



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**Bases biofísicas y estructurales de la interacción
de la profilina con una IgE monoclonal murina**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctor en Ciencias

PRESENTA:

Benjamín García Ramírez

TUTOR PRINCIPAL

Dra. Adela Rodríguez Romero

[Instituto de Química](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dr. Enrique Ortega Soto

[Instituto de Investigaciones Biomédicas](#)

Dr. Ruy Pérez Montfort

[Instituto de Fisiología Celular](#)

Ciudad de México. Agosto, 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.

García Ramírez Benjamín
Estudiante de Doctorado en Ciencias Bioquímicas
Presente

Los miembros del Subcomité Académico en reunión ordinaria del **15 de agosto** del presente año, conocieron su solicitud de asignación de **JURADO DE EXAMEN** para optar por el grado de **Doctor en Ciencias**, con la réplica de la tesis "**Bases biofísicas y estructurales de la interacción de la profilina con una IgE monoclonal murina**", dirigida por el Dr. **Rodríguez Romero Adela**.

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

PRESIDENTE	Lilian González Segura (FQ)
SECRETARIO	Luis Vaca Domínguez (IFC)
VOCAL	Martha Pedraza Escalona (UDIBI ENCB IPN)
VOCAL	Baltazar Becerril Luján (IBT)
VOCAL	Silvia Andrea Moreno Mendieta (IIBo)

A LOS MIEMBROS DEL JURADO:

Es obligación de los tutores de este programa participar en éstas y otras actividades académicas encomendadas por nuestro Comité Académico. Sin embargo, en caso de que tenga un impedimento académico o de salud para cumplir con esta encomienda, es muy importante contar con su respuesta (Formato anexo) en un plazo no mayor a una semana.

Tome en cuenta que usted tiene **30 (Doctorado)** días hábiles para emitir su voto con las rondas de revisión que considere necesarias.

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

Atentamente
"POR MI RAZA, HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 22 de agosto de 2022
COORDINADORA



Dra. Claudia Lydia Treviño Santa Cruz

Agradecimientos

A mi familia por el apoyo incondicional a lo largo de estos años.

A la Dra. Adela Rodríguez Romero, por su ayuda incondicional, consejos, enseñanzas y su confianza.

Al Dr. Enrique Ortega Soto, por su apoyo absoluto y sus enseñanzas para realizar este trabajo.

Al Dr. Ruy Pérez Montfort, por su consejos y enseñanzas a lo largo del doctorado.

A la Dra. Annia Rodríguez Hernandez por su apoyo, consejos y enseñanzas

Al Dr. Alfredo Torres Larios, por su apoyo y colaboración.

A la Dra. Claudia Angélica Garay Canales, por su gran apoyo.

Al Dr. Israel Mares Mejía, por su apoyo, consejos y enseñanzas.

A la M. en C. Georgina Espinoza Pérez por su apoyo.

A la Dra. Patricia Cano Sánchez por su ayuda en el area de biología molecular.

Al CONACYT por la beca doctoral 434885

Al LANEM-IQ-UNAM, por su infraestructura para realizar este proyecto, desde la cristalización, colecta de datos y resolución de estructuras.

A Jean Jaconcik y Vivian Stojanoff en la línea de luz 17-IS-1 (AMX) para la colecta de datos de rayos X. El trabajo en las líneas de luz AMX 17-ID-1 cuenta con el apoyo de los Institutos Nacionales de Salud, el Instituto Nacional de Ciencias Médicas Generales (P41GM111244) y la Oficina de Investigación Biológica y Ambiental del DOE (KP1605010) y la Fuente de luz de sincrotrón nacional II en el Laboratorio Nacional Brookhaven que cuenta con el apoyo de la Oficina de Ciencias Energéticas Básicas del DOE con el número de contrato DE-SC0012704 (KC0401040).

A la Dra. Lilian González Segura, al Dr. Luis Vaca Domínguez, a la Dra. Martha Pedraza Escalona, al Dr. Baltazar Becerril Luján y a la Dra. Silvia Andrea Moreno Mendieta, por sus comentarios que ayudaron a mejorar y enriquecer esta tesis.

Contenido

Abreviaturas	1
Abstract	2
Resumen	3
Introducción	4
Profilinas	4
Alergia	5
Tipos de alergias y síntomas.	5
Estructura de la IgE y el FcεRI	6
Glicosilaciones	9
Antecedentes	10
Justificación	14
Hipótesis	14
Objetivo	14
Objetivo Particulares	15
Metodología	16
Producción y purificación de la IgE 2F5	16
Cinética de fragmentación de la IgE 2F5 con papaína	16
Pruebas cualitativas de unión a profilina	17

Fragmentación a mayor escala de la IgE con papaína_____	17
Purificación del fragmento Fab/IgE 2F5 _____	17
Sobreexpresión y purificación de las profilinas_____	18
Diseño y purificación de los mutantes rZea m 12 E128D y E128D-G98N ____	19
Cinética de sobreexpresión de las mutantes rZea m 12-E128D y rZea m 12-E128D-G98N _____	19
Efecto del tratamiento térmico en el espectro de dicroísmo circular (DC) rHev b 8 _____	20
ELISA, estabilidad térmica, especificidad y reactividad cruzada de la IgE 2F5	20
Ensayos de Western blot _____	22
Ensayos de unión del Fab/IgE 2F5 con la profilina rHev b 8 mediante interferometría de biocapa (BLI) _____	22
Cristalización del complejo Fab/IgE 2F5-rHev b 8 _____	23
Cristalización del Fab/IgE 2F5 _____	24
Determinación de la estructura tridimensional del complejo Fab/IgE 2F5 con Hev b 8 y afinamiento _____	25
Producción y purificación de las IgG 1B4 y 2D10 _____	26
Tinción de glicoproteínas _____	27
MALDI-TOF _____	27
Resultados y Discusión _____	28
Purificación de la IgE 2F5_____	28

La IgE 2F5 reconoce la profilina rHev b 8 después de dos tratamientos de desnaturalización _____	29
Fragmentación de la IgE 2F5 _____	33
Purificación del fragmento Fab/IgE 2F5 _____	35
Cristalización del complejo Fab/IgE 2F5-Hev b 8 _____	37
Estructura cristalográfica del complejo Fab/IgE 2F5-rHev b 8 _____	39
Cristalización del Fab/IgE 2F5 _____	42
La IgE 2F5 no reconoce mediante ajuste inducido a Hev b 8 _____	44
Parátopo de la IgE 2F5 _____	47
Epítopo que reconoce la IgE 2F5 _____	47
Análisis de la interacción entre el Fab/IgE 2F5 y rHev b 8 _____	48
La afinidad del Fab/IgE 2F5 por rHev b 8 _____	50
La IgE 2F5 está glicosilada _____	51
Masa Molecular del Fab/IgE 2F5 _____	51
Pruebas de reactividad cruzada de la IgE 2F5 _____	52
Generando reactividad cruzada _____	53
Cinéticas de sobreexpresión y purificación de las mutantes rZea m 12-E128D y rZea m 12-E128D-G98N _____	55
Conclusiones _____	59
Perspectivas _____	61

Referencias _____ **62**

Anexo _____ **70**

Índice de Figuras y Tablas

- Fig. 1.** Representación de la estructura cristalográfica de la profilina del árbol del hule (*Hevea brasiliensis*), en rojo se muestran las α -hélices y en amarillo las hebras β (PDB ID: 5FDS)..... 4
- Fig. 2.** Modelo del complejo tetramérico del $Fc\epsilon RI$ donde se muestran las cadenas α , β y γ . Tomado de (M. Niemi et al., 2007) 7
- Fig. 3.** Modelo esquemático del reconocimiento de un alérgeno dimérico por el receptor $Fc\epsilon RI$. Tomado de (M. Niemi et al., 2007)..... 7
- Fig. 4.** Sitios de corte de una IgE con papaína (líneas rojas), se forman los fragmentos Fab y Fc, o Fab/c y pFc (líneas azules)..... 9
- Fig. 5.** Glicosilaciones en las inmunoglobulinas E. **A.** Los puntos rojos y los azules representan las Asn donde están unidos los glicanos de tipo complejo y tipo oligomanosa, respectivamente. **B.** Composición del glicano unido a Asn de tipo complejo en IgE. Consiste en un biantenado de ácido siálico y galactosa unidos a un núcleo de trimanosa, el cual a su vez se une al núcleo de quitobiosa (GlcNAc2) con una fucosa **C.** La composición del glicano de tipo oligomanosa en la IgE consiste comúnmente de un núcleo de quitobiosa (GlcNAc2) que une 5 manosas sin un orden específico; sin embargo, se ha informado un rango de 4 a 8 manosas (K.-T. C. Shade & Anthony, 2013). Abreviaturas: N, GlcNAc; M, Manosa; F, Fucosa; G, Galactosa; S, ácido Siálico..... 10
- Fig. 6.** Alineamientos. **A.** Superposición estructural entre la profilina de *Hevea brasiliensis* (Hev b 8) (rosa) y la profilina de *Zea mays* (Zea m 12) (cian), en azul se resaltan los residuos 37 al 52, que corresponden al probable epítipo reconocido por la IgE 2F5. **B.** Alineamiento de la secuencia de aminoácidos entre la profilina de *Hevea brasiliensis* (Hev b 8) y la profilina de *Zea m 12* (Zea m 12), la conservación de los residuos se muestra en tonalidades del azul al rojo, siendo el rojo los residuos más conservados. La identidad entre ambas profilinas es de 79.4%..... 12

Fig. 7. Purificación de la IgE 2F5 a partir del sobrenadante de la hibridoma mediante la columna Affi-gel-15-rHev b 8, y SDS-PAGE al 12% de la IgE en condiciones no reductoras (NR) y reductoras (R), marcador de peso molecular high range (Biorad), tinción con Coomasie G250. 29

Fig. 8. Estabilidad de la profilina rHev b 8. **A.** Espectros de diroísmo circular (CD) en la región lejana del UV a diferentes temperaturas: 25 °C antes del tratamiento térmico (azul), 90 °C (gris) y primer (naranja) y segundo (amarillo) proceso de recocado (n=3). La Tabla muestra los porcentajes de estructura secundaria (α H, α -hélice; β S, lámina β , Giros y Otros). **B.** Gráfica de caja y bigotes del ELISA que muestra los resultados del reconocimiento de rHev b 8 después del primer y segundo procedimiento térmico, se usó rZea m 12 como control negativo. Las barras de error representan las desviaciones estándar de las medias de cuatro repeticiones. **C.** Izquierda: SDS-Page que muestra rHev b 8 y rZea m 12, Derecha: Western blot. IgE 2F5 reconoció a rHev b 8, pero no reconoció a rZea m 12, marcador de peso molecular BLUEstain (GOLDBIO), tinción con Coomasie G250. 32

Fig. 9. Fragmentación de la IgE. **A.** SDS-PAGE en gradiente (7.5, 10 y 15 %) de la fragmentación de la IgE con papaína a tiempo 0, 2, 4, 6, 8, 12 y 16 horas, control positivo de corte de la IgG, control de IgE sin papaína, control de IgE e IgG sin tratamiento proteolítico. **B.** SDS-PAGE en gradiente (7.5, 10 y 15 %) de las pruebas de unión a la rHev b 8 acoplada a la resina de Affi-gel-15 para cada tiempo de fragmentación (0, 2, 4, 6, 8, 12 y 16 horas), marcador de peso molecular low range (Biorad), tinción con Coomasie G250..... 34

Fig. 10. Extendiendo tiempos de fragmentación. **A.** SDS-PAGE en gradiente (7.5, 10 y 15 %) de la fragmentación de la IgE 2F5 con papaína durante 0, 24, 36 y 48 horas. **B.** SDS-PAGE en gradiente (7.5, 10 y 15 %) de las pruebas de unión a las perlas de rHev b 8 acoplada a la resina Affi-gel-15 para los tiempos de fragmentación 24, 36 y 48 horas. Marcador de peso molecular wide range (Biorad), tinción con Coomasie G250. 35

Fig. 11. Cromatograma de la purificación del Fab/IgE 2F5 en la columna Superdex 75 16/60 a un flujo de 0.5 mL/min y su respectivo SDS-PAGE en gradiente (7.5, 10 y 15 %). Marcador de peso molecular wide range (Biorad), tinción con Coomasie G250. 36

Fig. 12. Cromatograma de la purificación del Fab/IgE 2F5 en la columna Superdex 75 16/60 a un flujo de 0.3 mL/min. Las fracciones en el cromatograma están indicadas en la parte inferior, y las fracciones correspondientes a los picos fueron aplicadas a un SDS-PAGE en gradiente (7.5, 10 y 15 %), las fracciones se indican en la parte superior del gel. Marcador de peso molecular wide range (Biorad), tinción con Coomasie G250..... 36

Fig. 13. Cromatograma de la purificación del Fab/IgE 2F5 por la columna de intercambio iónico y sus respectivos SDS-PAGE al 10%. Marcador de peso molecular wide range (Biorad), tinción con Coomasie G250..... 37

Fig. 14. Pruebas de precrystalización. En la condición A2 que contenía, Tris-HCl 0.1 M, pH 8.5, cloruro de magnesio, 0.2 M, 30% w/v polietilenglicol 4,000, se observó la presencia de microcristales. 38

Fig. 15. Cristales del Fab/IgE 2F5 donde se muestra la condición de cristalización y los cristales obtenidos después de 9 días. 39

Fig. 16. Modelo en representación de listón y superficie del complejo Fab/IgE 2F5 - rHev b 8 a 3.04 Å de resolución. En rosa se muestran a la profilina Hev b 8, en verde la cadena pesada del Fab/IgE 2F5, en amarillo la cadena ligera del Fab/IgE 2F5, en café la glicosilación de la Asn189 y en azul los residuos que corresponden al epítipo, ubicados en la hélice alfa 1 y 3, y el asa que se encuentra entre la hebra beta 6 y 7 (PDB ID: 7SBD). 40

Fig. 17. Modelo en representación de listón y superficie del complejo Fab/IgE 2F5- rHev b 8 a 3.34 Å de resolución. En rosa se muestran a la profilina Hev b 8, en verde la cadena pesada del Fab/IgE, en amarillo la cadena ligera del Fab/IgE, en café la

glicosilación de la Asn189 y en azul los residuos que corresponden al epítipo (PDB ID: 7SBG)..... 41

Fig. 18. Alineamiento de las estructuras de los complejos Fab/IgE-Hev b 8 a 3.04 y 3.34 Å, en café y azul respectivamente, en rosa se muestra a la profilina. Los dominios constantes del Fab muestran flexibilidad en el codo con una diferencia entre ángulos de 19.2°, los ángulos fueron medidos utilizando PyMOL. La profilina se muestra en rosa y magenta (PDB ID: 7SBD y 7SBG). 42

Fig. 19. Cristales del Fab/IgE 2F5 donde se muestra la condición de cristalización y los cristales obtenidos después de 13 meses. 43

Fig. 20. Fab/IgE 2F5 libre. En verde se muestran las cadenas pesadas y en amarillo las cadenas ligeras de las tres moléculas del Fab/IgE 2F5 libres en la unidad asimétrica a una resolución de 3.75 Å (PDB ID: 7SD2). 44

Fig. 21. Reconocimiento de cuerpo rígido. **A.** Estructura del complejo Fab/IgE 2F5-rHev b 8 a 3.04 Å, en la parte superior se observa la profilina, que consta de tres hélices alfa y siete hebras beta, y en la parte inferior izquierda se muestra la glicosilación que está constituida por cinco glicanos. **B.** Las tres moléculas del Fab/IgE 2F5 libres en la unidad asimétrica a 3.75 Å, en estos Fab no se observó la glicosilación. **C.** Superposición de las tres moléculas del Fab/IgE 2F5 libre (rojo, azul y morado) con el complejo Fab/IgE 2F5-rHev b 8 (verde) en la parte superior se observa la profilina. Se muestran las regiones del codo y las CDR de la cadena pesada (H1, H2, H3) y de la cadena ligera (L1, L2, L3) (PDB ID: 7SBD y 7SD2). 45

Fig. 22. Residuos parátipo-epítipo. **A.** Alineamiento estructural de los modelos a 3.04 Å (dorado) y 3.34 Å (azul) donde se muestran los residuos que forman el parátipo del Fab/IgE 2F5. **B.** Residuos que forman el epítipo. Alineamiento estructural de las profilinas de los modelos del complejo Fab/IgE 2F5-rHev b 8 a 3.04 Å (dorado) y 3.34 Å (azul). 48

Fig. 23. Vista estéreo de la región de contacto entre parátipo y el epítipo. Se muestra la cadena ligera (amarillo) y la cadena pesada (verde) del Fab/IgE 2F5, y

la profilina (rosa), el mapa de densidad electrónica $2F_o-F_c$ (1σ) se muestra en azul claro. El área de interfaz epítopo-parátopo es de 926 \AA^2 48

Fig. 24. Interacciones parátopo-epítopo y la afinidad del Fab/IgE 2F5. **A.** Resumen de la red de interacción. Cadena pesada (H), cadena ligera (L) y profilina (P). Los puentes salinos se representan con líneas rojas, los enlaces de hidrógeno con líneas azules y los contactos electrostáticos e interacciones de Van der Waals con líneas naranjas. **B.** Ajuste de BLI considerando unión no específica (NSB) usando el modelo 1:1 de Asociación-Disociación implementado en GraphPad Prism 8. Se probaron seis concentraciones diferentes y se muestran en diferentes colores. .. 50

Fig. 25. La IgE 2F5 está glicosilada. **A.** Gel SDS-PAGE en gradiente (7.5, 10 y 12%), en el segundo carril se observa de color rosa la tinción de la cadena pesada del Fab/IgE, en el tercer carril la tinción de la IgE completa, en el quinto y séptimo carril la tinción de las cadenas pesadas de las IgG 2D10 y 1B4 completas, las cadenas pesadas de los fragmentos Fab de las IgG no presentan glicosilaciones, por lo que no se observó su tinción en el cuarto y sexto carril. En el octavo y décimo carril se utilizaron como controles negativos a la profilina (Hev b 8) y el inhibidor de tripsina de soya (STI), en el noveno carril se observa la tinción del control positivo que fue la peroxidasa de rábano (HRP). **B.** El mismo gel teñido con Azul de Coomassie en donde se pueden observar la cadena ligera del Fab/IgE, las cadenas ligeras y pesadas de las IgG, a la profilina Hev b 8 y a la STI teñidas de color azul. Marcador de peso molecular Precision Plus (Biorad). 51

Fig. 26. **A.** Modelo de listón del Fab/IgE 2F5 en complejo con la profilina rHev b 8 donde se muestra el mapa de pólder a 3σ (azul) y el mapa de omisión a 3σ (verde) para la glicosilación en N189. **B.** Composición del glicano unido a N189 de tipo complejo en el Fab/IgE. Consiste en un núcleo de dimanosa unido al núcleo de quitobiosa (GlcNAc₂) y una fucosa. Abreviaturas: N, GlcNAc; M, manosa; F, Fucosa; G, Galactosa; S, ácido siálico. **C.** Espectrometría de masas MALDI TOF. Espectros de masas de DDDK-rHev b 8 (14625 Da) y del Fab/IgE 2F5 (57397.3 Da). Se utilizó lisozima (14100 Da) y albúmina de suero bovino (66410 Da) para calibrar el espectro. También se detectaron picos del complejo Fab/IgE 2F5-DDDK-rHev b 8

(72397.9 Da) y el Fab dimérico (115371 Da); sin embargo, estos dos picos no fueron calibrados..... 52

Fig. 27. Diagrama de caja y bigotes del ELISA de la interacción de la IgE, donde PBS es Amortiguador Salino de Fosfatos, Hev b 8 (profilina del árbol del látex, *Hevea brasiliensis*), Zea m 12 (profilina de *Zea mays*), CLP1 (proteína tipo quitinasa alérgica Hev b 11 del árbol del látex), Heveína (alérgeno Hev b 6 del árbol del látex), BSA a 10 y 30 $\mu\text{g/mL}$ (albumina bovina sérica). Se graficó la media de 4 determinaciones independientes y su desviación estándar. 53

Fig. 28. A. Generando reactividad cruzada. **A.** Modelos de cinta y barra de perfiles rHev b 8 (rosa) y rZea m 12 (cian) (RMSD 0,307 Å). Los diferentes residuos entre ambas profilinas (E14, N98, I118 y D128) están rodeados por líneas de puntos; esta región del epítopo es parte del sitio de unión de la poliprolina en las profilinas. **B.** Alineamiento de secuencias entre rHev b 8 y rZea m 12, las flechas verdes muestran residuos conservados en el epítopo y las flechas amarillas muestran los residuos diferentes. **C.** Los residuos del parátopo de Fab/IgE 2F5 y los cuatro residuos en rHev b 8, que son diferentes en rZea m 12 se muestran como barras. Los residuos del epítopo rHev b 8 se muestran en rosa, los residuos de la cadena pesada Fab en verde y los residuos de la cadena ligera Fab en amarillo. Las líneas punteadas indican las interacciones entre residuos..... 54

Fig. 29. Cinéticas de sobreexpresión. **A.** SDS-PAGE de la cinética de expresión de rZea m 12 - E128D y **B.** SDS-PAGE de la cinética de expresión de rZea m 12-E128D-G98N. En ambas figuras a la izquierda se muestra la fracción soluble y a la derecha la fracción insoluble a los tiempos 0, 2, 4, 6 y 8 h. La sobre expresión de las mutantes está indicada por la flecha azul. Marcador de peso molecular Precision Plus (Biorad)..... 55

Fig. 30. SDS-PAGE de las profilinas purificadas, rZea m 12, rZea m 12-E128D, rZea m 12-E128D-G98N, DDDK-rHev b 8 y rHev b 8. Marcador de peso molecular BLUEStain (GOLDBIO). 56

Fig. 31. Inmunoensayo de reactividad cruzada. Diagrama de caja y bigotes que muestra los resultados de ELISA para Zea m 12 y sus mutantes en comparación con rHev b 8, y las pruebas de comparaciones múltiples de Sidak. Para la ELISA de interacción de IgE se utilizó a rHev b 8 y la construcción DDDK-rHev b 8 como controles positivos, rZea m 12 como control negativo, rZea m 12-E128D mutante, rZea m 12-E128D-G98N doble mutante y PBS como control de fondo (ns = no significativo, todos los valores de p inferiores a 0.001 se resumen con tres asteriscos). Para estos experimentos, n=4. 57

Tabla 1. Condiciones de fragmentación de la IgE con papaína para un volumen de corte de 10 mL 17

Tabla 2. Juegos de datos adquiridos mostrando resolución y condición de cristalización 24

Tabla 3. Estadísticas de los datos colectados y del afinamiento. 46

Tabla 4. Prueba de comparación múltiple de Sidak 58

Abreviaturas

PBS	Amortiguador salino de fosfatos
IgE	Inmunoglobulina E
IgG	Inmunoglobulina G
Hev b 8	Profilina del árbol del hule (<i>Hevea brasiliensis</i>)
Zea m 12	Profilina del maíz (<i>Zea mays</i>)
Sola l 1	Profilina del jitomate (<i>Solanum lycopersicum</i>)
CDR	Región determinante de la complementariedad (del inglés Complementarity-determining region)
ELISA	Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (acrónimo del inglés Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)
BLI	Biolayer Interferometry (Interferometría de biocapa)
Fc	Fragmento cristizable
Fab	Fragmento de unión al antígeno
FcεRI	Receptor de alta afinidad para inmunoglobulina E
K_a	Constante de asociación
K_D	Constante de disociación
K_{off}	Constante cinética de disociación
MALDI-TOF	Desorción/Ionización Láser Asistida por Matriz – Tiempo de vuelo (acrónimo del inglés Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization - Time Of Flight)
Fv	Fragmentos variables
rHev b 8	rHev b 8.0102
rZea m 12	rZea m 12.0105

Abstract

Allergies are a growing health problem, where many substances can trigger allergies mediated by immunoglobulin type E (IgE). These substances can have multiple origins such as plants, animals, fungi, and chemical compounds, and by their nature, they can be proteins, carbohydrates, lipids or small molecules.

One protein allergen example are profilins, which are ubiquitous proteins considered minor allergens; however, these allergens have high cross-reactivity and they are related to pollen and food allergy syndrome. In this work, we present the first crystallographic structures of a murine Fab/IgE, with its heavy (H) and light (L) chains naturally paired, alone and in complex with the *Hevea brasiliensis* profilin (Hev b 8). Crystallographic models revealed that the six complementarity determining regions (CDRs) of IgE interact with the allergen, comprising a rigid surface between the paratope and the epitope of 926 Å², which includes an extensive network of interactions. Interestingly, we also observed unreported flexibility in the Fab/IgE elbow angle, whose flexibility did not influence the paratope's shape. Fab/IgE exhibits a high affinity for Hev b 8, even when 1M NaCl is used in biolayer interferometry (BLI) experiments. Finally, cross-reactivity was demonstrated by two maize profilin mutants (Zea m 12), so this antibody could be a promising tool in IgE engineering for diagnostic and research applications.

Resumen

Las alergias son un problema de salud creciente, donde muchas sustancias pueden desencadenar alergias mediadas por la inmunoglobulina de tipo E (IgE). Estas sustancias pueden tener múltiples orígenes como plantas, animales, hongos, compuestos químicos, y por su naturaleza pueden ser proteínas, carbohidratos, lípidos o moléculas pequeñas.

Un ejemplo de alérgeno proteico son las profilinas, proteínas ubicuas consideradas como alérgenos menores; sin embargo, estos alérgenos presentan alta reactividad cruzada y están relacionados con el síndrome de alergia al polen y los alimentos. En este trabajo se presentan las primeras estructuras cristalográficas de un Fab/IgE murino, con sus cadenas pesada (H) y ligera (L) apareadas de forma natural, solo y en complejo con la profilina de *Hevea brasiliensis* (Hev b 8). Los modelos cristalográficos revelaron que las seis regiones determinantes de la complementariedad (CDRs) de la IgE interactúan con el alérgeno, comprendiendo una superficie rígida entre el paratopo y el epítipo de 926 Å², la cual incluye una extensa red de interacciones. Interesantemente, también observamos una flexibilidad no reportada en el ángulo del codo del Fab/IgE, cuya flexibilidad no influyó en la forma del paratopo. El Fab/IgE exhibe una alta afinidad por Hev b 8, incluso cuando se usa NaCl 1M en experimentos de interferometría de biocapa (BLI). Finalmente, mediante dos mutantes de la profilina de maíz (*Zea m 12*) se demostró la reactividad cruzada, por lo que este anticuerpo podría ser una herramienta prometedora en la ingeniería de la IgE para aplicaciones de diagnóstico e investigación.

Introducción

Profilinas

Las profilinas son proteínas involucradas en el proceso de motilidad celular a través de la regulación de la polimerización del microfilamento de actina (Valenta et al., 1992); además pueden unir fosfatidilinositol y proteínas con dominios ricos en prolina. Las profilinas tienen una masa molecular de 12 a 17 kDa y están formadas por 100-153 aminoácidos (Santos & Van Ree, 2011), los cuales varían substancialmente dependiendo de la isoforma y del organismo de origen (Popescu, 2015). Estas proteínas se encuentran en todas las células eucariotas y algunas arqueas (Akil & Robinson, 2018). Las profilinas comparten una alta identidad de secuencia y, por lo tanto, se consideran panalérgenos ya que, en plantas, mantienen alrededor del 75 % de identidad en su secuencia. También se encuentra conservada su estructura 3D, la cual está compuesta por tres α -hélices y siete hebras β antiparalelas formando una lámina β (Hauser et al., 2010), estos elementos están conectados con giros beta y asas de tamaños similares (Fig. 1).

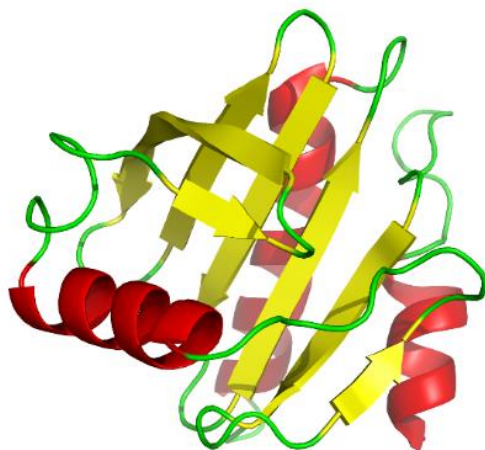


Fig. 1. Representación de la estructura cristalográfica de la profilina del árbol del hule (*Hevea brasiliensis*), en rojo se muestran las α -hélices y en amarillo las hebras β (PDB ID: 5FDS).

Las profilinas son consideradas proteínas alergénicas o alérgenos debido a que pueden despertar en algunos individuos una respuesta alérgica, es decir, una reacción exacerbada del sistema inmunológico (Sadowski., 2021). Debido a su alta conservación, estos alérgenos exhiben un alto grado de reactividad cruzada (Asero

et al., 2003; Ebner et al., 1995; Offermann et al., 2016) y se encuentran presentes en diversas fuentes como el polen, los ácaros del polvo, las esporas de hongos, la caspa de mascotas, el látex, alimentos, entre otras.

Alergia

Las reacciones alérgicas pueden ser mediadas por células o por la Inmunoglobulina E (IgE), que es el isotipo menos abundante en el plasma. En la mayoría de los casos, las alergias, son mediadas por la IgE como consecuencia del reconocimiento de los alérgenos. Este tipo de alergia tiene dos etapas, una etapa de sensibilización y una de respuesta. En la etapa de sensibilización el alérgeno atraviesa las células epiteliales y es reconocido por células presentadoras de antígenos (APC). Las APC internalizan los antígenos mediante endocitosis, dirigiéndolos a sus compartimentos sensibles a la catepsina S para su proteólisis o procesamiento, lo que genera el desenmascaramiento de epítomos ocultos de este alérgeno dando lugar a una gran variedad de péptidos. Las células T migran a los ganglios linfáticos y presentan a los linfocitos T los péptidos de los alérgenos a través del Complejo Mayor de Histocompatibilidad dos (MHC II), generando una respuesta TH2, que está mediada principalmente por las interleucinas IL 4 y 13, esto estimula a los linfocitos B a producir IgE. Las IgE migran al sitio de contacto inicial y se unen a los receptores de alta afinidad de los mastocitos o basófilos, principales células efectoras de la respuesta alérgica. La etapa de respuesta ocurre cuando existe una segunda exposición a los alérgenos y el individuo sensibilizado tiene IgE específicos unidos a los receptores de las células efectoras, estos reconocen al alérgeno y activan una compleja vía de señalización que finaliza con la desgranulación de las células provocando la liberación los mediadores de la inflamación como la histamina, leucotrienos, prostaglandinas, entre otros (von Bubnoff et al., 2001).

Tipos de alergias y síntomas.

Las alergias pueden generar síntomas en la piel, las vías respiratorias, las fosas nasales, o el aparato digestivo, dependiendo del tipo de alérgeno al que un individuo sea expuesto. La reacción alérgica puede desencadenarse por la presencia de

alérgenos en los alimentos, el veneno de los insectos, el látex de plantas y hongos, el polen, las mascotas y el moho. Por lo tanto, las alergias pueden ser por contacto, inhalación, ingestión o picaduras.

Las alergias por contacto comúnmente se dan sobre la piel al entrar en contacto con los alérgenos, generando síntomas como dermatitis atópica (eccema), urticaria (sarpullido) o hinchazón de la piel o los labios (angioedema). Los alergias por inhalación ocurren cuando el individuo entra en contacto con aeroalérgenos, alergenos de pólenes, mohos y caspa de algunos animales. Estos alérgenos producen síntomas como goteo o congestión nasal, asma, estornudos, picazón en la nariz, los ojos o el techo de la boca, ojos llorosos, rojos o hinchados (conjuntivitis). Las alergias por ingestión se dan principalmente por la ingesta de alérgenos a través de los alimentos y pueden ocasionar síntomas en los labios o la garganta (angioedema), picor en la boca y la garganta, síntomas estomacales/intestinales (diarrea, náuseas, dolor abdominal y vómitos). En las alergias por picaduras se da principalmente por la presencia de los alérgenos en los venenos de algunos insectos produciendo síntomas como dificultad para respirar; desarrollo de urticaria, hinchazón de labios, lengua o garganta; también puede haber síntomas gastrointestinales como vómitos, mareo, e incluso pérdida de conciencia. En casos graves de cualquier tipo de alergia se da la anafilaxia que ocurre cuando hay liberación excesiva de los mediadores de la inflamación poniendo a la persona en estado de choque (Volcheck, 2009).

Estructura de la IgE y el FcεRI

La IgE está conformada por dos fragmentos variables (Fab) y un fragmento constante (Fc). Mientras que el Fab reconoce al alérgeno, el Fc se une al receptor de alta afinidad (FcεRI) o al receptor de baja afinidad (FcεRII o CD23) (Gould & Sutton, 2008; Sutton & Davies, 2015). El FcεRI es expresado en mastocitos, basófilos, eosinófilos y células de Langerhans como un complejo tetramérico de tres cadenas con estequiometría $\alpha\beta\gamma_2$, correspondiendo la actividad de unión de la IgE a la cadena α , Fig. 2 (Kinet, 1999; Kraft & Kinet, 2007). Las constantes de afinidad (K_a) de la interacción entre la IgE y el FcεRI pueden fluctuar entre $10^{10} - 10^{11} \text{ M}^{-1}$,

hecho por lo que éste es conocido como receptor de alta afinidad para IgE (Kinet, 1999)

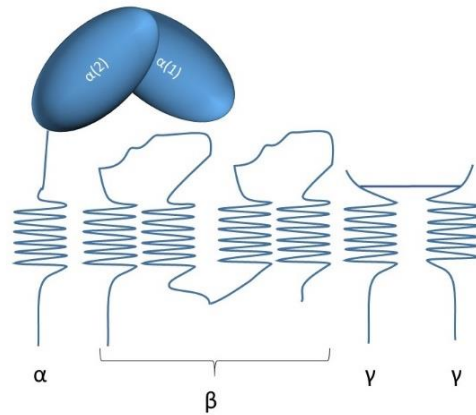


Fig. 2. Modelo del complejo tetramérico del FcεRI donde se muestran las cadenas α, β y γ. Tomado de (M. Niemi et al., 2007)

En una respuesta inmune mediada por IgE se produce un fenómeno llamado entrecruzamiento, el cual se da cuando dos IgE unidas a los FcεRI de una misma célula reconocen a un alérgeno (M. Niemi et al., 2007; Sutton & Davies, 2015), Fig. 3, lo que ocasiona la desgranulación de la célula, la liberando los mediadores inflamatorios.

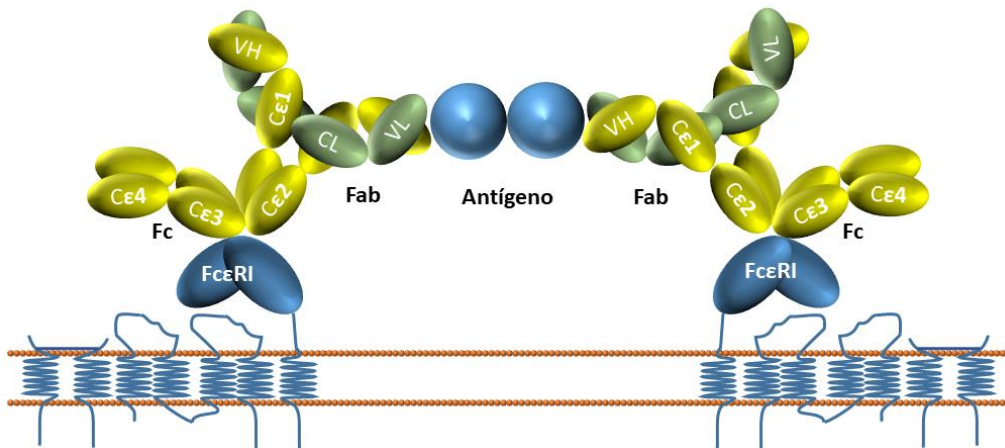


Fig. 3. Modelo esquemático del reconocimiento de un alérgeno dimérico por el receptor FcεRI. Tomado de (M. Niemi et al., 2007).

El entrecruzamiento puede ser mediado por alérgenos que pueden encontrarse en concentraciones celulares bajas (10–100 nM) siendo capaces de formar homodímeros transientes (Rouvinen et al., 2010), como es el caso de las lipocalinas (M. H. Niemi et al., 2015), en donde la formación de dichos dímeros es reducida y

el efecto de su respuesta es menor comparada con las formas homodiméricas estabilizadas por puentes de disulfuro. Esto último ocurre también con las profilinas y se ha logrado demostrar que las formas diméricas son reconocidas por las IgE unidas a los FcεRI de la célula efectora (Mares-Mejía et al., 2016).

Generalmente, las inmunoglobulinas (Ig) son proteínas que comparten las mismas características estructurales básicas. Están compuestas por dos cadenas pesadas de aproximadamente 50 kDa cada una y dos cadenas ligeras de 25 kDa cada una, conteniendo una serie de unidades homólogas repetitivas de aproximadamente 110 residuos de longitud y con un plegamiento independiente denominado dominio de inmunoglobulina (Stanfield et al., 2006).

Una Ig tiene al menos dos sitios de unión al antígeno y cada uno está conformado por un dominio en el extremo N-terminal de cada cadena pesada y de cada cadena ligera llamados dominios variables, V_H y V_L respectivamente. A su vez, cada V_H y V_L tiene 3 asas de reconocimiento a antígenos o región determinante de la complementariedad (CDR por sus siglas en inglés), por lo que cada Ig tiene 6 CDR en total (Owen et al., 2013).

En el extremo carboxilo terminal de cada cadena pesada y ligera de la Ig se encuentra la región constante. Las cadenas pesadas, que median funciones efectoras, se encuentran compuestas por tres o cuatro dominios ($C1_H$, $C2_H$, $C3_H$ o $C4_H$) dependiendo del isotipo (α , δ , γ , ϵ , μ). Los isotipos α , δ y γ están constituidos por tres dominios constantes mientras que los isotipos ϵ y μ por cuatro dominios constantes. Por otro lado, las cadenas ligeras están compuestas de un solo dominio constante (C_L) y pueden ser κ (kappa) o λ (lambda) de acuerdo con su secuencia (Owen et al., 2013; Padlan, 1994).

Si bien existe una gran cantidad de información estructural sobre las interacciones entre el Fc/IgE y sus receptores FcεRI y CD23 (Bowles et al., 2011; Kraft & Kinet, 2007; Shin & Greer, 2015; Sutton & Davies, 2015; von Bubnoff et al., 2003); solo hay algunos ejemplos de cómo un Fab/IgE recombinante reconoce los alérgenos (Khatri et al., 2022; Mitropoulou et al., 2018; M. Niemi et al., 2007; Padavattan et al.,

2009) y solo existe un informe de la estructura de un Fab/IgE nativo (Brünger et al., 1991).

Normalmente, para estudios estructurales las inmunoglobulinas son fragmentadas selectivamente por enzimas como la ficina, pepsina o papaína. La fragmentación con papaína corta al anticuerpo en los fragmentos Fab, Fab/c, Fc y dos o tres fragmentos pFc (Haba & Nisonoff, 1991) (Fig. 4).

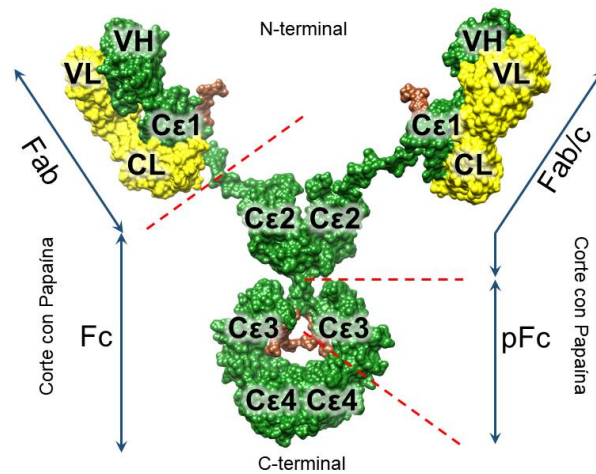


Fig. 4. Sitios de corte de una IgE con papaína (líneas rojas), se forman los fragmentos Fab y Fc, o Fab/c y pFc (líneas azules).

Glicosilaciones

La IgE ha sido descrita como la inmunoglobulina más glicosilada, estas glicosilaciones se encuentran presentes en las asparaginas de sus cadenas pesadas (Asn-X-Ser/Thr). Se ha reportado que existen a lo largo de la cadena pesada de la IgE murina ocho glicosilaciones biantenadas complejas, mientras que en la IgE humana se han reportado seis biantenadas complejas, y en ambas IgE se ha reportado una glicosilación de oligomanosa, Fig. 5A. Las glicosilaciones biantenadas complejas se encuentran formadas por dos antenas, cada antena tiene un ácido siálico y una galactosa que se unen a un núcleo de trimanosa, el cual a su vez se une al núcleo de quitobiosa (GlcNAc₂). Este núcleo de quitobiosa puede tener unida una fucosa mediante un enlace α 1-6, Fig. 5B. Por otro lado, la glicosilación de oligomanosa está formada por residuos de manosa que pueden tener una longitud entre cuatro y ocho manosas unidas a un núcleo de quitobiosa,

Fig. 5C (K. T. Shade et al., 2015; K.-T. C. Shade & Anthony, 2013). El peso total de los glicanos en las cadenas pesadas de la IgE contribuye aproximadamente al 12% del peso molecular de la IgE (Arnold et al., 2007).

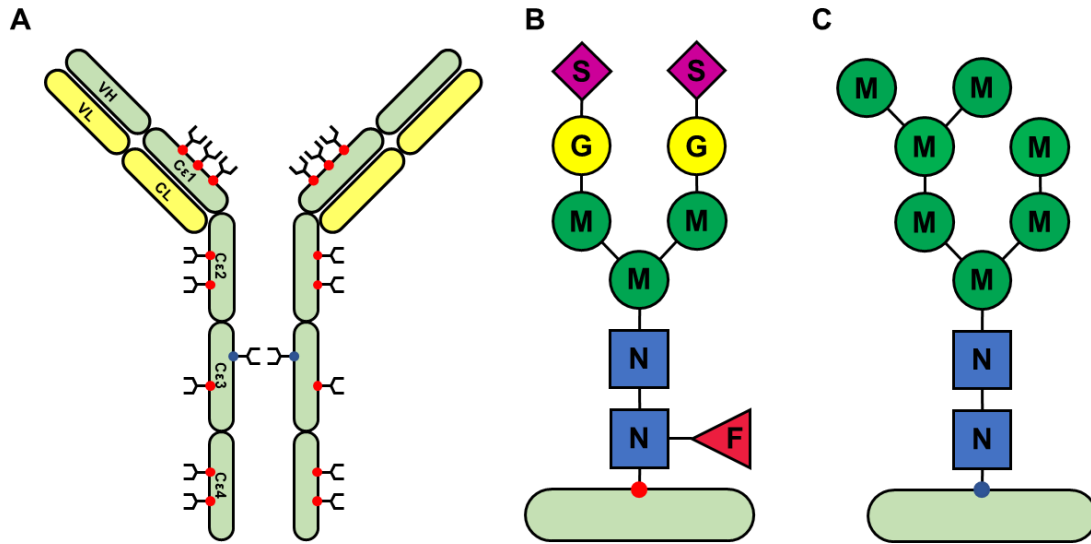


Fig. 5. Glicosilaciones en las inmunoglobulinas E. **A.** Los puntos rojos y los azules representan las Asn donde están unidos los glicanos de tipo complejo y tipo oligomanosa, respectivamente. **B.** Composición del glicano unido a Asn de tipo complejo en IgE. Consiste en un biantenado de ácido siálico y galactosa unidos a un núcleo de trimanosa, el cual a su vez se une al núcleo de quitobiosa (GlcNAc2) con una fucosa. **C.** La composición del glicano de tipo oligomanosa en la IgE consiste comúnmente de un núcleo de quitobiosa (GlcNAc2) que une 5 manosas sin un orden específico; sin embargo, se ha informado un rango de 4 a 8 manosas (K.-T. C. Shade & Anthony, 2013). Abreviaturas: N, GlcNAc; M, Manosa; F, Fucosa; G, Galactosa; S, ácido Siálico.

Antecedentes

El Subcomité de Nomenclatura de Alérgenos de la OMS/IUIS (<http://www.allergen.org/>) ha informado que la profilina natural y recombinante Hev b 8 es un alérgeno capaz de desencadenar síntomas en pacientes alérgicos al látex. Debido a que las profilinas son proteínas ubicuas presentes en todas las células eucariotas, existe una alta probabilidad de que los individuos sensibilizados por una de las múltiples isoformas de esta proteína experimenten, en una exposición posterior a profilinas de otras fuentes, una reacción alérgica cruzada debido a su

alta identidad de secuencia, causando el síndrome látex-polen-alimento (Hauser et al., 2010).

El estudio de las reacciones mediadas por IgE se puede realizar utilizando diversas metodologías; sin embargo, la herramienta más valiosa para ejecutarlo es mediante un hibridoma productor de IgE, ya que esto brinda la capacidad de tener un anticuerpo en el que sus cuatro cadenas, dos pesadas y dos ligeras, estén naturalmente apareadas. También proporciona la ventaja de tener una molécula que pueda estar homogénea para llevar a cabo un adecuado mapeo de epítomos. En el grupo de trabajo Mares-Mejía et al., en el 2016 obtuvieron mediante la técnica de hibridoma, una línea celular híbrida que produce IgE (denominada IgE 2F5). Para tal fin, se sensibilizaron ratones con la profilina del árbol del hule (*Hevea brasiliensis*, Hev b 8.0102), la cual fue obtenida de la extracción de ARN mensajero a partir de hojas del árbol. Sin embargo, previamente esta isoforma de la profilina ya había sido reportada en polen (Rihs et al., 2000)

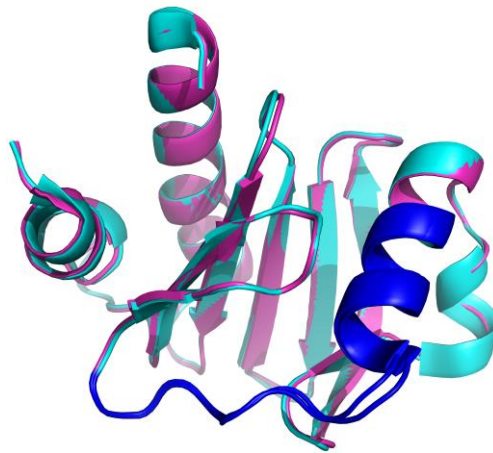
La constante de disociación (K_D) entre la IgE 2F5 y la rHev b 8.0102 fue determinada mediante ensayos de interferometría de biocapa (BLI) obteniendo un valor de 1.7 nM, la cual es una constante de disociación muy pequeña, a pesar de que fue determinada en presencia de 1 M de NaCl, lo que indicó una afinidad alta. La IgE fue capaz de reconocer específicamente a rHev b 8.0102 y no mostró reactividad cruzada con la profilina de maíz (*Zea m 12.0105*), la cual presenta estructura tridimensional altamente conservada con valores de RMSD de 0.3 Å, Fig. 6A, y una identidad de secuencia del 79.4 %, Fig. 6B, comparada con rHev b 8.

Los ensayos de reactividad cruzada utilizando la profilina de maíz se realizaron pensando en las formas que un individuo se puede sensibilizar. Hay que recordar que la profilina Hev b 8 esta presente en hojas y polenes, por lo que puede desencadenar una alergia por contacto e inhalación, mientras que la profilina Zea m 12, en una ciudad como la de México, es suministrado por ingesta. Estudios de prevalencia realizados en el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER) mostraron que en una población de 20 pacientes alérgicos al maíz, el 85% eran positivos al polen de maíz, 20% al maíz como alimento, 25% en prueba

cutánea, y el 6% fue positivo de las tres formas. También encontraron que el 85% de los pacientes alérgicos tuvieron respuesta positiva a la profilina de maíz purificada de forma recombinante (rZea m 12), es decir, poseían anticuerpos de tipo IgE contra la esta profilina (Ruiz-Morales, 2015).

Mediante alineamientos estructurales y de secuencia se buscó explicar la ausencia de reconocimiento de la profilina de maíz por la IgE 2F5. Esta carencia se explicó a través de la diferencia en la composición de aminoácidos y en la distribución de cargas de un asa formada por los residuos 37 al 52. Esta asa es la región que más diferencias presenta entre Zea m 12 y Hev b 8, Fig. 6A, B (Mares-Mejía et al., 2016).

A



B

	10	20	30	40	50	
Hev_b_8		MSWQAYVDDH	LMCE	IEGNHL	SAAAI	IGQDG	SVWAQ	SANFP	QFK	SEETGI	
Zea_m_12		MSWQAYVDDH	LLCD	IEGQHL	SAAAI	VGH DG	SVWAQ	SENFP	ELK	PEEVAGM	
Consistency		*****	*7*	*6*	***4**	*****8*	3**	*****3***	64*	3**84*	5
	60	70	80	90	100	
Hev_b_8		MSDFHEPGTL	APTGL	YIGGT	KYMVI	QGEPG	AVIRG	KKPG	GVT	VKKTNQA	
Zea_m_12		IKDFDEPGTL	APTGL	FVGGT	KYMVI	QGEPG	VVIRG	KKGTG	GIT	IKKTGMS	
Consistency		54**2	*****	*****68	***	*****	5*****3*	*8*	8**4	446	
	110	120	130					
Hev_b_8		LIIGIYDEPM	TPGQC	NMIVE	RLGDY	LIDQG	Y				
Zea_m_12		LIIGIYDEPM	TPGQC	NMVVE	RLGDY	LIEQG	F				
Consistency		*****	*****8	**	*****6	**	6				

Unconserved 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 Conserved

Fig. 6. Alineamientos. **A.** Superposición estructural entre la profilina de *Hevea brasiliensis* (Hev b 8) (rosa) y la profilina de *Zea mays* (Zea m 12) (cian), en azul se resaltan los residuos 37 al 52, que corresponden al probable epítipo reconocido por la IgE 2F5. **B.** Alineamiento de la secuencia de aminoácidos entre la profilina de *Hevea brasiliensis* (Hev b 8) y la profilina de *Zea m 12* (Zea m 12), la conservación de los residuos se muestra en tonalidades del azul al rojo, siendo el rojo los residuos más conservados. La identidad entre ambas profilinas es de 79.4%.

Actualmente existen diversas terapias inmunogénicas contra las alergias. Algunas de ellas utilizan hipoadérgenos, otras mediante el uso de alérgenos generan una respuesta de tolerancia y otras es a través del uso de anticuerpos monoclonales de tipo IgG que son específicos y reconocen a los alérgenos de diferentes fuentes. Las IgG bloquean los epítomos que reconocen las IgE y de esta forma se evita desencadenar la respuesta inmune.

Mares-Mejía et al., en el 2016, además de generar la IgE también generaron cinco IgG monoclonales de hibridomas murinos contra Hev b 8 recombinante (1B4, 1G4, 2D10, 4B2 y 4C4), evaluando su interacción con este alérgeno mediante ELISA e interferometría de biocapa (BLI). Las IgG exhibieron constantes de disociación hacia rHev b 8 con valores que oscilaron entre 10^{-10} M y 10^{-11} M y algunos de estos IgG mostraron reactividad cruzada con las profilinas recombinantes de maíz, de jitomate y de polen de fresno (Zea m 12, Sola l 1 y Fra e 2).

Finalmente, mediante inmunoensayos de competencia se formaron dos grupos con las IgG dependiendo del epítomo que reconocen. En el primer grupo se encontraban 1B4 y 4B2 que aparentemente reconoce la región de los residuos 37 a 52, y el segundo grupo 1G4, 2D10, y 4C4, que aparentemente reconoce las alfa hélices del amino y el carboxilo terminal. Posteriormente, se seleccionó un anticuerpo de cada grupo, del primer grupo se seleccionó 1B4 y del segundo grupo 2D10. Estos se utilizaron simultáneamente en pruebas de inhibición de anticuerpos policlonales humanos de tipo IgE e IgG4, que procedían de una mezcla de sueros de pacientes alérgicos a la profilina. Como resultado, 1B4 y 2D10 inhibieron casi por completo la interacción de las IgE e IgG4 con rHev b 8, lo que indica que los anticuerpos presentes en los sueros de pacientes alérgicos se unen a epítomos similares. De igual manera, se realizaron estos ensayo de inhibición con la IgE 2F5 encontrando que tiene la capacidad de inhibir el reconocimiento de los anticuerpos policlonales humanos de tipo IgE e IgG4 en un 36% y 11%, respectivamente (Mares-Mejía et al., 2020).

Justificación

La profilina es una proteína ubicua en las células eucariotas y juega un papel importante en las alergias; por lo tanto, es importante describir la red de interacciones que se establecen entre la profilina de *Hevea brasilienses* (Hev b 8) y la IgE 2F5 desde un punto de vista biofísico y estructural. En las etapas posteriores del proyecto, los resultados generados ayudarán a la comprensión del fenómeno de reconocimiento alérgeno-anticuerpo mediante una evaluación minuciosa de los movimientos alostéricos en la IgE a través del uso de diversas herramientas moleculares y bioinformáticas. De este modo se pueden diseñar y desarrollar estrategias para el mejoramiento de las inmunoterapias contra las alergias mediadas por la IgE.

Hipótesis

Las diferencias en la distribución de cargas en el asa formada por los aminoácidos 37 al 52 entre las profilinas Zea m 12 y Hev b 8 evitan la reactividad cruzada, esto a pesar de la alta conservación en secuencia y estructura 3D entre la familia de las profilinas.

Objetivo

Describir las interacciones que se establecen entre el alérgeno y el anticuerpo monoclonal murino IgE 2F5 para demostrar la reactividad cruzada entre profilinas de diferentes organismos.

Objetivo Particulares

Obtener el fragmento de unión al antígeno de la IgE 2F5 puro (Fab/IgE 2F5) y expresar y purificar la la profilina del árbol del látex (rHev b 8).

Obtener cristales adecuados del complejo Fab/IgE 2F5-rHev b 8 para determinar la estructura tridimensional.

Estimar la afinidad del complejo mediante interferometría de biocapa (BLI) y ELISA.

Analizar las interacciones paratopo-epitopo en el complejo Fab/IgE 2F5-rHev b 8 para generar reactividad cruzada con la mutante en la profilina rZea m 12 y determinar su capacidad de unión mediante ELISA.

Metodología

Producción y purificación de la IgE 2F5

Las células del hibridoma 2F5 (productora del anticuerpo monoclonal IgE 2F5) (Mares-Mejía et al., 2016), fueron enviadas para la secuenciación de las regiones Fv a Absolute Antibody Ltd (Redcar-Cleveland, Reino Unido), quien proporcionó las secuencias consenso de la clona. El anticuerpo monoclonal 2F5 se produjo a partir de células de hibridoma que se crecieron en medio RPMI-1640 suplementado con piruvato de sodio, L-glutamina, aminoácidos no esenciales, antibiótico y 3% de suero fetal bovino (SFB), en una atmósfera húmeda a 37°C con 5% de CO₂. La IgE 2F5 es excretada por las células, por lo que se colectó el sobrenadante y se descartó el paquete celular centrifugando a 2000 g durante 20 min. El sobrenadante se filtró por una membrana de 0.22 µm y se aplicó a una columna de afinidad de rHev b 8 unido covalentemente a la resina Affi-gel-15 (Biorad, CA, USA), esta columna fue preparada por nosotros y equilibrada con amortiguador PBS. La IgE fue eluida por cambio de pH con amortiguador glicina-HCl 0.2 M, pH 2.8, colectando 800 µL en tubos que contenían 200 µL de amortiguador Tris HCl 2 M, pH 8.0 para neutralizar el pH.

Cinética de fragmentación de la IgE 2F5 con papaína

Las pruebas de corte de la IgE con papaína se realizaron a los tiempos 0, 2, 4, 6, 8, 12, 16, 24, 36 y 48 horas a 37°C, utilizando como control positivo una IgG y como control negativo a la IgE incubada 16 horas en ausencia de la enzima, bajo las condiciones establecidas por Haba y Nisonoff en 1991 (Tabla 1). La reacción se detuvo con la adición de iodoacetamida a una concentración final de 20 mM. Posteriormente se aplicaron las pruebas de corte de la IgE a geles SDS-PAGE en gradiente (7.5, 10 y 12%) en condiciones reductoras y no reductoras. También se aplicó a estos geles la IgG con y sin tratamiento, y la papaína como controles de masa molecular.

Tabla 1. Condiciones de fragmentación de la IgE con papaína para un volumen de corte de 10 mL

Cantidad	Componente	Concentración de la solución madre
100 µL	Cisteína	0.5 M
40 µL	EDTA	0.5 M
3.6 mL	IgE	0.56 mg/mL
1 mL	Amortiguador de Fosfatos pH 7	1 M
400 µL	Papaína	75 µg/mL
4.9 mL	Agua ultrapura	

Pruebas cualitativas de unión a profilina

La unión de los fragmentos de la IgE con rHev b 8 se probó mediante la adición de 20 µl de los productos de reacción de diferentes tiempos de corte con papaína a 30 µL de la resina de Affi-gel con la profilina acoplada e incubando por 16 horas. Los ensayos se hicieron en tubos de 1.5 mL con tapa, a cada tiempo se le hicieron cinco lavados con amortiguador de fosfatos 50 mM pH 7, adicionando 200 µl de amortiguador, y se centrifugó durante cinco minutos a 6000 rpm, siempre se retiró el sobrenadante. Posteriormente se adicionó, por separado, amortiguador de carga para SDS-PAGE en condiciones reductoras y no reductoras, cada muestra se calentó por 20 minutos y se aplicó a un SDS-PAGE (gel concentrador 4% y gel separador 12%), y a un SDS-PAGE en gradiente bajo condiciones no reductoras (gel concentrador 2% y gel separador 7.5, 10 y 12 %).

Fragmentación a mayor escala de la IgE con papaína

Una vez obtenido el tiempo óptimo de fragmentación de la IgE (48 h) se procedió a cortar 6 mg de la IgE bajo las condiciones antes mencionadas.

Purificación del fragmento Fab/IgE 2F5

El producto de la fragmentación de la IgE con papaína se aplicó a una columna de exclusión molecular Superdex 75, a flujo de 0.3 mL/min con amortiguador Tris-HCl 50 mM, pH 8.4. Las fracciones obtenidas donde se muestra una banda alrededor de 66 kDa se concentraron mediante tubos de diafiltración de 10 000 MWCO

(Sartorius), centrifugando a 3500 rpm. Subsecuentemente se aplicaron a una columna de intercambio catiónico Mono Q GL 5/50, eluyendo con un gradiente de NaCl de 0 a 250 mM en 40 mL. Finalmente, las fracciones obtenidas se concentraron y dializaron contra el amortiguador de cristalización que contiene Tris-HCl 20 mM con NaCl 50 mM, pH 8.4.

Sobreexpresión y purificación de las profilinas

rHev b 8 y rZea m 12

La sobreexpresión de la profilina Hev b 8 se realizó siguiendo el protocolo descrito por Mares-Mejía, *et al.*, 2016 usando la cepa de *Escherichia coli* (*E. coli*) Rosetta (DE3), transformada con el vector pET-28c-rHevb8. La cepa fue inoculada en 50 mL de cultivo Luria Bertani (LB) suplementado con kanamicina 15 µg/ml y cloranfenicol 34 µg/ml, el cultivo se incubó a 37° C durante una noche. Posteriormente, el cultivo se escaló a 1L bajo las mismas condiciones hasta tener una densidad óptica de 0.7 a 600 nm para inducirlo con 0.5 mM β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) a 30° C por 7 h. Transcurrida la inducción se cosecharon las células centrifugando a 8000 rpm por 10 min a 4° C.

La purificación de la profilina recombinante se hizo utilizando una columna de afinidad a níquel equilibrada con amortiguador Tris-HCl 50 mM, NaCl 300 mM, pH 8 y 1mM de fluoruro de fenilmetilsufonilo (PMSF). Las células se lisaron con un sonicador Misonix 3000 usando pulsos de 10 segundos con potencia 6 y un reposo de 30 segundos hasta completar 10 min. El lisado se clarificó centrifugando a 14 000 rpm durante 30 min, se colectó el sobrenadante descartando el botón, se filtró el sobrenadante a través de una membrana de Millipore de 0.22 µm y se aplicó a una columna de afinidad a níquel His Trap (GE) de 5 mL acoplada a una bomba peristáltica. Se realizó un lavado con 100 mL de amortiguador Tris-HCl 50 mM, NaCl 300 mM e imidazol 15 mM para eliminar las interacciones inespecíficas, después se eluyó la profilina con amortiguador Tris-HCl 50 mM, NaCl 300 mM e imidazol 100 mM y una posterior elución con imidazol 250 mM.

Una vez obtenida la profilina se dializó contra el amortiguador de cristalización (Tris-HCl 20 mM con NaCl 50 mM, pH 8.4).

Diseño y purificación de los mutantes rZea m 12 E128D y E128D-G98N

La PCR se realizó con AccuPrime™ Pfx Super mix (Invitrogen, Waltham, MA, EE. UU.) y los siguientes cebadores (Sigma, St. Louis, MO, EE. UU.):

E128D

SECUENCIA 5'- TAC CTG ATC GAT CAG GGC TTC -3'

COMPLEMENTO 5'- GAA GCC CTG ATC GAT CAG GTA -3'.

E128D-G98N

SECUENCIA 5'- C AAG AAA ACT AAC ATG TCC TTG -3'

COMPLEMENTO 5'- CAA GGA CAT GTT AGT TTT CTT G -3'

Los plásmidos pET-28c-Zeam12-E128D y pET-28c-Zeam12-E128D-G98N se propagaron en células de *E. coli* DH5 α para extraerlos, purificarlos y secuenciarlos (Laragen, CA, EE. UU.).

Cinética de sobreexpresión de las mutantes rZea m 12-E128D y rZea m 12-E128D-G98N

Los plásmidos pET-28c-Zeam12-E128D y pET-28c-Zeam12-E128D-G98N fueron propagados, individualmente, en células de *E. coli* DH5 α para ser extraídos, purificados y transformados en células de *E. coli* Rosetta (DE3). Las cinéticas de sobreexpresión de cada mutante se llevaron a cabo inoculando 10 mL de cultivo Luria Bertani (LB) suplementado con 15 μ g/ml kanamicina y 34 μ g/ml cloranfenicol, el cultivo se incubó a 37° C durante una noche. Posteriormente, los cultivos se escalaron a 50 mL bajo las mismas condiciones hasta llegar a una densidad óptica de 0.7 a 600 nm, en este momento se indujo con 0.5 mM β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) a 30° C. Se colectó 1 mL del cultivo para el tiempo 0, 2, 4, 6 y 8 h y se centrifugó a 8000 rpm por 10 min a 4° C. Posteriormente las células se suspendieron en 160 μ l amortiguador Tris-HCl 50 mM y NaCl 300 mM, pH 8 con PMSF 1 mM, y se procedió, a lisarlas en un sonicador Misonix 3000 con pulsos de 10 s y potencia 6, y un reposo de 30 s hasta completar 10 min de pulsos. El lisado se clarificó centrifugando a 14 000 rpm durante 30 min, se colectaron los sobrenadantes y los

botones fueron suspendidos en 80 μL de amortiguador de carga SDS-PAGE. De cada sobrenadante se tomaron 10 μL y se adicionó 10 μL de amortiguador de carga, todas las muestras se calentaron por 10 min a 100 $^{\circ}\text{C}$ y se aplicaron a un gel SDS-PAGE al 15%. Posteriormente, se realizó la purificación de ambas mutantes como se describió previamente para rZea m 12.

Efecto del tratamiento térmico en el espectro de dicroísmo circular (DC) rHev b 8

Los espectros de DC de rHev b 8 se obtuvieron en la región del UV lejano (195-260 nm) usando un espectropolarímetro JASCO J-1500 y una cubeta de cuarzo de 1 mm de paso óptico. La concentración de proteína fue de 0.18 mg/ml en PBS y los experimentos se realizaron a 25 $^{\circ}\text{C}$. La señal se expresa en términos de elipticidad molar $[\theta]$ (grados $\times \text{cm}^2 \times \text{dmol}^{-1}$). La línea base fue obtenida utilizando el tampón en condiciones idénticas y se sustrajo de los espectros finales. Los espectros obtenidos son el promedio de tres mediciones.

Seguimos el despliegue térmico midiendo la elipticidad a una longitud de onda fija (218 nm), mientras la celda se calentaba (25-90 $^{\circ}\text{C}$) o enfriaba (90-25 $^{\circ}\text{C}$) a 1 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ con un controlador de temperatura Jasco PTC-510 Peltier y baño de circulación de agua mini-Jasco MCB-100. El espectro se analizó utilizando el software en línea BeStSel (Micsonai et al., 2018; Micsonai et al., 2015).

ELISA, estabilidad térmica, especificidad y reactividad cruzada de la IgE 2F5

La estabilidad térmica de rHev b 8 se evaluó mediante ELISA midiendo la unión de IgE 2F5 a las diferentes profilinas. Placas de 96 pocillos (Corning Incorporated, NY, USA) se recubrieron durante una noche a 4 $^{\circ}\text{C}$ con 100 μL de rHev b 8, 0.7 μM o rZea m 12, en tampón PBS pH 7.4. Después, los pocillos se lavaron tres veces usando PBS con Tween 20 al 0.1 % (amortiguador de lavado), posteriormente, los pocillos fueron bloqueados con BSA al 1 % en PBS y se incubaron durante dos horas a 37 $^{\circ}\text{C}$. Los pocillos fueron lavados tres veces, se añadieron 100 μL de IgE 2F5 diluida en PBS en cada pocillo y se incubaron durante una hora a 37 $^{\circ}\text{C}$. Después de la incubación, la placa se lavó tres veces con tampón de lavado y se

añadieron 100 μ L de anticuerpo secundario anti-IgE anti-ratón (cadena específica de ϵ) -HRP (Abcam Inc., Cambridge, Reino Unido) diluido en PBS en una relación 1:3000, y la placa se incubó durante una hora a 37 °C. La reacción de peroxidasa se desarrolló utilizando 100 μ L/pocillo de ácido 2, 2'-azino-di- (3-etil-benzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS, Invitrogen, CA, EE. UU.) y se incubó durante 20 min. Las placas se leyeron a 405 nm utilizando un lector de placas Cytation 3 (BioTek Instruments Inc. Winooski, VT, EE. UU.). Se graficó la absorbancia promedio de cuatro experimentos independientes y la desviación estándar correspondiente.

La alta especificidad de la IgE 2F5 por rHev b 8 se comprobó utilizando alérgenos no relacionados, el ELISA se realizó sensibilizando los pozos con 100 μ l de los alérgenos de rHev b 8, rZea m 12, proteína tipo quitinasa (rCLP1 o Hev b 11), heveína (Hev b 6.02) y albumina bovina sérica (BSA) a 10 μ g/mL y BSA a 30 μ g/mL en PBS pH 7.4, durante una noche a 4 °C. Se lavaron los pozos con PBS/Tween 20 al 0.05%, y se bloquearon con PBS/BSA al 0.05% durante 1 hora a 37°C. Se agregó 100 μ l de mAb 2F5 IgE (200 nM) a los pozos y se incubó durante 1 hora a 37°C. La placa se lavó con PBS/Tween20 al 0.05%, y se adicionó anti-IgE anti-ratón (cadena específica de ϵ) -HRP (1: 3000) Abcam Inc. seguido de 1 hora de incubación a 37 °C. Se lavó con PBS/Tween 20 al 0.05%. La reacción de la peroxidasa se desarrolló utilizando ABTS Invitrogen. Los pozos se leyeron a 405 nm en un lector de microplacas Biotek. Se calculó la media de 4 determinaciones independientes y la desviación estándar.

Para demostrar la reactividad cruzada entre rHev b 8 y rZea m 12, se realizó un ELISA recubriendo la placa con 100 μ L de 0.7 μ M rHev b 8, DDDK-rHev b 8 (profilina que contiene una parte del sitio de corte de enterocinasa debido a un corte inespecífico, Figura anexa 1), rZea m 12, rZea m 12 - E128D mutante, o rZea m 12 - E128D-G98N doble mutante, en tampón PBS pH 7.4. Se utilizó como controles positivos a rHev b 8 y DDDK-rHev b 8, a rZea m 12 como control negativo y a la solución salina tamponada con fosfato (PBS) como control de fondo.

Posteriormente, se siguió la metodología descrita anteriormente. Se graficaron el promedio de cuatro determinaciones independientes y la desviación estándar.

Ensayos de Western blot

Dos microgramos de rHev b 8 fueron aplicados a un SDS-PAGE al 15 %. El gel se transfirió a una membrana de PVDF con un voltaje constante de (15 V) durante 50 min. La membrana de PVDF se bloqueó con albúmina al 3 % y Tween 20 al 0.05 % en PBS, se lavó tres veces con Tween 20 al 0.1 % en PBS y se sumergió en una solución de IgE 2F5 de dos $\mu\text{g}/\text{mL}$ durante una noche a 4 °C. La membrana de PVDF se lavó tres veces y luego se sumergió en una solución de anticuerpo secundario anti-ratón IgE Fc ϵ específica (Abcam Inc., Cambridge, Reino Unido) (dilución 1:2000) durante dos horas a 37 °C. La membrana de PVDF se lavó tres veces y la reacción de peroxidasa se desarrolló utilizando Novex HRP, sustrato cromogénico (TMB) (Pierce Thermo-scientific, IL, EE. UU.) durante 15 minutos.

Ensayos de unión del Fab/IgE 2F5 con la profilina rHev b 8 mediante interferometría de biocapa (BLI)

La afinidad del Fab/IgE 2F5 por el alérgeno rHev b 8, fue determinada mediante una titulación cinética utilizando biosensores de estreptavidina en el sistema de interferometría de biocapa HTX Red384 Octec (FortéBio Inc., CA, EE. UU.) a 25 °C. La profilina fue dializada en tubos de diafiltración de 10 000 MWCO con 10 lavados del amortiguador PBS utilizando un factor de dilución de 10 y centrifugando a 3500 rpm. Posteriormente se le adicionó biotina en una relación 5:1 y nuevamente se dializó contra amortiguador PBS de la misma forma para remover el exceso de biotina. En el experimento de BLI la profilina biotinilada se une al biosensor de estreptavidina a una concentración de 125 nM y se titula el Fab/IgE 2F5 a diferentes concentraciones (62.5, 125, 250, 500, 1000 y 2000 nM). Los datos se procesaron con el software de análisis de datos de Octet FortéBio versión 8.2. Para determinar la constante de disociación (K_D) del complejo Fab/IgE 2F5-rHev b 8, los datos se ajustaron en GraphPad Prism 8 utilizando un modelo 1:1 de asociación seguido de disociación y se consideró la unión no específica (NSB).

Cristalización del complejo Fab/IgE 2F5-rHev b 8

La cristalización del complejo entre el Fab/IgE 2F5 y la profilina rHev b 8 fue preparada de dos formas, utilizando solo la secuencia correspondiente a rHev b 8 y la secuencia que corresponde a DDDK-rHev b 8. Los componentes del complejo fueron dializados contra el amortiguador de cristalización, e incubados 16 h para formar el complejo. Posteriormente se retiró el exceso de profilina mediante el uso de tubos de diafiltración de 50 000 MWCO con 10 lavados del amortiguador de cristalización utilizando un factor de dilución de 10, y centrifugando a 3500 rpm. Una vez dializado el complejo, la concentración de proteína se determinó utilizando ($A_{280nm}^{0.1\%}$) de 1.66 mL mg⁻¹ cm⁻¹ y ($A_{280nm}^{0.1\%}$) de 1.65 mL mg⁻¹ cm⁻¹ calculados para los complejos formados con rHev b 8 y DDDK-rHev b 8, respectivamente

Ambos complejos se concentraron a 1.7 mg/ml para realizar una prueba de precrystalización usando el kit PCT™ (Precrystallization Test) que consta de cuatro condiciones (A1, B1, A2 y B2) y sirven para determinar si la concentración de proteína y el agente precipitante (sulfato de amonio o PEG) son adecuados. Las condiciones de cristalización se probaron utilizando la técnica de difusión en fase de vapor en su modalidad de gota colgante. Para esto se añadió 1 µL del complejo a la concentración antes indicada y 1 µL del agente precipitante del reservorio. Posteriormente las pruebas de precrystalización fueron incubadas por 16 horas a 18 °C. Para el complejo entre el Fab/IgE 2F5 y la profilina DDDK-rHev b 8, la condición A2 (Tris-HCl 0.1 M, pH 8.5, MgCl 0.2 M y polietilenglicol 4000 al 30% w/v) mostró precipitados amorfos mientras que las condiciones A1, B1 y B2 permanecieron claras. Para el complejo con rHev 8, todas las condiciones se mostraron claras.

Ambos complejos se cribaron con los kits de cristalización de Hampton Research PEG-Ion I y II a la misma concentración de proteína mediante difusión en fase de vapor en la modalidad de gota sedente. A los 9 días se revisó el cribado de cristalización, observando la formación de cristales en diversas condiciones del complejo formado entre el Fab/IgE 2F5 y DDDK-rHev b 8, siendo la condición 24 del kit I (acetato de litio 0.2M con 20% w/v polietilenglicol 3350) la que nos permitió

obtener cristales adecuados para coleccionar un juego de datos a 3.34 Å de resolución. Los datos de difracción de rayos X fueron coleccionados en el Laboratorio Nacional de Estructuras de Macromoléculas (LANEM) utilizando un generador de ánodo rotatorio (Cu K α , λ = 1.5418 Å) y un detector DECTRIS-PILATUS 3R/200K-A a una distancia cristal-detector de 70 cm con incrementos de omega de 0.2° y una exposición de 200 s por imagen. La solución crio-protectora se preparó con la solución madre y 30% de glicerol.

Después de varios meses obtuvimos más cristales del complejo formado entre el Fab/IgE 2F5 y DDDK-rHev b 8. Los cristales fueron difractados y coleccionados en la línea 17-ID-1 de la Fuente de Luz del Sincrotrón Nacional (NSLS) en el Laboratorio Nacional de Brookhaven (BNL) en Upton, Nueva York. En la tabla 2 se resumen los juegos de datos coleccionados mostrando la resolución y las condiciones en las que cristalizó la proteína.

Tabla 2. Juegos de datos adquiridos mostrando resolución y condición de cristalización

Resolución	Condición
3.41 Å	Cloruro de potasio 0.2 M, 20% w/v polietilenglicol 3,350
3.34 Å	Acetato de litio 0.2 M, 20% w/v polietilenglicol 3,350
3.11 Å	Tacsimato™ 8%v/v, pH 8.0, 20% w/v polietilenglicol 3,350
3.04 Å	Tacsimato™ 2%v/v, pH 6.0, Bis-Tris 0.1 M, pH 6.5, 20% w/v polietilenglicol 3,350
2.99 Å	Tacsimato™ 2%v/v, pH 6.0, Bis-Tris 0.1 M, pH 6.5, 20% w/v polietilenglicol 3,350
2.91 Å	Tacsimato™ 2%v/v, pH 6.0, Bis-Tris 0.1 M, pH 6.5, 20% w/v polietilenglicol 3,350

Cristalización del Fab/IgE 2F5

El Fab/IgE 2F5 se dializó en tubos de diafiltración de 10 000 MWCO con 10 lavados del amortiguador de cristalización II (Tris-HCl 20 mM con NaCl 200 mM, pH 8.4) utilizando un factor de dilución de 10. La concentración de proteína se determinó utilizando el coeficiente de extinción teórico ($A_{280nm}^{0.1\%}$) de 1.7 mL mg⁻¹ cm⁻¹. La concentración empleada para las pruebas de cristalización fue de 3.3 mg/mL. De igual manera que con el complejo se realizó la prueba de precrystalización PCT™. La condición A2 que contiene Tris- HCl 0.1 M, pH 8.5, cloruro de magnesio 0.2 M y 30% w/v polietilenglicol 4000 mostró precipitados amorfos, mientras que las

condiciones A1, B1 y B2 se mostraron claras. El Fab/IgE 2F5 se cribó con los kits de cristalización de Hampton Research PEG-Ion I y II a la misma concentración mediante difusión de vapor en la modalidad de gota sedente, obteniendo cristales en diversas condiciones después de varios meses. Los cristales obtenidos en la condición C1 (acetato de magnesio 0.2 M, 20% w/v PEG 3350) fueron difractados colectándose un juego de datos a 3.75 Å de resolución en el LANEM utilizando un generador de ánodo rotatorio (Cu K α , λ = 1.5418 Å) con un detector DECTRIS-PILATUS 3R/200K-A. La distancia cristal-detector fue de 70 cm con incrementos de omega de 0.2° y una exposición de 200 s por imagen. La solución crio-protectora se preparó con la solución madre y 30% de glicerol.

Determinación de la estructura tridimensional del complejo Fab/IgE 2F5 con Hev b 8 y afinamiento

Los datos colectados a 3.04 y 3.34 Å fueron indizados, integrados y escalados usando el software XDS y HKL3000 respectivamente. Los cristales fueron ortorrómbicos perteneciendo al grupo espacial P2₁2₁2₁ y el valor del coeficiente de Matthews (2.58 Å³/Da) nos sugirió una molécula del complejo por unidad asimétrica. El complejo formado por Fab/IgE 2F5 y DDDK-Hev b 8 a 3.04 Å se determinó por reemplazo molecular usando PHASER (McCoy et al., 2007). La profilina Hev b 8 (PDB:5FDS) y el fragmento Fab/IgE anti-DNP (PDB: 1BAF) se emplearon como modelos de búsqueda. En el reemplazo molecular se obtuvieron valores de la función de translación (translation function Z score, TFZ) de 53.4 y la ganancia de probabilidad logarítmica (log-likelihood gain, LLG) de 4173.4, que indicaban una solución adecuada, y además se encontró una molécula del complejo en la unidad asimétrica. Se hicieron ciclos iterativos de afinamiento utilizando PHENIX Real-space refinement (Afonine et al., 2012) con las optimizaciones de peso activadas para equilibrar las contribuciones relativas de los términos experimentales y de restricción de coordenadas individuales. Entre cada afinamiento se alternó la construcción manual del modelo en COOT (Emsley et al., 2010). El modelo se construyó verificando los mapas de densidad electrónica $2F_o-F_c$ y F_o-F_c para minimizar el sesgo.

Para determinar la estructura del complejo Fab/IgE 2F5-DDDK-rHev b 8 a 3.34 Å de resolución, utilizamos en el reemplazo molecular las coordenadas del complejo a 3.04 Å, y se siguió la metodología antes descrita. Las estadísticas de procesamiento y afinamiento de datos para ambos modelos se muestran en la Tabla 3. Para el análisis de las intercaras proteína-proteína se utilizó la calculadora de interacción de proteínas (PIC) (Tina et al., 2007) y PDBsum (Laskowski, 2009).

Los datos colectados a 3.75 Å para el Fab/IgE 2F5 se escalaron con XDS (Kabsch, 2010a, 2010b) y el grupo espacial se verificó con Aimless (Evans & Murshudov, 2013). El cristal era monoclinico y pertenecía al grupo espacial monoclinico I121. El coeficiente de Matthews (2.25 Å³/Da) sugirió tres moléculas en la unidad asimétrica. La estructura de Fab/IgE 2F5 se determinó por reemplazo molecular usando PHASER (McCoy et al., 2007) y se utilizó la estructura del Fab perteneciente al complejo Fab/IgE 2F5-DDDK-rHev b 8 a 3.04 Å como modelo de búsqueda. Realizamos ciclos de afinamiento iterativos utilizando PHENIX Real-space refinement (Afonine et al., 2012), alternando la construcción manual del modelo con COOT (Emsley et al., 2010). El modelo se integró en los mapas de densidad electrónica $2F_o-F_c$ y F_o-F_c . Durante los afinamientos fue activada de forma automática la función "Weight optimization of real-space refinement". Todas las figuras de la estructura se generaron utilizando Chimera (Pettersen et al., 2004) y PyMOL (DeLano, 2002). El servidor Praline (Simossis & Heringa, 2005) fue utilizado para alinear secuencias.

Las coordenadas atómicas se depositaron en el Banco de Datos de Proteínas con los códigos de acceso 7SBD (Complejo con resolución de 3.04 Å), 7SBG (Complejo con resolución de 3.34 Å) y 7SD2 (Fab con resolución de 3.75 Å).

Producción y purificación de las IgG 1B4 y 2D10

Los anticuerpos monoclonales 1B4 y 2D10 se produjeron a partir de células de hibridoma (Mares-Mejía et al., 2016), crecidas en medio RPMI-1640 suplementado con piruvato de sodio, L-glutamina, aminoácidos no esenciales, antibiótico y 3% de suero fetal bovino (SFB) en una atmósfera húmeda a 37°C con 5% de CO₂. Las

IgGs son excretadas por las células, por lo que se colectó el sobrenadante y se descartó el paquete celular centrifugando a 2000 g durante 20 min. El sobrenadante se filtró por una membrana de 0.22 μm y se aplicó a una columna de afinidad de rHev b 8 unido covalentemente a la resina Affi-gel-15 (Biorad, CA, USA), esta columna es preparada por nosotros y equilibrada con amortiguador PBS. Las IgGs fueron eluidas por cambio de pH con amortiguador Glicina-HCl 0.2 M, pH 2.8, colectándose en fracciones de 800 μL en tubos que contenían 200 μL de amortiguador Tris-HCl 2 M, pH 8.0 para neutralizar el pH.

Tinción de glicoproteínas

Un SDS-PAGE en gradiente (7.5, 10 y 12%) fue cargado con el complejo Fab/IgE 2F5-rHev b 8, la IgE 2F5, el complejo Fab/IgG 2D10-rHev b 8, la IgG 2D10, el complejo Fab/IgG 1B4-rHev b 8, la IgG 1B4, la profilina rHev b 8, la peroxidasa de rábano como control positivo y el inhibidor de tripsina de la soya como control negativo. La tinción del gel se realizó de acuerdo con el protocolo de tinción de glicoproteínas de Pierce (Thermo Scientific, USA), el cual es un kit conveniente, rápido y sensible para teñir proteínas glicosiladas en geles de poliacrilamida utilizando el método del ácido peryódico de Schiff (PAS).

MALDI-TOF

Determinamos las masas moleculares de rHev b 8 recombinante (construcción completa), el Fab/IgE 2F5 y el complejo Fab/IgE 2F5-rHev b 8 (construcción completa) usando espectrometría de masas de desorción/ionización láser asistida por matriz-tiempo de vuelo (MALDI -TOF) (Microflex; Bruker Scientific LLC, Billerica, MA, EE. UU.). Los estándares para la calibración de masas fueron lisozima (14.4 kDa) y albúmina de suero bovino (BSA) (66.43 kDa). La matriz utilizada fue una solución saturada de ácido sinapínico en acetonitrilo acuoso al 30% (v/v) y ácido trifluoroacético al 0,1% (v/v). Las muestras se analizaron utilizando el software FLEX ANALYSIS 3.0TM (Bruker).

Resultados y Discusión

La cristalografía de rayos X proporciona información estructural a nivel atómico, por lo que es considerada como el estándar de oro para las caracterizaciones estructurales de los anticuerpos. No obstante, es la técnica más compleja ya que demanda cristales adecuados, estos cristales son difíciles de obtener debido a que los cribados con las diferentes condiciones de cristalización requiere grandes cantidades y homogéneidad del anticuerpo. Para evitar estas complicaciones comúnmente se utilizan anticuerpos monoclonales (aquellos que provienen de una misma clona o célula productora, produciéndose anticuerpos idénticos), así como anticuerpos recombinantes (aquellos que se producen bajo técnicas de biología molecular), aunque estos últimos tienen como desventaja la carencia de un apareamiento natural de las cadenas que los componen.

En este trabajo se utilizó un anticuerpo monoclonal IgE para conocer cuál es el epítipo y la dinámica del mismo cuando reconoce al alérgeno. Sin embargo, es importante resaltar que los anticuerpos propios de un individuo son policlonales (reconocen diferentes epítipos porque provienen de diferentes clonas), y que existe una diversidad polimórfica en los dominios constantes. Previamente, Mares-Mejía et al., 2020, reportaron que la IgE 2F5 fue capaz de bloquear al 30% de los anticuerpos policlonales de tipo IgE en una mezcla de sueros de pacientes alérgicos a profilina, indicando que éste es el porcentaje de anticuerpos policlonales que comparten el mismo epítipo o una región semejante del epítipo.

Purificación de la IgE 2F5

La IgE fue purificada mediante una columna rHev b 8 acoplada a la resina Affi-gel-15, preparada en el laboratorio. Las fracciones obtenidas (5-23) se juntaron y se concentraron (Fig. 7). El resultado de la purificación se muestra en el SDS-PAGE bajo condiciones no reductoras (NR) o reductoras (R) (Fig. 7).

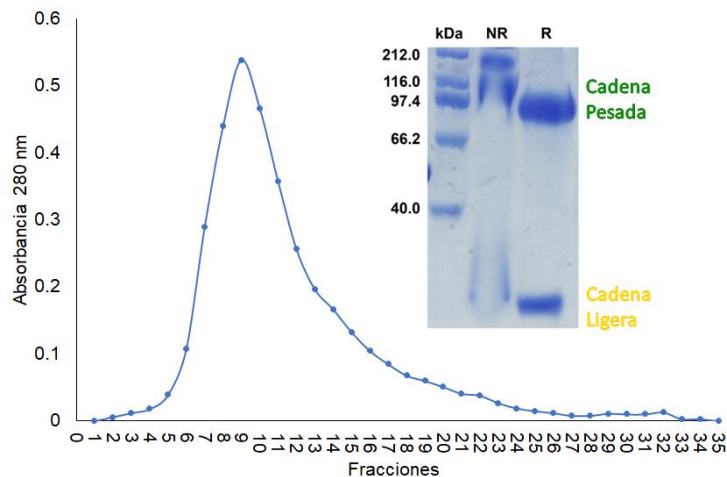


Fig. 7. Purificación de la IgE 2F5 a partir del sobrenadante de la hibridoma mediante la columna Affi-gel-15-rHev b 8, y SDS-PAGE al 12% de la IgE en condiciones no reductoras (NR) y reductoras (R), marcador de peso molecular high range (Biorad), tinción con Coomassie G250.

La IgE 2F5 reconoce la profilina rHev b 8 después de dos tratamientos de desnaturalización

El espectro de dicroísmo circular (CD) de rHev b 8 a 25 °C en la región lejana del UV muestra dos bandas negativas centradas en 218 y 208 nm y una banda positiva en 199 nm, lo que indica una cantidad significativa de hebras beta y hélices alfa. Este resultado concuerda con la estructura 3D reportada en el PDB con el código de acceso 5FDS (Fig. 8A).

Las profilinas han sido reportadas como proteínas altamente estables a los tratamientos térmicos, por lo que se realizaron ensayos de calentamiento y enfriamiento (recocido), encontrando que esta proteína es capaz de recuperar la mayor parte de su estructura secundaria después de calentarla gradualmente de 25 a 90 °C, y enfriarla gradualmente a 25 °C. La banda centrada en 218 nm se modificó notablemente después de los procedimientos térmicos; sin embargo, se recuperó parte del contenido de hélice alfa, aunque no en su totalidad (Fig. 8A). Sorprendentemente rHev b 8 puede ser reconocido por la IgE 2F5 después de haber sido sometido dos veces al recocido, esto implica que existe una porción de proteína plegada y otra desplegada, lo que se confirmó a través de un ELISA. En este ELISA

usamos a la profilina de maíz (rZea m 12), como control negativo, debido a que no es reconocida por la IgE 2F5, (Fig. 8B) y a rHev b 8 sin tratamiento, como control positivo. También, mediante un Western blot (Fig. 8C) confirmamos que la IgE 2F5 reconoce a rHev b 8 después del tratamiento con agentes desnaturizantes y alta temperatura (SDS y beta-mercaptoetanol, 95 °C).

Se ha demostrado que numerosos alérgenos presentan una gran estabilidad ante condiciones adversas. También se ha demostrado que la IgE de individuos alérgicos puede reconocer a los alérgenos después de una recuperación parcial o total de sus estructuras tridimensionales (Pekar et al., 2018; Sirvent et al., 2012). De acuerdo con nuestros ensayos de dicroísmo circular, obtenidos en función de la temperatura, Hev b 8 es un panalérgeno excepcionalmente estable. Esta profilina después de un proceso de recocido es capaz de recuperar parcialmente su estructura 3D, pero presumiblemente aún podría desencadenar una respuesta alérgica después de dos procedimientos térmicos debido a que detectamos el 56% del reconocimiento original usando la IgE 2F5 (Fig. 8A, B). La estabilidad de la profilina es esencial en el reconocimiento de anticuerpos y plantea interrogantes sobre por qué algunas profilinas se han subestimado como alérgenos relevantes.

Es importante destacar que rHev b 8 no es la única profilina reportada como termoestable; la profilina de mostaza Sin a 4 fue reconocida por las IgE del suero de los pacientes alérgicos posterior a realizar un despliegue térmico. Durante el proceso se registró la elipticidad a 220 nm mientras se calentaba (25-85 °C) o se enfriaba (85-25 °C) a 1 °C/min con un baño de circulación de agua controlado por computadora (Sirvent et al., 2012). Este hecho sugiere que cocinar los alimentos o someter los alérgenos a otras condiciones adversas como la vulcanización del látex (altas temperaturas, azufre y sustancias químicas) puede no ser suficiente para prevenir una respuesta alérgica.

También, hay que agregar que los alérgenos tienden a formar oligómeros en un amplio rango de concentraciones y tienen como efecto el aumento de la estabilidad a temperaturas altas, a cambios de pH y a la degradación proteolítica. Esta oligomerización puede generar epítomos adicionales en regiones de contacto

monómero-monómero o incrementar el número de epítomos para la unión de la IgE, facilitando el fenómeno de entrecruzamiento que involucra al receptor de la IgE (FcεRI), la IgE y al alérgeno (Hasan-Abad et al., 2022) detallado en la figura 3. Entonces la vía de exposición puede ser determinante para despertar una respuesta alérgica, esto recordando que las vías de exposición a los alérgenos pueden ser por ingestión, inhalación, picadura o contacto. En el caso de los panalérgenos como las profilinas, aumenta la probabilidad de una exposición con el alérgeno que no fue sometido a condiciones drásticas, como las profilinas de polen o de frutos. Por lo tanto, sabemos que la vía de exposición y la cantidad del alérgeno es crucial para la sensibilización y su posterior respuesta alérgica (Traidl-Hoffmann et al., 2009).

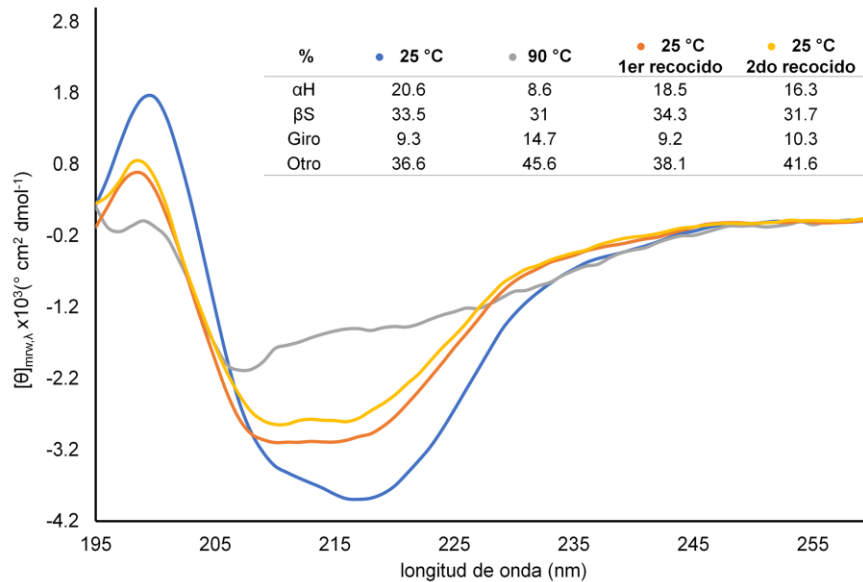
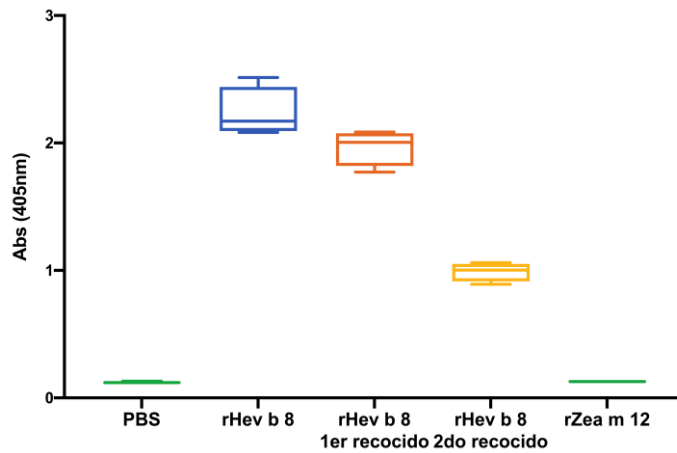
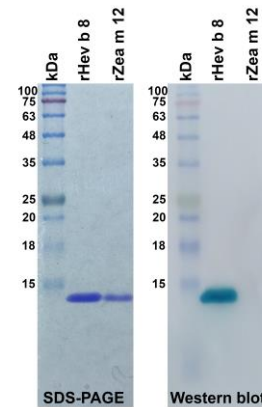
A**B****C**

Fig. 8. Estabilidad de la profilina rHev b 8. **A.** Espectros de dicrósmo circular (CD) en la región lejana del UV a diferentes temperaturas: 25 °C antes del tratamiento térmico (azul), 90 °C (gris) y primer (naranja) y segundo (amarillo) proceso de recocado ($n=3$). La Tabla muestra los porcentajes de estructura secundaria (α H, α -hélice; β S, lámina β , Giros y Otros). **B.** Gráfica de caja y bigotes del ELISA que muestra los resultados del reconocimiento de rHev b 8 después del primer y segundo procedimiento térmico, se usó rZea m 12 como control negativo. Las barras de error representan las desviaciones estándar de las medias de cuatro repeticiones. **C.** Izquierda: SDS-Page que muestra rHev b 8 y rZea m 12, Derecha: Western blot. IgE 2F5 reconoció a rHev b 8, pero no reconoció a rZea m 12, marcador de peso molecular BLUEstain (GOLDBIO), tinción con Coomassie G250.

Fragmentación de la IgE 2F5

El estudio estructural de los anticuerpos intactos es complejo debido a la gran flexibilidad que presentan los anticuerpos a través de los dominios que los componen. Una forma de disminuir esta flexibilidad es trabajar por separado con el fragmento de unión al antígeno (Fab) o el fragmento cristalizante (Fc) facilitando su cristalización. Esta fragmentación comúnmente se realiza con proteasas como ficina, papaína o pepsina.

Haba y Nisonoff en 1991 reportaron una metodología para la fragmentación de una IgE; por esta razón, la IgE 2F5 fue fragmentada con papaína. Primero se realizó una cinética a los tiempos 0, 2, 4, 6, 8, 12, y 16 horas (Fig. 9A). En esta cinética se pudo observar la presencia de la IgE intacta aproximadamente en 200 kDa, un fragmento que previamente fue reportado como un corte incompleto entre los dominios C ϵ 2 y C ϵ 3 denominando como (Fab')₂ con una masa de aproximadamente 115 kDa, el Fab/c correspondiendo al Fab y el C ϵ 2, que forma parte del Fc, con una masa aproximada de 93 kDa, el Fab alrededor de 57 kDa, y una banda alrededor de 26 kDa que podría corresponder a los fragmentos de los dominios C ϵ del Fc.

Después, mediante un gel SDS-PAGE se probó la unión de los fragmentos a la rHev b 8 acoplada a la resina Affi-gel-15, esto cargando directamente la resina con el complejo unido en el SDS-PAGE. De este modo se observó que los fragmentos del anticuerpo son capaces de unirse después del proceso de corte (Fig. 9B).

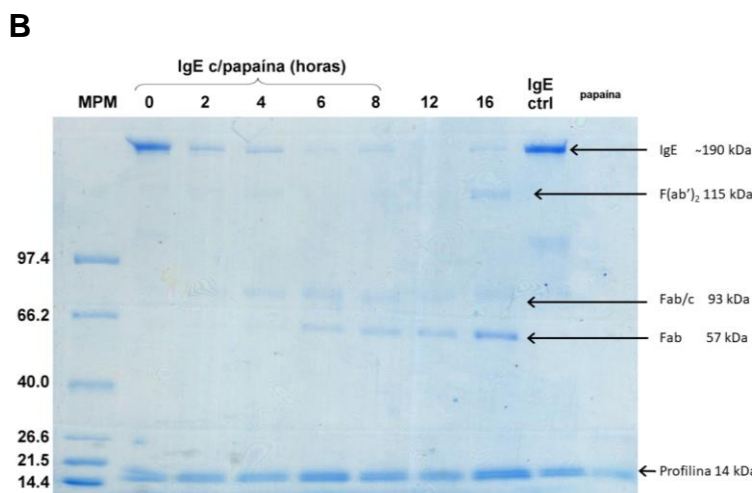
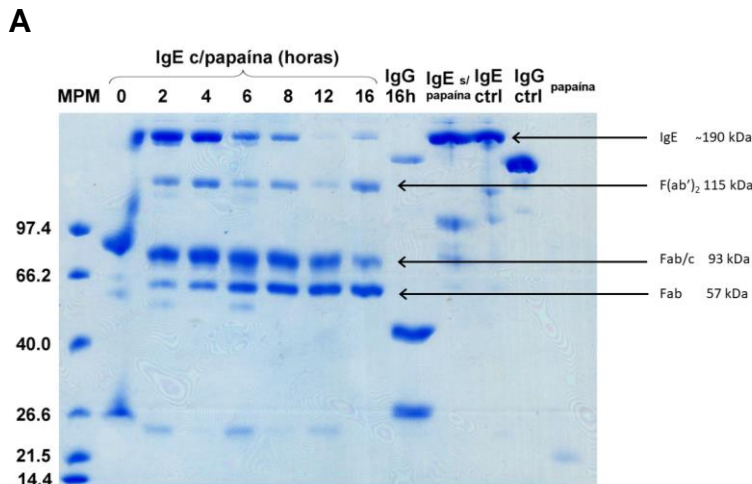


Fig. 9. Fragmentación de la IgE. **A.** SDS-PAGE en gradiente (7.5, 10 y 15 %) de la fragmentación de la IgE con papaína a tiempo 0, 2, 4, 6, 8, 12 y 16 horas, control positivo de corte de la IgG, control de IgE sin papaína, control de IgE e IgG sin tratamiento proteolítico. **B.** SDS-PAGE en gradiente (7.5, 10 y 15 %) de las pruebas de unión a la rHev b 8 acoplada a la resina de Affi-gel-15 para cada tiempo de fragmentación (0, 2, 4, 6, 8, 12 y 16 horas), marcador de peso molecular low range (Biorad), tinción con Coomassie G250.

Sin embargo, al realizar una inspección visual, la banda que corresponde a 57 kDa no se enriqueció mayoritariamente, prevaleciendo bandas a 190, 115, y 93 kDa por lo que se decidió extender el tiempo de fragmentación a 24, 36 y 48 horas (Fig.10A). Nuevamente se probó la unión de los fragmentos a la rHev b 8 acoplada a la resina, observando que los fragmentos del anticuerpo son capaces de unirse al alérgeno a pesar del proceso de corte. El resultado de la fragmentación a 48 horas aumentó la presencia del Fab y dado que no perdió su capacidad de unirse a la rHev b 8 se escogió este tiempo de fragmentación (Fig.10B).

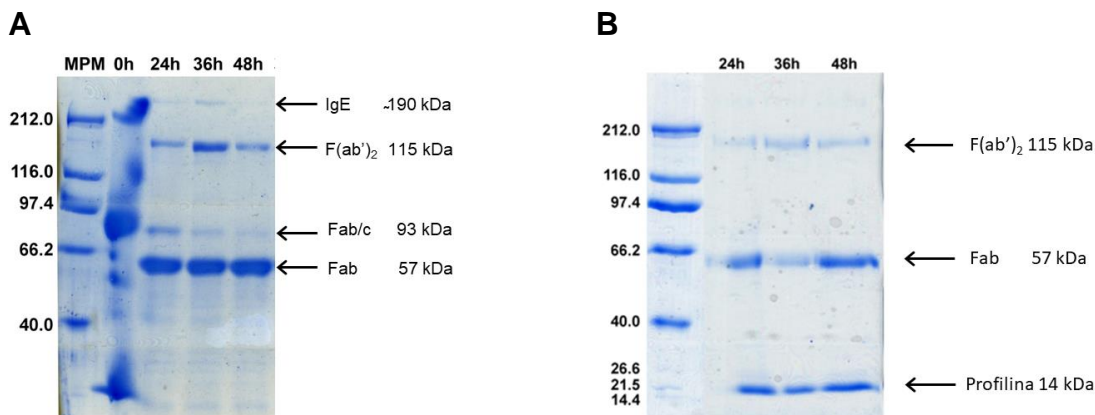


Fig. 10. Extendiendo tiempos de fragmentación. **A.** SDS-PAGE en gradiente (7.5, 10 y 15 %) de la fragmentación de la IgE 2F5 con papaína durante 0, 24, 36 y 48 horas. **B.** SDS-PAGE en gradiente (7.5, 10 y 15 %) de las pruebas de unión a las perlas de rHev b 8 acoplada a la resina Affi-gel-15 para los tiempos de fragmentación 24, 36 y 48 horas. Marcador de peso molecular wide range (Biorad), tinción con Coomassie G250.

Purificación del fragmento Fab/IgE 2F5

Una vez optimizado el tiempo de fragmentación (48h) se procedió a cortar mayor cantidad de IgE 2F5 para obtener mayor concentración del Fab. En un primer intento de purificación, se buscó obtener directamente el Fab mediante exclusión molecular, por lo que los fragmentos resultantes del corte con papaína fueron filtrados con membranas de PVDF y aplicados a la columna Superdex 75 16/60, a un flujo de 0.5 mL/min. El resultado de esta purificación fue la completa separación de la IgE intacta y el fragmento de 115 kDa de los Fab/c y el Fab. Sin embargo, el Fab no fue separado del Fab/c (Fig.11).

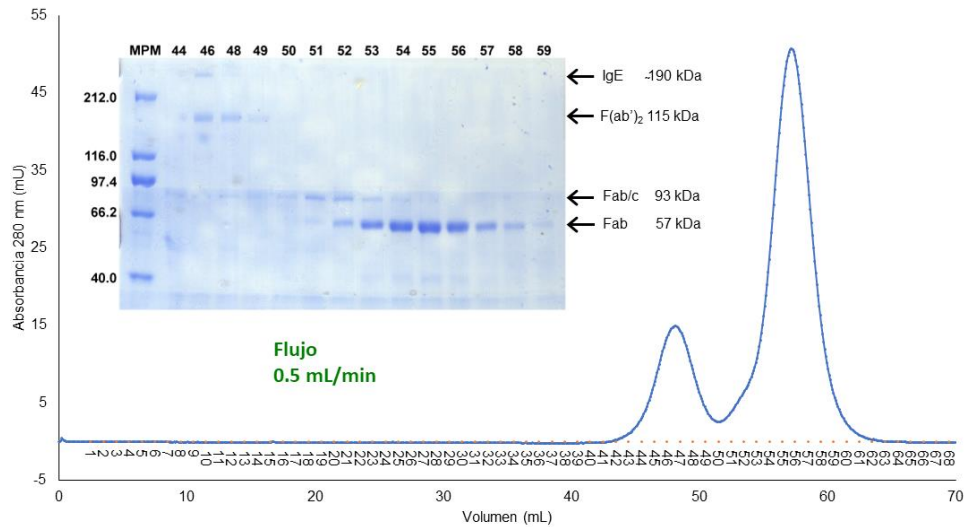


Fig. 11. Cromatograma de la purificación del Fab/IgE 2F5 en la columna Superdex 75 16/60 a un flujo de 0.5 mL/min y su respectivo SDS-PAGE en gradiente (7.5, 10 y 15 %). Marcador de peso molecular wide range (Biorad), tinción con Coomassie G250.

En un segundo intento, se aplicó el resultado de la fragmentación de la IgE 2F5 a la misma columna, pero ahora se utilizó un flujo de 0.3 mL/min con el objetivo de obtener el Fab puro. Sin embargo, tampoco fue posible separar el Fab y el Fab/c, Fig. 12, por lo que se decidió realizar una purificación mediante intercambio iónico con las fracciones que contenían al Fab y al Fab/c (fracciones 53 a 59) obtenidas a partir de la exclusión molecular (Fig. 12).

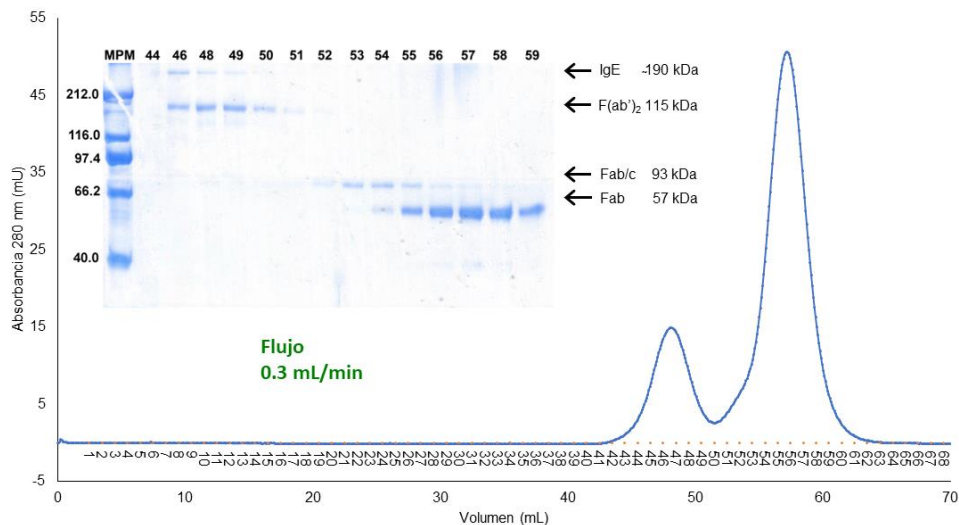


Fig. 12. Cromatograma de la purificación del Fab/IgE 2F5 en la columna Superdex 75 16/60 a un flujo de 0.3 mL/min. Las fracciones en el cromatograma están indicadas en la parte inferior, y las fracciones correspondientes a los picos fueron aplicadas a un SDS-PAGE en gradiente (7.5, 10 y 15 %), las fracciones se indican en la parte superior del gel. Marcador de peso molecular wide range (Biorad), tinción con Coomassie G250.

Las fracciones que contenían a la banda de 57 kDa (54 a 61), cuyas bandas corresponden al Fab, fueron aplicadas a la columna de intercambio iónico Mono Q GL 5/50. La purificación del fragmento Fab mediante intercambio iónico fue favorable, ya que se pudo obtener al Fab puro logrando separarlo del fragmento Fab/c (Fig.13). Las fracciones que contenían al Fab fueron dializadas y concentradas para realizar una prueba de precrystalización y su posterior cribado con los con las condiciones de cristalización disponibles.

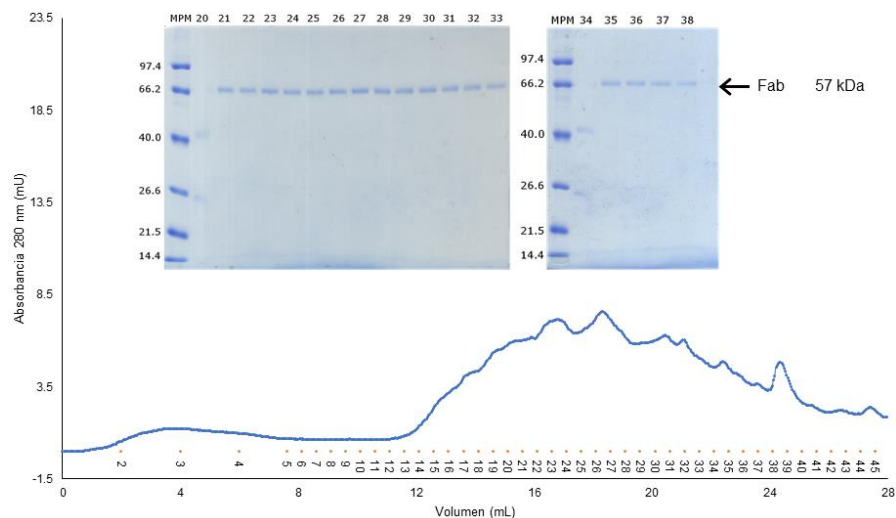


Fig. 13. Cromatograma de la purificación del Fab/IgE 2F5 por la columna de intercambio iónico y sus respectivos SDS-PAGE al 10%. Marcador de peso molecular wide range (Biorad), tinción con Coomassie G250.

Cristalización del complejo Fab/IgE 2F5-Hev b 8

Una vez obtenido el complejo, se dializó en el amortiguador de cristalización (Tris-HCl 20 mM, pH 8.4 con 50 mM de NaCl) y se concentró. Posteriormente se procedió a realizar una prueba utilizando el kit de precrystalización de Hampton Research (PCT). Este kit tiene cuatro condiciones de cristalización: Reactivo A1 (Tris-HCl 0.1 M, pH 8.5, sulfato de amonio 2.0 M), Reactivo B1 (Tris-HCl 0.1 M, pH 8.5, sulfato de amonio 1.0 M), Reactivo A2 (Tris-HCl 0.1 M, pH 8.5, cloruro de magnesio, 0.2 M, 30% w/v polietilenglicol 4,000), Reactivo B2 (Tris-HCl 0.1 M, pH 8.5, cloruro de magnesio 0.2 M, 15% w/v polietilenglicol 4,000). Las condiciones sirven para explorar si la concentración de proteína es adecuada y seleccionar el agente precipitante (sulfato de amonio o polietilenglicol). El resultado de la prueba de

precristalización debía de mostrar agregados si la concentración era adecuada y el agente precipitante también. La única condición que mostró agregados, en forma de microcristales, fue la condición A2 (Fig. 14), mientras que las condiciones A1, B1 y B2 se mostraron claras, indicando así que la concentración también era la adecuada. De este modo descartamos el cribado con los kits de cristalización Crystal Screen I y II que contienen como agente precipitante al sulfato de amonio y seleccionamos a los kits PEG/Ion I y II que contienen polietilenglicol.

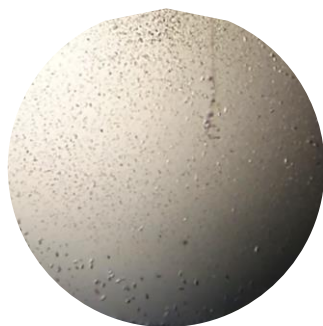


Fig. 14. Pruebas de precristalización. En la condición A2 que contenía Tris-HCl 0.1 M, pH 8.5, cloruro de magnesio, 0.2 M, 30% w/v polietilenglicol 4,000, se observó la presencia de microcristales.

Mediante el cribado realizado con el kit de cristalización PEG/Ion I y II de Hampton Research se obtuvieron cristales en múltiples condiciones después de 9 días (Fig. 15), de los cuales se pudieron coleccionar múltiples juegos de datos.

A1. 0.2M Fluoruro de sodio, 20% w/v PEG 3350



A3. 0.2M Fluoruro de amonio, 20% w/v PEG 3350



B11. 0.2M Formato de amonio, 20% w/v PEG 3350



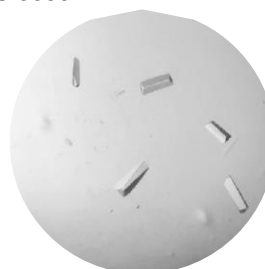
B12. 0.2M Acetato de litio, 20% w/v PEG 3350



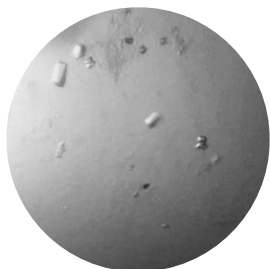
G4. 0.2M Formato de sodio pH 7.0, 20% w/v PEG 3350



G10. 2% v/v Tacsimato™ pH 7.0, 0.1M BIS-TRIS pH 7.5, 20% w/v PEG 3350



H3. 0.04M Acido cítrico, 0.06M BIS-TRIS-Propano pH 6.4, 20% w/v PEG 3350



C1. 0.2M Acetato de magnesio, 20% w/v PEG 3350



G9. 2% v/v Tacsimato pH 6.0, 0.1M Bis-Tris pH 6.5, 20% w/v PEG 3350



Fig. 15. Cristales del Fab/IgE 2F5 donde se muestra la condición de cristalización y los cristales obtenidos después de 9 días.

De los juegos de datos obtenidos se utilizaron los de la condición G9 con una resolución de 3.04 Å y los de la condición B12 con una resolución de 3.34 Å para determinar las estructuras.

Estructura cristalográfica del complejo Fab/IgE 2F5-rHev b 8

La estructura del complejo Fab/IgE 2F5-rHev b 8 a 3.04 Å de resolución, obtenido en la condición G9, mostró la estructura canónica del Fab (cuatro dominios, cada uno con un plegamiento de tipo beta-sándwich) y la estructura del rHev b 8 (siete hebras beta que forman una hoja beta antiparalela y tres hélices alfa). Esta estructura nos permitió observar que el epítipo en rHev b 8 es conformacional y

está formado por las regiones N-terminal y C-terminal, plegadas como hélices alfa, y un asa que conecta la hebra beta 6 y 7. Mediante extensos alineamientos de estructuras de profilinas se ha observado que el plegamiento de las profilinas está altamente conservado; sin embargo, presentan variaciones en la secuencia de aminoácidos (Jockusch et al., 2007). Adicionalmente, se observó una glicosilación en la N189 de la cadena pesada del Fab/IgE 2F5, Fig. 16, la cual consta de cinco carbohidratos, dos N-acetil glucosamina, una fucosa y dos manosas que será detallado más adelante. En la tabla 3 se muestran las estadísticas de la colecta de datos de difracción y del afinamiento.

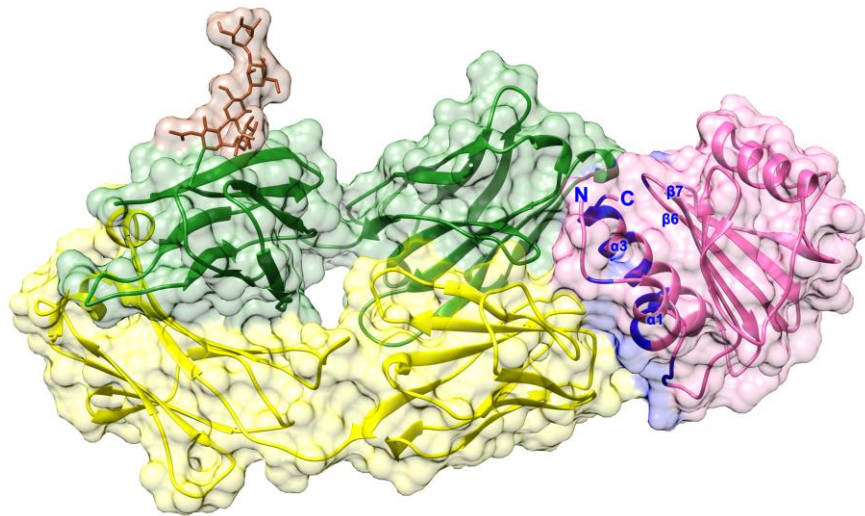


Fig. 16. Modelo en representación de listón y superficie del complejo Fab/IgE 2F5 -rHev b 8 a 3.04 Å de resolución. En rosa se muestran a la profilina Hev b 8, en verde la cadena pesada del Fab/IgE 2F5, en amarillo la cadena ligera del Fab/IgE 2F5, en café la glicosilación de la Asn189 y en azul los residuos que corresponden al epítipo, ubicados en la hélice alfa 1 y 3, y el asa que se encuentra entre la hebra beta 6 y 7 (PDB ID: 7SBD).

La estructura del complejo a 3.34 Å es muy similar a la anterior, el epítipo está localizado en la región N-terminal, C-terminal y el asa que conecta la hebra beta 6 y 7. En esta estructura también se observó la glicosilación en la Asn189 de la cadena pesada; sin embargo, esta glicosilación es más corta, ya que el mapa de densidad electrónica a esa resolución solo permitió interpretar dos N-acetil glucosaminas y una fucosa (Fig. 17). En la tabla 3 se muestra la recopilación de datos y estadísticas del afinamiento.

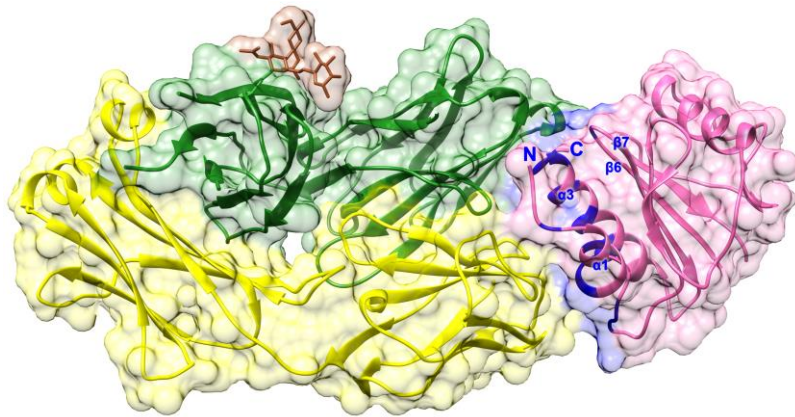


Fig. 17. Modelo en representación de listón y superficie del complejo Fab/IgE 2F5-rHev b 8 a 3.34 Å de resolución. En rosa se muestran a la profilina Hev b 8, en verde la cadena pesada del Fab/IgE, en amarillo la cadena ligera del Fab/IgE, en café la glicosilación de la Asn189 y en azul los residuos que corresponden al epítipo (PDB ID: 7SBG).

Con la finalidad de comparar ambas estructuras, se realizó un alineamiento estructural entre ambos modelos, observando que el Fab/IgE 2F5 es una macromolécula con flexibilidad en los dominios que lo componen. El ángulo del codo (elbow angle), de cada estructura, fue calculado usando el comando elbow angle implementado en PyMOL. El ángulo de la estructura a 3.04 Å es de 131 grados, mientras que en la estructura a 3.34 Å es de 113 grados. Hasta la fecha, la flexibilidad en la región del codo no ha sido reportada para una IgE, la diferencia que se observa entre estos ángulos es de 19.2° y es importante resaltar que, a pesar de esta flexibilidad los CDR se encuentran en una conformación similar (Fig. 18).

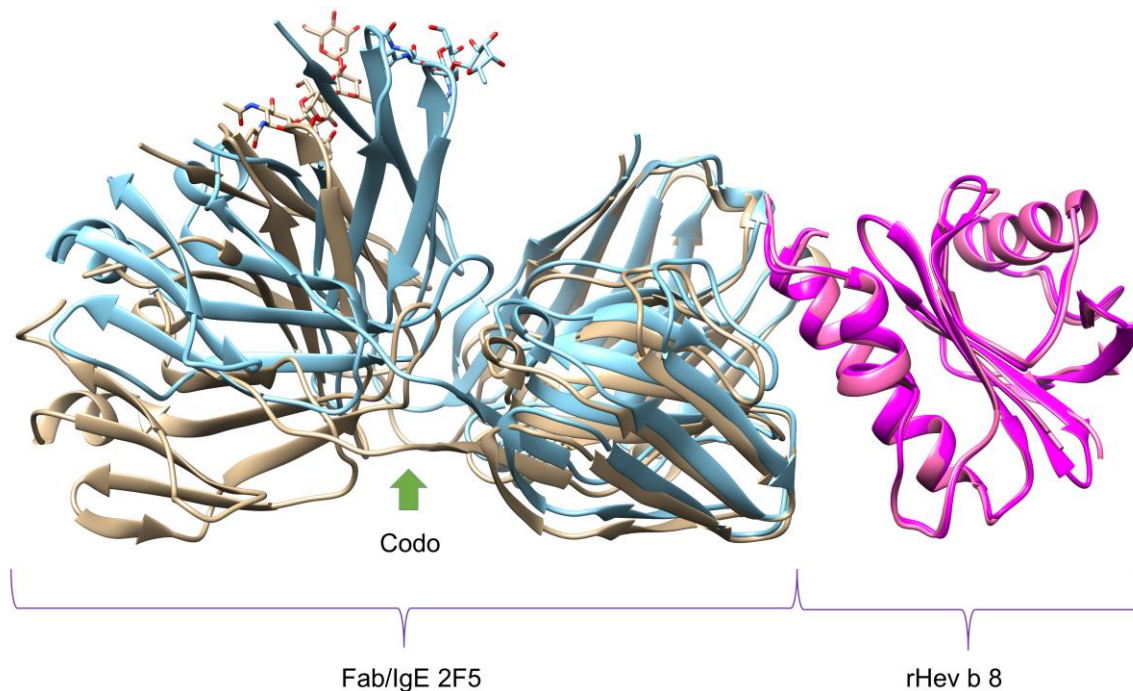


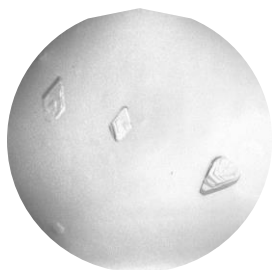
Fig. 18. Alineamiento de las estructuras de los complejos Fab/IgE-Hev b 8 a 3.04 y 3.34 Å, en café y azul respectivamente, en rosa se muestra a la profilina. Los dominios constantes del Fab muestran flexibilidad en el codo con una diferencia entre ángulos de 19.2°, los ángulos fueron medidos utilizando PyMOL. La profilina se muestra en rosa y magenta (PDB ID: 7SBD y 7SBG).

Cristalización del Fab/IgE 2F5

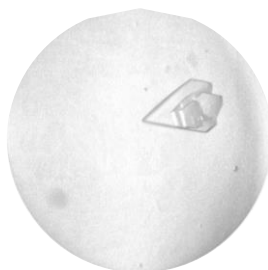
Una vez purificado, dializado (20 mM Tris HCl pH 8.4 con 150 mM de NaCl), y concentrado, el Fab/IgE 2F5 se cribó utilizando el kit PEG/Ion I y II.

El resultado del cribado fue satisfactorio, ya que se obtuvieron cristales en múltiples condiciones después 13 meses. Los cristales obtenidos del Fab/IgE 2F5 se muestran en la Fig. 19. De los cristales obtenidos se pudieron colectar varios juegos de datos, siendo la condición C1 (Acetato de magnesio 0.2 M, 20% w/v PEG 3350) la que difractó adecuadamente para obtener un juego de datos poder resolver una estructura a 3.75 Å de resolución.

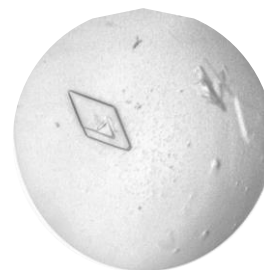
C1. 0.2 M Acetato de magnesio,
20% w/v PEG3350



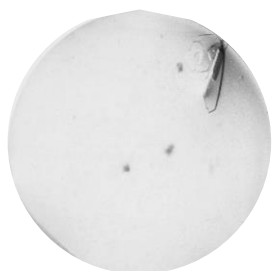
G4. 0.2M Formato de sodio pH
7.0, 20% w/v PEG 3350



G9. 2% v/v Tacsimato™ pH 6.0,
0.1 M Bis-Tris pH 6.5, 20% w/v
PEG 3,350



G10. 2% v/v Tacsimato™ pH 7.0,
0.1M Bis-Tris pH 7.5, 20% w/v
PEG 3350



H3. 0.04 M Acido cítrico, 0.06 M
Bis-Tris propano pH 6.4, 20% w/v
PEG 3,350

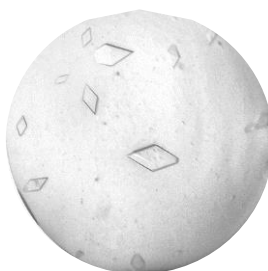


Fig. 19. Cristales del Fab/IgE 2F5 donde se muestra la condición de cristalización y los cristales obtenidos después de 13 meses.

La unidad asimétrica en el cristal del Fab/IgE 2F5 libre muestra tres moléculas de Fab (Fig. 20). Aunque no pudimos modelar todos los residuos de una de las tres moléculas en la unidad asimétrica debido a que la densidad electrónica era pobre en algunas regiones, sin embargo, la densidad electrónica fue suficiente para modelar todas las CDR y la mayor parte de la cadena principal. Las estadísticas de colecta y afinamiento de los datos para este modelo se muestran en la Tabla 3.

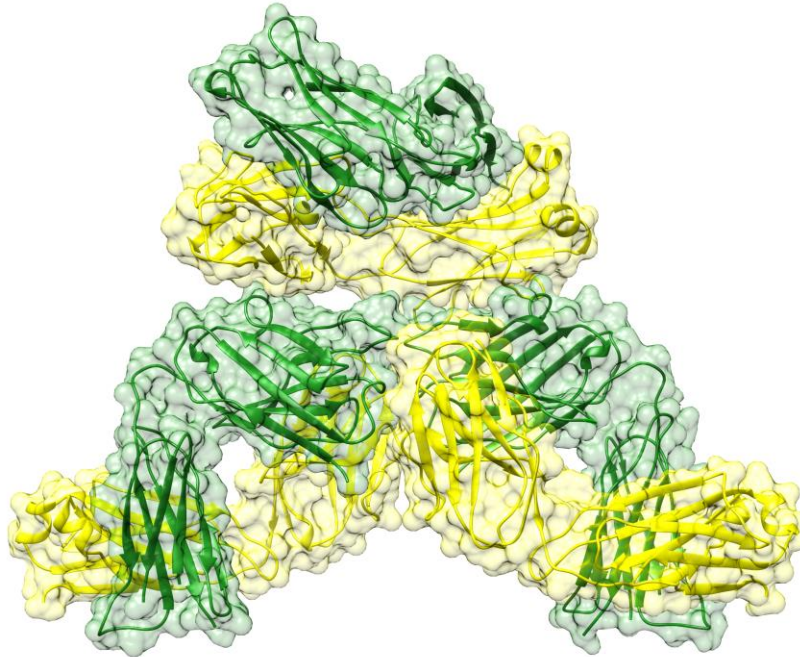


Fig. 20. Fab/IgE 2F5 libre. En verde se muestran las cadenas pesadas y en amarillo las cadenas ligeras de las tres moléculas del Fab/IgE 2F5 libres en la unidad asimétrica a una resolución de 3.75 Å (PDB ID: 7SD2).

La IgE 2F5 no reconoce mediante ajuste inducido a Hev b 8

Para observar si existían cambios en las CDR del Fab por el reconocimiento del alérgeno hicimos una comparación entre la estructura de los tres Fab libres con la estructura del complejo a 3.04 Å (Fig. 21). No se observaron cambios en las CDR cuando se reconoció el epítipo del alérgeno. Esto último indica que no hay flexibilidad en los CDR cuando la IgE reconoce al epítipo de la profilina, es decir, no existe un ajuste inducido en el parátipo; por lo tanto, el reconocimiento es de cuerpo rígido. Esto no implica que el reconocimiento de todas las IgE sea de cuerpo rígido, ya que puede ocurrir algo similar al caso de las IgG en donde existen ambos tipos de reconocimiento. Es importante destacar, que a la fecha no existen suficientes estructuras de IgE, tanto en su forma libre como en complejo, que permitan analizar y explorar las superficies de contacto para para realizar comparaciones.

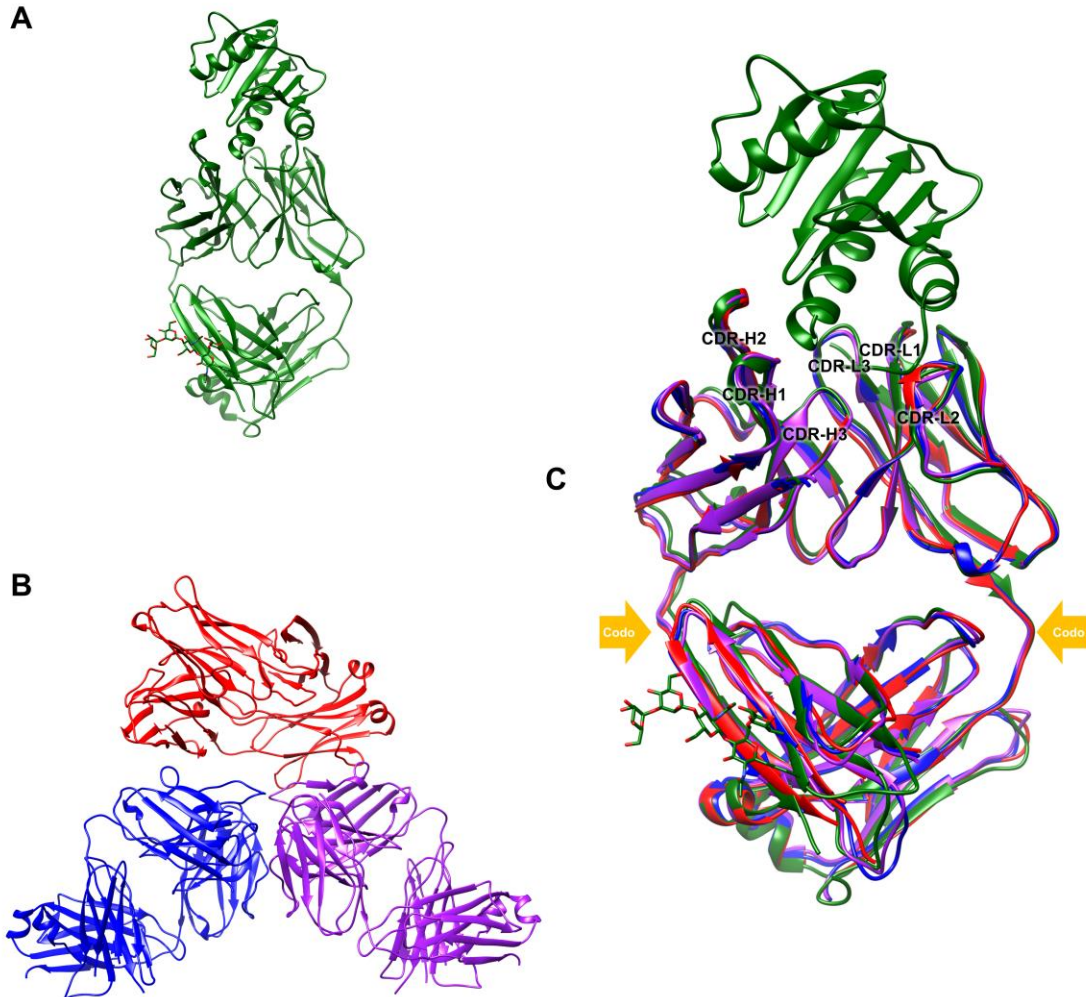


Fig. 21. Reconocimiento de cuerpo rígido. **A.** Estructura del complejo Fab/IgE 2F5-rHev b 8 a 3.04 Å, en la parte superior se observa la profilina, que consta de tres hélices alfa y siete hebras beta, y en la parte inferior izquierda se muestra la glicosilación que está constituida por cinco glicanos. **B.** Las tres moléculas del Fab/IgE 2F5 libres en la unidad asimétrica a 3.75 Å, en estos Fab no se observó la glicosilación. **C.** Superposición de las tres moléculas del Fab/IgE 2F5 libre (rojo, azul y morado) con el complejo Fab/IgE 2F5-rHev b 8 (verde) en la parte superior se observa la profilina. Se muestran las regiones del codo y las CDR de la cadena pesada (H1, H2, H3) y de la cadena ligera (L1, L2, L3) (PDB ID: 7SBD y 7SD2).

También es importante resaltar que la región del codo del Fab/IgE 2F5 libre es comparable con la estructura del Fab en el complejo a 3.04 Å (los RMSD varían de 0.73 Å para cadenas pesadas a 1.1 Å para cadenas ligeras).

Tabla 3. Estadísticas de los datos colectados y del afinamiento.			
	Complejo (PDB ID 7SBD)	Complejo (PDB ID 7SBG)	Fab/IgE (PDB ID 7SD2)
Datos colectados			
Grupo espacial	P 21 21 21	P 21 21 21	I 1 2 1
Resolución (Å)	29.42- 3.04 (3.15- 3.04)	37.57- 3.34 (3.46- 3.34)	44.96- 3.75 (3.88- 3.75)
Celda unitaria <i>a, b, c</i> (Å) <i>α, β, γ</i> (°)	57.96, 77.47, 144.55 90, 90, 90	52.33, 71.45, 132.52 90, 90, 90	91, 103.85, 180.20 90, 94.26, 90
Reflexiones totales	25818 (2330)	13718 (1324)	57215 (4534)
Reflexiones únicas	12929 (1181)	7616 (723)	17207 (15844)
Multiplicidad	2.0 (2.0)	1.8 (1.8)	3.3 (3.3)
Integridad (%)	99.02 (93.21)	98.41 (95.33)	99.09 (99.70)
<i>I</i> / <i>σ</i> (<i>I</i>)	7.12 (1.93)	17.06 (2.89)	8.1 (2.3)
Factor-B de Wilson (Å ²)	68.58	89.27	99.76
<i>R</i> -merge	0.057 (0.270)	0.073 (0.437)	0.110 (0.490)
CC _{1/2}	0.995 (0.853)	0.993 (0.677)	0.991 (0.843)
Afinamiento			
Reflexiones (afinamiento)	12920 (1181)	7536 (715)	17152 (1680)
Reflexiones (<i>R</i> -free)	1293 (118)	978 (93)	799 (63)
<i>R</i> -work / <i>R</i> -free	22.77 / 25.38	24.54 / 29.59	24.66 / 28.43
Número de átomos	4077	3759	8148
macromoléculas	4017	3721	8148
ligandos	60	38	0
Residuos de Proteína	558	547	1231
R.M.S. de enlaces (Å)	0.003	0.003	0.002
R.M.S. de ángulos (°)	0.65	0.64	0.57
Ramachandran favorecido (%)	97.83	98.14	97.03
Ramachandran permitido (%)	2.17	1.86	2.97
Puntuación de choques	5.60	7.04	3.55
Media de factor-B (Å ²)	63.99	73.10	102.02
macromoléculas	63.74	72.91	102.02
ligandos	80.26	91.64	0.00

Las estadísticas de la capa de mayor resolución se muestran entre paréntesis.

Parátopo de la IgE 2F5

En un análisis realizado por (Pomés et al., 2020) donde utilizaron 16 estructuras de anticuerpos (dos IgE y los demás IgG) en complejo con su alérgeno, encontraron que los parátomos están formados por 18 a 28 residuos que interactúan con epítomos formados por un número similar de aminoácidos. Además, observaron que los parátomos tienen un contenido muy alto de residuos de tirosina, serina y glicina; un contenido alto de residuos aromáticos (tirosina, triptófano, fenilalanina e histidina), y, un contenido bajo de isoleucina, leucina, lisina, metionina y prolina. En la mayoría de los complejos la cadena pesada del anticuerpo proporciona la mayor contribución al área total de la interfase; sin embargo, también detallan que esta contribución no siempre es significativamente mayor que la contribución de la cadena ligera.

El parátomo del anticuerpo IgE 2F5 esta formado por 16 residuos polares, básicos e hidrofóbicos. Los residuos de la cadena pesada que forman el parátomo son T31, Y32 y A33 (CDR-H1); R50, R52, T55 y N56 (CDR-H2); y H101 y V102 (CDR-H3); y los residuos de la cadena ligera son N28, H30, N31 e Y32 (CDR-L1); N50 (CDR-L2); y F91, W92 e Y96 (CDR-L3) (Fig. 22A).

Epítomo que reconoce la IgE 2F5

El epítomo conformacional en rHev b 8 comprende 18 residuos polares, ácidos, básicos e hidrofóbicos. Como se muestra en la Figura 22B, este epítomo involucra los residuos Y6, D9, H10, C13, E14, I15, M117, I118, L122, I127, Q129 y G130, que establecen interacciones hidrofóbicas y numerosas interacciones no enlazadas (van der Waals y electrostática) con los CDR. Por el contrario, M1, N98, R121, D124, D128 y G130 forman enlaces de hidrógeno con residuos en las CDR. Interesantemente, D124 y D128 establecen puentes salinos con los residuos CDR-H2 R50 y R52, y la Y125 de la profilina establece una interacción aromática con Y32 del CDR-L1 (Tabla anexa 1). Se forma un enlace de hidrógeno de 3.4 Å entre los residuos D-2 en rHev b 8 y el OH de Y49 en framework-L2.

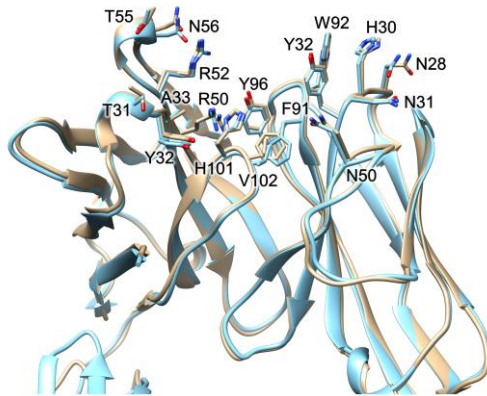
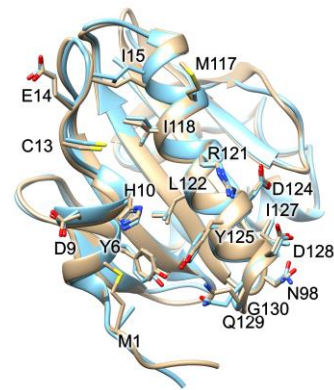
A**B**

Fig. 22. Residuos parátipo-epítipo. **A.** Alineamiento estructural de los modelos a 3.04 Å (dorado) y 3.34 Å (azul) donde se muestran los residuos que forman el parátipo del Fab/IgE 2F5. **B.** Residuos que forman el epítipo. Alineamiento estructural de las profilinas de los modelos del complejo Fab/IgE 2F5-rHev b 8 a 3.04 Å (dorado) y 3.34 Å (azul).

Análisis de la interacción entre el Fab/IgE 2F5 y rHev b 8

Los residuos del parátipo en el Fab/IgE 2F5 forman un surco en el que los residuos hidrófobos y básicos están rodeados por los residuos polares expuestos al disolvente. En la figura 23 se observa que el epítipo exhibe una forma complementaria al parátipo y encaja perfectamente en la superficie del parátipo. También se muestra que el surco en el parátipo está formado principalmente por la cadena pesada.

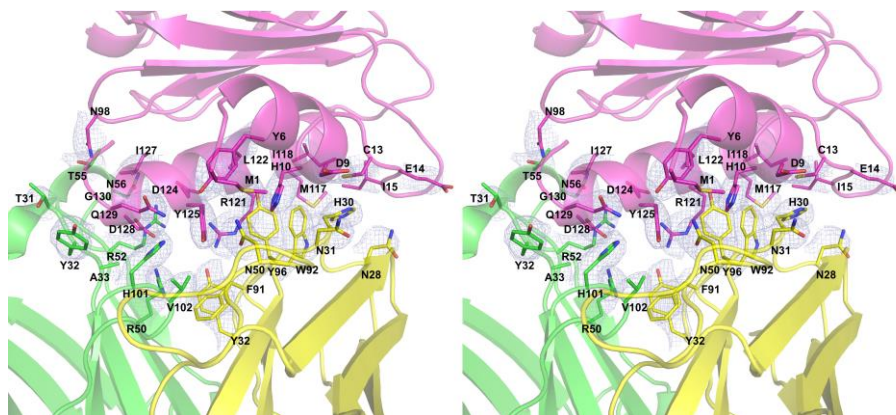


Fig. 23. Vista estéreo de la región de contacto entre parátipo y el epítipo. Se muestra la cadena ligera (amarillo) y la cadena pesada (verde) del Fab/IgE 2F5, y la profilina (rosa), el mapa de densidad electrónica 2F_o-F_c (1σ) se muestra en azul claro. El área de interfaz epítipo-parátipo es de 926 Å².

La formación de los complejos entre anticuerpos y alérgenos son promovidas por interacciones químicas no covalentes (puentes de hidrógeno, interacciones

hidrofóbicas, de van der Waals, carga-carga catión- π y π - π). Siendo, las interacciones hidrofóbicas y electrostáticas las más importantes para un contacto primario entre antígenos y anticuerpos. A medida que existe un acercamiento entre el antígeno y el anticuerpo, las interacciones de van der Waals y los puentes de hidrógeno prevalecen, mientras que los puentes de hidrógeno se asocian con la especificidad de la unión (Pomés et al., 2020).

En el análisis realizado por (Pomés et al., 2020) con las 16 estructuras de complejos de anticuerpo-alérgeno encontraron que se forman entre 7 y 16 puentes de hidrógeno, siendo las cadenas pesadas de los anticuerpos responsables de la mayoría de los puentes de hidrógeno formados. Aunque la mayoría de los átomos involucrados en los puentes de hidrógeno pertenecen a las cadenas laterales de los aminoácidos de los parátomos o epítomos, también hay puentes de hidrógeno formados por átomos de la cadena principal. Por otro lado, los aminoácidos con cadenas laterales cargadas con carga positiva (arginina o lisina) y aminoácidos con carga negativa (aspártico o glutámico) forman puentes salinos. También existen interacciones electrostáticas que aumentan la especificidad de unión entre antígenos y anticuerpos. Las cadenas laterales cargadas positivamente pueden participar en las interacciones catión- π (formada por residuos aromáticos (fenilalanina, tirosina, triptófano) y cadenas laterales de arginina o lisina. Por su parte, las cadenas laterales aromáticas pueden formar interacciones π - π .

De acuerdo con el análisis de interacción PIC (Protein Interaction Calculator) (Tina et al., 2007) y PDBsum (Laskowski, 2009), resumido en la figura 24A y detallado en la Tabla anexa 1, las interacciones establecidas entre rHev b 8 y las cadenas ligera y pesada del Fab/IgE 2F5 son: tres puentes salinos, dos interacciones catión- π , ocho interacciones hidrofóbicas, una interacción aromática, numerosos enlaces de hidrógeno e interacciones débiles (interacciones electrostáticas y de van der Waals). Como se comentó antes, existen solamente tres estructuras cristalográficas de Fab/IgE recombinantes, una en complejo con Bos d 5 (beta-lactoglobulina), otra con Phl p 2 (alérgeno del pasto) y la última con Der p 2 (alérgeno del ácaro del polvo), estos Fab muestran superficies planas de interacción de 890, 855 y 749 Å²,

respectivamente, mientras que el Fab/IgE 2F5 presenta un surco con una superficie de 925 \AA^2 .

La afinidad del Fab/IgE 2F5 por rHev b 8

La interacción entre el Fab/IgE 2F5 y rHev b 8 se determinó por interferometría de biocapa (BLI) utilizando NaCl 1M para comparar los resultados de con los informados anteriormente para el complejo IgE 2F5-rHev b 8, debido a que se observó que en ausencia de NaCl 1M no hay disociación del complejo (Mares-Mejía et al., 2016). El sensograma de la interacción entre rHev b 8 y el Fab/IgE 2F5 fue analizado usando un ajuste global 1:1 y considerando la unión no específica (NSB) con el modelo de Asociación-Disociación implementado en GraphPad Prism 8 (Barrows & Van Dyke, 2022; Motulsky), obteniendo un valor K_D de $370 \pm 6.8 \text{ nM}$ (Fig. 24B). La K_D calculada para la IgE en las mismas condiciones es aproximadamente dos órdenes de magnitud inferior (1.7 nM), lo que indica que la fragmentación si afectó a la constante de disociación, probablemente por la pérdida de avididad que posee la IgE bivalente, comparada con la unión univalente del Fab/IgE, es decir, la interacción entre rHev b 8 con el Fab/IgE es menos estable ($k_{off} = 1.4 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$) que la interacción con la IgE ($k_{off} = 3.1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$).

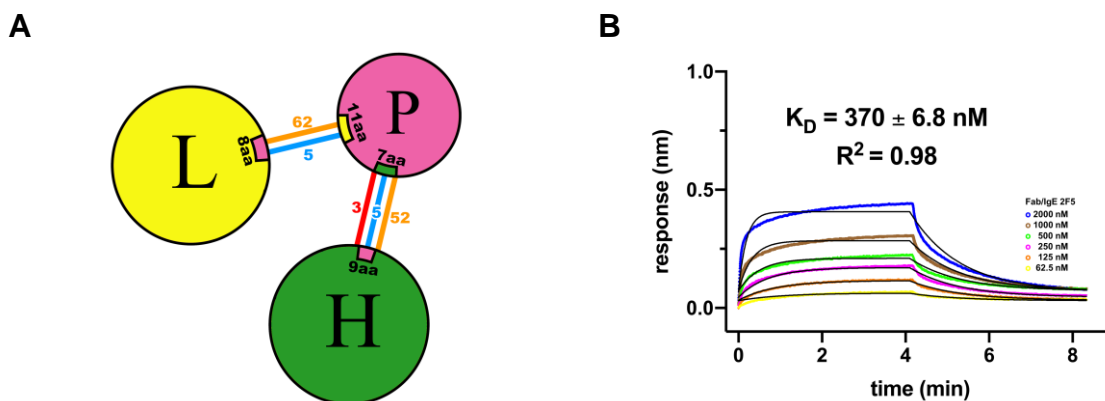


Fig. 24. Interacciones parátipo-epítipo y la afinidad del Fab/IgE 2F5. **A.** Resumen de la red de interacción. Cadena pesada (H), cadena ligera (L) y profilina (P). Los puentes salinos se representan con líneas rojas, los enlaces de hidrógeno con líneas azules y los contactos electrostáticos e interacciones de Van der Waals con líneas naranjas. **B.** Ajuste de BLI considerando unión no específica (NSB) usando el modelo 1:1 de Asociación-Disociación implementado en GraphPad Prism 8. Se probaron seis concentraciones diferentes y se muestran en diferentes colores.

La IgE 2F5 está glicosilada

Para corroborar la presencia de glicosilaciones se usó el kit de tinción de glicoproteínas de Pierce, Fig. 25A, observando en rosa la tinción de la cadena pesada del Fab/IgE 2F5, la tinción de la cadena pesada de la IgE completa y de las cadenas pesadas de las IgG completas, los fragmentos Fab de las IgG no se tiñeron dado que no presentan glicosilaciones. Posteriormente, el mismo gel fue teñido con Azul de Coomasie observando en azul la tinción de los demás fragmentos de las inmunoglobulinas y nuestros controles negativos, Fig. 25B.

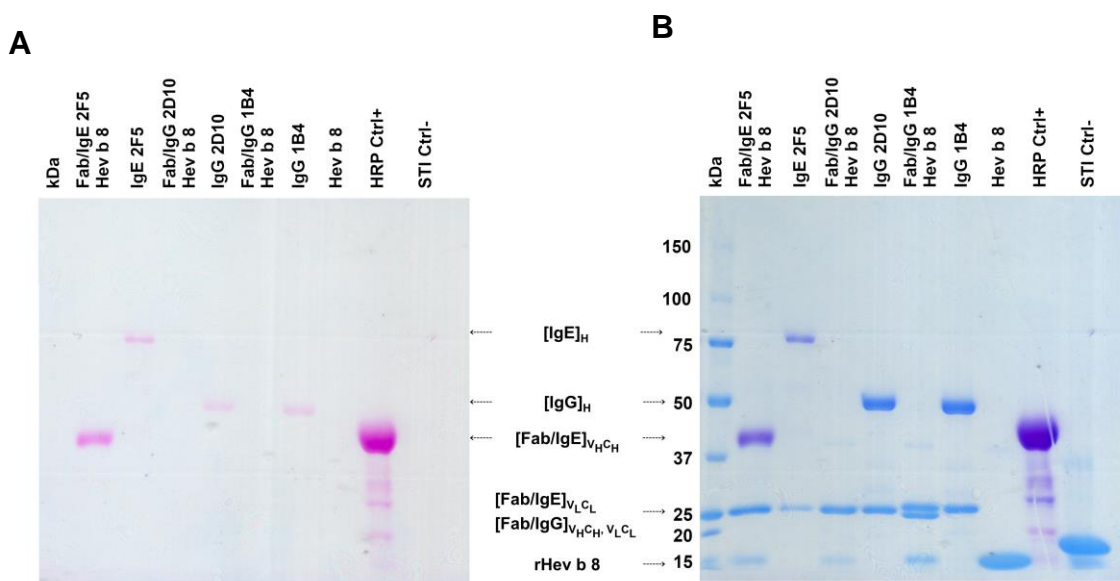


Fig. 25. La IgE 2F5 está glicosilada. **A.** Gel SDS-PAGE en gradiente (7.5, 10 y 12%), en el segundo carril se observa de color rosa la tinción de la cadena pesada del Fab/IgE, en el tercer carril la tinción de la IgE completa, en el quinto y séptimo carril la tinción de las cadenas pesadas de las IgG 2D10 y 1B4 completas, las cadenas pesadas de los fragmentos Fab de las IgG no presentan glicosilaciones, por lo que no se observó su tinción en el cuarto y sexto carril. En el octavo y décimo carril se utilizaron como controles negativos a la profilina (Hev b 8) y el inhibidor de tripsina de soya (STI), en el noveno carril se observa la tinción del control positivo que fue la peroxidasa de rábano (HRP). **B.** El mismo gel teñido con Azul de Coomasie en donde se pueden observar la cadena ligera del Fab/IgE, las cadenas ligeras y pesadas de las IgG, a la profilina Hev b 8 y a la STI teñidas de color azul. Marcador de peso molecular Precision Plus (Biorad).

Masa Molecular del Fab/IgE 2F5

En la estructura del complejo a 3.04 Å observamos en el mapa de densidad electrónica $2F_o - F_c$, una glicosilación en la Asn189 que corresponde a una masa de 967 Da. Esta última está ubicada en el primer dominio constante de la cadena pesada, Fig. 26A y está formada por dos manosas (M) unidas por un enlace β 1-4 a

un núcleo de quitobiosa y que presenta una Fucosa (F) unida a la primera N-acetil glucosamina (NAcGlu) mediante un enlace $\alpha 1-6$, Fig. 26B. El peso molecular determinado por MALDI-TOF del Fab/IgE 2F5 fue de 57 397 Da, mientras el peso molecular calculado a partir de la secuencia es de 46 777 Da, Fig. 26C. Esta diferencia nos indica que 10 620 Da podrían ser debidas a modificaciones postraduccionales. En los Fab/IgE se han reportado tres sitios de N-glicosilación que constan de oligosacáridos con una masa aproximada de 2.2 kDa, por lo que 4.4 kDa de la masa podría deberse a oligosacáridos más largos que forman a las glicosilaciones o a otro tipo de modificaciones postraduccionales presentes en los anticuerpos murinos.

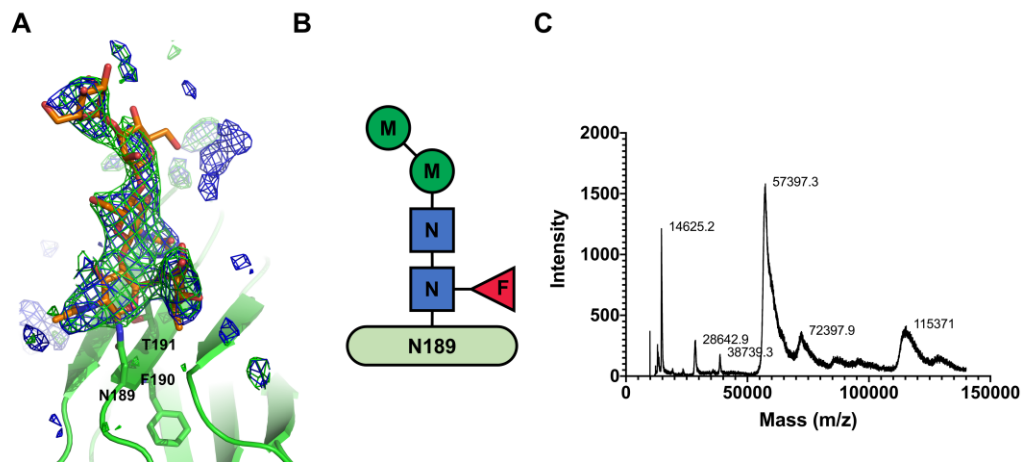


Fig. 26. A. Modelo de listón del Fab/IgE 2F5 en complejo con la profilina rHev b 8 donde se muestra el mapa de pólder a 3σ (azul) y el mapa de omisión a 3σ (verde) para la glicosilación en N189. **B.** Composición del glicano unido a N189 de tipo complejo en el Fab/IgE. Consiste en un núcleo de dimanosa unido al núcleo de quitobiosa (GlcNAc2) y una fucosa. Abreviaturas: N, GlcNAc; M, manosa; F, Fucosa; G, Galactosa; S, ácido siálico. **C.** Espectrometría de masas MALDI TOF. Espectros de masas de DDDK-rHev b 8 (14625 Da) y del Fab/IgE 2F5 (57397.3 Da). Se utilizó lisozima (14100 Da) y albúmina de suero bovino (66410 Da) para calibrar el espectro. También se detectaron picos del complejo Fab/IgE 2F5-DDDK-rHev b 8 (72397.9 Da) y el Fab dimérico (115371 Da); sin embargo, estos dos picos no fueron calibrados.

Pruebas de reactividad cruzada de la IgE 2F5

El inmuno-ensayo realizado con la IgE descartó que exista reactividad cruzada con la proteína-tipo quitinasa (rHev b 11 o CLP1) y con la heveína, (Hev b 6.02), las cuales han sido reportadas como alérgenos, además tienen capacidad de unir carbohidratos de NAcGlu. No hubo reconocimiento de algún epítipo en estos

alérgenos, ni tampoco hubo reconocimiento de las glicosilaciones en la IgE por parte de estas proteínas alergénicas. De esta forma se confirma la alta especificidad de la IgE por rHev b 8. En la Figura 27 se muestran los resultados obtenidos del inmunoensayo usando 20 pmol de IgE.

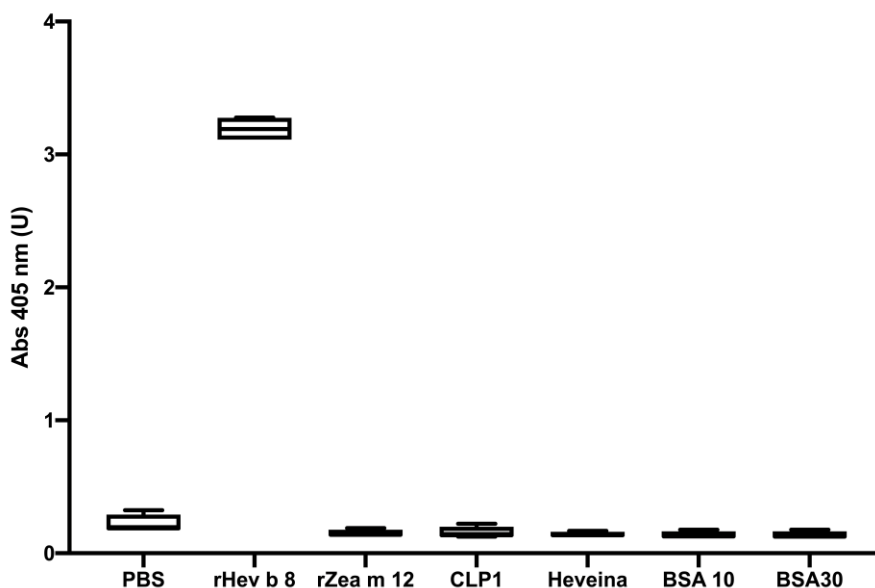


Fig. 27. Diagrama de caja y bigotes del ELISA de la interacción de la IgE, donde PBS es Amortiguador Salino de Fosfatos, Hev b 8 (profilina del árbol del látex, *Hevea brasiliensis*), Zea m 12 (profilina de *Zea mays*), CLP1 (proteína tipo quitinasa alergénica Hev b 11 del árbol del látex), Heveína (alérgeno Hev b 6 del árbol del látex), BSA a 10 y 30 $\mu\text{g/mL}$ (albumina bovina sérica). Se graficó la media de 4 determinaciones independientes y su desviación estándar.

Generando reactividad cruzada

Para generar y explicar la reactividad cruzada de las profilinas en función de la información estructural obtenida, primero realizamos el alineamiento estructural (Fig. 28A) y de secuencia (Fig. 28B) entre rHev b 8 (PDB 5FDS) y rZea m 12 (PDB 5FEF). Gracias a estos alineamientos fue fácil encontrar las regiones de alta conservación que involucran las hélices alfa en las regiones amino y carboxilo terminal. Mediante el alineamiento estructural de la profilina Hev b 8 y la profilina Zea m 12 se identificaron cuatro diferencias en el epítipo que reconoce el Fab/IgE 2F5. Los residuos E14, N98, I118 y el D128 de la profilina Hev b 8 corresponden en la profilina Zea m 12 a D14, G98, V118 y E128 (Fig. 28A, B).

Después realizamos el análisis de la estructura de rHev b 8 unido al Fab/IgE 2F5 mostrando que el D128 en rHev b 8 está sumergido en una cavidad del anticuerpo

que es totalmente complementaria (Fig. 28C). El D128 interactúa con el parátipo a través de R50 y R52 de la cadena pesada estableciendo dos puentes salinos (Tabla anexa 1). Por lo tanto, la presencia de E128 en rZea m 12 ejerce un impedimento estérico significativo. Por otra parte, la N98 (que se corresponde con G98 en rZea m 12) es esencial para estabilizar el complejo porque establece un puente de hidrógeno y cuatro contactos débiles con T55 de CDR-H2. Por lo que G98 no establece ninguna interacción con la T55 (Tabla suplementaria 1), y su mutación también es fundamental para el reconocimiento de Zea m12 por parte del Fab/IgE 2F5.

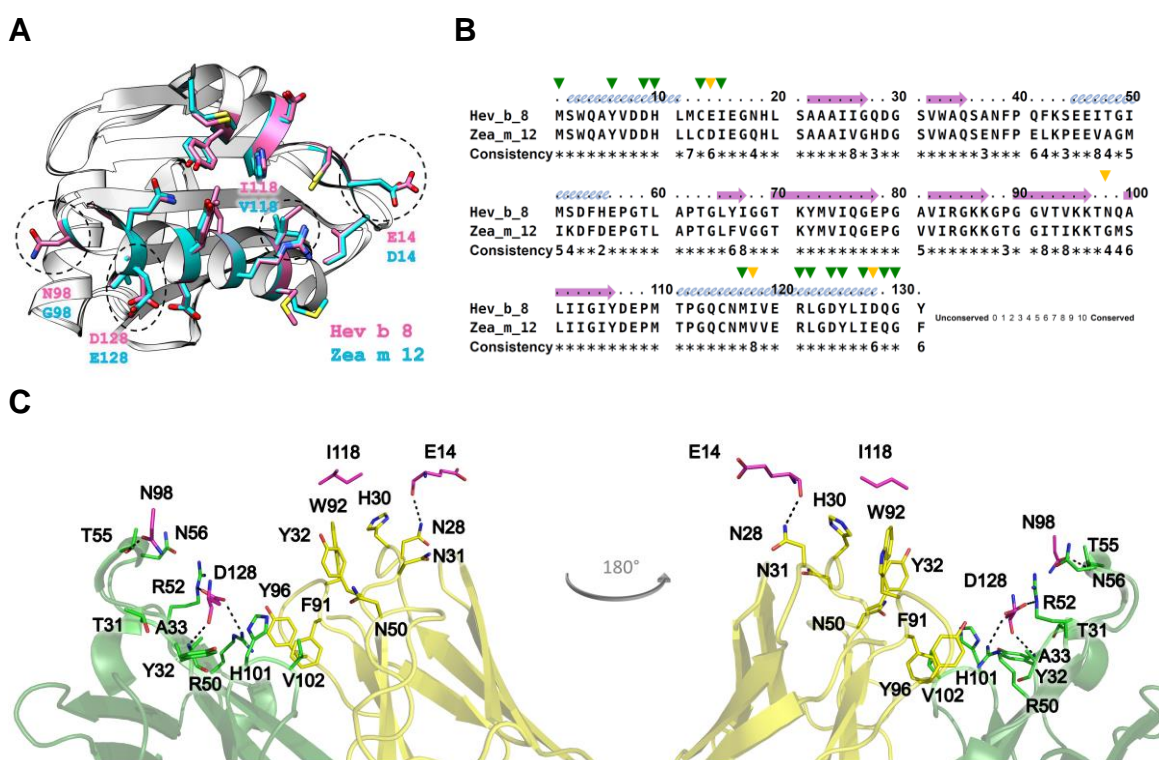


Fig. 28. A. Generando reactividad cruzada. A. Modelos de cinta y barra de perfiles rHev b 8 (rosa) y rZea m 12 (cian) (RMSD 0,307 Å). Los diferentes residuos entre ambas profilinas (E14, N98, I118 y D128) están rodeados por líneas de puntos; esta región del epítipo es parte del sitio de unión de la poliprolina en las profilinas. **B.** Alineamiento de secuencias entre rHev b 8 y rZea m 12, las flechas verdes muestran residuos conservados en el epítipo y las flechas amarillas muestran los residuos diferentes. **C.** Los residuos del parátipo de Fab/IgE 2F5 y los cuatro residuos en rHev b 8, que son diferentes en rZea m 12 se muestran como barras. Los residuos del epítipo rHev b 8 se muestran en rosa, los residuos de la cadena pesada Fab en verde y los residuos de la cadena ligera Fab en amarillo. Las líneas punteadas indican las interacciones entre residuos.

Cinéticas de sobreexpresión y purificación de las mutantes rZea m 12-E128D y rZea m 12-E128D-G98N

Para probar la relevancia de los residuos D128 y G98 en el reconocimiento de rHev b 8 por IgE 2F5 y para comprender la falta de reconocimiento de rZea m 12 por parte del anticuerpo, primero realizamos la mutación E128D y luego una doble mutación E128D-G98N en la profilina de maíz (rZea m 12).

El tiempo de inducción adecuado para la sobreexpresión de la mutante rZea m 12 - E128D y la doble mutante rZea m 12-E128D-G98N es entre 6 y 8 horas. En la figura 29A y B se observa el engrosamiento de la banda alrededor de los 20 kDa a medida que aumenta el tiempo de inducción.

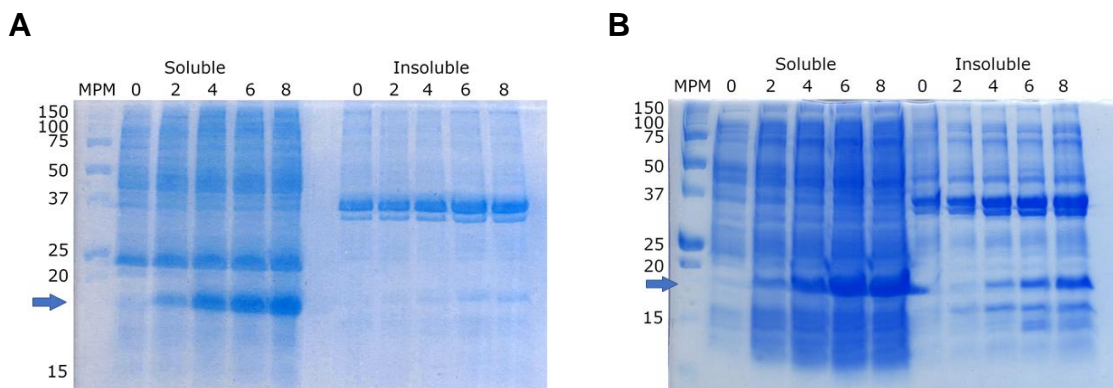


Fig. 29. Cinéticas de sobreexpresión. **A.** SDS-PAGE de la cinética de expresión de rZea m 12 - E128D y **B.** SDS-PAGE de la cinética de expresión de rZea m 12-E128D-G98N. En ambas figuras a la izquierda se muestra la fracción soluble y a la derecha la fracción insoluble a los tiempos 0, 2, 4, 6 y 8 h. La sobre expresión de las mutantes está indicada por la flecha azul. Marcador de peso molecular Precision Plus (Biorad).

Después de ser purificadas las mutantes se observa que migran en un SDS-PAGE de manera similar a la rZea m 12 y a la rHev b 8. Fig. 30.

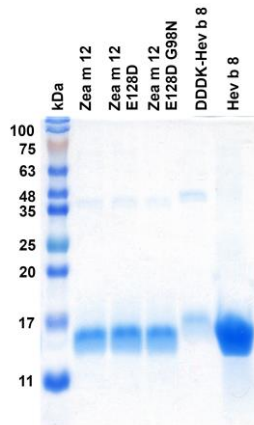


Fig. 30. SDS-PAGE de las profilinas purificadas, rZea m 12, rZea m 12-E128D, rZea m 12-E128D-G98N, DDDK-rHev b 8 y rHev b 8. Marcador de peso molecular BLUEStain (GOLDBIO).

La alta afinidad de IgE 2F5 por rHev b 8 (Fig. 23) se explica por las superficies complementarias entre el parátipo y el epítipo. Además, el alineamiento estructural entre rZea m 12 y rHev b 8 mostró la probable presencia de un impedimento estérico generado por el E128 en rZea m 12, que corresponde a D128 en rHev b 8 (Fig. 28A) y la importancia de N98 en rHev b 8 (G98 en rZea m 12). La relevancia de estos residuos para el reconocimiento de profilina por la IgE 2F5 se verificó con las dos mutantes de rZea m 12 E128D y E128D-G98N.

La mutante rZea m 12-E128D mostró solo un ligero aumento en el reconocimiento, apenas por encima del fondo, mientras que el reconocimiento de la doble mutante de rZea m 12 fue significativamente mayor, alcanzando valores de absorbancia aproximadamente del 50% del observado para la unión de la IgE 2F5 a rHev b 8 (Fig. 31). Los resultados muestran que ambos residuos (D128 y N98) contribuyen de manera importante a la alta estabilidad del complejo. Sin embargo, esta afirmación no significa que los demás residuos involucrados en la interacción no sean importantes, ya que la mutación de estos dos residuos (E128 y G98) en rZea m 12 resultó en un reconocimiento significativo por parte de IgE 2F5, aunque no al mismo nivel que el reconocimiento de rHev b 8 (Fig. 31).

De acuerdo con la prueba de comparaciones múltiples de Sidak (Abdi, 2007), tabla 4, el reconocimiento de la IgE 2F5 sobre las mutantes de rZea m 12 fue significativo comparado con el reconocimiento de rHev b 8 (Fig. 31). En cuanto a E14, no se

realizó ninguna mutación debido a que la interacción la establece el grupo carbonilo del enlace peptídico. Asimismo, el grupo metilo correspondiente al carbono delta de I118 no provoca un impedimento estérico como en el caso del del carbono delta del E128 en rZea m 12 (Fig. 28A, C). Una extensa red de interacciones débiles en la intercara parátopo-epítipo respalda este resultado (Fig. 24b y Tabla anexa 1), a pesar de que ambas profilinas comparten una identidad de secuencia del 79.4 %.

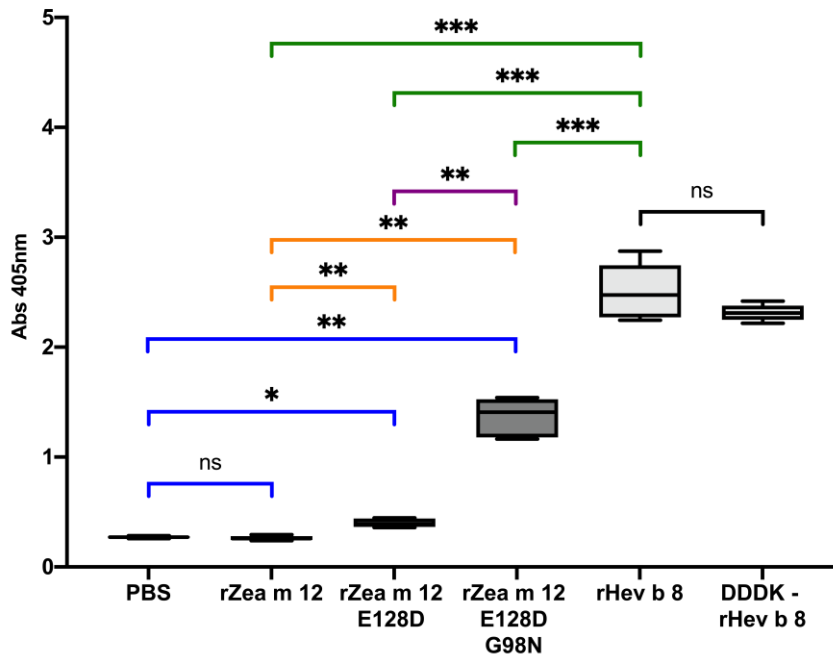


Fig. 31. Inmunoensayo de reactividad cruzada. Diagrama de caja y bigotes que muestra los resultados de ELISA para Zea m 12 y sus mutantes en comparación con rHev b 8, y las pruebas de comparaciones múltiples de Sidak. Para la ELISA de interacción de IgE se utilizó a rHev b 8 y la construcción DDDK-rHev b 8 como controles positivos, rZea m 12 como control negativo, rZea m 12-E128D mutante, rZea m 12-E128D-G98N doble mutante y PBS como control de fondo (ns = no significativo, todos los valores de p inferiores a 0.001 se resumen con tres asteriscos). Para estos experimentos, n=4.

Tabla 4. Prueba de comparación múltiple de Sidak

	Resumen	Valor P
PBS vs. rZea m 12	ns	0.8912
PBS vs. rZea m 12 E128D	*	0.01
PBS vs. rZea m 12 E128D G98N	**	0.0021
PBS vs. rHev b 8	***	0.0005
rZea m 12 vs. rZea m 12 E128D	**	0.0027
rZea m 12 vs. rZea m 12 E128D G98N	**	0.0017
rZea m 12 vs. rHev b 8	***	0.0005
rZea m 12 E128D vs. rHev b 8	***	0.0004
rZea m 12 E128D G98N vs. rHev b 8	***	0.0003
rZea m 12 E128D vs. rZea m 12 E128D G98N	**	0.0019
rHev b 8 vs. DDDK - rHev b 8	ns	0.8374

Conclusiones

El Fab/IgE 2F5 murino es una IgE no recombinante obtenida en respuesta a la inmunización de ratones con el alérgeno rHev b 8. Por lo tanto, la combinación de sus cadenas pesadas y ligeras exhibe un emparejamiento auténtico de un anticuerpo de tipo IgE. Todas las CDR-H y CDR-L son esenciales para unirse a la superficie de la profilina.

La IgE 2F5 intacta permitió a demostrar que el proceso térmico, como cocinar los alimentos e inclusive someter a la profilina a otras condiciones adversas, con algunos agentes desnaturizantes, puede no ser suficiente para prevenir una respuesta alérgica.

La estructura cristalográfica del complejo Fab/IgE 2F5-rHev b 8 reveló que el epítipo es conformacional y discontinuo. Este epítipo no está relacionado con el asa comprendida por los aminoácidos 37 al 52, como se había sugerido previamente, ya que está formado por la α -hélice 1, la α -hélice 3 y el asa que une a la hebra- β 6 con la hebra- β 7 de la Hev b 8. También, es importante destacar que la región del epítipo es el sitio de reconocimiento a cadenas de poliprolina y está altamente conservada en todas las profilinas.

La ausencia de reactividad cruzada entre las profilinas Hev b 8 y Zea m 12 es debida al impedimento estérico que genera el residuo E128 de la Zea m 12, el cual corresponde a D128 en la Hev b 8.

La IgE 2F5 mantiene una alta especificidad por la profilina Hev b 8 debido a la disposición espacial de los residuos que interaccionan tanto del epítipo como del parátipo, y en esta interacción existen tres puentes salinos, ocho interacciones hidrofóbicas, dos interacciones catión- π , una interacción aromática, múltiples puentes de hidrógeno e interacciones débiles (van der Waals y electrostáticas). El número de interacciones reportadas en este trabajo es presumiblemente mayor a las reportadas para otros anticuerpos.

Los alineamientos estructurales de los complejos estructurales a 3.04 y 3.34 Å nos permitieron observar que el Fab/IgE 2F5 tiene flexibilidad en el codo (elbow), lo cual no ha sido reportado previamente para una IgE. No obstante, esta flexibilidad no impacta sobre el reconocimiento del alérgeno. Además, el tipo de reconocimiento de la IgE 2F5 es rígido, ya que no hay un ajuste inducido a la forma del alérgeno, habiendo nula flexibilidad en los CDR.

La caracterización biofísica y estructural del Fab/IgE 2F5 (libre y en complejo con la profilina del árbol del hule y la de maíz) definen aspectos críticos de cómo una IgE, que tiene sus cadenas apareadas naturalmente, reconoce a los alérgenos y cómo se da su reactividad cruzada. Sin embargo, es importante resaltar que este estudio solo es sobre la IgE 2F5, implicando que las conclusiones de este documento no son una generalidad para otras IgE. También es necesario realizar estudios adicionales para generar cambios relevantes sobre la ingeniería de la IgE con el fin de impactar sobre el diagnóstico *in vitro* de las alergias. Finalmente, se busca generar aplicaciones terapéuticas mediante la modulación de la respuesta alérgica cuando la IgE reconoce a los alérgenos.

Perspectivas

A partir de los resultados obtenidos en esta tesis se planea realizar el proceso de humanización del anticuerpo monoclonal murino IgE 2F5 (mIgE 2F5), lo que permitirá estudiar el impacto y las diferencias en la degranulación al utilizar el anticuerpo murino (mIgE 2F5) o el anticuerpo humanizado (hIgE 2F5). Posteriormente, mediante experimentos de cristalografía de difracción de rayos X podremos determinar la estructura del anticuerpo y del complejo alérgeno-anticuerpo con finalidad de corroborar una correcta humanización.

Una vez cumplidas las perspectivas anteriores se planea explotar a esta IgE como herramienta de diagnóstico, de investigación o para inmunoterapias.

Referencias

- Abdi, Herve. (2007). The Bonferonni and Sidak Corrections for Multiple Comparisons. In Salkind N. J. (Ed.), *Encyclopedia of Measurement and Statistics* (pp. 103-107). Thousand Oaks (CA): Sage.
- Afonine, P. V., Grosse-Kunstleve, R. W., Echols, N., Headd, J. J., Moriarty, N. W., Mustyakimov, M., . . . Adams, P. D. (2012). Towards automated crystallographic structure refinement with phenix.refine. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 68(Pt 4), 352-367. doi:10.1107/s0907444912001308
- Akil, C., & Robinson, R. C. (2018). Genomes of Asgard archaea encode profilins that regulate actin. *Nature*, 562(7727), 439-443. doi:10.1038/s41586-018-0548-6
- Arnold, J. N., Wormald, M. R., Sim, R. B., Rudd, P. M., & Dwek, R. A. (2007). The impact of glycosylation on the biological function and structure of human immunoglobulins. *Annu Rev Immunol*, 25, 21-50. doi:10.1146/annurev.immunol.25.022106.141702
- Asero, R., Mistrello, G., Roncarolo, D., Amato, S., Zanoni, D., Barocci, F., & Caldironi, G. (2003). Detection of clinical markers of sensitization to profilin in patients allergic to plant-derived foods. *J Allergy Clin Immunol*, 112(2), 427-432. doi:10.1067/mai.2003.1611
- Barrows, J. K., & Van Dyke, M. W. (2022). Biolayer interferometry for DNA-protein interactions. *PLoS One*, 17(2), e0263322. doi:10.1371/journal.pone.0263322
- Bowles, S. L., Jaeger, C., Ferrara, C., Fingerroth, J., Van De Venter, M., & Oosthuizen, V. (2011). Comparative binding of soluble fragments (derCD23, sCD23, and exCD23) of recombinant human CD23 to CD21 (SCR 1-2) and native IgE, and their effect on IgE regulation. *Cell Immunol*, 271(2), 371-378. doi:10.1016/j.cellimm.2011.08.003

- Brünger, A. T., Leahy, D. J., Hynes, T. R., & Fox, R. O. (1991). 2.9 A resolution structure of an anti-dinitrophenyl-spin-label monoclonal antibody Fab fragment with bound hapten. *J Mol Biol*, 221(1), 239-256. doi:10.1016/0022-2836(91)80217-i
- DeLano, W.L. (2002). Pymol: An open-source molecular graphics tool. *CCP4 Newsletter on Protein Crystallography*, 40, 82-92.
- Ebner, C., Hirschwehr, R., Bauer, L., Breiteneder, H., Valenta, R., Ebner, H., . . . Scheiner, O. (1995). Identification of allergens in fruits and vegetables: IgE cross-reactivities with the important birch pollen allergens Bet v 1 and Bet v 2 (birch profilin). *J Allergy Clin Immunol*, 95(5 Pt 1), 962-969. doi:10.1016/s0091-6749(95)70096-x
- Emsley, P., Lohkamp, B., Scott, W. G., & Cowtan, K. (2010). Features and development of Coot. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 66(Pt 4), 486-501. doi:10.1107/s0907444910007493
- Evans, P. R., & Murshudov, G. N. (2013). How good are my data and what is the resolution? *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 69(Pt 7), 1204-1214. doi:10.1107/s0907444913000061
- Gould, H. J., & Sutton, B. J. (2008). IgE in allergy and asthma today. *Nat Rev Immunol*, 8(3), 205-217. doi:10.1038/nri2273
- Haba, S., & Nisonoff, A. (1991). Proteolytic digestion of mouse IgE. *J Immunol Methods*, 138(1), 15-23. doi:10.1016/0022-1759(91)90059-o
- Hasan-Abad, A. M., Mohammadi, M., Mirzaei, H., Mehrabi, M., Motedayyen, H., & Arefnezhad, R. (2022). Impact of oligomerization on the allergenicity of allergens. *Clin Mol Allergy*, 20(1), 5. doi:10.1186/s12948-022-00172-1
- Hauser, M., Roulias, A., Ferreira, F., & Egger, M. (2010). Panallergens and their impact on the allergic patient. *Allergy Asthma Clin Immunol*, 6(1), 1. doi:10.1186/1710-1492-6-1

- Jockusch, B. M., Murk, K., & Rothkegel, M. (2007). The profile of profilins. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*, 159, 131-149. doi:10.1007/112_2007_704
- Kabsch, W. (2010a). Integration, scaling, space-group assignment and post-refinement. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 66(Pt 2), 133-144. doi:10.1107/s0907444909047374
- Kabsch, W. (2010b). XDS. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 66(Pt 2), 125-132. doi:10.1107/s0907444909047337
- Khatri, Kriti, Richardson, Crystal M, Glesner, Jill, Kapingidza, Anyway Brenda, Mueller, Geoffrey A, Zhang, Jian, . . . Pomés, Anna. (2022). Human IgE monoclonal antibody recognition of mite allergen Der p 2 defines structural basis of an epitope for IgE cross-linking and anaphylaxis in vivo. *PNAS Nexus*, 1(3). doi:10.1093/pnasnexus/pgac054
- Kinet, J. P. (1999). The high-affinity IgE receptor (Fc epsilon RI): from physiology to pathology. *Annu Rev Immunol*, 17, 931-972. doi:10.1146/annurev.immunol.17.1.931
- Kraft, S., & Kinet, J. P. (2007). New developments in FcepsilonRI regulation, function and inhibition. *Nat Rev Immunol*, 7(5), 365-378. doi:10.1038/nri2072
- Laskowski, R. A. (2009). PDBsum new things. *Nucleic Acids Res*, 37(Database issue), D355-359. doi:10.1093/nar/gkn860
- Mares-Mejía, I., García-Ramírez, B., Torres-Larios, A., Rodríguez-Hernández, A., Osornio-Hernández, A. I., Terán-Olvera, G., . . . Rodríguez-Romero, A. (2020). Novel murine mAbs define specific and cross-reactive epitopes on the latex profilin panallergen Hev b 8. *Mol Immunol*, 128, 10-21. doi:10.1016/j.molimm.2020.09.017
- Mares-Mejía, I., Martínez-Caballero, S., Garay-Canales, C., Cano-Sánchez, P., Torres-Larios, A., Lara-González, S., . . . Rodríguez-Romero, A. (2016). Structural insights into the IgE mediated responses induced by the allergens

- Hev b 8 and Zea m 12 in their dimeric forms. *Sci Rep*, 6, 32552. doi:10.1038/srep32552
- McCoy, A. J., Grosse-Kunstleve, R. W., Adams, P. D., Winn, M. D., Storoni, L. C., & Read, R. J. (2007). Phaser crystallographic software. *J Appl Crystallogr*, 40(Pt 4), 658-674. doi:10.1107/s0021889807021206
- Micsonai, A., Wien, F., Bulyáki, É, Kun, J., Moussong, É, Lee, Y. H., . . . Kardos, J. (2018). BeStSel: a web server for accurate protein secondary structure prediction and fold recognition from the circular dichroism spectra. *Nucleic Acids Res*, 46(W1), W315-w322. doi:10.1093/nar/gky497
- Micsonai, A., Wien, F., Kernya, L., Lee, Y. H., Goto, Y., Réfrégiers, M., & Kardos, J. (2015). Accurate secondary structure prediction and fold recognition for circular dichroism spectroscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 112(24), E3095-3103. doi:10.1073/pnas.1500851112
- Mitropoulou, A. N., Bowen, H., Dodev, T. S., Davies, A. M., Bax, H. J., Beavil, R. L., . . . Sutton, B. J. (2018). Structure of a patient-derived antibody in complex with allergen reveals simultaneous conventional and superantigen-like recognition. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 115(37), E8707-e8716. doi:10.1073/pnas.1806840115
- Motulsky, H. J. Equation: Association then dissociation. *GraphPad Curve Fitting Guide*.
- Niemi, M. H., Rytönen-Nissinen, M., Miettinen, I., Jänis, J., Virtanen, T., & Rouvinen, J. (2015). Dimerization of lipocalin allergens. *Sci Rep*, 5, 13841. doi:10.1038/srep13841
- Niemi, M., Jylhä, S., Laukkanen, M. L., Söderlund, H., Mäkinen-Kiljunen, S., Kallio, J. M., . . . Rouvinen, J. (2007). Molecular interactions between a recombinant IgE antibody and the beta-lactoglobulin allergen. *Structure*, 15(11), 1413-1421. doi:10.1016/j.str.2007.09.012

- Offermann, L. R., Schlachter, C. R., Perdue, M. L., Majorek, K. A., He, J. Z., Booth, W. T., . . . Chruszcz, M. (2016). Structural, Functional, and Immunological Characterization of Profilin Panallergens Amb a 8, Art v 4, and Bet v 2. *J Biol Chem*, 291(30), 15447-15459. doi:10.1074/jbc.M116.733659
- Owen, Judith A, Punt, Jenni, Stranford, Sharon A, Jones, Patricia P, & Kuby, Janis. (2013). *Kuby immunology*. United States: New York : W.H. Freeman, c2013.
- Padavattan, S., Flicker, S., Schirmer, T., Madritsch, C., Randow, S., Reese, G., . . . Markovic-Housley, Z. (2009). High-affinity IgE recognition of a conformational epitope of the major respiratory allergen Phl p 2 as revealed by X-ray crystallography. *J Immunol*, 182(4), 2141-2151. doi:10.4049/jimmunol.0803018
- Padlan, E. A. (1994). Anatomy of the antibody molecule. *Mol Immunol*, 31(3), 169-217. doi:10.1016/0161-5890(94)90001-9
- Pekar, J., Ret, D., & Untersmayr, E. (2018). Stability of allergens. *Mol Immunol*, 100, 14-20. doi:10.1016/j.molimm.2018.03.017
- Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., Meng, E. C., & Ferrin, T. E. (2004). UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem*, 25(13), 1605-1612. doi:10.1002/jcc.20084
- Pomés, A., Mueller, G. A., & Chruszcz, M. (2020). Structural Aspects of the Allergen-Antibody Interaction. *Front Immunol*, 11, 2067. doi:10.3389/fimmu.2020.02067
- Popescu, F. D. (2015). Cross-reactivity between aeroallergens and food allergens. *World J Methodol*, 5(2), 31-50. doi:10.5662/wjm.v5.i2.31
- Rihs, H. P., Chen, Z., Rozynek, P., Baur, X., Lundberg, M., & Cremer, R. (2000). PCR-based cloning, isolation, and IgE-binding properties of recombinant

latex profilin (rHev b 8). *Allergy*, 55(8), 712-717. doi:10.1034/j.1398-9995.2000.00553.x

Rouvinen, J., Jänis, J., Laukkanen, M. L., Jylhä, S., Niemi, M., Päivinen, T., . . . Takkinen, K. (2010). Transient dimers of allergens. *PLoS One*, 5(2), e9037. doi:10.1371/journal.pone.0009037

Ruiz-Morales, René Daniel. (2015). *Prevalencia de la sensibilización y alergia al maíz en pacientes del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (Especialidad en Medicina), Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México.* Retrieved from https://tesiunam.dgb.unam.mx/F/KQR51NIKA3D1CMUPCAJGKTF9TJIK2G/PQV3HSSU2BB2PU5J65TP-03417?func=full-set-set&set_number=249454&set_entry=000001&format=999

Sadowski., Joseph M. Dougherty; Khalid Alsayouri; Adam. (2021, 2022 Jan). *Allergy*. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK545237/>

Santos, A., & Van Ree, R. (2011). Profilins: mimickers of allergy or relevant allergens? *Int Arch Allergy Immunol*, 155(3), 191-204. doi:10.1159/000321178

Shade, K. T., Platzer, B., Washburn, N., Mani, V., Bartsch, Y. C., Conroy, M., . . . Anthony, R. M. (2015). A single glycan on IgE is indispensable for initiation of anaphylaxis. *J Exp Med*, 212(4), 457-467. doi:10.1084/jem.20142182

Shade, Kai-Ting C., & Anthony, Robert M. (2013). Antibody Glycosylation and Inflammation. *Antibodies*, 2(3), 392-414.

Shin, J. S., & Greer, A. M. (2015). The role of FcεRI expressed in dendritic cells and monocytes. *Cell Mol Life Sci*, 72(12), 2349-2360. doi:10.1007/s00018-015-1870-x

Simossis, V. A., & Heringa, J. (2005). PRALINE: a multiple sequence alignment toolbox that integrates homology-extended and secondary structure

- information. *Nucleic Acids Res*, 33(Web Server issue), W289-294.
doi:10.1093/nar/gki390
- Sirvent, S., Palomares, O., Cuesta-Herranz, J., Villalba, M., & Rodríguez, R. (2012). Analysis of the structural and immunological stability of 2S albumin, nonspecific lipid transfer protein, and profilin allergens from mustard seeds. *J Agric Food Chem*, 60(23), 6011-6018. doi:10.1021/jf300555h
- Stanfield, R. L., Zemla, A., Wilson, I. A., & Rupp, B. (2006). Antibody elbow angles are influenced by their light chain class. *J Mol Biol*, 357(5), 1566-1574. doi:10.1016/j.jmb.2006.01.023
- Sutton, B. J., & Davies, A. M. (2015). Structure and dynamics of IgE-receptor interactions: FcεRI and CD23/FcεRII. *Immunol Rev*, 268(1), 222-235. doi:10.1111/imr.12340
- Tina, K. G., Bhadra, R., & Srinivasan, N. (2007). PIC: Protein Interactions Calculator. *Nucleic Acids Res*, 35(Web Server issue), W473-476. doi:10.1093/nar/gkm423
- Traidl-Hoffmann, C., Jakob, T., & Behrendt, H. (2009). Determinants of allergenicity. *J Allergy Clin Immunol*, 123(3), 558-566. doi:10.1016/j.jaci.2008.12.003
- Valenta, R., Duchene, M., Ebner, C., Valent, P., Sillaber, C., Deviller, P., . . . et al. (1992). Profilins constitute a novel family of functional plant pan-allergens. *J Exp Med*, 175(2), 377-385. doi:10.1084/jem.175.2.377
- Volcheck, G.W. (2009). *Clinical Allergy: Diagnosis and Management*: Humana Press.
- von Bubnoff, D., Geiger, E., & Bieber, T. (2001). Antigen-presenting cells in allergy. *J Allergy Clin Immunol*, 108(3), 329-339. doi:10.1067/mai.2001.117457

von Bubnoff, D., Novak, N., Kraft, S., & Bieber, T. (2003). The central role of FcεRI in allergy. *Clin Exp Dermatol*, 28(2), 184-187. doi:10.1046/j.1365-2230.2003.01209.x

Anexo

Hev b 8

MGSS **HHHHHH**SSG **LVPRGSH** **MASMTGGQQMGRGS** **DDDDK**MS
WQAYVDDHLMCEIEGNHLSAAAIIGQDGSVWAQSANFPQFK
SEEITGIMSDFFHEPGLAPTGLYIGGTKYMVIQGE PGAVIR
GKKGPGGVTVKKTNQALIIGIYDEPMT PGQCNMIVERLGDY
LIDQGY

Zea m 12

MGSS **HHHHHH**SSG **LVPRGSH** **MASMTGGQQMGRGS** **ENLYFQ****G**
MSWQAYVDDHLLCDIEGQHLSAAAIIVGHDGSVWAQSENFPE
LKPEEVAGMIKDFDEPGLAPTGLFVGGTKYMVIQGE PGV
IRGKKGTGGITIKKTGMSLIIGIYDEPMT PGQCNMVVERLG
DYLIEQGF

Figura anexa 1. Construcciones completas de *rHev b 8* y *rZea m 12* que contienen en la región N-terminal una etiqueta de histidina (rojo), un sitio de escisión de trombina (azul), una etiqueta T7 (verde), un sitio de escisión de enteroquinasa (púrpura en *rHev b 8*), y un sitio TEV (gris en *rZea m 12*).

Tabla anexa 1. Lista de interacciones entre rHev b 8 y el Fab/IgE 2F5

Interacciones hidrofóbicas menores a 5 Å				
Fab/IgE 2F5			Hev b 8	
CDR-L1	32	Tyr	122	Leu
	32	Tyr	125	Tyr
FWR-L2	49	Tyr	1	Met
CDR-L3	91	Phe	125	Tyr
	92	Trp	117	Met
	92	Trp	118	Ile
	92	Trp	15	Ile
CDR-H3	102	Val	125	Tyr

Interacciones π - π entre 4.5 and 7 Å					
Fab/IgE 2F5			Hev b 8		Dist. [Å]
CDR-L2	32	Tyr	125	Tyr	5.3

Cation- π Interactions within 6 Å					
Fab/IgE 2F5			Hev b 8		Dist. [Å]
CDR-L1	32	Tyr	121	Arg	5.21
CDRL3	96	Tyr	121	Arg	5.87

Puentes salinos							
Fab/IgE 2F5				Hev b 8			Dist. [Å]
CDR-H2	NH2	Arg	50	OD2	Asp	128	3.35
	NH2	Arg	52	OD1	Asp	124	2.88
	NE	Arg	52	OD1	Asp	128	2.98

Puentes de hidrógeno entre cadena principal y cadena principal							
Fab/IgE 2F5				Hev b 8			Dist. [Å]
CDR-H1	33	Ala	N	128	Asp	O	3.28
	31	Thr	O	130	Gly	N	3.02

Puentes de hidrógeno entre cadena principal y cadena lateral							
Fab/IgE 2F5				Hev b 8			Dist. [Å]
CDR-H3	101	His	NE2	125	Tyr	O	3.44
CDR-L1	28	Asn	ND2	14	Glu	O	3.28
	28	Asn	ND2	14	Glu	O	3.28
	30	His	ND1	14	Glu	O	3.44
	32	Tyr	OH	122	Leu	N	3.36
FWR-L2	49	Tyr	OH	1	Met	N	3.45
CDR-L3	91	Phe	O	121	Arg	NE	2.99
	91	Phe	O	121	Arg	NH2	2.71
	91	Phe	O	121	Arg	NH2	2.71

	92	Trp	O	121	Arg	NE	2.99
--	----	-----	---	-----	-----	----	------

Puentes de hidrógeno entre cadena lateral y cadena lateral							
Fab/IgE 2F5				Hev b 8			Dist. [Å]
CDR-H2	50	Arg	NH2	128	Asp	OD2	3.35
	50	Arg	NH2	128	Asp	OD2	3.35
	52	Arg	NH2	124	Asp	OD1	2.88
	52	Arg	NH2	124	Asp	OD1	2.88
	52	Arg	NE	128	Asp	OD1	2.98
	52	Arg	NE	128	Asp	OD2	3.34
	55	Thr	OG1	98	Asn	OD1	2.77
	55	Thr	OG1	98	Asn	OD1	2.77
	55	Thr	OG1	98	Asn	OD1	2.77
CDR-H3	101	His	NE2	129	Gln	NE2	3.32
	101	His	NE2	129	Gln	NE2	3.32
	101	His	NE2	129	Gln	NE2	3.32
CDR-L2	30	His	ND1	13	Cys	SG	3.61
	30	His	ND1	13	Cys	SG	3.61
	32	Tyr	OH	10	His	ND1	3.45
	32	Tyr	OH	10	His	ND1	3.45
FWR-L2	49	Tyr	OH	-2	Asp	OD1	3.4
	49	Tyr	OH	-2	Asp	OD2	2.85
CDR-L2	50	Asn	ND2	1	Met	SD	3.09
	50	Asn	ND2	1	Met	SD	3.09
	50	Asn	OD1	125	Tyr	OH	3.22
	50	Asn	OD1	125	Tyr	OH	3.22
	50	Asn	OD1	125	Tyr	OH	3.22
CDR-L3	96	Tyr	OH	121	Arg	NH2	3.45
	96	Tyr	OH	121	Arg	NH2	3.45

Interacciones débiles							
Fab/IgE 2F5				Hev b 8			Dist. [Å]
CDR-H1	O	Thr	31	O	Ile	127	3.75
	O	Thr	31	C	Asp	128	3.74
	O	Thr	31	O	Asp	128	3.51
	O	Thr	31	C	Gln	129	3.33
	O	Thr	31	O	Gln	129	3.78
	O	Thr	31	N	Gly	130	3.02
	O	Thr	31	CA	Gly	130	3.45
	CA	Tyr	32	O	Asp	128	3.27
	C	Tyr	32	O	Asp	128	3.78

	CG	Tyr	32	O	Asp	128	3.87
	CD2	Tyr	32	O	Asp	128	3.46
	CE1	Tyr	32	O	Gln	129	3.67
	CE2	Tyr	32	CA	Gln	129	3.73
	CE2	Tyr	32	O	Gln	129	3.74
	CZ	Tyr	32	O	Gln	129	3.4
	OH	Tyr	32	O	Gln	129	3.59
	N	Ala	33	O	Asp	128	3.28
	CB	Ala	33	CB	Asp	128	3.79
	CB	Ala	33	CG	Asp	128	3.76
	CDR-H2	NH2	Arg	50	OD2	Asp	128
CD		Arg	52	OD1	Asp	128	3.7
CD		Arg	52	OD2	Asp	128	3.53
NE		Arg	52	CG	Asp	128	3.55
NE		Arg	52	OD1	Asp	128	2.98
NE		Arg	52	OD2	Asp	128	3.34
CZ		Arg	52	OD1	Asp	128	3.83
NH2		Arg	52	CB	Asp	124	3.51
NH2		Arg	52	CG	Asp	124	3.27
NH2		Arg	52	OD1	Asp	124	2.88
NH2		Arg	52	OD1	Asp	128	3.88
CB		Thr	55	OD1	Asn	98	3.53
OG1		Thr	55	CG	Asn	98	3.83
OG1		Thr	55	OD1	Asn	98	2.77
CG2		Thr	55	OD1	Asn	98	3.4
OD1		Asn	56	CG2	Ile	127	3.54
OD1		Asn	56	CD1	Ile	127	3.84
CDR-H3		ND1	His	101	O	Asp	128
	ND1	His	101	CB	Asp	128	3.38
	CD2	His	101	CG	Gln	129	3.58
	CD2	His	101	NE2	Gln	129	3.59
	CE1	His	101	O	Tyr	125	3.2
	CE1	His	101	CD1	Tyr	125	3.9
	CE1	His	101	CB	Asp	128	3.44
	NE2	His	101	O	Tyr	125	3.44
	NE2	His	101	CD1	Tyr	125	3.69
	NE2	His	101	CE1	Tyr	125	3.42
	NE2	His	101	CZ	Tyr	125	3.62
	NE2	His	101	CG	Gln	129	3.42
	NE2	His	101	CD	Gln	129	3.88
	NE2	His	101	NE2	Gln	129	3.32

	CG1	Val	102	CE1	Tyr	125	3.42
	CG1	Val	102	OH	Tyr	125	3.67
CDR-L1	ND2	Asn	28	O	Glu	14	3.28
	O	His	30	O	Asp	9	3.71
	O	His	30	ND1	His	10	3.59
	O	His	30	CE1	His	10	3.85
	ND1	His	30	SG	Cys	13	3.61
	ND1	His	30	O	Glu	14	3.44
	CE1	His	30	O	Glu	14	3.13
	CE1	His	30	CA	Ile	15	3.79
	CE1	His	30	CB	Ile	15	3.62
	CE1	His	30	CG1	Ile	15	3.79
	NE2	His	30	CG1	Ile	15	3.74
	NE2	His	30	CD1	Ile	15	3.86
	C	Asn	31	CE1	His	10	3.88
	O	Asn	31	CE1	His	10	3.45
	O	Asn	31	NE2	His	10	3.83
	CB	Asn	31	O	Asp	9	3.84
	ND2	Asn	31	CB	Asp	9	3.85
	CD1	Tyr	32	ND1	His	10	3.81
	CD2	Tyr	32	ND1	His	10	3.74
	CE1	Tyr	32	ND1	His	10	3.36
	CE1	Tyr	32	CE1	His	10	3.85
	CE1	Tyr	32	CG	Tyr	125	3.82
	CE1	Tyr	32	CD1	Tyr	125	3.84
	CE2	Tyr	32	ND1	His	10	3.28
	CZ	Tyr	32	ND1	His	10	3.07
	CZ	Tyr	32	CG	Arg	121	3.85
	OH	Tyr	32	CB	His	10	3.75
	OH	Tyr	32	ND1	His	10	3.45
	OH	Tyr	32	CG	Arg	121	3.83
	OH	Tyr	32	N	Leu	122	3.36
	OH	Tyr	32	CA	Leu	122	3.33
	OH	Tyr	32	CB	Leu	122	3.45
OH	Tyr	32	CD1	Leu	122	3.49	
FWR-L2	CZ	Tyr	49	OD2	Asp	-2	3.84
	OH	Tyr	49	CG	Asp	-2	3.48
	OH	Tyr	49	OD1	Asp	-2	3.4
	OH	Tyr	49	OD2	Asp	-2	2.85
	OH	Tyr	49	CA	Lys	0	3.86
	OH	Tyr	49	C	Lys	0	3.66

	OH	Tyr	49	CB	Lys	0	3.2
	OH	Tyr	49	N	Met	1	3.45
	OH	Tyr	49	CB	Met	1	3.65
CDR-L2	CG	Asn	50	OH	Tyr	125	3.87
	OD1	Asn	50	CZ	Tyr	125	3.88
	OD1	Asn	50	OH	Tyr	125	3.22
	ND2	Asn	50	SD	Met	1	3.09
	ND2	Asn	50	CE	Met	1	3.8
	ND2	Asn	50	CE1	Tyr	6	3.81
	ND2	Asn	50	OH	Tyr	6	3.79
	ND2	Asn	50	OH	Tyr	125	3.86
CDR-L3	C	Phe	91	NH2	Arg	121	3.89
	O	Phe	91	NE	Arg	121	2.99
	O	Phe	91	CZ	Arg	121	3.28
	O	Phe	91	NH2	Arg	121	2.71
	C	Trp	92	NE	Arg	121	3.83
	O	Trp	92	CD	Arg	121	3.14
	O	Trp	92	NE	Arg	121	2.99
	CE3	Trp	92	CG	Arg	121	3.73
	CZ3	Trp	92	CB	Arg	121	3.79
	CZ3	Trp	92	CG	Arg	121	3.63
	OH	Tyr	96	CZ	Arg	121	3.87
	OH	Tyr	96	NH2	Arg	121	3.45

A native IgE in complex with profilin provides insights into allergen recognition and cross-reactivity

Benjamín García-Ramírez ¹, Israel Mares-Mejía ¹, Annia Rodríguez-Hernández¹, Patricia Cano-Sánchez¹, Alfredo Torres-Larios ^{2,4}, Enrique Ortega³ & Adela Rodríguez-Romero ¹✉

Allergies have become a rising health problem, where plentiful substances can trigger IgE-mediated allergies in humans. While profilins are considered minor allergens, these ubiquitous proteins are primary molecules involved in cross-reactivity and pollen-food allergy syndrome. Here we report the first crystal structures of murine Fab/IgE, with its chains naturally paired, in complex with the allergen profilin from *Hevea brasiliensis* (Hev b 8). The crystallographic models revealed that the IgE's six complementarity-determining regions (CDRs) interact with the allergen, comprising a rigid paratope-epitope surface of 926 Å², which includes an extensive network of interactions. Interestingly, we also observed previously unreported flexibility at Fab/IgE's elbow angle, which did not influence the shape of the paratope. The Fab/IgE exhibits a high affinity for Hev b 8, even when using 1 M NaCl in BLI experiments. Finally, based on the encouraging cross-reactivity assays using two mutants of the maize profilin (Zea m 12), this antibody could be a promising tool in IgE engineering for diagnosis and research applications.

¹Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior, Cd. Universitaria, Coyoacán, Ciudad de México 04510, Mexico.

²Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior, Cd. Universitaria, Coyoacán, Ciudad de México 04510, Mexico.

³Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior, Cd. Universitaria, Coyoacán, Ciudad de México 04510, Mexico. ⁴Deceased: Alfredo Torres-Larios. ✉email: adela@unam.mx

Numerous substances can trigger IgE-mediated allergies in humans, acting as haptens or antigens^{1–3}. Allergens are not substances produced by organisms to cause allergies; they are molecules with specific biological functions⁴. Different organisms carry out the same biological processes, and many of them are executed by proteins with highly conserved amino acid sequences and 3D structures. These similarities could produce cross-reactivity towards allergens from different sources in patients⁴, i.e., IgE can recognize a protein similar to the one that originated the sensitization, giving rise to an allergic reaction.

Profilins are excellent examples of allergen cross-reactivity. They are ubiquitous proteins expressed in every eukaryotic cell and some archaea⁵. They also share high sequence identity and thus are considered panallergens⁶. Profilins are involved in multiple cellular functions, such as motility, through regulation of the polymerization of actin microfilaments, binding proteins with proline-rich domains, and binding phosphatidylinositol, among others. Profilins are 12–17 kDa proteins, with 100–153 amino acids⁷ that vary depending on the organism of origin and the isoform⁸. In general, these proteins maintain a high 3D structure and sequence identity, which is approximately 70% among plant profilins⁹. Therefore, in patients suffering respiratory allergies, cross-reactivity between profilins from foods and aeroallergens could induce oral-allergy syndrome or even anaphylaxis.

On the other hand, IgE is the primary antibody associated with allergies. Although, to date, there are no published crystallographic structures of intact IgE, free or in complex with an allergen, negatively stained microscopy, and small-angle X-ray scattering (SAXS) studies have exhibited significant rigidity of the IgE molecule¹⁰. The dynamics, allosteric properties, and flexibility studies rely on theoretical models of IgE bound to its high-affinity receptor. While there is vast information on the interactions between IgE-Fc and the FcεRI and CD23 receptors^{11–15}, there are just a few examples of how recombinant Fab/IgE recognizes allergens^{16–18} and only one report on the structure of a native Fab/IgE; however, this antibody binds a hapten¹⁹. Concerning these few examples, the crystal structures of the allergens Bos d 5 (beta-lactoglobulin)¹⁶ and Phl p 2¹⁷ in complex with recombinant Fabs/IgEs show planar surfaces of interaction (890 and 855 Å², respectively), and both IgEs were obtained in mammalian expression systems.

Here, we report the first crystal structures of the complex between a murine Fab/IgE (heavy and light chains naturally paired) that recognizes the allergen profilin from natural rubber latex (Hev b 8)²⁰. This profilin is involved in the latex-fruit-pollen syndrome and oral-allergy syndrome and is highly cross-reactive²¹. Glycosylated Fab/IgE 2F5 exhibits an affinity for rHev b 8 in the medium-nanomolar range. Furthermore, IgE 2F5 can bind the allergen even after two annealing cycles. The structures of the free Fab/IgE 2F5 and its complex with rHev b 8 in two different conformations revealed the residues involved in the paratope-epitope interaction and provided insight into how an IgE recognizes an allergen and the structural basis of cross-reactivity.

Results

To analyze the paratope-epitope interactions of the Fab/IgE 2F5-rHev b 8 complex, we determined two crystal structures of the complex and one of the Fab/IgE free, and we performed different characterization experiments to confirm the allergenic determinants.

The IgE 2F5 recognizes profilin rHev b 8 after two annealing procedures. The circular dichroism (CD) spectrum of rHev b 8 in the Far-UV region at 25 °C shows two negative bands centered at

218 and 208 nm and a positive band at 199 nm, indicating a significant amount of beta structures and alpha-helices. This result agrees with its 3D structure (PDB 5FDS). After two annealing procedures of increasing the temperature from 25 to 90 °C and cooling down slowly to 25 °C, the protein recovered most of its secondary structure. The band centered at 218 nm was modified after the thermal procedures; however, the alpha-helix content was recovered, although not entirely (Fig. 1a). Remarkably, through ELISA, we confirmed that rHev b 8 could be recognized by IgE 2F5, even after being subjected to the described annealing procedure twice. For ELISA, we used maize profilin (rZea m 12), which IgE 2F5 does not recognize, as a negative control (Fig. 1b)²⁰. We confirmed through a Western blot experiment (Fig. 1c) that IgE 2F5 also recognizes rHev b 8 after treatment with denaturing agents and high temperature (SDS, and beta-mercaptoethanol, 95 °C).

The structure of the Fab/IgE 2F5-rHev b 8 complex allows identification of the paratope-epitope pair and shows the basis of the allergen recognition.

To promote crystallization of the Fab/IgE 2F5-rHev b 8 complex, we used two different constructs, mature rHev b 8 and rHev b 8, with a short peptide (DDDK-rHev b 8) with a mass of 14,629 Da (Fig. 2a)²², as explained in the methodology. The difference of 474 Da corresponds to the last four residues of the enterokinase cleavage site (residues D-3, D-2, D-1, K-0). Therefore, we named this construct as DDDK-rHev b 8. Better diffracting crystals of the Fab/IgE 2F5-profilin complex were obtained with the DDDK-rHev b 8 construct. To understand the strong interaction between Fab/IgE 2F5 and this profilin, we determined two X-ray crystal structures of the complex, at 3.04 and 3.34 Å resolution, from crystals that grew in different conditions (Fig. 2b, c). The structures were obtained using the molecular replacement method. Both complexes crystallized in the orthorhombic space group P212121 with one copy of the Fab/IgE 2F5-profilin complex in the asymmetric unit. (Table 1 summarizes the data collection and refinement statistics).

Both models showed the typical immunoglobulin fold of the constant and variable domains, and all complementarity-determining regions (CDR) of the heavy (VH) and light (VL) chains participate in the interaction with the allergen (Fig. 2b, c). A structural alignment of the models (Fab/IgE 2F5-rHev b 8) demonstrated flexibility at the Fab's elbow region (Fig. 2d), corresponding to different conformational states in the crystals; nonetheless, the paratope region did not change, as has been reported by others²³. In general, experimentally observed elbow angles for IgG Fabs vary by more than 15°²⁴. The elbow angle for the structure at 3.04 Å is 131°, while the one at 3.34 Å is 113°. This difference was 19.2° in our models that crystallized under different conditions; this flexibility at the elbow region has not been reported for a Fab/IgE. We also found an N-linked glycosylation site in N189 of the Fab's heavy chain constant region (Fig. 2b, c).

The structure of Fab/IgE 2F5 indicates non-induced-fit allergen recognition.

The overall structure of the free Fab/IgE 2F5 at 3.75 Å shows three Fabs molecules per asymmetric unit (Fig. 2e). We could not model all the residues of one of the three molecules in the asymmetric unit, but the electron density was enough to model all CDRs and the backbone. We compared the structure of the three free Fabs in the asymmetric unit with the Fabs structure in the rHev b 8 Fab/IgE 2F5 complex at 3.04 Å (Fig. 2f). No changes were observed, showing no flexibility, or induced fit in the antibody paratope when the allergen epitope was recognized. The free Fab/IgE 2F5 elbow region is comparable to the complex's structure at 3.04 Å (RMSD varies from 0.73 Å for heavy chains to

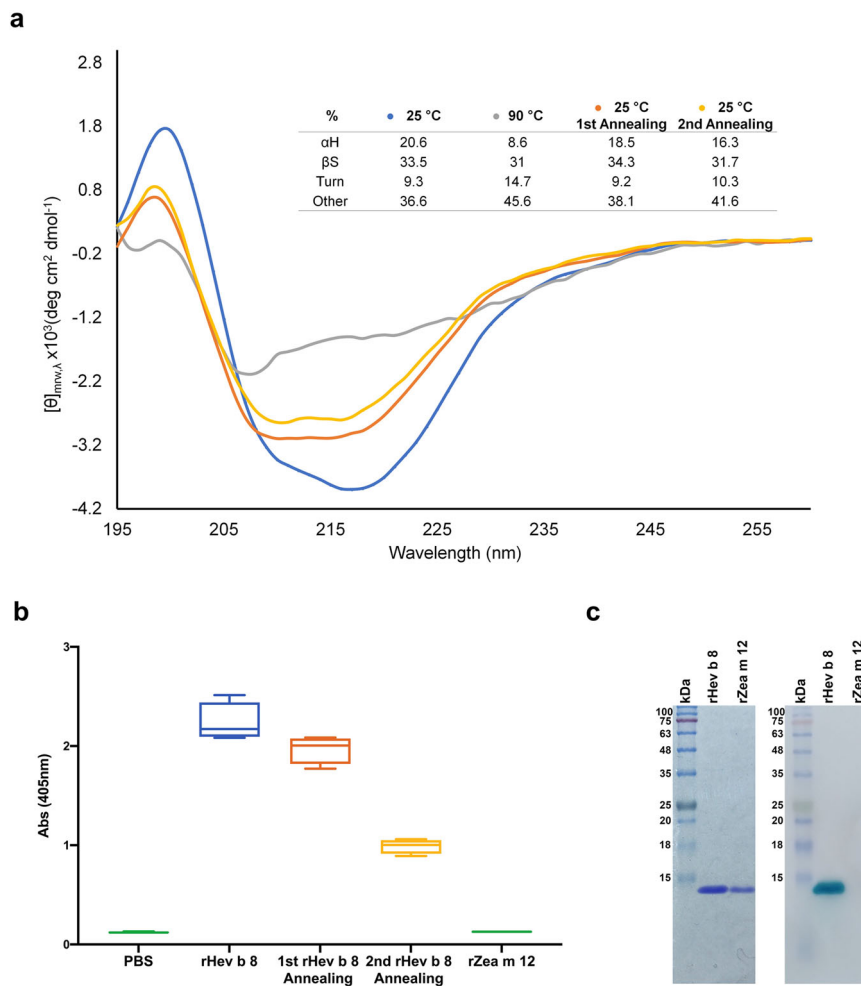


Fig. 1 rHev b 8 profilin stability. **a** Far-UV CD spectra at different temperatures: at 25 °C before heat treatment (blue), at 90 °C (gray), and first (orange) and second (yellow) annealing processes ($n = 3$). The Table shows percentages of secondary structure (α H, α -helix; β S, β -sheet, Turns, and Other). **b** Box and whisker plot showing ELISA results of the recognition of rHev b 8 after the first and second annealing procedures, rZea m 12 was used as a negative control. Error bars represent standard deviations of the means of four replications. **c** Left: SDS-Page showing rHev b 8 and rZea m 12, Right: Western blot. IgE 2F5 recognized rHev b 8 but did not recognize rZea m 12.

1.1 Å for light chains) (Fig. 2f). Table 1 shows data collection and refinement statistics for these models.

Fab/IgE 2F5 is glycosylated. SDS-PAGE staining using the Pierce Glycoprotein Staining Kit showed that complete IgE 2F5 and its Fab were glycosylated (Fig. 3a). We detected glycosylation on the IgE 2F5 and its Fab heavy chains. In addition to horseradish peroxidase (44 kDa) and soy trypsin inhibitor (20.1 kDa), we used Fabs and complete murine IgGs 1B4 and 2D10²⁵ as controls. Then, the same gel was stained using Coomassie Blue G250, and as shown in Fig. 3b, the blue staining of the other immunoglobulin fragments and the negative controls was observed. Murine IgG antibodies 1B4 and 2D10 were purified using the same procedure as IgE 2F5²⁵. The crystal structure of Fab/IgE 2F5 showed N-linked main glycosylation at the N189/F190/T191 sequon of the Fab's heavy chain constant region (Fig. 3c). Positive Fo-Fc electron density defined the branched sugar molecule bound at N189, which we interpreted as a core of N-linked N-acetylglucosamine (NAG) (β -1-4-linked), an α -1-6-linked fucose (FUC) bound to the first NAG, an a di-D-mannose (MAN) attached to the chitobiose core (GlcNAc2) (Fig. 3d), using the model-building tools implemented in Coot²⁶. The Fab molecular mass determined by matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS)

was 57.4 kDa, while the value calculated from the sequence was 46.8 kDa (Fig. 3e). This result suggests that the difference of 10.6 kDa is probably due to posttranslational modifications. As three N-glycosylation sites have been reported for Fabs/IgE with oligosaccharide chains of approximately 2.2 kDa²⁷, the modification's difference in mass could be due to another type of posttranslational modifications present in murine antibodies or longer oligosaccharides conforming to the glycosylation chains. Interestingly, the mass measured for the whole rHev b 8 construct was lower than expected, with 14,625 Da instead of 18,283 Da. As reported previously, the rHev b 8 mass is 14,151 Da²⁰. This difference corresponds to a construct with four additional residues at the N-terminal region (DDDK).

Structural insights into profilin cross-reactivity. The DDDK-rHev b 8 model in the complex Fab/IgE 2F5-rHev b 8 exhibits three α -helices and a β -sheet of seven β antiparallel strands connected by loops of different lengths, as has been reported previously for rHev b 8²⁰. Profilin has a conformational epitope with a buried surface area of 926 Å², as we determined using PDBsum²⁸. This epitope involves conserved residues at the N- and C-terminal regions that correspond to the polyproline binding site in profilins⁶, and one residue in a loop that connects to β -strands 6 and 7.

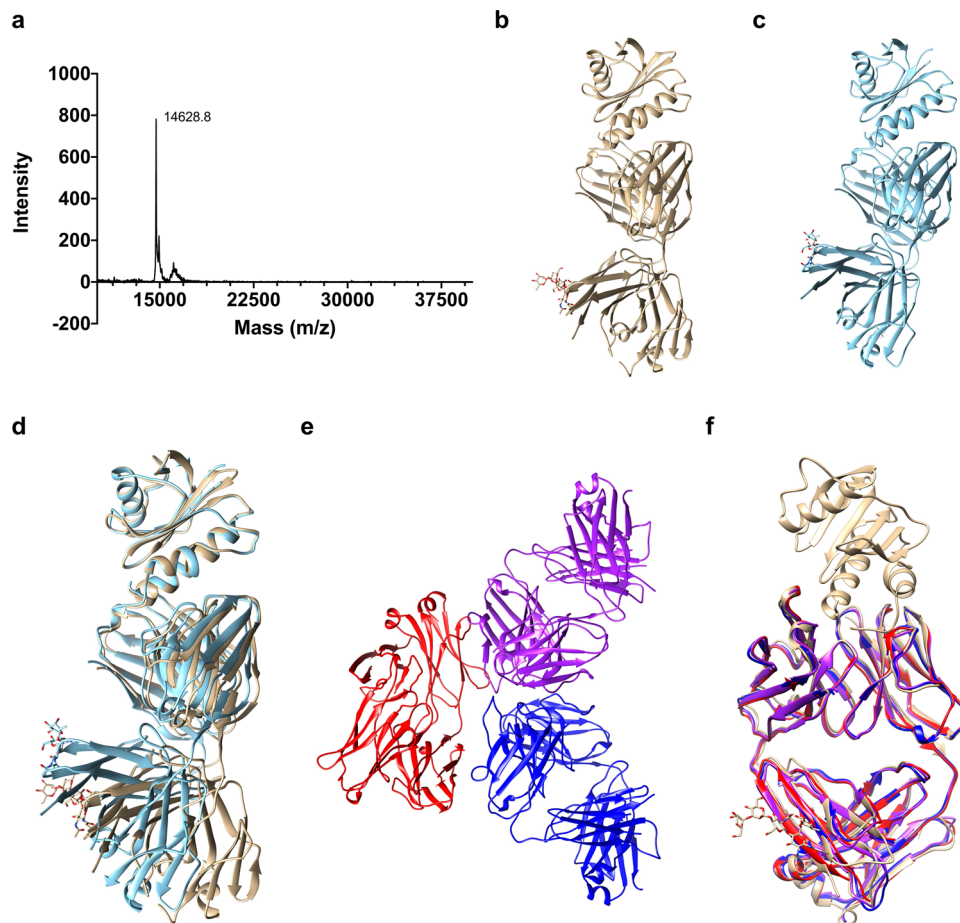


Fig. 2 Basis of allergen recognition through the free Fab/IgE 2F5 and the complex with DDDK-rHev b 8 structures. **a** MALDI-TOF spectrum for the DDDK-rHev b 8 construct. **b** and **c** Ribbon diagrams of the complex Fab/IgE 2F5-DDDK-rHev b 8 at 3.04 (gold) and 3.34 Å resolution (blue), respectively. **d** Fab constant domains show a displacement of 19.2 degrees due to flexibility at the elbow region. **e** The three free Fab/IgE 2F5 molecules in the asymmetric unit (3.75 Å resolution). **f** Superposition of the three free Fab/IgE 2F5 molecules in the asymmetric unit (red, blue, and purple), with the complex Fab/IgE 2F5-DDDK-rHev b 8 at 3.04 Å resolution (gold).

The rHev b 8 conformational epitope comprises 18 polar, acid, and basic residues. As shown in Fig. 4a, this epitope involves residues Y6, D9, H10, C13, E14, I15, M117, I118, L122, I127, Q129, and G130, which establish hydrophobic interactions and numerous nonbonded interactions (van der Waals and electrostatic) with the CDRs. In contrast, M1, N98, R121, D124, D128, and G130 form hydrogen bonds with residues in the CDRs. Meanwhile, D124 and D128 establish salt bridges with CDR-H2 residues R50 and R52, and the profilin Y125 establishes an aromatic interaction with Y32 (CDR-L1) (Supplementary Data 1). A hydrogen bond of 3.4 Å is formed between residues D-2 in rHev b 8 and the OH of Y49 in framework-L2.

The IgE 2F5 paratope involves the heavy chain residues T31, Y32, and A33 (CDR-H1); R50, R52, T55, and N56 (CDR-H2); and H101 and V102 (CDR-H3); and the light chain residues N28, H30, N31, and Y32 (CDR-L1); N50 (CDR-L2); and F91, W92, and Y96 (CDR-L3) (Fig. 4b).

The Fab/IgE 2F5 CDRs' structural alignment showed that they all exhibit a very similar conformation in both structures (3.04 and 3.34 Å) (Fig. 4b). The interface interaction network in both structures is similar. Notably, this epitope region sequence is not entirely conserved in profilins from plants; however, it has been previously reported as a potential epitope for this allergen^{29,30}. According to the sequence alignment of different plant profilins, several could cross-react with Hev b 8 (Supplementary Fig. 1).

The Fab/IgE 2F5 paratope residues conform to a groove in which the hydrophobic and basic residues are surrounded by polar residues exposed to the solvent. Figure 5 shows the paratope-epitope surface displaying the groove formed mainly by the heavy chain. The epitope exhibits a complementary shape to the paratope and fits perfectly.

According to the PIC (Protein Interaction Calculator)³¹ and PDBsum²⁸ interaction analysis, summarized in Fig. 6a and detailed in Supplementary Data 1, the interactions established between rHev b 8 and the light and heavy chains of Fab/IgE 2F5 are three salt bridges, two cation- π interactions, eight hydrophobic interactions, one aromatic interaction, numerous hydrogen bonds and nonbonded contacts (Electrostatic and van der Waals interactions).

The affinity of the Fab/IgE 2F5 for rHev b 8. To compare the results of the interaction Fab/IgE 2F5-rHev b 8 with the previously reported results for IgE 2F5-rHev b 8, we used NaCl 1 M in the biolayer interferometry (BLI) experiments. In the absence of NaCl, no dissociation could be obtained; therefore, the salt concentration was increased up to 1 M to measure the dissociation and to prevent reassociation effects. The interaction between rHev b 8 and the Fab/IgE 2F5 analyzed using the (BLI) OCTECT software gave a dreadful adjustment with a 1:1 global fitting (Supplementary Fig. 2a). Therefore, we used the 1:1 global fit

Table 1 Data collection and refinement statistics (molecular replacement).

	Complex (PDB 7SBD)	Complex (PDB 7SBG)	FabIgE (PDB 7SD2)
Data collection			
Space group	P 21 21 21	P 21 21 21	1 1 2 1
Cell dimensions <i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> (Å)	57.96, 77.47, 144.55	52.33, 71.45, 132.52	91, 103.9, 180.2
α , β , γ (°)	90, 90, 90,	90, 90, 90	90, 94.26, 90
Resolution (Å)	29.42–3.04 (3.15–3.04) ^a	37.57–3.34 (3.46–3.34)	44.96–3.75 (3.88–3.75)
<i>R</i> _{merge}	0.057 (0.27)	0.074 (0.438)	0.11 (0.44)
<i>I</i> / σ <i>I</i>	7.12 (1.93)	17.06 (2.89)	8.1 (2.3)
Completeness (%)	99.02 (93.21)	98.41 (95.33)	99.20 (99.20)
Redundancy	2.0 (2.0)	1.8 (1.8)	3.3 (3.3)
Refinement			
Resolution (Å)	29.42–3.04 (3.15–3.04)	37.57–3.34 (3.46–3.34)	44.96–3.75 (3.88–3.75)
No. reflections	12929 (1181)	7616 (723)	17152 (1680)
<i>R</i> _{work} / <i>R</i> _{free}	22.77/25.38	24.54/29.59	24.66/28.43
No. atoms			
Protein	4017	3721	8148
Carbohydrate	60	38	0
Water	0	0	0
<i>B</i> -factors (Å ²)			
Protein	63.74	72.91	102.02
Ligand/ion	80.26	91.64	
Water			
R.m.s. deviations			
Bond lengths (Å)	0.003	0.003	0.002
Bond angles (°)	0.65	0.64	0.57

^aValues in parentheses are for the highest-resolution shell.

considering nonspecific binding (NSB) using the Association-Dissociation model implemented in GraphPad Prism ^{832,33}, obtaining a *K_D* value of 370 ± 6.8 nM (Fig. 6b). Even though it is not perfect, the fitting improved, as reported for Fab/IgG antigen interactions³⁴. To confirm that the NSB fit does not affect the results, we also calculated the *k_{on}* (from the association step), then the *k_{off}* (from the dissociation step), separately, obtaining a *K_D* = 369 ± 3.8 nM (*k_{off}*/*k_{on}*) using Prism 8 (Supplementary Fig. 2b). Interestingly, the *K_D* value calculated using the IgE under the same conditions is approximately two orders of magnitude lower (1.7 nM)²⁰.

Generating cross-reactivity using profilin Zea m 12 that is not recognized by IgE 2F5. We next attempted to produce and explain profilins' cross-reactivity based on the obtained structural information. The sequence and structural alignments between rHev b 8 (PDB 5FDS) and rZea m 12 (PDB 5FEF) show the regions of high conservation involving the alpha-helices in the amino and carboxyl-terminal regions. We then identified four different residues in the epitope recognized by the Fab/IgE. rHev b 8 residues E14, N98, I118, and D128, which correspond to D14, G98, V118, and E128 in Zea m 12 (Fig. 7a, b).

Analysis of the structure of rHev b 8 bound to the Fab/IgE 2F5 supported that D128 on rHev b 8 is immersed in a complementary antibody cavity (Fig. 7c). D128 interacts with the paratope through R50 and R52 of the heavy chain establishing two salt bridges (Supplementary Data 1). Therefore, the presence of E128 in rZea m 12 exerts a significant steric hindrance. N98 (which corresponds with G98 on rZea m 12) is essential to

stabilize the complex because it establishes a hydrogen bond and four nonbonded contacts with T55 of CDR-H2. Nonetheless, G98 does not establish any interaction with T55 (Supplementary Data 1), and its mutation is fundamental for recognition of Zea m12 by Fab/IgE 2F5. To test the relevance of residues D128 and G98 in the recognition of rHev b 8 by IgE 2F5 (and to understand the lack of recognition of rZea m 12 by the antibody), we first performed a single mutation E128D and then a double mutation E128D-G98N.

The immunoassay performed with the IgE 2F5 and the rZea m 12-E128D single mutant showed only a slight increase in recognition, barely above the background. However, the recognition of the rZea m 12 double mutant was significantly higher, reaching Abs values (405 nm) of approximately 50% of those observed for the binding of IgE 2F5 to rHev b 8 (Fig. 8). Regarding E14, no mutation was made because the interaction is established by the carbonyl group of the peptide bond. Likewise, the methyl group corresponding to the delta carbon of I118 does not cause a steric hindrance as E128 (Fig. 8).

Discussion

The WHO/IUIS Allergen Nomenclature Sub-Committee (<http://www.allergen.org/>) has reported natural and recombinant profilin Hev b 8 as an allergen able to trigger symptoms in latex-allergic patients. Profilins are ubiquitous proteins present in all eukaryotic cells; therefore, there is a high probability that individuals sensitized by one of the multiple isoforms of this protein will, in a subsequent exposure to other profilins, experience an allergic cross-reaction due to their high sequence identity, causing pollen-food syndrome³⁵. In this study, we report the first crystal structures of the complex between a murine Fab/IgE (heavy and light chains naturally paired), bound to the allergen profilin from natural rubber latex (Hev b 8), and the structure of the Fab/IgE free.

The Fab/IgE 2F5-rHev b 8 complex structures revealed a conformational epitope constituted by the first and third α -helices of the allergen, corresponding to N- and C- terminal sequences that came close to each other in the three-dimensional structure (Fig. 4a), and a nearby residue in a loop connecting β strands 6 and 7. This region is rich in aromatic residues and constitutes the polyproline recognition site on profilins³⁶, showing a conserved three-dimensional structure not necessarily reflecting identity in amino acid sequences. This epitope is unrelated to the loop comprising A37-S52, which we previously suggested as a possible epitope²⁰.

A comparison of the two structures of the Fab/IgE 2F5-Hev b 8 complexes (at 3.04 and 3.34 Å resolution) shows that the Fab region of the murine IgE 2F5 exhibits flexibility at the elbow angle, comparable to that reported for Fabs from IgGs²³; nonetheless, this flexibility does not affect the paratope (Fig. 2d).

Our Fab/IgE 2F5-rHev b 8 structure at 3.04 Å resolution revealed an electron density in both maps (2Fo-Fc and Fo-Fc) (Fig. 3c), interpreted as a branched oligosaccharide bound to N189. Reports demonstrate that murine and human IgEs exhibit three N-linked glycosylation sites in the VH domain³⁷; however, its effect on antigen binding is unknown.

Some IgE characterizations performed by molecular modeling, FRET, and electron microscopy have also shown dynamic segmental flexibility and angle restrictions in the IgE conformation^{38,39}. One of the most significant challenges in structure-function studies of IgEs is to have a simple way to observe different conformations at the atomic level to predict the rules that govern the intensity of an allergic response. A recent paper on the structure of an intact IgE and its interaction with the anti-IgE antibody ligelizumab, obtained by electron microscopy (EM) and small-angle X-ray scattering (SAXS), suggested a major

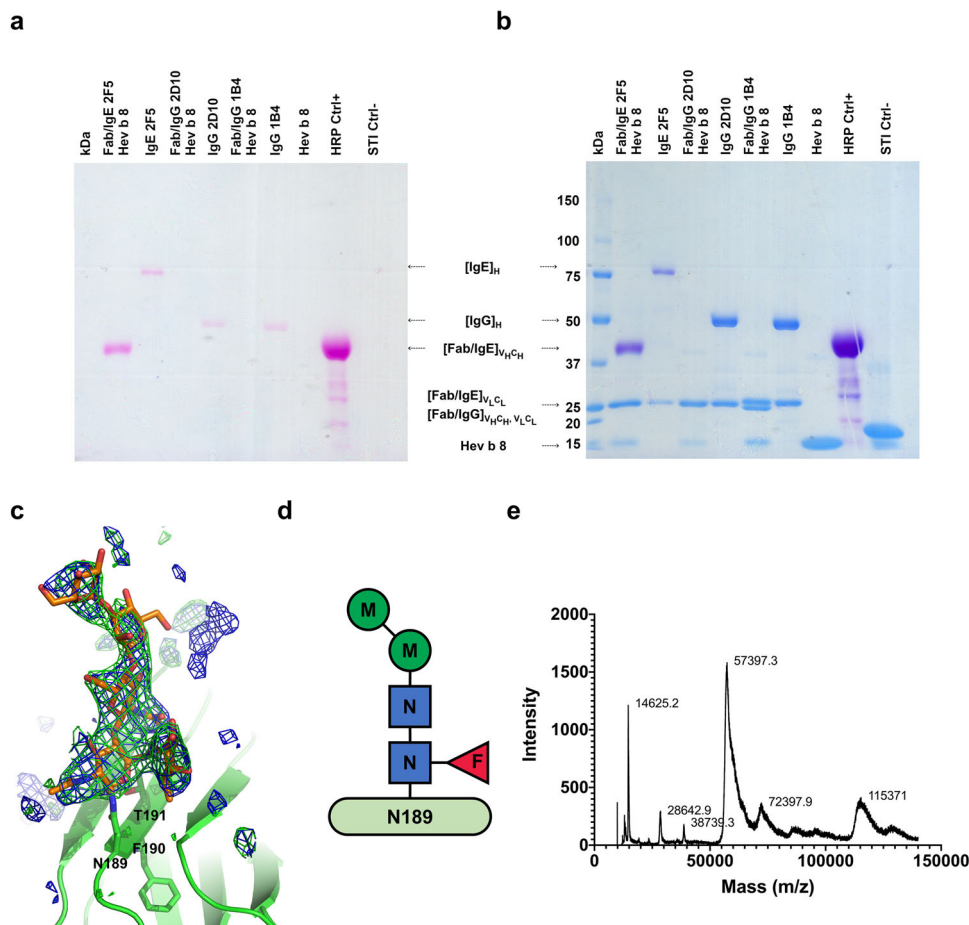


Fig. 3 IgE 2F5 and its Fab are glycosylated. **a** SDS-PAGE stained with the Pierce Glycoprotein Staining Kit. Lane one: Molecular weight markers. Second lane: the Fab/IgE 2F5 heavy chain (VH and C ϵ 1) is stained; Third lane: the complete IgE 2F5 heavy chain is stained; Fifth and Seventh lanes: Heavy chains of the complete IgG 2D10 and 1B4, which are glycosylated are stained. No stained bands were observed in the Fourth and Sixth lanes. Eighth and Tenth lanes, profilin (rHev b 8) and the soy trypsin inhibitor (STI) were used as negative controls: The Ninth lane shows horseradish peroxidase (HRP) used as a positive control. **b** The same gel was stained with Coomassie Blue G250. The Fab/IgE 2F5 light chain, IgG light and heavy chains, rHev b 8 profilin, and STI are observed. **c** Polder map contoured at 3 σ (blue) and omit map 3 σ (green) for the glycosylation at N189. **d** Composition of the oligosaccharide bound to N189 on the Fab/IgE 2F5, which comprises a core of di-mannose and fucose connected to the chitobiose core (GlcNAc2). Abbreviations: N, GlcNAc; M, mannose; F, fucose. **e** Mass spectra of DDDK-rHev b 8 (14,625 Da) and of the Fab/IgE 2F5 (57,397.3 Da). Lysozyme (14,100 Da) and bovine serum albumin (66,410 Da) were used to calibrate the spectrum. Interestingly, peaks of the Fab/IgE 2F5-DDDK-rHev b 8 complex (72,397.9 Da) and the dimeric Fab (115,371 Da) were also detected; however, these two peaks were not calibrated.

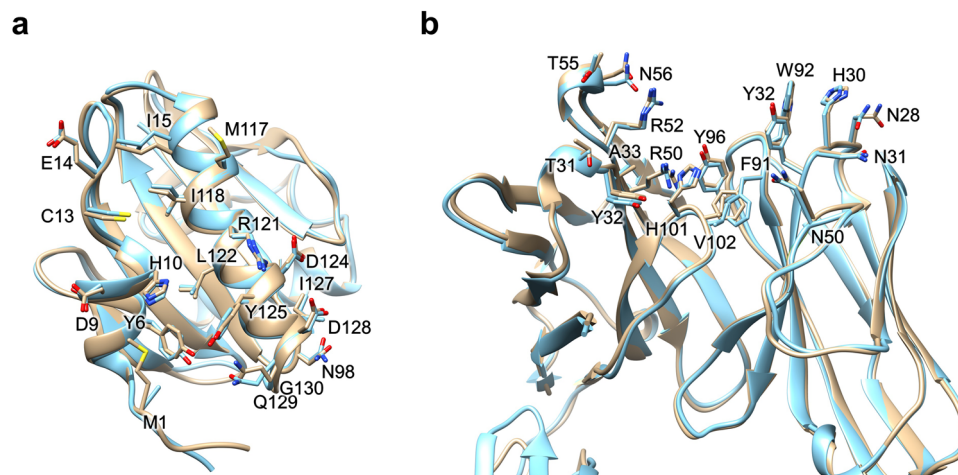


Fig. 4 Paratope-epitope interactions. **a** Epitope residues. Structural alignment of the Fab/IgE-rHev b 8 models at 3.04 Å (gold) and 3.34 Å (blue). **b** Paratope residues alignment of the models at 3.04 Å (gold) and 3.34 Å (blue).

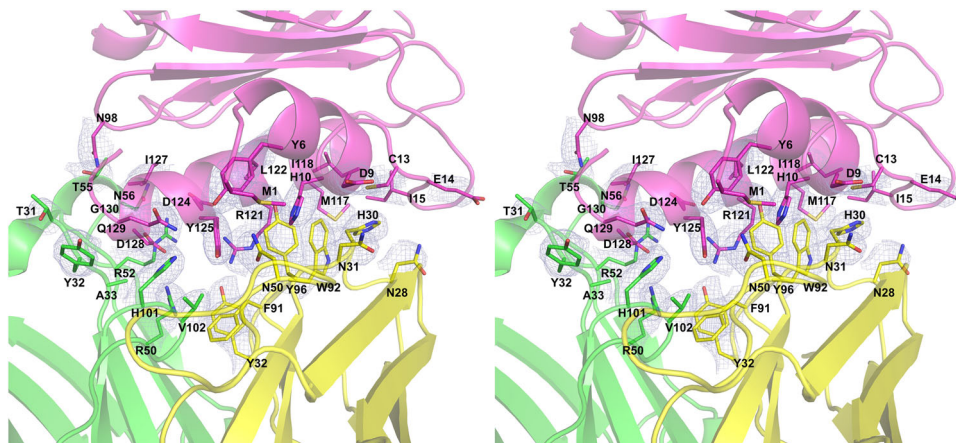


Fig. 5 Stereo-view of the paratope-epitope interface. Fab/IgE 2F5 light chain (yellow), heavy chain (green) and profilin (pink), the 2Fo-Fc electron density map (1σ) is shown in light blue. The epitope-paratope interface area (926 \AA^2).

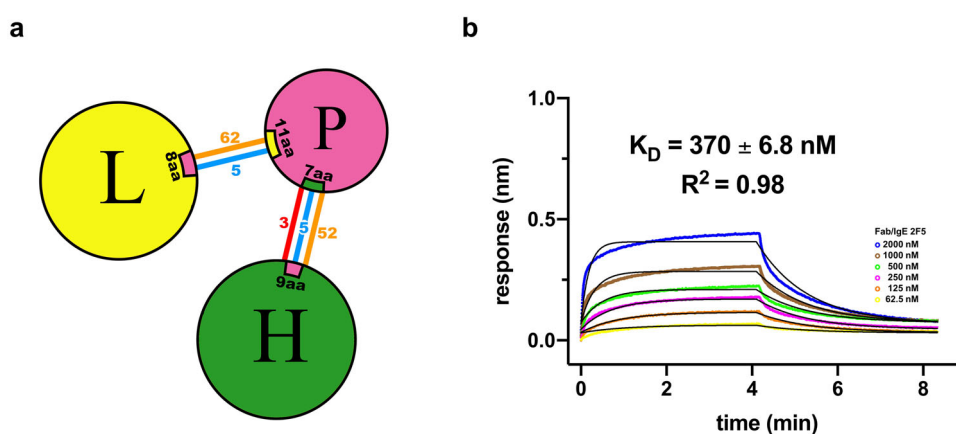


Fig. 6 Paratope-epitope interactions and affinity of the Fab/IgE 2F5. **a** Interaction network summary. Heavy chain (H), light chain (L), and profilin (P). Salt bridges are represented as red lines, hydrogen bonds as blue lines, and nonbonded contacts (electrostatics and van der Waals interactions) with orange lines. **b** BLI fitting considering nonspecific binding (NSB) using the Association-Dissociation model implemented in GraphPad Prism 8 and a 1:1 model. Six different concentrations were tested and are shown in different colors.

IgE conformation with a defined Fab and Fc organization¹⁰. However, there are no structural studies of IgE-allergen complexes. Only two allergens complexed with chimeric IgG constructs containing human IgE variable regions have been reported^{16,17}. Even though we do not have the structure of the intact IgE, our Fab/IgE structures provide valuable information concerning different conformations of this molecule, probably due to crystal packing, as suggested by others²³, but causing minimal changes at the paratope.

It has been demonstrated that numerous allergens exhibit high stability under harsh conditions. The IgE of susceptible or allergic individuals can recognize allergens after a partial or total recovery of their three-dimensional structures^{40,41}. According to our circular dichroism assays, obtained as a function of the temperature, rHev b 8 is an exceptionally stable panallergen. This profilin partially recovers its 3D structure but could presumably still trigger an allergic response after two annealing procedures since we detected 56% of the original IgE 2F5 recognition (Fig. 1a and b). Profilin stability is essential in antibody recognition and raises questions about why some profilins have been underestimated as relevant allergens. rHev b 8 is not the only profilin reported as thermostable; mustard profilin Sin a 4 was recognized by IgE from patients' sera after thermal treatment⁴⁰. This fact suggests that cooking food or subjecting allergens to other adverse conditions may not be enough to prevent an allergic response.

Functional Fabs from native, recombinant, or chimeric antibodies have been used in antibody structure characterization. The use of Fabs aims to decrease the intrinsic flexibility of whole antibodies. In our case, an intermediate interaction between Fab/IgE 2F5 and rHev b 8 was demonstrated using BLI experiments, considering that 1 M NaCl was present in the experiment. The Fab/IgE 2F5 K_D value of the interaction calculated using the 1:1 kinetic binding model was 370 nM (Fig. 6b). In contrast with the BLI experiment using the IgE²⁰, fragmentation of this antibody affected the dissociation constant, most probably due to loss in avidity of bivalent IgE compared to the binding of the Fab/IgE. Compared with K_D value of the nonfragmented IgE 2F5 (1.7 nM), the Fab's K_D is 200 times higher, indicating lower affinity.

As described above, complementary paratope-epitope surfaces explain the high affinity of IgE 2F5 for rHev b 8 (Fig. 5). When we performed the structural alignment of rZea m 12 over rHev b 8 bound to the Fab, we found a possible steric hindrance generated by E128 of rZea m 12, which corresponds to D128 in rHev b 8; that could help explain the absence of cross-reactivity (Fig. 7a). Furthermore, in rHev b 8, N98 (which corresponds with G98 on rZea m 12) is essential to stabilize the complex because it establishes a hydrogen bond and four nonbonded contacts with T55 of CDR-H2. The relevance of these residues for recognition of profilin by the 2F5 mAb was verified by creating two mutated rZea m 12: E128D and E128D-G98N. The results show that both

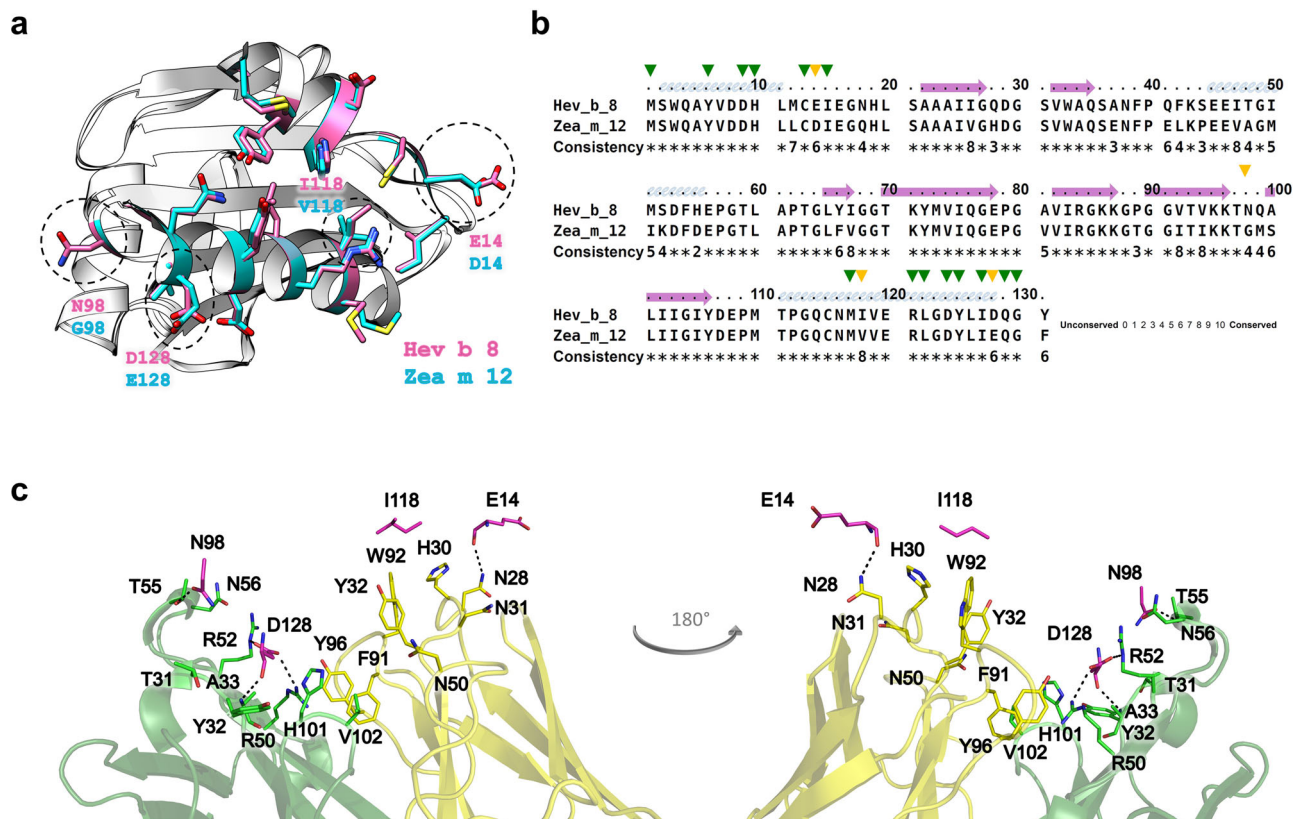


Fig. 7 Generating cross-reactivity. **a** Ribbon and stick models of rHev b 8 (pink) and rZea m 12 (cyan) profilins (RMSD 0.307 Å). Different residues between both profilins (E14, N98, I118, and D128) are circled in dotted lines; this epitope region is part of the polyproline binding site in profilins. **b** Sequence alignment between rHev b 8 and rZea m 12, green arrows show conserved residues in the epitope, and yellow arrows show different residues. **c** Paratope residues of Fab/IgE 2F5 and the four residues in rHev b 8 that are different in rZea m 12 are displayed as sticks. rHev b 8 epitope residues are shown in pink, the Fab heavy chain residues in green, and the Fab light chain residues in yellow. Dotted lines indicate residues interactions.

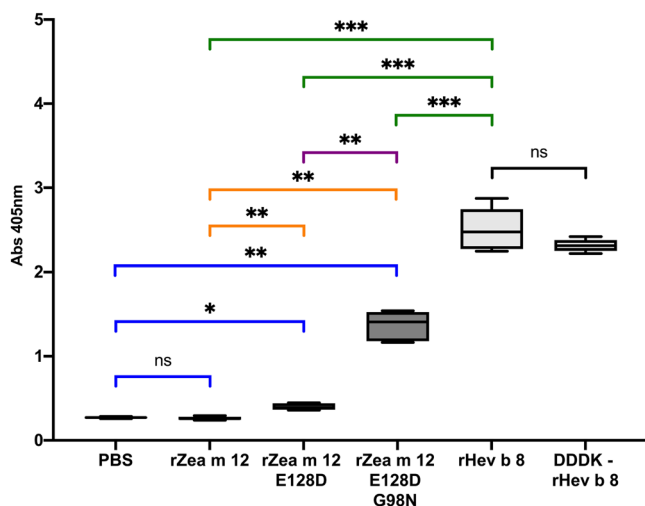


Fig. 8 Cross-reactivity immunoassay. Box and whisker plot showing ELISA results for Zea m 12, and its mutants compared with rHev b 8 and the Sidak's multiple comparisons tests. IgE interaction ELISA using rHev b 8, and the DDDK-rHev b 8 construct as positive controls, rZea m 12 as a negative control, rZea m 12-E128D single mutant, rZea m 12-E128D-G98N double mutant, and PBS as background control (ns not significant, all P values less than 0.001 are summarized with three asterisks). For these experiments, $n = 4$.

residues (D128 and N98) are essential contributors to the high stability of the complex. However, this statement does not mean that other residues are not significant, as mutation of these two residues (E128 and G98) in rZea m 12 resulted in a significant recognition by IgE 2F5, albeit not to the same level as recognition of rHev b 8 (Fig. 8). According to Sidak's multiple comparisons test⁴², IgE 2F5 recognition of the rZea m 12 mutants was significant compared to the recognition of rHev b 8, (Fig. 8). An extensive network of weak interactions at the interface paratope-epitope supports this result (Fig. 6a and Supplementary Data 1), where both profilins share 79.4% sequence identity.

Profilins have been underestimated as one of the most cross-reactive allergens and are currently classified as minor allergens based on their IgE-binding frequency. However, we demonstrated that annealing processes do not prevent the recognition of profilins by antibodies. Furthermore, we found using mutagenesis assays on the profilin from maize (rZea m 12), that minimal changes in aminoacidic sequence could avoid or allow cross-recognition of profilins by IgE antibodies.

The murine Fab/IgE 2F5 is a non-recombinant IgE obtained in response to immunization with rHev b 8 allergen. Therefore, VH and VL combination exhibits an authentic pairing of an IgE antibody. All CDR-H and CDR-L are essential for binding the surface of the profilin allergen. Further studies on the interaction of 2F5 (and other) anti-profilin antibodies with different profilins would help better define critical aspects of cross-reactivity among these significant allergens, which could have relevant implications in IgE engineering for diagnosis and research applications in allergy therapeutics.

Materials and methods

IgE 2F5 production and purification. We described the methodology for obtaining the IgE 2F5 in our previous paper²⁰. Briefly, female Balb/c mice were subcutaneously immunized every two weeks for two months with the recombinant allergen rHev b 8 adsorbed in alum (Al (OH)₃). We selected the mouse with a positive IgE response to the allergen for cell fusion. Ten days after the fusion, the supernatants of hybridoma cells were tested for the presence of IgE or IgG antibodies that recognized rHev b 8 using ELISA. We isolated one clone secreting IgE anti-profilin antibody (mAb 2F5), and the hybridoma secreting this IgE was cloned by limiting dilution. The isotype of the monoclonal IgE 2F5 was determined using the mouse immunoglobulin isotyping kit (Invitrogen, CA, USA).

Cell of the hybridoma 2F5 (producer of the monoclonal IgE antibody 2F5) were sent for sequencing of the Fv regions to Absolute Antibody Ltd (Redcar-Cleveland, United Kingdom), who provided the consensus sequences of the clone. Hybridoma cells²⁰ grown in RPMI-1640 medium supplemented with sodium pyruvate, L-glutamine, nonessential amino acids, antibiotics, and 3% of fetal bovine serum (FBS) in a humid atmosphere at 37 °C with 5% CO₂ produced the antibody. The secreted antibody was purified from the culture supernatant after centrifugation of the cell culture at 2000 × g for 20 min, and the cell pellet was discarded; the supernatant was filtered through a 0.22 μm membrane and applied to an affinity column equilibrated with PBS buffer, containing rHev b 8 covalently bound to an Affi-gel resin (Biorad, CA, USA). The antibody was eluted by changing pH with 0.2 M glycine-HCl buffer pH 2.8 and collected in 800 μL fractions in tubes containing 200 μL of 2.0 M Tris HCl buffer pH 8.0 to neutralize the pH immediately (Supplementary Fig. 3a).

IgE fragmentation with papain. We performed the IgE fragmentation tests under the conditions established by Haba and Nisonoff, 1991⁴³, (400 μL of papain, 75 μg/mL, 100 μL cysteine 0.5 M, 40 μL EDTA 0.5 M, 2 mg of IgE, 1 mL of PBS 10X, and 4.9 mL MilliQ water) incubated for 36 h at 37 °C. Murine IgG 2D10, previously obtained in our group²⁵, was used as a positive control for papain digestion. The negative control was IgE incubated for 36 h without papain. Reactions were stopped by the addition of iodoacetamide to a final concentration of 20 mM. These samples were then applied to SDS-PAGE gels under reducing and nonreducing conditions, along with papain and both IgE and IgG without treatment as molecular mass controls.

We used papain from Sigma (P-4762, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), and according to the supplier the enzyme cleavage site in our antibody is R204-T-I-L-V-R209 ↓ P210-V-N-I213, located between the Cε1 and Cε2 domains.

Purification of the Fab/IgE 2F5 fragment. After papain hydrolysis, the IgE fragmentation mixture was applied to a Superdex 75 size exclusion column (SEC) in an AKTA-FPLC system at a 0.3 mL/min flow rate in 50 mM TRIS buffer, pH 8.4. The fractions displaying a protein band at 66 kDa in SDS-PAGE were concentrated in 10 000 MWCO dialfiltration tubes (Sartorius, Göttingen, DE) and subsequently applied to a Mono Q GL cation exchange column, with a NaCl gradient from 0 to 250 mM in 40 mL. Finally, the fractions containing Fab were concentrated and dialyzed against crystallization buffer containing 20 mM TRIS-HCl and 50 mM NaCl pH 8.4, and purity was verified using SDS-PAGE (Supplementary Fig. 3b). The Fab/IgE 2F5 concentration was determined using the theoretical extinction coefficient at 280 nm calculated from the sequence ($A_{280\text{nm}}^{0.1\%}$) 1.7 mL mg⁻¹ cm⁻¹.

Protein expression and purification

rHev b 8 and rZea m12. Overexpression of rHev b 8 and rZea m 12 profilins was performed following the protocol described by Mares-Mejía, et al., 2016²⁰ using the *Escherichia coli* Rosetta strain (DE3) transformed with the vectors pET-28c-rHevb8 or pET-28c-rZeam12. The transformed strains were inoculated in 50 mL of Luria Bertani liquid media (LB), supplemented with 50 μg/mL kanamycin and 34 μg/mL chloramphenicol, and incubated at 37 °C overnight. Subsequently, the culture was scaled to 1 L under the same conditions and induced with 0.5 mM β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) at 30 °C for 12 h when the optical density was 0.7, at 600 nm. After the induction, the cells were harvested by centrifugation at 3100 × g for 10 min at 4 °C.

The cells were lysed in 50 mM TRIS-HCl buffer and 300 mM NaCl pH 8.0 and 1.0 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) with a Misonix 3000 sonicator (Misonix Inc. Farmingdale, NY, USA) using pulses of 10 s with power six and resting periods of 30 s until completing 10 min. The lysate was clarified by centrifuging at 3100 × g for 30 min, and the supernatant was collected. The supernatant was filtered through a 0.22 μm Millipore membrane and applied to a 5 mL HisTrap nickel affinity column (GE). Nonspecific interactions were eliminated by washing with 100 mL of 50 mM Tris HCl buffer, 300 mM NaCl, and 15 mM imidazole. Both recombinant proteins were eluted with 50 mM Tris HCl buffer, 300 mM NaCl, and 100 mM imidazole. Several milligrams of rHev b 8 whole construct was cleaved using EKMaxTM, and all the rZea m 12 was cleaved using TEV protease (prepared in our lab). SDS-PAGE verified purity, and the rHev b 8 concentration was determined using ($A_{280\text{nm}}^{0.1\%}$) of 1.1 mL mg⁻¹ cm⁻¹ for whole construct and 1.4 mL mg⁻¹ cm⁻¹ rHev b 8. The rZea m 12 concentration was determined using ($A_{280\text{nm}}^{0.1\%}$) of 1.2 mL mg⁻¹ cm⁻¹ (Supplementary Fig. 3c, d).

Design and purification of the rZea m 12-E128D and E128D-G98N mutants. iPCR was performed using AccuPrimeTM Pfx Super mix (Invitrogen, Waltham, MA, USA) and the following primers (Sigma, St. Louis, MO, USA):

E128D mutation

SEQUENCE 5'-TAC CTG ATC GAT CAG GGC TTC-3'
COMPLEMENTS'-GAA GCC CTG ATC GAT CAG GTA-3'.

E128D-G98N mutation

SEQUENCE5'- C AAG AAA ACT AAC ATG TCC TTG-3'
COMPLEMENTS'- CAA GGA CAT GTT AGT TTT CTT G-3'

pET-28c-Zea m 12-E128D and pET-28c-Zea m 12-E128D-G98N plasmids were propagated in *E. coli* DH5a cells to be extracted, purified, and sequenced (Laragen, CA, USA). Purified vectors were transformed into *E. coli* Rosetta cells (DE3) to be overexpressed as previously described.

Effect of heat treatment on the rHev b 8 circular dichroism (CD) spectrum. The rHev b 8 CD spectra were obtained in the far-UV region (195–260 nm) using a JASCO J-1500 spectropolarimeter and a 1 mm path-length quartz cuvette. The protein concentration was 0.18 mg/mL in PBS, and the experiments were performed at 25 °C. The signal is expressed in terms of molar ellipticity θ (degree × cm² × dmol⁻¹). The baseline obtained using the buffer under identical conditions was subtracted from the final spectra. Three scans were averaged to obtain the final spectrum of the recombinant allergen.

We followed the thermal unfolding, setting the ellipticity at 218 nm while heating (25–90 °C) or cooling (90–25 °C) at one °C/min with a Jasco PTC-510 Peltier temperature controller and Mini-Jasco MCB-100 water circulation bath. The spectrum was analyzed using the BeStSel online software^{44,45}.

ELISA, Western blot assays and cross-reactivity. rHev b 8 thermal stability was evaluated by ELISA measuring the binding of IgE 2F5 to the different profilins. Plates of 96 wells were coated for two hours at 37 °C with 100 μL of 0.7 μM rHev b 8 or rZea m 12, in PBS buffer pH 7.4. Then, the wells were washed three times using PBS with 0.1% Tween 20 (washing buffer), blocked with 1% BSA in PBS, and incubated for two hours at 37 °C. The wells were washed three times, and 100 μL of IgE 2F5 diluted in PBS was added per well and incubated for one h at 37 °C. After incubation, the plate was washed three times with washing buffer, and 100 μL of HRP-labeled secondary antibody anti-mouse IgE Fcε specific (Abcam Inc., Cambridge, UK), diluted in PBS (1:3000), was added per well, and then incubated for one h at 37 °C. The peroxidase reaction was developed using 100 μL/well ABTS (Invitrogen, CA, USA) as the substrate and incubated for 20 min. Plates were read at 405 nm using a Cytation 3 plate reader (BioTek Instruments Inc. Winooski, VT, USA). The average absorbance of four independent value experiments and the corresponding standard deviation were plotted.

For western blot experiments, ten μg of rHev b 8 was electrophoresed on a 15% SDS-PAGE²⁵. The gel was transferred to a PVDF membrane with a constant voltage (15 V) for 50 min. The PVDF membrane was blocked with 3% albumin, and 0.05% Tween 20 in PBS, washed three times using PBS with 0.1% Tween 20, and submerged in a two μg/μL IgE 2F5 solution overnight at 4 °C. The PVDF membrane was washed three times and then submerged in a secondary antibody anti-mouse IgE Fcε specific (Abcam Inc., Cambridge, UK) (1:2000 dilution) solution for 2 h at 37 °C. The PVDF membrane was washed three times, and the peroxidase reaction was developed using Novex HRP, and chromogenic substrate (TMB) (Pierce Thermo-Scientific, IL, USA) for 15 minutes.

To demonstrate cross-reactivity between rHev b 8 and rZea m 12, ELISA experiments were performed by coating the plate with 100 μL of 0.7 μM rHev b 8, DDDK-rHev b 8, rZea m 12, rZea m 12-E128D single mutant, or rZea m 12-E128D-G98N double mutant, in PBS buffer pH 7.4. Phosphate-buffered saline (PBS) was used as a background control, DDDK-rHev b 8, and rHev b 8 were used as positive controls, and rZea m 12 was used as a negative control. We then followed the methodology previously described. The average of four independent determinations and the standard deviation were plotted.

Kinetic binding assays of Fab/IgE 2F5 with rHev b 8 using biolayer interferometry. Profilin rHev b 8 was biotinylated in PBS buffer pH 7.4, 0.05% Tween 20 and 1 M NaCl employing a 1:5 profilin: biotin ratio, and the excess of reactive ester groups were blocked using ethanolamine. Biotinylated profilin was dialyzed extensively to remove free biotin and ethanolamine using diafiltration tubes of 10,000 MWCO and immobilized to the streptavidin biosensor at a concentration of 125 nM. The assay was performed in a total volume of 200 μL using black bottom 96-well microplates (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) at 25 °C with orbital shaking at 1000 rpm. The immobilized profilin was titrated with different concentrations of the Fab/IgE 2F5 (62.5, 125, 250, 500, 1000, and 2000 nM), BSA was used as the negative control, and new streptavidin biosensors were used for each experiment. All the experiments were performed using the Octet[®] RED96 System from FortéBio, controlled with the software Data Acquisition 8.2 (FortéBio Inc. San Jose, CA, USA). The BLI experiment baseline was PBS buffer pH 7.4, 0.05% Tween 20 and 1 M NaCl for 60 sec. The biotinylated allergen was then allowed to bind to the streptavidin sensor for 300 s, then washed with the same buffer to eliminate nonspecific binding. Next, the purified Fab/IgE 2F5 was bound to the allergen in the biosensor, and the association rate was measured (k_a). The dissociation rate (k_d) of the allergen-Fab complex was obtained in the last step. The data were processed

using the Octet Data Analysis Software version 8.2 and fitted to 1:1. Besides, we used a BLI fitting considering nonspecific binding (NSB) through the Association-Dissociation model implemented in GraphPad Prism 8³³ and a 1:1 model GraphPad Prism 8 association-then-dissociation model to fit the processed data.

Crystallization of the Fab/IgE 2F5-rHev b 8 complexes. The Fab/IgE 2F5-rHev b 8 complexes were prepared in two ways, using rHev b 8 and the DDDK-rHev b 8 (Supplementary Fig. 3d). The complex components were dialyzed in the crystallization buffer, mixed, and incubated for 16 h to form the complex. Profilin's excess was removed using 50,000 MWCO diafiltration tubes and washed ten times with the crystallization buffer using a dilution factor of 10. The protein concentration was determined using ($A_{280\text{nm}}^{0.1\%}$) of 1.66 mL mg⁻¹ cm⁻¹ and ($A_{280\text{nm}}^{0.1\%}$) of 1.65 mL mg⁻¹ cm⁻¹ calculated for the complex using the rHev b 8 and DDDK-rHev b 8, respectively.

Both complexes' crystallization screening was performed using a 1.7 mg/mL concentration with the Hampton Research PEG-Ion I and II crystallization kits and the sitting-drop vapor diffusion mode. After nine days, the complex formed by Fab/IgE 2F5 and the DDDK-rHev b 8 revealed crystals under various conditions. The best crystals were obtained with condition 24 of kit I (0.2 M lithium acetate, 20% PEG 3350). Using one of these crystals, we collected a dataset at 3.34 Å resolution employing a rotating anode generator MicroMax 007HF (Cu K α , $\lambda = 1.5418$ Å), with a Dectris-Pilatus 3 R/200K-A detector. The crystal detector distance was 70 cm, with omega increments of 0.2° and an exposure time of 200 s per image. The cryoprotective solution was prepared with the stock solution and 30% glycerol.

After several months, we obtained an increasing number of crystals of the complex Fab/IgE 2F5 with the rHev b 8 DDDK-rHev b 8. We collected a dataset at 3.04 Å resolution from crystals that grew up in the condition containing 2% TacsimiteTM pH 6.0, 0.1 M BIS-TRIS pH 6.5, 20% w/v Polyethylene glycol 3350. Data collection was performed using line 17-ID-1 of the National Synchrotron Light Source (NSLS) at the Brookhaven National Laboratory (BNL) in Upton, New York. We prepared the cryoprotective solution with the stock solution and 30% glycerol.

Crystallization of Fab/IgE 2F5. Fab/IgE 2F5 was dialyzed in 10 000 MWCO diafiltration tubes with ten washes of crystallization buffer II (20 mM TRIS-HCl with 200 mM NaCl, pH 8.4) using a dilution factor of 10. Subsequently, the Fab was concentrated to 3.3 mg/mL and screened using the PEG-Ion I and II crystallization kits (Hampton Research, Aliso Viejo, CA, USA) by vapor diffusion in the seated drop mode. Crystals appeared under various conditions after several months of incubation at 18 °C. The condition C1 (0.2 M magnesium acetate, 20% w/v polyethylene glycol 3,350) produced suitable crystals to be diffracted, and a dataset at 3.75 Å resolution was collected using a rotating anode generator MicroMax 007HF (Cu K α , $\lambda = 1.5418$ Å) with a DECTRIS-PILATUS 3 R/200K-A detector. The crystal detector distance was 70 cm, with omega increments of 0.2° and an exposure time of 200 s per image. The cryoprotective solution was prepared with the stock solution and 30% glycerol.

Structure determination of the complex Fab/IgE 2F5-rHev b 8 and the Fab/IgE 2F5. The data collected at 3.04 and 3.34 Å were indexed, integrated, and scaled using the XDS^{46,47} and HKL3000⁴⁸ software. Both crystals were orthorhombic and belonged to the space group (P212121). The structure of the complex Fab/IgE 2F5-DDDK-rHev b 8 at 3.04 Å was determined by molecular replacement with PHASER⁴⁹ using rHev b 8 profilin (PDB 5FDS) and the anti-DNP Fab/IgE fragment (PDB: 1BAF) as search models. We performed iterative model building and refinement cycles with PHENIX Real-space refinement⁵⁰, alternating manual model building with COOT⁵¹. The model was integrated onto the electron density maps 2Fo-Fc and Fo-Fc. Weight optimization of real-space refinement was performed during refinement. We used the coordinates of the complex Fab/IgE 2F5-rHev b 8 at 3.04 Å to determine the Fab/IgE 2F5-rHev b 8 structure using the crystal data at 3.34 Å resolution. For these models, the Ramachandran plots indicate 97.83% and 98.14% residues in favored region (2.17% and 1.86% in the allowed region) for the 3.04 and 3.34 models, respectively. Data processing and refinement statistics for both models are provided in Table 1. The Protein Interaction Calculator (PIC)³¹ and PDBsum²⁸ were used to analyze the protein-protein interfaces.

The data collected at 3.75 Å for the Fab/IgE 2F5 were scaled using XDS^{46,47}, and the space group was verified with Aimless⁵². The crystal was monoclinic and belonged to the space group (I121). The Matthews coefficient suggested three molecules in the asymmetric unit. The structure of Fab/IgE 2F5 was determined by molecular replacement with PHASER⁴⁹ using the Fab structure of the complex Fab/IgE 2F5-rHev b 8 at 3.04 Å as the search model. We performed iterative refinement cycles using PHENIX Real-space refinement⁵⁰, alternating manual model building with COOT⁵¹. The B-factors were refined as implemented in Phenix (XYZ coordinates, Real Space, Occupancies, and Individual B factor). In the final steps of the refinement, we set the value of all atoms to 50 Å². Weight optimization of real-space refinement was also used during refinement. The model was integrated into the electron density maps 2Fo-Fc and Fo-Fc. For this model, the Ramachandran Plot indicates 97.03% residues in the favored region, whereas 2.97% in the allowed region. All the structure figures were generated using Chimera⁵³ and PyMOL⁵⁴. We used the Praline server⁵⁵ for sequence alignments.

Atomic coordinates have been deposited in the Protein Data Bank under accession codes 7SBD (Complex at 3.04 resolution), 7SBG (Complex at 3.34 resolution), and 7SD2 (for the Fab).

Fab glycosylation detection by SDS-PAGE and the periodic acid-Schiff reagent. A gradient SDS-PAGE (7.5, 10 and 12% separation gel) was performed loading the Fab/IgE 2F5-rHev b 8 complex, IgE 2F5, Fab/IgG 2D10-rHev b 8 complex, IgG 2D10, Fab/IgG 1B4-rHev b 8 complex, IgG 1B4, profilin rHev b 8, horseradish peroxidase as a positive control and soybean trypsin inhibitor as a negative control. Glycoproteins were stained on gels with the periodic acid-Schiff reagent method was achieved using the Pierce Glycoprotein Staining Kit (Thermo Fisher, MA, USA).

Mass measurements by MALDI-TOF. We determined the molecular masses of recombinant rHev b 8 (whole construct), the Fab/IgE 2F5, and the complex Fab/IgE 2F5-rHev b 8 (whole construct) using matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry (Microflex; Bruker Scientific LLC, Billerica, MA, USA). The standards for mass calibration were lysozyme (14,400 Da) and bovine serum albumin (BSA) (66,430 Da). The matrix used was a saturated solution of sinapinic acid in 30% (v/v) aqueous acetonitrile and 0.1% (v/v) trifluoroacetic acid. Samples were analyzed using FLEX ANALYSIS 3.0TM (Bruker) software.

Statistical analysis and reproducibility. The statistical analysis of the ELISAs was performed using the one-way analysis of variance (ANOVA), followed by an all-pairwise multiple comparison procedure (Šidák method)⁴². A *P* value < 0.05 was considered statistically significant. All summary statistics and analyses were performed using the Prism 8.0 software (GraphPad Software, La Jolla, Calif) (<https://www.graphpad.com/>). An asterisk identifies statistical significance and is denoted as **p* < 0.05; ***p* < 0.01; ****p* < 0.001; *****p* < 0.0001. Error bars represent standard deviation from the mean. Sample size and replicates for each experiment are listed in the figure legends.

Reporting summary. Further information on research design is available in the Nature Research Reporting Summary linked to this article.

Data availability

Atomic models for the complexes Fab/IgE-Hev b 8 have been deposited at the PDB with accession codes 7SBD and 7SBG (<https://doi.org/10.2210/pdb7SBD/pdb> and <https://doi.org/10.2210/pdb7SBG/pdb>). The crystal structure of the Fab/IgE 2F5 has the PDB accession code 7SD2 (<https://doi.org/10.2210/pdb7SD2/pdb>). Other data are available from the corresponding author on request.

Received: 12 January 2022; Accepted: 14 July 2022;

Published online: 27 July 2022

References

- Golembiewski, J. A. Allergic reactions to drugs: implications for perioperative care. *J. Perianesth. Nurs.* **17**, 393–398 (2002).
- Tarlo, S. M. & Lemiere, C. Occupational asthma. *N. Engl. J. Med.* **370**, 640–649 (2014).
- Sudharson, S., Kalic, T., Hafner, C. & Breiteneder, H. Newly defined allergens in the WHO/IUIS Allergen Nomenclature Database during 01/2019–03/2021. *Allergy* **76**, 3359–3373 (2021).
- Huby, R. D., Dearman, R. J. & Kimber, I. Why are some proteins allergens? *Toxicol. Sci.* **55**, 235–246 (2000).
- Akil, C. & Robinson, R. C. Genomes of Asgard archaea encode profilins that regulate actin. *Nature* **562**, 439–443 (2018).
- Offermann, L. R. et al. Structural, functional, and immunological characterization of profilin panallergens Amb a 8, Art v 4, and Bet v 2. *J. Biol. Chem.* **291**, 15447–15459 (2016).
- Santos, A. & Van Ree, R. Profilins: mimickers of allergy or relevant allergens. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **155**, 191–204 (2011).
- Popescu, F. D. Cross-reactivity between aeroallergens and food allergens. *World J. Methodol.* **5**, 31–50 (2015).
- Landa-Pineda, C. M. et al. [Profilins: allergens with clinical relevance]. *Rev. Alerg. Mex.* **60**, 129–143 (2013).
- Jensen, R. K. et al. Structure of intact IgE and the mechanism of ligelizumab revealed by electron microscopy. *Allergy* **75**, 1956–1965 (2020).
- Sutton, B. J. & Davies, A. M. Structure and dynamics of IgE-receptor interactions: FcεRI and CD23/FcεRII. *Immunol. Rev.* **268**, 222–235 (2015).
- Shin, J. S. & Greer, A. M. The role of FcεRI expressed in dendritic cells and monocytes. *Cell. Mol. Life Sci.* **72**, 2349–2360 (2015).

13. von Bubnoff, D., Novak, N., Kraft, S. & Bieber, T. The central role of FcεRI in allergy. *Clin. Exp. Dermatol.* **28**, 184–187 (2003).
14. Kraft, S. & Kinoshita, J. P. New developments in FcεRI regulation, function and inhibition. *Nat. Rev. Immunol.* **7**, 365–378 (2007).
15. Bowles, S. L. et al. Comparative binding of soluble fragments (derCD23, sCD23, and exCD23) of recombinant human CD23 to CD21 (SCR 1-2) and native IgE, and their effect on IgE regulation. *Cell Immunol.* **271**, 371–378 (2011).
16. Niemi, M. et al. Molecular interactions between a recombinant IgE antibody and the beta-lactoglobulin allergen. *Structure* **15**, 1413–1421 (2007).
17. Padavattan, S. et al. High-affinity IgE recognition of a conformational epitope of the major respiratory allergen Phl p 2 as revealed by X-ray crystallography. *J. Immunol.* **182**, 2141–2151 (2009).
18. Mitropoulou, A. N. et al. Structure of a patient-derived antibody in complex with allergen reveals simultaneous conventional and superantigen-like recognition. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **115**, E8707–e8716 (2018).
19. Brünger, A. T., Leahy, D. J., Hynes, T. R. & Fox, R. O. 2.9 Å resolution structure of an anti-dinitrophenyl-spin-label monoclonal antibody Fab fragment with bound hapten. *J. Mol. Biol.* **221**, 239–256 (1991).
20. Mares-Mejía, I. et al. Structural insights into the IgE mediated responses induced by the allergens Hev b 8 and Zea m 12 in their dimeric forms. *Sci. Rep.* **6**, 32552 (2016).
21. Ganglberger, E. et al. Hev b 8, the Hevea brasiliensis latex profilin, is a cross-reactive allergen of latex, plant foods and pollen. *Int Arch. Allergy Immunol.* **125**, 216–227 (2001).
22. Islam, M. M. et al. Analysis and control of protein crystallization using short peptide tags that change solubility without affecting structure, thermal stability, and function. *Cryst. Growth Des.* **15**, 2703–2711 (2015).
23. Stanfield, R. L., Zemla, A., Wilson, I. A. & Rupp, B. Antibody elbow angles are influenced by their light chain class. *J. Mol. Biol.* **357**, 1566–1574 (2006).
24. Sotriffer, C. A., Rode, B. M., Varga, J. M. & Liedl, K. R. Elbow flexibility and ligand-induced domain rearrangements in antibody Fab NC6.8: large effects of a small hapten. *Biophys. J.* **79**, 614–628 (2000).
25. Mares-Mejía, I. et al. Novel murine mAbs define specific and cross-reactive epitopes on the latex profilin allergen Hev b 8. *Mol. Immunol.* **128**, 10–21 (2020).
26. Emsley, P. & Crispin, M. Structural analysis of glycoproteins: building N-linked glycans with Coot. *Acta Crystallogr. D. Struct. Biol.* **74**, 256–263 (2018).
27. Shade, K. T. et al. A single glycan on IgE is indispensable for initiation of anaphylaxis. *J. Exp. Med.* **212**, 457–467 (2015).
28. Laskowski, R. A. PDBsum new things. *Nucleic Acids Res.* **37**, D355–359 (2009).
29. Tordesillas, L. et al. Characterization of IgE epitopes of Cuc m 2, the major melon allergen, and their role in cross-reactivity with pollen profilins. *Clin. Exp. Allergy* **40**, 174–181 (2010).
30. López-Torrejón, G. et al. An experimental and modeling-based approach to locate IgE epitopes of plant profilin allergens. *J. Allergy Clin. Immunol.* **119**, 1481–1488 (2007).
31. Tina, K. G., Bhadra, R. & Srinivasan, N. PIC: protein interactions calculator. *Nucleic Acids Res.* **35**, W473–476 (2007).
32. Barrows, J. K. & Van Dyke, M. W. Biolayer interferometry for DNA-protein interactions. *PLoS ONE* **17**, e0263322 (2022).
33. Motulsky, H. J. Equation: Association then dissociation. *GraphPad Curve Fitting Guide*. https://www.graphpad.com/guides/prism/latest/curve-fitting/reg_equation_association_then_disso.htm (2022).
34. Wu, N. C. et al. An alternative binding mode of IGHV3-53 antibodies to the SARS-CoV-2 receptor binding domain. *Cell Rep.* **33**, 108274 (2020).
35. Hauser, M., Roulias, A., Ferreira, F. & Egger, M. Panallergens and their impact on the allergic patient. *Allergy Asthma Clin. Immunol.* **6**, 1 (2010).
36. Lu, J. & Pollard, T. D. Profilin binding to poly-L-proline and actin monomers along with ability to catalyze actin nucleotide exchange is required for viability of fission yeast. *Mol. Biol. Cell* **12**, 1161–1175 (2001).
37. Shade, K. T., Conroy, M. E. & Anthony, R. M. IgE glycosylation in health and disease. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **423**, 77–93 (2019).
38. Hunt, J. et al. A fluorescent biosensor reveals conformational changes in human immunoglobulin E Fc: implications for mechanisms of receptor binding, inhibition, and allergen recognition. *J. Biol. Chem.* **287**, 17459–17470 (2012).
39. Roux, K. H., Strelets, L., Brekke, O. H., Sandlie, I. & Michaelsen, T. E. Comparisons of the ability of human IgG3 hinge mutants, IgM, IgE, and IgA2, to form small immune complexes: a role for flexibility and geometry. *J. Immunol.* **161**, 4083–4090 (1998).
40. Sirvent, S., Palomares, O., Cuesta-Herranz, J., Villalba, M. & Rodríguez, R. Analysis of the structural and immunological stability of 2S albumin, nonspecific lipid transfer protein, and profilin allergens from mustard seeds. *J. Agric. Food Chem.* **60**, 6011–6018 (2012).
41. Pekar, J., Ret, D. & Untertmayr, E. Stability of allergens. *Mol. Immunol.* **100**, 14–20 (2018).
42. Abdi, H. in *Encyclopedia of Measurement and Statistics* (ed Salkind, N. J.) 103–107 (Sage, Thousand Oaks, CA, 2007).
43. Haba, S. & Nisonoff, A. Proteolytic digestion of mouse IgE. *J. Immunol. Methods* **138**, 15–23 (1991).
44. Micsonai, A. et al. BeStSel: a web server for accurate protein secondary structure prediction and fold recognition from the circular dichroism spectra. *Nucleic Acids Res.* **46**, W315–W322 (2018).
45. Micsonai, A. et al. Accurate secondary structure prediction and fold recognition for circular dichroism spectroscopy. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **112**, E3095–3103 (2015).
46. Kabsch, W. XDS. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* **66**, 125–132 (2010).
47. Kabsch, W. Integration, scaling, space-group assignment and post-refinement. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* **66**, 133–144 (2010).
48. Minor, W., Cymborowski, M., Otwinowski, Z. & Chruszcz, M. HKL-3000: the integration of data reduction and structure solution—from diffraction images to an initial model in minutes. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* **62**, 859–866 (2006).
49. McCoy, A. J. et al. Phaser crystallographic software. *J. Appl. Crystallogr.* **40**, 658–674 (2007).
50. Afonine, P. V. et al. Towards automated crystallographic structure refinement with phenix.refine. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* **68**, 352–367 (2012).
51. Emsley, P., Lohkamp, B., Scott, W. G. & Cowtan, K. Features and development of Coot. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* **66**, 486–501 (2010).
52. Evans, P. R. & Murshudov, G. N. How good are my data and what is the resolution. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* **69**, 1204–1214 (2013).
53. Pettersen, E. F. et al. UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis. *J. Comput. Chem.* **25**, 1605–1612 (2004).
54. DeLano, W. L. In *CCP4 Newsletter on Protein Crystallography*, Vol. 40, 82–92 (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.0 Schrödinger, LLC, 2002).
55. Simossis, V. A. & Heringa, J. PRALINE: a multiple sequence alignment toolbox that integrates homology-extended and secondary structure information. *Nucleic Acids Res.* **33**, W289–294 (2005).

Acknowledgements

This paper is dedicated to the memory of A.T.-L., a very appreciated colleague and friend. This work was supported by DGAPA-UNAM (Grants PAPIIT-IN207613 to A.R.-R. and IN208320 to E.O.); and CONACyT (Grants 221169 and CF 2019–87163 to A.R.-R.) and is part of the Ph.D. thesis of B.G.-R., student from the Programa de Doctorado en Ciencias Bioquímicas, UNAM, who received a fellowship from CONACYT (CVU-434885). The authors would like to thank Jean Jaconcik and Vivian Stojanoff at the 17-IS-1 (AMX) beamline for X-ray data collection. Work at the AMX 17-ID-1 beamlines is supported by the National Institutes of Health, National Institute of General Medical Sciences (P41GM11244), and by the DOE Office of Biological and Environmental Research (KP1605010), and the National Synchrotron Light Source-II at Brookhaven National Laboratory is supported by the DOE Office of Basic Energy Sciences under contract number DE-SC0012704 (KC0401040). We also thank Georgina Espinosa for X-ray data collection at LANEM-IQ-UNAM and Claudia Garay-Canales from IIB-UNAM for experiments with hybridoma cells.

Author contributions

B.G.-R. and A.R.-R. designed the study, performed experiments, and wrote the manuscript. B.G.-R., I.M.-M., A.R.-H., P.C.-S., A.T.-L. and E.O. designed and performed experiments. B.G.-R. determined the crystal structures. B.G.-R., E.O. and A.R.-R. analyzed data. All the authors commented the manuscript.

Competing interests

The antibody IgE 2F5 and its use thereof has been granted the patent MX 387680. Correspondence and requests for materials should be addressed to A.R.-R. (email: adela@unam.mx). The rest of the authors declare that they have no relevant conflicts of interest.

Additional information

Supplementary information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1038/s42003-022-03718-w>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to Adela Rodríguez-Romero.

Peer review information *Communications Biology* thanks Alicia Chenoweth and the other, anonymous, reviewer(s) for their contribution to the peer review of this work. Primary handling editors: Damon Tumes and Manuel Breuer.

Reprints and permission information is available at <http://www.nature.com/reprints>

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2022

Aplicaciones médicas de los anticuerpos

Benjamín García Ramírez y Adela Rodríguez Romero

Resumen

Debido a la pandemia originada por el virus SARS-CoV-2, los anticuerpos se han convertido en foco de discusión. Estas moléculas, también llamadas *inmunoglobulinas*, son proteínas especializadas, producidas por el sistema inmune en respuesta a la presencia de invasores extraños del cuerpo, como virus, bacterias, parásitos o cualquier otra sustancia extraña, a las cuales se les denomina *antígenos*. Una vez detectados, los anticuerpos se unen a estos invasores de una manera muy específica y entonces los marcan para ser destruidos. Sin embargo, existen muchas dudas sobre qué son los anticuerpos y cómo funcionan. Este documento tiene como objetivo aclarar algunas preguntas relacionadas con estas moléculas.

Palabras clave: anticuerpos, inmunoglobulinas, vacuna, virus.

ANTIBODIES' MEDICAL APPLICATIONS

Abstract

Antibodies have been the focus of discussion due to the pandemic caused by the SARS-CoV-2 virus. These molecules, also called *immunoglobulins*, are specialized proteins produced by the immune system in response to the presence of foreign invaders of the body, such as viruses, bacteria, parasites or any other substance, which are called *antigens*. Once detected, the antibodies bind to these invaders in a very specific way and then mark them for destruction. However, there are many questions about what antibodies are and how they work. This document aims to clarify some questions related to these molecules.

Keywords: antibodies, immunoglobulins, vaccine, virus.

Recepción: 13/01/2021. Aprobación: 13/04/2021.

DOI: <http://doi.org/10.22201/cuaieed.16076079e.2021.22.5.5>



Benjamín García Ramírez

benjamin.garcia.ramirez@live.com
orcid.org/0000-0002-5322-576X

Estudiante de doctorado adscrito al Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), con maestría en Ciencias Bioquímicas en el mismo instituto y Licenciatura en Química de Alimentos por la Facultad de Química de la UNAM. Sus intereses se centran en el estudio estructural y la caracterización biofísica de proteínas con sus ligandos. En el laboratorio donde desarrolla su tesis doctoral se tiene interés en la investigación de moléculas relacionadas con la alergia, y su proyecto consiste en la caracterización de complejos entre anticuerpos (de tipo IgE e IgG) y sus antígenos. Entre sus intereses se encuentra la divulgación de la ciencia en idioma español y su enseñanza, de manera más comprensible para la población en general.

Adela Rodríguez Romero

adela@unam.mx
orcid.org/0000-0001-7641-6545

Doctora en Ciencias por la Universidad Autónoma Metropolitana (UAM). Es especialista en Cristalografía de Proteínas y nivel III del SNI. Recibió el premio a la mejor tesis doctoral en química en la UNAM, en 1992 y el Reconocimiento Sor Juana Inés de la Cruz, UNAM, en 2006. Realizó dos estancias de investigación en el Center for Advanced Research in Biotechnology, del NIST, Maryland, Estados Unidos. En la actualidad es investigadora titular del Instituto de Química de la UNAM, y es responsable de la Unidad de Estructura de Proteínas que forma parte del Laboratorio Nacional de Estructura de Macromoléculas (LANEM-IQ). Entre sus principales aportaciones se encuentra la determinación de la estructura tridimensional de diversas lectinas, enzimas, fragmentos Fab y alérgenos proteicos. Es profesora de posgrado en los temas de estructura, estabilidad y función de proteínas, así como un curso teórico-práctico en cristalografía de proteínas.

¿Qué son los anticuerpos?

Los *anticuerpos* son grandes estructuras proteicas, que forman parte del sistema inmune y se encuentran en la sangre, saliva, lágrimas, leche materna y mucosas. Éstos protegen a los organismos ante sustancias dañinas o patógenos, por lo que evitan las enfermedades.

Los anticuerpos están constituidos por una o más cadenas de aminoácidos y algunas de ellas tienen unidas cadenas de azúcares o sacáridos. Un *aminoácido* es una molécula orgánica pequeña, que contiene un grupo amino, uno carboxilo y una cadena lateral, que puede presentar diferentes características químicas. En la naturaleza existen 20 aminoácidos diferentes y son las piezas básicas que constituyen a las proteínas, al unirse entre sí por un enlace peptídico. Si imaginamos a una proteína como una cadena de perlas, cada aminoácido es representado por una perla de color diferente (ver figura 1, izquierda). Para que estas cadenas puedan realizar alguna función, la mayoría de las veces deben de adquirir una estructura tridimensional o plegamiento específico, es decir, una forma no lineal. Esta estructura tridimensional depende de los aminoácidos que la componen y de la longitud de la cadena (ver figura 1, derecha).

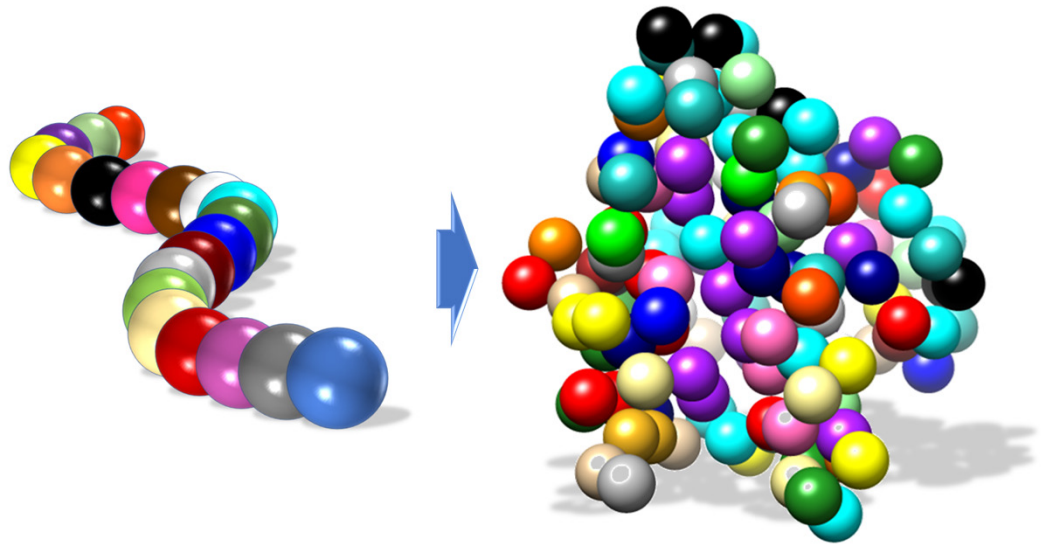


Figura 1. Izquierda. Cadena de aminoácidos lineal. Derecha. Cadena de aminoácidos plegada, que es como adquiere, generalmente, su actividad biológica. Cada aminoácido está representado por una perla de diferente color.

En general, los anticuerpos están constituidos por cuatro cadenas de aminoácidos: dos cadenas pesadas, que contienen un número mayor de aminoácidos, y dos cadenas ligeras idénticas. Estas cadenas se unen y forman una estructura en forma de la letra Y (ver figura 2). Las diferencias entre los aminoácidos que componen dichas cadenas brindan distintas características a los anticuerpos, como flexibilidad, distinción entre patógenos (*especificidad*), el tipo de respuesta que despliegan, e inclusive la forma en que se encuentran en el organismo. Los anticuerpos se dividen en dos fragmentos, el fragmento de unión al antígeno o Fab (del inglés *antigen binding fragment*), que se compone de la cadena ligera y la cadena pesada (ver figura 2), y el fragmento Fc (del inglés

crystallizable fragment), que es la continuación de las dos cadenas pesadas, y es el que tiene la capacidad de interaccionar con otros elementos del sistema inmune (Abbas *et al.*, 2014, p. 88).

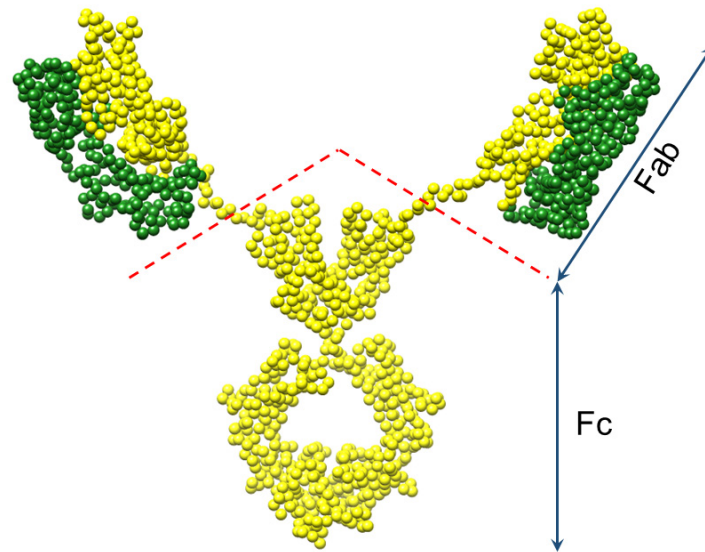


Figura 2. Representación en esferas de un anticuerpo. Se muestran en amarillo los aminoácidos de las dos cadenas pesadas (440 aminoácidos), y en verde las dos cadenas ligeras (220 aminoácidos). La línea discontinua (rojo) indica la separación entre el fragmento Fab y el fragmento Fc.

Los anticuerpos reconocen, de manera muy específica, regiones en la superficie de los agentes externos o antígenos mediante los fragmentos Fab. Los antígenos pueden ser proteínas, carbohidratos, lípidos u otras moléculas encontradas en bacterias, hongos, parásitos, virus, productos químicos y otras sustancias que provocan que el sistema inmunológico desencadene una respuesta. Una vez unidos a los antígenos, los anticuerpos transmiten una señal a través de la unión del fragmento Fc a receptores específicos, lo que desencadena una cascada de acciones que "vencen" al invasor. Estos receptores están localizados en la superficie de varias células del sistema inmunológico (ver figura 3). Los anticuerpos

son parte del *sistema inmunológico adaptativo*, que reconoce y elimina patógenos específicos.

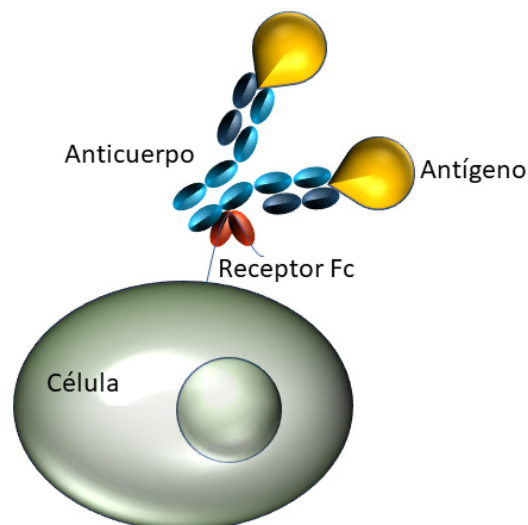


Figura 3. Esquema que muestra el reconocimiento de un agente externo o antígeno (amarillo) por un anticuerpo (azul), el cual se une al receptor de una célula del sistema inmune (rojo), mediante su fragmento Fc (azul).

Por tanto, una de las funciones principales de los anticuerpos que son secretados a la mucosa y sangre es unirse e inactivar sustancias extrañas como virus, patógenos o toxinas. La región en la superficie del virus o patógeno que es reconocida por el anticuerpo se denomina *epítipo*, mientras que la región que reconoce al epítipo se conoce como *parátipo* y cada anticuerpo cuenta con dos

parátomos (ver figura 4). Estos últimos reconocen de manera complementaria al epítomo, formando un complejo anticuerpo-antígeno a través de una serie de interacciones muy específicas, tal y como una llave reconoce a la cerradura. Consecuentemente, a mayor complementariedad parátomo-epítomo, el anticuerpo será más específico; por el contrario, si no existe complementariedad no habrá reconocimiento (ver figura 4). Esta especificidad favorece, por ejemplo, que un anticuerpo reconozca al virus de la influenza y no al virus SARS-CoV-2.

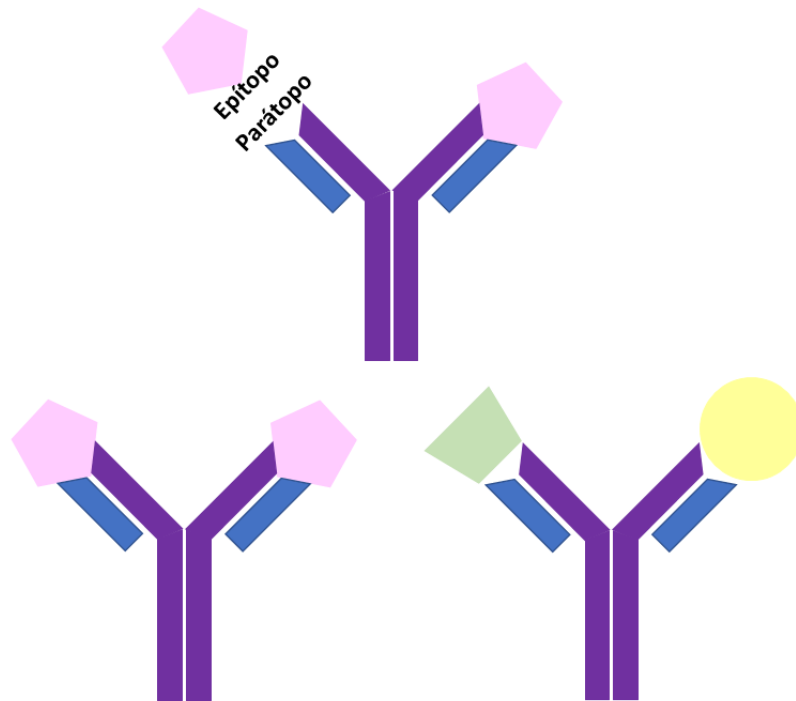


Figura 4. Esquema del reconocimiento de un antígeno por un anticuerpo. En rosa se muestra al antígeno con su epítomo uniéndose al parátomo. El reconocimiento parátomo-epítomo es complementario. En verde y amarillo se muestran antígenos no complementarios.

¿Dónde se forman y como actúan los anticuerpos?

En los organismos existen múltiples respuestas inmunológicas, algunas de las cuales están mediadas por células y otras por proteínas. En la respuesta mediada por proteínas, también llamada *respuesta humoral*, se encuentran los anticuerpos.

Los anticuerpos generados en mamíferos son producidos por las **células B** o glóbulos blancos que se forman en la médula ósea. Estos últimos producen anticuerpos, inicialmente como receptores en su superficie, y una vez que maduran, los liberan. Cuando los antígenos son reconocidos, las células B se activan a través de un complejo mecanismo que les permite madurar y dividirse en células idénticas llamadas *clon*. Algunas células B derivan en *células plasmáticas*, que actúan como fábricas, secretando millones de anticuerpos al torrente sanguíneo y al sistema linfático, o pueden derivar en *células B de memoria*, que permiten una respuesta del sistema inmune en menor tiempo, cuando existe una segunda exposición al mismo antígeno (Murphy y Weaver,

2016, p. 195). Para entender la importancia de los anticuerpos, podemos pensar en personas infectadas por el Virus de Inmunodeficiencia Adquirida (VIH), el cual daña el sistema inmunológico al destruir sus glóbulos blancos, por lo que no se producen anticuerpos contra agentes extraños y las personas pueden, entonces, sufrir enfermedades graves.

En humanos existe un "ejército" de diferentes tipos de anticuerpos, las inmunoglobulinas (Ig) G, D, E, A y M (ver figura 5), los cuales están caracterizados por sus cadenas pesadas y gracias a éstas se localizan en distintos lugares del organismo, en diferentes concentraciones y respuestas. Tanto IgE como IgM tienen una cadena pesada más larga que la IgG y la IgD. La IgA, por otra parte, se puede encontrar como monómero o como dímero, es decir, dos IgA unidas por otra cadena llamada J. La IgM puede formar un complejo que consta de cinco IgM y una cadena J (Alberts *et al.*, 2002).

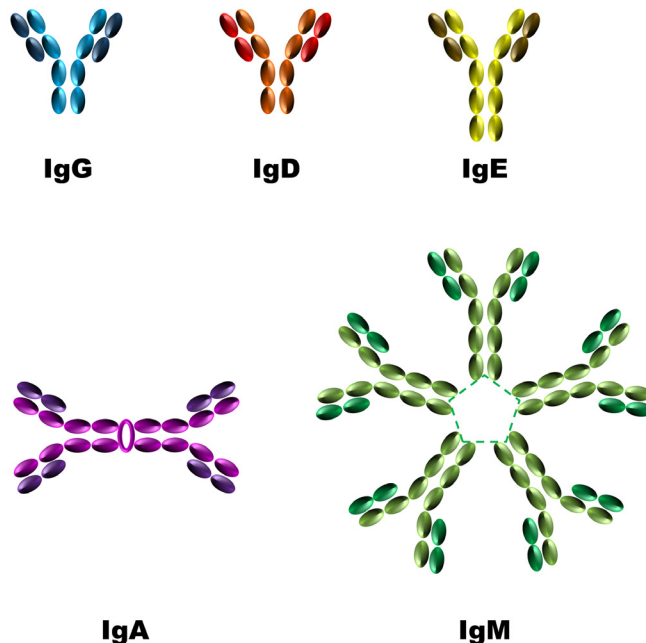


Figura 5. Diferentes tipos de inmunoglobulinas. La IgG, IgA e IgD cuentan con una cadena pesada más corta mientras que es más larga en la IgE e IgM. La IgA e IgM pueden formar estructuras de mayor tamaño.

La IgM es el primer anticuerpo que se genera en las células B, y es secretado en grandes cantidades. En el caso de infecciones virales, como la COVID-19, éste es el primer anticuerpo en "entrar en acción". A medida que maduran las células B, también se expresa la IgD, pero en cantidades menores.

Los anticuerpos IgG son los más importantes en la defensa contra bacterias y virus patógenos, como el SARS-CoV-2 que invaden el cuerpo humano. En general, debe de transcurrir un tiempo para que sean expresados, son abundantes en circulación sanguínea y son los únicos capaces de atravesar la placenta, confiriendo inmunidad al feto. Además, se pueden unir a la superficie del patógeno para evitar que éste entre a las células humanas a replicarse, o lo marcan para que otras células lo destruyan.

Los anticuerpos IgE tienen un papel importante en la defensa contra parásitos y están implicado en respuestas alérgicas. Finalmente, el anticuerpo IgA se encuentra en las mucosas y en las secreciones como lágrimas, donde brinda protección. Recientemente, se ha reportado que los bajos niveles de IgA están asociados también con asma y repuestas alérgicas (Kim *et al.*, 2017).

Los anticuerpos contra un patógeno requieren varios días, incluso semanas, para producirse cuando el individuo es infectado por primera vez. Sin embargo, cuando el individuo se re-expone al mismo patógeno, entonces producirá anticuerpos específicos de manera muy rápida (usualmente 24 horas). Debido a esto, necesitamos vacunas para protegernos contra algunos patógenos. Además, los anticuerpos no efectúan la misma función cuando se unen a un objetivo. Algunos cortan la infección desde un principio, neutralizando directamente al antígeno y evitando que el patógeno entre en la célula. Otros etiquetan a los invasores, de modo que algunas células del sistema inmunológico puedan eliminarlo. Otros pueden cubrir a los virus o bacterias en una capa pegajosa. Finalmente, otros anticuerpos avisan a las células inmunes llamadas macrófagos para que devoren al invasor.

Existe una clara variabilidad de la respuesta entre individuos ante un patógeno, hay algunos que producen anticuerpos de muy alta calidad, que son muy buenos para reconocer al antígeno, mientras que otros individuos producen anticuerpos que no son tan efectivos para unirse al patógeno y proporcionan sólo una protección parcial. Estos últimos pueden experimentar una infección más severa con síntomas más prolongados. Para los pacientes infectados con SARS-CoV-2 no se sabe a ciencia cierta qué porcentaje está en las dos categorías mencionadas.

Los anticuerpos y sus aplicaciones médicas

Desde la antigüedad, se observó que individuos curados de algunas enfermedades eran resistentes a infecciones posteriores. También se vio que podían adquirir protección ante dichas enfermedades al ser inmunizados con una variante atenuada. En 1976 el Dr. Edward Jenner demostró que una vacuna elaborada con el virus que infecta a roedores confería inmunidad contra el virus de la viruela en humanos. Después de más de un siglo del uso de la primera vacuna, se descubrió que los organismos inmunizados contenían "sustancias activas" denominadas anticuerpos. Estas moléculas complejas, generadas por el sistema inmunológico en respuesta a la presencia de un antígeno específico, podían ser aisladas y usadas para la prevención o el tratamiento de enfermedades.

Las vacunas normalmente contienen fragmentos del patógeno para estimular al sistema inmune a producir anticuerpos antígeno-específicos y generar células de memoria. Así, los organismos se preparan para responder rápidamente ante un nuevo ataque del patógeno. En el caso del SARS-CoV-2, se han producido vacunas que generan anticuerpos contra la proteína S (espícula o spike), que sobresale en la superficie del virus.

Actualmente, científicos y empresas farmacéuticas buscan producir, en grandes cantidades, anticuerpos que reconozcan epítomos específicos para imitar o desencadenar la respuesta del sistema inmunológico. Los anticuerpos pueden ser *policlonales* cuando reconocen el mismo antígeno, pero diferente epítomo (fuerza y especificidades diferentes) o *monoclonales* que sólo reconocen un epítomo (Ecker *et al.*, 2015). En aplicaciones médicas se busca que los anticuerpos sean monoclonales y son generados de dos maneras: a partir de una tecnología llamada *hibridoma*, donde las células B que producen al anticuerpo deseado son fusionadas con células cancerígenas, dando como resultado células inmortales que producen anticuerpos de manera constante (Ghahane *et al.*, 2017), o mediante el uso de técnicas de biología molecular, en las que se obtienen construcciones genéticas que son introducidas en células animales o bacterianas, para ser traducidas como el anticuerpo deseado (Buss *et al.*, 2012).

La producción de anticuerpos por biología molecular es más sencilla, aunque no siempre se obtiene la afinidad esperada, es decir, el anticuerpo no se une fuertemente a su antígeno. Sin embargo, una vez obtenida la afinidad deseada, los anticuerpos pueden ser fusionados con otras proteínas permitiendo que se emita una señal cuando el anticuerpo reconoce al antígeno; esta señal puede ser un cambio de color, o bien la emisión de fluorescencia. Tal es el caso de los anticuerpos que se usan para detectar SARS-CoV-2 mediante [inmunoensayos](#).

De los anticuerpos, la IgG ha sido el más investigado, razón por la cual se ha obtenido una gran diversidad de éstos con diferentes especificidades y afinidades. Algunos de ellos han sido empleados en diversas terapias, al suministrarse completos o en fragmentos, dependiendo del antígeno blanco y de la respuesta que se busque obtener. No obstante, existen algunas limitantes para su uso, debido a que no se conocen completamente algunas de sus características, como su comportamiento en diferentes soluciones, o bien el efecto de sus secuencias de aminoácidos en cada organismo.

En el área diagnóstica, los anticuerpos se emplean en la detección de enfermedades o para determinar el estado de salud de un individuo. Algunos ejemplos son la detección de patógenos (parásitos, virus y bacterias), cáncer, autoinmunidad, embarazo, niveles hormonales, entre otros. Actualmente, algunas pruebas diagnósticas están enfocadas para su uso por personas no especializadas, de manera que puedan ser adquiridas comercialmente en farmacias o centros de distribución, como es el caso de las pruebas de embarazo. No obstante, la gran mayoría dependen de personal capacitado y certificado en los métodos de laboratorio, ya que estos últimos son más precisos y cuantificables al reportar valores numéricos. En el caso de la COVID-19, se emplean pruebas rápidas de antígeno para detectar presencia del SARS-CoV-2, o las pruebas rápidas de sangre, para saber si el individuo tiene presencia de anticuerpos contra SARS-CoV-2.

En el campo terapéutico, los anticuerpos se suministran directamente al individuo para contener enfermedades o mejorar su salud. Algunos anticuerpos han sido empleados en el tratamiento de personas con asma, cáncer, artritis reumatoide, Alzheimer, como antídotos contra venenos o al estimular su producción, como en la tuberculosis y el sarampión. Este último método también puede prevenir el desarrollo de algunas enfermedades, y esto se hace suministrando el antígeno en pequeñas cantidades (Matsuoka *et al.*, 2013). Sin embargo, existen incógnitas alrededor de los anticuerpos, por ejemplo, cómo las células discriminan entre agentes externos para generar anticuerpos y por qué las células pueden generar anticuerpos contra el mismo organismo, como en la enfermedad de [lupus](#), una enfermedad autoinmune.

El 21 de noviembre de 2020, la FDA (Food and Drug Administration de los Estados Unidos) dio una [autorización de uso de emergencia de los anticuerpos monoclonales casirivimab e imdevimab](#) para el tratamiento de la COVID-19. Por supuesto, el costo de estos anticuerpos es bastante elevado, comparado con el costo de un antibiótico o un tratamiento antiviral.

Conclusión

Los anticuerpos monoclonales se emplean en numerosas aplicaciones médicas como terapia, diagnóstico e investigación. No obstante, se trata de un campo del conocimiento que está en constante evolución, por lo que algunos avances actuales deberán ser adaptados en el futuro para alcanzar un mayor desarrollo. Consecuentemente, se generan productos más específicos y eficientes a medida que la investigación avanza, lo que contribuye en diversas aplicaciones médicas, como es el caso de los anticuerpos utilizados para diagnosticar y combatir al virus SARS-CoV-2.

Referencias

- ❖ Abbas, A., Lichtman, A. H. H. y Pillai, S. (2014). *Cellular and Molecular Immunology* (8.ª ed.). Saunders.
- ❖ Alberts, B., Johnson A., Lewis J., Raff, M., Roberts, K. y Walter, P. (2002). *Molecular Biology of the Cell* (4.ª ed.). Garland Science.
- ❖ Buss, N. A., Henderson, S. J., McFarlane, M., Shenton, J. M. y de Haan, L. (2012). Monoclonal antibody therapeutics: history and future. *Current opinion in pharmacology*, 12(5), 615–622. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2012.08.001>
- ❖ Ecker, D. M., Jones, S. D. y Levine, H. L. (2015). The therapeutic monoclonal antibody market. *mAbs*, 7(1), 9–14. <https://doi.org/10.4161/19420862.2015.989042>
- ❖ Kim, W. J., Choi, I. S., Kim, C. S., Lee, J. H. y Kang, H. W. (2017). Relationship between serum IgA level and allergy/asthma. *The Korean journal of internal medicine*, 32(1), 137–145. <https://doi.org/10.3904/kjim.2014.160>

- ❖ Matsuoka, T., Shamji, M. H. y Durham, S. R. (2013). Allergen immunotherapy and tolerance. *Allergology international: official journal of the Japanese Society of Allergology*, 62(4), 403–413. <https://doi.org/10.2332/allergolint.13-RAI-0650>
- ❖ Murphy, K. y Weaver, C. (2016). *Janeway's Immunobiology* (9.ª ed.). Garland Science/Taylor and Francis.

Agradecimientos

Se agradece el apoyo financiero de la DGAPA-UNAM (Proyecto PAPIIT IN-208418) y del CONACYT (Proyecto Fronteras 87163).

CÓMO CITAR ESTE ARTÍCULO

- ❖ García Ramírez, Benjamín y Rodríguez Romero, Adela. (2021, septiembre-octubre). Aplicaciones médicas de los anticuerpos. *Revista Digital Universitaria (RDU)*, 22(5). <http://doi.org/10.22201/cuaieed.16076079e.2021.22.5.5>