

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

INSTITUTO DE QUÍMICA

CLONACIÓN Y EXPRESIÓN DEL ALÉRGENO Hev b 11
(QUITINASA DE CLASE I) DE *Hevea brasiliensis*

T E S I S

Que para obtener el grado académico de:

Maestra en ciencias

P r e s e n t a:

Q. F. B. CAROL SISETH MARTÍNEZ CABALLERO

DIRECTOR DE TESIS

Dra. Adela Rodríguez Romero



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

ENTIDADES CAMPUS CIUDAD DE MÉXICO

OF. No. PMDCB/979/2009

QFB. CAROL SISETH MARTÍNEZ CABALLERO
Alumna de la Maestría en Ciencias Bioquímicas
P r e s e n t e

Los miembros del Subcomité Académico, en reunión ordinaria del día 3 de agosto del presente año, conocieron su solicitud de asignación de JURADO DE EXAMEN para optar por el grado de MAESTRA EN CIENCIAS (BIOQUÍMICA), con la tesis titulada "Clonación y expresión del alérgeno Hev b 11 (quitinasa de clase 1) de *Hevea brasiliensis*", dirigida por la Dra. Adela Rodríguez Romero.

De su análisis se acordó nombrar el siguiente jurado:

PRESIDENTE	Dra. Amelia Farrés González-Saravia
VOCAL	Dr. Enrique García Hernández
SECRETARIO	Dr. Francisco Javier Plasencia de la Parra
SUPLENTE	Dra. Tzvetanka Dimitrova Dinkova
SUPLENTE	Dr. Edgar Zenteno Galindo

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

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 10 de agosto de 2009.
EL COORDINADOR DE LA ENTIDAD ACADÉMICA

DR. ROGELIO RODRÍGUEZ SOTRES

C.c.p. Archivo

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, gracias por todo lo que he recibido.

Al posgrado de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas, a todos sus integrantes: alumnos, investigadores, personal administrativo; gracias por los consejos, conocimientos y ayuda recibida.

A la Dra. Adela Rodríguez Romero, por sus consejos, paciencia y en especial por el apoyo profesional y personal, muchas gracias.

A la Dra. Patricia Cano Sánchez, por todo el apoyo y asesoría recibida durante la realización de este trabajo.

A los miembros del comité tutorial: Dra. Amelia Farrés Gonzáles-Saravia y Dra. Romina Rodríguez Sanoja.

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

A mis compañeros de laboratorio y del Instituto de Química: Deyanira, Angela, Israel, Cristian, Ernesto, Gabriel, Azucena, Alma, Belén, Javier; gracias por su apoyo, consejos y amistad.

Agradezco las beca financiada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).

El proyecto fue financiado por CONACYT 82947 y DGAPA-UNAM PIN209506-3.

DEDICATORIAS

Gracias Dios por permitirme vivir este momento, por estar siempre conmigo, por darme la vida que he tenido y por enseñarme que cada etapa tiene su momento y porque.

Papá y mamá gracias por ser parte de mi vida, por estar siempre conmigo, por su confianza, apoyo y porque siempre han creído en mi.

Tía Rosy, gracias por preocuparte siempre por mi, por brindarme tu apoyo y por ser parte importante en mi vida.

A mis abuelitos, por ser mi ejemplo de dedicación y superación.

A mis amigos, por todos los momentos compartidos, por su sinceridad y apoyo.

الى حبيبي محمود

شكرا لكل واحد من حضراتكم, لأنكم شكلتم جزء من حياتي, وخاصة اشكر الله اليوم و دائما

(A cada uno de ustedes, gracias por formar parte de mi vida, pero sobre todo gracias Dios hoy y siempre)

No os hagáis tesoros en la tierra, donde la polilla y el orín corrompen, y donde ladrones minan y hurtan; si no haceos tesoros en el cielo, donde la polilla ni el orín corrompen, y donde ladrones no minan y hurtan. Porque donde esté vuestro tesoro, allí estará también vuestro corazón.

Mateo 6: 19-21

ÍNDICE

Agradecimientos	iii
Dedicatorias	iv
Índice	vi
Abreviaturas	viii
Resumen	ix
Introducción	1
<i>Hevea brasiliensis</i> : el árbol del hule	1
Composición química del látex	1
Alergia al látex	3
Síndrome látex-frutas	7
Quitinasas	9
Nomenclatura	10
Clasificación	12
Propiedades bioquímicas y físicas	16
Antecedentes	19
Justificación	21
Objetivo	22
Objetivos específicos	22
Metodología	23
Resultados	30
Discusión	41
Conclusiones	47
Perspectivas	48

Bibliografía	49
Anexos	54

ABREVIATURAS

kDa	Kilodaltones
IgE	Inmunoglobulina de tipo E
° C	Grados Celsius
PRP	Proteínas relacionadas a la patogénesis
APC	Antigen presenting cell (Células presentadoras de antígeno)
CD	Células dendríticas
NK	Natural killer (Células asesinas)
RAST	Radioalergosorbent test (Prueba de radioalergoabsorbencia)
NAG	N-acetilglucosamina
GlcNAG	N-acetil-D-glucosamina
GH	Glucósido-hidrolasa
PUM	Proteína de unión a maltosa
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas)
PDB	Protein Data Bank (Banco de datos de proteínas)
ARN	Ácido ribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
LB	Luria-Bertoni
PCR	Polymerase chain reaction (Reacción en cadena de la polimerasa)
DO	Densidad óptica
IPTG	Isopropil β -D-tiogalactopiranosido
FPLC	Fast protein liquid chromatography

RESUMEN

El látex es el citoplasma de las células laticíferas del árbol del hule (*Hevea brasiliensis*), que gracias a sus propiedades elásticas se utiliza para elaborar numerosos productos médicos y de uso cotidiano. Una constante exposición a éstos puede causar reacciones de alergia o hipersensibilidad de tipo I, la cual es el resultado de una respuesta inmune inapropiada a ciertas proteínas inocuas (alérgenos), principalmente en personas con predisposición genética.

El látex contiene más de 200 proteínas distintas, que constituyen alrededor del 1% de dicho material. Del total de proteínas, trece con masas moleculares entre 4.7 a 57 kDa son las que se han reconocido como las que provocan las respuestas alérgicas.

Es bien conocido que muchos pacientes con alergia al látex son sensibles a ciertas frutas (síndrome látex-frutas) y algunos reportes han identificado a las quitinasas de clase I (Hev b 11) como moléculas importantes en la unión a las IgEs del suero de estos pacientes. Este alérgeno es poco abundante en el látex del árbol del hule, por lo que para hacer estudios inmunológicos y moleculares se requiere utilizar técnicas recombinantes para clonar el gen, expresar y purificar a esta enzima.

En este trabajo se expresó a Hev b 11 recombinante (rHev b 11) utilizando el vector pET 32 a y *E. coli* Rosetta gami, como proteína de fusión con tiorredoxina. Ésta, con una masa molecular de 47 kDa, se agregó formando cuerpos de inclusión, posiblemente por el alto contenido de cisteínas

(veintitres) presentes en la quitinasa; no obstante, también se obtuvo proteína soluble la cual presentó actividad catalítica de endo y exoquitinasa.

Al parecer rHev b 11 corresponde a una isoforma de las quitinasas de clase I ya reportadas, estas últimas están formadas por un dominio tipo heveína, un conector y un dominio catalítico. La rHev b 11 obtenida en nuestro grupo de trabajo está formada por un dominio de heveína y un segmento que representa la mitad de este dominio (residuos 23-43), dos conectores y un dominio catalítico. Esta enzima se purificó parcialmente utilizando técnicas cromatográficas, tales como filtración en gel e intercambio catiónico; sin embargo, esta metodología debe optimizarse.

Con base en las estructuras de las quitinasas de arroz y papaya, reportadas en el 2008, se obtuvo un modelo teórico para la rHev b 11 utilizando el servidor SwissProt. En dicho modelo se observa que el segmento adicional (medio dominio tipo heveína y el conector) no afecta el plegamiento del dominio catalítico ni del dominio de heveína; no obstante, la unión entre los dos dominios parece ser más estrecha, lo que podría causar mayor rigidez y tal vez cambiar algunas propiedades inmunológicas y/o de unión a sustrato.

INTRODUCCIÓN

***Hevea brasiliensis*: el árbol del hule**

H. brasiliensis es un árbol originario de la región Amazónica, que pertenece al orden *Euphorbiales*, familia *Euphorbiaceae*. Éste crece en regiones tropicales a una temperatura óptima entre 20 y 28 °C alcanzando hasta 30 metros de altura (Blanco *et al.*, 2002).

El hule se encuentra en una suspensión acuosa de aspecto lechoso denominada látex, el cual circula por un sistema de conductos denominados vasos laticíferos situados debajo de la corteza del árbol. Para obtener esta sustancia lechosa, se practica una incisión diagonal en la corteza, de izquierda a derecha, con ángulo de 30°, que es el tipo de corte más común. El látex fluye espontáneamente a través de estos cortes por un dispositivo metálico hacia una cubeta recolectora, que en algunas ocasiones puede contener una pequeña cantidad de agente conservante con acción germicida (amoníaco, formaldehído) (Blanco *et al.*, 2002).

Composición química del látex

El látex es el citoplasma de las células laticíferas de *H. brasiliensis* y en su composición se encuentra el hule natural que está formado por unidades de cis-1,4-poliisopreno (Petsonk., 2000), organelos subcelulares (vacuolisosomas o lutoides), así como lípidos, carbohidratos, sustancias inorgánicas y agua (Quirce., 2000)

(Tabla 1). El cis-1,4-poliisopreno es un polímero orgánico que confiere al hule natural sus cualidades de elasticidad y durabilidad (Lawrence *et al.*, 1996).

	Látex natural fresco %	Hule seco %
cis-1,4-poli-isopreno	25-45	93.5
Proteínas	1-2	2-3
Carbohidratos	1-2	0.4
Lípidos	0.9-1.7	3.3
Compuestos inorgánicos	0.4-0.6	0.2
Aminoácidos, aminas	0.4	-----
Agua	55-65	-----

Tabla 1. Composición química del látex (Blanco *et al.*, 2002).

El papel fisiológico del sistema laticífero se desconoce, pero parece tratarse de un sistema de defensa del árbol. La coagulación involucra la agregación de partículas de hule y es de suma importancia contra la invasión de posibles patógenos bloqueando el acceso a las heridas sufridas (Gidrol *et al.*, 1994).

Cuando se centrifuga el látex fresco a altas velocidades (60,000-100,000 g) se obtienen tres fracciones diferentes: la superior de aspecto cremoso, que es la fase del hule, una fase intermedia translúcida o fracción sérica C, que contiene el citosol de las células laticíferas y es más rica en proteínas mayoritariamente hidrosolubles, y finalmente, la fracción basal o sérica B, que contiene principalmente los lutoides o vacuolas. En esta fracción se encuentran diversas proteínas hidrosolubles y relacionadas a la patogénesis (PRP) (Blanco *et al.*, 2002), las cuales son expresadas a consecuencia de heridas hechas a la planta o por la aplicación de sustancias químicas como el etileno o el ácido salicílico, que mimetizan el efecto de infección o inducen el estrés (Van Loon *et al.*, 1999).

La concentración de proteínas muestra una variación clonal y oscila entre 1 y 2 % aproximadamente. Alrededor del 25- 30 % de proteínas se encuentran en la fase del hule, 45- 50 % en la fase sérica C y aproximadamente el 25 % en la fracción sérica B. Las principales proteínas, desde un punto de vista cuantitativo, son la heveína (Hev b 6.02) (50 %) y la hevamina (30 %) que se encuentran en los lutoides (Blanco *et al.*, 2002).

Alergia al látex

Gracias a sus propiedades elásticas, el látex se utiliza para elaborar numerosos productos médicos y de uso cotidiano, como guantes, material quirúrgico, preservativos, globos, etc. (Slater., 1997) (Turjanmaa *et al.*, 1996). En el mercado hay más de 40,000 artículos de uso cotidiano de látex y su número aumenta cada día (Cheng *et al.*, 1999). La exposición repetida a productos de látex por motivos laborales o por intervenciones quirúrgicas múltiples, así como la atopia son los principales factores de riesgo asociados con la sensibilización. La mayoría de los casos de alergia al látex se producen en grupos de riesgo definidos, entre los que se incluye a profesionales sanitarios (Hadjiliadis *et al.*, 1995) (Kibby *et al.*, 1997), operarios de la industria de manufactura de látex (Orfan *et al.*, 1994) y niños con espina bífida o con anomalías urogenitales (Banta *et al.*, 1993).

El látex contiene más de 200 proteínas distintas, que constituyen alrededor del 1% de dicho material (Nel *et al.*, 1998). Del total de proteínas, trece con masas moleculares entre 4.7 kDa a 57 kDa son las que se reconocen como las que provocan las respuestas alérgicas y a las cuales se les ha designado una

nomenclatura oficial por el Subcomité de Nomenclatura de Alérgenos, además varias presentan isoformas (Tabla 2).

Estas proteínas presentes en el látex causan reacciones de alergia o hipersensibilidad de tipo I, la cual es el resultado de una respuesta inmune inapropiada a ciertas proteínas inocuas (alérgenos), mayoritariamente en personas con predisposición genética (Sutton *et al.*, 1993).

Alérgeno	Denominación bioquímica	Función	Peso molecular (kDa)	Alergenicidad	Estructura tridimensional
Hev b 1	Factor de elongación del hule	Biosíntesis del látex	58	Mayor en *EB	No
Hev b 2	Beta-1-3-glucanasa	Defensa	34-36	Menor	Sí
Hev b 3	Homólogo de factor de elongación	Biosíntesis del látex	24-27	Mayor en *EB	No
Hev b 4	Proteína microhélice	Estructural	50-57	Menor	No
Hev b 5	Proteína ácida	Desconocida	16	Mayor	No
Hev b 6	Proheveína/heveína	Protección	20/4.7	Mayor	Sí
Hev b 6.02	Heveína	Protección	4.7	Mayor	Sí
Hev b 7	Homólogo de patatina	¿Estructura?	43	Menor	No
Hev b 8	Profilina	Estructura y señalización	14	Menor	Sí
Hev b 9	Enolasa	Biosíntesis de nutrientes	51	Menor	No
Hev b 10	Superóxido-dismutasa	Eliminación de radicales libres	26	Menor	No
Hev b 11	Quitinasa clase I	Protección	33	Menor	No
Hev b 12	Proteína de transferencia de lípidos	Transferencia de lípidos	9	Menor	No
Hev b 13	Proteína nódulo	Esterasa	42.9	Menor	No

Tabla 2. Características de los principales alérgenos del látex. *EB: espina bífida

En una primera exposición, cuando un alérgeno entra al organismo interactúa con receptores localizados en la superficie de células presentadoras de antígeno (APC), células dendríticas (CD) y células asesinas naturales (NK). Éstas capturan a los alérgenos, los procesan y más tarde presentan en su superficie pequeños péptidos unidos a moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad tipo II (HLA-II) (Romagnani *et al.*, 2004). En una segunda exposición el alérgeno es reconocido por el complejo formado por las IgE's y los receptores específicos para estos anticuerpos, localizados en las membranas de las células cebadas y los basófilos, provocando la liberación de histamina, leucotrienos y otros mediadores inflamatorios contenidos en los gránulos presentes en dichas células, teniendo como consecuencias principales la vasodilatación y contracción de músculo liso (Figura 1). Esta respuesta deja sensibilizadas a las mucosas y a la piel, y predispuestas a reaccionar con el alérgeno nuevamente (Janeway *et al.*, 1996).

En el presente, la alergia al látex es un problema médico importante, que afecta cada vez más a profesionales sanitarios y población general. La primera descripción de hipersensibilidad inmediata al látex se realizó en Alemania (Stern *et al.*, 1927), y posteriormente se describió un caso de urticaria por contacto con látex (Nutter *et al.*, 1979). En nuestro país no se conoce la incidencia de alergia al látex en la población general; sin embargo, estudios recientes en nuestro laboratorio permiten estimar una prevalencia de 1.6-1.9 %. La prevalencia en la población mundial oscila de 1 a 2%, mientras que en grupos afectados como los profesionales al cuidado de la salud va de 1 a 22% y en los pacientes con espina bífida de 24 al 60%, este porcentaje es alto debido a las múltiples intervenciones quirúrgicas a las cuales son sometidas estas personas (Poley *et al.*, 2000).

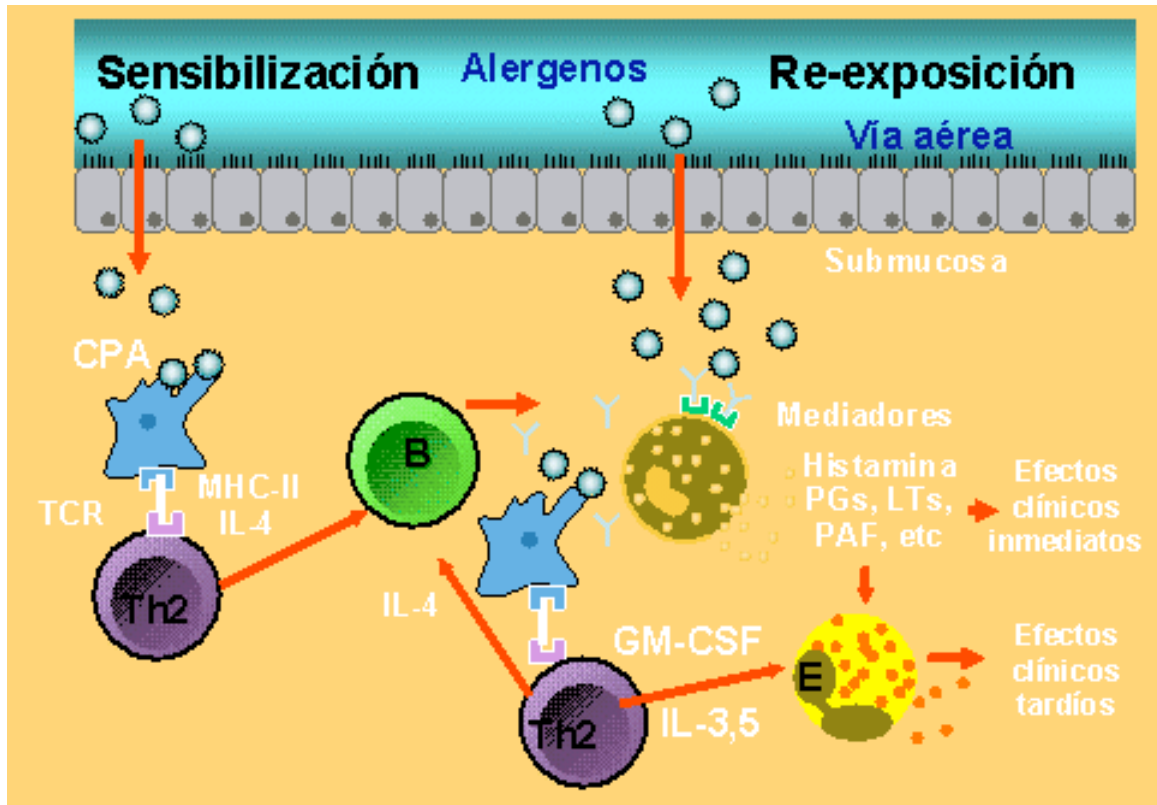


Figura 1. Representación gráfica de la hipersensibilidad de tipo I, en la que se describe la sensibilización y la reacción alérgica provocada por la re-exposición a un alérgeno.

Los síntomas, que son muy variables, dependen de la vía de exposición, de la cantidad del alérgeno y de la susceptibilidad personal (Slater., 1997). Son muy frecuentes, los síntomas inmediatos, con manifestaciones que van desde urticaria (local o generalizada), angioedema, rinoconjuntivitis (Carrillo *et al.*, 1986) o asma (Liss *et al.*, 2001) e incluso shock anafiláctico (Slater., 1997).

La heveína (Hev b 6.02) es uno de los alérgenos principales de látex, tanto en abundancia como en capacidad alergénica. Este alérgeno es una lectina de 43 aminoácidos, con un peso molecular de 4.7 kDa, rica en cisteínas que forman cuatro puentes disulfuro, y con capacidad de unión al polisacárido quitina y oligosacáridos de N-acetil glucosamina. Esta proteína posee propiedades antifúngicas y su síntesis

es inducida por herida, infección por patógenos, o ataque de insectos. También se ha propuesto que participa en la coagulación del látex, lo que puede estar relacionado con la defensa al bloquear la entrada a parásitos. La heveína se sintetiza como un precursor de 20 kDa (Figura 2), denominado proheveína (Hev b 6.01), que es procesado por hidrólisis generando heveína y un dominio C-terminal de 138 aminoácidos con un peso molecular de 14 kDa, que también es alergénico (Hev b 6.03) (Blanco *et al.*, 2002).

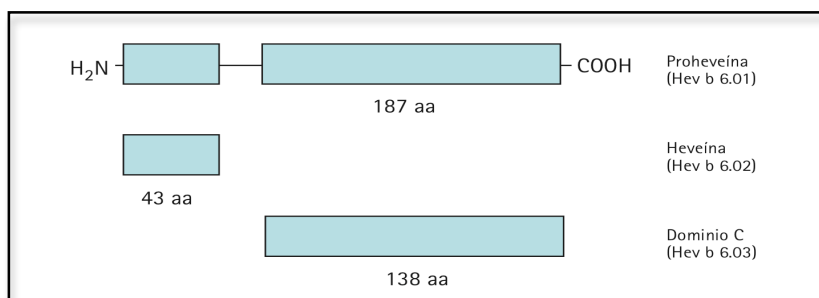


Figura 2. Representación de la proheveína y moléculas derivadas.

Síndrome látex-frutas

Es bien conocido que muchos pacientes con alergia al látex también son sensibles a ciertas frutas. Algunos reportes indican que el aguacate, el plátano, la castaña y el kiwi son los principales implicados en el llamado "síndrome látex-frutas". La presencia de componentes comunes de unión a IgE en los frutos mencionados y el látex se ha demostrado por RAST (prueba de radioalergoabsorbencia) y estudios de inhibición por inmunoblot (Diaz *et al.*, 1999). Una explicación es que algunos alérgenos del látex presentan secuencias

homólogas con proteínas de otras plantas, como lectinas y quitinasas de clase I, que muestran dominios de tipo heveína similar a los de la proheveína del látex (Hev b 6) (Figura 3). El alérgeno de 16 kDa (Hev b 5) es homólogo a la proteína del kiwi PKIWI 501, Hev b 7 (46 kDa) a la patatina de la papa y a algunas enzimas del látex como la β -1,3-glucanasa (Hev b2) y la esterasa están presentes en frutas y vegetales (Diaz *et al.*, 1999).

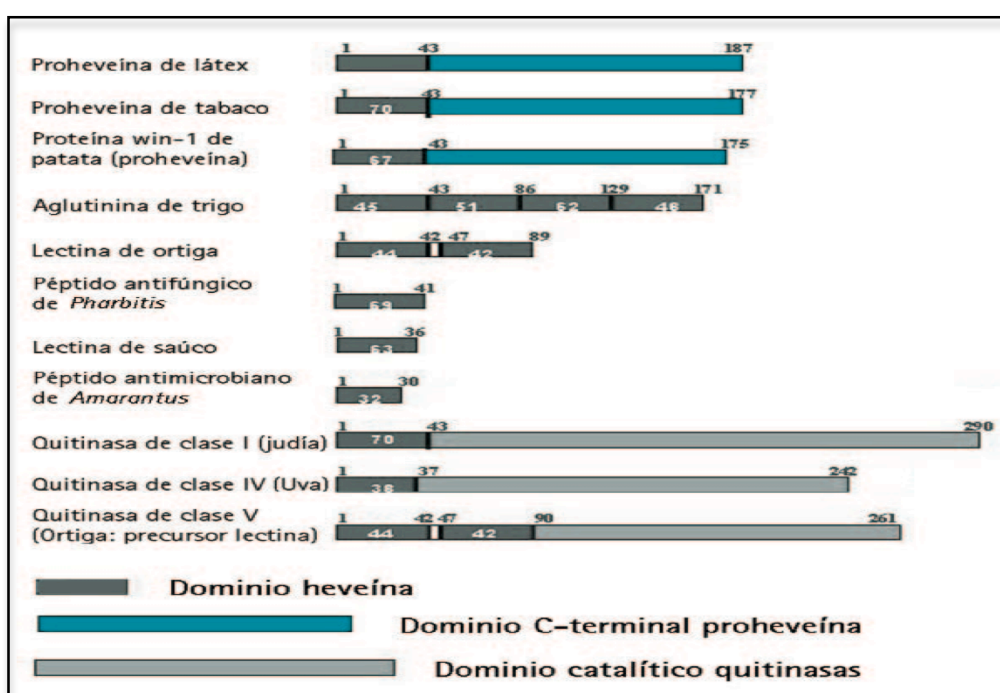


Figura 3. Estructura primaria de proteínas vegetales con dominios heveína. Los números en azul representan las posiciones de residuos aminoácidos. Los números en blanco son los porcentajes de identidad de secuencia de los correspondientes dominios heveína con la heveína del látex (Blanco *et al.*, 2002).

Algunos alérgenos con una masa molecular mayor a 30 kDa, que se han encontrado en aguacate, castaña y plátano, fueron identificados como quitinasas de clase I (Blanco *et al.*, 1999). Las quitinasas de clase II, altamente relacionadas a las de clase I, pero sin el dominio N-terminal tipo heveína no muestran alergenicidad en

pruebas *in vitro* o *in vivo*. La hevamina de látex que se ha descrito como un alérgeno de menor importancia no tiene presente el dominio de tipo heveína.

Algunos reportes han indicado que las quitinasas de clase I se unen de manera importante a las IgE's de suero de pacientes con el síndrome látex-fruta en plátano (Sánchez *et al.*, 1999), aguacate (Sowka *et al.*, 1998) y castaña (Díaz *et al.*, 1998). Las secuencias N-terminal de estas quitinasas son muy similares y además muestran identidad con la heveína. Estos datos y los ya reportados por otros grupos (Beezhold *et al.*, 1997), (Banerjee *et al.*, 1997) indican que las quitinasas de clase I son probablemente los principales alérgenos involucrados en este síndrome, por lo que se ha propuesto que los epítomos de unión a IgE se encuentran en el dominio heveína (Figura 4), el cual juega un papel esencial en la alergenicidad de este tipo de enzimas (Chen *et al.*, 1998).

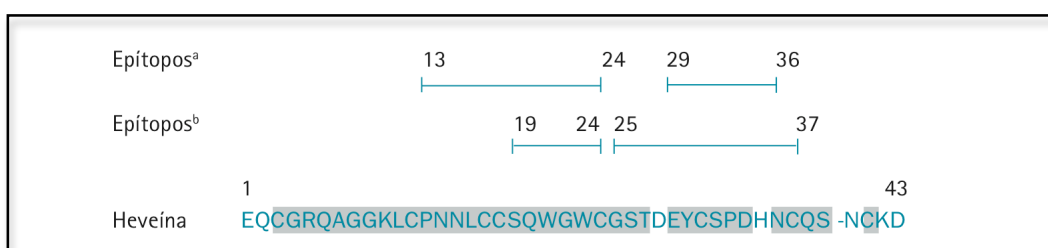


Figura 4. Secuencia de aminoácidos de la heveína del látex. Epítomos lineales descritos por Beezhold et al (a) y Banerjee et al (b).

Quitinasas

Las quitinasas son glucósido hidrolasas que catalizan la degradación de la quitina, un polisacárido insoluble de residuos N-acetil-D-glucosamina unidos por enlaces β -1,4 (NAG) (Figura 5). Son producidas por una gran variedad de

organismos que poseen quitina como componente estructural (hongos, insectos y crustáceos) y organismos que no poseen quitina (bacterias, plantas y vertebrados). Las funciones de las quitinasas son diversas (Jolles *et al.*, 1999), en invertebrados se requieren para la degradación parcial de exoesqueletos viejos; los hongos las producen para modificar la quitina, que es un componente principal de la pared celular y las bacterias para degradar quitina y utilizarla como fuente de carbono. Por otra parte, se ha sugerido que la producción de quitinasas en plantas es parte de los mecanismos de defensa contra algunos patógenos (Taira *et al.*, 2002).

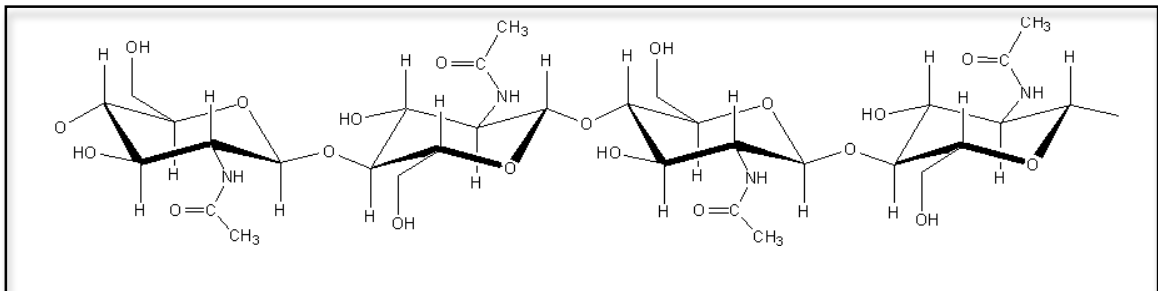


Figura 5. Estructura química de la quitina

Nomenclatura

Las quitinasas pueden ser clasificadas en dos grandes categorías: endoquitinasas y exoquitinasas (EC 3.2.1.14). Las primeras rompen la quitina al azar en sitios internos, generando oligosacáridos de N-acetil-D-glucosamina (GlcNAc) de bajo peso molecular como quitotetraosa, quitotriosa y diacetilquitobiosa (Figura 6). Las exoquitinasas pueden ser divididas en dos subcategorías: quitobiosidasas (EC 3.2.1.29), que catalizan la liberación progresiva de diacetilquitobiosa comenzando por el extremo no reductor de la quitina, y β -(1,4) N-acetil glucosaminidasas (EC

3.2.1.30) que rompen los productos oligoméricos de endoquitinasas y quitobiosidasas, generando monómeros de GlcNAc (Sahai *et al.*, 1993). Una vía alterna involucra es la desacetilación de quitina a quitosana, la cual es finalmente convertida a residuos de glucosamina por la acción de la quitosanasa (EC 3.2.1.132) (Dahiya *et al.*, 2006).

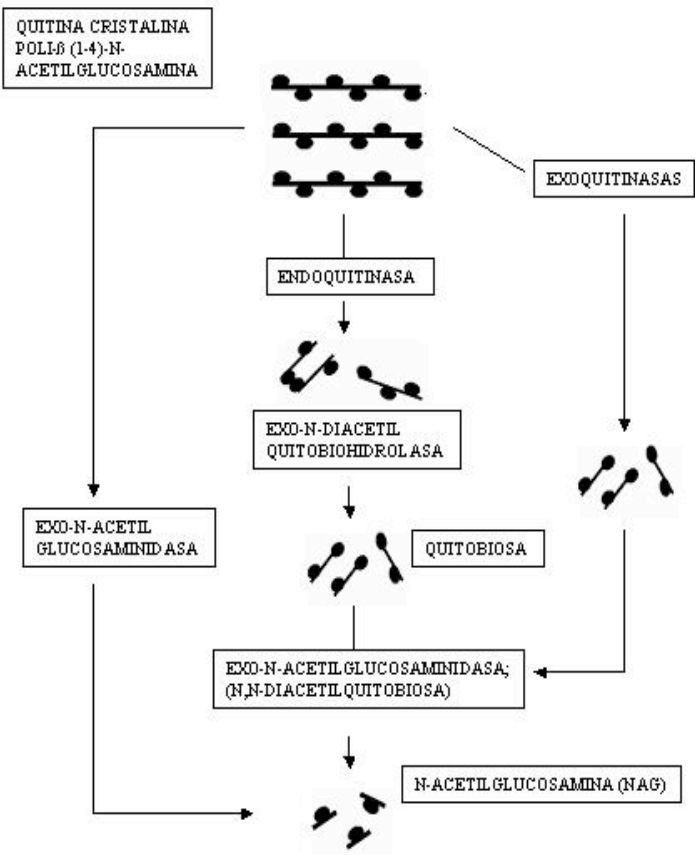


Figura 6. Degradación de quitina mediada por endoquitinasas y exoquitinasas (Cruz *et al.*, 1999).

Clasificación

Las quitinasas (endoquitinasas y exoquitinasas) se han clasificado en seis clases (I-VI), dependiendo de su estructura primaria y secuencias consenso. Las quitinasas de las clases I, IV y V tienen uno o dos dominios de heveína. Las quitinasas de clase I, II y IV tienen dominios catalíticos homólogos (con deleciones en el de la clase IV). Las quitinasas de clase III también tienen actividad de lisozima. Las quitinasas de clase VI no son homólogas a las de las otras cinco clases, pero tienen similitud de secuencia con exoquitinasas de bacterias (Figura 7) (Blanco *et al.*, 2002).

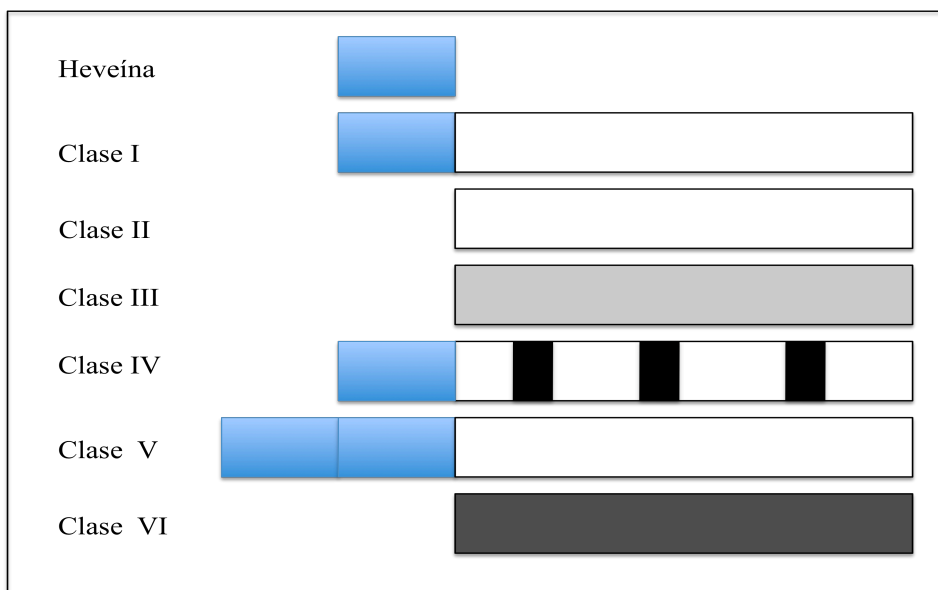


Figura 7. Clases de quitinasas. Los rectángulos azules representan el dominio de heveína, los blancos son dominios catalíticos homólogos, el rectángulo gris claro simboliza el dominio catalítico característico de las quitinasas de clase III, el gris oscuro representa el dominio catalítico de las quitinasas de clase VI con homología al de las quitinasas de bacterias y el negro simboliza deleciones en la secuencia.

Las quitinasas también se han clasificado en dos diferentes familias de glucósido- hidrolasas, GH18 y GH19, con base en la secuencia de aminoácidos de

su dominio catalítico (Henrissat *et al.*, 1999), para correlacionar sus características estructurales y mecanismos de acción (Tabla 3) .

Familia Glicosil-hidrolasas	Clase de quitinasa	Mecanismo catalítico	Intermediario	Configuración del producto	Inhibidores
18	III y V	sustrato asistida	Ion oxazolinio	β	alosamidina
19	I, II, IV y VI	ácido	Ion oxocarbenio	α	Amidinas amidrazonas

Tabla 3. Diferencias entre las quitinasas de la familias 18 y 19 de glicosilhidrolasas (Iseli *et al.*, 1996).

Las quitinasas pertenecientes a la familia 18 contienen algunos aminoácidos altamente conservados en el dominio catalítico (Robertus *et al.*, 1999), como lo muestran las enzimas de *Coccidioides immitis* (Pisho *et al.*, 1995, Yang *et al.*, 1996), *Trichoderma harzianum* (García *et al.*, 1994), *Aphanoclaudium album* (Blaiseau *et al.*, 1992) y *Serratia marcescens* (Brurberg *et al.*, 1994) (Figura 8).

	130	170
Chi-ci	LSIGGW TYS ¹⁷⁷ PNF	FDGIDIDWE Y ¹⁷⁷ PED
Chi-th	LSIGGW TW ¹⁷⁷ STNF	FDGIDIDWE Y ¹⁷⁷ PAD
Chi-aa	LSIGGW TW ¹⁷⁷ STNF	FDGIDIDWE Y ¹⁷⁷ PAD
Chi-sm	PSIGGW TLS ¹⁷⁷ DPF	FDGVDIDWE F ¹⁷⁷ PGG

Figura 8. Secuencias de aminoácidos encontradas en el sitio activo de las quitinasas, las cuales incluyen un residuo de Glu en la posición 177, importante para el mecanismo catalítico. Las letras en negritas señalan los aminoácidos altamente conservados en este dominio.

La estructura tridimensional de algunas quitinasas de la familia 18 han sido resueltas, entre ellas la de una quitinasa de bacteria *Serratia marcescens* (Perrakis

et al., 1994) y la hevamina de *H. brasiliensis* (Terwisscha *et al.*, 1996). La estructura del dominio catalítico de estas enzimas es, en ambos casos un barril (β/α), es decir 8 hélices α rodean al barril β formando una especie de anillo (Figura 9) (Robertus *et al.*, 1999).

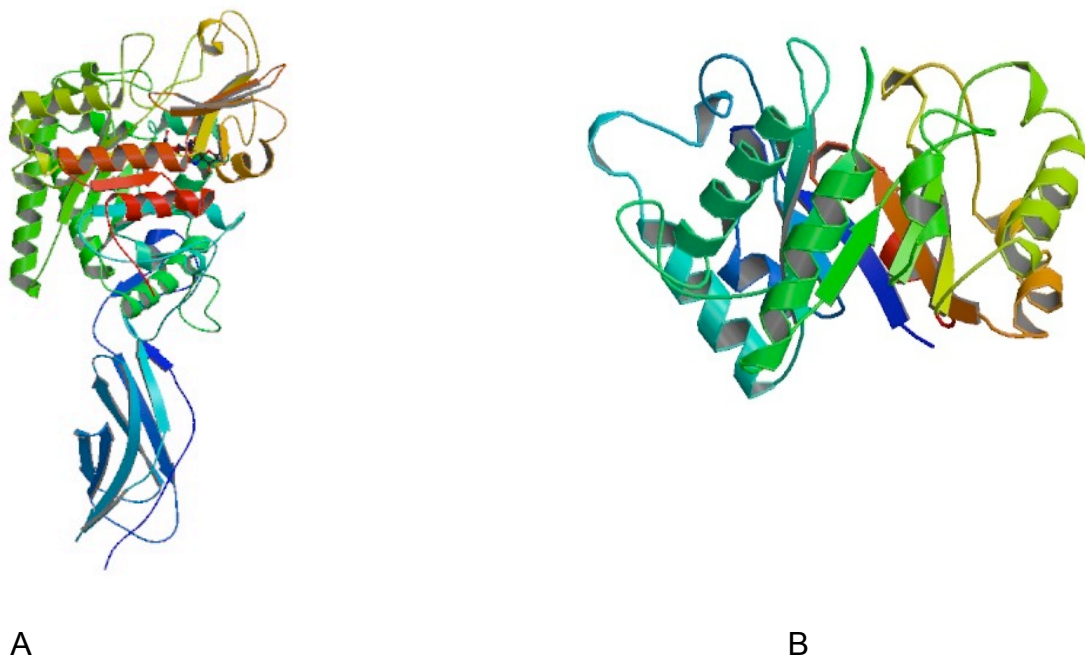


Figura 9. Estructura tridimensional de quitinasas de la familia 18, A: quitinasa de *Serratia marcescens* (Código PDB: 1x6n), B: hevamina de *Hevea brasiliensis* (Código PDB: 2hvm).

La familia 19 está formada principalmente por quitinasas provenientes de plantas. Algunas enzimas representantes de esta familia son: la quitinasa de la cebada (*Hordeum vulgare*) (Leah *et al.*, 1991), de papa (*Solanum tuberosum*) (Gayner *et al.*, 1988); de *Arabidopsis thaliana* (Samac *et al.*, 1990) y del guisante (*Pisum sativum*) (Chang *et al.*, 1995) (Figura 10).

	60	70	80	90	100
Chi-hv	KREVA AF LAQ T SHETT GGWATAPDGAF AWGYCFKQ ERGASSDYCTPSAQWPCAPGK				
Chi-st	KREIA AF FAQ T SHETT GGWASAPDGPY AWGYCFLR ERGNPGDYCPPSSQWPCAPGR				
Chi-at	KKEVA AF FGQ T SHETT GGWATAPDGPY SWG YCFK QEQNP ASDYCEPSATWPCASGE				
Chi-ps	KREIA AF LGQ T SHETT GGWPTAPDGPY AWGYCFLR EQNP-STY CQAS SEFPCASGK				

Figura 10. Secuencia de aminoácidos del dominio catalítico de algunas quitinasas representantes de la familia 19. Los residuos Glu 67 y Glu 89 son importantes en el mecanismo de acción. En negritas se señalan los aminoácidos altamente conservados en este dominio.

Las quitinasas de cebada (Leah *et al.*, 1991), arroz (PDB: 2dkv) y papaya (Huet *et al.*, 2008) son miembros de esta familia, de los cuales se ha reportado la estructura tridimensional por difracción de rayos X. Un análisis de la estructura 3D de la quitinasa de cebada mostró que varios residuos conservados forman un núcleo hidrofóbico. La naturaleza de estos residuos justifica la idea de que la quitinasa de cebada es un modelo razonable para otras enzimas de la familia 19 (Figura 11), donde los residuos no polares en el núcleo y los residuos responsables de la actividad enzimática están altamente conservados (Robertus *et al.*, 1999).



Figura 11: Quitinasa de cebada, representante de la familia 19 de glicosil-hidrolasas (Código PDB: 1dxj).

Propiedades Bioquímicas y Fisicoquímicas

Masa molecular y punto isoeléctrico

Las quitinasas presentes en plantas y algas tienen en promedio un peso molecular de 30 kDa. Las quitinasas con masa molecular entre 40-90 kDa y hasta 120 kDa han sido identificadas en moluscos, artrópodos y algunos vertebrados como peces, anfibios y mamíferos. Un intervalo grande de masa molecular de 30 a 120 kDa se encuentra en bacterias y hongos (Monzingo *et al.*, 1996). Algunas quitinasas de plantas como la zanahoria y de insectos, como los gusanos del tabaco (Matthews *et al.*, 1981) y de la seda (Grutter *et al.*, 1983) están glicosiladas.

El punto isoeléctrico de las quitinasas comprende un intervalo grande de valores: de 3-10 en plantas y algas; 4.7-9.3 en insectos, crustáceos, moluscos y peces y 3.5-8.8 en microorganismos (Koga *et al.*, 1999).

pH óptimo

El pH óptimo de las quitinasas es de 4-9 para plantas y algas, de 4.8-7.5 para animales y de 3.5-8.0 para microorganismos. El pH óptimo parece depender del sustrato utilizado, por ejemplo las quitinasas del gusano de seda (Grutter *et al.*, 1983) y de la planta ñame (Blake *et al.*, 1967) muestran dos valores óptimos de pH 4 y 8-10 cuando se usa glicol quitina como sustrato. Sin embargo, estas quitinasas muestran únicamente un pH óptimo a 4.6 cuando el sustrato es N-acetil quitooligosacáridos (Kelly *et al.*, 1979). Esto se puede deber a la capacidad de unión a quitina o a la existencia de otro dominio de unión.

Estabilidad

Las quitinasas de plantas de clase III (Kelly *et al.*, 1979) y las quitinasas de *Bacillus licheniformis* (Andersen *et al.*, 1979) muestran alta resistencia a temperaturas de hasta 80 °C. Por otra parte las quitinasas de insectos como la del gusano de seda no son muy estables a temperaturas cercanas a 40 °C (Grutter *et al.*, 1983). Considerando que las quitinasas de insectos son generalmente más grandes que las quitinasas de plantas, la estabilidad termodinámica puede estar favorecida en las quitinasas más pequeñas y compactas (Koga *et al.*, 1999).

Mecanismo de acción

Las quitinasas usan dos diferentes mecanismos hidrolíticos (Iseli *et al.*, 1996): catálisis sustrato asistida, característica de las quitinasas de la familia 18, que conduce a la retención de la conformación del carbono anomérico del producto (Figura 12 A) (van Aaltel *et al.*, 2001). La reacción de hidrólisis llevada a cabo por quitinasas de la familia 19 usa el mecanismo de catálisis ácida, invirtiendo la configuración (Figura 12 B) (Brameld *et al.*, 1998).

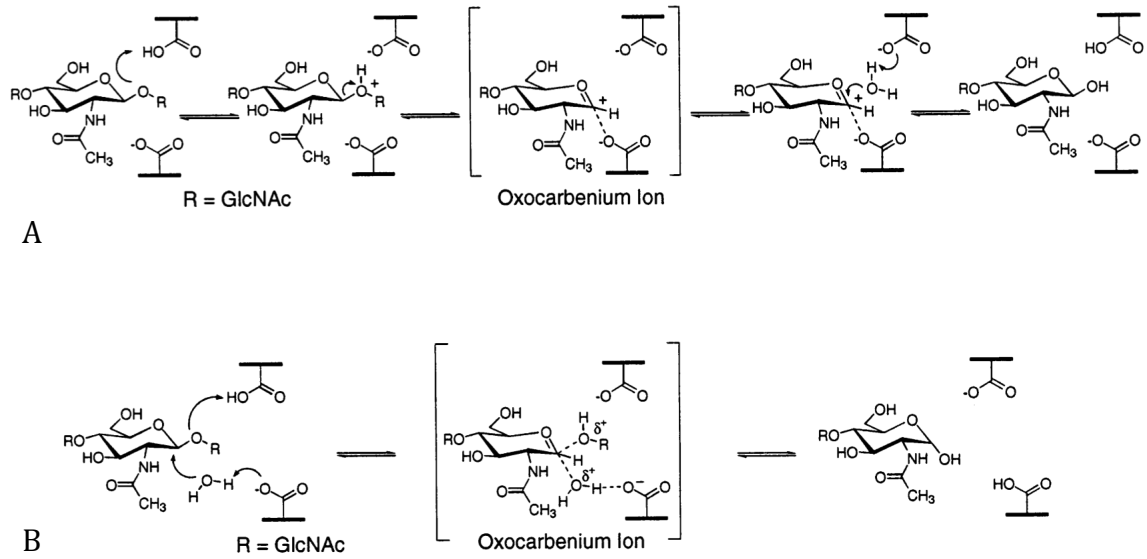


Figura 12: A) Mecanismo propuesto para las quitinasas de la familia 18: hidrólisis de doble desplazamiento, la protonación de un residuo de GlcNAc conduce a la formación del intermediario oxacilina, que puede ser hidrolizado para formar un producto con retención de la configuración anomérica. B) Mecanismo de desplazamiento simple, propuesto para quitinasas de la familia 19; dos residuos ácidos son requeridos en el sitio activo provocando que el producto de hidrólisis presente una inversión de la configuración anomérica (Brameld *et al.*, 1998).

ANTECEDENTES

En el 2002, Riordan y cols. fueron los primeros en clonar el gen de la quitinasa de clase I (Hev b 11) del látex de *H. brasiliensis*. Ellos obtuvieron una proteína de fusión con la proteína de unión a maltosa (PUM), la cual fue expresada utilizando el sistema *Escherichia coli*, vector pMAL-p2. La proteína de fusión (rHev b 11-PUM) en su secuencia de quitinasa mostró 70 % de identidad con la endoquitinasa de aguacate, y 58 % con la heveína, en su dominio de unión a quitina. También presentó actividad biológica inhibiendo el crecimiento de *Fusarium oxyspoum* y fue reconocida por IgE's del suero de pacientes alérgicos a látex y frutas en ensayos de ELISA e inmunoblots.

En ensayos de inhibición por ELISA, la pre-incubación de sueros con la proteína recombinante de fusión (rHev b 11-PUM) mostró un 16 % de inhibición con una proteína recombinante de heveína (rHev b 6.02-PUM) en fase sólida. Estos datos parecen contradecir la hipótesis que establece que el dominio heveína de las quitinasas de clase I del látex es el único donde se encuentran los epítomos de unión a IgE, responsables de la reactividad cruzada con frutas. Al parecer el dominio quitinasa contiene otros epítomos de unión a IgE que no están presentes en el dominio de unión a heveína.

Un año más tarde, Rihs y cols. expresaron la quitinasa de clase I de hojas de *H. brasiliensis*, utilizando el mismo sistema de expresión que Riordan y cols. La isoforma recombinante rHev b 11.0102-PUM contiene un dominio de unión a quitina con 56 % de identidad en secuencia a la heveína y mostró diferencias en 8 aminoácidos comparada con la quitinasa recombinante obtenida del látex (Tabla 4).

Un análisis por Pharmacy CAP System™ reveló la presencia de anticuerpos específicos IgE para esta proteína de fusión en 29 % de sueros de pacientes alérgicos a látex.

riordan	E	Q	C	G	R	Q	A	G	G	A	L	C	P	G	G	L	C	C	S	Q	Y	G	W	C	A	N	T	P	E	Y	C	G	S	G	C	Q	S	Q	C	D	G	G	G	G	G	45
rhis	E	Q	C	G	R	Q	A	G	G	A	L	C	P	G	G	L	C	C	S	Q	Y	G	W	C	A	N	T	P	E	Y	C	G	S	G	C	Q	S	Q	C	D	G	G	V	G	G	45
riordan	E	D	G	G	I	D	L	G	S	I	I	S	R	S	T	F	E	E	M	L	K	H	R	N	D	A	A	C	P	A	K	G	F	Y	T	Y	D	A	F	I	S	A	A	K	A	90
rhis	E	G	G	C	V	D	L	G	S	I	I	S	R	S	T	F	E	E	M	L	K	H	R	N	N	A	A	C	P	A	K	G	F	Y	T	Y	D	A	F	I	S	A	A	K	A	90
riordan	F	P	A	F	G	I	T	G	D	V	D	T	C	K	R	E	I	A	A	F	F	G	Q	T	S	H	A	T	T	G	G	W	P	T	A	P	D	G	P	Y	A	W	G	Y	C	135
rhis	F	P	A	F	G	I	T	G	D	V	D	T	C	K	R	E	I	A	A	F	F	G	Q	T	S	H	A	T	T	G	G	W	P	T	A	P	D	G	P	Y	A	W	G	Y	C	135
riordan	Y	K	E	E	L	N	Q	A	S	S	Y	C	S	P	S	P	A	Y	P	C	A	P	G	K	K	Y	Y	G	R	G	P	I	Q	L	S	W	N	Y	N	Y	G	Q	C	G	Q	180
rhis	H	K	E	E	L	N	Q	A	S	S	Y	C	S	P	S	P	A	Y	P	C	A	P	G	K	K	Y	Y	G	R	G	P	I	Q	L	S	W	N	Y	N	Y	G	Q	C	G	Q	180
riordan	A	L	G	L	D	L	L	N	N	P	D	L	V	A	T	D	R	V	I	S	F	K	A	A	I	W	F	W	M	T	P	Q	F	P	K	P	S	C	H	D	V	I	T	G	Q	225
rhis	A	L	G	L	D	L	L	N	N	P	D	L	V	A	T	D	R	V	I	S	F	K	A	A	I	W	F	W	M	T	P	Q	F	P	K	P	S	C	H	D	V	I	T	G	Q	225
riordan	W	S	P	T	G	H	D	I	S	A	G	R	A	P	G	Y	G	V	I	T	N	I	I	N	G	G	L	E	C	G	R	G	W	D	A	R	V	E	D	R	I	G	F	Y	K	270
rhis	W	S	P	T	G	H	D	I	S	A	G	R	A	P	G	Y	G	V	I	T	N	I	I	N	G	G	L	E	C	G	S	G	W	D	A	R	V	E	D	R	I	G	F	Y	K	270
riordan	R	Y	C	D	M	F	A	V	G	Y	G	S	N	L	D	C	Y	N	Q	I	P	F	G	L	G	295																				
rhis	R	Y	C	D	M	F	G	V	G	Y	G	S	N	L	D	C	Y	N	Q	I	P	F	G	L	G	295																				

Tabla 4: Secuencia de nucleótidos y de aminoácidos de la quitinasa de clase I de las hojas de *H. brasiliensis* (LaCIC) (Rhis et al., 2003) en comparación con la secuencia de la quitinasa de clase I obtenida de látex (AJ238579) (Riordan et al., 2002).

JUSTIFICACIÓN

Algunos reportes han identificado a las quitinasas de clase I como moléculas importantes en la unión a IgE de suero de pacientes con el síndrome látex-frutas. Por lo tanto, la purificación y caracterización de este alérgeno es necesaria para evaluar la reactividad cruzada en el síndrome látex-fruta y en un futuro contribuir a su diagnóstico y terapia. Con el fin de contar con material suficiente para llevar a cabo estos estudios o bien para preparar herramientas de diagnóstico, se requiere tener cantidades importantes del alérgeno, el cual es poco abundante en la planta. La alternativa para solucionar este problema es la clonación, expresión y purificación de la quitinasa de clase I de *H. brasiliensis* utilizando técnicas de DNA recombinantes.

OBJETIVO

Clonar y expresar al alérgeno Hev b 11 (quitinasa de clase I) recombinante a partir de las hojas de *H. brasiliensis*.

Objetivos específicos

- Extraer el RNA de las hojas de *H. brasiliensis* y sintetizar el ADNc.
- Clonar el gen de la quitinasa de clase I.
- Expresar y evaluar la actividad de esta enzima.
- Establecer las condiciones de purificación para la quitinasa de clase I recombinante.

METODOLOGÍA

Aislamiento de ARN total

El ARN se aisló de hojas del árbol de *H. brasiliensis*, utilizando el kit comercial de extracción Rneasy® Mini Qiagen. Las hojas sufrieron una pequeña lesión 24 horas antes de ser cortadas.

Síntesis de ADNc

La transcripción reversa se llevó a cabo con el kit Protoscript® First Strand ADNc Syntesis Kit, New England BioLabs®, se utilizaron 3 µg de ARN total y los oligos dT₂₃ o Random (dN₉).

Reacción en cadena de la polimerasa: amplificación del gen de la quitinasa de clase I

La amplificación de la quitinasa de clase I se llevó a cabo en 25 µL de reacción en una mezcla que contenía: 5 µL de ADNc, 50 mM KCl, 20 mM Tris-HCl (pH 8.4), 1.5 mM MgCl₂, 0.4 µM de cada oligonucleótido CHIT-5' (5'-GGCCATGGACGACGACGACAAGGAGCAATGTGGTCGCCAAGCAGGTGGC-3') y CHIT-3' (5'-CAGCGGCCGCCCTAATCCGAATGGCGTTT-3') los que se diseñaron utilizando como secuencia a la quitinasa de clase I de *H. brasiliensis* (Gen Bank: AJ238579) y 1.0 U Taq Polimerasa Platinum® Invitrogen. El producto de reacción fue obtenido en un termociclador (TC-512, TECHNE), con un paso inicial de

desnaturalización (95 °C por 3 min) y un total de 30 ciclos de desnaturalización (95 °C por 30 seg), alineamiento (55 °C por 30 seg) y extensión (72 °C por 30 seg) seguido por 5 min a 72 °C.

Clonación y secuenciación del producto de PCR

El producto de PCR fue clonado en los vectores pET 22b y pET 32a, entre los sitios de restricción Not I (5'...GC*GGCCGC...3') y Nco I (5'...C*CATGG...3') y se ligó a 37 °C durante una hora (Ligasa T4, Fermentas®). Esta mezcla de ligación se transformó en células de *E. coli* DH5 α y se sembró en agar Luria-Bertoni (LB)-Ampicilina, las colonias que crecieron se sembraron en medio LB-Ampicilina para la extracción del vector basándose en el procedimiento de lisis alcalina desarrollada por Birnboim y Dolly, 1979. Los vectores se cortaron con la enzima Not I para linealizarlos y poder verificar su masa molecular en un gel de agarosa; por otra parte se realizó una reacción de PCR con los oligonucleótidos específicos de la quitinasa clase I, para su análisis.

Aquellos vectores en los que se confirmó la presencia del inserto, se secuenciaron en el Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

Transformación de *E. coli* Rosseta gami y BL21

En un tubo de 50 μ L de células competentes de *E. coli* Rosseta gami o BL21 se agregaron 50 ng del vector clonado pET 32a o pET 22b respectivamente, la mezcla se incubó por 30 minutos en hielo. Se realizó un choque térmico a 42 °C por 30

segundos e inmediatamente después se colocaron los tubos a 4 °C por 5 minutos. A esta mezcla se añadió 200 µL de medio LB y se incubó por 1 hora a 37 °C en agitación. Se sembraron 100 µL de estas células en cajas de medio LB-ampicilina-kanamicina-cloramfenicol-tetraciclina para *E. coli* Rosetta gami y LB-ampicilina para *E. coli* BL21 y se incubaron toda la noche a 37 °C.

Expresión de la proteína de fusión (quitinasa de clase I-tiorredoxina)

Cinética de inducción

En 30 mL de medio LB-ampicilina-kanamicina-cloramfenicol-tetraciclina y LB-ampicilina, se inocularon 300 µL de un cultivo de células recombinantes de *E. coli* Rosetta gami o *E. coli* BL21 respectivamente, y se crecieron a 37 °C, hasta llegar a una densidad óptica (DO) de 0.6. La expresión de la proteína de fusión fue inducida con 0.5 mM de isopropil-β-D-tiogalactopiranosido (IPTG) a 30 °C por 24 horas. Para hacer la cinética de inducción, cada dos horas se tomaron muestras de 1 mL, a partir del tiempo cero (sin IPTG).

Expresión de la proteína de fusión

En 1 litro de medio LB-ampicilina-kanamicina-cloramfenicol-tetraciclina, se inocularon 10 mL de un cultivo de células *E. coli* Rosetta gami recombinantes y se crecieron a 37 °C, hasta llegar a una DO de 0.6. La expresión de la proteína de fusión fue inducida por 0.5 mM de IPTG a 30 °C por 12 horas. El medio se centrifugó

y el paquete celular se lisó por sonicación en amortiguador $\text{H}_2\text{PO}_4/\text{HPO}_4^-$ 50 mM, 0.3 M de NaCl, pH 8.

Purificación de la quitinasa de clase I recombinante

Cromatografía de afinidad en columna de níquel

La Figura 13 muestra el diagrama de construcción del vector pET 32a, en donde se aprecia la presencia de dos His-tags. Por lo tanto, el extracto celular obtenido de cultivos inducidos se aplicó a una columna de afinidad (HIS-Select™ Nickel Affinity Gel, Sigma). La elución de la proteína de fusión (quitinasa clase I-tiorredoxina) de una masa molecular de 47 kDa se llevó a cabo usando diferentes concentraciones de imidazol (10-250 mM).



Figura 13: Construcción de la proteína de fusión recombinante (quitinasa clase I-tiorredoxina), en el vector pET 32a.

Reacción de corte con enteroquinasa

La fracción de elución que contenía la proteína de fusión recombinante se hidrolizó con enteroquinasa (EkMax™, Invitrogen), para liberar a la quitinasa de clase I (35 kDa) de la tiorredoxina (17 kDa) (Figura 13).

Cromatografía de exclusión molecular (FPLC)

El producto de la reacción de corte con enteroquinasa se aplicó a una columna Superdex_Peptide_HR_10/30, acoplada a un sistema de cromatografía líquida para proteínas (FPLC). La columna se equilibró con amortiguador de acetatos, pH 6, NaCl 200 mM y se eluyó con el mismo amortiguador a un flujo de 0.5 mL/min.

Cromatografía de intercambio aniónico (FPLC)

La fracción obtenida en la cromatografía de exclusión molecular se purificó por cromatografía de intercambio aniónico utilizando una columna Mono_Q_HR_5/5, acoplada a un sistema de FPLC. La columna fue equilibrada con amortiguador de fosfatos 50 mM, pH 6. La elución se llevó a cabo con un gradiente de 0 a 100 % de NaCl 1 M. Las fracciones obtenidas se concentraron en un Amicon (Millipore) utilizando una membrana con corte de 10 kDa.

Evaluación de la actividad endoquitinasa y exoquitinasa de la proteína de fusión: quitinasa de clase I-tiorredoxina

Para la determinación de la actividad de endoquitinasa y exoquitinasa se utilizaron dos métodos, el de la liberación de azúcares reductores usando el ácido dinitrosalicílico (DNS) y con sustratos sintéticos, respectivamente.

Actividad endoquitinasa y exoquitinasa usando quitina como sustrato

A 7.5 mg de quitina de camarón (Sigma Chemical Co) se le adicionaron 100 μ L de extracto celular de *E. coli* Rosetta gami recombinante y 150 μ L de amortiguador de acetatos 50 mM, pH 5. La mezcla se incubó por 24 h a 37 °C y los azúcares reductores formados por la hidrólisis de la quitina se cuantificaron con la técnica DNS. Transcurridas las 24 horas, se adicionaron 500 μ L de DNS y se puso a ebullición durante 10 minutos. Esta mezcla se centrifugó a 14, 000 rpm durante 15 minutos y se leyó la absorbancia a 550 nm. Una unidad de actividad se define como los mg de N-acetil-glucosamina liberados por hora.

Como control positivo se utilizó un extracto semipurificado del látex de *H. brasiliensis* y como control negativo el extracto celular de *E. coli* Rosetta gami recombinante sin inducir.

Actividad de exoquitinasa utilizando sustratos sintéticos.

Se utilizó el sustrato p-nitrofenil-N-acetil- β -D-glucosaminida (pNADG) a una concentración de 2 mg/mL en amortiguador de citratos-fosfatos 0.1 M, pH 5.6.

El ensayo consistió en adicionar 50 μ L de pNADG, 75 μ L de amortiguador citratos-fosfatos 0.1 M, pH 5.6 y 25 μ L de extracto celular de *E. coli* Rosetta gami recombinante. Esa mezcla se incubó con agitación a 37 °C por 1 hora. La reacción se detuvo adicionando 250 μ L de NaOH 0.1 M. El p-nitrofenol liberado se determinó espectrofotométricamente a 400 nm. La cantidad de sustrato hidrolizado se calculó empleando el coeficiente de extinción molar ϵ^M de 18.1 para el p-nitrofenol. Una

unidad de actividad se define como los μ moles de p-nitrofenol liberados por minuto.

Se utilizaron los mismos controles que en el experimento anterior.

RESULTADOS

Amplificación del gen de la quitinasa clase I y análisis de secuencia

La reacción de amplificación del gen de la quitinasa clase I, a partir de cDNA, usando los oligos específicos CHIT-5' y CHIT-3' produjo un fragmento de 978 pb, el cual se insertó en los plásmidos pET 22b (5493 pb) y pET 32a (5900 pb) para su expresión (Figura 14).

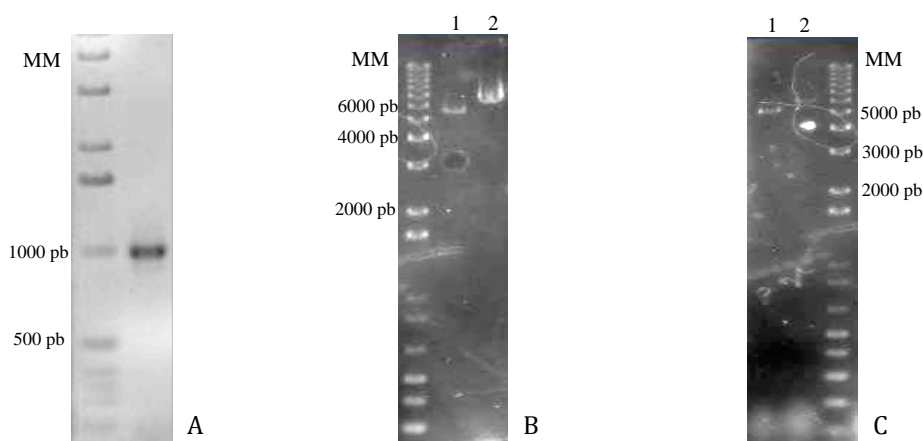


Figura 14. A: Amplificación del gen de la quitinasa de clase I. B: Análisis de restricción con la enzima *Not I*, (1) pET 32a, (2) pET 32a con inserto. C: Análisis de restricción con la enzima *Not I*, (1) pET 22b, (2) pET 22b con inserto.

Al analizar la secuencia de la quitinasa de clase I clonada en los plásmidos pET 22 b y pET 32a, se observó la presencia de 90 pb adicionales, que no están presentes en las secuencias ya reportadas de este mismo gen (Riordain *et al.*, 2002 y Rihs *et al.*, 2003). Esta región adicional es una secuencia repetida que corresponde a las posiciones 160-250 pb e implica una inserción de 30 aminoácidos (Figura 15).

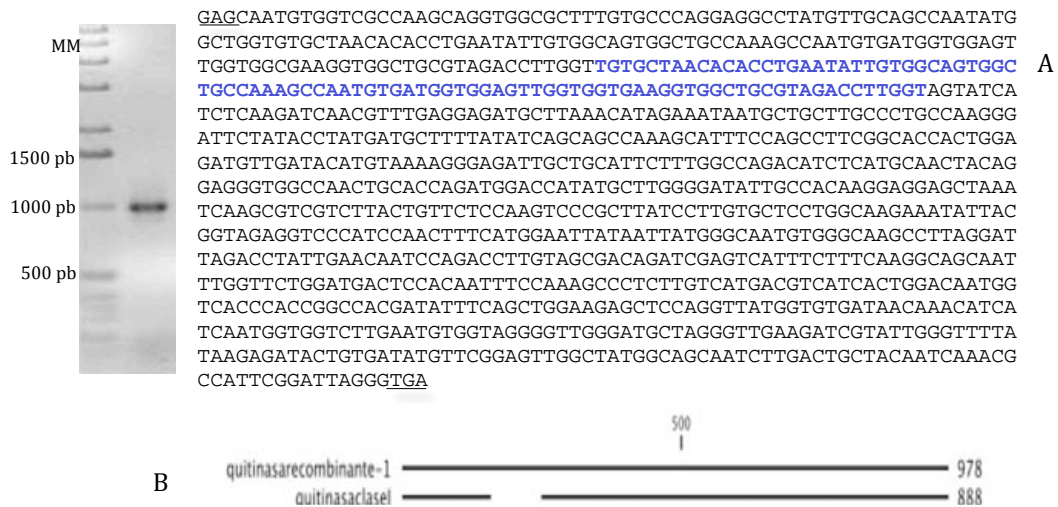


Figura 15. A: secuencia obtenida para el gen de la quitinasa clase I, en azul se muestra la secuencia repetida del gen en las posiciones 160-250 pb y subrayados se señalan los codones de inicio y de termino. B: Comparación de secuencia del gen de la quitinasa clase I de *H. brasiliensis* reportada por Rihs y cols y la secuencia del gen de la quitinasa clase I obtenida en este trabajo.

La amplificación de este gen se realizó con DNAc sintetizado con oligos random, éstos se unen al azar en secuencias de RNA total; por lo que, para hacer más específica nuestra búsqueda y evitar la amplificación de productos inmaduros que no han sido procesados a RNAm y que por consecuencia aún pudieran tener secuencias de intrones, se utilizaron oligos dT23 para la síntesis de DNAc (Figura 16).

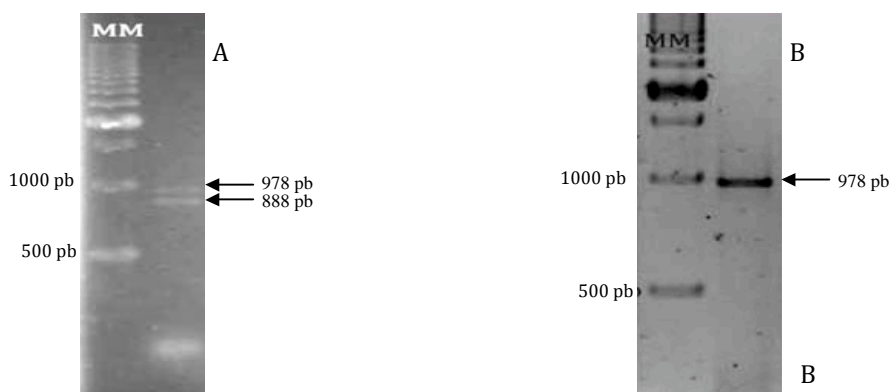


Figura 16. Productos de PCR del gen de la quitinasa de clase I obtenidos a partir de ADNc sintetizado con oligos dT23. (A) Productos amplificados utilizando Master Mix de Fermentas. (B) Producto obtenido utilizando Taq Platinum, Invitrogen.

En la reacción de PCR utilizando Taq Platinum®, Invitrogen nuevamente se observó la presencia del gen con los 90 pb adicionales (Figura 16B), también se utilizó un Master Mix de ©Fermentas donde se observó la presencia de dos productos de amplificación; uno de 978 pb, que ya se había clonado y que corresponde al gen con los 90 pb adicionales y otro producto de amplificación de una masa molecular aproximada de 888 pb (Figura 16A), la cual corresponde al tamaño del gen reportado en los trabajos de Riordain (2002) y Rhis (2003); lo que podría indicar la presencia de ambos fragmentos.

Para verificar que la secuencia del producto de PCR de menor masa molecular es igual a la del gen de la quitinasa de clase I de trabajos previos, se intentó clonarlo; para lo cual se probaron dos polimerasas más, se hicieron curvas de gradiente de temperatura y Mg^{2+} pero no obtuvimos resultados satisfactorios, ya que como producto de PCR siempre obtuvimos muy poco; lo que dificultó la clonación de este fragmento.

En un alineamiento de secuencias de aminoácidos del gen de la quitinasa de clase I de *H. brasiliensis* utilizando las reportadas en los años 2002 y 2003 por Riordan y Rhis respectivamente y la secuencia obtenida en este trabajo, se puede apreciar que los 90 pb adicionales corresponden a una secuencia repetida de 30 aminoácidos que comprenden los últimos 20 del C terminal del dominio heveína y los 10 del conector (Figura 17).

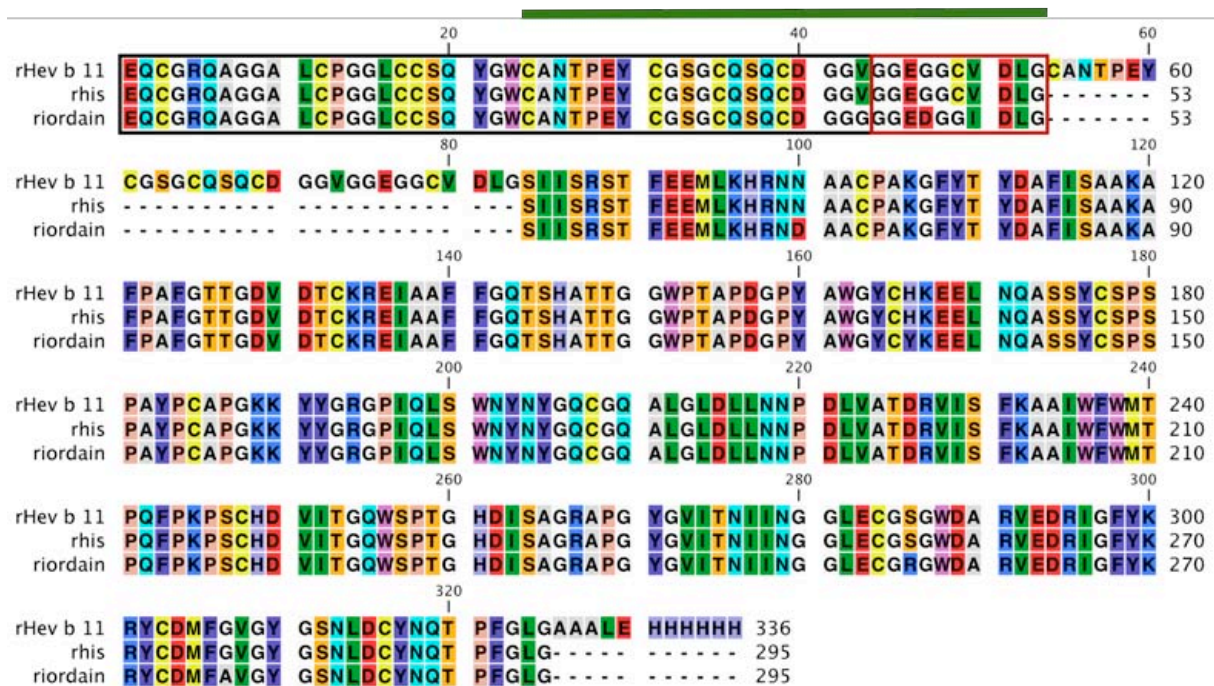


Figura 17. Comparación de la secuencia de aminoácidos de la quitinasa clase I recombinante con la secuencia obtenida en trabajos previos. Recuadro negro: dominio heveína, recuadro rojo: conector. La línea verde señala la secuencia repetida en rHev b 11.

La comparación de los residuos de aminoácidos muestra diferencias en ocho posiciones entre las secuencias reportadas por Riordan y RHis, por lo que la última está reportada como una isoforma presente en las hojas, tanto que la reportada por Riordan está en látex. La secuencia obtenida por nosotros es la misma que la obtenida por RHis, con la diferencia de los 30 aminoácidos adicionales que están repetidos.

Expresión de la proteína de fusión quitinasa de clase I-tiorredoxina

Se probaron dos sistemas de expresión para aumentar las probabilidades de un plegamiento correcto debido al alto contenido de cisteínas en la quitinasa de clase I;

el vector pET 32a, *E. coli* Rosetta gami que tiene un citoplasma oxidante que favorece la formación de puentes disulfuro y el vector pET 22b, *E. coli* BL 21 que permite la migración de la proteína hacia el espacio periplásmico donde el plegamiento también se ve favorecido. En el primer sistema de expresión se obtuvo una proteína de fusión con una masa molecular de 47 kDa; de los que, 34.5 kDa corresponden a la quitinasa de clase I y 12 kDa a la tiorredoxina. En cambio en el otro sistema de expresión pET 22b, *E. coli* BL-21 se logró la expresión de una proteína de aproximadamente 22 kDa (Figura 18).

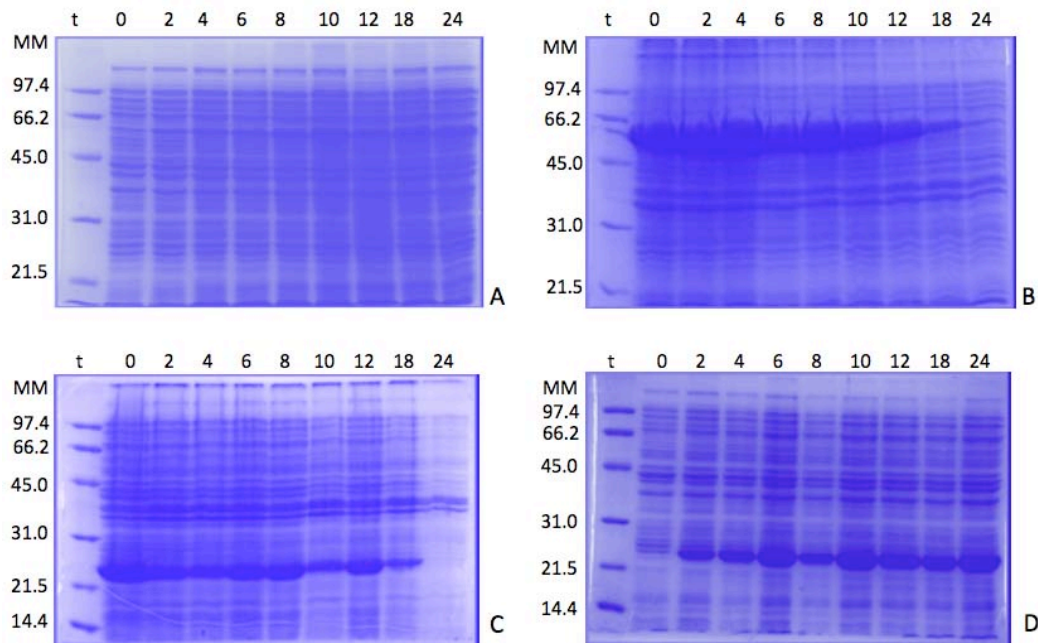


Figura 18. Expresión de la quitinasa de clase I recombinante. (A) *E. coli* Rosetta gami sobrenadante, (B) *E. coli* Rosetta gami pellet, (C) *E. coli* BL 21 sobrenadante (D) *E. coli* BL 21 pellet.

La proteína de fusión recombinante de una masa molecular de 47.0 kDa obtenida con el sistema de expresión pET 32a, *E. coli* Rosetta gami se agregó como cuerpos de inclusión en una proporción grande (Figura 18B); sin embargo, de toda la

quitinasa expresada, logramos obtener una parte de la proteína soluble (Figura 18A), la cual presentó actividad exoquitinasa y endoquitinasa (Figura 19).

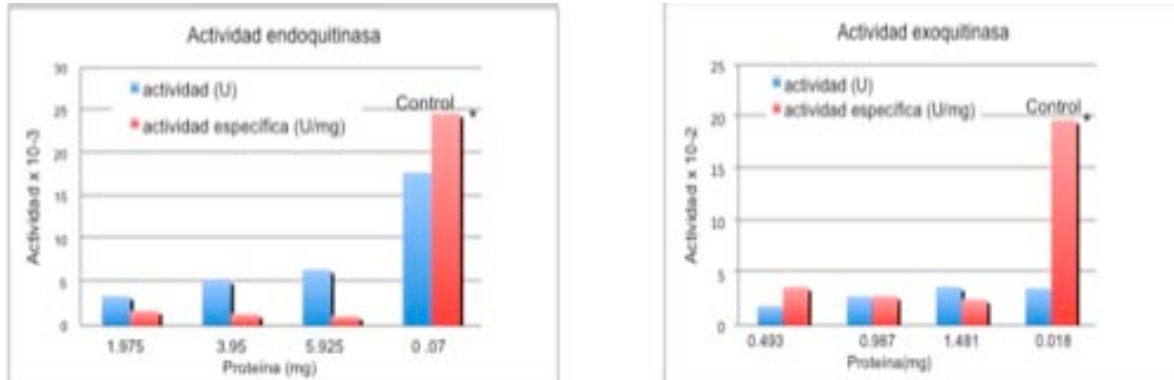


Figura 19. Evaluación de la actividad enzimática de la quitinasa de clase I recombinante a varias concentraciones de proteína. El control positivo fue extracto semipurificado de quitinasa nativa proveniente del látex de *Hevea brasiliensis*. * Actividades específicas con un orden de magnitud mayor al de la escala.

La presencia de actividad enzimática en la proteína de fusión, podría indicar el correcto plegamiento de la quitinasa de clase I, a pesar de la presencia del segmento de 30 aminoácidos adicionales, los que al parecer no tuvieron efecto en la actividad de la proteína y muy posiblemente tampoco en su plegamiento.

Utilizando algoritmos del ExPASy Swiss-Prot se obtuvieron modelos teóricos de la estructura tridimensional de la quitinasa de clase I de *H. brasiliensis* reportada por Rhis y de la obtenida en este trabajo (Figura 20), tomando como base la quitinasa de clase I de arroz (PDB:2DKV).

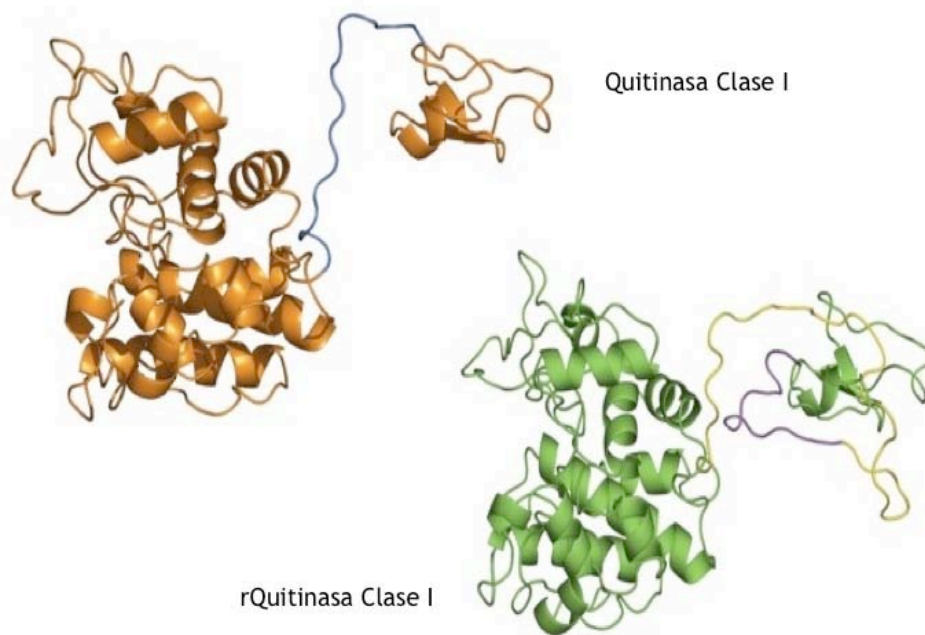


Figura 20. Comparación de modelos teóricos de la estructura tridimensional de la quitinasa de clase I nativa y recombinante obtenidos utilizando algoritmos de ExPASy Swiss-Prot. Azul: conector, amarillo: secuencia adicional.

En la estructura tridimensional del modelo teórico del alérgeno rHev b 11 clonado y expresado en este trabajo, no se ve afectado el plegamiento del dominio catalítico y de heveína, sin en cambio la presencia de los 30 aminoácidos adicionales, parece acercar ambos dominios.

Purificación de la quitinasa clase I recombinante

La proteína de fusión quitinasa clase I-tiorredoxina (47 kDa) eluyó a partir de 100 mM de imidazol en la columna de afinidad de níquel (Figura 21).

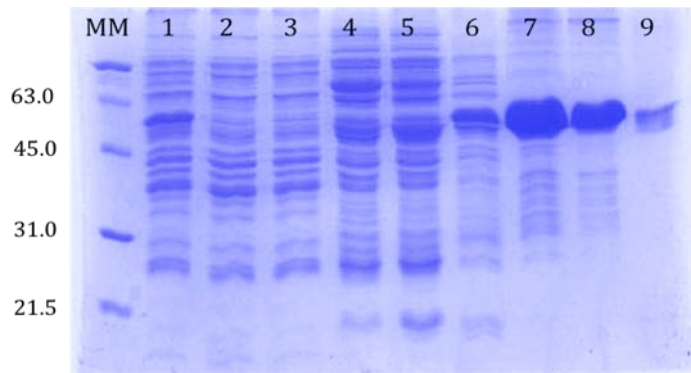


Figura 21. . Elución de la proteína de fusión quitinasa recombinante-tiorredoxina. MM: marcador molecular (kDa), Carril 1: extracto celular antes de pasar por la columna de afinidad, carril 2 y 3: Lavados con amortiguador de lisis, carril 4-9: eluciones con 20, 50, 100, 150, 200 y 250 mM de imidazol.

La fracción que eluyó con 200 mM de imidazol se hidrolizó con enteroquinasa (EkMax™, Invitrogen) para liberar la quitinasa recombinante (35 kDa) de la tiorredoxina (12 kDa), de acuerdo con el diagrama de construcción en el vector pET 32a (Figura 21).

Inicialmente los oligos se diseñaron para expresar la proteína en el vector pET 22b, donde sólo se tenía un His•tag, pero este sistema no funcionó. Se probó entonces el vector pET 32a y sí hubo expresión; sin embargo, el His•tag estuvo presente tanto en la tiorredoxina como en la quitinasa clase I (Figura 13). Por lo tanto, al pasar el producto del corte con enteroquinasa por la columna de afinidad, ambas proteínas se pegaron y no se pudieron separar (Figura 22).

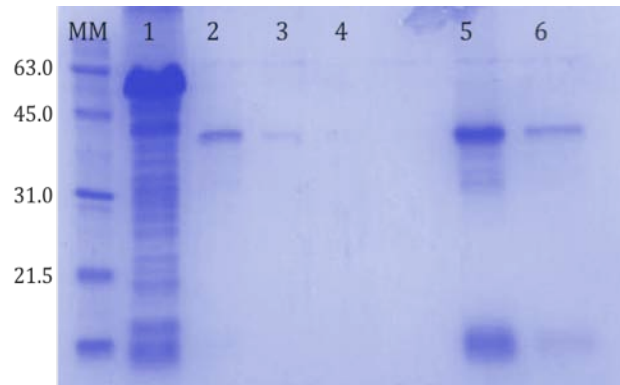


Figura 22: Elución de la quitinasa clase I recombinante y tiorredoxina después de la hidrólisis con enteroquinasa en la columna de afinidad de níquel. MM: masa molecular (kDa), 1: proteína de fusión recombinante antes del corte con enteroquinasa, 2, 3 y 4: Lavados, 5 y 6: elución con 150 mM imidazol.

Debido a la diferencia en masa molecular entre la quitinasa clase I recombinante y la tiorredoxina, se utilizó una columna de exclusión molecular Superdex-75 de 30 cm de longitud, pero no hubo una buena separación (Figura 23). Por lo tanto se decidió usar una cromatografía de intercambio iónico.

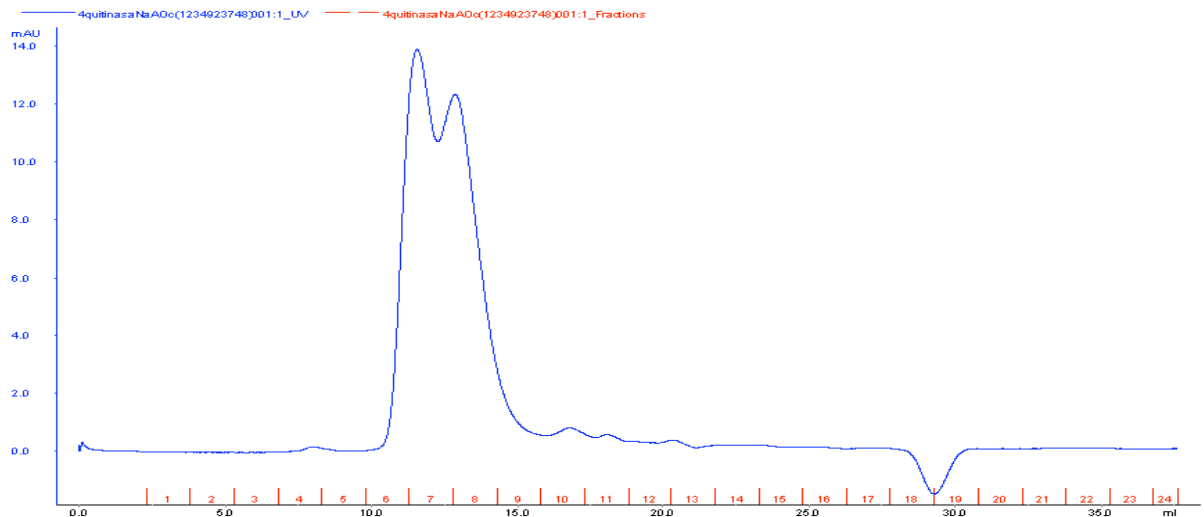


Figura 23: Purificación de la quitinasa clase I recombinante por cromatografía de exclusión molecular, Columna: Superdex75_Peptide/HR/10_30.

Para purificar a la quitinasa recombinante de clase I se utilizó una columna de intercambio aniónico Mono Q, utilizando como fase móvil amortiguador de fosfatos pH 6.5. La elución se llevó a cabo mediante un gradiente de NaCl (Figura 24).

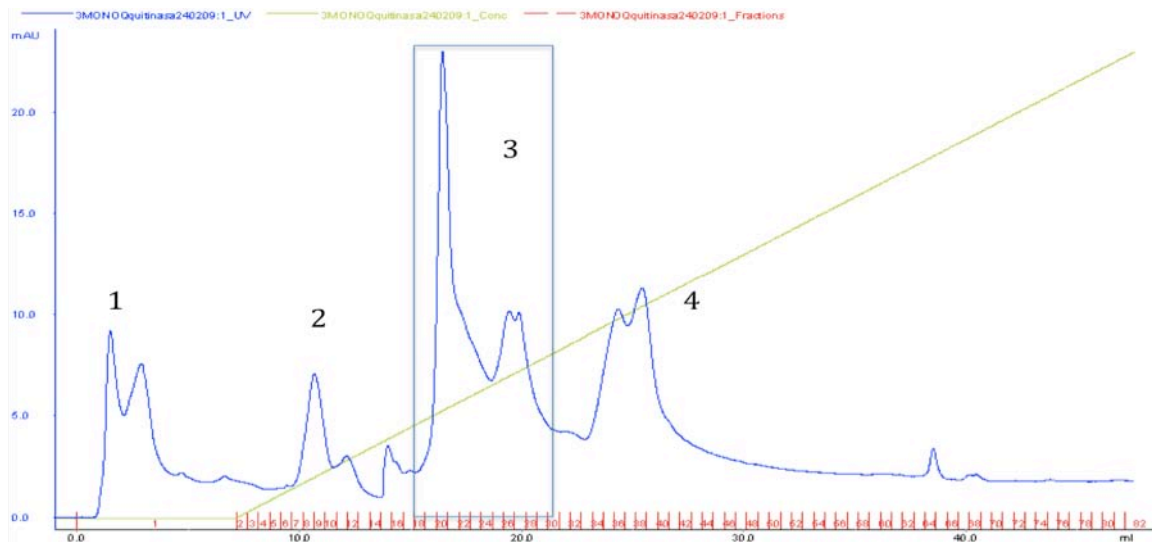


Figura 24: Purificación de la quitinasa clase I recombinante por cromatografía de intercambio aniónico. F: fracciones recolectadas. Columna: Mono_Q_HR_5/5. En el recuadro se señala la fracción que presentó actividad de quitinasa (fracción 3).

Cada una de las fracciones recolectadas (1-4), se concentraron y se cargaron en un gel de poliacrilamida al 12 % (Figura 25).

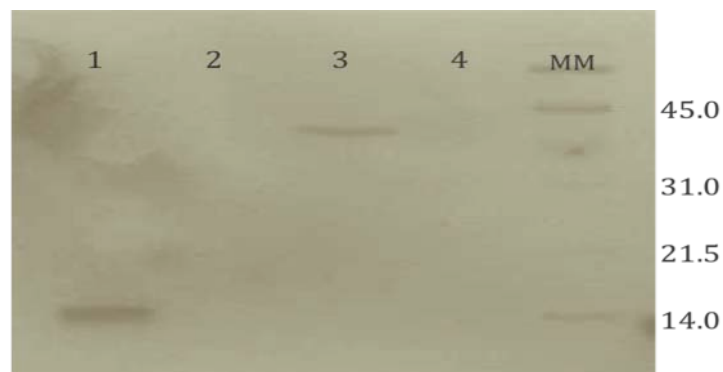


Figura 25: Gel SDS.PAGE. Fracciones recolectadas en la columna Mono Q de intercambio aniónico. Tinción de plata. Carril 1, 2, 3 y 4: fracciones 1, 2, 3 y 4 respectivamente.

En las fracciones 1 y 3 se observaron bandas de tamaño correspondiente a la tiorredoxina y quitinasa clase I recombinante respectivamente. En la fracción 3 también determinamos actividad de quitinasa, asegurando su presencia y semi purificación. No obstante, al llegar a este paso se tuvieron cantidades muy pequeñas de quitinasa recombinante clase I, las cuales fueron aproximadamente de 10 µg/mL.

DISCUSIÓN

La necesidad de producir alérgenos recombinantes en suficientes cantidades es esencial para mejorar y estandarizar los métodos de diagnóstico y de terapia. Las técnicas de Biología Molecular aplicadas a la expresión de genes que codifican alérgenos han hecho posible la producción de un mayor número de proteínas con capacidad de unión a IgEs, o de mutantes en las que se hubiere modificado alguna propiedad estructural y/o funcional de la molécula. Por lo tanto, la expresión de proteínas recombinantes y su purificación permitirá tener una proteína estándar que pudiera ser usada para estudios de caracterización molecular e inmunológicos.

Las plantas tienen un mecanismo de defensa complejo y eficiente para combatir peligros potenciales en el ambiente. Uno de los procesos bioquímicos frecuentes es la activación transcripcional de genes relacionados a la patogénesis, entre los cuales se incluye a los genes codificantes de las quitinasas. Estas enzimas son expresadas de manera constitutiva en hojas de numerosas plantas, pero se ha demostrado que son inducidas por una variedad de estímulos bióticos y abióticos como son: invasión por patógenos, heridas, reguladores de crecimiento (etileno), compuestos químicos o metales pesados.

Por las condiciones metodológicas de la extracción de ARN a partir de látex, lo cual implica el viajar al campo experimental donde se encuentran estos árboles y procesar el material lo antes posible, decidimos utilizar las hojas como fuente de extracción, ya que en el 2003 Rhis y cols clonaron la isoforma rHev b 11.0102 de este material. Esta isoforma también demostró su capacidad de unión a anticuerpos IgE, en forma similar a la rHev b 11.0101 (látex) clonada por Riordan y cols en el 2002.

En la reacción de amplificación (PCR), utilizando los oligonucleótidos específicos para el gen de la quitinasa de clase I, se sintetizaron dos productos con tamaños de 888 pb y 978 pb, de los cuales el de menor masa molecular era el esperado de acuerdo a lo reportado por Riordan y Rhis.

Se intentó clonar y secuenciar ambos productos, pero solo tuvimos éxito con el de 978 pb. Al analizar la secuencia del fragmento clonado, se pudo observar la presencia de 90 pb adicionales, correspondientes a una repetición de la secuencia del gen ya reportado (Riordan, 2002 y Rhis, 2003). Al trasladar esta secuencia de nucleótidos a aminoácidos nos percatamos que correspondían a los últimos 20 aminoácidos del C-terminal del dominio heveína y a los 10 aminoácidos que forman el conector (Figura 16). Esto quiere decir que la proteína clonada y expresada está formada por un dominio de heveína y un segmento que representa la mitad de este dominio (residuos 23-43), dos conectores y un dominio catalítico.

Existen reportes en los cuales se ha encontrado la presencia de dos o más dominios heveína en quitinasas (Kai-Jun et al, 1999; Wasano et al, 2009), lo cual aumenta el funcionamiento de las proteínas en procesos de crecimiento bacteriano mediante la aglutinación de bacterias por unión a azúcares de la pared celular (Guan et al, 2008).

Aunque no existen evidencias de quitinasas con medios dominio de heveína, no podemos descartar que el gen obtenido se trate de una isoforma de la quitinasa clase I, la cual no ha sido reportada; ya que basándonos en la bibliografía correspondiente, la inducción de estas isoformas es multifactorial y está relacionada principalmente con el tipo de estrés. Tal es el caso de la quitinasa BjCH11 de

Brassica juncea (mostaza parda) con dos dominios heveína, la cual se induce de manera importante con metil jasmonato (MeJA), por daño mecánico e infecciones a la planta por hongos, pero no es expresada de manera constitutiva (Xue-Feng et al, 2009).

En la figura 15 se puede apreciar que aunque obtuvimos una banda con la masa molecular buscada, no sabemos si esa corresponde al gen ya reportado para la quitinasa de clase I (Riordan y Rhis), puesto que no la pudimos clonar. Una posible explicación es que los dos genes encontrados sean isoformas, el de tamaño más pequeño correspondería al gen ya reportado por Rhis y cols, y el que clonamos nosotros a la isoforma que presenta un dominio de heveína y un segmento adicional que correspondería al 40 % de este dominio y el conector.

Algo importante que resaltar fue el parecido de la proteína obtenida en este trabajo con la obtenida por Rhis y cols, cuyo material de partida fueron las hojas de *H. brasiliensis*, a diferencia de lo hecho por Riordan y cols en el 2002, quienes partieron de látex. En estos trabajos se encontraron dos isoformas de la quitinasa clase I, que difieren en ocho aminoácidos. La obtenida por nosotros a partir de hojas fue exactamente la misma que la obtenida por Rhis con la diferencia del fragmento extra, y el dominio catalítico que corresponde a los residuos 51 al 124 es idéntico.

Las isoformas obtenidas por Rhis y Riordan se expresan dependiendo de la fuente, una es expresada en látex y la otra en hoja. No obstante, en nuestro caso podríamos especular que la enzima que obtuvimos es una isoforma cuya expresión podría depender de varios factores, como la región geográfica donde crece el árbol,

la estación del año, el tipo de estrés al que este sometido, el cual como ya se ha reportado, es fundamental para la expresión de isoformas.

Para la expresión de la rHev b 11 nosotros probamos el vector pET 32a con *E. coli* Rosetta gammi y el vector pET 22b con *E. coli* BL-21. En el primer sistema logramos obtener a la quitinasa como proteína de fusión con tiorredoxina, lo cual junto con el citoplasma reductor de *E. coli* Rosseta gammi ayudó a la formación de los puentes disulfuro presentes en la enzima, y por lo tanto, al correcto plegamiento de la misma. No obstante, en este mismo sistema parte de la proteína formó cuerpos de inclusión, posiblemente por el alto contenido de cisteínas, que en este caso es de 22. Con el otro sistema no tuvimos éxito, ya que aunque la secuencia y el marco de lectura eran los correctos obtuvimos una proteína más pequeña a la esperada.

La enzima que contiene el segmento extra de heveína presenta 5 cisteínas adicionales, que no sabemos si están formando puentes disulfuro entre sí. Por lo que para comprobar el correcto plegamiento de la quitinasa clase I recombinante se evaluó la actividad endoquitinasa y exoquitinasa. En ambos casos la actividad fue muy pequeña en comparación con la del control positivo, que fue un extracto semipurificado de quitinasa clase I a partir de hule natural. Cabe mencionar que para realizar las pruebas de actividad de la enzima recombinante se utilizó el extracto celular total, el cual contenía la proteína de fusión; esto es la quitinasa unida a la tiorredoxina y las proteínas de *E. coli*. Por otra parte en el extracto semipurificado de hule natural también se encuentra presente la hevamina que tiene actividad de quitinasa y otras quitinasas no pertenecientes a la de clase I, las cuales podrían tener un efecto sinérgico.

La purificación de la rHev b 11 resultó complicada, debido a la presencia de los fragmentos His•tag, uno en la tiorredoxina y otro en la quitinasa, ya que el sistema en el que se realizó la expresión de la proteína daba como resultado esa construcción (Figura 13). Por lo tanto, la purificación no se realizó en un solo paso usando la columna de afinidad, sino que requirió de una cromatografía de intercambio aniónico. Este procedimiento dio resultados satisfactorios con respecto a la pureza, pero no al rendimiento, el cual tiene que ser mejorado.

Es importante resaltar que a diferencia de los trabajos previos de Rhis y Riordan, en donde trabajaron con la proteína de fusión para llevar a cabo los estudios inmunológicos de alergenicidad de estas proteínas, en nuestro caso separamos a la quitinasa de la tiorredoxina, lo que nos permitirá llevar a cabo este tipo de estudios con la proteína pura.

En la caracterización de la actividad enzimática, usamos sustratos como el pNADG y la quitina para evaluar la actividad de exo y endo quitinasa. Por lo que podemos decir que la enzima recombinante obtenida en este trabajo presenta ambas actividades, mientras que Riordan y cols reportan únicamente estudios de inhibición de hongos en placas.

Finalmente, vale la pena mencionar que antes del 2008 no existía ninguna estructura tridimensional para las quitinasas de clase I, fue en ese año cuando se reportaron las estructuras 3D de las quitinasas de la papaya (Huet y cols, 2008) y del arroz (PDB: 2dkv). Con base en éstas se obtuvo un modelo teórico para la quitinasa recombinante obtenida en este trabajo. En éste se observa que el segmento adicional (40 % dominio de heveína y conector) no afecta el plegamiento de la

proteína; sin embargo, la unión entre los dominios parece ser más estrecha, lo que podría causar mayor rigidez y tal vez cambiar algunas propiedades de unión al sustrato e inmunológicas. Cabe señalar que el conector entre los dominios heveína y catalítico para las estructuras tridimensionales reportadas no se observa en los mapas de densidad electrónica puesto que es muy flexible.

CONCLUSIONES

Se clonó y expresó una probable isoforma de las quitinasa de clase I de *H. brasiliensis*, la cual tiene una repetición de secuencia de 30 aminoácidos, correspondientes al carboxilo terminal del dominio heveína y al conector.

El sistema de expresión pET 32 a, *E. coli* Rosetta gami nos permitió obtener una proteína soluble, la cual presentó actividad catalítica de endo y exoquitinasa.

Se logró semipurificar a la rHev b 11 mediante técnicas cromatográficas, que permitieron tener una proteína con actividad catalítica, la cual conservó su estabilidad al ser separada de la tiorredoxina.

La quitinasa de clase I obtenida en este trabajo tiene una mayor identidad en secuencia a la isoforma Hev b 11.0102 obtenida de hojas de *H. brasiliensis* en comparación con la Hev b 11 obtenida del látex.

El segmento adicional encontrado en rHev b 11 no afecta su función catalítica y aparentemente tampoco su plegamiento.

PERSPECTIVAS

En este trabajo se obtuvo una enzima, que puede ser una isoforma de las quitinasas ya reportadas para *H. brasiliensis*, por lo que es importante comprobar que la secuencia obtenida no es un artefacto de biología molecular, aún cuando los productos se obtuvieron a partir de cDNA sintetizado con oligonucleótidos dT23, los cuales son específicos para la unión a RNAm, para lo cual necesitamos otras pruebas para asegurarnos de la presencia de dicho RNAm (Northern blot) y más aún comprobar la presencia de la proteína en las hojas de *H. brasiliensis*.

Se necesitan probar otros sistemas de expresión en los que se obtenga mayor cantidad de enzima recombinante soluble y plegada, mejorar las técnicas de purificación para aumentar los rendimientos de proteína expresada y realizar su caracterización, enzimática, estructural e inmunológica.

BIBLIOGRAFÍA

- Andersen MD, Jensen A, Robertus JD, Leah R, Skriver K (1979). Heterologous expression and characterization of wild-type and mutant forms of a 26 kDa endochitinase from barley (*Hordeum vulgare* L.) *Biochem J*, 322: 815-822.
- Arai N, Shiomi K, Yamaguchi Y, Masuma R, Iwai Y, Turberg A, Kolbl H, Omura S (2000). Argadin, a new chitinase inhibitor, produced by *Clonostachy* sp. FO. 7314. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 48:1442–1446.
- Banta JV, Bonanni C, Prebluda J (1993). Latex anaphylaxis during spinal surgery in children with myelomeningocele. *Rev Med Child Neurol*, 35(6):543-8.
- Blanco y cols (1999). Class I chitinases as potential panallergens involved in the latex-fruit syndrome. *J Allergy Clin Immunol*, 103 (3): 507-513.
- Banerjee B, W. X. (1997). IgE from latex-allergic patients binds to cloned and expressed B cell epitopes of prohevein . *J Immunol*, 159: 5724-5732.
- Blanco-Guerra C, Quirce-Gancedo (2002). *Alergia al látex*. Barcelona, España: mra ediciones.
- Blake CCF, Johnson LN, Mair GA, North ACT, Phillips DC, Sarma VR (1967). Crystallography studies of the activity of hen egg-white lysozyme. *Proc Roy Soc Ser B*, 167: 378-388.
- Brameld, K.A. and Goddard III, W.A. (1998). The role of enzyme distortion in the single displacement mechanism of family 19 chitinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95: 4276-428.
- Beezhold DH, K. D. (1997). IgE epitope analysis of the hevein preprotein; a major latex allergen. *Clin Exp Immunol* , 108: 114-121.
- Bernard, H. (1999). Clasification of chitinases modules. In R. A. Pierre Jollés, *Chitin and chitinases*. Switzerland: Birkhäuser Verlag.
- Boller, T. (1985). *In cellular and Molecular Biology of Plant Stress*. (K. T. Key JL, Ed.) New York: Alan R. Liss Inc.
- Carrillo T, Cuevas M, Muñoz T, Hinojosa M, Moneo I (1986). Contact urticaria and rhinitis from latex surgical gloves. *Contact Dermatitis*, 15(2):69-72
- Chang MM, H. D. (1995). Molecular cloning and characterization of a pea chitinase gene expressed in response to wounding, fungal infection and the elicitor chitosan . *Plant Mol Biol*, 28: 105-111.
- Cheng L, Lee D. (1999). Review of latex allergy. *J Am Board Fam Pract*, 12: 285-92.
- Chen Z, P. A. (1998). Identification of hevein (Hev b 6.02) in Hevea latex as a major cross-reacting allergen whit avocado fruit in patients whit latex allergy. *J Allergy Clin Immunol*, 102: 476-481.

Cruz-Camarrillo R, R.-A. L. (1999). Las quitinasas bacterianas y sus posibles aplicaciones biotecnológicas. In H.-O. S.-S.-C. Prado-Barragán LA, Tópicos en Biotecnología. Avances en purificación y Aplicación de Enzimas en Biotecnología (Primera Edición ed., pp. 287-314). México: Universidad Autónoma Metropolitana.

Dahiya N, T. R. (2006). Biotechnological aspects of chitinolytic enzymes: a review. *Appl Microbiol Biotechnol*, 71: 773-782.

Diaz-Perales A, C. C. (1998). Class I chitinases with hevein-like domain, but not class II enzymes, are relevant chestnut and avocado allergens. *J Allergy Clin Immunol*, 102: 127-133.

Díaz-Perales (1999). Cross-reactions in the latex-fruit syndrome: A relevant role of chitinases but not of complex asparagine-linked glycans. *J Allergy Clin Immunol*, 104: 681-687.

Fuentes-Silva D, R.-R. A. (2006). Endo-B-1,3-glucanasas reconocidas por anticuerpos tipo IgE de suero de pacientes alérgicos. *Alergia, Asma e Inmunología Pediátricas*, 15: 35-42.

Gayner, J. (1988). Primary structure of an endochitinase mRNA from *Solaneum tuberosum*. *Nucleic Acids Res*, 16: 5210.

Gidrol Xavier, Chresting H (1995). Hevein, a Lectin-like Protein from *Hevea brasiliensis* (Rubber Tree) Is Involved in the Coagulation of Latex. *The Journal of Biological Chemistry*, 269: 9278-9283.

Grutter MG, Weaver LH, Matthews BW (1983). Goose lysozyme structure: an evolutionary link between hen and bacteriophage lysozymes? *Nature* 303: 828-831.

Hadjiiladis D, Khan K, Tarlo SM. Skin test responses to latex in an allergy and asthma clinic. *J Allergy Clin Immunol* 1995; 96(3):431-2.

Hart PJ, Pflugger HD, Monzingo AF, Hollis T, Robertus JD. (1995). The refined crystal structure of an endochitinase from *Hordium vulgare* L. seeds at 1.8 Å resolution. *J Mol Biol*, 248: 402-413.

Henrissat, B. (1999). Classification of chitinases modules. In M. A. Jolles P (Ed.), *Chitin and Chitinases*. Switzerland: Birkhäuser Verlag Basel.

Huet J, Rucktooa P, Bernard C (2008) X-ray Structure of Papaya Chitinase Reveals the Substrate Binding Mode of Glycosyl Hydrolase Family 19 Chitinases. *Biochemistry*, 47 (32): 8283-8291.

Ikegami T, O. T. (2000). Solution Structure of the Chitin-binding Domain of *Bacillus circulans* WL-12 Chitinase A1. *Journal of Biological Chemistry*, 275: 13654-13661.

Iseli, B., Armand, S., Boller, T., Neuhaus, J-M. and Henrissat, B. (1996) Plant chitinases use two different hydrolytic mechanisms. *FEBS Lett*, 382: 186-188.

Janeway A, Travers P. (1996). *Immunobiology* (2da ed.). London: Current Biology Ltd.

- Jolles P, M. R. (1999). Chitin and chitinases. Birkhäuser Verlag, Basel.
- Kasprzewska, A. (2003). Plant chitinases-regulation and function. Cellular & Molecular Biology Letters, 8, 809-824.
- Kelly JA, Sielecki AR, Sykes BD, James MNG, Phillips DC (1979). X- ray crystallography of the binding of the bacterial cell wall trisaccharide NAM-NAG-NAM to lysozyme. Nature 282: 875-878.
- Kibby T, Akl M. (1997) Prevalence of latex sensitization in a hospital employee population. Ann Allergy Asthma Immunol, 78(1):41-4.
- Koga D, M. M (1999). Biochemistry of chitinases. In M. R. Jollés P, Chitin and chitinases (pp. 111-121). Switzerland .
- Lawrence P, Mark B (1996). Current perspectives on latex allergy. The Journal of Pediatrics 128, 305-311.
- Leah R, T. H. (1991). Biochemical and molecular characterization of three barley seed proteins whit antifungal properties . J Biol Chem , 226: 1564-1573.
- Matthwes BW, Grutter MG, Anderson WF, Remington SJ (1981). Common precursor of lysozymes on heg egg-white and bacteriophage T4. Nature 290: 334-335.
- Monzingo AF, Marcotte EM, Hart PJ, Robertus JD (1996). Quitinases, chitosanases and lysozymes can be divided into procaryotic and eucaryotic families sharing a conserved core. Nature Structure Biol, 3: 143-140.
- Negro-Álvarez JM, M.-L. J.-C.-S. (2003). Alergia al látex. Archivos de Alergia e Inmunología Clínica, 34: 28-35.
- Nel A, Gujuluva Ch. (1998) Latex antigens: identification and use in clinical and experimental studies including cross reactivity with food and pollen alergens. Ann Allergy Asthma & Immunol, 81: 388-389.
- Nutter, A. (1979). Contact urticaria to rubber. BR J Dermatol, 101 (5): 597-598.
- Orfan NA, Reed R, Dykewicz MS, Ganz M, Kolski GB. (1994) Occupational asthma in a latex doll manufacturing plant. J Allergy Clin Immunol, 94(5): 826-30.
- Ownby DR, O. H. (1996). The prevalence of anti-latex IgE antibodies in 1000 volunteer blood donors. J Allergy Clin Immunol, 97:1188-1192.
- Perrakis A, T. I. (1994). Crystal structure of a bacterial chitinase at 2.3 Å resolution . Structure, 2: 1169-1180.
- Petsonk EL. (2000). Couriers of asthma: antigenic proteins in natural rubber latex. Occup Med,15(2):421-30.
- Quirce Gancedo S. (2000) Alergia al látex. Alergol Inmunol Clin. 15 Supl 1: 89-96.

- Reyes-López C, H.-S. A.-E.-A.-R. (2004). Insights into a conformational epitope of Hev b 6. 02 (hevein). *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 314: 123-130.
- Reyes-López C, R.-R. A. (2002). Características bioquímicas y moleculares de alérgenos del látex de *Hevea brasiliensis*. *Alergia, Asma e Inmunología Pediátricas*, 11: 92-100.
- Rihs H P, D. B. (2003). Molecular cloning, purification, and IgE-binding of a recombinant class I chitinase from *Hevea brasiliensis* leaves (rHev b 11.0102). *Allergy*, 58: 246-251.
- Riordain G, R. C.-S. (2002). Cloning and molecular characterization of the *Hevea brasiliensis* allergen Hev b 11, a class I chitinase. *Clin Exp All*, 32: 455-462.
- Robertus Jon D, M. A. (1999). The structure and action of chitinases. In M. R. Jollés Pierre, *Chitin and chitinases* (pp. 125-133). Switzerland: Birkhäuser Verlag Basel.
- Romagnani, S. (2004). Immunological influences on allergy and the TH1/TH2 balance. *J Allergy Clin Immunol*, 113 (3): 395-400.
- Rossmann MG, Argos P (1976). Exploring structural homology of proteins. *J Mol Biol* 105: 75-96.
- Sahai AS, M. M. (1993). Chitinases of fungi and plants: their involvement in morphogenesis and host parasite interaction. *FEMS Microbiol Rev*, 11: 317-338.
- Samac DA, H. C. (1990). Isolation and characterization of the genes encoding basic and acidic endochitinase in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol*, 93: 907-914.
- Sánchez-Monge y cols. (1999). Isolation and characterization of major banana allergens: identification as fruit class I chitinases. *Clin Exp Allergy*, 29: 673-680.
- Slater JE. (1989) Rubber anaphylaxis. *N Eng J Med*, 320(17):1.126-30.
- Slater JE. Latex allergy. En: Kay AB, ed. *Allergy and allergic diseases*. Oxford: Blackwell Science, 1997; 981-93.
- Sowka S, H. L. (1998). Identification and cloning of Prs as I, a 32-kDa endochitinase and major allergen of avocado and its expression in the yeast *Pichia pastoris*. *J Biol Chem*, 273: 28091-28097.
- Stern G. (1927). Überempfindlichkeit gegen kaustchuk als Ursache von urticaria und quinckeschemodem. *Klin Wochenschrift*, 6: 1096-1097.
- Sutton BJ, G. H. (1993). The human IgE network. *Nature*, 366: 421-428.
- Tabudravu JN, Eijsink VA, Gooday GW, Jaspar M, Komander D, Legg M, Synstad B, Van-Aalten DM (2002) Psammaplin A, a chitinase inhibitor isolated from the Fijian marine sponge *Aplysinella rhex*. *Bioorg Med Chem* 10:1123–1128.

Taira T, Ohnuma T, Yamagami T, ASO Y, Ishiguro M, Ishihara M (2002) Antifungal activity of rye (*Secale cereale*) seed chitinases: the different binding manner of class I and class II chitinases to the fungal cell wall. *Biosci Biotechnol Biochem* 66:970–977.

Terwisscha van Scheltinga AC, H. M. (1996). The 1.8 Å resolution structure of hevamina, a plant chitinase/lysozyme and analysis of the conserved sequence and structure motifs of glycosyl hydrolase family 18 glycosyl . *J Mol Biol* , 262, 243-257.

Tews I, Scheltinga AC, Terwisscha V, Perrakis A, Wilson KS, Dijkstra BW (1997) Substrate assisted catalysis unifies two families of chitinolytic enzymes. *J Am Chem Soc* 119: 7954–7959

Turjanmaa K, Alenius H, Makinen-Kiljunen S, Reunala T, Palosuo T. (1996) Natural rubber allergy. *Allergy*, 51(9):593-602. 39.

Van Aalten, D.M.F., Komander, D., Synstad, B., Gåseidnes, S., Peter, M.G. and Eijsink, V.G.H. (2001) Structural insights into the catalytic mechanism of a family 18 exo-chitinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 8979-8984.

Van Loon, Van Strien (1999). The families of pathogenesis-related proteins, their activities and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiol Mol Plant Pathol*, 55: 85-97.

Zhao Kai-Jun and Chye Mee-Len. (1999). Methyl jasmonate induces expression of a novel *Brassica juncea* chitinase with two chitin-binding domains. *Plant Molecular Biology*. 40: 1009-1018.

ANEXOS

pET-32a-c(+) Vectors

TB122 12/98

	Cat. No.
pET-32a DNA	69015-3
pET-32b DNA	69016-3
pET-32c DNA	69017-3

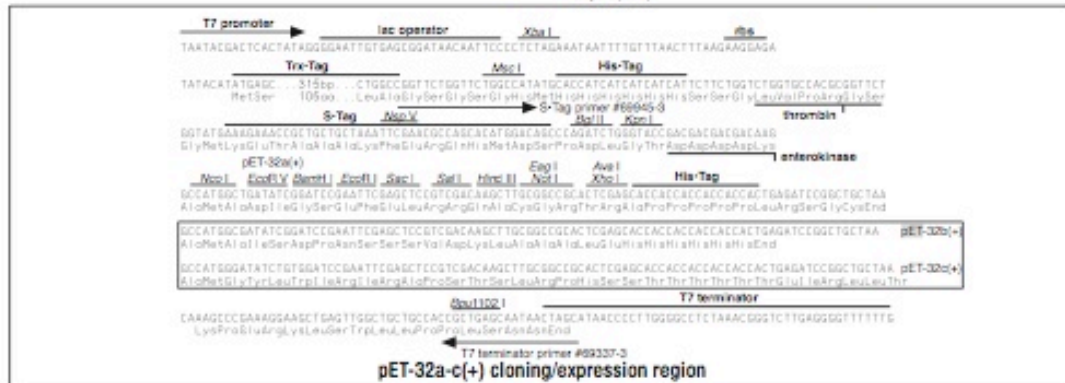
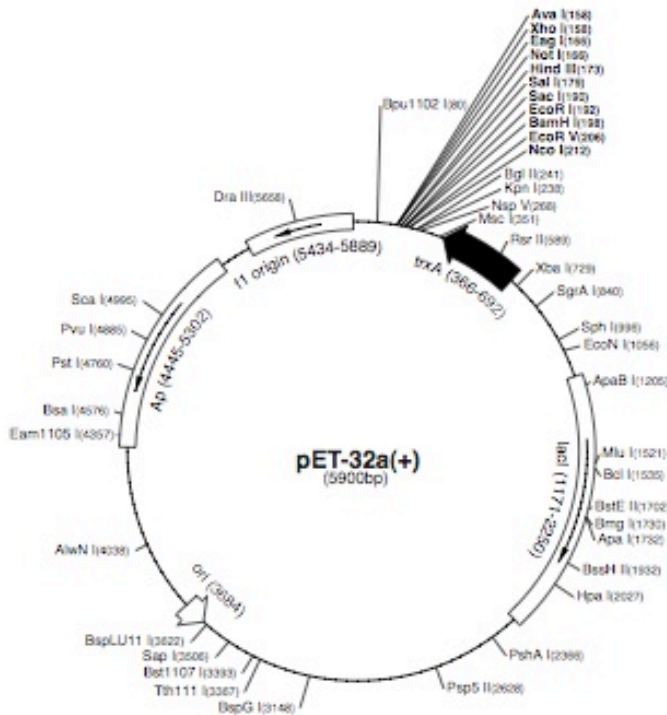
The pET-32 series is designed for cloning and high-level expression of peptide sequences fused with the 109aa Trx*Tag™ thioredoxin protein (1). Cloning sites are available for producing fusion proteins also containing cleavable His*Tag™ and S*Tag™ sequences for detection and purification. Unique sites are shown on the circle map. Note that the sequence is numbered by the pBR322 convention, so the T7 expression region is reversed on the circle map. The cloning/expression region of the coding strand transcribed by T7 RNA polymerase is shown below. The f1 origin is oriented so that infection with helper phage will produce virions containing single-stranded DNA that corresponds to the coding strand. Therefore, single-stranded sequencing should be performed using the T7 terminator primer (Cat. No. 69337-3).

1. LaValle, B.R., DiBiasio, E.A., Kovacic, S., Grant, K.L., Schendel, P.F. and McCoy, J.M. (1993) *BioTechnology* 11, 187-193.

pET-32a(+) sequence landmarks

T7 promoter	764-780
T7 transcription start	763
Trx*Tag coding sequence	366-692
His*Tag coding sequence	327-344
S*Tag coding sequence	249-293
Multiple cloning sites (Nco I - Xho I)	158-217
His*Tag coding sequence	140-157
T7 terminator	26-72
lacI coding sequence	1171-2250
pBR322 origin	3684
bla coding sequence	4445-5302
f1 origin	5434-5889

The maps for pET-32b(+) and pET-32c(+) are the same as pET-32a(+) (shown) with the following exceptions: pET-32b(+) is a 5899bp plasmid; subtract 1bp from each site beyond *Bam*HI at 198. pET-32c(+) is a 5901bp plasmid; add 1bp to each site beyond *Bam*HI at 198 except for *Eco*R V, which cuts at 209.



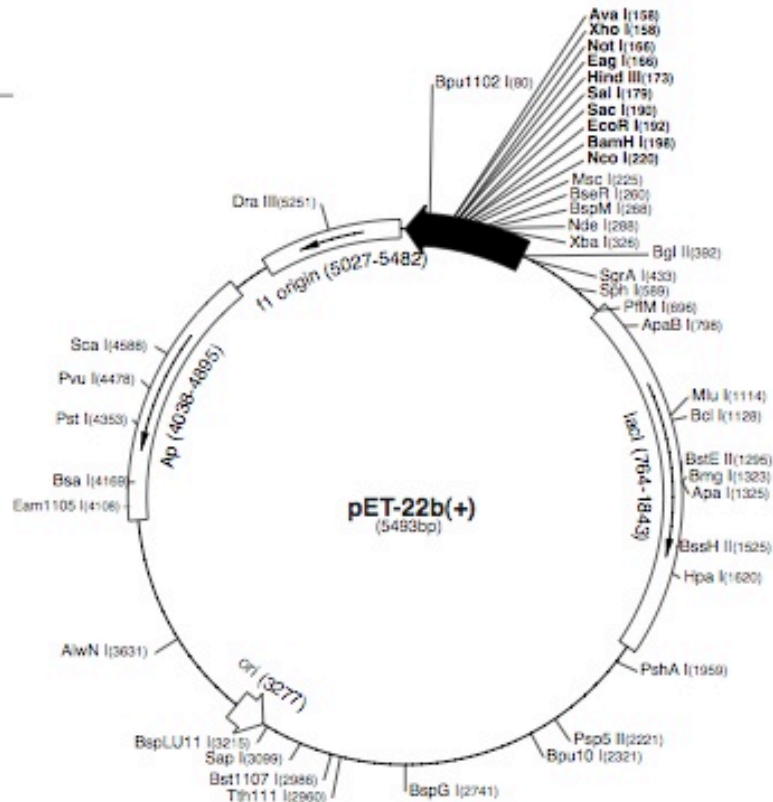
pET-22b(+)⁺ Vector

TB038 12/98

The pET-22b(+)⁺ vector (Cat. No. 69744-3) carries an N-terminal *pelB* signal sequence for potential periplasmic localization, plus optional C-terminal His•Tag[®] sequence. Unique sites are shown on the circle map. Note that the sequence is numbered by the pBR322 convention, so the T7 expression region is reversed on the circular map. The cloning/expression region of the coding strand transcribed by T7 RNA polymerase is shown below. The f1 origin is oriented so that infection with helper phage will produce virions containing single-stranded DNA that corresponds to the coding strand. Therefore, single-stranded sequencing should be performed using the T7 terminator primer (Cat. No. 69337-3).

pET-22b(+)⁺ sequence landmarks

T7 promoter	361-377
T7 transcription start	360
<i>pelB</i> coding sequence	224-289
Multiple cloning sites (<i>Nco</i> I - <i>Xho</i> I)	158-225
His•Tag coding sequence	140-157
T7 terminator	26-72
<i>lacI</i> coding sequence	764-1843
pBR322 origin	3277
<i>bla</i> coding sequence	4038-4895
f1 origin	5027-5482



pET-22b(+)⁺ cloning/expression region