la respuesta alérgica.

2. Marco teórico

2.1 Sistema inmunitario

El sistema inmunitario consta de todos los elementos de los que un organismo dispone para defenderse frente a agentes externos potencialmente nocivos, su estudio forma parte de la rama de la biología denominada inmunología.

Este sistema se clasifica según su función en:

- Sistema Inmunitario Innato (SII): Es la primera línea de defensa del organismo. Es el sistema de defensa más antiguo y está presente en todos los organismos pluricelulares. Su respuesta es rápida, pero posee especificidad limitada, esto debido a que este sistema responde tras la detección de patrones moleculares comunes en patógenos mediante receptores específicos, como Toll-Like Receptors (TLRs) y Nod-Like Receptors (NLRs). Por ello, el sistema inmunitario innato se limita por el reconocimiento de patrones moleculares predeterminados para dar una respuesta, por lo cual carece de adaptabilidad.
- Sistema Inmunitario Adquirido (SIA): Es la línea de defensa más selectiva, se caracteriza por su capacidad adaptativa, es decir por mejorar su reconocimiento hacia determinadas moléculas mediante exposiciones sucesivas. Además, posee memoria para reconocer rápidamente antígenos a los cuales se ha estado expuesto previamente. Este sistema, a su vez, posee dos tipos de respuesta inmune: inmunidad celular e inmunidad humoral. La primera está mediada por los linfocitos T y es el principal mecanismo de defensa contra microorganismos intracelulares. Por otra parte, la inmunidad humoral es mediada por el conjunto de anticuerpos que son secretados por los linfocitos B, es el principal medio de defensa contra infecciones bacterianas y, además, es el principal responsable de la respuesta alérgica o hipersensibilidad de tipo I (Tochep, 2012).

2.2 Anticuerpos o inmunoglobulinas

Los anticuerpos o inmunoglobulinas son proteínas heterodiméricas capaces de unirse a moléculas de manera muy específica, y constan de cuatro cadenas polipeptídicas, dos de ellas son cadenas pesadas (≈ 50 kDa) y las otras dos son cadenas ligeras (≈ 25 kDa). Los anticuerpos se pueden dividir en dos regiones características: región Fc (constante) y la región Fab (variable), y se clasifican en cinco isotipos (G, A, M, D y E).

La región Fab de los anticuerpos reconoce la molécula blanco mediante interacciones parátipo-epítipo, siendo el parátipo la región de reconocimiento del anticuerpo y el epítipo la región del antígeno que es reconocido. La región constante Fc determina la respuesta inmune tras el reconocimiento de la molécula blanco, para ello el Fc se une a receptores en la superficie celular como lo son Fc ϵ RI, Fc γ RI, Fc α RI, entre otros; según esta región los anticuerpos se pueden clasificar en cinco isotipos: las IgM, IgG, IgE, IgA y IgD (Schroeder & Cavacini, 2010).

Las inmunoglobulinas tipo E o IgEs son de especial interés para el presente trabajo, ya que son responsables de la respuesta alérgica o hipersensibilidad tipo I. Estas inmunoglobulinas

están involucradas en la defensa del organismo contra patógenos, en particular parásitos, y son fundamentales en la respuesta alérgica (Gould *et al.*, 2003).

2.3 Alergia

La alergia o hipersensibilidad de tipo I es una reacción exacerbada del sistema inmunitario contra una molécula inocua denominada alérgeno. Esta respuesta involucra las inmunoglobulinas de tipo E (IgEs) y se asocia a una predisposición genética del individuo. La respuesta alérgica se divide en dos etapas: la sensibilización y la respuesta inmune secundaria.

La sensibilización se presenta cuando un individuo con predisposición genética se expone a un alérgeno. En esta etapa el sistema inmune reconoce al alérgeno e inicia la producción de linfocitos B para la síntesis de IgEs específicas contra esta sustancia extraña. Posteriormente, estas inmunoglobulinas se unen a sus receptores de alta afinidad FcεRI, localizados principalmente en la membrana plasmática de mastocitos y basófilos, con lo cual se sensibilizan estas células efectoras.

La respuesta inmune secundaria consta de las subsecuentes exposiciones del individuo al alérgeno tras la etapa de sensibilización. En esta etapa se lleva a cabo el entrecruzamiento de los receptores FcεRI en las células efectoras sensibilizadas, proceso que es mediado por la unión de las IgEs con el alérgeno. Este entrecruzamiento induce la cascada de señalización que da lugar a la desgranulación de los mastocitos y basófilos con la liberación de histamina, serotonina, entre otras moléculas efectoras de la respuesta inmune que inducen los síntomas típicos de una respuesta alérgica (Valenta *et al.*, 2015).

2.4 Alérgenos

Los alérgenos involucrados en la hipersensibilidad de tipo I son proteínas de diversas fuentes, generalmente inocuas, que producen alergia en individuos susceptibles. La mayoría de las fuentes alérgicas poseen más de un alérgeno en distintas proporciones. La prevalencia de la alergia a éstos varía entre las poblaciones alérgicas de distintas regiones dependiendo de factores genéticos, epigenéticos, ambientales, de alimentación, entre otros. Por ello, la prevalencia se evalúa para cada población humana por separado debido a la variabilidad de ésta (Tham & Leung, 2018).

Los alérgenos poseen una región antigénica, conocida como epítipo, que es la responsable de la respuesta inmune, a la cual se unen los anticuerpos IgE. Por lo anterior, es fundamental la identificación y estudio de los epítipos para la comprensión de la respuesta alérgica y el desarrollo de terapias para contrarrestarla.

Los epítipos se clasifican en dos grupos: Los continuos o lineales y los discontinuos o conformacionales.

Los epítipos continuos constan de un conjunto de residuos aminoacídicos consecutivos en la secuencia de la proteína alérgica, por lo que sólo dependen de la secuencia de la proteína y son independientes del plegamiento de ésta.

Los epítomos discontinuos son aquellos donde los residuos que lo constituyen se encuentran distribuidos en distintos puntos a lo largo de la secuencia proteica, se encuentran cercanos en la superficie debido al plegamiento propio de la proteína. Por esta razón, estos epítomos dependen de la conformación de la proteína alergénica, y también se les conoce como epítomos conformacionales. La mayoría de los epítomos reconocidos por anticuerpos caen en esta última categoría (Barlow *et al.*, 1986).

2.5 Alérgenos del látex

La alergia al látex es un problema grave que afecta a individuos susceptibles, sobre todo en el ámbito intrahospitalario en países en vías de desarrollo. En estos casos, el 8% de la población está sensibilizada frente al látex y la mortalidad por anafilaxia en anestesia es del 6%, siendo la alergia al látex la segunda causa de reacciones anafilácticas intraoperatorias. Esta alergia es especialmente importante en trabajadores del área de salud y niños con espina bífida, al ser una población que está expuesta continuamente al látex (Vélez-Méndez, 2015).

Estudios en trabajadores del área de salud revelaron una prevalencia del 5 al 17 % de alergia al látex. Para niños con espina bífida se ha encontrado una prevalencia del 34 al 64.5% en México (Orozco *et al.*, 2006).

Estudios en Latinoamérica han revelado que la alergia al látex es un problema serio: Un estudio en Venezuela hecho a estudiantes del posgrado de odontología de la UCV reveló una prevalencia del 32% de alergia al látex (Pimentel *et al.*, 2011). En Brasil, un estudio indicó una prevalencia del 57% de alergia en trabajadores del área de salud (Buss & Fröde, 2007).

Los alérgenos presentes en el látex de *Hevea brasiliensis* son los responsables de la respuesta alérgica que éste puede inducir. A la fecha se han reportado 15 proteínas alergénicas presentes en este material según la IUIS (International Union of Immunological Societies), y éstos se resumen en la Tabla 1. En dicha tabla se indica la actividad biológica que se ha reportado para cada uno de estos alérgenos.

Tabla 1. Tabla con los alérgenos del látex de *Hevea brasiliensis* según la IUIS.

Alérgeno del látex	Peso molecular (kDa)	Nombre de la proteína o función biológica
Hev b 1	14	Factor de elongación del hule
Hev b 2	35, 36.5 y 38	β -1,3-glucanasa, glucano endo-1,3- β -glucosidasa e isoforma vacuolar básica
Hev b 3	24	Proteína de las pequeñas partículas del hule
Hev b 4	53-55	Homólogo de lecitinasa, miembro de la familia de las lipasas/esterasas
Hev b 5	16	Proteína ácida, función desconocida
Hev b 6	20	Precursor de la heveína
Hev b 7	42	Proteína tipo patatina (lipasa; Sowka <i>et al.</i> , 1998)
Hev b 8	15	Profilina
Hev b 9	51	Enolasa
Hev b 10	26	Superóxido dimutasa
Hev b 11	30	Quitinasa clase I
Hev b 12	9	Proteína no-específica de transferencia de lípidos
Hev b 13	42	Esterasa
Hev b 14	30	Hevamina
Hev b 15	7.5	Inhibidor de serina proteasas

2.6 Lipasas

Las lipasas son un grupo ubicuo de hidrolasas, que al igual que las esterasas, catalizan la hidrólisis de ésteres, particularmente ésteres de cadena larga e insolubles en agua (lípidos) (Lopes *et al.*, 2011). Estas enzimas están involucradas en multitud de procesos como el metabolismo de lípidos, rutas de señalización y mecanismo de defensa. Los dos grupos más importantes de lipasas son las triacilglicerol lipasas (EC 3.1.1.3) y las fosfolipasas A₂ (EC 3.1.1.4).

Las triacilglicerol lipasas son el primer grupo de lipasas conocidas y, como su nombre indica, catalizan la hidrólisis de triacilglicéridos, siendo los miembros más destacados de esta familia la lipasa pancreática, la lipasa monoglicérida y la galactolipasa. Estas enzimas participan en la hidrólisis secuencial de triacilglicéridos a ácidos grasos libres y glicerol, un proceso fundamental para el metabolismo de los lípidos. Este proceso es una catálisis heterogénea, ya que las enzimas son solubles en agua mientras que los triacilglicéridos son insolubles en ésta, por lo que ambos medios se mezclan formando emulsiones donde la reacción tiene lugar en el área que corresponde a la interfase lípidos-agua. Esta catálisis bifásica es promovida por una propiedad peculiar de las lipasas, conocida como activación interfacial, donde la proteína

mediante interacciones con la interfase lípidos-agua, experimenta cambios conformacionales que estimulan la actividad enzimática de la misma (Pahojá & Sethar, 2002).

La otra familia de lipasas, fosfolipasas A₂, catalizan la hidrólisis del ácido graso en la posición *sn*-2 de los fosfolípidos en la membrana. Esta posición usualmente posee ácidos grasos poliinsaturados que son precursores de los eicosanoides, los cuales actúan como mediadores químicos en multitud de procesos biológicos, como la inflamación. Estas enzimas son fundamentales para el funcionamiento de rutas de señalización, metabolismo de lípidos, mecanismos de defensa, la acción de venenos, entre otros. Por lo anteriormente mencionado hay un gran número de lipasas de esta familia, que se han agrupado, en cuatro categorías: fosfolipasas A₂ secretadas (sPLA₂s), fosfolipasas A₂ citosólicas (cPLA₂s; Burke & Dennis, 2009), fosfolipasas A₂ independientes de Ca²⁺ (iPLA₂s) y fosfolipasas A₂ asociadas a lipoproteínas (LpPLA₂s), siendo de interés para el presente trabajo la categoría cPLA₂s.

La fosfolipasa más caracterizada de la categoría cPLA₂s es la GIVA PLA₂, ubicada en las plaquetas humanas, cuya estructura consta de dos dominios: un dominio catalítico, con un plegamiento α/β -hidrolasa y un dominio C2 de unión a lípidos, dependiente de Ca²⁺. Esta enzima posee un sitio catalítico constituido por la diada Ser-Asp, que además presenta un asa con pequeñas hélices α que actúa como tapa para la entrada del sustrato al sitio activo (ver Fig. 1). Esta proteína tiene preferencia por fosfolípidos con ácido araquidónico en la posición *sn*-2, el cual es precursor de los eicosanoides. Se ha demostrado que esta enzima está implicada en el desarrollo de procesos inflamatorios (Burke & Dennis, 2009). A esta categoría (cPLA₂s) pertenecen una familia de proteínas de interés para este trabajo, las patatinas, presentes en los tubérculos de la papa.

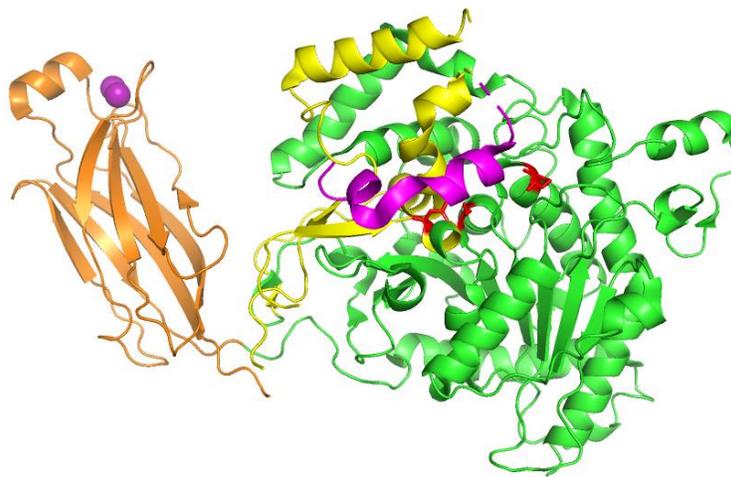


Figura 1. Estructura de GIVA PLA₂ (PDB:1CJY). En naranja se señala el dominio de unión a lípidos, en verde el dominio catalítico y en amarillo la estructura tipo “gorra”, en rosado la región tapa, las esferas púrpuras son iones Ca²⁺ y en rojo los residuos catalíticos.

2.7 Patatinas

Patatina es el nombre que se le ha dado a la proteína más abundante en la papa (*Solanum tuberosum*), constituye alrededor del 30% de la proteína soluble total en este tubérculo y poseen una masa molecular de alrededor de 40 kDa. Sin embargo, en otras plantas se han encontrado proteínas homólogas, por lo que se han agrupado en la familia de las patatinas. Estas proteínas poseen actividad enzimática de lipasa, teniendo máxima actividad contra sustratos sintéticos con cadenas de 10 y 16 carbonos, caprato y palmitato, respectivamente. Además, se ha encontrado que catalizan la hidrólisis de fosfolípidos, pero son inactivas contra diacilglicéridos y triacilglicéridos, por lo que pertenecen al grupo de las fosfolipasas (Andrews *et al.*, 1988).

La primera estructura reportada de una patatina fue de la patatina-17 (Pat17) de *Solanum cardiophyllum* (PDB: 1OXW). Dicha estructura permite caracterizar el plegamiento de Pat17, el cual posee una hoja β constituida por seis hebras β , de las cuales cinco son hebras paralelas y una es antiparalela, rodeadas por nueve hélices α (Fig. 2). Además, Pat17 posee una diada catalítica Ser77-Asp215, en la que Ser77 se ubica en un motivo Gly-X-Ser-X-Gly, altamente conservado en las patatinas y característico de las hidrolasas, que se encuentra en el asa entre la hebra β_5 y la hélice C. Mediante comparaciones del plegamiento de la proteína se determinó que éste es característico de la familia de enzimas citosólicas fosfolipasas A_2 (cPLA₂) de humano, en contraposición al plegamiento α/β -hidrolasa canónico (Rydel *et al.*, 2003).

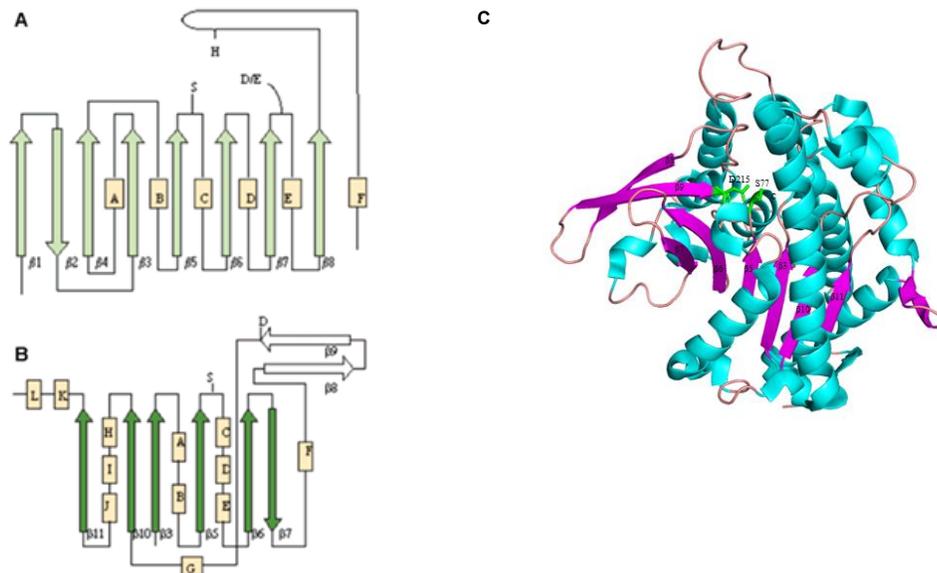


Figura 2. Estructura tridimensional de Pat17 en diagrama de listones y diagrama topológico de Richardson comparativo con el plegamiento α/β -hidrolasa canónico. A) Diagrama topológico de Richardson del plegamiento α/β -hidrolasa canónico, B) Diagrama topológico de Richardson del plegamiento de la patatina Pat17 (Imagen tomada de Rydel *et al.*, 2003), C) Estructura de Pat17 (PDB:1OXW) en diagrama de listones con las hebras β en color púrpura, los residuos S77 y D215 que constituyen el sitio catalítico en verde, en color azul las hélices α , y las asas y giros conectores en rosa.

La estructura de esta proteína muestra dos canales que permiten acomodar las cadenas hidrocarbonadas de los fosfolípidos durante la catálisis (Fig. 3). Esta proteína fue cocrystalizada con los inhibidores fluorofosfonato de metilaraquidonilo (MAFP) (PDB: 4PKB) y diisopropilfosfoluridato (DFP) (PDB: 4PKA), los cuales son compuestos organofosforados que poseen una estructura similar a la de los fosfolípidos (MAFP) o fosfoésteres (DFP) y se unen de forma covalente a la Ser catalítica mediante un enlace fosfoéster. Aunque en la estructura no se observan las cadenas hidrocarbonadas de los inhibidores, si se pueden observar el grupo fosfonato de cada inhibidor unido covalentemente a Ser77. Con estas estructuras se determinó la orientación del inhibidor en el sitio activo, en la cual, el oxígeno del fosfonato del inhibidor interactúa con dos glicinas consecutivas (Fig. 4), que constituyen el bolsillo que estabiliza el intermediario oxianión de las reacciones de hidrólisis, conocido como el agujero del oxianión. Finalmente, se modeló el arreglo de una fosfatidilcolina en el sitio activo de la enzima, el 1-palmitoil-2-oleoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina (POPC), en el cual las cadenas hidrocarbonadas se localizan en los dos canales (Fig. 5) (Wijeyesakere *et al.*, 2014).

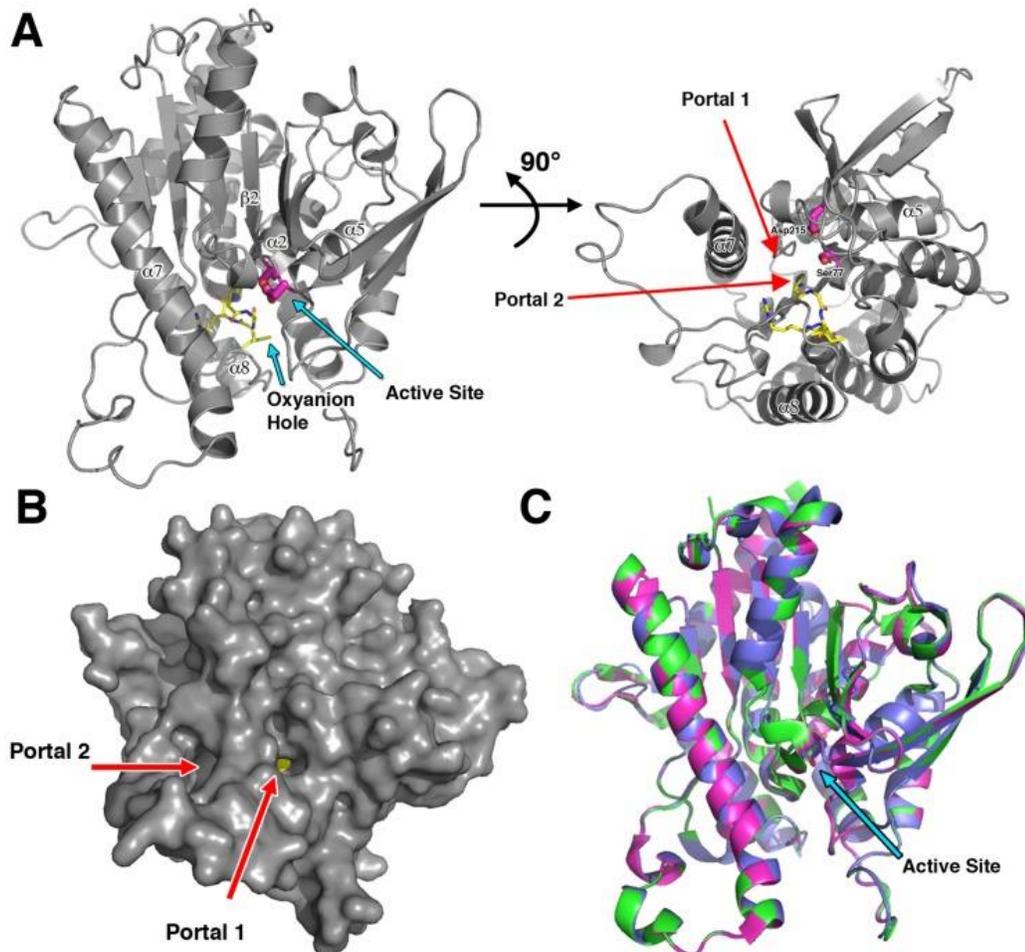


Figura 3. Sitio activo y canales en la estructura de Pat17. A) Estructura de Pat17 en diagrama de listones desde dos perspectivas con un giro de 90° que permite visualizar los residuos del sitio catalítico y los canales que conducen a éste, B) Estructura de Pat 17 en representación de su superficie, resaltando los dos canales antes mencionados, C) Superposición de las estructuras de Pat17 nativa (verde), inhibida con MAFP (magenta) e inhibida con DFP (azul) (Imagen tomada de Wijeyesakere *et al.*, 2014).

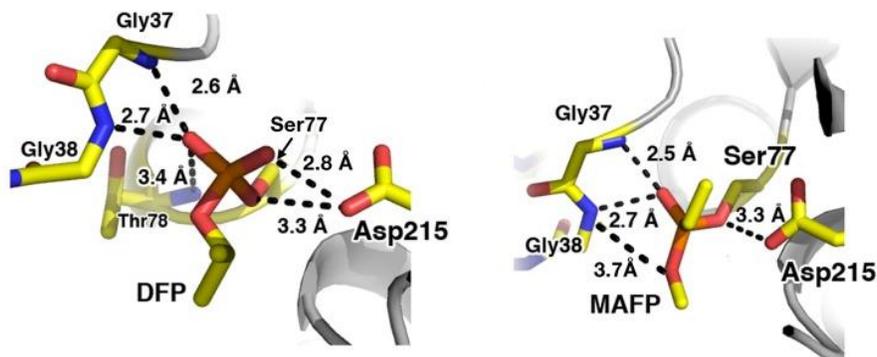


Figura 4. Interacciones en el sitio activo de Pat17 con los inhibidores DFP y MAFP (Imagen tomada de Wijeyesakere *et al.*, 2014).

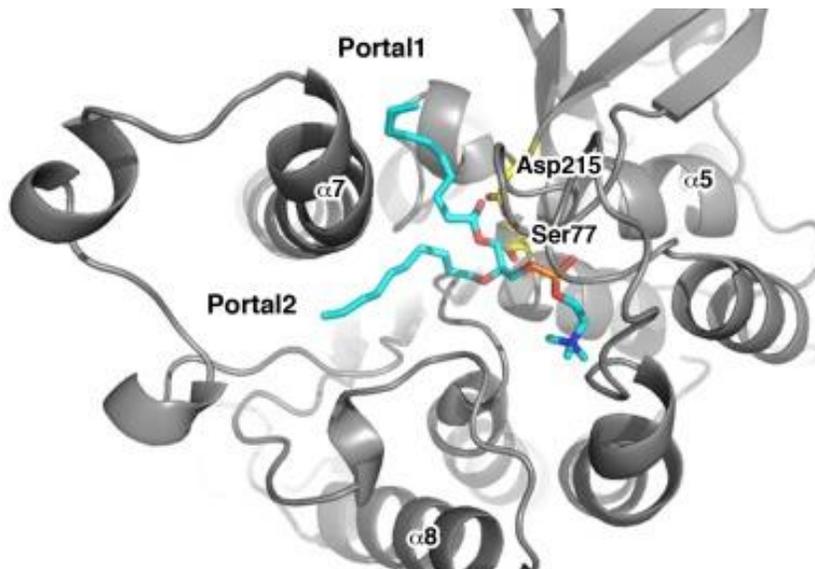


Figura 5. Modelo del arreglo hipotético de POPC en Pat17 (Imagen tomada de Wijeyesakere *et al.*, 2014).

Esta familia de proteínas es de interés para el presente trabajo, ya que la proteína alergénica Hev b 7 es una patatina. Mediante un alineamiento de la secuencia de aminoácidos de Hev b 7.01 (GenBank: AAC27724.1) y otras patatinas como la de yuca (NCBI Reference Sequence: XP_021631399.1), cacao (NCBI Reference Sequence: XP_017976540.1), papa (UniProtKB/Swiss-Prot: P07745.1) y Pat17 (GenBank: AAK56395.1) con el servidor PRALINE (Simossis & Heringa, 2005) se observa una identidad del 43% con esta última, la única con estructura conocida. Las patatinas de yuca y cacao son las patatinas de plantas comunes más parecidas a Hev b 7, la patatina de papa y Pat17 son las más caracterizadas y estudiadas hasta la fecha. Se observa que los motivos Gly-X-Ser-X-Gly y Asp-Gly-X del sitio catalítico se encuentran conservados en todas las patatinas incluyendo Hev b 7. Además, se observan regiones conservadas que corresponderían al núcleo de las patatinas y zonas menos conservadas que podrían ser las regiones expuestas al solvente; resaltando tres inserciones al interior de la secuencia de Hev b 7 que no están presentes en Pat17. Por lo que se espera que Hev b 7 tenga una estructura tridimensional tipo patatina y un sitio catalítico constituido por la diada Ser-Asp, igual a Pat17, pero con diferencias importantes en las regiones expuestas al solvente de la proteína, sobre todo por las inserciones antes mencionadas (Fig. 6).

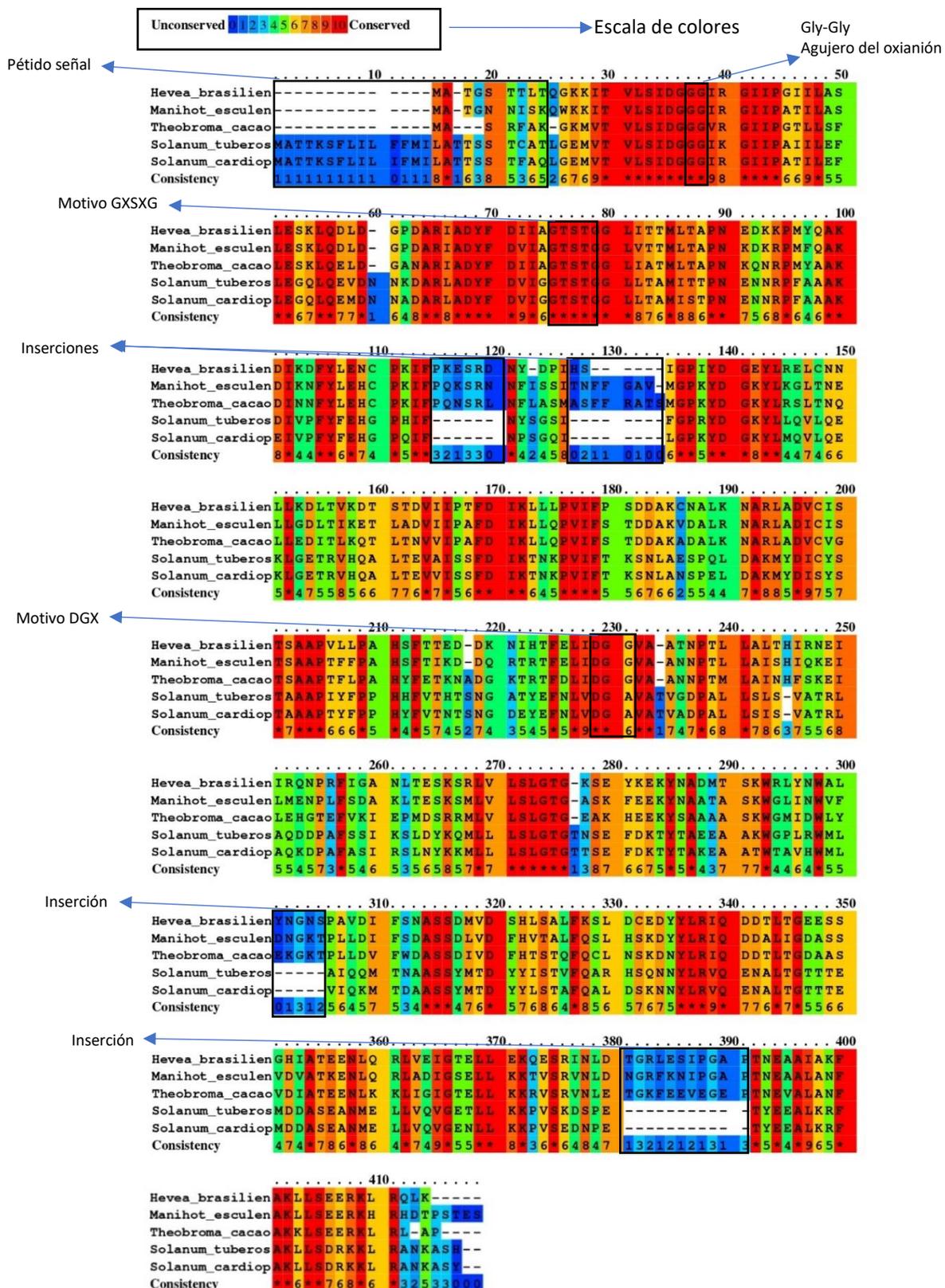


Figura 6. Alineamiento de las secuencias aminoacídicas de distintas patatinas con el servidor PRALINE: Hev b 7.01 (*Hevea brasiliensis*), patatina de yuca (*Manihot esculenta*), patatina del cacao (*Theobroma cacao*), patatina de papa (*Solanum tuberosum*) y Pat17 de *Solanum cardiophyllum*.

3. Antecedentes

3.1 Alérgeno Hev b 7

El primer reporte de la presencia del alérgeno Hev b 7 en el látex de *Hevea brasiliensis* fue publicado en 1994 por el grupo de Beezhold en Canadá en 1994. Éste fue un estudio de identificación de proteínas alergénicas del látex en presencia o ausencia de amoníaco, siendo este un aditivo común para estabilizarlo y conservarlo durante su almacenamiento y transporte. Para este estudio se analizaron extractos proteicos de látex mediante inmunoblot con sueros de pacientes adultos y alérgicos al látex, siendo un 85% de ellos trabajadores en el área de salud. Los inmunoblot revelaron la presencia de dos bandas intensas, una de 46 kDa y la otra de 110 kDa. Los extremos N-terminal de las proteínas en estas bandas se secuenciaron y compararon, observando que estas secuencias eran idénticas entre sí y no habían sido reportadas previamente. Se concluyó que las bandas de 46 kDa y 110 kDa correspondían a nuevos alérgenos del látex, y entre las que la proteína de 110 kDa correspondería a un precursor de la proteína de 46 kDa o dímero de la misma (Beezhold *et al.*, 1994).

En 1996, el mismo grupo de investigación estudió la reactividad cruzada entre el látex y una serie de alimentos, con una identificación preliminar de los alérgenos responsables. Estos autores emplearon la prueba del pinchazo en la piel en pacientes adultos alérgicos al látex, de los cuales el 80% eran trabajadores en el área de salud. En este estudio se encontró que los alimentos más importantes en la reactividad cruzada con el látex son el aguacate, la papa, el plátano, el tomate, la castaña y el kiwi (Beezhold *et al.*, 1996).

Adicionalmente, en este mismo trabajo se caracterizó con mayor detalle la proteína alergénica del látex de 46 kDa previamente reportada, en este caso sólo se usó látex sin tratamiento con amoniaco. La proteína fue purificada, fragmentada con CNBr y los extremos N-terminal de los fragmentos fueron secuenciados, y con estas secuencias se determinó la similitud de esta proteína con las patatinas reportadas, lo que llevó a integrarla a esta familia. Con esta información se concluyó que este alérgeno es el homólogo de las patatinas en *Hevea brasiliensis* (Beezhold *et al.*, 1996).

Se sugirió que el alérgeno de 46 kDa del látex podría presentar reactividad cruzada con las patatinas de papa y tomate. Sin embargo, no se había reportado que las patatinas poseyeran propiedades alergénicas, por lo que se hizo un estudio de la reactividad cruzada del látex con la papa. Mediante inmunoblot se estudió la inhibición en el reconocimiento de la proteína de 46 kDa del látex por sueros de pacientes alérgicos al látex contra extractos proteicos de papa (Beezhold *et al.*, 1996) y como resultado desaparecieron varias bandas. Las proteínas asociadas a muchas de estas bandas eran desconocidas, pero la banda correspondiente a 46 kDa sólo se atenuó, lo que indica una reactividad cruzada parcial entre esta proteína y las proteínas de la papa. Finalmente, se concluyó que este alérgeno de 46 kDa del látex pertenece a la familia de las patatinas, y se confirmó la reactividad cruzada entre el látex y la papa. No obstante, no se demostró con certeza el papel de este nuevo alérgeno del látex, ni de las patatinas de la papa en esta reactividad cruzada (Beezhold *et al.*, 1996).

El mismo equipo de trabajo reportó la secuencia del cDNA para este alérgeno, al que se le había asignado el nombre Hev b 7 según la nomenclatura internacional (Kostyal *et al.*, 1998). Este cDNA fue insertado en el plásmido pGEX2T para expresarlo en *Escherichia coli*. BL21 y obtener la proteína recombinante rHev b 7. Ya que la masa molecular de rHev b 7 es de 43 kDa, pero la masa observada en SDS-PAGE se estimaba en 46 kDa, se asumió la presencia

de alguna glicosilación en la forma nativa de la proteína. Pero se demostró que la forma recombinante tiene esta misma característica, por lo que esta diferencia en la masa estimada se debe a un corrimiento anómalo de Hev b 7 en SDS-PAGE. La proteína recombinante y la nativa fueron usadas en ensayos de inmunoblot, teniendo ambas la misma afinidad por la IgE. A pesar de las condiciones desnaturalizantes para los inmunoblot, no se observan diferencias en la afinidad de los anticuerpos por Hev b 7, por lo que se discute la posibilidad de que el epítipo de este alérgeno sea lineal.

La similitud entre las secuencias de Hev b 7 y las patatinas sugiere que este alérgeno posee una actividad enzimática como esterasa, específicamente como lipasa, por lo que su función en la planta sería como mecanismo de defensa contra patógenos (Kostyal *et al.*, 1998). En paralelo, otro grupo de investigación en Austria también obtuvo la secuencia del cDNA de Hev b 7 y expresó la proteína de forma recombinante usando el plásmido pPIC9 en *Pichia pastoris* (Sowka *et al.*, 1998). De igual manera, hicieron pruebas inmunológicas (inmunoblot) con resultados similares a los del anterior estudio. Una de las diferencias de este estudio es que se hizo un análisis de carbohidratos en la proteína nativa, demostrando que no se encuentra glicosilada en la fuente natural. También se realizaron estudios de la actividad enzimática de esta proteína, para lo que se usó el palmitato de p-nitrofenilo como sustrato, obteniendo una actividad específica en ΔA_{400} de $0.941 \pm 0.012 \text{ min}^{-1} \times \text{mg de proteína}^{-1}$ (Sowka *et al.*, 1998).

Un aspecto relevante de este estudio es que reportan ligeras diferencias entre la secuencia aminoacídica de la proteína nativa y la secuencia de la proteína recombinante, lo que es un indicio de que Hev b 7 posee isoformas (Kostyal *et al.*, 1998; Sowka *et al.*, 1998). Esta hipótesis se confirmó al comparar las secuencias, tanto de cDNA como de aminoácidos, de este grupo con las reportadas por Kostyal y colaboradores, con lo que se concluye que los dos grupos en paralelo identificaron y secuenciaron dos isoformas de Hev b 7, con un 98% de identidad entre sus secuencias de aminoácidos.

En 1999 se demostró que la patatina de la papa era un alérgeno (Seppälä *et al.*, 1999), un hecho que podría extrapolarse a otras patatinas, como Hev b 7, y explicaría la reactividad cruzada entre el látex y alimentos como la papa, aguacate y plátano. En 1999, los grupos de Sowka *et al.* (1998) y Kostyal *et al.* (1998) que secuenciaron en paralelo dos isoformas de Hev b 7, publicaron en conjunto un estudio de las isoformas del Hev b 7, su actividad alérgica y su reactividad cruzada con alimentos. Mediante técnicas de biología molecular obtuvieron los cDNAs de las isoformas y los secuenciaron, identificando cuatro isoformas para Hev b 7. Estos cDNAs fueron expresados en *Pichia pastoris* y *E. coli* BL21. Mediante Western blots y ELISA con sueros de pacientes con alergia al látex y a la papa se determinó que todas las isoformas de Hev b 7 son alérgicas. Un estudio de inhibición, con la patatina recombinante de la papa y extractos proteicos de papa, aguacate y plátano, en inmunoblot y ELISA indicaron que no hay reactividad cruzada entre las isoformas de Hev b 7 y estos alimentos. Adicionalmente, se demostró que todas las isoformas poseen actividad enzimática hidrolítica contra el palmitato de p-nitrofenilo (Sowka *et al.*, 1999).

Un año después, en Finlandia tuvo lugar un estudio de reactividad cruzada entre Hev b 7 y Sol t 1 (patatina de la papa), tanto en sus formas nativas como recombinantes, en niños y adultos. Para ello, se usaron inmunoblot y ELISA con sueros de pacientes alérgicos, tanto de niños como de adultos, encontrando que Hev b 7 es un alérgeno relevante sólo en adultos (Wagner *et al.*, 2001). Además, mediante estudios de inhibición de inmunoblot y ELISA se determinó la reactividad cruzada entre Hev b 7 y Sol t 1, solamente en adultos (Seppälä *et al.*, 2000). Sin embargo, en 2001 un grupo de investigación demostró que los

sueros de niños con espina bífida, alérgicos al látex, poseen anticuerpos IgE que reconocen a Hev b 7, siendo este uno de los alérgenos del látex más importante para esta población (Wagner *et al.*, 2001).

El último estudio reportado de la proteína Hev b 7 fue en 2003, donde se buscó su ubicación, en el contexto celular, ya que se sabe que las patatinas son proteínas vacuolares (Jekela *et al.*, 2003). Mediante centrifugación y estudios de secuencia aminoacídica se determinó que Hev b 7 no es una proteína vacuolar y que probablemente se encontraría en el citosol, aunque este aspecto aún no está muy claro. Un aspecto relevante de este artículo es que se discute la posibilidad de que Hev b 7 posea puentes disulfuro en su estructura, ya que presenta cinco cisteínas en su secuencia aminoacídica. Además, se plantea la posibilidad de que una de las cisteínas participe en la formación de un dímero de Hev b 7, como el reportado por Beezhold y colaboradores en 1994 (Jekela *et al.*, 2003). Hasta la fecha, no se ha reportado la estructura tridimensional de esta proteína.

4. Justificación del problema

La alergia al látex es un problema de salud en países en vía de desarrollo que ha mostrado un incremento en los últimos años. Por este motivo, es fundamental el estudio de los distintos alérgenos del látex para el desarrollo de estrategias de detección y terapia para los individuos alérgicos a este material.

El alérgeno Hev b 7 es el interés para el presente trabajo, ya que no existen estudios de su importancia para la población mexicana alérgica al látex. Además, se desconocen los detalles en la actividad enzimática de esta proteína y si ésta es una fosfolipasa como otras patatinas. Por lo antes mencionado, en este trabajo se propone estudiar aspectos inmunológicos y enzimáticos de la proteína Hev b 7 e intentar cristalizarla para determinar su estructura tridimensional mediante técnicas de difracción de rayos X o en su defecto emplear modelos *in silico* y de esta manera identificar los posibles epítomos de ésta.

5. Hipótesis

Hev b 7 es una fosfolipasa que posee un arreglo dimérico, como otros miembros de la familia de las patatinas, con al menos un puente disulfuro estabilizándola, cuya alergenicidad es relevante entre la población de trabajadores del área de salud mexicanos.

6. Objetivo general

Caracterizar inmunológica, enzimática y estructuralmente el alérgeno rHev b 7.

7. Objetivos específicos

1. Obtener mediante técnicas de DNA recombinante a rHev b 7 y purificarla.
2. Medir las actividades enzimáticas de rHev b 7 como lipasa y fosfolipasa.
3. Estudiar Hev b 7 como alérgeno frente a las inmunoglobulinas de tipo E de sueros de individuos alérgicos al látex.
4. Obtener un modelo tridimensional de Hev b 7 y evaluar su estado oligomérico, ya sea experimental o predicho *in silico*, según lo permitan los resultados.
5. Determinar los posibles epítomos responsables de la alergenicidad de Hev b 7.

8.2 Propagación del plásmido con *E. coli* DH5 α

Con el plásmido, se transformaron células competentes de *E. coli* DH5 α y se crecieron las colonias en agar con medio LB y ampicilina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Con las colonias obtenidas se prepararon 10 mL de medio LB con ampicilina y se incubó el medio a 37°C por toda una noche. Con estas células se prepararon dos mini-prep con el siguiente protocolo:

1) Se prepararon dos botones celulares, de 5 mL cada uno, centrifugando 1 mL del medio a 14500 rpm por 1 min, se descartó el sobrenadante, se le añadió 1 mL de medio y se repitió el proceso hasta tener el botón celular con los 5 mL de medio.

2) Cada botón se resuspendió en 100 μL de amortiguador 50mM de Tris-HCl, 10mM de EDTA, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ RNasa A, pH 8. A esta mezcla se le añadieron 200 μL de solución 0.2 M de NaOH y 1% de SDS para lisar las células y precipitar las proteínas presentes. Se dejó reposar la mezcla en hielo por 5 min.

3) A la mezcla anterior se le añadieron 150 μL de amortiguador de acetato de potasio 3.0 M pH 5.5, para precipitar el DNA cromosómico de la bacteria y se dejó reposar en hielo otros 5 min.

4) La mezcla se centrifugó a 14500 rpm por 10 min. para separar el sobrenadante y desechar el precipitado; al sobrenadante se le añadieron 400 μL de isopropanol, para precipitar el DNA plasmídico. Se centrifugó la mezcla a 14500 rpm por 5 min.

5) Se desechó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en 200 μL de etanol y se centrifugó nuevamente (14500 rpm por 5 minutos), se retiró el etanol y se dejó secar el precipitado de DNA plasmídico por 2 h.

6) Finalmente, el precipitado anterior se disolvió en 40 μL de agua Milli-Q esterilizada y se almacenó a -20°C.

Con 3 μL del mini-prep se hizo una digestión con las enzimas de restricción BglII y NotI (0.2 μL de cada una de ellas) y con 1 μL de NEbuffer 3.1 (500 mM de Tris-HCl, 1 M de NaCl, 100 mM de MgCl_2 , 1 mg/mL de BSA, pH 7.9) y 5.6 μL de agua Milli-Q esterilizada, se dejó a 37°C por 1h. Esta mezcla se corrió en un gel de agarosa al 1% y el gel se tiñó con bromuro de etidio para observar las bandas.

8.3 Cinéticas de expresión de Trx-rHev b 7 en *E. coli*

Para realizar la cinética de expresión, se transformaron células competentes de *E. coli* BL21(DE3) y Rosetta-gami mediante choque térmico. Se crecieron las células en agar con medio LB con ampicilina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) para BL21(DE3) y LB con ampicilina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), cloranfenicol (34 $\mu\text{g}/\text{mL}$), kanamicina (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y tetraciclina (15 $\mu\text{g}/\text{mL}$) para Rosetta-gami. Con las colonias obtenidas se prepararon 2 mL de medio LB con los antibióticos respectivos para cada cepa y se incubaron a 37°C por toda una noche, haciendo así los pre-inóculos. 100 μL de estos pre-inóculos se añadieron a 20 mL de medio LB (relación 1:200) con los mismos antibióticos. Estos cultivos se dejaron incubando a 37°C hasta alcanzar un $\text{OD}_{600}=0.6$, entonces fueron inducidos con IPTG 0.5 mM y se incubaron a 25°C. Se colectaron alícuotas de 1 mL en los tiempos de 0h, 2h, 12h y 24h, se centrifugaron a 14500 rpm por 5 min., se descartó el sobrenadante y el botón celular se conservó a -20°C.

Los botones celulares se resuspendieron en 75 μ L de amortiguador de Tris-HCl 50 mM, 100 mM de NaCl, pH 8 y se lisaron mediante sonicación (potencia 4, pulsos de 10 s, reposo 30s, tiempo total 1 min.), tras lo cual se centrifugó el lisado a 14500 rpm por 10 min. y se separan las fases soluble e insoluble. Estas fases se aplicaron a un gel de electroforesis SDS-PAGE, de acuerdo con el método descrito por Laemmli (Laemmli, 1970).

8.4 Expresión de Trx-rHev b 7 en *E. coli*

Células de *E. coli* BL21(DE3) previamente transformadas con el plásmido pET-32a-rHev b 7 se inocularon en 50 mL de medio LB con ampicilina (100 μ g/mL) y se incubó a 37°C por toda la noche. Posteriormente, se añadió este pre-inóculo a 1 L de medio LB con la misma concentración de ampicilina, se incubó a 37°C hasta alcanzar una OD₆₀₀=0.6, se indujo la expresión con 0.5 mM de IPTG y se incubó a 25°C por 4 h. Las células del cultivo se concentraron en un botón celular mediante centrifugación a 5500 rpm por 15 min, éste se conservó a -60°C.

8.5 Solubilización asistida por sonicación de Trx-rHev b 7

De acuerdo con la electroforesis SDS-PAGE se determinó que la proteína de fusión Trx-rHev b 7 se encuentra en la fase insoluble como cuerpos de inclusión, por lo que el botón celular se lisó en 50 mL de un amortiguador de fosfatos 50 mM pH 8, 500 mM de NaCl mediante sonicación con potencia del 40%, pulsos de 5 s, descansos de 30 s y tiempo total de 8 min. Luego, se separó el sobrenadante y la fase insoluble mediante centrifugación a 14500 rpm por 45 min y se desechó el sobrenadante, conservando la fase insoluble. Esta última fue lavada con solución 50 mM de fosfatos pH 8, 500 mM de NaCl y 2% de Triton X-100 en dos ocasiones, empleando sonicación para homogeneizar la mezcla; potencia del 40%, pulsos de 5 s, descansos de 30 s y tiempo total de 30 s. Las fases se separaron mediante centrifugación (14500 rpm por 20 min) y se conservó la fase insoluble, la cual se lavó en tres ocasiones con agua destilada empleando sólo pipeteo para resuspenderla. Se usó el mismo proceso de centrifugado y se conservó la fase insoluble, siendo estos los cuerpos de inclusión de Trx-rHev b 7 que se conservaron a -60°C; todas las fracciones se corrieron en un SDS-PAGE al 12% de acrilamida.

Una pequeña fracción de los cuerpos de inclusión se resuspendió en 10 mL de amortiguador de fosfatos 10 mM pH 8 con 0.5 mM de DTT. La mezcla se sonicó con una potencia del 20%, pulsos de 5 s, descansos de 50 s por un tiempo total de 10 min, inmediatamente se centrifugó y cada fracción se cargó en un SDS-PAGE al 12% de acrilamida y se tiñó con azul de Coomassie. Se observa como parte de la proteína se encuentra en la fase soluble tras este protocolo de solubilización mediante sonicación, ésta será purificada y empleada en las distintas etapas de caracterización de Trx-rHev b 7 y rHev b 7.

8.6 Cuantificación de las proteínas

Las proteínas Trx-rHev b 7 y rHev b 7 se cuantificaron empleando los espectrofotómetros SHIMADZU UV-1900 y NanoDrop 2000 de Thermo Scientific, midiendo la absorbancia a 280 nm y calculando la concentración con la absortividad calculada a partir de sus secuencias de

aminoácidos en el servidor ExPASy ProtParam (Gasteiger *et al.*, 2005), siendo éstas de 0.746 mL mg⁻¹cm⁻¹ para Trx-rHev b 7 y 0.675 mL mg⁻¹cm⁻¹ para rHev b 7.

8.7 Purificación mediante cromatografía de afinidad a Ni²⁺ de Trx-rHev b 7 solubilizada

La fracción soluble del paso de solubilización de los cuerpos de inclusión se aplicó a una columna HisTrap de 5 mL, la cual estaba previamente equilibrada con amortiguador de fosfatos 10 mM pH 8; luego se lavó con 5 volúmenes de columna (VC) de amortiguador de fosfatos 10mM pH 8 y se eluyó la proteína con amortiguador de fosfatos 10 mM pH 8, 300 mM de imidazol, cada fracción se corrió en un SDS-PAGE al 15% de acrilamida y se tiñó con azul de Coomassie.

8.8 Espectrometría de masas MALDI-TOF de Trx-rHev b 7

La masa molar de Trx-rHev b 7 se determinó por espectrometría de masas MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time Of Flight) usando un equipo Microflex (Bruker) operado en modo lineal positivo, con un láser de nitrógeno de 20 Hz y controlado por el software Flexcontrol versión 3.0 (Bruker Daltonics). Se empleó una matriz de ácido sinapínico disuelto en 0.1% de ácido trifluoroacético y 30% de acetonitrilo, que se mezcló con una solución de la proteína Trx-rHev b 7 en agua a 10 mg/mL. El equipo se calibró con las masas de las proteínas Concanavalina A (25.5 kDa el monómero, 51 kDa el dímero) y BSA (66.43 kDa).

8.9 Estudio de Trx-rHev b 7 en solución mediante dispersión dinámica de luz (DLS)

La proteína Trx-rHev b 7 se llevó a una concentración de 1 mg/mL en fosfatos 10 mM pH 7.5 y se filtraron 100 µL de la solución usando una membrana Millipore de 0.22 µm en una celda desechable de 50 µL y se leyó en un equipo Zetasizer µV para medir el tamaño y monodispersidad de la proteína. La temperatura fue de 25°C con un tiempo de equilibrio de 120 s con cinco mediciones, cada medición fueron 11 corridas de 10 s cada una.

8.10 Cristalización de Trx-rHev b 7

Con la proteína Trx-rHev b 7 pura a una concentración de 11 mg/mL, en amortiguador de Tris-HCl 10 mM pH 7.5 con 1 mM de DTT se montaron pruebas de cristalización, empleando los kits de cristalización Crystal Screen, PEG-Ion, PEGRx de Hampton Research y Morpheus Complete I, II y III de Molecular Dimensions. Se empleó el método de difusión en fase de vapor, modalidad gota asentada, con gotas de 1.2 µL con una relación 1:1 proteína:condición de cristalización y 60 µL de condición en el pozo, para ello se empleó el robot de cristalización Crystal Gryphon de Art Robbins Instruments.

8.11 Corte de la proteína de fusión Trx-rHev b 7 con la proteasa TEV

La proteína Trx-rHev b 7 solubilizada y purificada con anterioridad (previamente dializada contra 10 mM de Tris-HCl pH 8) se incubó con la proteasa TEV, en una relación 1:10, con

1 mM de DTT a 30°C por una hora. La proteína cortada se aplicó a un SDS-PAGE al 15% de acrilamida y el gel se tiñó con azul de Coomassie.

8.12 Purificación mediante cromatografía de afinidad a Ni²⁺ de rHev b 7 tras el corte con la proteasa TEV

La proteína cortada se dializó contra amortiguador de fosfatos 50 mM, 100 mM de NaCl pH 8 y se recirculó por la columna de HisTrap, previamente equilibrada con esta solución amortiguadora. La columna se lavó con el mismo amortiguador y las proteínas unidas se eluyeron con amortiguador de fosfatos 50 mM, 100 mM de NaCl, 500 mM imidazol pH 8. La proteína rHev b 7 eluyó en el lavado sin retenerse en la columna y se analizó en un SDS-PAGE al 10% de acrilamida y se tiñó con azul de Coomassie.

8.13 Actividad enzimática de Trx-rHev b 7 y rHev b 7 usando palmitato de p-nitrofenilo como sustrato

Se hicieron pruebas de actividad de lipasa con las proteínas Trx-rHev b 7 y rHev b 7 usando palmitato de p-nitrofenilo como sustrato, para ello se empleó el protocolo de Andrews *et al.* (1988) con ciertas modificaciones:

- 1) Se preparó un stock de palmitato de p-nitrofenilo a 100 mM en isopropanol.
- 2) 20 µL de del stock se disuelven en 10 mL de amortiguador de Tris-HCl pH 8, 100 mM, 0.05% SDS y 0.25 % de Triton X-100.
- 3) A 1 mL de esta solución se le añadieron 20 µL de las proteínas Trx-rHev b 7 o rHev b 7 purificadas y los experimentos se realizaron por triplicado.
- 4) Como control negativo se dejó 1 mL de la solución stock de sustrato descrita en el paso 2 y se le añadieron 20 µL de buffer 100 mM de Tris-HCl pH 8.
- 5) Como control positivo se tomó 1 mL de solución del paso 2 y se le añadieron 2 µL de la Lipasa B de *Candida antarctica* (Lipozyme CALB L de Novozymes) suministrada por el Dr. Ismael Bustos Jaimes de la Facultad de Medicina de la UNAM.
- 6) Todas las soluciones se dejaron incubando a 37°C por 30 min en un termoblock en tubos Eppendorf y la reacción se paró mediante choque térmico de 100°C en bloque térmico.
- 7) Se midió la absorbancia a 400 nm de cada una de las soluciones.
- 8) Con las absorbancias y el coeficiente de extinción molar del p-nitrofenolato (18.3 mM⁻¹ cm⁻¹) se calculó la actividad de lipasa de la proteína.

Las unidades de actividad (U) se definieron como los µmol de p-nitrofenol que se liberan por min (Andrews *et al.*, 1988). La actividad específica (U/mg) se calcula considerando la cantidad de proteína empleada en el ensayo.

8.14 Actividad enzimática como fosfolipasa de rHev b 7 con suspensión de yema de huevo como sustrato

Se hizo una prueba de actividad enzimática contra un sustrato natural, en este caso los fosfolípidos de la yema de huevo, utilizando el protocolo diseñado por Tan & Tan en 1988 y modificado por nosotros:

- 1) Se mezclaron 20 mL de yema de huevo, 20 mL de una solución 18 mM de CaCl₂ y 20 mL de una solución 8 mM de Triton X-100.

- 2) La mezcla se ajusta a pH 8 con NaOH 0.1 M y se verifica su estabilidad en el tiempo.
- 3) A 15 mL de esta mezcla se le añaden 100 μ L de solución con la enzima rHev b 7 a 0.5 mg/mL (50 μ g de proteína) mientras se homogeneiza con un agitador magnético.
- 4) Se sigue la disminución del pH con un potenciómetro con electrodo de vidrio selectivo a ion H_3O^+ . A medida que avanza el tiempo, la disminución en una unidad de pH equivale a la liberación de 130 μ mol de ácidos grasos.
- 5) Se calcula la actividad enzimática definiendo las unidades de actividad (U) como los μ mol de ácidos grasos liberados por minuto.
- 6) Como control positivo se hizo el paso 3, pero se añadieron 2 μ L de la Lipasa B de *Candida antarctica*.

8.15 Estudios de estabilidad de Trx-rHev b 7 mediante ensayos de fluorometría diferencial de barrido

La proteína Trx-rHev b 7 a 0.15 mg/mL en 10 mM Tris-HCl pH 7.5 y se mezcló con un stock 5000x de SYPRO ORANGE de Sigma en una relación 1:1000. Posteriormente, 10 μ L de la proteína se incubaron con 10 μ L de cada una de las condiciones del kit pH Screen de Hampton Research. La caja se dejó incubando 1 h en cuarto oscuro a 15°C y se midió la curva de desnaturalización empleando un equipo RT-PCR QuantStudio 3, con una rampa de temperatura de entre 25 y 98°C a una tasa de calentamiento de 0.016°C/s. Los datos de fluorescencia obtenidos del filtro X4 ($\lambda_{exc}=580\pm 10$ y $\lambda_{emis}=623\pm 14$) se emplearon para el análisis de las curvas de desnaturalización. Donde λ_{exc} es la longitud de onda de excitación del fluoróforo y λ_{emis} es la longitud de onda de emisión del fluoróforo. Las curvas se normalizaron, graficaron y ajustaron a una función sigmoideal de Boltzmann mediante el programa GraphPad 8 versión 8.4.3 (GraphPad Software Inc., USA).

8.16 Espectros de dicroísmo circular en el UV lejano de Trx-rHev b 7 y rHev b 7

Las proteínas Trx-rHev b 7 y rHev b 7 puras se dializaron en un amortiguador de fosfatos 10 mM pH 7.5 y se llevaron a una concentración de 0.12 mg/mL ($A_{280}=0.0936$) y 0.03 mg/mL ($A_{280}=0.0200$), respectivamente. Se midió su espectro de dicroísmo circular en la región del ultravioleta lejano (195-250 nm) a 25°C en un espectropolarímetro (Jasco J-1500), utilizando una celda de 0.1 cm de paso de luz. El espectro se obtuvo por triplicado y para la línea base se usó el amortiguador de fosfatos.

8.17 Reconocimiento de rHev b 7 por IgE en sueros de pacientes alérgicos al látex

El reconocimiento del alérgeno rHev b 7 por los anticuerpos IgE presentes en sueros de pacientes alérgicos al látex se realizó mediante ensayos de ELISA. La placa se sensibilizó con 100 μ L de alérgeno en cada pozo a 32 μ g/mL en PBS, incubando a 4°C por 12 h. Luego se lavó la placa en tres ocasiones con Tween-20 0.05% en PBS, 200 μ L por pozo, y se incubó con albúmina de suero bovino (BSA) al 1% en PBS por 2h a 37°C, 150 μ L por pozo, para el bloqueo. La placa se lavó nuevamente con Tween-20 0.05% en PBS, tras lo cual se diluyeron los sueros de pacientes en un factor 1:5 en PBS, 50 μ L de cada dilución se colocaron por pozo y se incubaron a 4°C por una noche. Se lavó la placa de igual manera con Tween-20 para añadir el anticuerpo secundario murino Anti-IgE cadena ϵ humana específico unido a la peroxidasa del rábano (HRP). Este anticuerpo se diluyó en un factor de 1:500 en BSA 0.05%

en PBS, se añadieron 50 μL por pozo y se dejó incubando por 2h a 37°C. Finalmente, se lavó con Tween-20 y se incubó con el sustrato ABTS (ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)), 50 μL por pozo, incubando a temperatura ambiente por 30 minutos y se leyó la absorbancia a 405 nm con un lector de placas BioTek. Cada suero se preparó y midió por triplicado, los blancos se prepararon empleando PBS en lugar de suero y también se realizaron por triplicado, empleándose el suero de 17 niños y 2 adultos alérgicos al látex. La donación de los sueros de pacientes alérgicos al látex se realizó siguiendo los protocolos aprobados por el Comité de Ética del Instituto Nacional de Pediatría de la Ciudad de México.

8.18 Modelos estructurales

A partir de la secuencia de aminoácidos de la proteína Hev b 7 y mediante los servidores Robetta (Song *et al.*, 2013) y AlphaFold-Multimer (Jumper *et al.*, 2021; Varadi *et al.*, 2022; Evans *et al.*, 2021) se obtuvieron modelos teóricos de su estructura tridimensional.

8.19 Evaluación de calidad y ortodoxia de los modelos estructurales

Los modelos obtenidos mediante Robetta y AlphaFold-Multimer fueron sometidos a una evaluación de calidad y ortodoxia mediante los servidores PROCHECK (Laskowski *et al.*, 1993) y MOLPROBITY (Williams *et al.*, 2018), revisando los gráficos de Ramachandran y las colisiones entre residuos.

8.20 Predicción de epítomos

Con el fin de determinar los posibles epítomos lineales, usando la secuencia de aminoácidos, y los epítomos conformacionales, empleando los modelos tridimensionales de Hev b 7 junto a los servidores Bepipred Linear Epitope Prediction 2.0 (Jespersen *et al.*, 2017) y DiscoTope 2.0 (Kringelum *et al.*, 2012).

9. Resultados y discusión

9.1 Propagación del plásmido con *E. coli* DH5 α

Tras la propagación, digestión del plásmido pET-32a(+)-rHev b 7 y su posterior separación mediante electroforesis en gel de agarosa, se distingue una banda entre los marcadores de 1000 pb y 1500pb, como se observa en la Fig. 8, lo cual es consistente con la presencia del inserto del gen Hev b 7 (1203 pb) en el plásmido pET-32a(+).

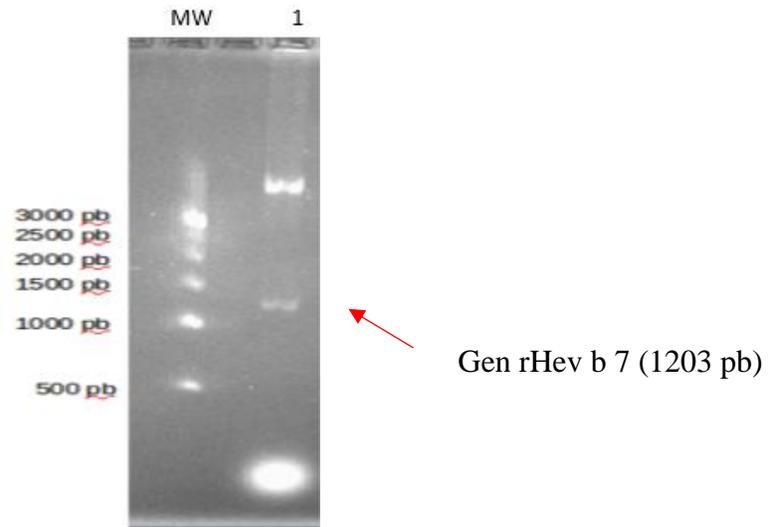


Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de la digestión del plásmido pET-32a(+)-rHev b 7 con las enzimas de restricción BglII y NotI.

9.2 Cinéticas de expresión de Trx-Hev b 7 en *E. coli*

Tras probar la expresión de Trx-rHev b 7 en las cepas de *E. coli* BL21(DE3) y Rosetta-gami a 25°C, se determinó que la mayor parte de la proteína quedaba en la fracción insoluble como cuerpos de inclusión (Fig. 9). Por este motivo, se decidió trabajar en la solubilización de la proteína desde esta fracción. Un artículo publicado en marzo de 2020 describe un protocolo de solubilización de cuerpos de inclusión de una lipasa expresada en un vector pET-32a(+) mediante sonicación en amortiguadores de baja fuerza iónica (Yin *et al.*, 2020). Este protocolo demostró excelentes rendimientos a un bajo costo, por lo que se decidió probarlo con la proteína Trx-rHev b 7.

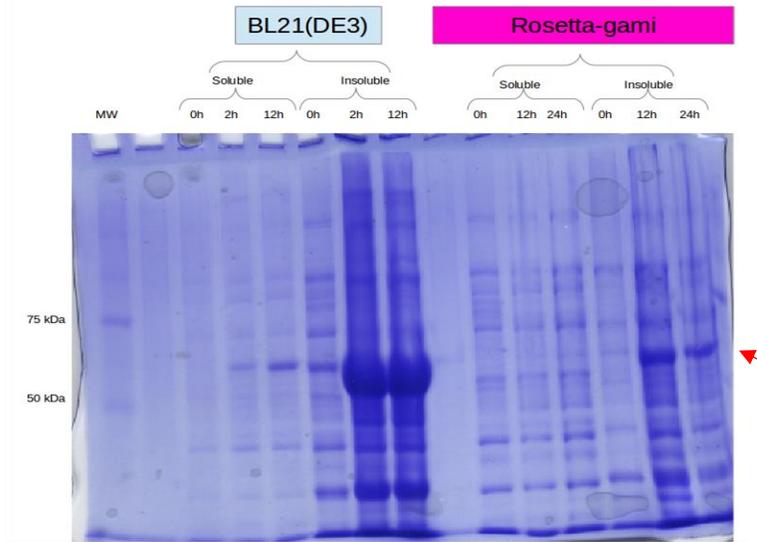


Figura 9. Perfil electroforético SDS-PAGE (10% T) de las fracciones solubles e insolubles de los extractos de *E. coli* BL21(DE3) y Rosetta-gami transformadas con el plásmido pET-32a(+)-rHev b 7, las cuales fueron inducidas con IPTG para seguir la cinética de expresión de Trx-rHev b 7 (60 kDa) a 25°C con los tiempos 0h, 12h y 24 h. La flecha roja indica la posición correspondiente a 60 kDa.

9.3 Expresión en *E. coli* y solubilización mediante sonicación de Trx-rHev b 7

Se expresó Trx-rHev b 7 en *E. coli* BL21(DE3) en forma de cuerpos de inclusión, los cuales fueron lavados (Fig. 10) y finalmente solubilizados mediante sonicación. La proteína se solubilizó con sonicación en un amortiguador de baja fuerza iónica.

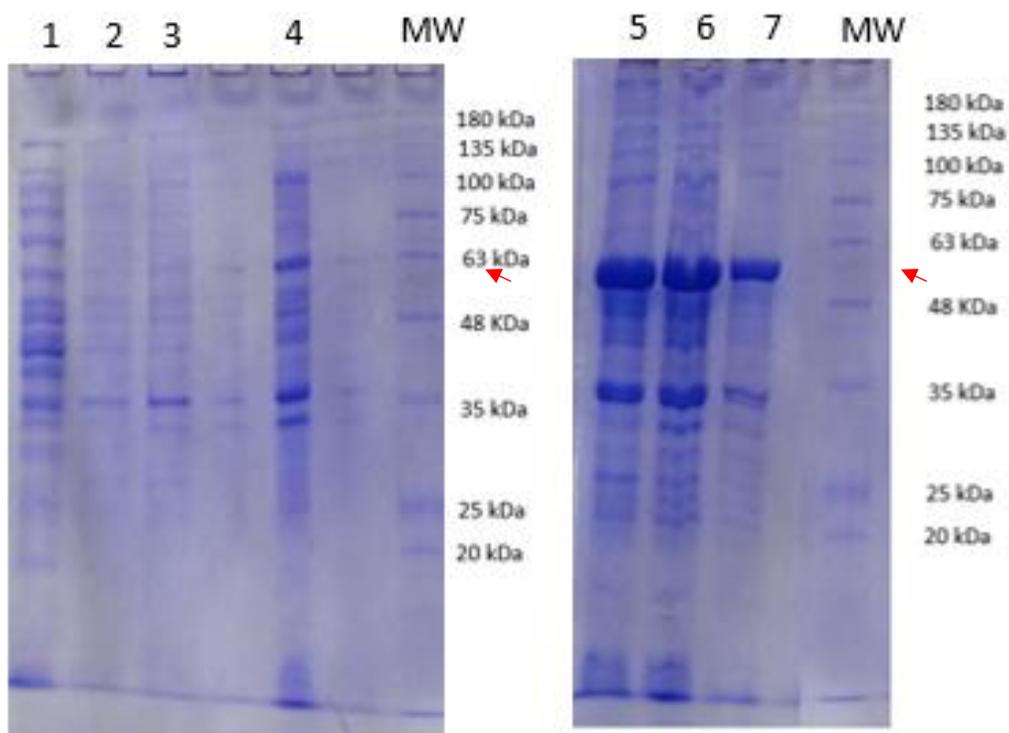


Figura 10. Perfil electroforético SDS-PAGE (12% T) del fraccionamiento de extractos de *E. coli* BL21(DE3) transformada con el plásmido pET-32a(+)-rHev b 7 (carril 1 y 5) y lavados consecutivamente con: Tritón X-100 al 2% (2 y 6), agua (3 y 7), fosfatos 10 mM pH 8 y 0.5 mM de DTT con sonicación (4), los carriles. Las fracciones 1 a 4 son los sobrenadantes y 5 a 7 son precipitados. La flecha roja indica la posición correspondiente a 60 kDa.

9.4 Purificación mediante cromatografía de afinidad a Ni²⁺ de Trx-rHev b 7 solubilizada

La proteína Trx-rHev b 7 solubilizada se purificó en un primer paso mediante la columna HisTrap, donde la proteína se unió a la columna de afinidad a Ni²⁺ y se eluyó con imidazol 300 mM. La proteína purificada en este paso de cromatografía se analizó en un SDS-PAGE al 12% de acrilamida (Fig. 11). Un análisis del perfil electroforético mediante el programa ImageJ (Schneider *et al.*, 2012) para analizar el número de píxeles en los carriles indicó una pureza electroforética de alrededor del 97% para la proteína Trx-rHev b 7 purificada. Esta pureza fue determinada mediante el análisis en el número de píxeles de la imagen en el carril 2, distinguiendo el pico en el número de píxeles correspondiente a la banda a 60 kDa (Trx-rHev b 7) y usando como blanco el carril contiguo, el cual no fue cargado con muestra. Con estos datos se calculó el porcentaje de píxeles correspondiente a la banda de Trx-rHev b 7, siendo esta la pureza electroforética estimada.

Con este protocolo de expresión y purificación se obtuvieron rendimientos excelentes de proteína Trx-rHev b 7 de hasta 100 mg por cada litro de cultivo. Debido a la poca estabilidad de la proteína rHev b 7 (apartado 9.9), se decidió trabajar principalmente con la proteína de fusión Trx-rHev b 7.

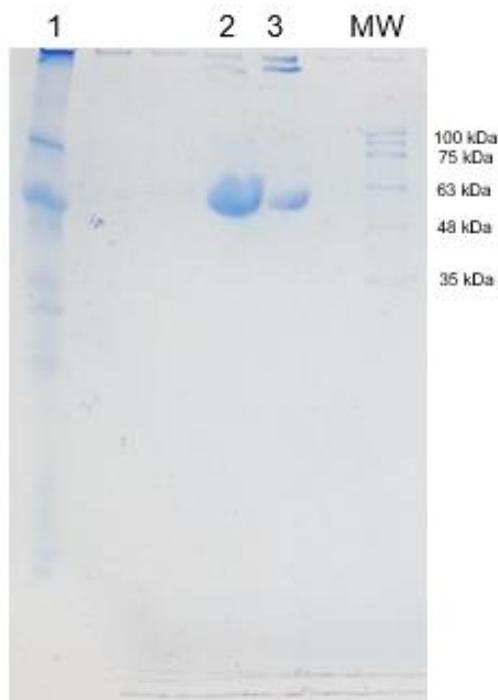


Figura 11. Perfil electroforético SDS-PAGE (12% T) de la fracción soluble de la sonicación en fosfatos 10 mM pH 8 con 0.5 mM de DTT del cuerpo de inclusión de Trx-rHev b 7 lavado en el paso anterior (carril 1) y la purificación de la proteína mediante cromatografía de afinidad a Ni²⁺, siendo eluida con 300 mM de imidazol a una pureza electroforética del 97% (carril 2) y debido a la alta concentración con la que eluyó esta proteína parte de ella se agregó, este agregado de igual forma fue analizado (carril 3).

9.5 Espectro de masas MALDI-TOF de Trx-rHev b 7

El espectro de masas de la proteína Trx-rHev b 7 solubilizada presenta un pico en 60402 Da (Fig. 12), con una relación masa/carga cercana a la esperada (59939.02 Da), no se tienen los elementos necesarios para precisar el origen de esta diferencia en la masa molecular. Con el espectro logramos corroborar la presencia de la proteína Trx-rHev b 7 en la muestra, aunque se pueden observar otras pequeñas señales que podrían deberse a la presencia de contaminantes, como la señal que se distingue entre 66-68 kDa que podría ser una proteína de *E. coli* que se copurificó, o al ruido en el espectro. Se podría medir un nuevo espectro MALDI-TOF empleando una mayor concentración de proteína para mejorar la relación señal-ruido y así identificar con más claridad la naturaleza de dichas señales.

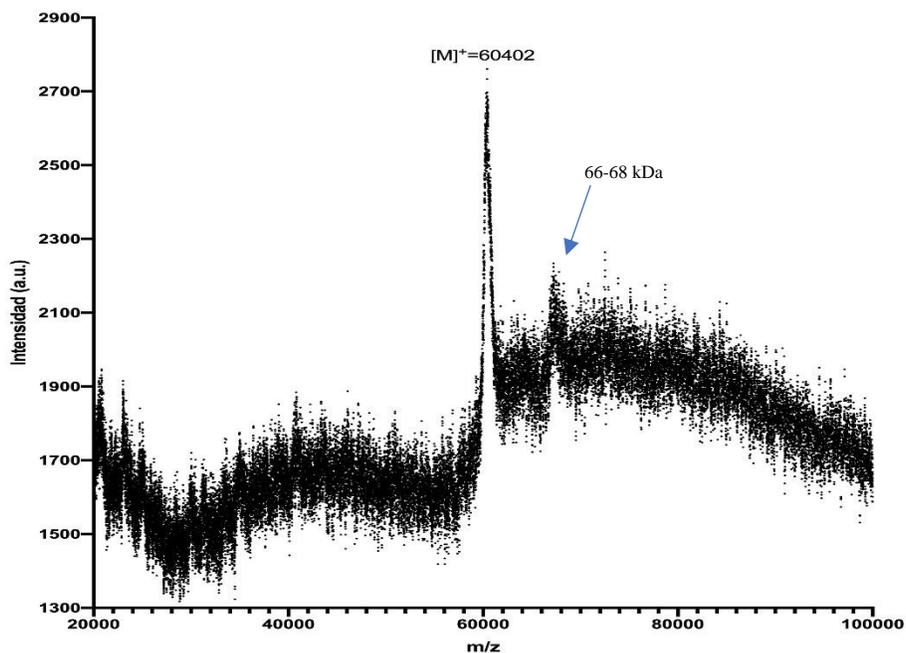


Figura 12. Espectro de masas MALDI-TOF de Trx-rHev b 7.

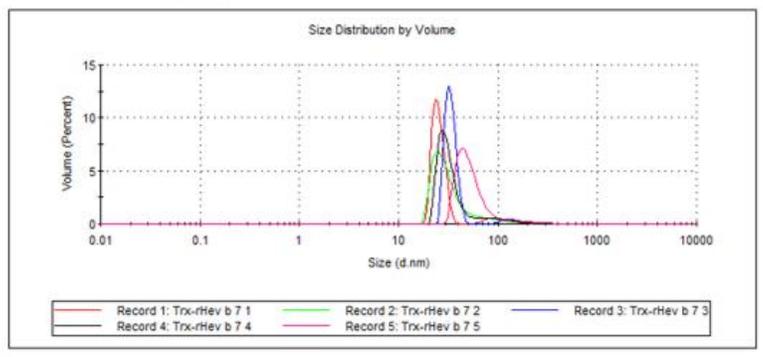
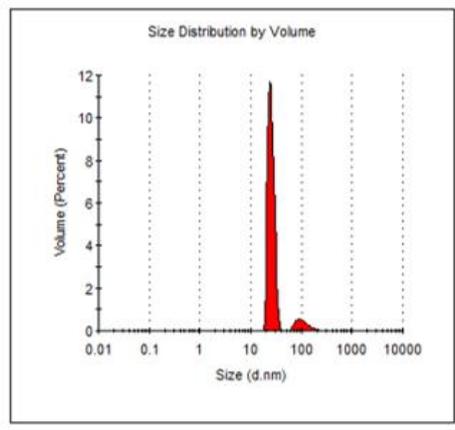
9.6 Estudio de Trx-rHev b 7 en solución mediante dispersión dinámica de la luz (DLS)

La proteína solubilizada y purificada se analizó en el equipo de dispersión dinámica de luz (DLS). Los resultados indican que, a la concentración trabajada de 1 mg/mL, se trata de un oligómero de alrededor de 24 subunidades con un diámetro de partícula de alrededor de 25 nm (Fig. 13). El índice de polidispersidad revela que la muestra es monodispersa, lo que la hace adecuada para montar pruebas de cristalización. Sin embargo, debido al gran número de subunidades en el oligómero será un reto la resolución estructural de esta proteína, aun obteniendo cristales adecuados para ser difractados. A pesar del gran número de subunidades, ya se ha observado como Trx favorece la formación de oligómeros de gran tamaño, como el octámero de la proteína de fusión Trx-Puf60 determinado mediante cristalografía de rayos X, en el cual el oligómero tiene un arreglo tipo dona (PDB:3DXB) (Fig. 14; Corsini *et al.*, 2008).

	Cumulant	Multimodal Distribution		
	Guassian	Peak 1	Peak 2	Peak 3
Mean (d.nm):	95.47	137.6	26.69	0.000
Mode (d.nm):	---	129.9	25.79	0.000
Polydispersity Index:	0.356	---	---	---
Polydispersity [StD] (d.nm):	56.94	43.46	3.764	0.000
%Polydispersity:	59.6	31.6	14.1	0
Intensity (Percent):	---	87.5	12.5	0.0
Mass (Percent):	---	8.1	91.9	0.0
MW - Globular Protein (kDa):	2.85e4	6.71e4	1450	0.00
MW - Linear Polymer (kDa):	2250	4370	223	0.00
MW - Brush Polymer (kDa):	1.19e4	2.74e4	661	0.00
MW - Starburst Poly (kDa):	2.89e5	9.85e5	3990	0.00

Z-Average (d.nm): 95.47
 Pdl: 0.356
 Intercept: 0.817
 Result quality : Good

	Size (d.nm):	% Volume:	St Dev (d.nm):
Peak 1:	107.3	8.1	33.14
Peak 2:	25.23	91.9	3.541
Peak 3:	0.000	0.0	0.000



Muestra monodispersa
 24 subunidades en el oligómero

Figura 13. Datos de dispersión dinámica de luz (DLS) de Trx-rHev b 7 en solución, mostrando un gráfico de la distribución por volumen del tamaño de partícula.



Figura 14. Estructura tridimensional del octámero de la proteína Trx-Puf60 (PDB:3DXB), poseyendo cada subunidad un color distinto, las esferas rojas corresponden a moléculas de agua y las esferas verdes a iones cloruro.

9.7 Cristalización de Trx-rHev b 7

La proteína Trx-rHev b 7 purificada fue empleada en ensayos de cristalización, observándose la formación de pequeños cristales ópticamente activos frente a la luz polarizada del microscopio en las condiciones B3, B7 y B11 de Morpheus Complete III de Molecular Dimensions. Todas estas condiciones poseen la misma mezcla de aditivos y agentes precipitantes, sólo varían en su pH siendo este de 6.5, 7.5 y 8.5, respectivamente. Uno de los cristales crecidos en la condición B3 de este kit (Fig. 15), la cual contiene 1.5% de mezcla de vitaminas (0.3% w/v de L-ascorbato de sodio, 0.3% w/v cloruro de colina, 0.3% w/v de D-pantenol, 0.3% hidrocloreuro de piridoxina y 0.3% de hidrocloreuro de tiamina), 0.1 M de solución amortiguadora de imidazol-MES pH 6.5, 20% de glicerol y 10% de PEG 4000; se montó en un asa de nylon y se probó en el equipo de difracción de rayos X MicrosMax007HF del LANEM-IQ. Se obtuvieron las imágenes a 0° y 90° sin registrar reflexiones, lo que descarta su naturaleza salina, pero indica que se trata de un gel sin capacidad de difractar.

Estos resultados nos plantean una serie de condiciones de cristalización que pueden ser optimizadas, ya sea cambiando la concentración de proteína, agente precipitante, pH, fuerza iónica o añadiendo aditivos. Todas estas condiciones en las que se observaron cristales contienen una mezcla precipitante con 20% de glicerol, 10% de PEG 4000 y la mezcla de vitaminas ya mencionada, algo que puede ser un punto de inicio en la optimización de las condiciones de cristalización de esta proteína.

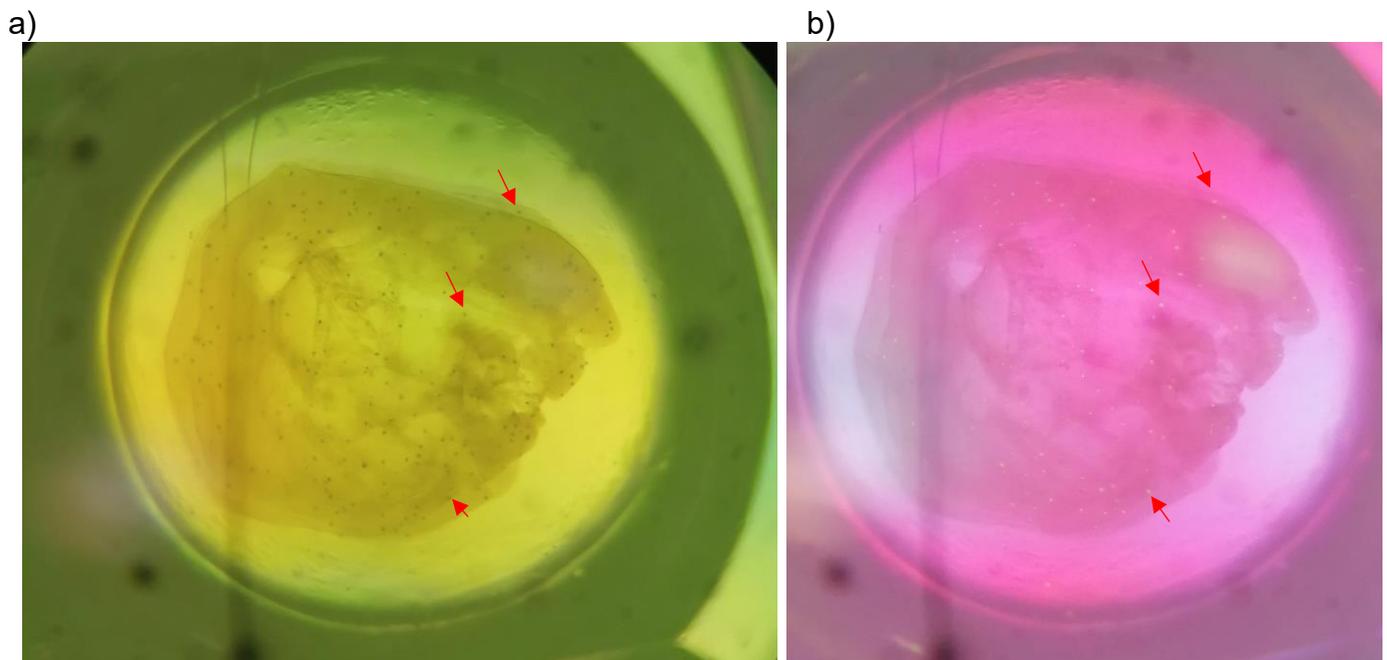


Figura 15. Microcristales en gota de Trx-rHev b 7 obtenidos con la condición B3 del kit Morpheus Complete III, observándose un precipitado en el cual crecieron cristales que interactúan con la luz polarizada pasando de un aspecto opaco (imagen a) a un aspecto brillante (imagen b) al girar 90° el polarizador. Las flechas rojas señalan algunos microcristales

9.8 Corte de la proteína de fusión Trx-rHev b 7 con la proteasa TEV

Parte de la proteína Trx-rHev b 7 purificada se incubó con la proteasa TEV para evaluar la eficiencia de la proteólisis y la solución resultante se analizó en un SDS-PAGE (Fig. 16). Este experimento demuestra una eficiencia de corte superior al 50%, basándose en la intensidad de las bandas correspondientes a Trx-rHev b 7 y rHev b 7. Adicionalmente, este experimento indica que el sitio de corte de la proteasa TEV está asequible para el solvente, algo que no se espera en agregados solubles.

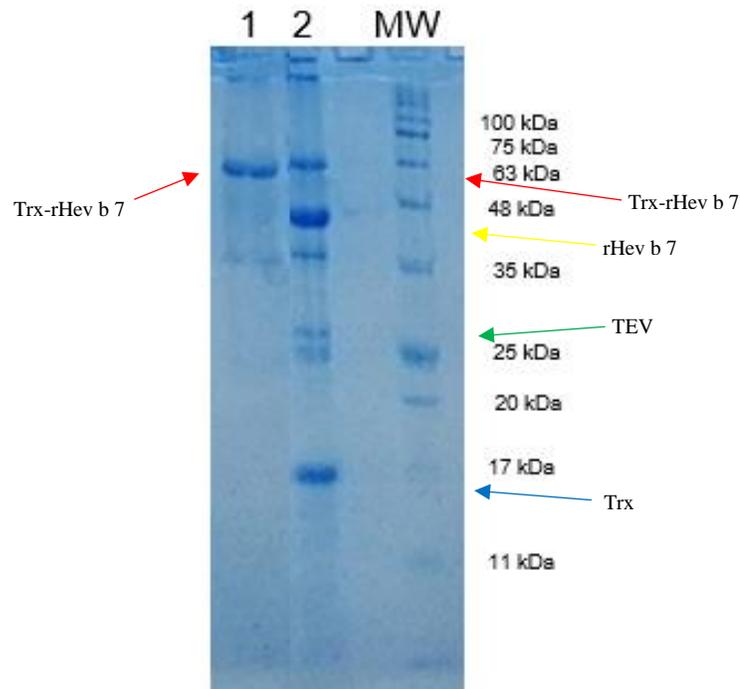


Figura 16. Perfil electroforético SDS-PAGE (10% T) de la proteína Trx-rHev b 7 solubilizada (carril 1) y el ensayo de corte con la proteasa TEV de esta proteína (carril 2). Las flechas rojas indican la posición de las bandas correspondientes a Trx-rHev b 7, la flecha amarilla indica la posición correspondiente a la banda de rHev b 7, la flecha verde indica la posición correspondiente a la banda de la proteasa TEV y la flecha azul indica la posición correspondiente a la banda de Trx.

9.9 Purificación mediante cromatografía de afinidad a Ni²⁺ de rHev b 7

La mezcla posterior de reacción posterior al corte con TEV se recirculó por la columna de afinidad a Ni²⁺ y se colectó la proteína rHev b 7 pura en la fracción no retenida a la resina, el SDS-PAGE que lo corrobora se muestra en la Fig. 17. Este paso resultó particularmente problemático debido a la agregación de la proteína tras el corte con la proteasa, este proceso inicia desde la separación cromatográfica de rHev b 7, la proteína dura aproximadamente 24 h en solución antes de agregarse completamente. Adicionalmente, la mayor parte de la proteína tras ser cortada sigue uniéndose a la resina de Ni²⁺, incluso lavando con 1 M de NaCl. Debido a estos factores rHev b 7 se empleó en pocos ensayos, entre ellos actividad enzimática y ELISA.

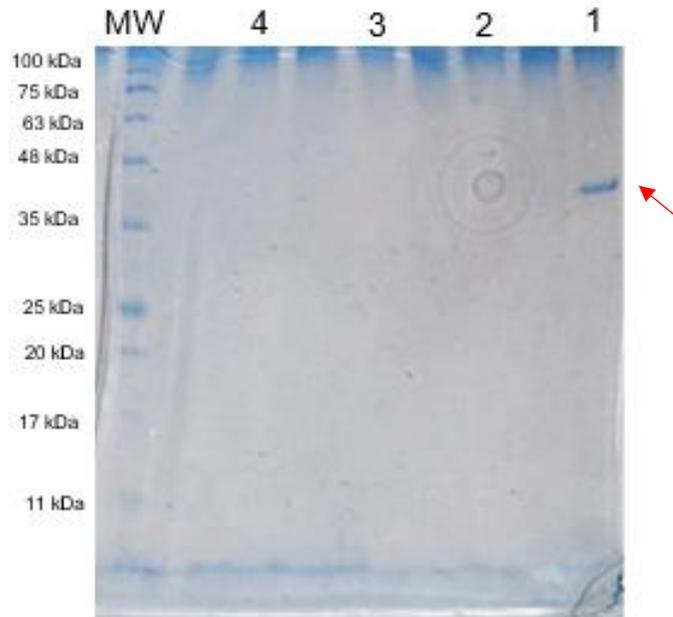


Figura 17. Perfil electroforético SDS-PAGE (15% T) de rHev b 7 (43 kDa; carril 1) y lavados de la columna de Ni²⁺ con 1 M de NaCl intentado eluir más rHev b 7 (carriles 2, 3 y 4). La flecha roja indica la posición correspondiente a la banda de rHev b 7.

9.10 Actividades enzimáticas de Trx-rHev b 7 y rHev b 7 usando palmitato de p-nitrofenilo como sustrato

La actividad enzimática de Trx-rHev b 7 y rHev b 7 se midió usando el palmitato de p-nitrofenilo como sustrato, siguiendo el protocolo y usando la definición de actividad mencionados en el apartado 8.13. Ambas enzimas mostraron actividad hidrolítica con el palmitato de p-nitrofenilo, siendo la proteína libre rHev b 7 más activa que Trx-rHev b 7. Sin embargo, ambas proteínas poseen una actividad enzimática muy inferior al control positivo (Lipasa B de *Candida antarctica*). Al comparar las actividades enzimáticas específicas con las de las patatinas de la papa se observa una gran variabilidad en la actividad específica con este sustrato, la patatina del tubérculo de papa posee una actividad de 55 mU/mg (ΔA_{400} de $1 \text{ min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$) y para la patatina de las anteras de papa es de 8 mU/mg (ΔA_{400} de $0.15 \text{ min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$; Höfgen & Willmitzer, 1990), dentro de cuyo rango cae la actividad de rHev b 7 (Tabla 2). La lipasa B de *Candida antarctica* se ha reportado que posee una actividad específica de 10 U/mg con este mismo sustrato (Eom *et al.*, 2013). Esto corresponde con una actividad enzimática superior a la de las patatinas, lo que puede deberse a que éstas se ha reportado que son principalmente fosfolipasas. No fue posible hacer un mayor número de ensayos de actividad debido a la inestabilidad de rHev b 7, que tras ser escindida de la Trx y purificarse comienza a agregarse en el transcurso de unas 24 h. Aun así, este ensayo es una evidencia del correcto plegamiento de la proteína solubilizada a partir de los cuerpos de inclusión.

Tabla 2. Actividades enzimáticas como lipasas de Trx-rHev b 7 y rHev b 7 con el palmitato de p-nitrofenilo como sustrato. Una unidad de actividad se define como un μmol de producto (p-nitrofenol) liberado por minuto. Actividades específicas de otras patatinas.

Muestra	ΔA_{400} en 30 min.	Actividad (mU/mL)	Actividad específica (mU/mg)
Control negativo	0.0012 \pm 0.0005	0	0
Control positivo	0.217 \pm 0.002	0.395 \pm 0.004	-----
Trx-rHev b 7	0.0060 \pm 0.0006	0.010 \pm 0.001	10 \pm 1
rHev b 7	0.0150 \pm 0.0002	0.027 \pm 0.0004	27.1 \pm 0.4
Patatina de tubérculo (<i>Solanum tuberosum</i>)			55 (Höfgen & Willmitzer, 1990)
Patatina de anteras (<i>Solanum tuberosum</i>)			8 (Höfgen & Willmitzer, 1990)

9.11 Actividad enzimática como fosfolipasa de rHev b 7 con suspensión de yema de huevo como sustrato

El ensayo de actividad de rHev b 7 usando una suspensión de yema de huevo permitió corroborar que, efectivamente, se trata de una fosfolipasa y posee una actividad enzimática considerable con este sustrato en particular, exhibiendo una actividad enzimática específica de 72 \pm 3 U/mg (Tabla 3). Este resultado indica que la enzima posee una mayor actividad con este sustrato que contra el palmitato de p-nitrofenilo. La yema de huevo posee una gran cantidad de lípidos, entre los que destacan fosfolípidos como las glicerofosfocolinas 34:2 y 36:2 y otros como glicerofosfoetanolaminas 38:4 y 36:2, glicerofosfoerinas 36:2 y 38:4, glicerofosfoinositol 38:4, entre otros (Wood *et al.*, 2021). Por consiguiente, estos fosfolípidos serían un mejor sustrato sobre el cual actúa la enzima rHev b 7, lo que es consistente con que las patatinas son fosfolipasas (Hirschberg *et al.*, 2001).

La nomenclatura usada para los fosfolípidos se basa en datos obtenidos mediante espectrometría de masas y se denomina a “nivel de especies”, los números corresponden a el número total de carbonos en las cadenas hidrocarbonadas y a los equivalentes a dobles enlaces en estas mismas cadenas (Liebisch *et al.*, 2020). De hecho, se ha reportado que la patatina recombinante de papa posee alta actividad con el sustrato sintético diC8PC (1,2-dioctanil-*sn*-glicero-3-fosfocolina) de 127 U/mg, siendo este sustrato una glicerofosfocolina, por lo que esta familia de proteínas posee alta actividad enzimática con fosfolípidos que con análogos de lípidos simples como el palmitato de p-nitrofenilo, algo que se observa también en rHev b 7. Mediante comparación con otras enzimas estudiadas por este método se encuentra que esta actividad enzimática es mucho menor a la de otras fosfolipasas como la fosfolipasa A de *Trimeresurus purpureomaculatus*, la cual exhibió una actividad de 1790 U/mg (Tan & Tan, 1988). En cambio, estudios de actividad por este método de venenos de serpientes de cascabel de la costa oeste mexicana revelaron actividades de 0.7 a 134 U/mg (Colis-Torres *et al.*, 2022), dentro de cuyo rango cae la actividad de rHev b 7. Esto nos indica una actividad apreciable como fosfolipasa de rHev b 7, la cual resalta por sobre su actividad hidrolítica con lípidos simples, lo que sugiere que rHev b 7 es una fosfolipasa como otros miembros de la familia de las patatinas.

Tabla 3. Actividad enzimática como fosfolipasa de rHev b 7 con suspensión de yema de huevo como sustrato. Una unidad de actividad se define como un μmol de producto (ácido graso) liberado por minuto.

Muestra	ΔpH cada 20 min	Actividad (U)	Actividad específica (U/mg)
Control negativo	0.01 ± 0.01	0	0
rHev b 7	-0.55 ± 0.02	3.6 ± 0.1	72 ± 2
Fosfolipasa A de <i>Trimeresurus purpureomaculatus</i>			1790 (Tan & Tan, 1988).
Venenos de serpiente de cascabel de la costa oeste mexicana			0.7-134 (Colis-Torres <i>et al.</i> , 2022)

9.12 Estudios de estabilidad de Trx-rHev b 7 mediante ensayos de fluorimetría diferencial de barrido

Los ensayos de fluorimetría diferencial de barrido de proteínas se basan en la medición del aumento de la fluorescencia de la mezcla de reacción a medida que se incrementa la temperatura y de esta manera se construye una curva de desnaturalización de la proteína. Este fenómeno ocurre debido a que la sonda fluorescente SYPRO ORANGE, en la mezcla del ensayo, se une a las regiones hidrofóbicas de la proteína que se exponen durante la desnaturalización inducida por la temperatura, lo que genera el aumento de la fluorescencia que es medido en el equipo de RT-PCR. Las curvas de desnaturalización de la proteína, en distintas condiciones de pH, aditivos, sales y ligandos, proporcionan información sobre la estabilidad de la proteína en cada una de estas condiciones. Los ensayos con la proteína Trx-rHev b 7 mostraron una ausencia de fluorescencia a lo largo del experimento para la gran mayoría de las condiciones empleadas, indicando una gran estabilidad de la proteína en la gran mayoría de las condiciones de pH empleadas para el experimento, ya que al no desnaturalizarse la proteína no se observa un aumento en la fluorescencia. En la Fig. 18, se observan las curvas de desnaturalización en condiciones de pH extremos, acotando la región entre el mínimo y el máximo de fluorescencia durante la rampa de temperatura y ajustando los datos a la función sigmoide de Boltzmann. Esto nos revela que la proteína de fusión Trx-rHev b 7 es termoestable en el intervalo de pH entre 3.2 y 9.8, algo que podría esperarse de una proteína fusionada a la tiorredoxina, la cual se ha reportado confiere termoestabilidad a muchas de las proteínas con las que se fusiona (LaVallie *et al.*, 2000). Esta estabilidad fue notable al concentrar la proteína para las pruebas de cristalización, ya que ésta alcanzó concentraciones de 20 mg/mL sin agregarse.

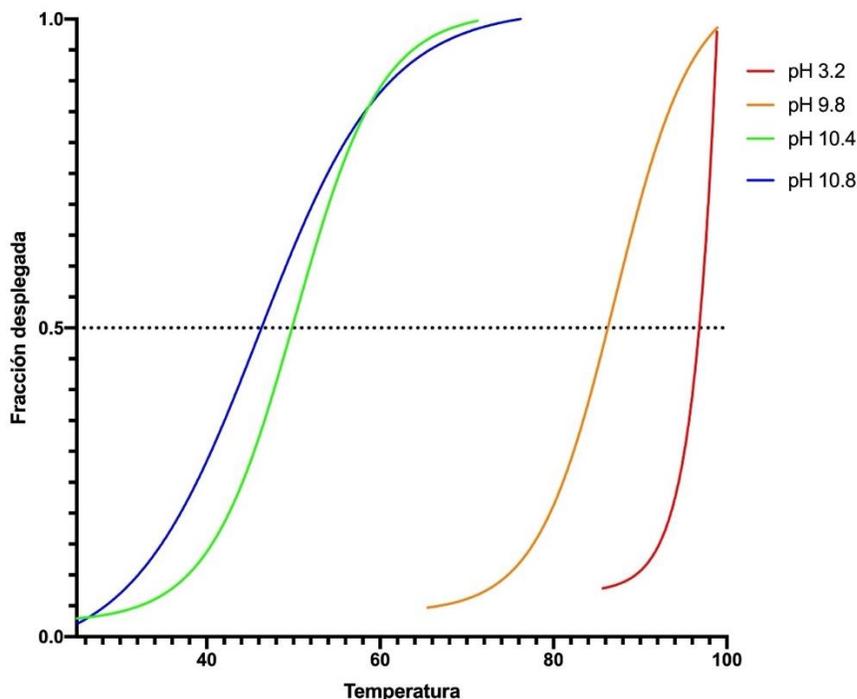


Figura 18. Estudios de desnaturalización de Trx-rHev b 7 mediante fluorimetría diferencial de barrido a distintos valores de pH.

9.13 Espectros de dicroísmo circular en el UV lejano de Trx-rHev b 7 y rHev b 7

Las proteínas Trx-rHev b 7 y rHev b 7 mostraron un espectro de dicroísmo circular distinto (Fig. 19), como era de esperarse dada la presencia de tiorredoxina en la proteína de fusión. No obstante, se estimó el contenido de estructura secundaria de ambas proteínas usando el servidor BestSel (Micsonai *et al.*, 2018). Como puede apreciarse la proteína rHev b 7 tiene tanto hélices α como hebras β , algo esperado para una enzima de la familia de las hidrolasas. Los resultados del servidor BestSel (Tabla 4) indican que las proteínas Trx-rHev b 7 y rHev b 7 difieren en los contenidos de estructura α y β que poseen cada una. Al comparar el contenido de estructura secundaria de rHev b 7 con el de Pat17 se observan ciertas similitudes en el contenido total de hebras β y giros, difiriendo ambas, de forma notable, en el contenido de hélices α y regiones sin estructura secundaria. rHev b 7 posee una mayor proporción de regiones sin estructura secundaria con respecto a Pat17, quien posee mayor contenido de hélices α . En la Fig. 6 se distinguen inserciones en la secuencia de Hev b 7 con respecto a Pat17, las cuales al no poseer estructura secundaria pueden contribuir a estas diferencias. Este experimento junto con los ensayos de actividad enzimática con palmitato de p-nitrofenilo son evidencias de que el protocolo de solubilización por sonicación efectivamente permite obtener a la proteína Trx-rHev b 7 plegada y activa a partir de cuerpos de inclusión. Esto en conjunto con el estudio por dispersión dinámica de la luz nos indicaría que la especie en solución de alrededor de 24 subunidades se trata de un oligómero de Trx-rHev b 7 y no de un agregado soluble, de ser el caso carecería de actividad enzimática y de estructura secundaria.

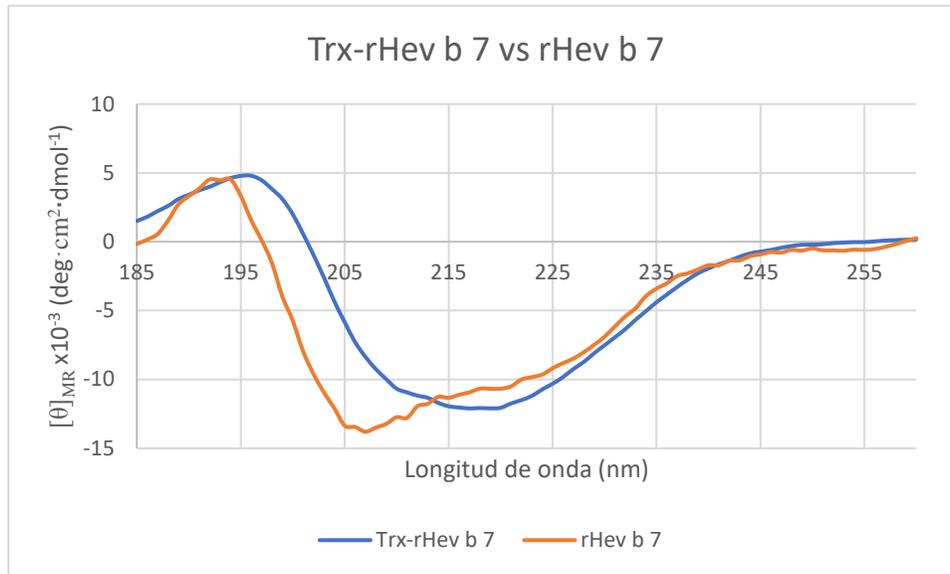


Figura 19. Espectros de dicroísmo circular (DC) en el UV lejano de Trx-rHev b 7 (línea azul) y rHev b 7 (línea naranja).

Tabla 4. Elementos de estructura secundaria calculados con el servidor BestSel a partir de los espectros de dicroísmo circular en el UV lejano de las proteínas Trx-rHev b 7 y rHev b 7.

Proteína	Hélices α	Hebras β paralelas	Hebras β antiparalelas	Giros	Desestructurada
Trx-rHev b 7	13.5%	13.3%	14.5%	12.6%	46.1%
rHev b 7	22%	12.1%	4.7%	14%	47.3%
Pat17	38%	7.4%	6.8%	11.2%	36.5%

9.14 Reconocimiento de rHev b 7 por IgE en sueros de pacientes alérgicos al látex

El ensayo de ELISA de rHev b 7 contra los 19 sueros probados (17 de niños y 2 de adultos) indican un leve reconocimiento por parte de las IgE en siete de los sueros de los pacientes, siendo los sueros 11 (niño) y 19 (trabajador del área de salud) los más evidentes. Como criterio de reacción positiva se usó una absorbancia de una desviación estándar sobre el blanco de PBS (Fig. 20). El suero 18 también fue inmunorreactivo frente a rHev b 7 y pertenece a un adulto trabajador del área de salud alérgico al látex. Los sueros 18 y 19, en conjunto, agruparían lo que correspondería al 100% de la población adulta en estudio, por lo tanto, todos los sueros de adultos en el estudio poseen IgEs reactivas a rHev b 7. Por otro lado, 5 de los 17 sueros de niños probados poseen anticuerpos IgE que reconocen a rHev b 7, lo es el 29.4% de la muestra en estudio. Estos datos pueden sugerir que Hev b 7 es un alérgeno relevante en la población de trabajadores del área de salud alérgicos al látex en la Ciudad de México, además de que algunos niños también reconocieron a rHev b 7, volviéndolo un alérgeno de interés en el estudio de la alergia al látex en México. Aunque faltaría hacer un estudio con un

mayor número de sueros para tener datos estadísticamente robustos sobre la prevalencia alérgica de Hev b 7 en la población mexicana alérgica al látex.

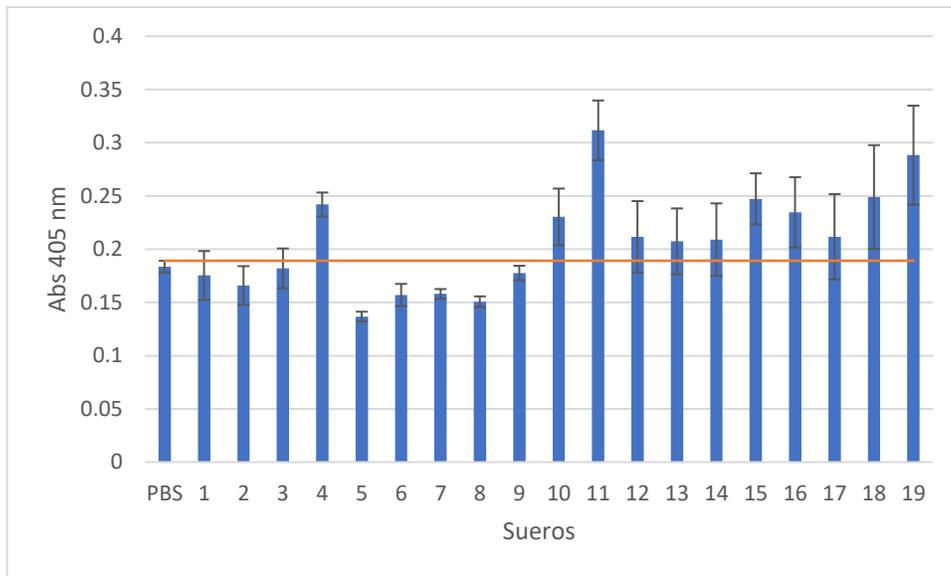
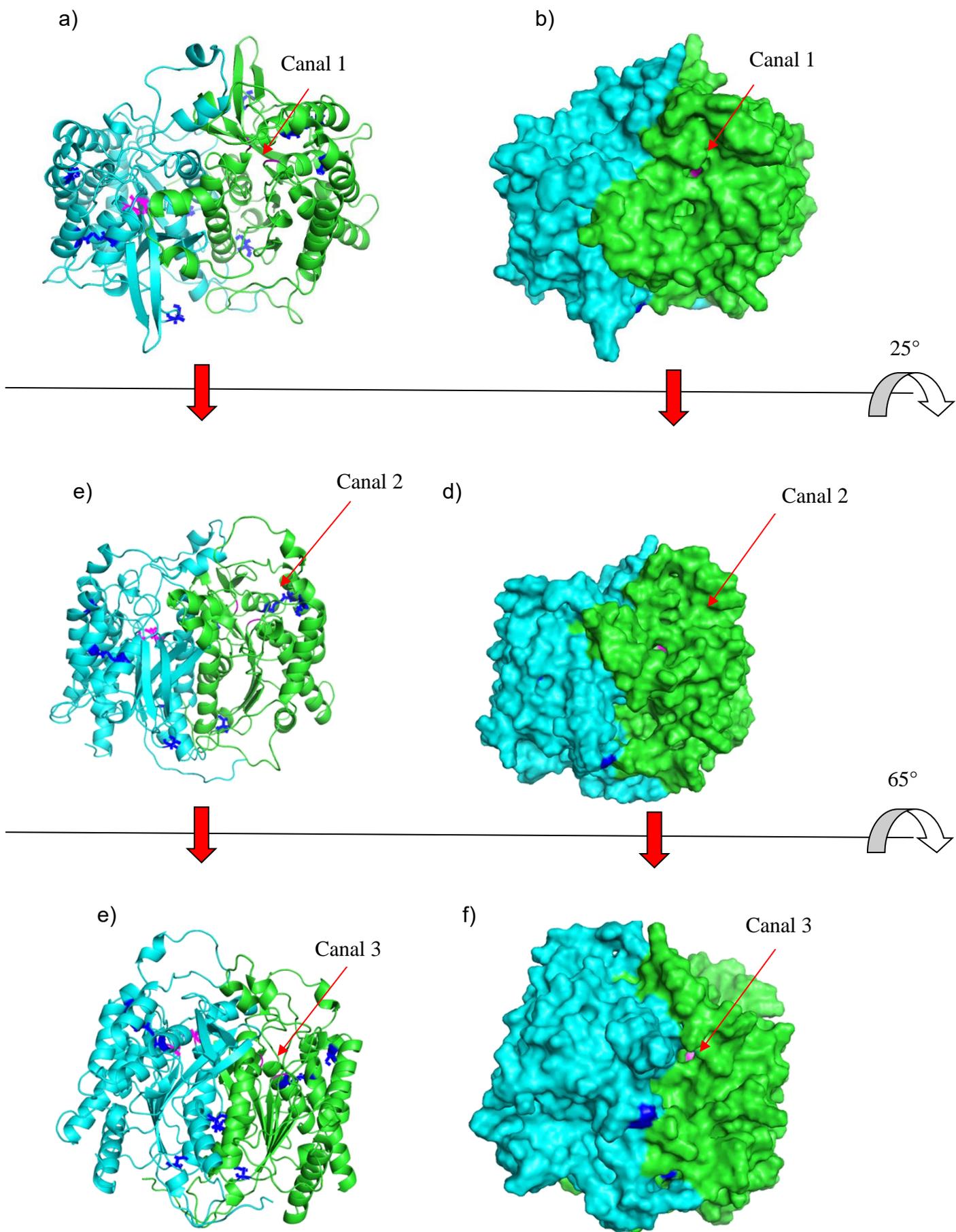


Figura 20. Reconocimiento de rHev b 7 por IgE en sueros de pacientes alérgicos al látex. Los sueros 1-17 son de niños alérgicos al látex y los sueros 18 y 19 son de trabajadores del área de salud alérgicos al látex, todos del INP de la Ciudad de México. Cada suero fue medido por triplicado, las barras señalan la absorbancia a 405 nm con su respectiva desviación estándar y la línea roja horizontal indica el criterio de reacción positiva, representa una desviación estándar sobre el blanco de PBS.

9.15 Modelo estructural de Robetta

Usando el servidor Robetta se obtuvo un modelo tridimensional que se basó en la estructura de la patatina de *Solanum cardiophyllum* (PDB:1OXW) (Fig. 21). El modelo obtenido posee un plegamiento tipo α/β típico de hidrolasas, con una hoja β compuesta por 5 hebras β paralelas y una antiparalela, rodeada por hélices α y una horquilla β . La Ser61 y el Asp205 forman la diada catalítica (Fig. 21). Estos resultados son los esperados tras el alineamiento de secuencias entre Hev b 7 y Pat17 (Fig. 6) que presentan un 43% de identidad. Robetta predice un dímero para esta proteína, lo cual concuerda con lo reportado por Beezhold *et al.* (1996). Tres de las cisteínas de la proteína se encuentran libres, sólo una está expuesta al solvente, y dos formar un puente disulfuro (Cys125-Cys175) entre dos de las hélices α próximas a la diada catalítica, lo que pudiera conferirle una mayor estabilidad térmica a esta proteína con respecto a otras patatinas. La estructura da lugar a tres canales que convergen en la cavidad que contiene la diada catalítica Ser-Asp, lo que en conjunto constituiría el sitio activo de la enzima, donde se acomodaría el sustrato, probablemente un fosfolípido tipo glicerofosfolina.

El análisis de la interfase del dímero mediante el servidor PISA (Krissinel & Henrick, 2007) indicó un área total accesible al solvente de 7312.3 Å² que se oculta al formarse el dímero, lo que corresponde a un área de intercara de 3656.1 Å², indicando que Hev b 7 es un dímero obligado al ser su área oculta mayor a 1400 Å² (Ali & Imperiali, 2005). Esta cara está constituida por 197 residuos de aminoácidos, de los cuales 88 son residuos hidrofóbicos (Leu, Ile, Ala, Pro, Val y Phe), siendo estos el 44.67 % de los residuos en la intercara. La parte central de la intercara está formada principalmente por las hélices α 214-228 y 280-308, siendo principalmente hidrofóbicos los residuos localizados en esta región. Por otro lado, las periferias de la intercara son pequeñas hélices, grandes asas y el extremo N-terminal, los cuales poseen un mayor contenido de residuos polares y cargados. Como prueba de ello, en esta región están los 23 puentes de hidrógeno y 2 puentes salinos que estabilizan al dímero (Tabla 5). En la intercara resalta la hélice α 280-308, que se encuentra muy próxima a su contraparte de la otra subunidad. Sin embargo, esta proximidad no implica que estos interactúen entre sí, esto debido a la conformación de sus cadenas laterales, como ejemplo está la Phe285, la cual tiene una distancia de 4.6 Å entre las cadenas principales de sus contrapartes, pero debido a esa distancia tan corta sus cadenas laterales se ubican en direcciones opuestas, impidiendo que interactúen entre sí (Fig. 22).



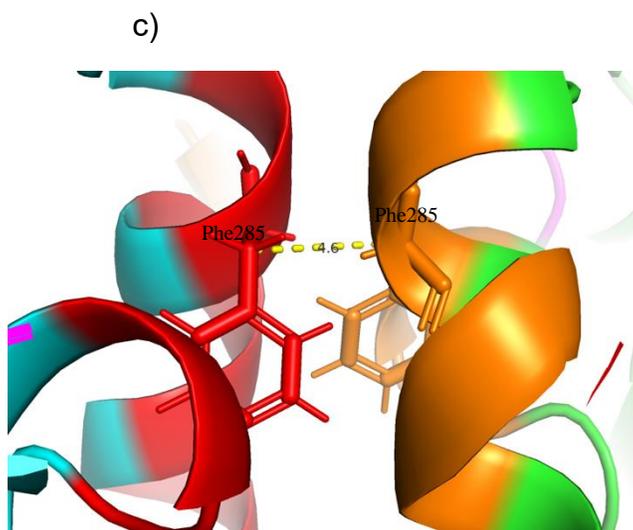


Figura 22. Modelo estructural del dímero de Hev b 7 obtenido mediante Robetta, resaltando los residuos de la intercara. a) Vista lateral del diagrama de listones. b) Vista axial del diagrama de listones. C) Acercamiento a los residuos Phe285 de ambas subunidades, la distancia entre sus cadenas principales y conformación de sus cadenas laterales. Los colores verde y cian son para cada monómero, el color naranja y rojo son para los residuos de aminoácidos localizados en la interfase del dímero, diferenciando los residuos de cada subunidad, el color magenta indica la diada catalítica Ser-Asp y el color azul son las cisteínas.

Tabla 5. Interacciones tipo puente de hidrógeno y puente salino en la intercara del dímero del modelo de Robetta.

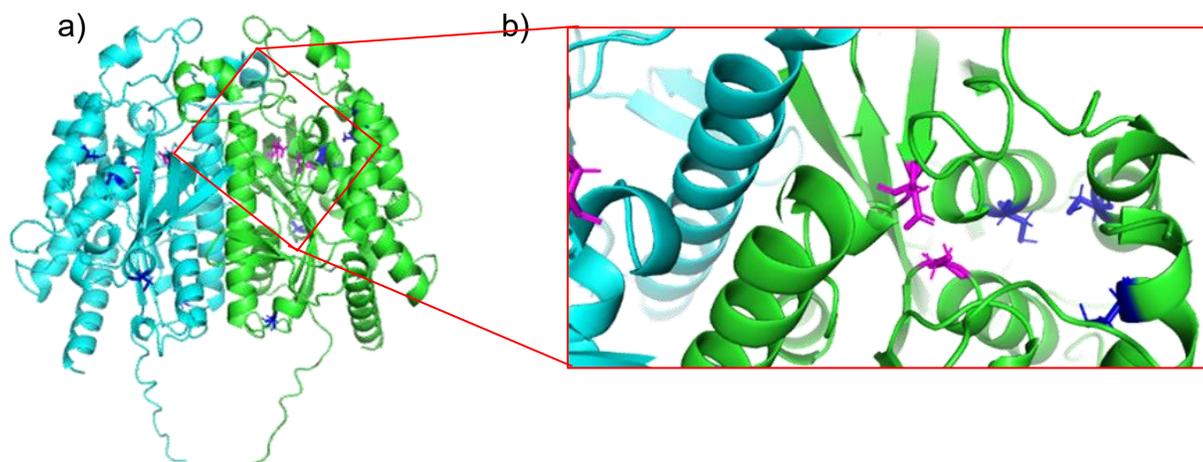
Puentes de hidrógeno	Puentes salinos
Ser360A[H]---Met1B[O]	Met1A[N]---Asp308B[OD2]
Arg357A[NH2]---Arg227B[O]	Asp308A[OD1]---Met1B[N]
Arg357A[HE]---Asn229B[O]	
Arg357A[NH2]---Asn229B[O]	
Asn236A[H]---Gly234B[O]	
Ser111A[H]---Asn271B[OD1]	
Ser111A[OG]---Asn271B[OD1]	
Lys241A[NZ]---Ser303B[O]	
Ile233A[H]---Asp305B[OD2]	
Met1A[N]---Asp308B[OD2]	
Arg227A[NH1]---Asp354B[O]	
Arg227A[NH1]---Thr355B[OG1]	
Met1A[O]---Ser360B[H]	
Arg227A[O]---Arg357B[NH2]	
Asn229A[O]---Arg357B[NH2]	
Asn229A[O]---Arg357B[HE]	
Gly234A[O]---Asn236B[H]	
Asn271A[OD1]---Ser111B[H]	
Asn271A[OD1]---Ser111B[OG]	
Ser303A[O]---Lys241B[NZ]	
Asp305A[OD2]---Ile233B[H]	
Asp354A[O]---Arg227B[NH1]	
Thr355A[OG1]---Arg227B[NH1]	

9.16 Modelo estructural de AlphaFold-Multimer.

El modelo obtenido a través del servidor AlphaFold-Multimer, que es un método que emplea machine learning que se “entrena” esencialmente con estructuras cristalográficas, muestra un plegamiento tipo α/β con las mismas características del modelo predicho por Robetta, una hoja β constituida por 5 hebras β paralelas y una antiparalela, rodeada por hélices α y una horquilla β . También posee la misma diada catalítica Ser-Asp y las cisteínas 125 y 175 se ubican lo suficientemente cerca para formar puente disulfuro entre las hélices α junto al sitio catalítico.

El análisis del arreglo dimérico predicho por AlphaFold-Multimer mediante el servidor PISA (Krissinel & Henrick, 2007) indica un área total accesible al solvente que se ocultó en el dímero de 6330 \AA^2 , correspondiente con un área de la intercara de 3165 \AA^2 , la cual es inferior a la calculada para el modelo de Robetta. Esta área es suficiente para explicar que Hev b 7 sea un dímero obligado. Hay 170 residuos en esta intercara, de los cuales 76 son residuos hidrofóbicos (Leu, Ile, Ala, Pro, Val y Phe) (44.71 %), siendo este porcentaje muy parecido al del modelo de Robetta. Asimismo, la parte central de la intercara está formada principalmente por las hélices α 214-228 y 280-308, siendo principalmente hidrofóbicos los residuos localizados en esta región. De igual manera, las periferias de la intercara son pequeñas hélices y grandes asas, en este caso el extremo N-terminal no participa en la dimerización. A diferencia del modelo de Robetta, en este modelo hay 12 puentes de hidrógeno y 6 puentes salinos entre las subunidades (Tabla 6), los cuales en su mayoría son distintos entre ambos modelos, pero localizándose de igual forma en las periferias de la intercara. Esto indica que, aunque ambos modelos compartan el mismo plegamiento difieren sustancialmente en las asas, siendo estas las responsables de los puentes de hidrógeno y puentes salinos antes mencionados en las periferias de la intercara.

Otra diferencia entre ambos modelos está en la distancia entre las hélices 280-308 de ambas subunidades, siendo esta mayor para el modelo de AlphaFold-Multimer y esto permite un arreglo en el cual las cadenas laterales de los residuos pueden interactuar con sus contrapartes. Por ejemplo, la Phe285 tiene una distancia de 7.0 \AA con la cadena principal de su contraparte, permitiendo que las cadenas laterales de cada contraparte se aproximan lo suficiente (3.4 \AA) para formar interacciones $\pi \cdots \pi$ (Fig. 23), algo que no se observa en el modelo de Robetta (Fig. 22).



c)

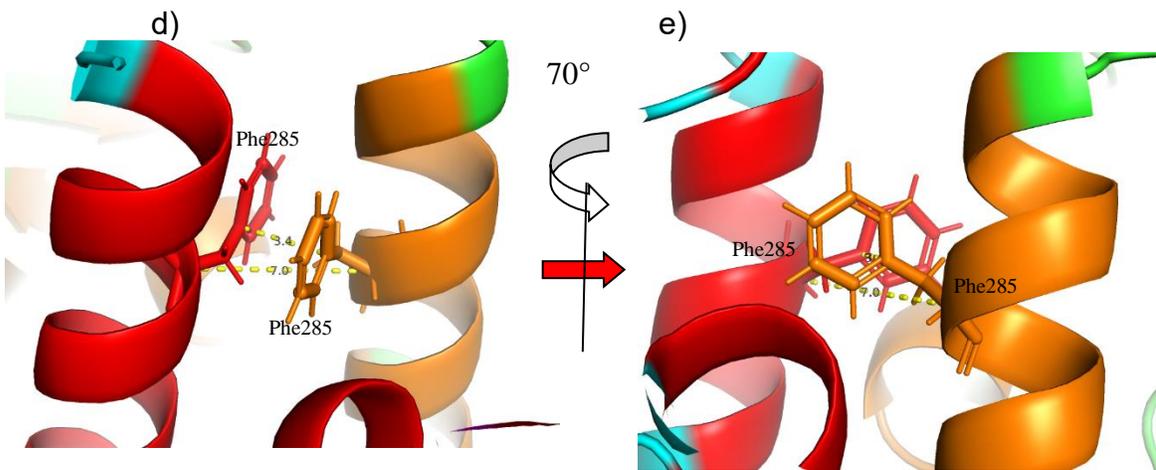


Figura 23. Modelo estructural de Hev b 7 en forma de dímero obtenido mediante AlphaFold-Multimer. a) Vista lateral del diagrama de listones. b) Acercamiento a los residuos de la diada catalítica y el posible puente disulfuro aledaño. c) Vista lateral del diagrama de listones, resaltando los residuos en la intercara. d) Acercamiento a los residuos Phe285 de ambas subunidades, la distancia entre sus cadenas principales y laterales. e) Giro de 70° de la imagen anterior. Los colores verde y cian son para cada monómero, el color naranja y rojo son para los residuos de aminoácidos localizados en la interfase del dímero, diferenciando los residuos de cada subunidad, el color magenta indica la diada catalítica Ser-Asp y el color azul son las cisteínas.

Tabla 6. Interacciones tipo puente de hidrógeno y puente salino en la intercara del dímero del modelo de AlphaFold-Multimer.

Puentes de hidrógeno	Puentes salinos
Arg268A[HH11]---Ile109B[O]	Lys149A[NZ]---Glu257B[OE1]
Ala261A[H]---Glu202B[OE2]	Arg227A[NE]---Asp354B[OD2]
Lys149A[HZ3]---Glu257B[OE1]	Arg227A[NH2]---Asp354B[OD2]
Gly113A[H]---Trp267B[O]	Glu257A[OE1]---Lys149B[NZ]
Lys167A[HZ1]---Asp354B[O]	Asp354A[OD2]---Arg227B[NE]
Arg227A[HH21]---Asp354B[OD2]	Asp354A[OD2]---Arg227B[NH2]
Ile109A[O]---Arg268B[HH11]	
Glu202A[OE2]---Ala261B[H]	
Glu257A[OE1]---Lys149B[HZ3]	
Trp267A[O]---Gly113B[H]	
Asp354A[O]---Lys167B[HZ3]	
Asp354A[OD2]---Arg227B[HH21]	

9.17 Superposición de los modelos estructurales de Robetta y AlphaFold-Multimer.

La superposición de los modelos estructurales obtenidos por Robetta y AlphaFold-Multimer (RMSD de 6.151 Å para los dímeros y 5.898 Å para los monómeros) muestra que ambos coinciden en el plegamiento de la mayor parte de la proteína, es decir, la hoja β central y las hélices α a su alrededor, pero difieren en las asas y hélices α más expuestas al solvente (Fig. 24), siendo algunas de éstas las que dan forma a las cavidades que conducen al sitio catalítico de la enzima. De hecho, la estructura predicha por Robetta posee tres de estas cavidades, lo cual contrasta con el modelo de AlphaFold-Multimer. En este último, las cavidades están ausentes debido al arreglo de las asas cercanas a los residuos catalíticos (Fig. 25). Las regiones involucradas en estas diferencias entre los modelos de Robetta y AlphaFold Multimer son las asas que van desde los residuos 255 al 259 y 273 al 282, la hélice α entre los residuos 100 y 105, la His326 y la región entre los residuos 347 y 361.

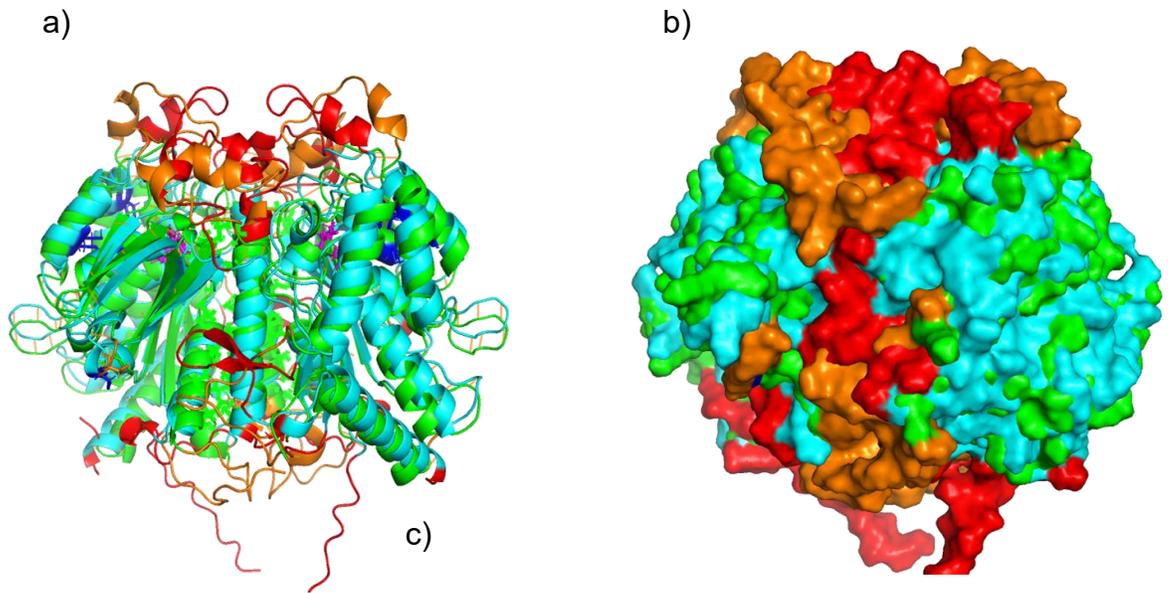
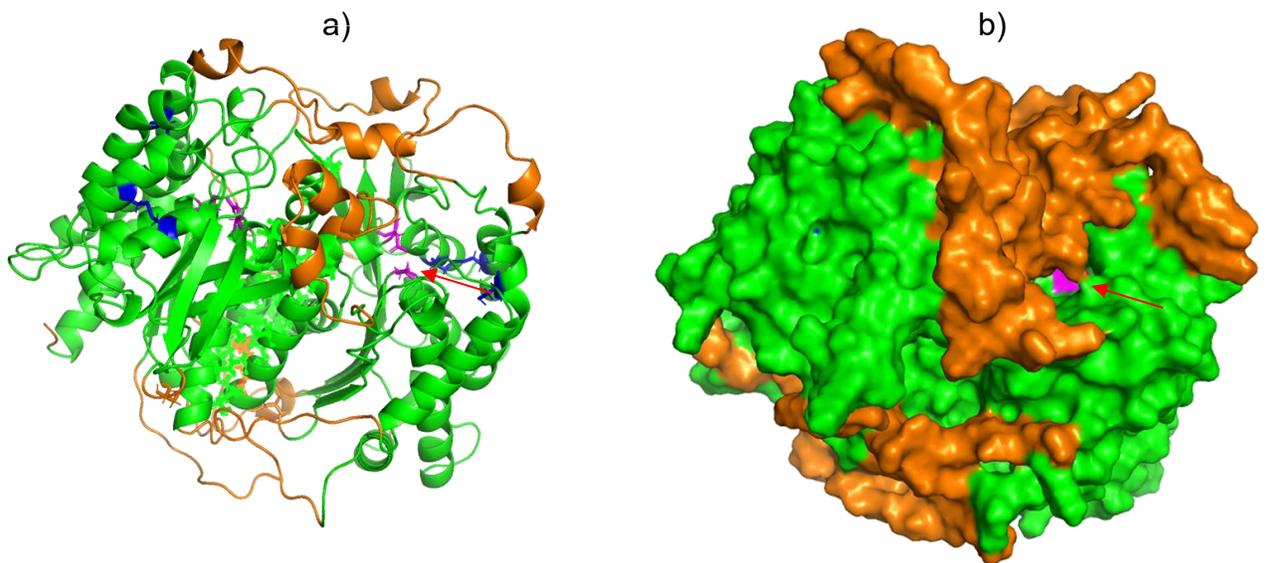


Figura 24. Superposición de los modelos estructurales de Hev b 7 obtenidos mediante Robetta y AlphaFold-Multimer (RMSD de 6.151 Å), resaltando las regiones distintas entre ambos. a) Superposición en diagrama de listones. b) Superposición en diagrama de superficie. El color verde corresponde al modelo de Robetta, el color cian corresponde al modelo de AlphaFold-Multimer, el color magenta indica la diada catalítica Ser-Asp, el color azul son las cisteínas y los colores rojo (AlphaFold-Multimer) y naranja (Robetta) indican las regiones que son distintas entre ambos modelos estructurales.



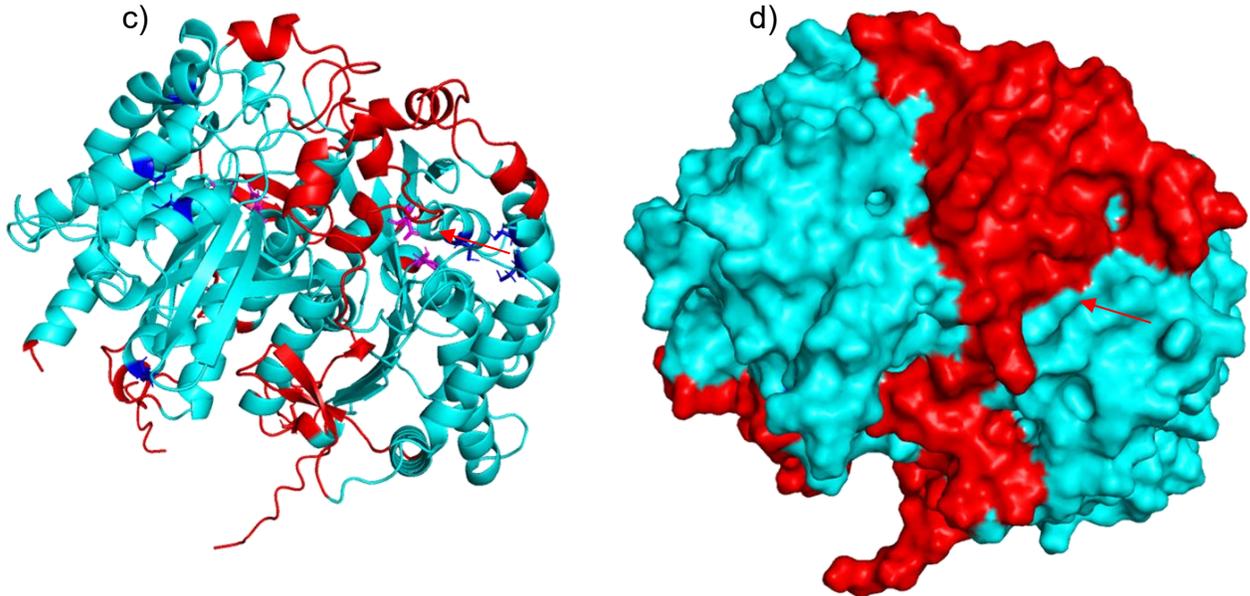


Figura 25. Comparación de los modelos estructurales de Hev b 7 obtenidos mediante Robetta y AlphaFold-Multimer, resaltando el canal 2 hacia la diada catalítica y las regiones distintas entre ambos modelos. a) Diagrama de listones del modelo de Robetta señalando el canal 2. b) Diagrama de superficie del modelo de Robetta señalando el canal 2. c) Diagrama de listones del modelo de AlphaFold-Multimer señalando la zona donde se localizaría el canal 2. d) Diagrama de superficie del modelo de AlphaFold-Multimer señalando la zona donde se localizaría el canal 2. El color verde corresponde al modelo de Robetta, el color cian corresponde al modelo de AlphaFold-Multimer, el color magenta indica la diada catalítica Ser-Asp, el color azul son las cisteínas, los colores rojo (AlphaFold-Multimer) y naranja (Robetta) indican las regiones que son distintas entre ambos modelos estructurales. La flecha señala la región correspondiente al canal 2 del modelo de Robetta.

La distancia entre el asa 273-282 y la His326 difiere entre los dos modelos en estudio, empleando la Gly277 como referencia, se mide una distancia de 2.9 Å para el modelo de AlphaFold-Multimer y 11.3 Å para el modelo de Robetta. Esta diferencia se debe a la conformación de la cadena lateral de la His326 y un cambio completo en el arreglo del asa 273-282 de ambos modelos, como se observa en la Fig. 26. El asa 273-282 y la hélice 100-105 muestran una diferencia mucho más significativa en su distancia al hacer la misma comparación. La distancia entre la Gly277 y la Arg103 es de 6.3 Å para el modelo de AlphaFold-Multimer y de 21.7 Å para el de Robetta, formándose un puente de hidrógeno entre la Arg103 y la His326 para AlphaFold-Multimer. Esto nos indica un gran desplazamiento de esta hélice α entre ambos modelos, estando en el modelo de Robetta mucho más expuesta al solvente. Estos cambios en conjunto causan que los residuos Arg103, Ile115, Leu274, Gly277 y His326 en el modelo de AlphaFold-Multimer se aproximen entre sí, bloqueando lo que sería el canal 1 en el modelo de Robetta (Fig. 26).

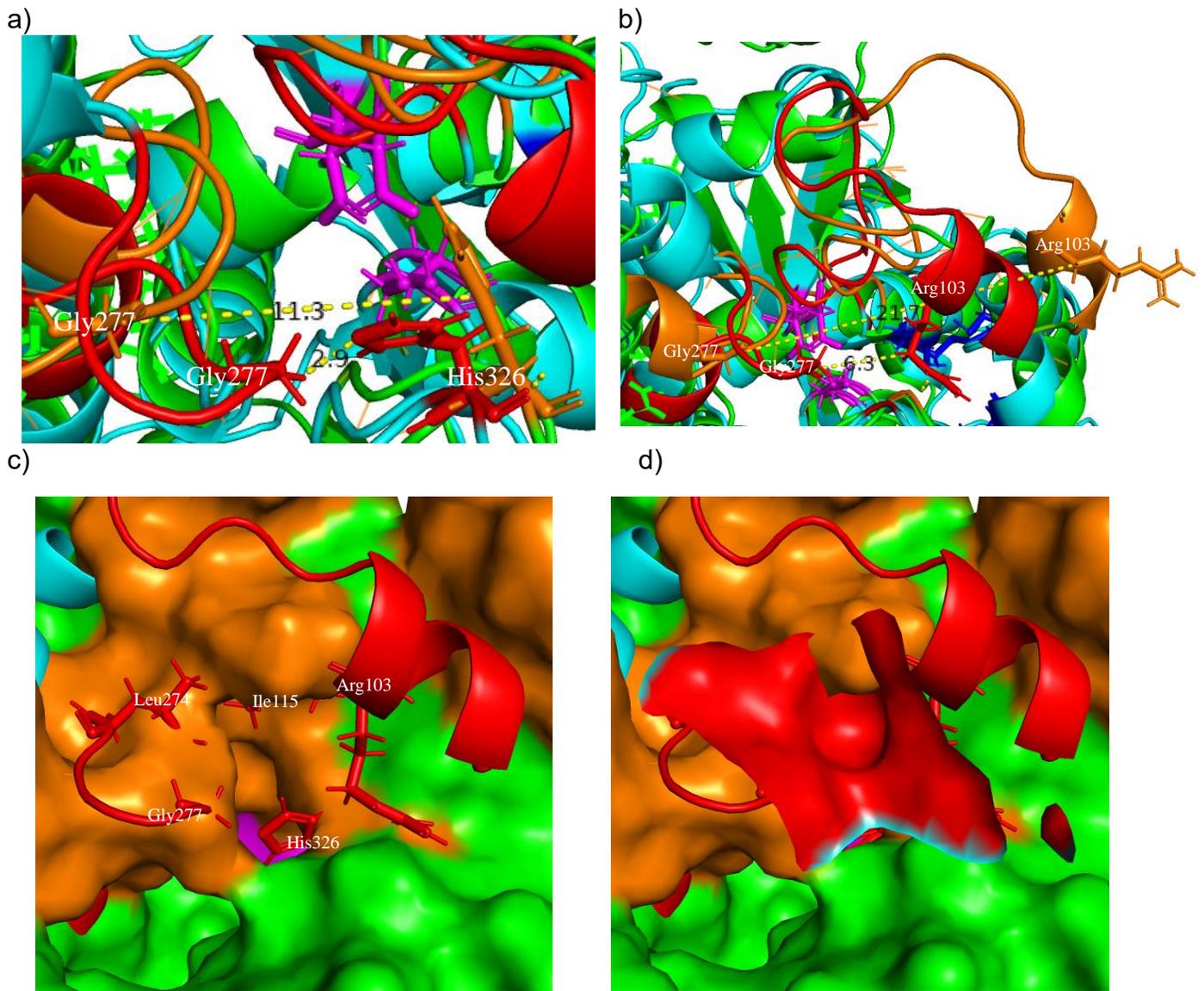
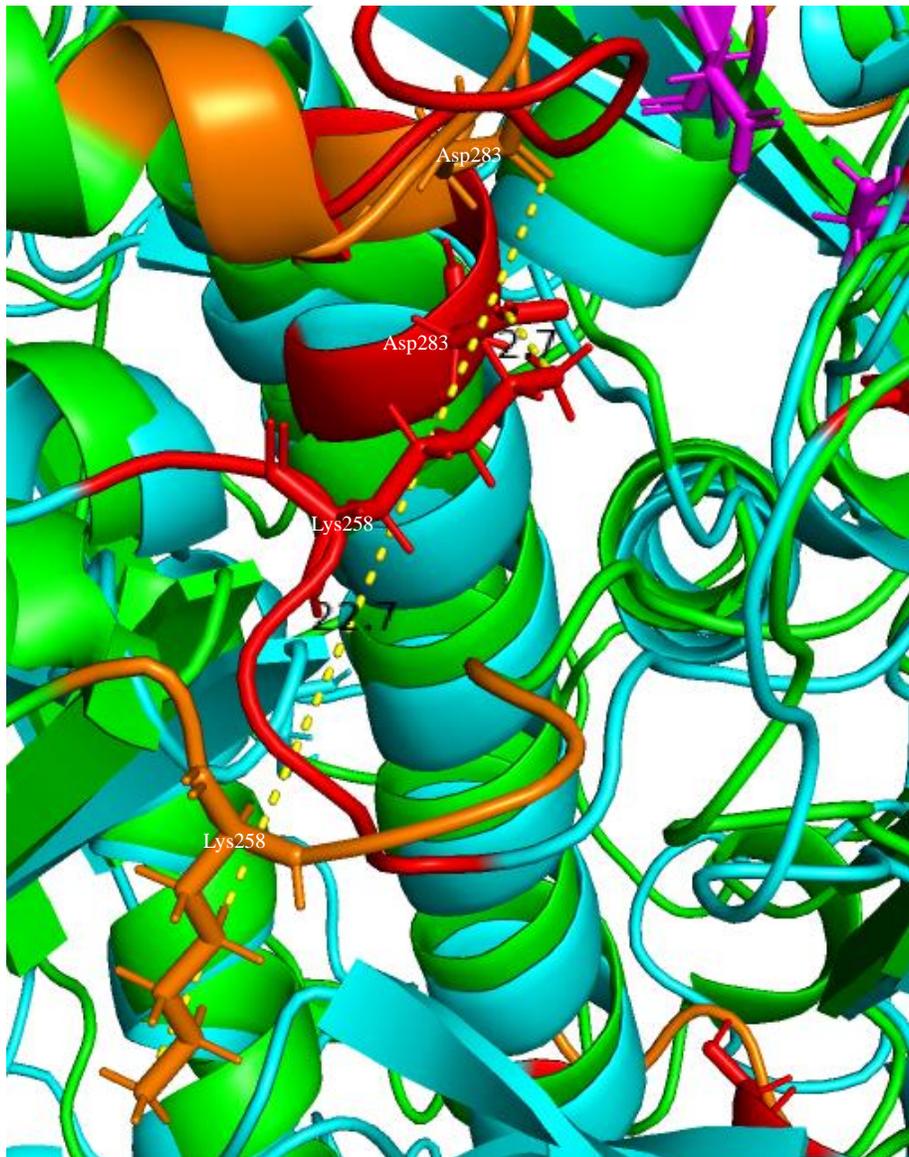


Figura 26. Comparación de los modelos estructurales de Hev b 7 obtenidos mediante Robetta y AlphaFold-Multimer, enfatizando las diferencias conformacionales en el asa 273-282, la His326 y la hélice 100-105. a) Acercamiento al canal 1 de la superposición de modelos en diagrama de listones, comparando la distancia Gly277-His326 de cada uno. b) Acercamiento al canal 1 en diagrama de listones de la superposición de modelos, comparando la distancia Arg103-Gly277 de cada uno. c) Acercamiento al canal 1 de la superposición del modelo de Robetta en diagrama de superficie y el modelo de AlphaFold-Multimer en diagrama de listones y los residuos Leu274, Gly277, His326, Ile115 y Arg103 representados en palos. d) Imagen anterior, pero con los residuos Leu274, Gly277, His326, Ile115 y Arg103 representados en superficie. El color verde corresponde al modelo de Robetta, el color cian corresponde al modelo de AlphaFold-Multimer, el color magenta indica la diada catalítica Ser-Asp, el color azul son las cisteínas y los colores rojo (AlphaFold-Multimer) y naranja (Robetta) indican las regiones que son distintas entre ambos modelos estructurales.

Otro cambio relevante entre ambos modelos tiene lugar en el asa 255-259, la cual cambia en el modelo de AlphaFold-Multimer, ya que está menos expuesta al solvente y más próxima al asa 273-282 que en el caso de Robetta. Esta diferencia se evidencia en la distancia entre la Lys258 y el Asp283, siendo ésta de 2.7 Å para el modelo de AlphaFold, formándose un puente salino, y 22.7 Å para el de Robetta. Este cambio en el asa causa que los residuos Lys258, Asn276, Asn278 y Asp283 en el modelo de AlphaFold-Multimer bloqueen el canal 2 hacia el sitio catalítico que existe en Robetta (Fig. 27).



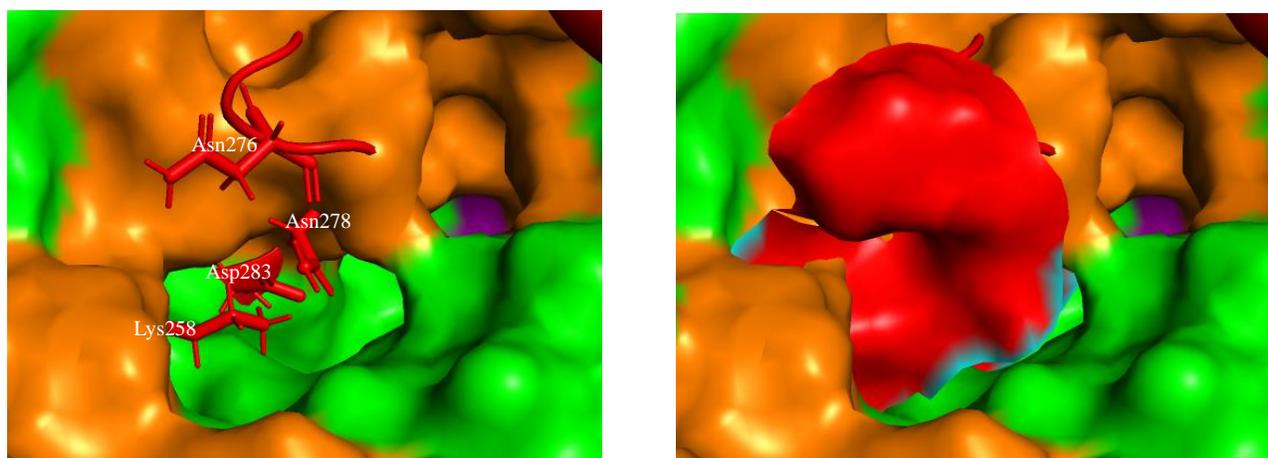


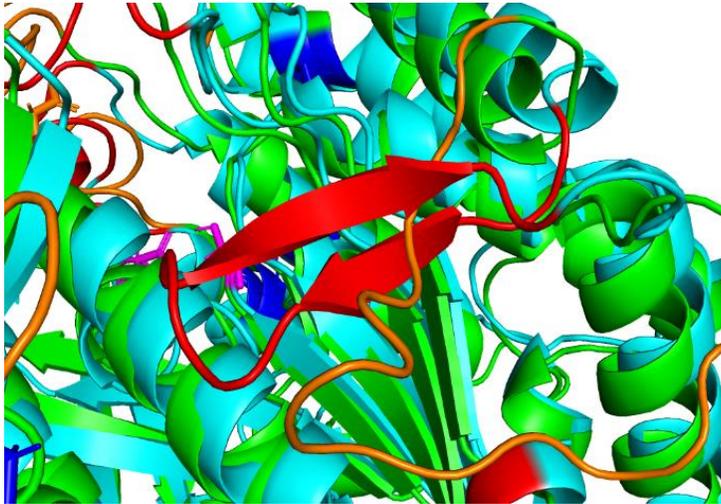
Figura 27. Comparación entre los modelos estructurales de Hev b 7 obtenido mediante Robetta y AlphaFold-Multimer, resaltando los cambios en el arreglo del asa 255-259. a) Acercamiento al asa 255-259 de la superposición de los modelos en diagrama de listones, comparando la distancia Lys258-Asp283 de cada uno. b) Acercamiento al canal 2 de la superposición del modelo de Robetta en diagrama de superficie y el modelo de AlphaFold-Multimer en diagrama de listones y los residuos Asn276, Asn278, Asp283 y Lys258 representados en palos. c) Imagen anterior, pero con los residuos Asn276, Asn278, Asp283 y Lys258 representados en superficie. El color verde corresponde al modelo de Robetta, el color cian corresponde al modelo de AlphaFold-Multimer, el color magenta indica la diada catalítica Ser-Asp, el color azul son las cisteínas y los colores rojo (AlphaFold-Multimer) y naranja (Robetta) indican las regiones que son distintas entre ambos modelos estructurales.

Finalmente, la región más distinta entre ambos modelos es la que está comprendida entre los residuos 347 y 361, en el modelo de AlphaFold-Multimer adopta un plegamiento tipo horquilla β , en cambio para Robetta se observa una gran asa. Este cambio afecta, entre otras cosas, la distancia entre los residuos Tyr255 y Arg357, siendo ésta de 4.3 Å, correspondiente con una interacción catión- π , en el modelo de AlphaFold-Multimer y 34 Å en el modelo de Robetta. Esta interacción causa que en el modelo de AlphaFold-Multimer no exista el canal 3 del modelo de Robetta (Fig. 28).

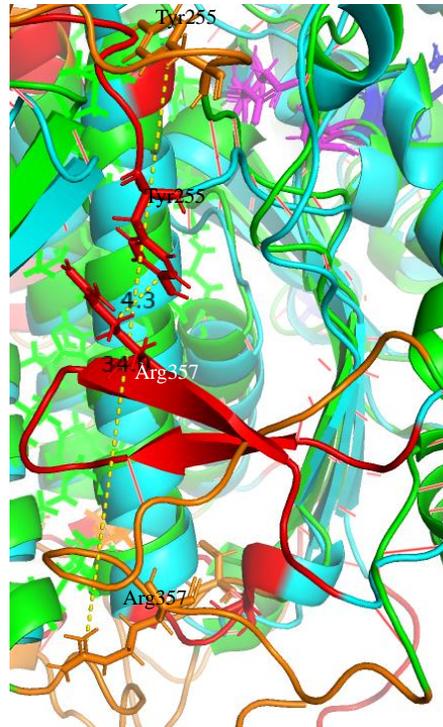
Las diferencias entre ambos modelos pueden deberse a conformaciones distintas de la proteína, una conformación abierta (Robetta) y otra cerrada (AlphaFold-Multimer) o simplemente una consecuencia de la imprecisión de la predicción de la estructura de proteínas en regiones móviles y poco conservadas, por lo que la estructura tridimensional de Hev b 7 podría tratarse de un híbrido entre ambos modelos. Algo que es un hecho es que deben de existir en algún momento canales que permitan el acceso del sustrato al sitio catalítico, de lo contrario la enzima sería inactiva, algo que no concordaría con los ensayos de actividad enzimática realizados. Por otra parte, aunque ambas estructuras coincidan en varios aspectos de la intercara del dímero, hay diferencias sustanciales como la distancia entre las hélices 280-308 de cada subunidad, la cual permitiría interacciones entre las cadenas laterales de los residuos en el caso del modelo de AlphaFold-Multimer, en contraste al modelo de Robetta. Otro aspecto de la intercara son los puentes de hidrógeno y puentes salinos en las periferias de ésta, los cuales son distintos entre los modelos, siendo estas regiones asas y pequeñas hélices poco conservadas y difíciles de predecir. Todas estas incógnitas sobre los canales hacia el sitio catalítico y el arreglo de los residuos en la intercara del dímero podrían ser

contestadas con la estructura tridimensional de Hev b 7 en presencia y ausencia de inhibidores o ligandos.

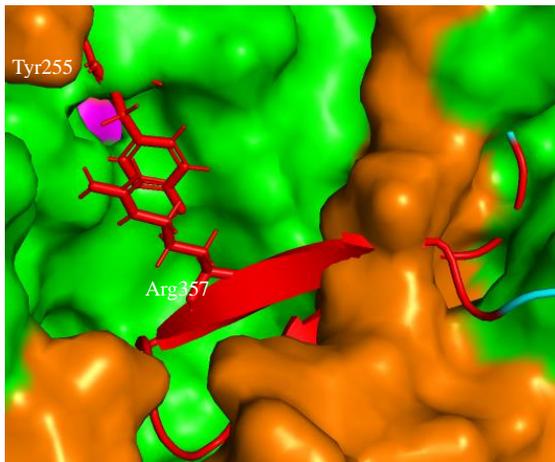
a)



b)



c)



d)

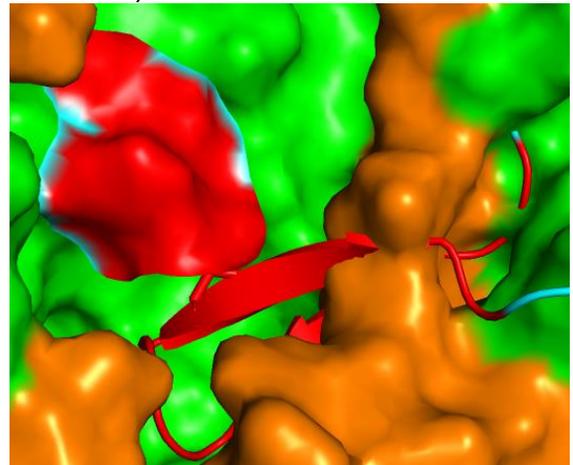


Figura 28. Comparación entre los modelos estructurales de Hev b 7 obtenido mediante Robetta y AlphaFold-Multimer, resaltando los cambios en el arreglo de la región 347-361. a) Acercamiento a la región 347-361 de la superposición de los modelos en diagrama de listones. b) Imagen anterior desde otra perspectiva comparando la distancia Tyr255-Arg347 de cada modelo. c) Acercamiento al canal 3 de la superposición del modelo de Robetta en diagrama de superficie y el modelo de AlphaFold-Multimer en diagrama de listones y los residuos Tyr255 y Arg347

representados en palos. d) Imagen anterior, pero con los residuos Tyr255 y Arg347 representados en superficie. El color verde corresponde al modelo de Robetta, el color cian corresponde al modelo de AlphaFold-Multimer, el color magenta indica la diada catalítica Ser-Asp, el color azul son las cisteínas y los colores rojo (AlphaFold-Multimer) y naranja (Robetta) indican las regiones que son distintas entre ambos modelos estructurales.

9.18 Evaluación de calidad y ortodoxia de los modelos estructurales de Hev b 7 mediante PROCHECK.

En una validación se evalúan los parámetros estereoquímicos del modelo y los compara con los datos recopilados en las bases de datos estructurales como PDB (Protein Data Bank) y CSD (Cambridge Structural Database). La validación de los modelos mediante PROCHECK arrojó varios problemas para ambos modelos, se hará énfasis en el gráfico de Ramachandran, siendo estos quien proveerá la información sobre si la conformación de los residuos es correcta.

Para el modelo de Robetta, la revisión del diagrama de Ramachandran refleja que 97.8% de los residuos se encuentran en la región permitida del Ramachandran, 1.6 % en áreas permitidas cercanas al límite con regiones prohibidas y 0.6% en área prohibidas. Los residuos en áreas prohibidas son cuatro, dos por dímero, siendo estos las Val183 de ambas subunidades, la Asn 164 y la Arg231 de la cadena A. Se observa como la Asn164 y Arg231 se encuentran en asas flexibles, al tratarse de residuos expuestos al solvente en asas flexibles lo más probable es que la conformación de estos deba corregirse para obtener un modelo mejor ajustado al gráfico de Ramachandran. Las Val183 de ambas subunidades están en la intercara del dímero, por lo que su conformación fuera del Ramachandran podría ser necesaria para el arreglo de los residuos en esta región (Fig. 29).

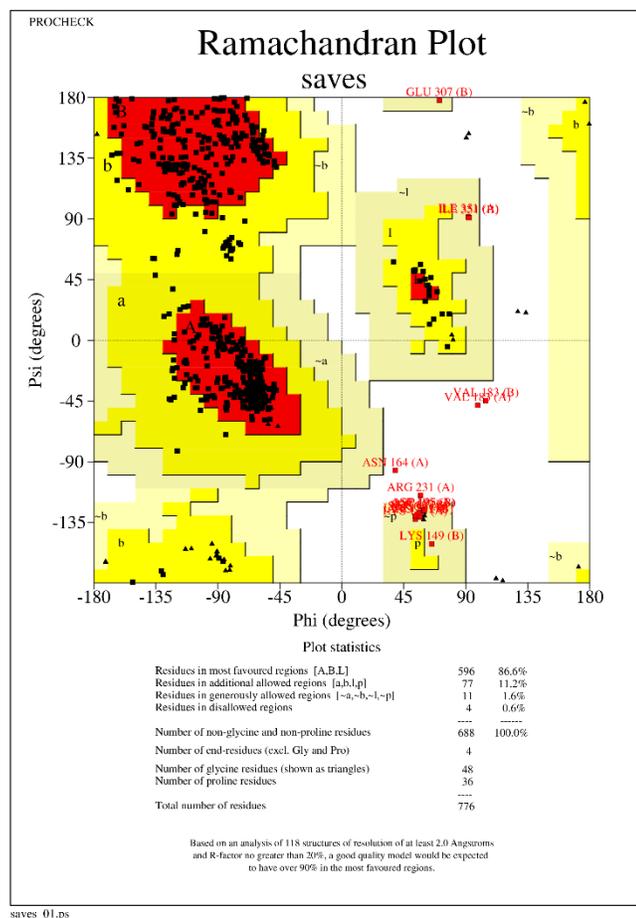


Figura 29. Diagrama de Ramachandran obtenido mediante PROCHECK para el modelo de Robetta.

En la validación del modelo de AlphaFold-Multimer se distinguen varias pruebas en las que da errores, se hará énfasis en el gráfico de Ramachandran. El 98.8 % de los residuos están en regiones permitidas, 0.6% en cercanos al límite de los permitido y 0.6% en regiones prohibidas. Los residuos con conformaciones prohibidas por el Ramachandran son las Ser61 de ambas subunidades, la Val183 de la cadena B y la Lys130 de la cadena B (Fig. 30). De estos residuos, la Lys130 se localiza en una región expuesta al solvente, por lo que se esperaría una conformación típica, este residuo podría corregirse. Por otro lado, las Ser61 y la Val183 se encuentran al interior de la proteína, siendo de hecho la Ser61 uno de los residuos catalíticos y la Val183 un residuo de la intercara, por lo que se podría esperar en estos una conformación que no se ajuste a lo esperado según el gráfico de Ramachandran. Se puede resaltar el hecho de que en ambos modelos la Val183 no posee la conformación esperada según el gráfico de Ramachandran, por lo que este residuo es probable que su particular conformación sea necesaria para su acomodo en la intercara del dímero.

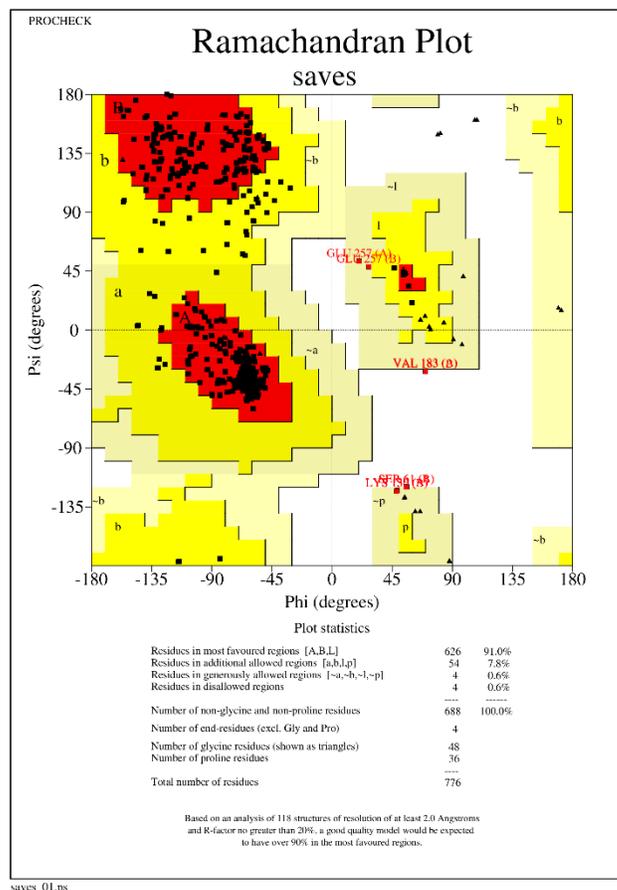


Figura 30. Diagrama de Ramachandran obtenido mediante PROCHECK para el modelo de AlphaFold-Multimer.

9.19 Evaluación de calidad y ortodoxia de los modelos estructurales de Hev b 7 mediante MOLPROBITY.

La validación de los modelos mediante MOLPROBITY arrojó varios problemas para ambos modelos, se hará énfasis en los residuos que no se encuentran en conformaciones permitidas según el diagrama de Ramachandran y las colisiones entre estos.

Para el modelo de Robetta se encontraron siete residuos fuera de la conformación permitida por el Ramachandran (Tabla 7), de los cuales sólo la Asn164A se encuentra en un asa flexible expuesta al solvente, por lo que este residuo se podría ajustar al Ramachandran. Los demás residuos se localizan en la intercara del dímero, o muy próximos a ella, por lo que su particular conformación puede ser relevante para la dimerización de Hev b 7.

Tabla 7. Residuos de aminoácidos con conformaciones fuera de lo permitido por el Ramachandran para el modelo de Robetta según MOLPROBITY

Asn164A	Val183B
Val183A	Asn229B
Asn229A	Ile351B
Ile351A	

Al analizar las colisiones en el modelo de Robetta mediante MOLPROBITY se encuentran 30 (Tabla 8), de las cuales 10 tienen distancias iguales o menores a 2 Å: Trp267A---Arg268A, Trp267B---Arg268B, Asp308B---Lys373B, Ala187A---Leu269B, Thr214A---Leu297A, Thr7A---Leu8A, Lys130B---Asp131B, Thr6B---Thr7B, Leu8A---Ala235A y Gly234A---Leu237A. La colisión Lys130B---Asp131B está en una de las asas expuestas al solvente de la proteína, alejada de los canales y la intercara, por lo que podrían reacomodarse estos residuos para evitar esta colisión. La colisión Thr214A---Leu297A se localiza al interior de la subunidad A, reacomodar estos residuos sin ocasionar nuevas colisiones y caer en regiones prohibidas del Ramachandran será algo complicado. El resto de las colisiones se localizan en la periferia de la intercara o próximas a ésta, el modificar estos residuos puede que afecte las interacciones tipo puentes de hidrógenos y puentes salinos esperados. Cabe resaltar que ninguno de los residuos en zonas prohibidas del Ramachandran (Tabla 7) poseen colisiones, excepto la Asn164A que colisiona con la Cys163A (Tabla 8). Aunque, su posición en un asa expuesta al solvente permitiría solucionar ambos problemas sin afectar la intercara o los canales ya mencionados en el apartado 9.15. Por consiguiente, las colisiones son el aspecto que se tendrá que revisar con más cuidado para el modelo de Robetta. Aun así, el *clashcore* dado por MOLPROBITY para este modelo es de 2.49, un buen valor.

Tabla 8. Colisiones entre residuos en el modelo de Robetta según MOLPROBITY.

Phe98B---His326B
Trp267A---Arg268A
Trp267B---Arg268B
Asp308B---Lys373B
Lys130A---Asp131A
Cys94A---Pro95A
Leu185A---His188A
Tyr53A---Leu378A
Asp131A---Asp131A
Ala187A---Leu269B
Glu307A---Asp308A
Cys94B---Ile97B
Asn168B---Asn168B
Ala187A---Leu269B
Thr214A---Leu297A
Thr7A---Leu8A
Lys130B---Asp131B
Cys94B---Pro95B
Thr6B---Thr7B
Leu244A---Tyr309A
Ile28B---Pro29B
Leu8A---Ala235A
Thr15B---Phe54B
Lys149B---Leu150B
Cys163A---Asn164A
Gly234A---Leu237A
Thr6A---Thr7A
Leu246A---Phe374A
Ala181B---Pro182B
Ala181A---Asp205A

Para el modelo de AlphaFold-Multimer se encontraron 16 residuos fuera de la conformación permitida por el Ramachandran (Tabla 9), de los cuales Thr3A, Thr3B, Ser5A, Ser5B, Thr6A, Thr6B, Thr7B, Leu8A, Leu8B y Thr9A se localizan en los extremos amino de ambas subunidades, siendo estas regiones flexibles y expuestas al solvente. Por ello, los residuos antes mencionados podrían corregirse sin afectar otros aspectos relevantes del modelo. Los residuos Tyr255 y Glu257 de ambas subunidades se localizan en la periferia de la intercara de dímero, por lo que su peculiar conformación puede que sea necesaria para el arreglo dimérico de Hev b 7. La Val183 se localiza en la intercara del dímero, este residuo particular se encuentra en una conformación prohibida según el gráfico de Ramachandran en ambos modelos analizados por PROCHECK y MOLPROBITY, esto sugiere que este residuo debería poseer esta conformación para acomodarse adecuadamente en la intercara del dímero.

Tabla 9. Residuos de aminoácidos con conformaciones fuera de lo permitido por el Ramachandran para el modelo de AlphaFold-Multimer según MOLPROBITY

Thr3A	Thr3B
Ser5A	Ser5B
Thr6A	Thr6B
Leu8A	Thr7B
Thr9A	Leu8B
Val183A	Val183B
Tyr255A	Tyr255B
Glu257A	Glu257

Al analizar las colisiones en el modelo de AlphaFold-Multimer mediante MOLPROBITY se encuentran 30 (Tabla 10), resaltando 14: Lys149A---Glu257B, Asp140A---Arg231A, Glu257A---Lys149B, Ile361A---Ala364A, Gly251B---Leu318B, Gly251A---Leu318A, Asp140B---Arg231B, Val134B---Ser158B, Val134A---Ser158A, Asp52A---Arg382A, Ile361B---Ala364B, Asp52B---Arg382B, Glu119B---Arg122B y Pro157B---Asp160B al poseer distancias iguales o menores a 2 Å. Las colisiones Lys149A---Glu257B, Glu257A---Lys149B, Glu119B---Arg122B y Pro157B---Asp160B se localizan la periferia de la intercara del dímero o próximas a ésta, muchos de estos residuos están parcialmente expuestos al solvente y un reacomodo de la cadena lateral podría solventar este problema. Por otra parte, las colisiones Asp140A---Arg231A, Asp140B---Arg231B, Ile361A---Ala364A, Ile361B---Ala364B, Asp52A---Arg382A y Asp52B---Arg382B se encuentran en regiones expuestas al solvente alejadas tanto de la intercara como de los posibles canales, por lo que un reacomodo de sus cadenas laterales podría evitarlas. Finalmente, las colisiones Gly251B---Leu318B, Gly251A---Leu318A, Val134B---Ser158B y Val134A---Ser158A tienen lugar en regiones no expuestas al solvente, pero alejadas de la intercara y los posibles canales, por lo que estas colisiones serán algo complicadas de resolver, aunque no afectan a la intercara del dímero o el sitio activo del modelo de Hev b 7 obtenido por AlphaFold-Multimer. Aun así, el *clashcore* dado por MOLPROBITY para este modelo es de 2.49, un buen valor.

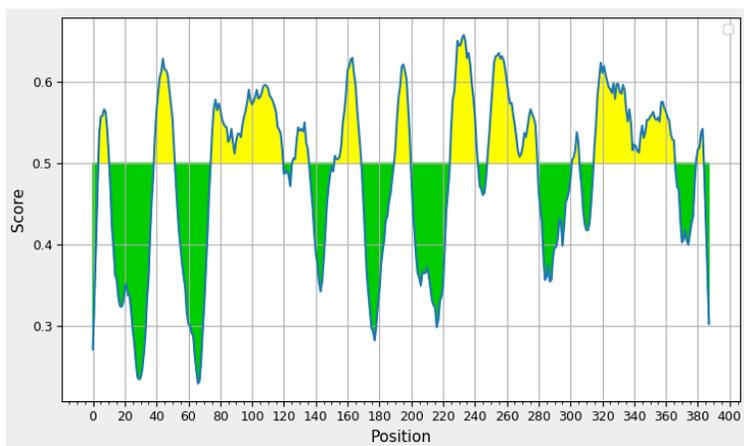
Comparando las validaciones de los modelos de Robetta y AlphaFold-Multimer mediante MOLPROBITY se observa como ambos poseen problemas tanto en sus gráficos de Ramachandran, como en las colisiones de sus residuos de aminoácidos. Sin embargo, muchos de estos problemas no afectan de manera sustancial aspectos clave de los modelos como lo son el sitio activo y la intercara del dímero, sobre todo su región central. Aun así, es notorio un mayor número de residuos con conformaciones prohibidas por el gráfico de Ramachandran y más colisiones con distancias iguales o menores a 2 Å en el modelo de AlphaFold-Multimer que en el modelo de Robetta. Aunque muchos de estos problemas pudieran ser corregidos modificando la conformación de la cadena principal y cadenas laterales de algunos residuos, otros necesitarían hacerse con un mayor cuidado. Este último dato demuestra la importancia de evaluar la calidad y ortodoxia de los modelos estructurales, incluso los obtenidos por métodos tan novedosos como AlphaFold-Multimer.

Tabla 10. Colisiones entre residuos en el modelo de AlphaFold-Multimer según MOLPROBITY.

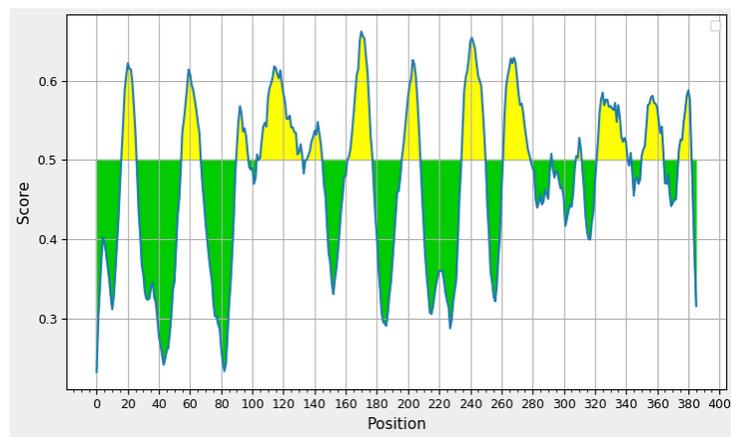
Thr264A---Ile148B
Lys149A---Glu257B
Asp140A---Arg231A
Leu216A---Met292B
Leu244A---Phe374A
Glu257A---Lys149B
Ile361A---Ala364A
Met292A---Leu216B
Leu244B---Phe374B
Lys376B---Glu380B
Gly251B---Leu318B
Leu237B---Arg243B
Lys376A---Glu380A
Gly251A---Leu318A
Asp140B---Arg231B
Lys12B---Arg385B
Ser240A---Cys306A
Val183A---Leu269B
Val134B---Ser158B
Val134A---Ser158A
Leu269A---Val183B
Asp52A---Arg382A
Ile361B---Ala364B
Asp52B---Arg382B
Leu318B---Ile339B
Lys87B---Lys87B
Glu119B---Arg122B
Ile225A---Leu237A
Pro157B---Asp160B
Ile14B---Ala235B

9.20 Predicción de epítomos lineales mediante Bepipred Linear Epitope Prediction 2.0

Con el uso de este servidor se predijeron los posibles epítomos lineales para células B de Hev b 7 y Pat17 a partir de sus secuencias de aminoácidos y se compararon entre sí (Fig. 31). Para que ocurra reactividad cruzada en el reconocimiento por anticuerpos se requiere de altos porcentajes de identidad (>80%) entre las secuencias de aminoácidos y regiones antigénicas prácticamente idénticas. La observación de los epítomos predichos revela que Hev b 7 sólo posee dos secuencias de posibles epítomos similares, más no idénticas, a las de Pat17. Esto nos indica que es poco probable que exista un epítomo de reactividad cruzada entre Hev b 7 y Pat17, lo cual puede extrapolarse al resto de patatinas.



Hev b 7.01



Pat17

Predicted peptides:

No.	Start	End	Peptide	Length
1	5	11	STLTQG	7
2	40	52	LQDLGPDARIAD	13
3	75	120	EDKKPMYQAKDIKDFYLENCPKIFPKESRDNYDPIHSIGPIYDGEY	46
4	127	136	NLLKDLTVKD	10
5	153	169	PVIFPSDDAKCNALKNA	17
6	191	200	TTEDDKNIHT	10
7	226	242	IRQNPRFIGANLTESKS	17
8	249	280	GTGKSEYKEYNADMTSKWRLYNHALYNGNSP	32
9	302	306	KSLDC	5
10	316	366	DTLTGEESSGHIATEENLQRLVEIGTELLEKQESRINLDTGRLESIPGAPT	51
11	380	384	EERKL	5

Predicted peptides:

No.	Start	End	Peptide	Length
1	17	26	TTSSTFAQLG	10
2	56	67	QEMDNNADARLA	12
3	91	98	ENNRPFAA	8
4	104	133	PFYFEHGPQIFNPSSGQILGPKYDGKYLQV	30
5	136	145	EKLGETRVHQ	10
6	162	178	PVIFTKSNLANSPELDA	17
7	197	208	HYFVTNTSNGDE	12
8	236	250	AQKDPAFASIRSLNY	15
9	262	279	TTSEFDKTYTAKEAATWT	18
10	293	293	A	1
11	309	312	ALDS	4
12	323	342	ALTGTTTMDDASEANMELL	20
13	344	344	Q	1
14	351	365	KKPVSEDNPETEEA	15
15	375	383	DRKKLRANK	9

Figura 31. Epítomos lineales predichos para Hev b 7.01 y Pat17 según el servidor Bepipred Linear Epitope Prediction, señalando los posibles epítomos comunes entre Hev b 7 y Pat17.

9.21 Predicción de epítomos conformacionales mediante DiscoTope 2.0

Con este servidor se determinaron los posibles epítomos conformacionales de Hev b 7 usando los modelos tridimensionales obtenidos mediante los servidores Robetta (Fig. 32) y AlphaFold-Multimer (Fig. 33) y se compararon entre sí.

El análisis señala un posible epítomo constituido por alrededor de 40 residuos superpuestos en una región específica de la proteína, siendo ésta próxima a los canales que conducen hacia el sitio catalítico, discutidos en el apartado 9.17. Además, este posible epítomo es común en ambos modelos, el cual consta de la hélice y el asa entre los residuos 100 y 112, el par de hélices entre 254 y 275, la pequeña asa entre 317 y 320 y el Glu331 (Fig. 32 y 33). Adicionalmente, este epítomo está expuesto al solvente en el arreglo dimérico de Hev b 7, lo que probablemente sea relevante en el entrecruzamiento de las IgE que dará inicio a la cascada de señalización que termina con la liberación de los mediadores de la inflamación en la respuesta alérgica, como ya se ha reportado en otros alérgenos (Rouvinen *et al.*, 2010; Mares-Mejía *et al.*, 2016). Debido a las características ya mencionadas de esta región antigénica, es alta la probabilidad de que este sea el epítomo responsable de la alergenicidad de Hev b 7. Además, su localización sugiere una correlación entre la actividad enzimática y la alergenicidad de Hev b 7, ya que el epítomo sería reconocido por anticuerpos con efecto neutralizante en la actividad de Hev b 7.

El resto de las regiones antigénicas predichas varían entre los modelos y se encuentran dispersas en la superficie de la proteína, algunas ocultas al localizarse en la intercara del dímero y otra en el extremo N-terminal, el cual es flexible y varía entre los modelos (Fig. 32 y 33). Por ello, estas posibles regiones antigénicas no se consideran relevantes en la alergenicidad de Hev b 7.

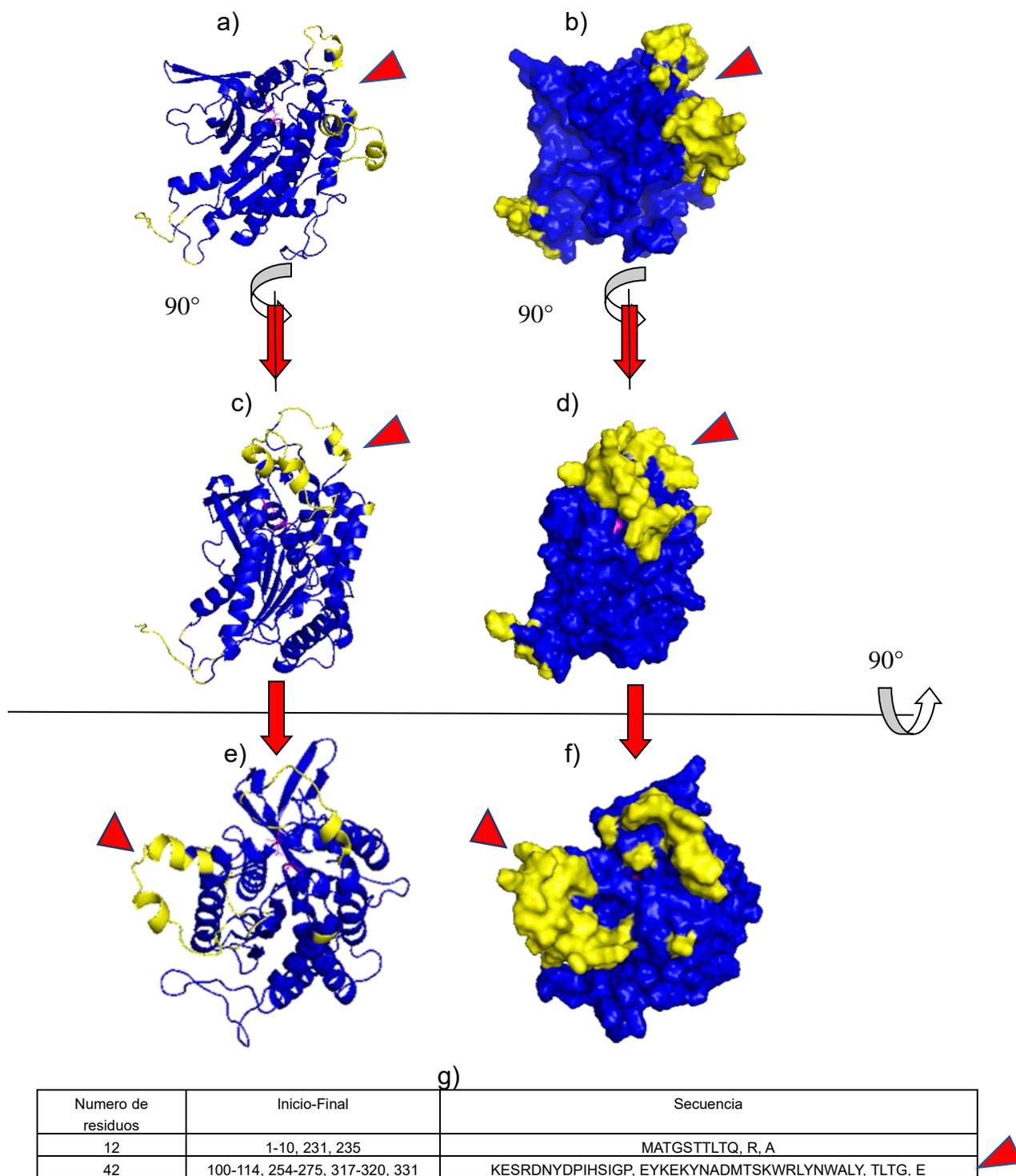
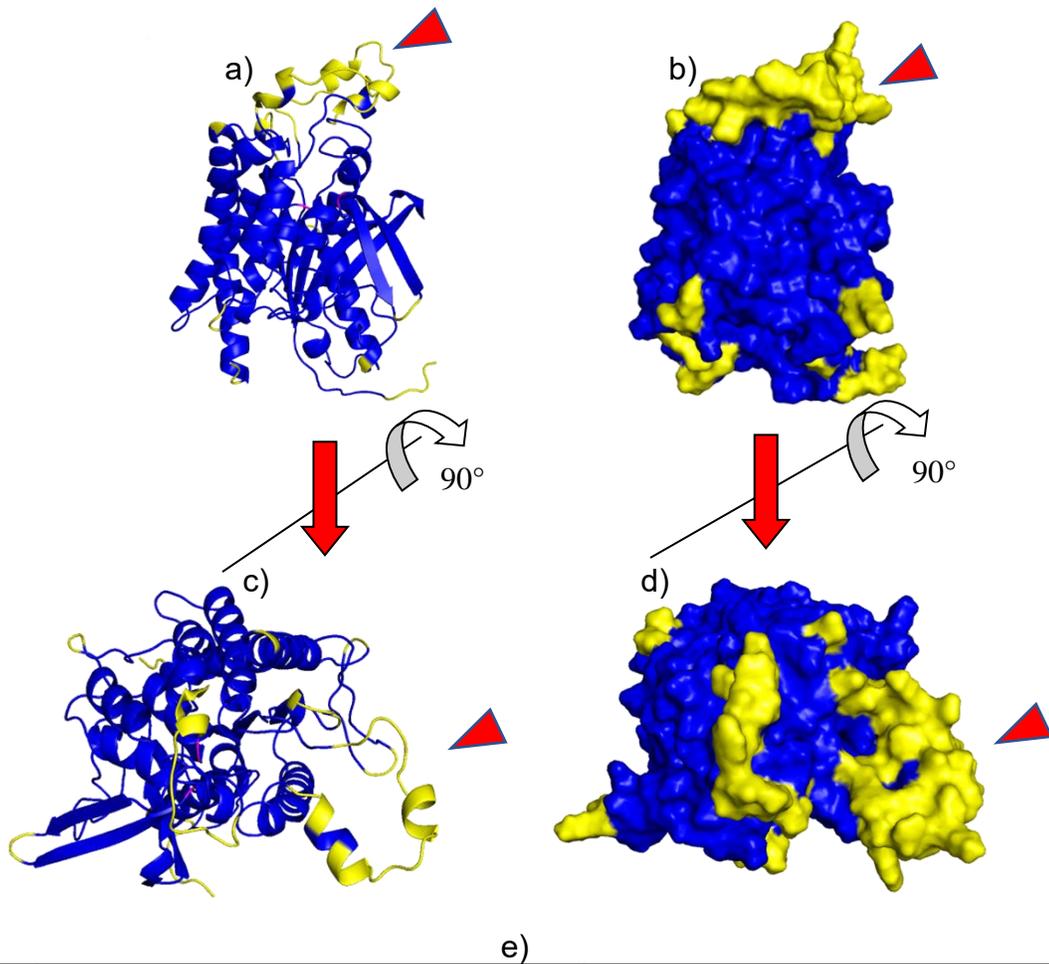


Figura 32. Epítomos conformacionales (color amarillo) predichos mediante el servidor DiscoTope 2.0 para el modelo estructural de Hev b 7 obtenido mediante Robetta. a) Vista lateral de Hev b 7 en modelo de listones. b) Vista lateral de Hev b 7 en modelo de superficie. c) Vista del canal 3 al sitio catalítico de Hev b 7 en modelo de listones. d) Vista del canal 3 al sitio catalítico de Hev b 7 en modelo de superficie. e) Vista del canal 1 al sitio catalítico de Hev b 7 en modelo de listones. f) Vista del canal 1 al sitio catalítico de Hev b 7 en modelo de superficie. g) Aminoácidos que constituyen los dos epítomos predichos para el modelo de Robetta de Hev b 7. Las flechas rojas señalan el epítomo de interés.



Numero de residuos	Inicio-Final	Secuencia
19	1-5, 75-76, 195-196, 228-230, 354-355, 362-363, 386-388	MATGS, ED, DK, QNP, DT, PG, QLK
43	100-112, 254-277, 317-321, 331	KESRDNYDPIHSI, EYKEKYNADMTSKWRLYNWALYNG, TLTGE, E

f)

Predicted peptides:

No.	Start	End	Peptide	Length
1	5	11	STTLTQG	7
2	40	52	LQQLDGPDARIAD	13
3	75	120	EDKKPMYQAKDIKDFYLENCPKIFPKESRDNYDPIHSIGPIYDGEY	46
4	127	136	NLLKDLTVKD	10
5	153	169	PVIFPSSDDAKCNALKNA	17
6	191	200	TTEDDKNIHT	10
7	226	242	IRQNPRFIGANLTESKS	17
8	249	280	GTGKSEYKEKYNADMTSKWRLYNWALYNGNSP	32
9	302	306	KSLDC	5
10	316	366	DTLTGEESSGHIAATEENLQRLVEIGTELLEKQESRINLDTGRLESIPGAPT	51
11	380	384	EERKL	5

Figura 33. Epítomos conformacionales (color amarillo) predichos mediante el servidor DiscoTope 2.0 para el modelo estructural de Hev b 7 obtenido mediante AlphaFold-Multimer y comparados con los epítomos lineales predichos por Bepipred. Las flechas

rojas señalan los epítomos comunes entre ambos modelos y los predichos por Bepipred. a) Vista lateral del modelo de Hev b 7 en listones. b) Vista lateral del modelo de Hev b 7 en superficie. c) Vista tras giro de 90° del modelo de Hev b 7 en listones. d) Vista tras giro de 90° del modelo de Hev b 7 en superficie. e) Aminoácidos que constituyen los dos epítomos predichos para el modelo de AlphaFold-Multimer de Hev b 7. f) Epítomos lineales predichos por Bepipred, señalando aquellos que coinciden con los epítomos conformacionales predichos por DiscoTope para ambos modelos estructurales. Las flechas rojas señalan el epítomo de interés.

9. Conclusiones

La proteína Trx-rHev b 7 forma cuerpos de inclusión al ser expresada en *E. coli* que pueden ser solubilizados mediante un protocolo de sonicación en amortiguadores de baja fuerza iónica y purificada mediante un paso de cromatografía de afinidad a Ni^{2+} , obteniéndose la proteína pura, plegada, activa y monodispersa con rendimientos de hasta 100 mg por cada litro de cultivo.

rHev b 7 es una fosfolipasa, como otros miembros de la familia de las patatinas. Esto último debido a que los ensayos de actividad enzimática sugieren una preferencia por la suspensión de yema de huevo, rica en fosfolípidos, en lugar del sustrato sintético palmitato de p-nitrofenilo. Su actividad con este último sustrato está en el mismo orden de magnitud que la reportada para otras patatinas.

Los ensayos de reconocimiento de IgE en sueros de individuos alérgicos al látex mediante ELISA sugieren una mayor prevalencia alérgica a Hev b 7 en la población de trabajadores del área de salud alérgicos al látex de la Ciudad de México. Algunos niños también presentaron IgE que reconocen a este alérgeno, por lo que un estudio de prevalencia en ambas poblaciones con un mayor número de sueros es importante.

Hev b 7 posee un puente disulfuro Cys125-Cys175 estabilizándola, próximo a su diada catalítica Ser61-Asp205, según los modelos de Robetta y AlphaFold-Multimer.

Hev b 7 forma un dímero obligado con un área de intercara mayor a 3000 \AA^2 y un 44.7% de residuos hidrofóbicos en ésta, algo en lo que coinciden los modelos de Robetta y AlphaFold-Multimer.

La comparación entre los dos modelos teóricos de Hev b 7 parece indicar que el obtenido con Robetta presenta una conformación abierta, mientras que el modelo de AlphaFold-Multimer una conformación cerrada. Esto debido a la presencia o ausencia de canales hacia el sitio catalítico en estos modelos. Otra posible explicación es que la estructura tridimensional de Hev b 7 sea un híbrido entre ambos modelos que no lograron predecir con total precisión la conformación de las regiones menos conservadas del alérgeno, en el cual deben existir los canales ya mencionados para la función enzimática de Hev b 7.

Los modelos estructurales de Hev b 7 permiten proponer en conjunto un epítipo conformacional que consta de la hélice y el asa entre los residuos 100 y 112, el par de hélices entre 254 y 275, la pequeña asa entre 317 y 320 y el Glu331. Su localización es próxima al sitio activo de la enzima, indicando una posible correlación entre la actividad enzimática de Hev b 7 y su alergenidad.

10. Referencias

- Ali, M. H.; Imperiali, B. Protein oligomerization: How and why. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. **2005**, 13(17), 5013-5020. doi: 10.1016/j.bmc.2005.05.037
- Andrews, D. L.; Beames, B.; Summers, M. D.; Park, W. D. Characterization of the lipic acyl hydrolase activity of the major potato (*Solanum tuberosum*) tuber protein, patatin, by cloning and abundant expression in a baculovirus vector. *Biochemical Journal*. **1988**, 252(1), 199-206. doi: 10.1042/bj2520199
- Barlow, D. J.; Edwards, M. S.; Thornton, J. M. Continuous and discontinuous protein antigenic determinants. *Nature*. **1986**, 322(6081), 747-748. doi: 10.1038/322747a0
- Beezhold, D. H.; Sussman, G. L.; Kostyal, D. A.; Chang, N. Identification of a 46-kD latex protein allergen in health care workers. *Clinical & Experimental Immunology*. **1994**, 98, 408-413. doi: 10.1111/j.1365-2249.1994.tb05505.x
- Beezhold, D. H.; Sussman G. L.; Liss G. M.; Chang N. Latex allergy can induce clinical reactions to specific foods. *Clinical and Experimental Allergy*. **1996**, 26, 416-422. doi: 10.1111/j.1365-2222.1996.tb00557.x
- Burke, J. E.; Dennis, E. A. Phospholipase A₂ structure/function, mechanism, and signalling. *Journal of Lipid Research*. **2009**, 50, S237-S242. doi: 10.1194/jlr.R800033-JLR200
- Buss, Z. S.; Fröde, T. S. Latex allergen sensibilization and risk factors due to glove use by health care workers at public health units in Florianopolis, Brazil. *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology*. **2007**, 17(1), 27-33.
- Chhetri, G.; Kalita, P.; Tripathi, T. An efficient protocol to enhance recombinant protein expression using ethanol in *Escherichia coli*. *MethodsX*. **2015**, 2, 385-391. doi: 10.1016/j.mex.2015.09.005
- Colis-Torres, A.; Neri-Castro, E.; Strickland, J. L.; Olvera-Rodríguez, A.; Borja, M.; Calvete, J.; Jones, J.; Parkinson, C. L.; Bañuelos, J.; López de León, J.; Alagón, A. Intraspecific venom variation of Mexican West Coast Rattlesnakes (*Crotalus basiliscus*) and its implications for antivenom production. *Biochimie*. **2022**, 192, 111-124. doi: 10.1016/j.biochi.2021.10.006
- Corsini, L.; Hothorn, M.; Scheffzek, K.; Sattler, M.; Stier, G. Thioredoxin as a fusion tag for carrier-driven crystallization. *Protein Science*. **2008**, 17(12), 2070–2079. doi: 10.1110/ps.037564.108
- Eom, G. T.; Lee, S. H.; Song, B. K.; Chung, K. W.; Kim, Y. W.; Song, J. K. High-level extracellular production and characterization of *Candida antarctica* lipase B in *Pichia pastoris*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. **2013**, 116(2), 165-170. doi: 10.1016/j.jbiosc.2013.02.016

Evans, R.; O'Neill, M.; Pritzel, A.; Antropova, N.; Senior, A. W.; Green, T.; Židek, A.; Bates, R.; Blackwell, S.; Yim, J.; Ronneberger, O.; Bodenstein, S.; Zielinski, M.; Bridgland, A.; Potapenko, A.; Cowie, A.; Tunyasuvunakool, K.; Jain, R.; Clancy, E.; Kohli, P.; Jumper, J.; Hassabis, D. Protein complex prediction with AlphaFold-Multimer. *BioRxiv*. **2021**
doi: 10.1101/2021.10.04.463034

Gasteiger, E.; Hoogland, C.; Gattiker, A.; Wilkins, M. R.; Appel, R. D.; Bairoch, A. Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. *The Proteomics Protocols Handbook*. **2005**, 571-607.

German, D. F. Latex Allergy. *Allergy and Asthma*. **2016**, 26, 397-405. doi: 10.1007/978-3-319-30835-7_26

Gould, H. J.; Sutton, B. J.; Beavil, A. J.; Beavil, R. L.; McCloskey, N.; Coker, H. A.; Fear, D.; Smurthwaite, L. The Biology of IgE and the Basis of Allergic Disease. *Annual Review of Immunology*. **2003**, 21, 579-628. doi: 10.1146/annurev.immunol.21.120601.141103

Hirschberg, H. J.; Simons, J. W.; Dekker, N.; Egmond, M. R. Cloning, expression, purification and characterization of patatin, a novel phospholipase A. *European Journal of Biochemistry*. **2001**, 268(19), 5037–5044. doi: 10.1046/j.0014-2956.2001.02411.x

Höfgen, R.; Willmitzer, L. Biochemical and genetic analysis of different patatin isoforms expressed in various organs of potato (*Solanum tuberosum*). *Plant Science*. **1990**, 66(2), 221-230. doi: 10.1016/0168-9452(90)90207-5

Jekela, P.; Hofsteenge, J.; Beintema, J. The patatin-like protein from the latex of *Hevea brasiliensis* (Hev b 7) is not a vacuolar protein. *Phytochemistry*. **2003**, 63, 517–522.
doi: 10.1016/S0031-9422(03)00224-3

Jespersen, M. C.; Peters, B.; Nielsen, M.; Marcatili, P. BepiPred-2.0: improving sequence-based B-cell epitope prediction using conformational epitopes. *Nucleic Acids Research*. **2017**, 45(1), 24–29. doi: 10.1093/nar/gkx346

Jumper, J.; Evans, R.; Pritzel, A.; Green, T.; Figurnov, M.; Ronneberger, O.; Hassabis, D. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature*. **2021**, 596(7873), 583-589.
doi: 10.1038/s41586-021-03819-2

Kringelum, J. V.; Lundegaard, C.; Lund, O.; Nielsen, M. Reliable B cell epitopes: impacts of method development and improved benchmarking. *PLoS Computational Biology*. **2012**, 8(12).
doi:10.1371/journal.pcbi.1002829

Krissinel, E.; Henrick, K. Inference of macromolecular assemblies from crystalline state. *Journal of Molecular Biology*. **2007**, 372, 774-797. doi: 10.1016/j.jmb.2007.05.022

Kostyal, D. A.; Hickey, V. L.; Noti, J. D.; Sussman, G. L.; Beezhold, D. H. Cloning and characterization of a latex allergen (*Hev b 7*): homology to patatin, a plant PLA₂. *Clinical & Experimental Immunology*. **1998**, 112, 355-362. doi: 10.1046/j.1365-2249.1998.00596.x

Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. **1970**, 227(5259), 680-685. doi: 10.1038/227680a0

- Laskowski, R. A.; MacArthur, M. W.; Moss, D. S.; Thornton, J. M. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *Journal of Applied Crystallography*. **1993**, 26(2), 283-291. doi: 10.1107/S0021889892009944
- LaVallie, E. R.; Lu, Z.; Diblasio-Smith, E. A.; Collins-Racie, L. A.; McCoy, J. M. Thioredoxin as a fusion partner for production of soluble recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Methods in Enzymology*. **2000**, 326, 322–340. doi: 10.1016/s0076-6879(00)26063-1
- Liebisch, G.; Fahy, E.; Aoki, J.; Dennis, E. A.; Durand, T.; Ejsing, C. S.; Fedorova, M.; Feussner, I.; Griffiths, W. J.; Köfeler, H.; Merrill, A. H.; Jr, Murphy, R. C.; O'Donnell, V. B.; Oskolkova, O.; Subramaniam, S.; Wakelam, M.; Spener, F. Update on LIPID MAPS classification, nomenclature, and shorthand notation for MS-derived lipid structures. *Journal of Lipid Research*. **2020**, 61(12), 1539–1555. doi: 10.1194/jlr.S120001025
- Lopes, D.B.; Fraga, L. P.; Fleuri, L. F.; Macedo, G. A. Lipase and esterase-to what extent can this classification be applied accurately. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. **2011**, 31(3), 608-613. doi: 10.1590/S0101-20612011000300009
- Mares-Mejía, I.; Martínez-Caballero, S.; Garay-Canales, C.; Cano-Sánchez, P.; Torres-Larios, A.; Lara-González, S.; Ortega, E.; Rodríguez-Romero, A. Structural insights into the IgE mediated responses induced by the allergens Hev b 8 and Zea m 12 in their dimeric forms. *Scientific Reports*. **2016**, 6, 32552. doi: 10.1038/srep32552
- Micsonai, A.; Wien, F.; Bulyáki, É.; Kun, J.; Moussong, É.; Lee, Y. H.; Goto, Y.; Réfrégiers, M.; Kardos, J. BeStSel: a web server for accurate protein secondary structure prediction and fold recognition from the circular dichroism spectra. *Nucleic Acids Research*. **2018**, 46(1), 315–322. doi: 10.1093/nar/gky497
- Orozco, S.; Chong, L. E.; Penagos, M.; Huerta, J. G.; Reyes, C. A.; Rodríguez, A. Utilidad de las pruebas cutáneas por punción (prick test) con extracto de guante, extracto crudo de látex y proteínas purificadas (pseudoheveína, heveína, forma molecular de la heveína y heveína modificada químicamente) en el diagnóstico de alergia al látex. Estudio de fase II. *Alergia, Asma e Inmunología Pediátricas*. **2006**, 15(1), 6-29.
- Pahoja, V. M.; Sethar, M. A. A Review of Enzymatic Properties of Lipase in Plants, Animals and Microorganisms. *Journal of Applied Sciences*. **2002**, 2(4), 474-484. doi: 10.3923/jas.2002.474.484
- Pimentel, E. V.; Jenny, G.; Salazar, E. Prevalencia de la alergia y de la sensibilización al látex en el estudiante de postgrado de la Facultad de Odontología de la UCV. *Acta Odontológica Venezolana*. **2011**, 49(3).
- Posch, A.; Chen, Z.; Raulf-Heimsoth, M.; Baur, X. Latex allergens. *Clinical & Experimental Allergy*. **1998**, 28, 134-140. doi: 10.1046/j.1365-2222.1998.00181.x
- Schroeder, H.; Cavacini, L. Structure and function of immunoglobulins. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. **2010**, 125(2), 41-52. doi: 10.1016/j.jaci.2009.09.046

- Rydel, T. J.; Williams, J. M.; Krieger, E.; Moshiri, F.; Stallings, W. C.; Brown, S. M.; Pershing, J. C.; Purcell, J. P.; Alibhai, M. F. The Crystal Structure, Mutagenesis, and Activity Studies Reveal that Patatin Is a Lipid Acyl Hydrolase with a Ser-Asp Catalytic Dyad. *Biochemistry*. **2003**, 42, 6696-6708. doi: 10.1021/bi027156r
- Schneider, C.; Rasband, W.; Eliceiri, K. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*. **2012**, 9, 671–675. doi: 10.1038/nmeth.2089
- Seppälä, U.; Alenius, H.; Turjanmaa, K.; Reunala, T.; Palosuo, T.; Kalkkinen, N. Identification of patatin as a novel allergen for children with positive skin prick test responses to raw potato. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. **1999**, 103(1), 165-171. doi: 10.1016/S0091-6749(99)70541-5
- Seppälä, U.; Palosuo, T.; Kalkkinen, N.; Seppälä, U.; Ylitalo, L.; Reunala, T.; Turjanmaa, K.; Reunala, T. IgE reactivity to patatin-like latex allergen, Hev b 7, and to patatin of potato tuber, Sol t 1, in adults and children allergic to natural rubber latex. *Allergy*. **2000**, 55, 266-273. doi: 10.1034/j.1398-9995.2000.00392.x
- Rouvinen, J.; Jänis, J.; Laukkanen, M. L.; Jylhä, S.; Niemi, M.; Päivinen, T.; Mäkinen-Kiljunen, S.; Haahtela, T.; Söderlund, H.; Takkinen, K. Transient dimers of allergens. *PLoS One*. **2010**, 5(2), e9037. doi: 10.1371/journal.pone.0009037
- Simossis, V. A.; Heringa, J. PRALINE: a multiple sequence alignment toolbox that integrates homology-extended and secondary structure information. *Nucleic Acids Research*. **2005**, 33, 289-294. doi: 10.1093/nar/gki390
- Song, Y.; DiMaio, F.; Wang, R. Y.; Kim, D.; Miles, C.; Brunette, T. J.; Thompson, J.; Baker, D. High resolution comparative modeling with RosettaCM. *Structure*. **2013**, 21(10), 1735-1742. doi: 10.1016/j.str.2013.08.005
- Sowka, S.; Hafner, C.; Radauer, C.; Focke, M.; Brehler, R.; Astwood, J.; Arif, S.; Kanani, A.; Sussman, G.; Scheiner, O.; Beezhold, D.; Breiteneder, H. Molecular and immunologic characterization of new isoforms of the *Hevea brasiliensis* latex allergen Hev b 7: Evidence of no cross-reactivity between Hev b 7 isoforms and potato patatin and proteins from avocado and banana. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. **1999**, 104(6), 1302-1310. doi:10.1016/S0091-6749(99)70028-X
- Sowka, S.; Wagner, S.; Krebitz, M.; Arija-Mad-Arif, S.; Yusof, F.; Kinaciyan, T.; Brehler, R.; Scheiner, O.; Breiteneder, H. cDNA cloning of the 43kDa latex allergen Hev b 7 with sequence similarity to patatins and its expression in the yeast *Pichia pastoris*. *European Journal of Biochemistry*. **1998**, 255, 213-219. doi: 10.1046/j.1432-1327.1998.2550213.x
- Tan, N. H.; Tan, C. S. Acidimetric assay for phospholipase A using egg yolk suspension as substrate. *Analytical Biochemistry*. **1988**, 170(2), 282-288. doi: 10.1016/0003-2697(88)90632-x
- Tham, E. H.; Leung, D. How Different Parts of the World Provide New Insights Into Food Allergy. *Allergy, Asthma & Immunology Research*. **2018**, 10(4), 290–299. doi: 10.4168/aaair.2018.10.4.290

Tochep, P. Visión panorámica del sistema inmune. *Revista Médica Clínica Las Condes*. **2012**, 23(4), 446-457. doi: 10.1016/S0716-8640(12)70335-8

Valenta, R.; Hochwallner, H.; Linhart, B.; Pahr, S. Food Allergies: The Basics. *Gastroenterology*. **2015**, 148, 1120-1131. doi: 10.1053/j.gastro.2015.02.006

Varadi, M.; Anyango, S.; Deshpande, M.; Nair, S.; Natassia, C.; Yordanova, G.; Velankar, S. AlphaFold Protein Structure Database: Massively expanding the structural coverage of protein-sequence space with high-accuracy models. *Nucleic Acids Research*. **2022**, 50(D1), D439-D444. doi: 10.1093/nar/gkab1061

Vélez-Mendez, M. Detección y tratamiento perioperatorio de la alergia al látex. *Revista Mexicana de Anestesiología*. **2015**, 38(1), 270-272.

Wagner, B.; Buck, D.; Hafner, C.; Sowka, S.; Niggemann, B.; Scheiner, O.; Breiteneder, H. Hev b 7 is a *Hevea brasiliensis* protein associated with latex allergy in children with spina bifida. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. **2001**, 108(4), 621-627. doi: 10.1067/mai.2001.118289

Wijeyesakere, S. J.; Richardson, R. J.; Stuckey, J. A. Crystal structure of patatin-17 in complex with aged and non-aged organophosphorus compounds. *PLoS One*. **2014**, 9(9), e108245. doi: 10.1371/journal.pone.0108245

Williams, C. J.; Headd, J. J.; Moriarty, N. W.; Prisant, M. G.; Videau, L. L.; Deis, L. N.; Verma, V.; Keedy, D. A.; Hintze, B. J.; Chen, V. B.; Jain, S.; Lewis, S. M.; Arendall 3rd, W. B.; Snoeyink, J.; Adams, P. D.; Lovell, S. C.; Richardson, J. S.; Richardson, D. C. MolProbity: More and better reference data for improved all-atom structure validation. *Protein Science*. **2018**, 27(1), 293–315. doi: 10.1002/pro.3330

Wood, P. L.; Muir, W.; Christmann, U.; Gibbons, P.; Hancock, C. L.; Poole, C. M.; Emery, A. L.; Poovey, J. R.; Hagg, C.; Scarborough, J. H.; Christopher, J. S.; Dixon, A. T.; Craney, D. J. Lipidomics of the chicken egg yolk: High-resolution mass spectrometric characterization of nutritional lipid families. *Poultry Science*. **2021**, 100(2), 887-899. doi: 10.1016/j.psj.2020.11.020

Yin, Y. C.; Li, H. Q.; Wu, X. S. Refolding and Simultaneous Purification of Recombinant *Serratia marcescens* Lipase by One-Step Ultrasonication Process. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. **2020**, 191, 1670-1683. doi: 10.1007/s12010-019-03172-1

Durante esta maestría se realizó la publicación del artículo de divulgación:
Ramírez y Rodríguez *Mens. Bioquim.* 46 (2022): 87-102

Comité Editorial: González Andrade, M.; Hernández Alcántara, G.; Martínez González, J.J.;
Meraz Cruz, N.; Ramírez Silva, L.H. y Vilchis Landeros, M.M.
© ISSN-0188-137X

Facultad de Medicina



Versión electrónica en <http://bq.facmed.unam.mx/tab>

MENSAJE BIOQUÍMICO

Mens. Bioquim. 46 (2022) 87-102



Memoria del XLIX Taller de Actualización Bioquímica, Facultad de Medicina; UNAM

Cristalografía de macromoléculas.

Macromolecular crystallography.

Ramírez Rodríguez, Miguel Alejandro¹ y Rodríguez Romero, Adela^{1*}.

1. Laboratorio Nacional de Estructura de Proteínas-Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México.

*Correspondencia: Instituto de Química, Circuito exterior s/n Circuito de la Investigación Científica, Ciudad Universitaria., Coyocacán,
CDMX, México, C.P. 04510. Tel: +52(55)56224568, adela@unam.mx
