



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

**PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS
BIOMÉDICAS**

**IDENTIFICACIÓN Y ANÁLISIS DE EPÍTOPOS
CONFORMACIONALES DEL PRINCIPAL
ALERGENO DEL LÁTEX, Hev b 6.02, POR
MEDIO DE ANTICUERPOS RECOMBINANTES**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS
P R E S E N T A:

María Martha Pedraza Escalona.

DIRECTOR DE TESIS:

Dra. Adela Rodríguez Romero.

México, D.F.

2008

Agradecimientos y dedicatorias

A mi querida Patria, que me da la oportunidad de realizar un sueño muy grande. Mi compromiso... eterno.

A mis amados Padres, que hoy se doctoran conmigo. Gracias por todo el esfuerzo y sacrificio; por su paciencia abismal, por su amor infinito, por su preocupación diaria. Sempiternas gracias.

A mi querido hermano Juan Francisco, gracias por apoyarme en todo momento, por darme fortaleza.

A mi David, gracias por creer en mí.

A Beatriz Escalona, gracias por estar siempre pendiente.

A la memoria de Josefina Longi de Pedraza, una mujer incansable.

A toda la gente que encontré en mi trayecto diario, gracias por ayudarme a llegar siempre a mi destino, por ser buenos conmigo; por ayudar a no rendirme.

A mí amada Universidad Nacional Autónoma de México, gracias siempre. En especial a todos los académicos y administrativos del Instituto de Química, del Instituto de Biotecnología y de la Facultad de Medicina; así como al Posgrado de Doctorado en Ciencias Biomédicas.

A la Dra. Adela Rodríguez Romero, gracias por permitirme realizar este trabajo. Gracias por toda la paciencia, el apoyo y sobre todo por confiar en mí.

A los miembros del jurado que revisaron ésta tesis, gracias por los comentarios y por las aportaciones.

A los miembros del comité tutorial Dr. Edgar Zenteno Galindo y Dr. Daniel Alejandro Fernández Velasco.

Al Dr. Baltazar Becerril Luján y al Dr. Edgar Zenteno Galindo por recibirme en sus laboratorios como uno de sus estudiantes. En especial a la Dra. Concepción Agundis Mata, gracias por la paciencia y por todo el apoyo.

Por ser fuente de inspiración y ejemplo de vida, gracias Dr. Lourival Possani-Postay.

A mis maestros prácticos, porque gracias a sus consejos y experiencia aprendí a amar cada día más mi trabajo. Gracias Dr. Ali Pereyra Morales, Dra. Verónica Quintero Hernández, Dra. Alejandra Hernández Santoyo, Dra. Elia Diego García, M. en C. Leopoldo Guereca Gurrola, M. en C. Timoteo Olamendi Portugal, Dr. Ernesto Ortiz Suri, Dra. Lidia Riaño Umbarila, Dra. Georgina Gurrola Briones, Dr. Fernando Zamudio y Dr. Lenin Domínguez-Ramírez.

A mis maestros teóricos, en especial a los profesores Rudolf Valenta y Rob Aalberse, porque en momentos de duda siempre me dieron como respuesta otra pregunta. Gracias por amar a los alérgicos y enseñarme sus secretos. Mi admiración y mi respeto a los científicos que se preocupan y dan su vida para ayudar a los demás.

A mis compañeros de los diferentes laboratorios, gracias por compartir las mesas de trabajo, los equipos, las ideas, la esperanza, los sueños y sobre todo las preguntas. Gracias Carlos, Juan José, Sandra, Genaro, Adrián, Lissette, Lucía, Lina, Mauricio, Itzel, Mary, Brenda, Santos, Pavel, Paty, Omar, Ricardo, Lidia G, Gina E, Cinthia, Verna, Rivelino, Miriam, Oscar, Nurit, Pablo, Citlalli, Luis, Linda, Cipriano, Rita, Rosalba, Marisol y Carmen.

Agradezco las becas financiadas por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, DGEP-UNAM y PAEP-UNAM.

Con especial cariño, gracias a mis anticuerpos, plásmidos y fagémidos, bacterias, hibridomas, ratones y conejos porque sin ellos no hubiera sido posible este trabajo.

ÍNDICE

Índice de figuras.....	6
Índice de tablas.....	7
Abreviaturas.....	8
Abstract.....	9
Resumen.....	10
1 INTRODUCCIÓN	
1.1 Mecanismos en el proceso alérgico.....	11
1.1.1 Concepto de alergia.....	11
1.1.2 Mecanismos generadores de la respuesta alérgica.....	12
1.1.3 Manifestaciones clínicas de la alergia.....	13
1.1.4 Hipótesis sobre el incremento de las enfermedades alérgicas.....	15
1.1.5 Características de los alérgenos proteicos.....	15
1.1.6 Reactividad cruzada.....	16
1.2 Caracterización molecular de la interacción alérgeno-anticuerpo.....	18
1.2.1 Estructura de anticuerpos.....	18
1.2.2 Inmunoglobulinas E.....	20
1.2.3 Interacción antígeno-anticuerpo.....	21
1.2.4 Interacción alérgeno-anticuerpo IgE.....	22
1.2.5 Determinación de epítomos lineales y conformacionales en alérgenos...	22
2 ANTECEDENTES	
2.1 Alergia al látex.....	24
2.2 Grupos de riesgo y prevalencia de la alergia al látex.....	26
2.3 Síndrome látex-fruta.....	27
2.4 Hev b 6.02, alérgeno principal del látex.....	28
2.5 Epítomos lineales y conformacionales de Hev b 6.02.....	30
3 JUSTIFICACIÓN	32
4 OBJETIVOS	33
5 MÉTODOS Y MATERIALES	34
6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
6.1 Selección de anticuerpos específicos a Hev b 6.02.....	42
6.2 Maduración de la afinidad del scFv M8.....	48

6.3 Ensayos de inhibición.....	51
6.4 Ensayos de fluorescencia.....	57
6.5 Modelado por homología y acoplamiento simulado de los complejos Hev b 6.02-scFvs.....	60
6.6 Interacción alérgeno-anticuerpo.....	60
7 CONCLUSIONES GENERALES.....	68
8 PERSPECTIVAS.....	70
9 REFERENCIAS.....	71
10 ANEXOS.....	86

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representación de los procesos de sensibilización y fase efectora de la Hipersensibilidad Tipo I.

Figura 2. Molécula de una inmunoglobulina IgG.

Figura 3. Representación esquemática de los dominios estructurales de los IgE e IgG humanos.

Figura 4. Alergenos de látex de hule natural implicados en el síndrome látex-fruta.

Figura 5. Procesamiento postraducciona l y secuencia de Hev b 6.02.

Figura 6. Representación de la estructura de Hev b 6.02.

Figura 7. Epít opos lineales y residuos específicos involucrados en el reconocimiento de Hev b 6.02 por IgEs de sueros de pacientes reportados hasta la fecha.

Figura 8. Reconocimiento de anticuerpos monoclonales murinos a Hev b 6.02 presentes en el sobrenadante de hibridomas por el método de ELISA.

Figura 9. Reconocimiento y reactividad cruzada de los anticuerpos monoclonales murinos 6D6 y 6E7 específicos para Hev b 6.02.

Figura 10. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de los tres scFv específicos a Hev b 6.02 seleccionados de un repertorio humano.

Figura 11. Alineamiento de secuencias de las V_H de los anticuerpos específicos a Hev b 6.02.

Figura 12. Alineamiento de secuencias de las V_L de los anticuerpos específicos a Hev b 6.02.

Figura 13. Modelos de los anticuerpos específicos a Hev b 6.02.

Figura 14. Comparación de los modelos de las cadenas ligeras del scFv A6 anti-Hev b 6.02 y el scFv anti-Phl p 5.

Figura 15. Reconocimiento de los scFv-fago anticuerpos anti-Hev b 6.02 por ELISA.

Figura 16. Ubicación de los cambios obtenidos después del proceso de maduración de M8.

Figura 17. Inhibición entre fragmentos variables de cadena sencilla.

Figura 18. Comparación de las secuencias entre variantes de Hev b 6.02.

Figura 19. Ubicación 3D de los cambios presentes en pseudoheveína y Hev b 6.0202.

Figura 20. Ensayos de inhibición por ELISA de la interacción Hev b 6.02-Abs recombinantes.

Figura 21. Ubicación de los residuos de Trp expuestos en disolución de Hev b 6.02.

Figura 22. Efecto en la fluorescencia intrínseca de los triptófanos de Hev b 6.02 al interactuar con los anticuerpos recombinantes en diferentes relaciones molares.

Figura 23. Gráficas de Stern-Volmer para los efectos en el apagamiento de Hev b 6.02 y sus complejos con anticuerpos recombinantes.

Figura 24. Modelos de la interacción entre los anticuerpos recombinantes y Hev b 6.02.

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Alergenos del NRL reportados por la IUIS a la fecha.

Tabla 2. Isotipo de algunas clonas productoras de anticuerpos específicos a Hev b 6.02.

Tabla 3. Comparación de las variaciones con respecto a la línea germinal de los genes de las cadenas pesadas y ligeras de los scFv específicos a Hev b 6.02.

Tabla 4. Identificación de los cambios en los residuos de aminoácidos ocurridos durante cada ciclo de evolución realizado a la clona M8.

Tabla 5. Porcentaje de inhibición de la interacción Hev b 6.02-IgE por anticuepos recombinantes.

Tabla 6. Porcentaje de inhibición máxima de algunos anticuerpos bloqueadores reportados en la literatura.

Tabla 7. Cuadro comparativo de las características en las interacciones Ab recombinante-Hev b 6.02.

Tabla 8. Residuos involucrados en los epítomos lineales y conformacionales de Hev b 6.02.

Tabla 9. Cuadro comparativo de las características de las interacciones alergeno-anticuerpo reportadas hasta el momento.

ABREVIATURAS

Å	Ángstrom
Ab	Anticuerpo
Ag	Antígeno
ASA	Área accesible al disolvente
BSA	Albúmina de suero bovino
CD	Célula dendrítica
CDR	Región determinante de la complementariedad
C_H	Región constante de la cadena pesada
C_L	Región constante de la cadena ligera
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
Fab	Fragmento de unión al antígeno
GM-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos
IL	Interleucina
MHC	Complejo Mayor de Histocompatibilidad
NK	Célula Natural Killer
NRL	Natural rubber latex (Látex de hule natural)
scFv	Fragmento variable de cadena sencilla
TCR	Receptor de linfocitos T
V_H	Región variable de la cadena pesada
V_L	Región variable de la cadena ligera

Abstract

Hev b 6.02 (hevein), identified as a major allergen from natural rubber latex, is involved in the latex-fruit syndrome and also acts as a pathogenesis defense-related protein. Its 3D structure has been solved at high resolution, and its linear epitopes have already been reported. However, information about conformational epitopes is still controversial, even though it is relevant for the study of allergen–antibody molecular interactions. This work is focused on the structural characterization of putative B-cell epitopes of Hev b 6.02 based on molecular modelling and *in vitro* experiments using recombinant antibodies. We obtained a murine monoclonal antibody (mAb 6E7) and three anti-Hev b 6.02 human single chain fragments (scFvs A6, H8 and G7) that were able to compete for hevein binding with serum IgEs from latex allergic patients. A synergistic blocking effect of tested antibodies was observed, indicating that they may bind to different regions of the Hev b 6.02 surface. *In vitro* assays showed that the mAb 6E7 and scFv H8 recognized the area of Hev b 6.02 where the aromatic residues are exposed; while the scFv G7 bound the amino and carboxy-terminal regions that lie close to each other, as a different epitope. The structural modelling of the Hev b 6.02–scFv H8, Hev b 6.02–scFv A6 and Hev b 6.02–scFv G7 complexes revealed the putative regions of three conformational epitopes. In one of these, the aromatic residues, as well as polar side chains are important for the interaction, suggesting that they are part of a dominant conformational epitope also presented on the Hev b 6.02–IgE interactions. Identified antibodies could be useful for diagnostic and therapeutic studies, as well as for the treatment of latex allergy.

Resumen

Este trabajo es enfocado en la caracterización estructural de los epítomos putativos conformaciones del principal alergeno del látex Hev b 6.02, basado en modelaje molecular y experimentos *in vitro* utilizando anticuerpos recombinantes. Obtuvimos un anticuerpo monoclonal murino (mAb 6E7) y tres fragmentos variables de cadena sencilla (scFvs A6, H8 and G7) específicos a Hev b 6.02 que son capaces de competir por la unión de Hev b 6.02 con las IgEs de suero de pacientes. Encontramos un efecto bloqueador sinergista en presencia de varios anticuerpos juntos, indicando que ellos reconocen regiones diferentes de la superficie de este alergeno. Los experimentos *in vitro*, los cuales se centran en inhibiciones por ELISA y experimentos de fluorescencia muestran que los anticuerpos 6E7 y H8 reconoce el área donde los triptófanos están expuestos al disolvente; mientras que el anticuerpo scFv G7 reconoce la región amino y carboxilo-terminal, las cuales se encuentran cercanas, estableciendo a este como un epítomo diferente. Los modelos estructurales del acoplamiento entre los complejos Hev b 6.02-scFv H8 y Hev b 6.02-scFv G7 revelaron las regiones putativas de los dos epítomos conformacionales. En uno de ellos, los residuos aromáticos, así como algunos residuos polares son importantes para la interacción, sugiriendo que estos forman parte de un epítomo conformacional también presente en la interacción de Hev b 6.02-IgE. Los anticuerpos identificados en este trabajo pueden ser herramientas esenciales para el diagnóstico, así como para el tratamiento contra la alergia al látex.

1 INTRODUCCIÓN

1.1 MECANISMOS EN EL PROCESO ALÉRGICO

1.1.1 CONCEPTO DE ALERGIA

El sistema inmune humano presenta un alto grado de organización celular y molecular en la defensa contra sustancias extrañas (antígenos). Sin embargo, puede presentar alteraciones que generan mecanismos de respuesta exagerada o adversa al propio individuo. Dentro de este tipo de respuestas se encuentran las reacciones de hipersensibilidad (clasificadas por Coombs y Gell en Tipos I a VI), en las cuales se desarrolla una respuesta inmune inadecuada contra algunas sustancias extrañas, o inclusive, contra aquellas que no debieran ser consideradas como tales^{1,2,3}. La alergia (del griego *allos ergo*, reacción alterada) o hipersensibilidad inmediata (Tipo I) se manifiesta contra una cierta clase de antígenos denominados alergenos, ya sea proteínas o haptenos (fármacos), los cuales se caracterizan por interactuar con inmunoglobulinas de tipo E (IgE). La manifestación clínica de esta respuesta depende de factores como la predisposición genética, la vía de entrada del alergeno y el ambiente en el cual se encuentra el individuo⁴.

1.1.2 MECANISMOS GENERADORES DE LA RESPUESTA ALÉRGICA

La fase de sensibilización, periodo en el cual se producen anticuerpos IgE's específicos para cada alérgeno, inicia desde el primer contacto de estos con el organismo. Recientemente se ha observado que los alérgenos al entrar a un organismo interaccionan con receptores tipo Toll, sobre todo TLR-2, localizados en la superficie de células presentadoras de antígeno (APC), como las células dendríticas (CD) y células NK (natural killers) maduras⁵.

Estas células 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 (MHC-II). Dicho complejo es presentado a receptores de linfocitos T vírgenes (TCR), que una vez unidos en presencia de moléculas co-estimuladoras activan cascadas de señalización en el linfocito T CD4⁺, provocando la liberación de citocinas como Interleucina 4 (IL-4) e Interleucina 10 (IL-10). Estas estimulan la inducción de la respuesta de células especializadas en la defensa contra patógenos extracelulares, también llamadas células T helper tipo 2 (Th2)⁶.

Las condiciones que favorecen la respuesta de células Th2 permiten la expresión de un grupo de genes codificados en el cromosoma humano 5q31-33 dando lugar a la liberación de más y mayor cantidad de citocinas, tales como IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 y IL-13, así como al factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), las cuales favorecen la proliferación de mastocitos, basófilos y eosinófilos^{7, 8, 9}. Los linfocitos B son estimulados por las IL-4 e IL-13 en forma soluble, así como por CD40L, presente en la superficie de los linfocitos T, que al interaccionar con sus receptores específicos (IL-4R, IL-13R y CD40, respectivamente) sinergizan la expansión clonal, la diferenciación a células plasmáticas y el cambio de isotipo hacia la producción de anticuerpos IgE^{8, 23}.

Los individuos atópicos (del latín *a + topos*, "sin lugar", "desubicado") presentan una predisposición genética a reaccionar ante la estimulación de concentraciones bajas de alérgenos, generando una respuesta parcial de células B y no de centros germinales

maduros, observándose que el cambio de isotipo a IgE se produce en grandes cantidades¹⁰.

El fragmento cristalizante (Fc) de estas IgE's se encuentra mayoritariamente anclado a la superficie de células cebadas (mastocitos), basófilos, monocitos, en células dendríticas y células de Langerhans por receptores de alta afinidad específicos (FcεRI)^{7,10}. Por otra parte, estas inmunoglobulinas también se encuentran en la superficie celular de linfocitos B, a través de los receptores de baja afinidad FcεRII y CD23^{11, 12, 13}. En el momento que dos moléculas de IgE, ancladas a receptores de alta afinidad, reconocen estructuralmente a un alérgeno o a alérgenos multivalentes se desencadena la activación de mastocitos, basófilos y eosinófilos, por medio de cascadas de señalización. Estas derivan en la producción de citocinas IL-3, IL-4, GM-CSF y factores de crecimiento¹⁴, así como en la desgranulación, en tejidos específicos, de mediadores como histamina, prostaglandinas y leucotrienos, enzimas como triptasa y quimasa, neuropéptidos y productos del rompimiento de factores del complemento, los cuales en conjunto generan la respuesta inmediata de la alergia^{8, 15}. La interacción alérgeno-IgE-FcεRI también conduce a la proliferación y diferenciación de células B en células plasmáticas especializadas para la producción de IgE's circulantes específicas contra dicho alérgeno (Ver Figura 1)¹⁷.

1.1.3 MANIFESTACIONES CLÍNICAS DE LA ALERGIA

Las manifestaciones inmediatas de la hipersensibilidad tipo I se obtienen a través de la liberación de histamina, prostaglandina y otros mediadores preformados, los cuales se unen a receptores específicos ubicados en las células endoteliales vasculares ocasionando vasodilatación, contracción del músculo liso, hipersecreción mucosa y edema (ver Figura 1)¹⁶. El tipo de manifestación clínica así como su severidad dependerán de la vía de entrada y de la sensibilidad de cada individuo. Por lo cual, los síntomas de una respuesta alérgica pueden ser hinchazón, secreción mucosa e irritación del tracto respiratorio para aquellos alérgenos que ingresan al organismo por vía aérea, mientras que se presentan urticaria local, aparición de ronchas y dermatitis para alérgenos que penetran por membranas mucosas o piel. En ocasiones muy severas se presentan cuadros agudos (choques anafilácticos) que pueden ocasionar la muerte¹.

La respuesta inmediata da paso al desarrollo de una fase tardía que se produce de ocho a doce horas después de la exposición del alérgeno, ya que el reclutamiento de basófilos, eosinófilos y células Th2 en el sitio de reacción causan una segunda fase de contracción del músculo liso, provocando edema y bloqueo de las vías aéreas superiores, manifestaciones clínicas del asma. Una exposición continua al alérgeno puede generar una respuesta crónica inflamatoria, claramente observada en la dermatitis atópica y en el asma alérgico-crónico¹⁰.

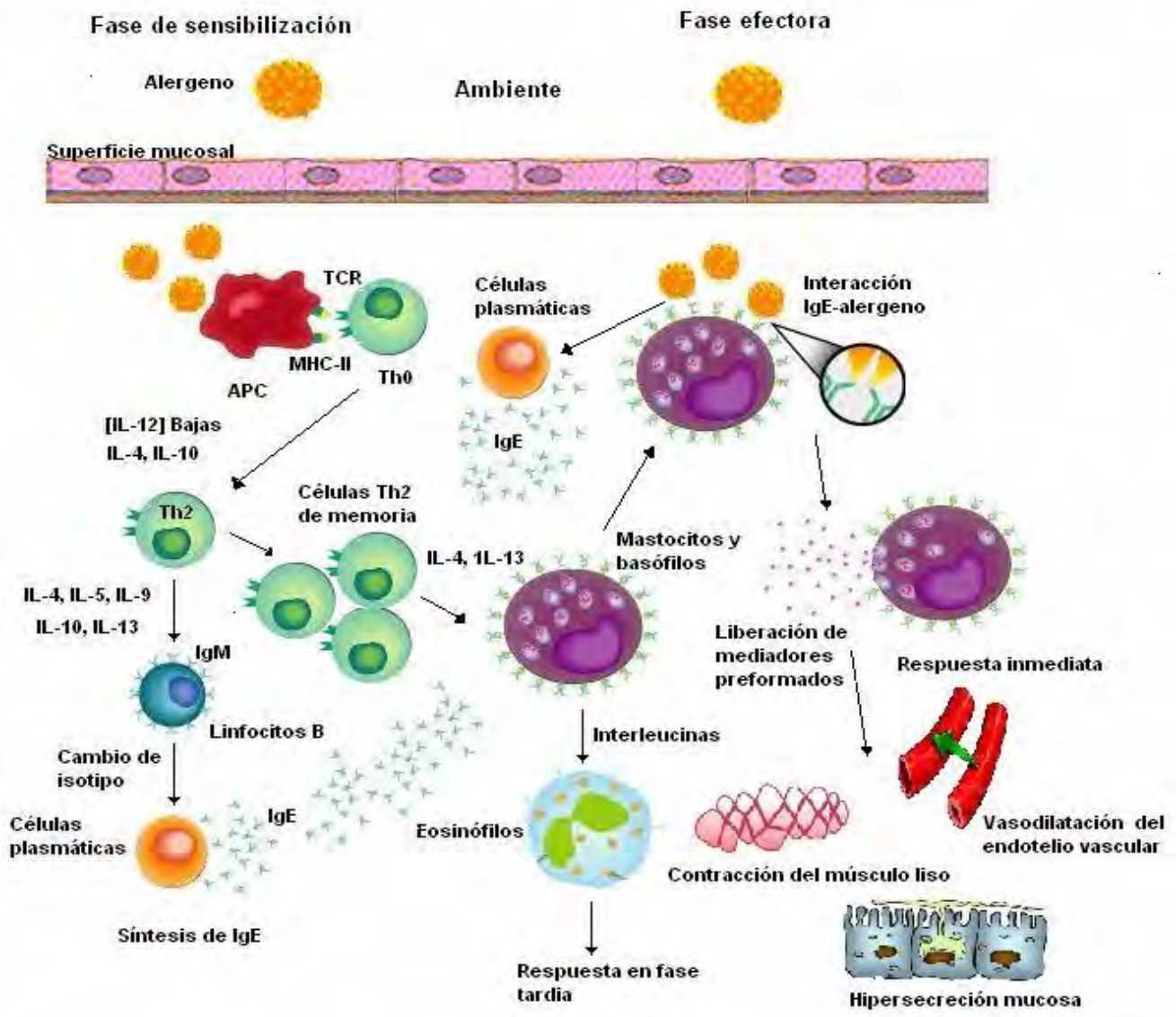


Figura 1. Representación de los procesos de sensibilización y fase efectora de la Hipersensibilidad Tipo I

1.1.4 HIPÓTESIS SOBRE EL INCREMENTO DE LAS ALERGIAS

Actualmente existen reportes donde se indica que los alérgenos afectan a casi 500 millones de personas en el mundo, la mayoría ubicados en países industrializados, con un aumento significativo en años recientes sobre todo en países en vías de desarrollo¹⁸. Existen tres hipótesis que explican el por qué de este aumento. La primera, denominada “hipótesis de la higiene o de la selva”, indica que la falta de exposición a agentes infecciosos y a endotoxinas durante los dos primeros años de vida inhiben la estimulación de células mononucleares (CD y NK), a través de receptores tipo Toll, desencadenando una elevación de la respuesta TH2⁹. La segunda llamada “hipótesis de la microflora” establece que la perturbación de la flora intestinal normal a causa del uso exagerado de antibióticos y la incorporación de alimentos industrializados en la dieta disminuyen la tolerancia inmunológica e incrementa las enfermedades alérgicas¹⁹. La última hipótesis denominada “de la contaminación ambiental” establece que varios contaminantes como las partículas suspendidas de diesel, polvo de guantes o el humo del tabaco son capaces de cambiar la respuesta de células T al patrón de secreción Th2¹⁸.

1.1.5 CARACTERÍSTICAS DE LOS ALERGENOS PROTEICOS

Actualmente existen 7 bases de datos sobre alérgenos proteicos, destacando la base SDAP (Structural Database of Allergenic Proteins), la cual contiene la secuencia de 737 alérgenos e isoalérgenos y la información sobre las estructuras tridimensionales de 45 de ellos, reportados en el PDB^{20, 21}. Los alérgenos son nombrados de acuerdo a su origen taxonómico, las primeras tres letras describen al género, seguidas por la primera letra de la especie y un número arábigo, el cual es designado consecutivamente según su aparición como alérgeno. Los isoalérgenos (variantes de un mismo alérgeno) se nombran con un punto y números consecutivos después del nombre del alérgeno²².

La Organización Mundial de la Salud, junto con la Unión Internacional de las Sociedades de Inmunólogos, ha creado la base de datos oficial donde cada alérgeno nuevo es reportado estableciendo su origen e importancia²². Esta consideración se realiza con base en la prevalencia de cada alérgeno, es decir el porcentaje de individuos

alérgicos sensibilizados al mismo. Los alérgenos clasificados como “principales” son aquellos presentan una prevalencia de hasta el 50% en poblaciones alérgicas.

Los alérgenos proteicos reportados hasta el momento provienen de fuentes muy diversas, inclusive de origen humano; sin embargo, se han clasificado de acuerdo a algunas características comunes, como su actividad biológica (proteínas relacionadas a la patogénesis, enzimas, proteínas que unen calcio o transportan lípidos, etc.), su estabilidad por resistencia a proteasas o a agentes desnaturizantes (presencia de puentes disulfuro o modificaciones postraduccionales, etc.) o presencia de motivos estructurales comunes^{24, 25}.

En 1998 se realizó el primer análisis comparativo de las escasas estructuras tridimensionales de alérgenos reportadas en el PDB (Protein Data Bank), estableciendo de manera muy general que todas ellas presentaban una forma más esférica que elíptica²⁶. Estudios posteriores dieron lugar a una clasificación basada en la estructura secundaria de 40 proteínas alérgicas provenientes de diversas fuentes, proponiéndose cuatro familias estructurales definidas: tipo hélice α , hebras β antiparalelas, hojas β antiparalelas asociadas íntimamente a hélices α y hojas β antiparalelas-hélices α poco asociadas²⁷. Furmonaviciene y col. (2001) establecieron al motivo α - β estabilizado por una cisteína como una familia estructural predominante en algunos alérgenos²⁸. No obstante, hasta el momento no se ha demostrado que la presencia de características estructurales específicas defina a un alérgeno como tal, únicamente se ha propuesto que sus propiedades intrínsecas estén relacionadas con la capacidad de inducir una respuesta TH2 e interactuar con IgE's²⁹.

1.1.6 REACTIVIDAD CRUZADA

Dos alérgenos presentan reactividad cruzada solo si comparten características estructurales similares, lo que hace que sean reconocidos por anticuerpos IgE de sueros de pacientes que se han producido por sensibilización hacia alguno de los dos. Es interesante mencionar que en la mayoría de los casos, todos los alérgenos que presentan reactividad cruzada tienen un plegamiento similar, con más del 70% de identidad en la secuencia de aminoácidos; sin embargo, alérgenos con plegamiento similar pueden no

mostrar reactividad cruzada²⁷.

En 2001, la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Organización para el Alimento y la Agricultura (FAO) propusieron que una proteína es potencialmente alergénica si presenta una identidad mínima del 35% en un intervalo de 80 aminoácidos comparada con un alérgeno conocido y al menos 6 aminoácidos idénticos contiguos, además se debe confirmar la estabilidad de la proteína y su unión a las IgEs^{30, 31, 32}.

El intervalo de valores para las constantes de afinidad de la interacción Ab-Ag varía de 10^3 a 10^{10} M^{-1} , lo cual corresponde a una diferencia máxima de energía libre de aproximadamente 40 kJ mol^{-1} . Esto implica que dos alérgenos homólogos que presentan pequeñas diferencias en el número de interacciones con anticuerpos IgE de pacientes, por ejemplo, puentes de hidrógeno (con energías de $2\text{-}8 \text{ kJ mol}^{-1}$) pueden hacer no detectable la unión con alguno de los dos³³; de ahí que alérgenos con plegamiento similar pero con diferencias en la secuencia de aminoácidos puedan no presentar reactividad cruzada.

1.2 CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LA INTERACCIÓN ALERGENO-ANTICUERPO

1.2.1 ESTRUCTURA DE ANTICUERPOS

Los anticuerpos o inmunoglobulinas son proteínas producidas por células B plasmáticas que tienen una estructura común de cuatro cadenas peptídicas. Esta estructura se forma de dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) idénticas. Las cadenas pesadas poseen entre cuatro (IgG, IgD e IgA) y cinco (IgM e IgE) dominios de acuerdo a su isotipo; en la parte amino terminal se encuentra la región variable (VH) seguida de tres o cuatro regiones constantes (CH's). Las cadenas ligeras presentan solo un dominio variable (VL) y un dominio constante (CL) (Figura 2). Los dominios constantes varían de tres a cuatro dependiendo el isotipo de la inmunoglobulina, algunos de estos dominios muestran los sitios de unión a receptores específicos presentes en la superficie de varios tipos celulares.

El entrecruzamiento es decir, la unión entre antígeno-anticuerpo-receptor-célula permite la activación celular específica para llevar a cabo funciones diferentes, es por eso que la parte constante que se une a los receptores se conoce como parte efectora, mientras que los dominios variables son los que están involucrados en el reconocimiento al antígeno³⁴. Cada dominio consta de siete (constante) o nueve (variable) hebras β empacadas en forma de un sándwich de hoja β y cada una de estas estructuras se asocia de manera no covalente con su contraparte similar para formar un barril β antiparalelo. En el caso específico de la asociación de los dominios VL y VH, la Cys214 de la VL forma un puente disulfuro con la Cys229 de la VH³⁵. Esta asociación permite que seis asas, denominadas regiones determinantes de la complementariedad (CDRs), generen el sitio de reconocimiento a antígeno o regiones hipervariables. Tres asas provienen del dominio VL (L1, L2 y L3) y tres del dominio VH (H1, H2 y H3), y todas ellas son flanqueadas por regiones muy conservadas denominadas marco o framework (Figura 2)³⁶. Los CDRs muestran la tasa de variabilidad más grande con respecto a las demás regiones de un anticuerpo, tanto en secuencia como en el número de aminoácidos, generando gran diversidad química para el reconocimiento potencial de muchas estructuras antigénicas de diferentes fuentes. Las diferencias de especificidad y

afinidad que poseen los anticuerpos se deben esencialmente a las variaciones en las regiones variables. Los CDRs con mayor variabilidad son H3 y L3, que están ubicados en el centro del sitio de unión al antígeno³⁷.

Los linfocitos B desarrollan rearrreglos entre el repertorio de genes involucrados en construir la región variable de la cadena pesada genes denominados de variabilidad, diversidad y unión (VDJ) y la región variable ligera conformada por los genes de variabilidad y unión (VJ), ubicados en el cromosoma 14, 2 y 22, respectivamente, antes de la exposición al antígeno. En el repertorio de la línea germinal existen 50 genes V, 27 genes D y 6 genes J³⁸ para la cadena pesada; 40 genes para las variables ligeras K y 5 genes JK^{39,40}. Para las V λ hay 30 genes con sus correspondientes cuatro genes J λ . Los procesos de recombinación entre dichos genes y entre las regiones variables permite generar una diversidad de 10⁹ variantes de anticuerpos⁴¹. Cuando los anticuerpos expuestos en la superficie de las células B reconocen a su antígeno, ocurren varios fenómenos que desencadenan la hipermutación somática y la recombinación del cambio de isotipo. Esto permite el aumentando de la afinidad por su antígeno, para que éste sea reconocido con mayor rapidez en un segundo encuentro (respuesta secundaria)^{42,43}.

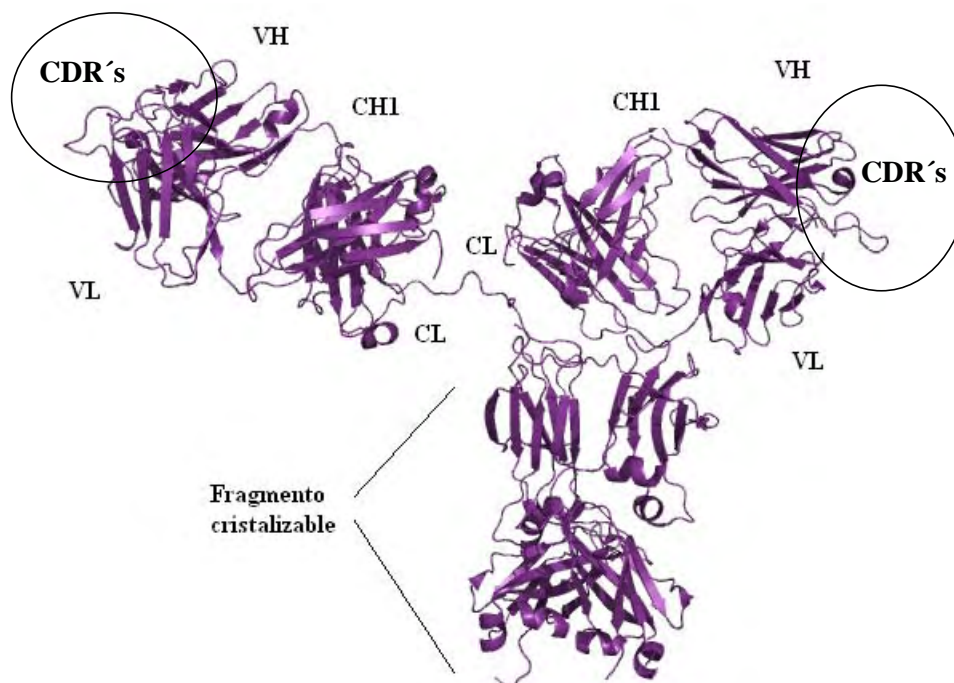


Figura 2. Molécula de una inmunoglobulina IgG (Código PDB: 1HZH). Se muestra el fragmento cristalizable y las regiones constantes (C) y variables (V) de los fragmentos de unión al antígeno. CH1 y VH corresponden a la cadena pesada, CL y VL corresponden a la cadena ligera. Las regiones determinantes de la complementariedad (CDR's) se muestran dentro de un círculo.

1.2.2 INMUNOGLOBULINA E

Ishizaka e Ishizaka en 1967 descubrieron a la IgE, involucrándola en la respuesta alérgica, así como en la respuesta a infecciones por parásitos⁴⁴. Estas tienen un peso aproximado de 190 kD y no atraviesan la barrera placentaria⁷; consisten de dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas epsilon (ϵ), las cuales se encuentran plegadas en dominios constante (C) y variable (V)⁴⁵. Las cadenas pesadas ϵ presentan cuatro dominios constantes (C ϵ 1-C ϵ 4), uno más que las cadenas γ de las inmunoglobulinas tipo G, este dominio extra (C ϵ 2) se localiza en la región bisagra del fragmento cristalizante, aportando menos flexibilidad a esta inmunoglobulina (Figura 3)^{46, 47}.

La parte efectora y diferencial de estas inmunoglobulinas es el dominio C ϵ 3, el cual se une a dos tipos de receptores: los de alta afinidad (10^{-10} M) Fc ϵ RI, formados por un tetrámero transmembranal $\alpha\beta\gamma_2$, y los de baja afinidad (10^{-8} M) Fc ϵ RII, que son lectinas tipo C. Esta interacción se lleva a cabo en relación estequiométrica 1:1, es decir, el dominio C ϵ 3 se une a la cadena α de un tetrámero Fc ϵ RI^{7, 10}. Este sitio efector no está involucrado en la formación del sitio de reconocimiento al alérgeno, por lo cual la recombinación y formación de los CDR's es totalmente independiente, implicando que anticuerpos de otro isotipo pueden reconocer sitios similares o iguales a los que reconocen estas inmunoglobulinas.

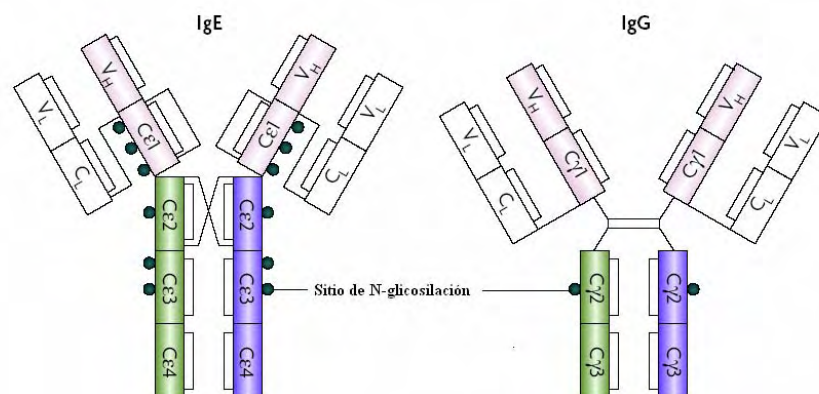


Figura 3. Representación esquemática de los dominios estructurales de los IgE e IgG humanos. Los puentes disulfuro se muestran por conexiones y los sitios N-glicosilados se representan por pequeños círculos verdes.

1.2.3 INTERACCIÓN ANTÍGENO-ANTICUERPO

Las proteínas presentan determinantes antigénicos llamados epítomos, los cuales son reconocidos por anticuerpos (epítomos de células B) o por los receptores de células T TCR (epítomos de células T). Los segmentos de la cadena polipéptica que interactúan con TCR son llamados epítomos lineales y aquellos arreglos conformacionales que son reconocidos por anticuerpos son denominados epítomos discontinuos⁴⁸. Estos últimos están localizados en diferentes posiciones de la secuencia lineal, pero muy cercanos si la proteína se encuentra en su forma plegada, razón por la cual se les ha denominado epítomos conformacionales o estructurales. En general los epítomos de este tipo ocupan superficies irregulares de hasta 1000 \AA^2 que comprende de 15 a 22 residuos que hacen contacto con la superficie molecular del anticuerpo (parátomo); sin embargo, sólo algunos átomos de tres a cinco residuos de cada parte contribuyen a la energía de la interacción, lo que permite la definición de un epítomo funcional o energético, considerado más pequeño que el epítomo estructural^{33, 49}. La energía de unión de la interacción antígeno-anticuerpo se establece por un gran número de contactos de baja energía (interacciones de van der Waals y puentes de hidrógeno) y muy pocos contactos de alta energía (puentes salinos), además de un acomodo de complementariedad entre el epítomo y el parátomo⁵⁰.

Los primeros estudios realizados sobre la interacción Antígeno-Anticuerpo revelaron la presencia de residuos predominantes en los CDR's, tales como Asn e His⁵¹. Sin embargo, estudios del carácter químico de dicha interacción muestran que el 51% de la superficie accesible al disolvente en ambos lados es hidrofóbica⁵². Desde el punto de vista termodinámico, la presencia de residuos hidrofóbicos favorece la energía libre y la entalpía de asociación^{53, 54}. Los residuos presentes en el parátomo que reaccionan con el antígeno en mayor porcentaje son Tyr, Trp y Arg, seguidos de Ser, y Asn, y en menor proporción residuos cargados como Asp, Glu o Lys^{55, 56}. Los residuos Tyr y Trp se encuentran significativamente más expuestos al disolvente en comparación con otros residuos hidrofóbicos como Val, Ile y Leu⁵¹. La Tyr ofrece una gran superficie hidrofóbica con posibilidad de establecer interacciones π aromáticas y puentes de hidrógeno con su grupo 4-hidroxilo; mientras el Trp es capaz de formar interacciones de

transferencia de carga, por puentes de hidrógeno, apilamiento π - π y contactos de Van der Waals⁵⁶. Por su parte la Ser presenta cadena lateral polar no cargada con grupos beta-oxhidrilo los cuales le permiten formar puentes de hidrógeno; la Arg tiene 3 átomos de carbono-metilenos hidrofóbicos y un grupo guanidinio que puede contribuir con enlaces de hidrógeno y puente salinos y por último la Asn, la cual no es cargada pero es en extremo polar, permitiéndole formar puentes de hidrógeno con átomos de las cadenas laterales de otros aminoácidos polares.

1.2.4 INTERACCIÓN ALERGENO-ANTICUERPO IgE.

Para el caso de los alergenicos proteicos, las primeras observaciones establecieron que los segmentos hidrofílicos expuestos en la superficie, así como regiones de alta movilidad y flexibilidad como asas y los sitios amino y carboxilo terminales son altamente alergénicos^{57, 58, 186}. Sin embargo, otros grupos de investigación han demostrado que la alergenicidad se establece por la existencia de zonas clave, que sin importar tamaño o estructura poseen una serie de aminoácidos de naturaleza hidrofóbica expuestos en la superficie⁶⁰⁻⁶³. En 1994 Droupadi y col. establecieron que residuos hidrofóbicos, específicamente residuos aromáticos son el blanco ideal de la interacción con anticuerpos IgE, ya que estos últimos presentan un alto porcentaje de residuos aromáticos ubicados en los CDRs⁵⁹. Recientemente se han descrito algunas interacciones alergenico-anticuerpo gracias a la cocrystalización de estos, aunque los resultados son pocos, se establece la presencia de algunos residuos aromáticos en las zonas de reconocimiento^{63, 148, 151, 185}.

1.2.5 DETERMINACIÓN DE EPÍTOPOS LINEALES Y CONFORMACIONALES EN ALERGENOS

Los primeros experimentos que se llevan a cabo en la determinación de los epítopos involucrados en el reconocimiento por las IgEs de sueros de pacientes alérgicos son la generación de péptidos sintéticos sobrelapantes que cubren la longitud completa del alergenico, o bien, se utilizan mutantes puntuales a partir de proteínas recombinantes^{64, 66}. Aunque ninguna de estas técnicas permite una identificación completa de los epítopos de un alergenico, son un buen paso inicial para la detección de los fragmentos peptídicos

que manifiestan una interacción con la IgE similar a la que presenta el alérgeno completo. La etapa siguiente consiste en encontrar anticuerpos específicos que de manera individual reconozcan sitios similares a los que reconocen las IgEs de suero de pacientes, para que por competencia se defina que ambos anticuerpos reconocen a un mismo epítipo ya sea total o parcialmente. De esta forma se determina indirectamente a los residuos involucrados en la interacción alérgeno-anticuerpo y puesto que la respuesta humoral de IgEs es policlonal se requiere generar baterías de anticuerpos que inhiban el mayor número de epítopos presentes en cada alérgeno.

2 ANTECEDENTES

2.1 ALERGIA AL LÁTEX

El látex es el citoplasma de células especializadas conocidas como laticíferas, siendo su función natural sellar sitios dañados en la superficie del árbol. Este material está compuesto por el hidrocarburo cis-1,4 poliisopreno (25-45%), proteínas (1-2%), carbohidratos (1-2%), lípidos (1-1.5%) y algunos componentes inorgánicos como potasio, manganeso, calcio, sodio, zinc y hierro⁶⁷. El látex del árbol del hule natural *Hevea brasiliensis* (NRL, por sus siglas en inglés) presenta propiedades elásticas y aislantes que lo hacen la materia prima principal para la elaboración de productos hospitalarios y de uso comercial tales como guantes, condones, pelotas, catéteres, etc⁶⁸. En el proceso de recolección, el látex es tratado con amoníaco, tiuramos o sulfuros para prevenir la contaminación bacteriana y evitar su coagulación. La porción líquida es separada por centrifugación, generando tres fracciones distintas, la superior que contiene las partículas de hule, la fracción central o suero C que contiene proteínas hidrosolubles y la fracción inferior rica en lutoides y de donde se obtienen el suero B,

rico en proteínas ácidas y básicas. En procesos posteriores de manufactura se agregan otros químicos concentrados, como catalizadores (tiuramos y carbamatos) y antioxidantes (como fenilendiamino), dicha mezcla es sometida finalmente al proceso de vulcanización con el fin de aumentar su tensión, fuerza, elasticidad y durabilidad⁶⁹⁻⁷¹.

El término ‘alergia al látex’ es aplicado a las reacciones alérgicas producidas por el látex de hule natural, del cual se obtienen más de 40,000 productos de consumo general. Los guantes de látex son los productos que más frecuentemente se asocian con problemas de sensibilización y alergia; ya sea, a través del contacto con la mucosa respiratoria o con la piel, o por la inhalación de partículas proteicas adheridas al polvo de los guantes y suspendidas en el aire⁷². El uso de guantes de hule se vio incrementado a finales de la década de los 80’s en respuesta a la prevención de enfermedades de transmisión por fluidos corporales como hepatitis y SIDA⁷³. La absorción de las proteínas del látex a través de la piel es considerada la principal ruta de sensibilización y es responsable de las manifestaciones locales de urticaria, las cuales se pueden volver sistémicas. La inhalación de las partículas dispersas en el aire son capaces de accionar síntomas respiratorios, nasales y oculares (como tos y congestión nasal); en pacientes sensibilizados se manifiesta rinitis, conjuntivitis y asma, hasta problemas severos como anafilaxis sistémica, taquicardia, angioedema, nausea, vómito e hipotensión⁷⁴.

Las manifestaciones clínicas de la alergia al látex, que corresponden a la hipersensibilidad tipo I, son ocasionadas por la interacción de anticuerpos IgE con proteínas alergénicas del látex y son considerados un problema de salud pública a nivel mundial; tan sólo en el 2001 se presentaron 2.3 millones de reportes de estadounidenses alérgicos al látex⁷⁵. Hasta el momento, el Subcomité de Nomenclatura de Alergenos de la IUIS ha asignado nombres oficiales a 13 alergenos y 24 isoalergenos en productos elaborados con NRL, los cuales no son eliminados aún durante el proceso de lavado y vulcanización a altas temperaturas (Tabla 1)^{76,77}.

Cabe señalar que las manifestaciones clínicas de la sensibilidad al látex no sólo son la hipersensibilidad de tipo I, también la dermatitis irritante por contacto y la dermatitis alérgica por contacto. La dermatitis por contacto es una respuesta inflamatoria a uno o más agentes externos que se comportan como irritantes de la piel sin que intervengan

mecanismos inmunológicos. Por su parte, la dermatitis alérgica por contacto o hipersensibilidad tipo IV es una respuesta inmune mediada por linfocitos T hacia sustancias químicas, como catalizadores, antioxidantes y mercaptobenzotiazol que son agregados en el proceso de vulcanización⁷⁵.

Tabla 1. Alergenos del NRL reportados por la IUIS a la fecha⁷⁷.

Nombre común	Nomenclatura	Peso molecular (kDa)	pI	Importancia como alergeno
Factor de elongación	Hev b 1	58	4.9	mayor
Endo1,3-glucanasa	Hev b 2	36	9.5	mayor
Proteína de la partícula pequeña del hule	Hev b 3	24	4.8	mayor
Lecitinasa	Hev b 4	50-57	4.5	mayor
Proteína ácida	Hev b 5	16	3.5	mayor
Precursor de heveína	Hev b 6.01	20	5.06	mayor
Heveína	Hev b 6.02	4.7	4.9	mayor
Fragmento C-terminal de heveína	Hev b 6.03	14	6.4-7.4	mayor
Patatina	Hev b 7	42/ 46	4.8	menor
Profilina	Hev b 8	13.9	4.9	menor
Enolasa	Hev b 9	51	5.6	menor
MnSOD	Hev b 10	22.9	6.3	menor
Quitinasa clase I	Hev b 11	33	5.1	menor
Proteína transportadora de lípidos	Hev b 12	9.3	-	-
Esterasa	Hev b 13	42	-	-

2.2 GRUPOS DE RIESGO Y PREVALENCIA DE LA ALERGIA AL LÁTEX.

El diagnóstico de la alergia al látex está basado en una detallada historia clínica y en pruebas *in vivo* positivas, tales como pruebas cutáneas prick (*skin prick test*). La determinación y cuantificación *in vitro* de anticuerpos IgE específicos contra proteínas alergénicas de NRL no siempre se asocia con cuadros clínicos de alergia.

Las personas más afectadas por este tipo de alergia debido al contacto prolongado y reiterado con productos del látex son:

1. Profesionales al cuidado de la salud (HCW por sus siglas en inglés)
2. Pacientes con espina bífida
3. Pacientes que han sufrido cirugías en el primer año de vida
4. Pacientes que han sufrido cirugías múltiples.
5. Pacientes con malformaciones urogenitales
6. Individuos atópicos
7. Trabajadores de la industria del látex⁶⁹.

La prevalencia en la población mundial oscila de 1 a 12%, 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%⁷⁸. Hev b 2, 5, 6.01 y 13 son los principales alérgenos en los pacientes al cuidado de la salud y en aquellos con espina bífida se agrega a esta lista Hev b 1, Hev b 6.02 y Hev b 3⁷⁹. En nuestro país desafortunadamente no existen reportes amplios al respecto, sólo estudios aislados en Chihuahua y Puebla^{80, 81}.

2.3 SÍNDROME LÁTEX- FRUTA.

Algunas sensibilizaciones a aeroalérgenos mediadas por IgE están asociadas a una variedad de hipersensibilidades alimentarias. Esta asociación clínica debida a la reactividad cruzada entre dos diferentes fuentes de alergia se le ha nombrado como síndrome⁸². Se ha observado que aproximadamente de 30 a 50 % de los pacientes alérgicos al látex de hule natural muestran hipersensibilidad a alimentos derivados de plantas, especialmente frutas frescas, por lo cual esta asociación se ha definido como síndrome látex-fruta⁸³. Las frutas implicadas en esta asociación se han clasificado en tres tipos: 1) aquellas que sólo se asocian por las manifestaciones clínicas, 2) aquellas en las que además de las manifestaciones clínicas existe caracterización de reactividad cruzada de los componentes por ensayos de inhibición de extractos y 3) aquellas en las que además de las manifestaciones clínicas existe la caracterización de reactividad cruzada por alérgenos específicos⁸⁴. En el último lugar de esta clasificación se encuentran involucrados cinco alérgenos de látex: Hev b 2, Hev b 6.02, Hev b 7, Hev b 8 y Hev b 12, los cuales se asocian con proteínas que presentan características similares

en diferentes frutas (Figura 4)⁸⁵.

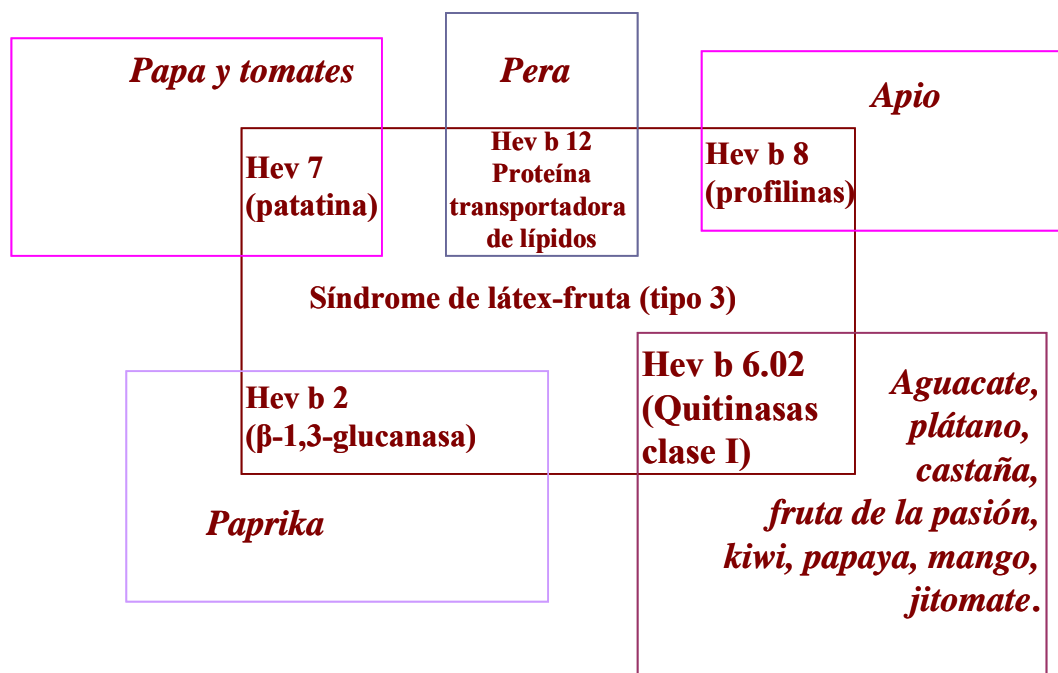


Figura 4. Alérgenos específicos (clasificación de tipo 3) de látex de hule natural implicados en el síndrome látex-fruta.

En años recientes se ha demostrado que este síndrome es ocasionado principalmente por las quitinasas de clase I, clasificadas como proteínas relacionadas con la defensa a patógenos (PRP) tipo 3 y 4. Estas presentan dominios N-terminales de unión a quitina tipo heveína. Quitinasas presentes en el mismo látex (Hev b 11), aguacate (Pers a 1), plátano, castaña (Cas s 5), chirimoya, fruta de la pasión, kiwi, papaya, mango y jitomate presentan reactividad cruzada con Hev b 6.02 (heveína)⁸⁶⁻⁹¹. Este alérgeno presenta la mayor prevalencia y es el más abundante (75 nmol/mg total de proteína) en el látex^{92, 93}.

2.4 Hev b 6.02, ALERGENO PRINCIPAL DE LÁTEX

La heveína (Hev b 6.02) es una cadena polipéptica resultado del rompimiento enzimático por procesos postraduccionales de la proheveína (Hev b 6.01), ambas provenientes del suero B del látex de hule natural. Hev b 6.02 es una lectina de 43 residuos de aminoácidos (4728 Da), rica en glicinas y cisteínas, las cuales forman cuatro puentes disulfuro, que le dan gran estabilidad estructural a dicha proteína^{94, 95} (Figura 5).

Cabe mencionar, que algunas lectinas, como la lectina de papa (*Solanum tuberosum*)¹⁸⁷ reaccionan inespecíficamente con los carbohidratos (quitobiosas) presentes en el fragmento constante de los anticuerpos IgE y pueden inducir síntomas de tipo alérgico al permitir la liberación de histamina; sin embargo, para el caso de Hev b 6.02 se ha demostrado IgEs que reconocen específicamente a esta proteína⁹⁶.

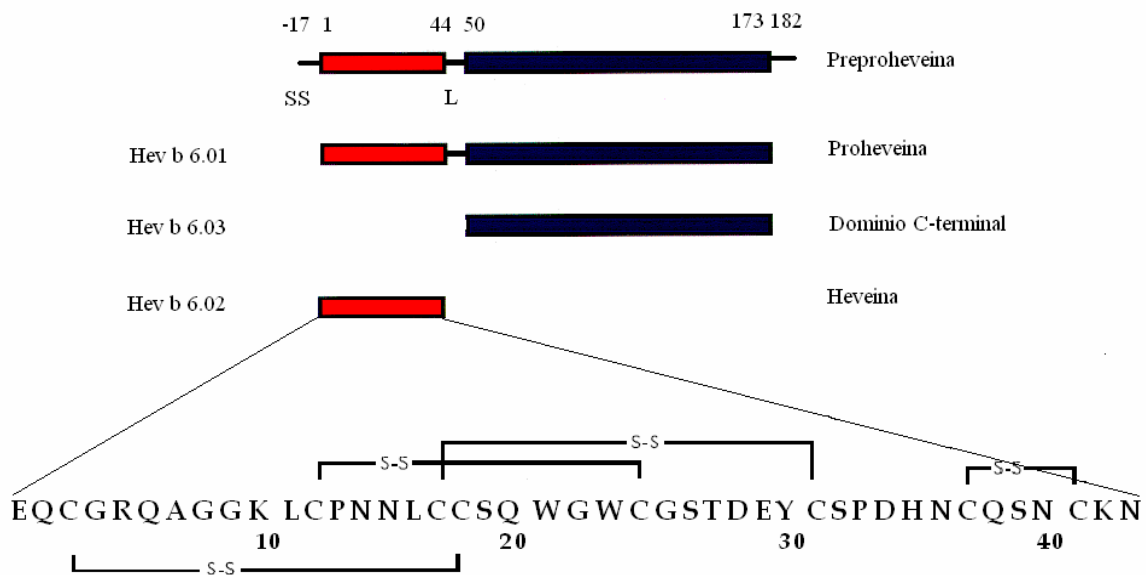


Figura 5. Procesamiento postraduccional y secuencia de Hev b 6.02. Este alergeno es el producto maduro de tres rompimientos proteolíticos. El primer rompimiento involucra la pérdida del péptido señal amino terminal de 17 aminoácidos; el segundo involucra la escisión del fragmento carboxilotermino, el cual dirige a la proheveína (Hev b 6.01) hacia los cuerpos luteales. El tercer rompimiento se da por la degradación del péptido de 6 aminoácidos que une Hev b 6.02 (dominio amino-terminal) con Hev b 6.03 (dominio carboxilo-terminal)⁹⁴. Además se muestra la localización de los puentes disulfuro en la secuencia de Hev b 6.02.

La función celular de la heveína se relaciona con la respuesta de la planta contra agentes infecciosos o daños físicos, debido a su capacidad de unir oligosacáridos de N-acetilglucosamina. Cuando esta proteína es liberada de los luteales, estructuras vacuolares presentes en el látex, interactúa con receptores altamente glicosilados (de aproximadamente 22 kD) que envuelven a las partículas del hule y provocan su coagulación con el objeto de evitar la entrada del patógeno^{69, 97}. El plegamiento tipo toxina-aglutinina de Hev b 6.02 (Figura 6), no presenta centros hidrofóbicos característicos de proteínas pequeñas, lo que la hace exponer residuos aromáticos en su

superficie.

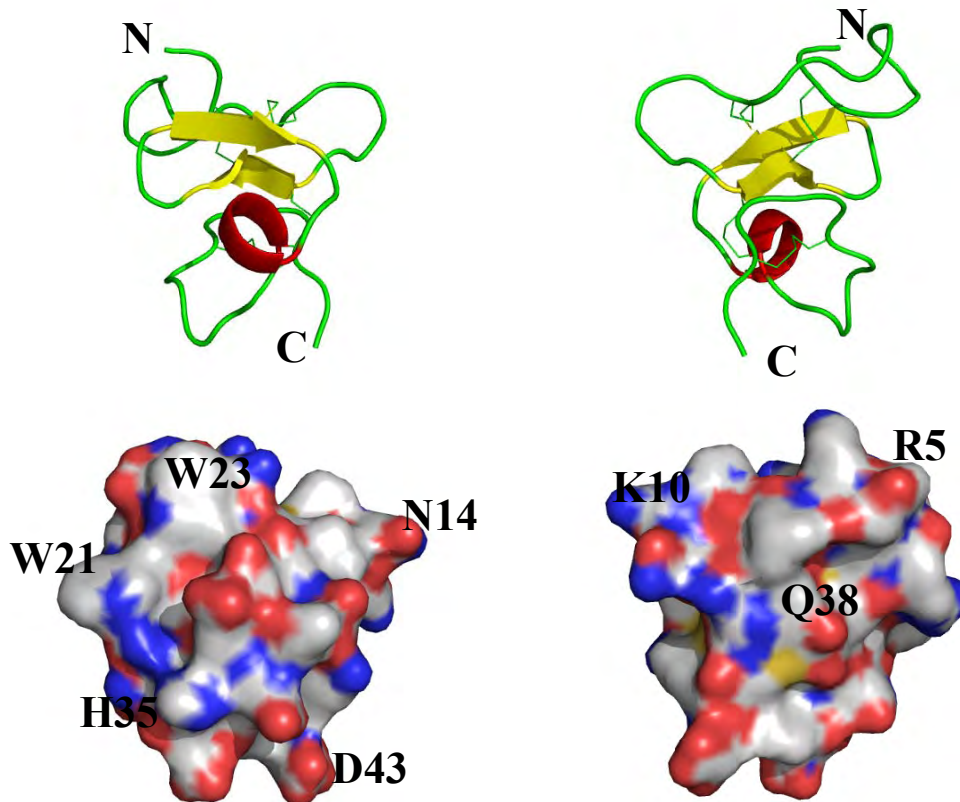


Figura 6. Representación de la estructura 3D de Hev b 6.02¹⁰³. Las vistas se muestran en rotación de 180°. En la estructura secundaria de este alérgeno las asas se observan en color verde, las hebras betas en amarillo y la pequeña hélice alfa en rojo. Se muestra la superficie y algunos residuos importantes que serán discutidos a lo largo del trabajo.

2.5. EPÍTOPOS LINEALES Y CONFORMACIONALES DE Hev b 6.02

Estudios inmunológicos realizados en pacientes alérgicos a Hev b 6.02, muestran discrepancia en la determinación de los epítopos que son reconocidos por los anticuerpos IgE de suero de pacientes. Dos grupos de investigación en forma paralela reportaron la presencia de dos epítopos lineales similares de tamaño diferente, utilizando decapeptidos sintéticos. Beezhold y col. (1997) identificaron al primer epítipo del residuo 13 al 24 (PNNLCCSQWGWC) y al segundo epítipo del residuo 29 al 36 (EYCSPDHN)⁹⁸; por su parte, Banerjee y col. (1997) identificaron a los residuos 19 al 24 (SQWGWC) como el primer epítipo y a los residuos 25 a 37 (GSTDEYCSPDHNC) como el segundo⁹⁹.

En contraste, a pesar de su pequeño tamaño, la presencia de epítomos conformacionales ha sido reportada en años recientes por tres grupos de investigación (ver Figura 7). Karisola y col. (2002), utilizando una quimera con diferentes segmentos de esta molécula, establecieron que las regiones N- y C- terminales son esenciales para la unión a IgE's de sueros de pacientes, destacando a seis residuos (R5, K10, E29, Y30, H35 y Q38)^{100,101}. Raulf- Heimsoth y col. (2004) reportaron dos mutantes de este alérgeno, en la primera cambiaron los ocho residuos Cys por Ser y en la segunda por Ala, en ambos casos las IgE's de suero de pacientes no reconocieron a estas mutantes, confirmando la presencia de epítomos estructurales en Hev b 6.02⁷². Drew y col. (2004) observan que mutaciones en una y cuatro de las ochos cisteínas presentes en Hev b 6.02 disminuyen el porcentaje de inhibición de 20 a 100%, respectivamente¹⁰². En un trabajo paralelo, nuestro grupo de investigación realizó una oxidación química específica de los residuos de triptófano expuestos en la superficie, W21 y W23, con 3-BNPS-skatole, produciendo un alérgeno modificado que mostró una disminución en el porcentaje de inhibición de cerca del 80%¹⁰³. Recientemente, encontramos una isoforma natural de heveína, Hev b 6.0202, la cual presenta un solo cambio N14D, y muestra una disminución del porcentaje de inhibición cercano al 25% utilizando pool de suero de pacientes pediátricos y del 30% en pool de pacientes adultos¹⁰⁴.



Figura 7. Epítomos lineales y residuos específicos involucrados en el reconocimiento de Hev b 6.02 por IgEs de sueros de pacientes reportados hasta la fecha. a) Beezhold et al. (1997), b) Banerjee et al. (1997), c) Karisola et al. (2004), d) Reyes-López et al. (2004), e) Drew et al. (2004), f) Raulf- Heimsoth et al. (2004), g) Reyes-López et al. (2006) y h) de Silva et al. (2004). Este último reporta los epítomos lineales reconocidos por células T.

3 JUSTIFICACIÓN

El conocimiento de los residuos específicos que son cruciales en la interacción alérgeno-anticuerpo establecen las bases moleculares para la comprensión de la Hipersensibilidad Tipo I y para el diseño racional de variantes hipoalérgicas útiles en la inmunoterapia. Si bien los anticuerpos IgE monoclonales humanos serían los agentes ideales para la determinación de los epítomos conformacionales de un alérgeno, su concentración en suero es la más baja de los cinco isotipos y tienen una vida media de uno a cinco días en torrente sanguíneo¹⁰⁵. Por otra parte, las monoclonas de IgE son difíciles de obtener experimentalmente, aún partiendo de bancos de anticuerpos de individuos alérgicos, pues los métodos utilizados generan anticuerpos combinatoriales, que no son los originados *in vivo*. Por tal motivo, los anticuerpos específicos producidos por técnicas *in vitro*, como la producción de hibridomas y el despliegue en fago filamentoso son ampliamente utilizados^{106, 107}. Ambas herramientas permiten la identificación de epítomos conformacionales de manera individual y específica, además estos Abs han demostrado ser herramientas ideales en el diagnóstico y caracterización de la potencia alérgica, así como fuente de aplicación para la inmunoterapia alérgeno-específico^{108, 109}. Una de las características ideales que deben presentar estos anticuerpos es la capacidad de inhibir la interacción IgE-alérgeno, ya que permiten de esta forma analizar indirectamente los epítomos conformacionales.

Por todas las ventajas antes mencionadas, la elaboración de anticuerpos específicos a uno de los principales alérgenos del látex de hule natural, Hev b 6.02, ha sido el reto de trabajo de varios grupos de investigación, ya sea creando anticuerpos monoclonales contra la proheveína¹⁰² o fragmentos variables de cadena sencilla contra heveína recombinante¹¹⁰. En el primer caso, los anticuerpos monoclonales no fueron bloqueadores y en el segundo esta característica no se determinó. En el presente estudio se seleccionaron anticuerpos inhibidores de la interacción IgE-Hev b 6.02, a través de las dos técnicas antes mencionadas, permitiendo la identificación y caracterización de los epítomos conformacionales presentes en Hev b 6.02.

4 OBJETIVO GENERAL

Identificación de los epítomos de unión a IgE presentes en Hev b 6.02, a través de la utilización de anticuerpos recombinantes bloqueadores.

4.1 OBJETIVOS PARTICULARES

Producción, selección, purificación y caracterización de anticuerpos monoclonales murinos específicos a Hev b 6.02 por medio de la producción de hibridomas, así como de las secuencias de los fragmentos variables de cadena sencilla (scFv's) humanos específicos a Hev b 6.02 por medio de la técnica de despliegue en fago filamentoso.

Evolución dirigida de los scFvs anti-Hev b 6.02, por medio de la técnica error prone-PCR, así como la determinación y evaluación de las secuencias evolucionadas de scFv anti-Hev b 6.02.

Caracterización inmunológica y fisicoquímica de la interacción Hev b 6.02-anticuerpos recombinantes

Determinación de la capacidad inhibitoria de los anticuerpos recombinantes a la interacción Hev b 6.02-IgE de suero de pacientes.

Modelado de los fragmentos variables de cadena sencilla anti Hev b 6.02 y determinación *in silico* de las interacciones presentes en los complejos Hev b 6.02-anticuerpos recombinantes.

5 MÉTODOS Y MATERIALES

5.1 PURIFICACIÓN DE ALERGENOS DEL LÁTEX

La purificación de Hev b 6.02 se llevó a cabo según el protocolo reportado por Rodríguez-Romero y col (1991)¹¹¹, Hev b 6.0202 según Reyes-López y col (2006)¹⁰⁴, pseudoheveina y la heveína modificada fueron purificadas según Reyes-López y col (2004)¹⁰³.

5.2 CARACTERIZACIÓN DE LOS SUEROS DE PACIENTES ALÉRGICOS A Hev b 6.02

Un total de 40 sueros de pacientes alérgicos al látex (donados por el Instituto Nacional de Pediatría de la Ciudad de México) fueron utilizados, 20 sueros provenientes de pacientes adultos (trabajadores al cuidado de la salud) y 20 de pacientes pediátricos. Estos pacientes presentaron historia clínica de alergia al látex y pruebas cutáneas positivas, se demostró su reactividad a Hev b 6.02 en pruebas de ELISA con señales más altas que el promedio mas tres veces la desviación estándar de los sueros de

individuos no alérgicos.

5.3 PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS MONOCLONALES ANTI-Hev b 6.02

Hev b 6.02 fue acoplado covalentemente a albúmina sérica bovina (BSA) utilizada como acarreador¹¹². Cuatro ratones hembra BALB/c fueron inmunizados por vía i.p. tres veces con 10 µg de Hev b 6.02-BSA en adyuvante completo de Freund. Después de obtener altos títulos de anticuerpos contra este alérgeno, se procedió a fusionar las células de bazo (1.35×10^7) con células de mieloma murino Sp2/0-Ag14 (Sp2) en razón 10:1 en presencia de polietilenglicol (PEG 1500). Se seleccionaron las células híbridas según Kolher y Milstein^{113, 114}. La presencia de los anticuerpos anti-Hev b 6.02 producidos en el sobrenadante de cultivo fue determinada por ELISA directa. Después se procedió a la clonación por el método de dilución limitante de las clonas con mayor título. El isotipo de los anticuerpos obtenidos fue determinado por ELISA sandwich. Los hibridomas fueron inyectados intraperitonealmente, junto con pristano, a ratones hembra BALB/c para la obtención de líquido de ascitis a los 30 días posteriores a la inyección. Se utilizó sobrenadante del cultivo celular Sp2 como testigo negativo y suero de conejo anti-Hev b 6.02 como control positivo.

5.4 PURIFICACIÓN DE ANTICUERPOS Y FRAGMENTOS DE ANTICUERPOS MONOCLONALES

Mediante el uso de columnas de proteína A y G (HiTrap, Amersham, Biosciences), que tienen alta afinidad por el fragmento Fc de los anticuerpos se procedió a la purificación de estos a partir de líquido de ascitis y sobrenadante celular. Con el objeto de obtener los fragmentos de unión al antígeno (Fab) se procedió a la digestión de los anticuerpos con papaína, siguiendo el protocolo de Harlow y Lane¹¹⁴. La concentración de anticuerpo presente en cada muestra fue medida asumiendo que 1 mg/mL = 1.4 unidades de absorbancia a 280 nm en celda de 1 cm.

5.5 SELECCIÓN DE FRAGMENTOS VARIABLES DE CADENA SENCILLA (scFv) ANTI-Hev b 6.02

Siguiendo la técnica de despliegue en la superficie de fagos filamentosos (sistema de fagémidos) descrita por Smith¹¹⁵⁻¹¹⁸, se seleccionaron fragmentos variables de cadena sencilla específicas a Hev b 6.02 a partir de un banco de 1.1×10^8 variantes de origen humano no inmune¹¹⁹. Cada secuencia de scFv (de 800 pb aproximadamente) se encuentra flanqueada por los sitios de restricción Sfi I y Not I e insertada en el fagémido Psyn2, el cual presenta el gen de resistencia a ampicilina y el gIII, el cual codifica para la proteína III de la cápside del fago filamentosos. Se realizaron diversas estrategias de selección y después de cada ronda de tamizaje, se procedió a la titulación y recuperación de los fago-anticuerpos según Marks y colaboradores (1991)¹²⁰. Posterior a la tercera o cuarta ronda en cada estrategia se realizó una selección de los fago-anticuerpos anti Hev b 6.02 mediante pruebas de ELISA directa.

5.6 EVOLUCIÓN DIRIGIDA.

La clona M8 fue sometida a mutagénesis al azar con tasas de mutagenicidad baja, alta y media por medio de la técnica de error-prone PCR^{121, 122}. Los productos de PCR fueron digeridos con Sfi I y Not I (Biosciences, England), purificados y ligados en fagémidos pSyn2, los cuales fueron transformados en la cepa TG1 de *E. coli*. El tamaño de la librería formada, así como la tasa de mutación, fueron determinadas según Cirino y col¹²³. Cada nueva librería fue sometida a tres o cuatro rondas de tamizaje. Las secuencias de las clonas mutagenizadas fue determinada con los primers directo (5'ATA CCT ATT GCC TAC GCC 3') y reverso (5'TTT CAA CAG TCT ATG CGG 3') en un secuenciador Applied Biosystems Modelo 3100.

5.7 EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE LOS FRAGMENTOS VARIABLES DE CADENA SENCILLA

Las secuencias de scFv's anti Hev b 6.02 fueron subclonadas en el vector de expresión Psyn1, el cual permite la expresión periplásmica de los anticuerpos fusionada a un epítopo cmc y a una cola de seis histidinas bajo el control del operón de lactosa. Los scFv en forma soluble se produjeron de acuerdo a los protocolos desarrollados por Schier y col¹²⁴. Adicionalmente, como último paso de purificación se utilizó una columna de filtración en gel Superdex 75 XK16/70 (Amersham Biosciences). La

concentración de scFv en cada muestra fue determinada a través del coeficiente de extinción molar estimado teóricamente con el servidor ProtParam (<http://ca.expasy.org/tools/protparam.html>) para cada uno de los anticuerpos obtenidos.

5.8 PRUEBAS IN VITRO

5.8.1. ELISA (enzyme linked immunosorbent assay)

En placas de poliestireno se adicionaron 100 µl/pozo de Hev b 6.02 a una concentración de 3 µg/mL en amortiguador de carbonatos 50 mM toda la noche a 4 °C. Se bloqueó con leche descremada en polvo al 5% w/v en PBS, caseína al 1% en PBS o albúmina sérica bovina al 1% en PBS durante 2 hrs a 37°C. Después de lavar tres veces con PBS-Tween 1% se incubaron a 37 °C por 90 minutos con los anticuerpos monoclonales murinos, los fragmentos variables de cadena sencilla en formato de fago anticuerpos o en formato soluble en diferentes concentraciones; o bien, 2 hrs a 37 °C con los sueros de pacientes diluidos 1:10 en PBS. Después de repetir la operación de lavado, se procedió a la incubación con el anticuerpo secundario adecuado para cada caso, en la dilución y tiempo indicado. El proceso de revelado para todos los casos utilizó el sustrato O-fenilendiamino (Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA) 0.4 % y H₂O₂ 0.4 % en amortiguador de fosfatos 100 mM pH 5.0, deteniendo la reacción con HCl 3N. La lectura en unidades de absorbancia se llevo a cabo a 490 nm en un lector de ELISA (Dynatech MR5000).

5.8.2. DOT BLOT ELISA

En una membrana de nitrocelulosa (BIORAD) se colocaron en punto 25 µg de diferentes proteínas, utilizando BSA como control negativo. Después de lavar la membrana con PBS fue bloqueada con PBS-BSA 1% w/v 90 min 37 °C. Después de lavar, se incubaron 3 hrs a 37 °C con los diferentes anticuerpos diluidos 1:100 respectivamente. Después de repetir la operación de lavado, se procedió a la incubación por 1 hr a 37° C con el anticuerpo secundario unido a peroxidasa, específico para cada caso. La reacción fue detectada con diaminobencidina 0.6%, H₂O₂ 0.12% en amortiguador de fosfatos 50 mM pH 7.4.

5.8.3. ENSAYOS DE INHIBICION POR ELISA

a) *Determinación de la constante de disociación de Hev b 6.02-AbM's murinos.* En placas de poliestireno se incubó 1 µg/pozo de Hev b 6.02 en amortiguador de carbonatos 50 mM pH 9.4. Las placas fueron bloqueadas con PBS-5% de leche descremada baja en grasas. En tubos aparte se co-incubaron concentraciones crecientes de Hev b 6.02 (1.9×10^{-11} a 1.28×10^{-5} M) con concentraciones molares constantes de los anticuerpos murinos seleccionados 6E7 (5.3×10^{-8}), 6D6 (7.8×10^{-8}) y Fab de 6D6 (2×10^{-7}) en PBS por 2 hrs. a 37 °C (fase líquida). Estas mezclas de reacción fueron transferidas a las placas de poliestireno que contienen Hev b 6.02 previamente adherida (fase sólida), donde se incubaron por 30 min. Los siguientes pasos fueron realizados de la misma manera que en una ELISA sencilla. La determinación de la constante de disociación (K_D) se realizó por dos métodos, gráfico y analítico^[125, 126], este último aplica la ecuación de Scatchard modificada para ELISA.

b) *Ensayos de inhibición de la interacción Abr-Hev b 6.02 por variantes de heveína.* Como se menciona en el apartado 5.8.1 las placas se prepararon con Hev b 6.02. En tubos aparte se co-incubaron, ya sea anticuerpos monoclonales murinos o fragmentos variables de cadena sencilla, a 25 µg/mL con diferentes inhibidores a concentraciones crecientes de 0.005 a 33 µg/ml (en este caso se utilizaron Hev b 6.02 como control, Hev b 6.02 modificada químicamente con 3-BNPS-Skatole⁹⁴, pseudoheveína y la isoforma natural Hev b 6.0202)⁹⁵ en PBS durante 2 hrs a 37 °C. Las mezclas de reacción fueron transferidas a las placas de ELISA durante 30 a 45 minutos a 37 °C y fueron revelados como se explicó anteriormente. Los resultados fueron expresados como porcentaje de inhibición usando la siguiente fórmula: $[100 - (\text{absorbancia en presencia del inhibidor} / \text{absorbancia en ausencia del inhibidor} \times 100)]$ para cada concentración de inhibidor.

c) *Ensayo de inhibición de la interacción IgE-Hev b 6.02 por anticuerpos recombinantes.* Placas de poliestireno cubiertas y bloqueadas como se indica anteriormente fueron incubadas 2 hrs a 37 °C con los scFv's o con AbMs (25 µg/mL). Después del proceso de lavado, las placas fueron incubadas con los sueros de pacientes alérgicos al hule de látex natural (dilución 1:10) por 2 hrs a 37 °C. En este caso se

detectó a las inmunoglobulinas IgE humanas unidas a la Hev b 6.02 en fase sólida utilizando un anticuerpo biotinilado anti-IgE humano (Zymed; diluido 1:1000) y se reveló de la manera habitual.

5.9 ENSAYOS DE FLUORESCENCIA

Los ensayos se realizaron en un espectrofluorómetro Perkin Elmer BL50 a 25°C, utilizando una longitud de onda de excitación de 295 nm y un rango en longitud de onda de emisión de 320 a 440 nm. El slit de excitación fue 2.5 nm y el de emisión de 3.5 nm. El amortiguador utilizado fue PBS pH 7.4. La concentración de Hev b 6.02 utilizada para todos los experimentos fue 2.11×10^{-6} M (10 µg/mL). La concentración de anticuerpos fue preparada en diferentes relaciones molares respecto al alérgeno.

a) Centro espectral de fluorescencia (CM). Utilizando la fluorescencia intrínseca de los triptófanos presentes en Hev b 6.02, se realizó un estudio para ver si el ambiente de éstos cambia en presencia de los ligandos producidos (anticuerpos). El centro espectral de masa se establece como aquella longitud de emisión con mayor intensidad, a través de una integración de todas las intensidades a todas las longitudes de emisión. El centro espectral de masa o $CM = \frac{\sum \lambda I(\lambda)}{\sum I(\lambda)}$, donde λ es la longitud de onda de emisión y $I(\lambda)$ representa la intensidad de la fluorescencia a esa longitud de onda¹²⁷.

b) Experimentos de apagado de la señal de fluorescencia (quencheo). Utilizando como apagador (quencher) sin carga a la acrilamida se observó si los triptófanos presentes en la superficie de Hev b 6.02 se vuelven menos accesibles en presencia de los anticuerpos producidos. Una solución stock de acrilamida 3.0 M (Molecular Biology Grade, Aldrich, St. Louis, MO) fue agregada en incrementos de 10 mM hasta llegar a 200 mM tanto a Hev b 6.02 sola, como en presencia de los anticuerpos recombinantes previamente incubados antes del experimento. Los datos de apagamiento de la fluorescencia fueron analizados por medio de la ecuación de Stern-Volmer $F_0/F = 1 + K_{sv}[Q]$, donde F_0 y F son las intensidades de fluorescencia corregidas en la ausencia y presencia de acrilamida respectivamente, K_{sv} es la constante dinámica de Stern-Volmer, y $[Q]$ es la concentración molar de acrilamida¹²⁸.

5.10 ALINEAMIENTO DE SECUENCIA Y MODELADO POR HOMOLOGÍA DE LOS ANTICUERPOS RECOMBINANTES ANTI-Hev b 6.02

La estructura tridimensional de los modelos de anticuerpos recombinantes anti Hev b 6.02 se realizó utilizando el servidor WAM (Web Antibody Modeling)¹²⁹ y el programa Modeller 9v2¹³⁰, así como el servidor ESyPred3D¹³¹. Los frameworks son generados por el homología con los templados de anticuerpo que presentan mayor porcentaje de identidad de acuerdo a los alineamientos generados en Modeller 9v2 y en BLAST^[132] aplicada a estructuras de anticuerpos cristalizadas con mayor resolución reportadas en el Protein Data Bank. Todos los CDR's excepto CDR3 VH fueron modelados de acuerdo a la homología con aquellas asas de la misma estructura canónica. Los modelos obtenidos fueron sometidos a 100 rondas de minimización en UCSF Chimera¹³³.

5.11 DOCKING DE LOS COMPLEJOS Hev b 6.02-scFv

El docking de cuerpo rígido se llevó a cabo en GRAMM-X¹³⁴ y ZDOCK¹³⁵ como punto de partida para construir los modelos entre cada scFv y la estructura cristalizada de Hev b 6.02 a 1.5 Å resolución (Código en PDB: 1Q9B)¹⁰³. RosettaDock¹³⁶ fue utilizado para ejecutar la búsqueda rotacional y translacional del antígeno alrededor de la superficie de unión del anticuerpo, este proceso fue iniciado repetidamente desde diferentes puntos de orientación para generar 1000 estructuras de resultado. Los valores de r.m.s.d. fueron calculados sobre las moléculas de scFv después de la superposición del ligando (Hev b 6.02) en comparación al modelo original, que junto con los valores de fnat fueron usados para evaluar los resultados. La visualización se llevo a cabo por programa PyMOL v1.0r2¹³⁷.

6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Algunas de las características, antes mencionadas de Hev b 6.02, la hacen un modelo de estudio para determinar las interacciones alergeno-anticuerpo IgE a nivel molecular. La estrategia para determinar las regiones inmunodominantes se realizó a través de la obtención de anticuerpos recombinantes específicos hacia este alergeno.

6.1 SELECCIÓN DE ANTICUERPOS ESPECÍFICOS A Hev b 6.02

6.1.1 Selección de anticuerpos monoclonales murinos

En la Figura 8 se muestra el reconocimiento de los anticuerpos presentes en el sobrenadante de los hibridomas hacia Hev b 6.02, después del proceso de fusión y separación de monoclonas por dilución limitante.

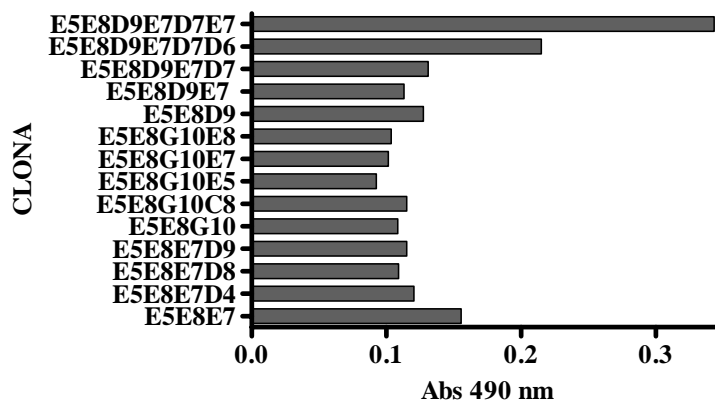


Figura 8. Reconocimiento de anticuerpos monoclonales murinos a Hev b 6.02 presentes en el sobrenadante de hibridomas por el método de ELISA.

Las clonas E5E8D9E7D7E7 (6E7) y E5E8D9E7D7D6 (6D6) fueron seleccionadas como fuente de anticuerpos monoclonales debido a que después del proceso de purificación presentaron alta especificidad hacia Hev b 6.02 (Figura 9). Estos anticuerpos presentaron un solo isotipo para las cadenas pesada y ligera (Tabla 2), así como títulos de 1.5 μg y 2.9 μg , respectivamente. Adicionalmente se determinó la constante de disociación del complejo Fab 6E7-Hev b 6.02 por el método de ELISA competitiva utilizando la ecuación de Scatchard, de la cual se obtiene una K_D de $1.93 \times 10^{-7} \text{M}$.

Tabla 2. Isotipo de algunas clonas productoras de anticuerpos específicos a Hev b 6.02.

CLONA DE HIBRIDOMA	CADENA PESADA	CADENA LIGERA
E5E8D9E7	IgG _{2b} , IgG _{2a}	$\kappa \lambda$
E5E8D9E7D7	IgG _{2b} , IgG ₁	κ
E5E8D9E7D7D6	IgG _{2b}	κ
E5E8D9E7D7E7	IgG ₁	κ

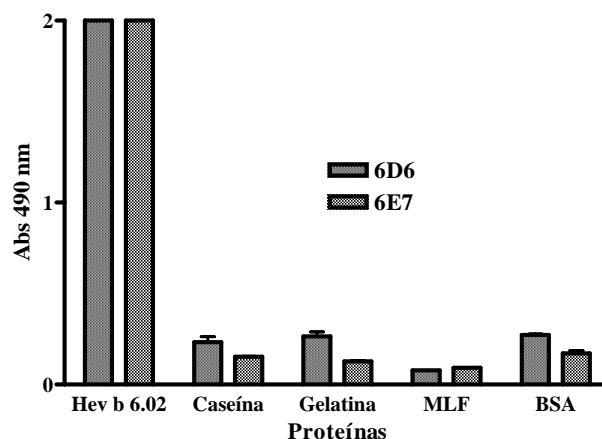


Figura 9. Reconocimiento y reactividad cruzada de los anticuerpos monoclonales murinos 6D6 y 6E7 específicos para Hev b 6.02 (3 µg/mL) y a diferentes proteínas utilizadas como agentes bloqueadores por ELISA.

6.1.2 Selección de fragmentos variables de cadena sencilla (scFvs).

Por el método de despliegue en fagos, a través de un proceso de selección a partir de un banco no inmune¹¹⁹ tres clonas productoras de fago-anticuerpos, denominados A6, H8 y M8, mostraron secuencias únicas (Figura 10), así como señal positiva y especificidad a Hev b 6.02.

		CDRH1	CDRH2	
A6	1	EVQLVESGAEVKKPGASVKVSCKAS GYIFTNYGIS WVRKAPGQGLEWVA WISGYNGLIKS		60
H8	1	EVQLVESGGGLVPGGSLRLSCAAS GFTFGGYSMN WVRQAPGKGLEWV SSISSSSYIYY		60
M8	1	QVQLVQSGAEVKMPGESLKI SCKGSAYNF SNY WIA WVRQMPGEGLEWMG IVYPGD SHIRY		60
			CDRH3	
A6	61	A QRFQGRVTLTDDIS TTTAYMELRSLRSDDTAVYYCAR SGMYKDGSGSYTG -- MDVWGQG		118
H8	61	ADSVKGRFTISRDN AKNSLYLQ MNSLRAEDTAVYYCAR QAVR ---- GPARG -- MDVWGQG		114
M8	61	R PSFQGV TI SADK SISFVYLQWSSLKASGTAIYYCAR QSIIPVG -- GLMRGDAFDI WGQG		119
		Linker	CDRL1	
A6	119	TTVTVSSGGGGSGGGGGSGGGSDIQMTQSPSSLSASV GD RV TI TC RAS --- QNIDKFLNW		175
H8	115	TTVTVSSGGGGSGGGGGSGGGSDIQMTQSPSSLS TSV GD RV TI SCRAS --- H ISS YVNW		171
M8	120	TMVTVSSGGGGSGGGGGSGGGSHVILTQ-PPSVSVSPGQTATITC SGDQLEHMERLSICW		178
		CDRL2	CDRL3	
A6	176	FQKPGKAPRLLIY GATNLD SGVPSRISGSGSGTDFTLTIS SLQ PE DFATYHC QQSY-IT		234
H8	172	YQKPGKAPKLLIS ATSTLQN AVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQ PE SATYYC QQSY-SH		230
M8	179	YQKPGQSPVVVIY QATSRPP GIPERFSGSYSGNTATLTISGAQSVDDADYY CQAWDPIS		238
A6	235	PR SFGQGT KLEIKRAAAEQ KLISEEDLN GA AHHHHHHH		271
H8	231	SV TFGQGT RL EIKRAAAEQ KLISEEDLN GAHHHHHHH		267
M8	238	EL VFGSGT QLTVLSAAAEQ KLISEEDLN GA AHHHHHHH		275

Figura 10. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de los tres scFv específicos a Hev b 6.02 seleccionados de un repertorio humano. Los CDRs están indicados de acuerdo a la clasificación de Kabat¹³⁸.

Las secuencias de los genes de las cadenas pesadas (hc) y ligeras (hl) de los scFv específicos a Hev b 6.02 fueron comparadas con las líneas germinales de familias de genes de anticuerpos humanos reportadas en la base de datos IMGT/V-QUEST¹³⁹. En la Tabla 3 se muestran las variaciones con respecto a las líneas germinales presentes en los FRs, así como en los CDRs. La tasa y distribución de estas variaciones son muy parecidas a las que se presentan en otros anticuerpos anti-alergenos provenientes de diferentes fuentes, tanto humanas como murinas^{140, 141}, en estos anticuerpos se observa un mayor número de mutaciones en los CDRs y menor en los FRs.

Tabla 3. Comparación de las variaciones con respecto a la línea germinal de los genes de las cadenas pesadas y ligeras de los scFv específicos a Hev b 6.02.

Clona	Linea germinal V,D,J (hc) V,J (hl)	Regiones variables completas		CDRs		FRs	
		n	Porcentaje	n	Porcentaje	n	Porcentaje
A6 hc	IGHV1-18*01	42/369	11	25/114	21	17/255 bp	7
	IGHD3-10*01	bp		bp			
	IGHJ6*01						
H8 hc	IGHV3-21*01	20/357	6	20/102	20	0/255 bp	0
	IGHD3-10*01	bp					
	IGHJ6*01						
M8 hc	IGHV5-51*01	30/372	8	16/114	14	14/258 bp	5
	IGHD6-19*01	bp		bp			
	IGHJ3*02						
A6 lc	IGKV1-39*01	24/324	7	11/81 bp	14	13/243 bp	5
	IGKJ1*01	bp					
H8 lc	IGKV1-39*01	25/324	8	15/81 bp	19	10/243 bp	4
	IGKJ5*01	bp					
M8 lc	IGLV3-1*01	56/333	17	29/93 bp	31	27/240 bp	11
	IGLJ1*01	bp					

6.1.3 Características de los anticuerpos específicos a Hev b 6.02

Las secuencias de las regiones variables de las cadenas pesadas (V_H) de los dos anticuerpos murinos 6E7 y 6D6 se obtuvieron a partir del cDNA de los hibridomas, por medio de RT-PCR^{142, 143}. Se realizaron alineamientos con las regiones V_H de los scFv específicos a Hev b 6.02, y con 1C2 y 1A4 anticuerpos provenientes de pacientes alérgicos contra el mismo alérgeno¹¹⁰, los cuales se muestran en la Figura 11.

```

          _____ CDRH1 _____          _____ CDRH2 _____
M8  QVQLVQSGAEVKMPGESLKISCKGSAYNFSN--YWLAWVRQMPGEGLEWMGIVYPGDSHI  58
A6  EVQLVESGAEVKKPGASVKVSCKASGYIFTN--YGISWVRKAPGQGLEWVAWISGYNGLI  58
H8  EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFGG--YSMNWVRQAPGKGLEWVSSISSSSSYI  58
1C2  QITLKESGPTLVKPTQTLTLTLCNLSGFSLSTSGVGVGWIRPPGKALEWLALIYW-DDDK  59
1A4  QITLKESGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSLSTTGMGVAWIRPPGKALEWLALIYW-DDDT  59
6E7  EVKMQESGPGLVAPSQSLSITCTVSGFSLTS--YGVHWVRQPPGKGLEWLVVIWS-DGST  57
6D6  EVKMQESGPGLVAPSQSLSITCTVSGFSLTS--YGVHWVRQPPGKGLEWLVVIWS-DGST  57
    :: : ** : * :: : * *.: : : : *.: *.: *.: *.: *.: : ..

          _____ CDRH3 _____
M8  RYRPSFQQVTISADKSISFVYLQWSSLKASGTAI-YYCARQSIIPV-G-GLMRGDAFDI  115
A6  KSAQRFQGRVLTTTDISTTTAYMELRSLRSDTAV-YYCARSGMYKD-GSGSYTG--MDV  114
H8  YYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAV-YYCARQAVR-----GPARG--MDV  110
1C2  RYSPSLRNRLTITKDTSKNQVVLTMTNMDPVDTGT-YFCARSVNYDDVSGTYHSHNWFDP  118
1A4  RYSPALKSRLTVTTKDTSKNQVVLTMTNMDPVDTATYYYCAHTHCS--NGVCYSAHWFDS  117
6E7  TYNSALKSMIVISKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAM-YYCARE-----PPRRTFAY  106
6D6  TYNSALKSRLSISKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAM-YYCARE-----PPRRTFAY  106
    . . . : * : . : . : . * . *.: *.: :

M8  WGQGTMTTVSS 126
A6  WGQGTTVSS 125
H8  WGQGTTVSS 121
1C2  WGQGTLTVSS 129
1A4  WGQGTLTVSS 128
6E7  WGQGTTVSS 117
6D6  WGQGTTVSS 117
    *****

```

Figura 11. Alineamiento de secuencias de las V_H de los anticuerpos específicos a Hev b 6.02. En rojo se muestran los CDR's.

En este trabajo encontramos que las V_H s con mayor porcentaje de identidad de secuencia fueron las correspondientes a los anticuerpos murinos con un 96%, y entre las regiones variables provenientes de IgEs con 77%¹¹⁰. Las regiones con menor porcentaje de identidad se presentaron entre A6 y 1A4 (33%) y entre las V_H s de M8 y de 1C2/1A4 (37%). Pese a la variabilidad de secuencia, el tipo y la distribución de aminoácidos de los CDRH1 y CDRH2 fueron muy similares en la mayoría de los anticuerpos, con la excepción del CDRH2 de M8, en el cual se presenta una zona rica de Ser (Figura 11). Esta característica fue aún más notoria entre las regiones variables murinas y las reportadas por Laukkanen y col. para una IgE anti-heveina¹¹⁰, lo que podría indicar la formación de un sitio de unión similar a Hev b 6.02 entre estos anticuerpos. Al

comparar los CDRH3, donde la mayor variabilidad en tamaño y secuencia se presenta, se observan CDRs largos en 1C2 y 1A4 (19 residuos), así como en M8 (17 residuos) (Figura 13). Este tamaño de asas se ha reportado en anticuerpos que presentan una zona plana en el sitio de unión al antígeno proteico; sin embargo, existen excepciones a dicha regla, ya que CDRH3 largos (17 residuos) también permiten la formación de sitios de unión en forma de cavidad (pocket) para péptidos ¹⁴⁴.

```

                _____CDRL1_____                _CDRL2_
H8  DIQMTQSPSSLSTSVGDRVTISCRAS--HSISS-YVNWYQOKPGKAPKLLISATSTLQNA 57
1C2 ETTLTQSPSSLASVSGDRVTITCRAS--QSISY-YLNWYQOKPGKAPKLLIYAASSLQSG 57
A6  DIQMTQSPSSLASVSGDRVTITCRAS--QNIDK-FLNWFQOKPGKAPRLLIYGATNLDSG 57
1A4 ETTLTQSPGTLSPGERATLSCRAS--QSVSSSYLAWYQOKPGQAPRLLIYGASSRATG 58
M8  HVILTQPP-SVSVSPGQTATITCSGDQLEHMERLSICWYQOKPGQSPVVVIYQATSRPPG 59
      . :*:.* :*: * *: .*:.* .. . :. : *:*:*:*:* :*:
                _____CDRL3_____
H8  VPSRFSGSGSGTDFLTITISLQPEDSATYYCQQSY-SHSVTFGQGRLEI- 106
1C2 VPSRFSGSGSGTDFLTITISLQPEDFATYYCQQSY-STPRTFGQGRLEIK 107
A6  VPSRISGSGSGTDFLTITISLQPEDFATYHCQQSY-ITPRSFQGRLEIK 107
1A4 IPDRFSGSGSGTDFLTISRLEPEDFAVYYCQQYG-SSPLTFGQGRLEI- 107
M8  IPERFSGSYSGNTATLTISGAQSVDDADYYCQAWDPISSELVFGSGTQLTVL 110
      :*.*:*:* *:. ***** :. * * *:* *      **.*:*:* :

```

Figura 12. Alineamiento de secuencias de las V_L de los anticuerpos específicos a Hev b 6.02. En verde se muestran los CDR's según la clasificación de Kabat¹³⁸.

Por otra parte, como se puede apreciar en la Figura 12, las regiones V_L presentan mayor porcentaje de identidad entre ellas, por ejemplo, A6 y H8 tienen un 74% de identidad entre ellos y más del 80 % con 1C2 y esta última 75% con 1A4. En los tres CDRs se observa un tipo y distribución de aminoácidos muy semejante, con excepción de M8. Esta cadena ligera contiene la secuencia con el menor porcentaje de identidad al ser comparada con las demás, lo que podría indicar la formación de un sitio de unión a Hev b 6.02 totalmente diferente.

Al modelar cada anticuerpo notamos que el sitio de unión al antígeno presenta una topología variada sobre todo en lo que respecta a las regiones variables de la cadena pesada (Figura 13). Por otra parte analizamos la presencia de residuos aromáticos ubicados en los CDR's, ya que en varios reportes de anticuerpos específicos hacia alergen indican la presencia de un número mayor de residuos aromáticos en comparación con otros anticuerpos, sobre todo en los CDRH2 y CDR3 de las cadenas pesadas y de las cadenas ligeras, presentando desde hasta 15 de estos residuos en dichas zonas^{59, 188}. Los anticuerpos específicos hacia Hev b 6.02 obtenidos en este trabajo presentaron entre 8 y 9 residuos aromáticos en los CDR's y la mayor cantidad la

presentó el CDRH1 del cFv M8, mientras los anticuerpos específicos hacia este alergeno provenientes de un banco de IgE también presentaron entre 8 y 9 residuos aromáticos en los CDR's, donde el CDR3H de 1C2 presentó el mayor número. Al compararlos con anticuerpos dirigidos contra proteínas no alergénicas no encontramos diferencias en dicho número.

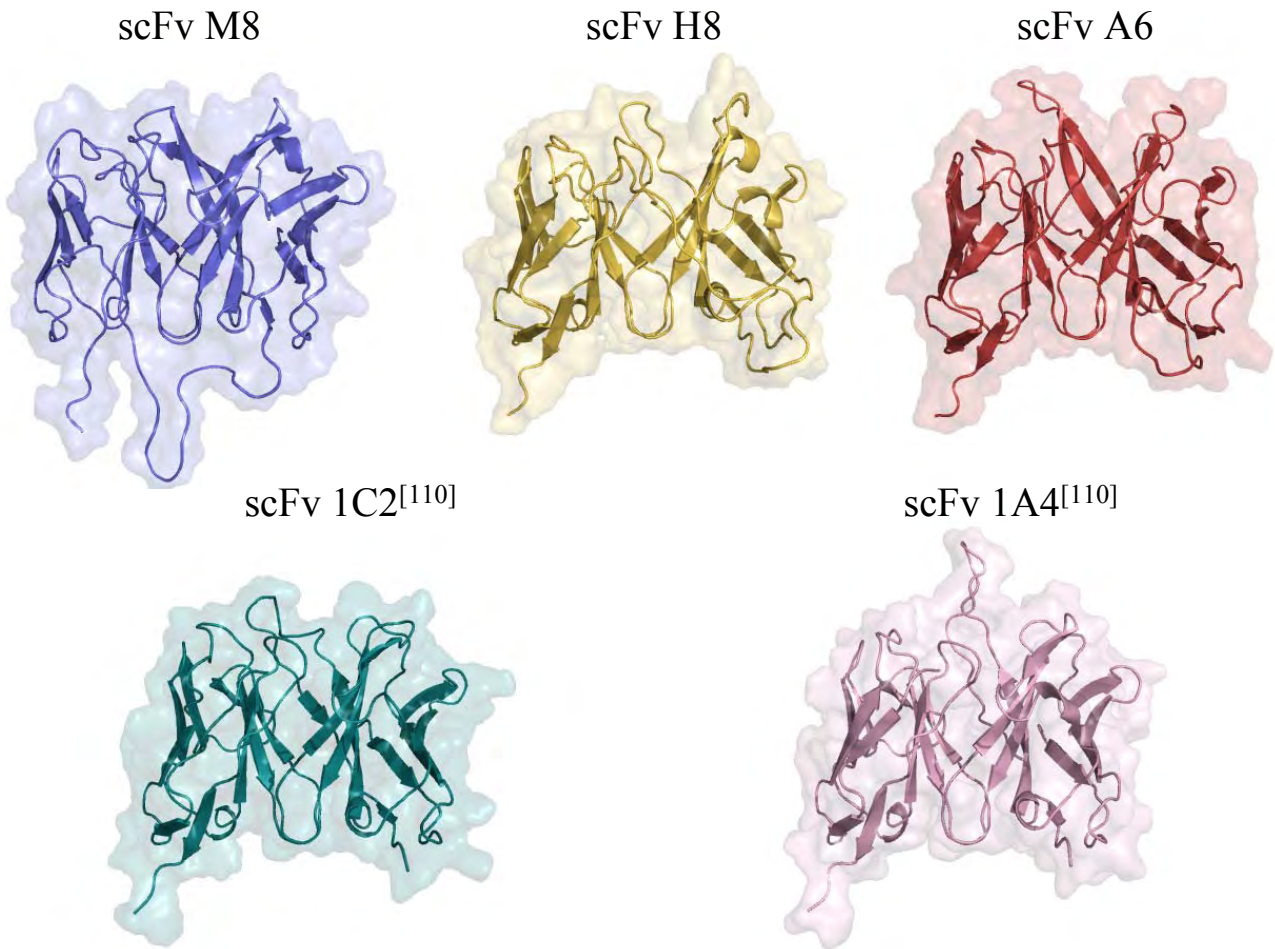


Figura 13. Modelos de los anticuerpos específicos a Hev b 6.02..

En la Figura 14 se muestra que las secuencias humanas, en especial las cadenas ligeras de los scFvs A6 y H8 presentaron altos porcentajes de identidad con otros anticuerpos IgE que reconocen alérgenos del polen de la hierba *Phleum pratense*¹⁴⁵⁻¹⁴⁷. Este hallazgo fue también observado con anticuerpos específicos contra un alérgeno de la leche bovina (beta-lactoglobulina), ya que la región variable de la cadena ligera

presentó un alto porcentaje de identidad con los anticuerpos específicos a Hev b 6.02¹¹⁰ y anticuerpos específicos al polen de la hierba antes mencionada¹⁴⁸. A partir de estas observaciones se podría inferir que dichos Abs presentan sitios de unión parecidos y por lo tanto, epítomos similares entre estos alergenicos; lo que podría explicar algunos problemas de reactividad cruzada observados en el área clínica¹⁴⁹.

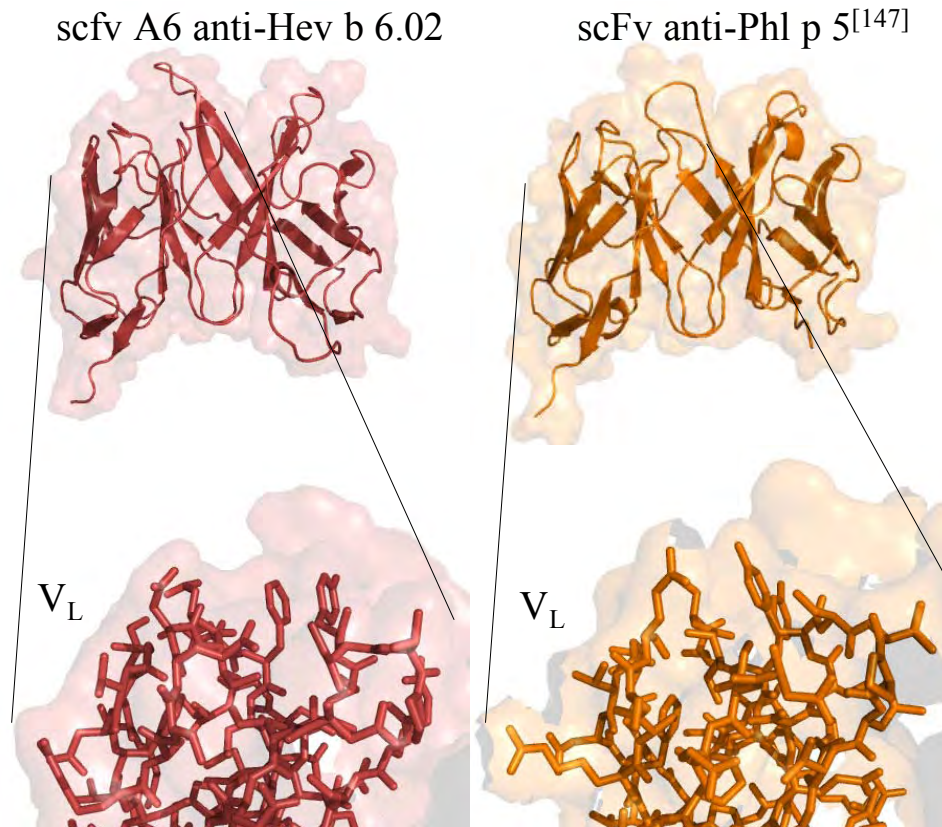


Figura 14. Comparación de los modelos de las cadenas ligeras del scFv A6 anti-Hev b 6.02 y el scFv anti-Phl p 5¹⁴⁷. El porcentaje de identidad de estas V_L es del 81%.

6.2. Maduración de la afinidad del scFv M8.

La clona M8 fue sometida a evolución dirigida para la maduración de su afinidad; debido a que fue el primer anticuerpo que se obtuvo por selección *in vitro*. En la Tabla 4 se muestra el proceso de evolución en donde se establece el número de variantes y la tasa de mutación por ciclo, así como las clonas seleccionadas y la ubicación de cada cambio. Después de tres rondas de maduración, la clona G7 presentó diez cambios con respecto a M8 (Figura 16) y un aumento de más de cinco veces en el reconocimiento por Hev b 6.02 (Figura 15). Cada uno de los cambios fue analizado para

determinar su participación en el mejoramiento de la afinidad y, en su caso, el incremento en la estabilidad. Dos cambios, ubicados en el extremo carboxilo-terminal, no se modelaron por carecer de una estructura modelo de esa zona.

Tabla 4. Identificación de los cambios en los residuos de aminoácidos ocurridos durante cada ciclo de evolución. Las mutaciones y sus posiciones se muestran con respecto a la clona M8.

Banco mutagénico	Tamaño de cada banco	Clonas seleccionadas	Mutaciones en comparación a la secuencia madre
1 (BM5 de scFv M8)	7.3 x 10 ⁶ variantes (T. M:1.1%)	1G5	FWKVH E10K
		1F6	FWKVH M48V FWKVH I76F FWKVH G90S
2 (BM de 1F6)	2.38 x 10 ⁶ variantes (T.M. 1%)	2D6	FWKVH A9P FWKVH S17F FWKVH S25F FWKVH M40I
		2F7	CDR3VH I102K FWKVH M121V FWKVL S208T FWKVL S252G FWKVL A255G
3 (BM de 2F7)	2.3 x 10 ⁶ variantes	G7	FWKVL Q180H CDR2VL S196Y

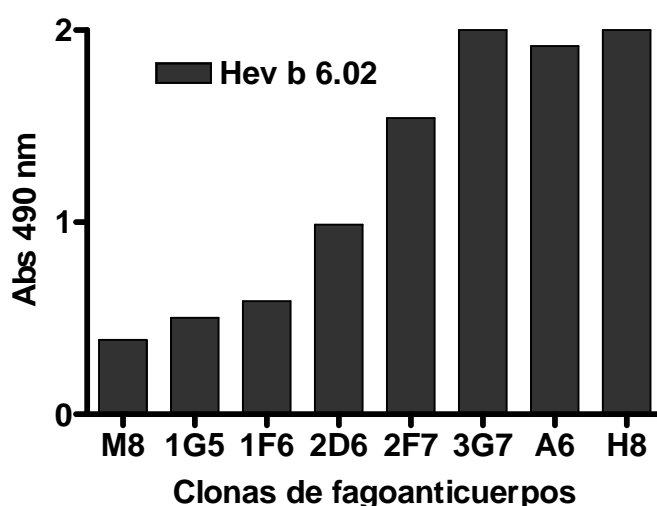


Figura 15. Reconocimiento de los scFv-fago anticuerpos anti-Hev b 6.02 por ELISA. El título de los fago-anticuerpos fue de 3.3 x 10¹¹ fagos/mL

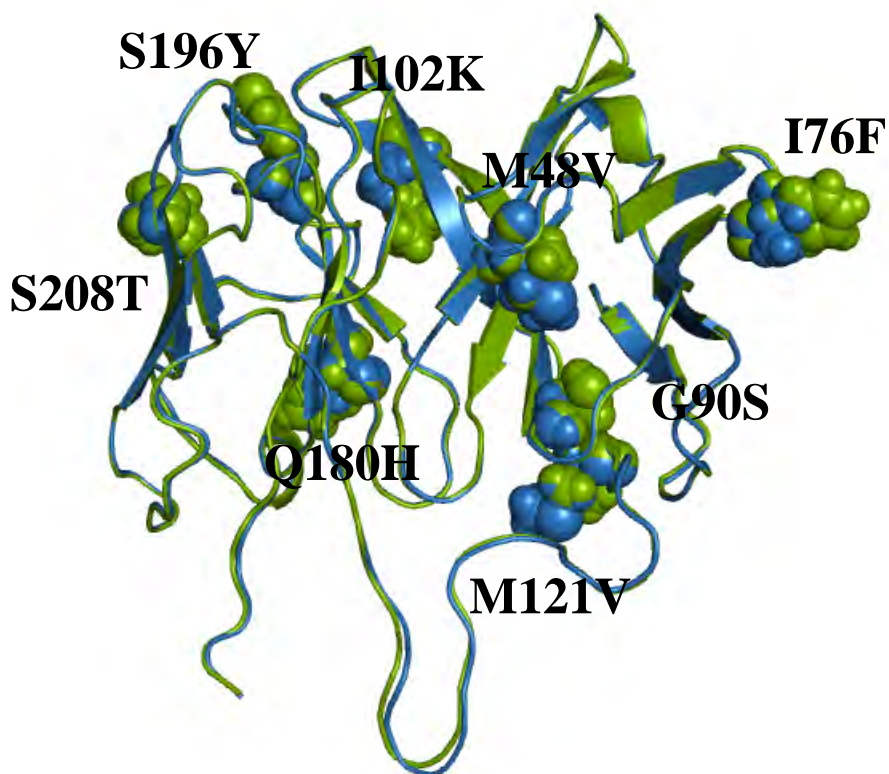


Figura 16. Ubicación de los cambios obtenidos después del proceso de maduración de M8. El modelo en azul representa al scFv M8 y en verde al scFv madurado G7.

Las variaciones que estarían menos involucradas en el proceso de maduración de la afinidad son la S208T y la I76F (ubicadas en los FRs de la V_L y V_H , respectivamente). Estas no presentaron cambios en el tipo de aminoácido, ya que el primero se mantuvo como residuo polar y el segundo como residuo hidrofóbico. Los residuos de metionina expuestos al disolvente están propensos a procesos de oxidación, lo que provoca una disminución de la estabilidad de los scFv. Entonces los cambios ubicados en el FR de la V_H M48V y sobre todo M121V aseguran mayor estabilidad a la molécula del scFv G7. Los cambios G90S y Q180H si afectan las características del ambiente en el que se encuentran, ya que para el primer caso pasa de un residuo hidrofóbico a uno polar y en el segundo de polar a cargado, lo que favorece las interacciones intracadena por medio de puentes de hidrógeno, debido a la posición en la que se encuentran.

Los cambios que se sugiere están más involucrados en la maduración de la afinidad, debido a su ubicación en el CDR3H y en el CDR2L son I102K y S196Y,

respectivamente. El primer cambio podría favorecer las interacciones electrostáticas con el alérgeno, así como un acomodo estructural del CDR3H. El último cambio ofrece la presencia de un residuo aromático en la región de los CDRs y por consecuencia un incremento en el área expuesta al disolvente (104.93 \AA^2), que la hace más susceptible a la interacción con el alérgeno Hev b 6.02 por medio de interacciones hidrofóbicas o por puentes de hidrógeno.

6.3 ENSAYOS DE INHIBICIÓN

6.3.1 Competencia entre scFvs.

Para verificar si los anticuerpos obtenidos reconocen sitios diferentes de Hev b 6.02, se realizó una inhibición por ELISA entre los scFvs G7, A6 y H8, la cual se muestra en la Figura 17. Cuando se utilizó el formato de proteína soluble para uno de ellos (G7) y haciéndolo competir con él mismo (control positivo) y con los demás en formato de fago-anticuerpo se observó que los anticuerpos A6 y H8 inhiben hasta 73.5% a G7. Según los parámetros establecidos por Ponomarenko y Bourne¹⁵⁰, se dice que dos anticuerpos que tengan más del 75% de competencia entre ellos por un mismo antígeno están reconociendo un mismo epítipo de ese antígeno. Debido a lo anterior, A6, H8 y G7 están reconociendo sitios aparentemente diferentes.

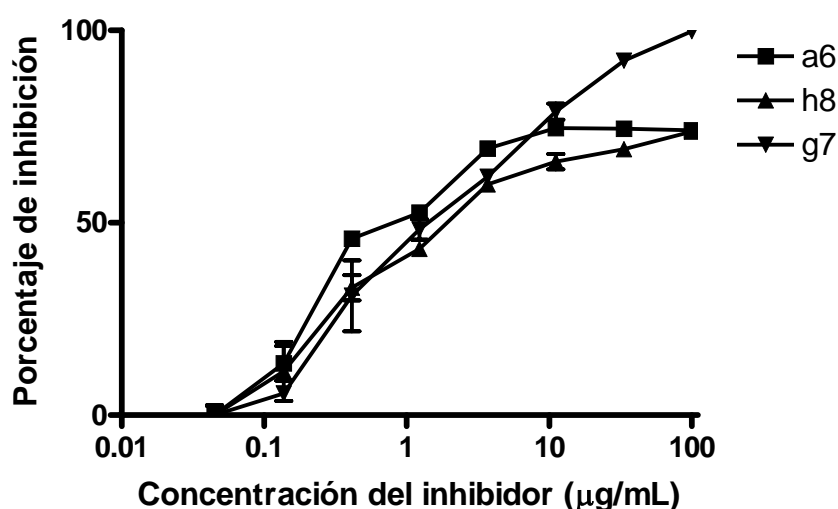


Figura 17. Inhibición entre fragmentos variables de cadena sencilla.

6.3.2 Inhibición de la interacción IgE-Hev b 6.02 por anticuerpos recombinantes.

Una de las características más importantes de los anticuerpos, producidos *in vitro*, contra alérgenos es su capacidad de inhibir la interacción de estos con IgEs de suero de pacientes. Con el objeto de determinar dicha propiedad para el anticuerpo murino 6E7 y para los scFvs humanos M8, A6, H8 y el madurado G7 se realizaron ensayos de inhibición por competencia entre cada anticuerpo recombinante y cada suero de paciente, de donde se seleccionaron las respuestas más variadas, las cuales se muestran en la Tabla 5. Cabe destacar que el scFv H8 es capaz de inhibir hasta en un 55% dicha interacción y que la combinación de todos los anticuerpos inhibe más de un 70% la interacción IgE-Hev b 6.02 en algunos pacientes.

Tabla 5. Porcentaje de inhibición de la interacción Hev b 6.02-IgE por anticuerpos recombinantes.

Individuo	scFv M8	scFv G7	scFv A6	scFv H8	mAb 6E7	scFvs + mAb 6E7
Porcentaje de Inhibición						
1	32.6	28.5	22.6	19.0	9.5	24.3
2	14.4	18.5	8.0	6.1	18.8	20.2
3	20.7	18.9	51.3	42.7	9.6	13.2
4	24.9	6.9	-	55.1	20.6	63.4
5	22.0	26.5	8.3	35.7	12.9	15.0
6	8.2	-	-	37.3	30.6	33.6
7	12.1	34.1	14.1	45.3	40.6	71.5
Promedio	19.3	22.3	20.9	34.5	20.4	34.5

Los Abs capaces de inhibir la interacción alérgeno-IgE, pueden provenir de orígenes diferentes, como el murino^{63, 151}, humanos a partir de banco inmunes^{110, 152} y de bancos no inmunes¹⁵³. Estos pueden ser utilizados para la purificación y cuantificación de alérgenos, el mapeo de epítopos y el desarrollo de vacunas terapéuticas. Loveless y col. (1940) definen por primera vez el término de anticuerpo bloqueador, mostrando que la inhibición competitiva entre IgGs de diversos orígenes e IgEs de suero de pacientes puede usarse como un tratamiento efectivo contra la

alergia^{154, 155}. Estudios posteriores, de varios grupos realizados *in vitro*, establecieron que después de un proceso de vacunación se observaron bajos niveles de IgEs específicos¹⁵⁶⁻¹⁵⁸, inhibición de la liberación de histamina en basófilos y la disminución de la respuesta de linfocitos T hacia alérgenos, así como una marcada disminución de los síntomas alérgicos *in vivo*¹⁵⁹⁻¹⁶⁰.

La capacidad de inhibir la interacción IgE-alérgeno por los Abs producidos en este trabajo fue comparada con los datos reportados en la literatura para otros alérgenos los cuales se muestran en la Tabla 6. Se observan comportamientos similares independientes del tamaño del alérgeno, indicando la posible presencia de regiones inmunodominantes.

Tabla 6. Porcentaje de inhibición máxima de algunos anticuerpos bloqueadores reportados en la literatura.

Anticuerpo bloqueador	Alérgeno	Porcentaje máximo de inhibición alérgeno-IgE	Referencia
AbM BV16	Bet v 1	40%	(Mirza et al., 2000) ¹⁵¹
AbM 21E11	Api m 2	57%	(Padavattan et al., 2007) ⁶³
AbM 4A7	Blo t 5	45%	(Naik et al, 2007) ¹⁶¹
AbM de IgE	Phl p 1	43%	(Flicker et al., 2006) ¹⁴¹
AbM 13A4	Der f 2	50%	(Nishiyama, et al, 1999) ¹⁶²
scFv H8	Hev b 6.02	55%	En este trabajo
scFv A6	Hev b 6.02	51%	En este trabajo
AbM 6E7	Hev b 6.02	40%	En este trabajo

En este trabajo se establece por primera vez que varios anticuerpos específicos e individualmente identificables contra un mismo alérgeno realizan un efecto sinérgico de inhibición a la interacción IgE-alérgeno al combinarse. En la Tabla 5 se muestra que en algunos pacientes se obtiene más del 63% de inhibición, lo que hace evidente que la batería de anticuerpos reconoce diferentes regiones de la superficie de Hev b 6.02, al igual que la población de anticuerpos IgE presentes en los sueros de pacientes alérgicos. Este tipo de sinergismo sólo se había observado con el uso de anticuerpos policlonales^{159, 163}. Por tales motivos, los anticuerpos específicos hacia Hev b 6.02 pueden ser utilizados como herramientas potenciales en el diagnóstico y tratamiento de la alergia al

látex.

El scFv G7 madurado no genera un aumento considerable de la inhibición de la interacción IgE-Hev b 6.02 comparado con el scFv M8 (Tabla 5), por el contrario, en algunos casos se observó disminución de dicho efecto. Esto podría indicar que la característica más importante de un anticuerpo bloqueador no es la afinidad, sino el epítipo que está reconociendo. Varios reportes de anticuerpos con alta afinidad hacia alérgenos que no tienen efecto bloqueador corroboran esta importancia^{140, 164}.

6.3.3 Identificación de los sitios importantes en la interacción Hev b 6.02-Anticuerpos recombinantes.

Para determinar los residuos de Hev 6.02 involucrados en la interacción con los diferentes anticuerpos recombinantes estudiados, se utilizaron variantes de este alérgeno que previamente habían demostrado su capacidad hipoalérgénica en pruebas *in vitro* e *in vivo*^{103, 104} y que además mantuvieron el plegamiento típico de heveína. En la Figuras 18 y 19 se muestra el alineamiento, así como las variaciones en la estructura 3D de la pseudoheveína y Hev b 6.0202 (isoforma 2) comparadas con Hev b 6.02. Las proteínas antes mencionadas fueron utilizadas como inhibidores de la interacción de Hev b 6.02 con cada anticuerpo recombinante y con una mezcla de IgE de suero de pacientes. Para realizar estos experimentos se usaron concentraciones crecientes de las tres proteínas. Si se presenta un cambio en la capacidad inhibitoria comparada con el control positivo (Hev b 6.02), de lo cual se deduce que los cambios presentes en estas variantes son importantes para las interacciones con los diferentes anticuerpos (Figura 20).

Hev b 6.02	EQCGRQAGGK	LCPNNLCCSQ	WGWCGSTDEY	CSPDHNCQSN	CKD
	10	20	30	40	
Pseudoheveína	EQCGRQAGGK	LCPNNLCCSQ	YGWCGSSDDY	CSPSKNCQSN	CKGGG
Hev b 6.02m	EQCGRQAGGK	LCPNNLCCSQ	WGWCGSTDEY	CSPDHNCQSN	CKD
Hev b 6.0202	EQCGRQAGGK	LCPDNLCCSQ	WGWCGSTDEY	CSPDHNCQSN	CKD

Figura 18. Comparación de las secuencias entre variantes de Hev b 6.02. En rojo se muestran las variaciones con respecto a este alérgeno, cabe señalar que para el caso de la heveína modificada se marcan en rojo los residuos de triptófano por la modificación química de oxidación que sufrieron con el BNPS-Skatole¹⁰³.

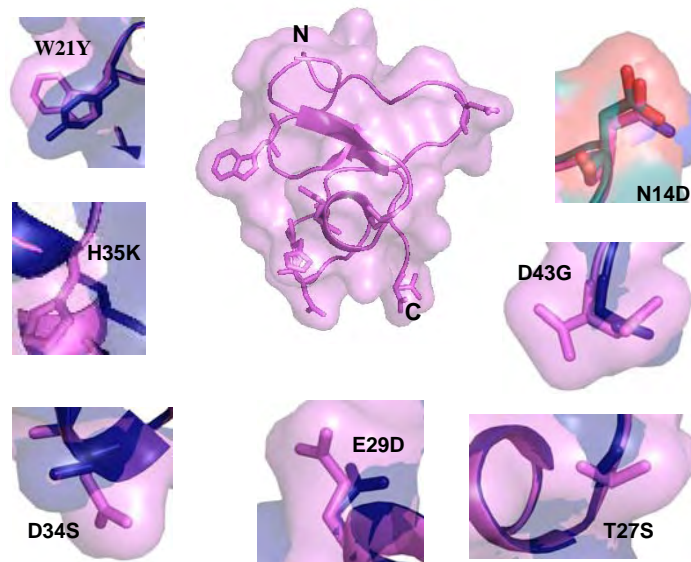


Figura 19. Ubicación 3D de los cambios presentes en pseudoheveína y Hev b 6.0202. En morado se muestra a Hev b 6.02, en azul a pseudoheveína y en verde a Hev b 6.0202.

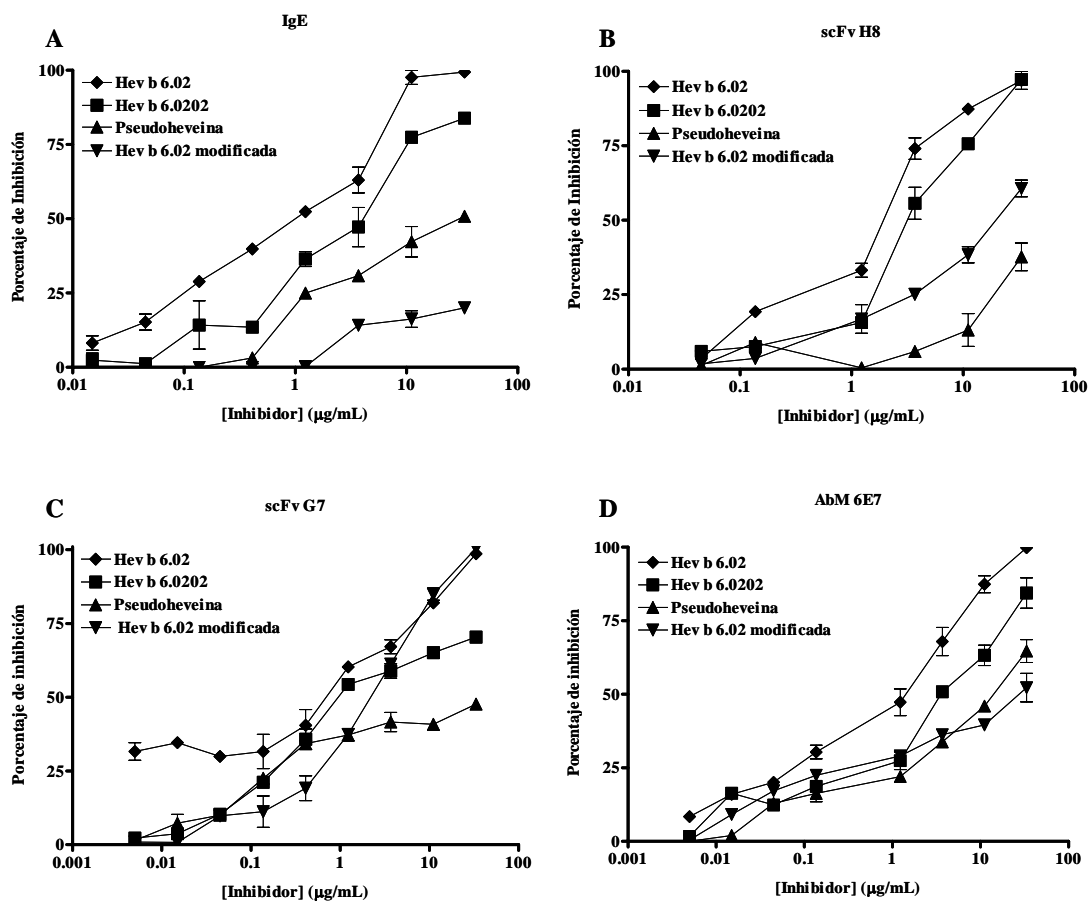


Figura 20. Ensayos de inhibición por ELISA de la interacción Hev b 6.02-Anticuerpos recombinantes. El promedio de la inhibición de la unión de Hev b 6.02 en fase sólida a IgE (A), scFv H8 (B), scFv G7 (C) y el Abm 6E7 (D) por Hev b 6.0202, pseudoheveína y heveína químicamente modificada. La curva de inhibición con Hev b 6.02 es mostrada como control positivo.

Es importante recalcar que los cambios presentes en Hev b 6.0202, pseudoheveína y heveína químicamente modificada se presentan en residuos expuestos al disolvente, lo que puede darnos información importante de los sitios que cada anticuerpo reconoce. La mutación natural N14D presente en Hev b 6.0202 genera un cambio local en la distribución de cargas, lo que posiblemente indica que el residuo localizado en la posición 14 es importante en la interacción con el scFv G7, debido a que presentó un 70% de inhibición comparada con Hev b 6.02 (Figura 20C). Cuando el ambiente de los residuos aromáticos W21 y W23 cambia por el efecto de la oxidación, la interacción con el scFv H8 y el Abm 6E7 presenta una disminución en la inhibición de 40% y 58%, respectivamente (Figura 20 B y D). Por otra parte, la heveína modificada no mostró cambios en la interacción con el scFv G7; esto sugiere que los residuos aromáticos antes mencionados forman parte de un epítipo ubicado en la cara opuesta a la del epítipo reconocido por el scFv G7. La variante natural de la heveína (pseudoheveína) presenta seis mutaciones ubicadas en la región C-terminal y el cambio W21Y en la región aromática (Figura 19). Estos cambios mostraron una reducción en la capacidad de unión de todos los anticuerpos recombinantes en diferentes porcentajes, indicando que algunos de estos residuos están involucrados en dichos reconocimientos. Los cambios en D34S y D43G propician la reducción de cargas negativas expuestas y por lo tanto la reducción de interacciones polares en la molécula, estos cambios son los que se sugiere impactan en mayor grado la topología del epítipo que reconocen varios anticuerpos.

Cuando comparamos el efecto inhibitorio de estas variantes en la interacción con IgEs provenientes de suero de pacientes alérgicos (Figura 20A), observamos que la pseudoheveína y la heveína modificada presentaron bajos porcentajes de inhibición, 50% y 20%, respectivamente, lo cual sugiere que los residuos W21, W23, T27, E29, D34, H35 y D43 son relevantes en la interacción IgE-Hev b 6.02. Estableciendo que existen residuos importantes o inmunodominantes que son reconocidos también por los anticuerpos recombinantes producidos en este trabajo.

6.4 Ensayos de fluorescencia

La fluorescencia intrínseca del triptófano puede ser usada para estimar la naturaleza polar del microambiente en el cual se encuentra este residuo, y explicar fenómenos como el plegamiento-desplegamiento y la unión a ligandos, entre otros. Existe una relación entre el grado de exposición del grupo indol al disolvente y la intensidad máxima de fluorescencia. En la Figura 21 se muestra la estructura 3D de Hev b 6.02, en donde los residuos W21 y W23 presentan áreas de superficie accesible al disolvente de 165.9\AA^2 y 112.1\AA^2 , respectivamente. Adicionalmente se observa que W21 expone las dos caras y el borde del anillo bencénico, así como una cara y el borde del anillo pirrol, mientras W23 expone una cara y un borde del anillo bencénico y una cara y borde del anillo pirrol, lo que explica que el centro de la masa espectral de esta molécula sea de 358 nm, el cual se ubica del lado rojo del espectro.

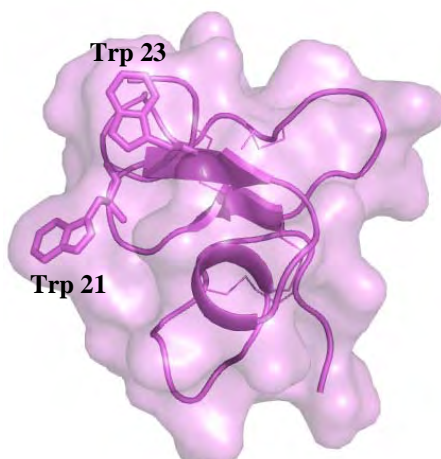


Figura 21. Ubicación de los residuos de Trp expuestos en disolución de Hev b 6.02.

6.4.1 Centro espectral de fluorescencia

El efecto en el centro espectral de fluorescencia al interactuar con concentraciones crecientes de los diversos anticuerpos recombinantes fue determinado. La unión del scFv H8 y el anticuerpo monoclonal 6E7 promovieron un cambio hacia la región azul del espectro de emisión de 358 nm a 348 nm y 345 nm, respectivamente. (Figura 22). Cabe mencionar que los espectros de emisión de los anticuerpos tienen centros de masa alrededor de 335 nm, lo que indica que los posibles residuos Trp presentes en los mismos no se encuentran expuestos al disolvente de la misma forma

que en el alérgeno. Estos resultados indican la presencia de por lo menos dos epítomos diferentes o parcialmente diferentes, un epítomo involucra a los residuos aromáticos expuestos en la superficie, el otro no los incluye.

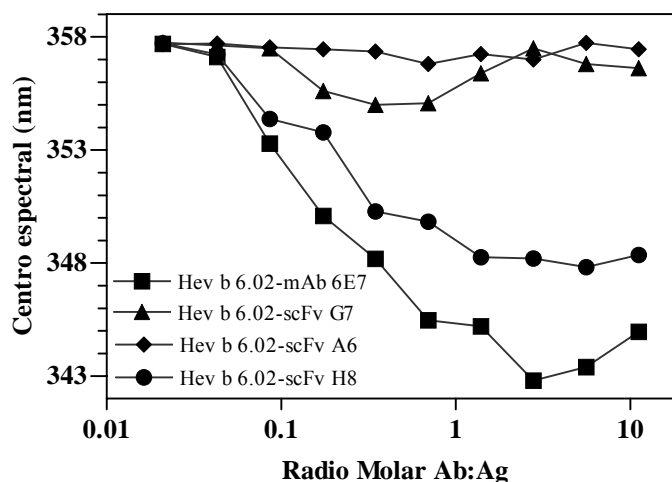
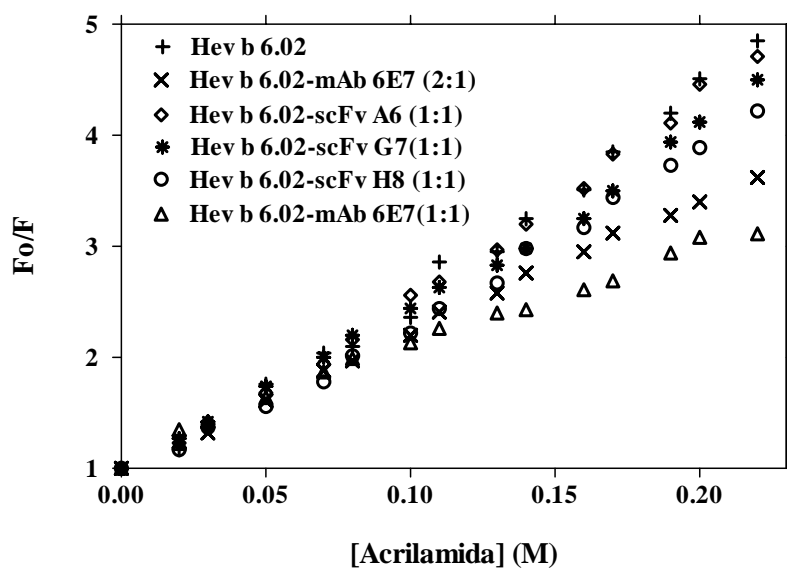


Figura 22. Efecto en la fluorescencia intrínseca de los triptófanos de Hev b 6.02 al interactuar con los anticuerpos recombinantes en diferentes relaciones molares.

El acoplamiento de los anticuerpos scFvs H8 y el AbM 6E7 con Hev b 6.02 promueve un cambio en el microambiente de los dos triptófanos presentes estableciendo una clara disminución en la polaridad de dicho ambiente¹²⁷. Esto indica que estos Abs cubren por lo menos una cara del anillo bencénico en los dos triptófanos, según los análisis de Vivian y Callis¹⁶⁵.

6.4.2 Apagamiento dependiente de acrilamida

En la Figura 23 se muestra el apagamiento de la señal de fluorescencia (mediante la ecuación de Stern Volmer^{166, 167}) de Hev b 6.02 y de los complejos Hev b 6.02-anticuerpos recombinantes, en presencia de concentraciones crecientes de acrilamida la cual es un quencher (apagador) no cargado.



Interacción	$K_{SV} (M^{-1})$
Hev b 6.02	17.7 ± 0.494
Hev b 6.02-AbM 6E7(2:1)	12.1 ± 0.149
Hev b 6.02-AbM 6E7(1:1)	9.35 ± 0.270
Hev b 6.02- scFv A6 (1:1)	17.2 ± 0.356
Hev b 6.02-scFv G7 (1:1)	15.5 ± 0.349
Hev b 6.02-scFv H8 (1:1)	15.4 ± 0.440

Figura 23. Gráficas de Stern-Volmer para los efectos en el apagamiento de Hev b 6.02 y sus complejos con anticuerpos recombinantes.

En este caso la presencia de los anticuerpos AbM 6E7, scFv H8 e incluso del scFv G7 provocaron una disminución de la constante de Stern Volver (K_{SV}), indicando que por lo menos un triptófano es menos accesible en presencia de estos anticuerpos a la interacción con la acrilamida, ya sea por cercanía estructural o interacción directa entre ellos.

6.5. Modelado por homología y acoplamiento simulado (docking) simulado de los complejos Hev b 6.02-scFvs.

Los modelos de los scFvs específicos a Hev b 6.02 fueron seleccionados considerando el resultado de menor energía y además fueron validados utilizando PROCHECK¹⁶⁸. El criterio de evaluación de los acoplamientos siguió el criterio de CAPRI (Critical Assessment of Predicted Interactions)¹³⁶, el cual se basa en la fracción de contactos nativos (fnat), que se define como el número de contactos correctos residuo-residuo del complejo predicho, dividido entre el número de contactos en el complejo blanco. El criterio de selección es alto si fnat es mayor o igual a 0.5, en nuestro caso fnat fue de 0.67 a 0.7 en los mejores resultados. El siguiente parámetro es L_{rms}, el cual define el desplazamiento de la cadena principal del ligando predicho contra las estructuras blanco al superponer éstas en relación al receptor (anticuerpo). El criterio de selección es alto cuando el L_{rms} es menor o igual a 1.0, el medio cuando va de 1 a 5 y el bajo aceptable cuando va de 5 a 10. Nuestros valores oscilan entre de 1.27 a 1.87, por lo que se encuentran en el rango medio. No se presentaron contactos desfavorables de acuerdo al análisis realizado en UCSF Chimera¹³³. Los modelos, así como los acoplamientos se muestran a lo largo del trabajo.

6.6 Interacción alérgeno-anticuerpo

Actualmente se han establecido las principales características que definen a la interacción antígeno-anticuerpo en comparación con otras interacciones. Estas involucran coincidencia geométrica, área de distribución de cada epítipo, presencia dominante de algunos residuos, entre otros^{52, 169-174}.

La interacción alérgeno-anticuerpo es el evento crucial de la respuesta alérgica y ha sido poco estudiada desde el punto de vista estructural. Como una forma de acercamiento a esta información se realizaron modelos de las interacciones entre los anticuerpos obtenidos y Hev b 6.02. Estos modelos sugieren la presencia de tres epítopos discontinuos con diferencias topológicas en el reconocimiento. Uno de ellos, Hev b 6.02-scFv H8 (Figura 24D), comprende un parche de residuos aromáticos expuestos al disolvente rodeados de algunos residuos polares; el segundo, Hev b 6.02-

scFv G7 (Figura 24B) establece un epítipo conformacional integrado por las regiones amino y carboxilo terminal, y el tercero Hev b 6.02-scFv A6 (Figura 24C) muestra un reconocimiento por la región carboxilo-terminal. En la Tabla 7 se muestran las características de dichas interacciones comparadas con los datos promedio reportados por Rubinstein y col. (2008) sobre las interacciones Ab-Ag¹⁷³. Los resultados obtenidos son consistentes con la mayoría de las características de los complejos anticuerpo-antígeno obtenidos mediante datos cristalográficos^{55, 173}. Los residuos de los diferentes anticuerpos, que predominan en la interacción con Hev b 6.02, son residuos aromáticos como Tyr y Trp, además de Ser, Asn, Arg y Asp, datos que concuerdan con reportes previos^{51, 55, 56}. También se observa en la Figura 24, que el scFv M8 presenta menos interacciones con Hev b 6.02 que el scFv madurado G7, aún cuando el área cubierta del alérgeno es mayor. Estos resultados explicarían el aumento en la afinidad de este anticuerpo, ya que ocurre un rearrreglo favorecido por los cambios obtenidos en la evolución dirigida, sobre todo aquellos ubicados en el CDR3H y el CDR2L.

En nuestro caso encontramos que los anticuerpos, que presentan mayor capacidad inhibitoria de la interacción IgE-Hev b 6.02 (Tabla 5), fueron aquellos que al menos establecen un contacto con los residuos aromáticos expuestos al disolvente (Trp 21 y Trp 23), indicando la importancia de estos residuos en el reconocimiento por anticuerpos. Actualmente existen varios reportes que destacan la importancia de los residuos aromáticos en los epítipos de alérgenos. Por ejemplo, algunos con actividad biológica de cisteín-proteasa, presentan en el centro de un epítipo IgE un residuo conservado de Tyr¹⁷⁴. Por otra parte, en los epítipos conformacionales de la albúmina 2-S SFA-8, alérgeno de las semillas de girasol¹⁷⁵ y en algunos alérgenos con actividad de serina-proteasas se ha reportado la presencia de Trp como residuos clave¹⁷⁶. Recientemente, Padavattan y col., (2007) reportaron la estructura Api m 2-Fab que muestra a un epítipo formado por un parche hidrofóbico (Trp y una Phe), flanqueados por residuos polares y cargados⁶³. Todos estos resultados indican que los residuos aromáticos participan en redes de interacciones cooperativas, tanto hidrofóbicas como polares importantes para interaccionar con anticuerpos IgE e IgG

En la Tabla 8 se muestran los residuos de Hev b 6.02 que forman parte de los epítipos reportados en estudios previos, así como la predicción de epítipos

conformacionales resultado de los acoplamientos realizados en este trabajo y por aquellos obtenidos en el servidor PPIPRED¹⁷⁷. Entre el 21% y 23% de los residuos involucrados en los epítomos lineales reportados por Beezhold y col⁹⁸ y Banerjee y col⁹⁹, no se encuentran expuestos al disolvente en la estructura 3D de este alérgeno; por lo cual residuos como Asn14, Asn15, Trp21, Trp23, Glu29, Pro33, Asp34, His 35 y Asn36 serían los más involucrados en la interacción con anticuerpos. Estos se localizan distribuidos en la parte media y carboxilo terminal de este alérgeno. Los residuos involucrados en el reconocimiento por IgEs reportados por Karisola y col¹⁰¹ se encuentran en más de dos caras de este alérgeno, en una de ellas se encuentran los residuos Arg5 y Gln38, en otra la Lys10 y en la última los residuos His35, Glu29 y Tyr30, indicando la ubicación de más dos epítomos conformacionales diferentes. Cabe señalar que la existencia de servidores que predicen los epítomos conformacionales, hasta el momento no son diseñados para el caso de la predicción de los epítomos de alérgenos, ya que su bases de datos no involucran dichas interacciones. Sin embargo, el acercamiento realizado por el servidor PPIPRED¹¹⁷ estableció que residuos como Asn14, Asn15, Trp21, Trp23, Glu29 y Tyr30 pueden ser importantes en la interacción de Hev b 6.02-anticuerpos. Por lo anterior, se establece que residuos ubicados en las regiones amino, central y carboxilo son importantes para el reconocimiento con las IgEs de suero de pacientes, pero no se establece las posibles interacciones entre estos y los residuos ubicados en el parátomo.

Los modelos obtenidos de la interacciones Hev b 6.02-anticuerpos recombinantes delimitan área cubierta, residuos involucrados y posibles interacciones, algunas de las cuales fueron comprobados por los experimentos *in vitro* antes mostrados. Dichos epítomos muestran (Tabla 8) la importancia de Lys10, Asn 14 y Asn 15, Asn40 y Lys42 en las interacciones con el parátomo del scFv G7; Arg5, Trp21, Trp23, Glu29 y Asp34 en las interacciones con el parátomo del scFv H8, así como los residuos de la parte carboxilo terminal que se estiman como importantes en la interacción con el scFv A6.

/

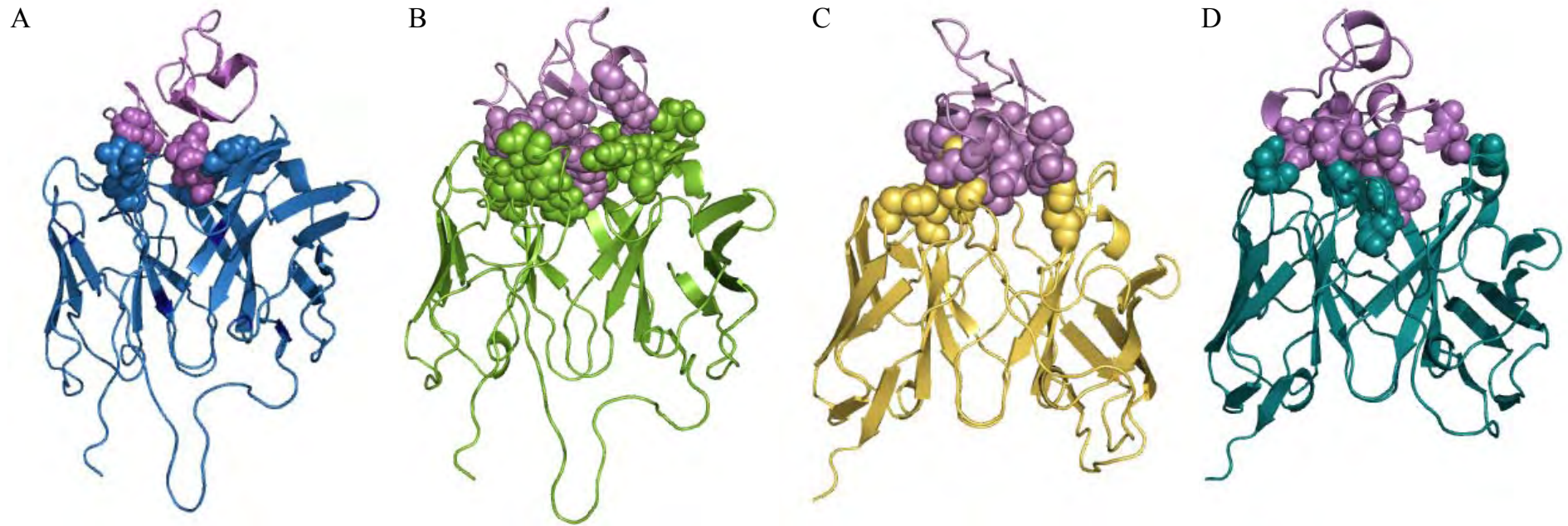


Figura 24. Modelos de la interacción entre los anticuerpos recombinantes y Hev b 6.02. Vista frontal de Hev b 6.02 (violeta). A) con scFv M8(azul), B) con scFv G7 (verde), C) con scFv H8 (amarillo) y D) con scFv A6(ciano oscuro). En representación de esferas se muestran los residuos involucrados por interacciones polares.

Tabla 7. Cuadro comparativo de las características en las interacciones Ab recombinante-Hev b 6.02

	Estudios de Rubinstein ¹⁷³	Interacción scFv M8-Hev b 6.02	Interacción scFv G7-Hev b 6.02	Interacción scFv A6-Hev b 6.02	Interacción scFv H8-Hev b 6.02
Tamaño del epítipo	15 a 25 aminoácidos	21	16	18	15
Área de distribución	600- 1000 Å ²	1100. 1 Å ²	788Å ²	852.2Å ²	614 Å ²
Interacciones Polares		Puentes de hidrógeno Leu 11- Ser 175 (L1), Asp 235 (L3) Asn 14-Asp 111 (H3) Asn 15- Tyr52 (H2)	Puentes de hidrógeno Gln2-His109 (H3) Lys10- Tyr196 (L2) Leu11-Gln193 (L2) Cys12- Ser175 (L1) Asn14- Tyr52 (H2), Asp111 (H3) Asn15- Tyr52 (H2), Arg59 (H2), Trp234 (L3) Ser26- Asp55 (H2) Asn40- Asp235 (L3) Lys42- Asp55 (H2) Puentes salinos Asp 42-Lys 55 (H2)	Puentes de hidrógeno Asn15- Asn168 (L1) Ser26- Ser106 (H3) Asp34- Asn55 (H2) Asn40- Tyr232 (L3) Cys41- Arg236 (L3) Lys42- Ser108 (H3) Asp 43- Arg236 (L3) Puentes salinos Asp43- Arg236 (L3)	Puentes de Hidrógeno Arg5-Gly103 (H3) Gln6-Gly103 (H3) Ser19- Tyr228 (L3) Gln20- Tyr228 (L3) Trp21- Tyr168 (L1) Trp23- Tyr168 (L1), Tyr228 (L3) Gln29-His163 (L1) Pro33- Tyr228 (H2) Asp34- Tyr59 (H2) Puentes salinos Glu29-His163(L1)
Interacciones hidrofóbicas		No determinada	Leu11-Leu174(L1) Leu16- Tyr52 (H2) Trp23-Met108(H3)	Pro33- Trp50 (H2) Pro-Leu57(H2)	Trp21- Tyr228 (L3) Trp23-104(H3), Tyr168 (L1), Tyr228 (L3) Tyr30- Tyr228 (L3)
Porcentaje del área del epítipo en contacto con los CDRs	90-100%	93.1%	100%	96.4%	95%
Tipo de epítipo	Conformacional 2 a 6 segmentos de 1 a 3 residuos	Conformacional 4 segmentos de tamaño variable	Conformacional 5 segmentos de tamaño variable	Conformacional 5 segmentos de tamaño variable	Conformacional 5 segmentos de tamaño variable
Tendencia de residuos predominantes involucrados en el epítipo	Tyr, Trp, residuos cargados y polares.	Residuos polares	Residuos polares y cargados	Residuos polares y cargados	Residuos aromáticos y polares
Estructura secundaria en epítopos	Asas	Asas	Asas	Asas	Asas y hoja Beta

En negritas se muestran los residuos en los anticuerpos que más frecuentemente se encuentran involucrados en este tipo de interacciones.

Tabla 8 Residuos involucrados en los epítomos lineales y conformacionales de Hev b 6.02.

Residuo	ASA (Å)	ASA≥80Å	Beezhold y col ¹⁰	Banerjee y col. ¹¹	Karisola y col ¹⁰¹	PPIPRED 1	PPIPRED 2	PPIPRED 3	scFv G7	scFv A6	scFv H8
GLU 1	110.7										
GLN 2	85.98										
CYS 3	0										
GLY 4	5.7										
ARG 5	178.09										
GLN 6	59.16										
ALA 7	21.7										
GLY 8	78.81										
GLY 9	41.74										
LYS 10	125.77										
LEU 11	114.9										
CYS 12	8.87										
PRO 13	98										
ASN 14	140.67										
ASN 15	124.56										
LEU 16	59.5										
CYS 17	8.93										
CYS 18	0										
SER 19	6.33										
GLN 20	41.1										
TRP 21	165.92										
GLY 22	0										
TRP 23	112.11										
CYS 24	26.83										
GLY 25	10.38										
SER 26	67.49										
THR 27	79.76										
ASP 28	90.27										
GLU 29	102.19										
TYR 30	50.89										
CYS 31	1.01										
SER 32	18.86										
PRO 33	79.98										
ASP 34	128.75										
HIS 35	77.38										
ASN 36	97.88										
CYS 37	17.19										
GLN 38	56.12										
SER 39	20.98										
ASN 40	58.92										
CYS 41	63.96										
LYS 42	98.26										
ASP 43	191.67										

Tabla 9. Cuadro comparativo de las características de las interacciones alérgeno-anticuerpo reportadas hasta el momento.

	Estudio de Rubinstein ¹⁷³	Interacción Fab-Bet v 1(1) ¹⁴⁴	Interacción Fab-Api m 2 (2) ⁶³	Interacción scFv-β lactoglobulina (3) ¹⁴⁸	Interacción Fab-Bla g 2 (4) ¹⁸⁵
Tamaño del epitopo	15 a 25 aminoácidos	22	16	28	24
área de distribución de los epitopos	600- 1000 Å ²	842	840	851	928.7
Porcentaje del área del epitopo en contacto con los CDR's	90-100%	100%	100%	100%	89.65%
Tipo de epitopo	Conformacional 2 a 6 segmentos de 1 a 3 residuos	Conformacional 5 segmentos de tamaño variable	Conformacional 2 segmentos de tamaño variable	Conformacional 6 segmentos de tamaño variable	Conformacional 5 segmentos de tamaño variable.
Residuos involucrados	Tyr, Trp, residuos cargados y polares.	Residuos polares y cargados	Trp en el centro del epitopo rodeado de Glu y Asp	Sitios ricos en Glu (7) y Lys, existe la presencia de un Trp y una Tyr.	Tyr en el centro del epitopo
Preferencia de estructura secundaria en epitopos	Asas	Asas flanqueadas de hojas beta	Asas	Hojas beta	Asas rodeadas de hojas beta

(1) Bet v 1, una proteína que transporta lípidos, es el un alérgeno de abedul blanco *Betula verrucosa*

(2) Api m 2, una hialuronidasa, es un alérgeno presente en el veneno de abejas *Apis mellifera*

(3) β-Lactoglobulina es un alérgeno de la leche bovina

(4) Bla g 2 es una aspártico-proteasa inactiva, un alérgeno proveniente de cucaracha *Blattella germanica*

Hasta la fecha se han resuelto más de 30 estructuras de alérgenos por difracción de rayos X y más de 10 por resonancia magnética nuclear (NMR), estableciendo una gran variedad de estructuras generadoras de una respuesta alérgica y la ausencia de patrones que determine las características estructurales que hacen de una proteína un alérgeno. Sin embargo, la presencia de funciones comunes en una gran cantidad de alérgenos establece la posibilidad de que la función intrínseca de una proteína este estrechamente vinculada a la modulación de la respuesta inmune y la estimulación en la producción de IgEs. Las principales funciones encontradas en las proteínas alérgicas incluyen enzimas hidrolíticas, proteínas que unen ligandos, y que además estén involucradas con mecanismos de defensa. Hev b 6.02 es una lectina que une oligómeros de N-acetilglucosamina y se encuentra relacionada en procesos de defensa de la planta.

Algunas de las proteínas que unen ligandos presentan en el sitio de unión zonas ricas en residuos hidrofóbicos sobre todo aromáticos, como en el caso de algunas proteínas de plantas que transportan lípidos (Bet v 1 del abedul blanco y Pru av 1 de la cereza)¹⁷⁸, el sitio de unión a poli-L-prolina de profilinas (Hev b 8 del látex y Bet v 2 del abedul)¹⁷⁹ lipocalinas animales (Can f 1 y Can f 2 de perro, Rat n 1 de rata, Bos d 5 de vaca, Equ c 1 y Equ c 2 de caballo)¹⁸⁰⁻¹⁸², y enzimas^{63, 174, 175, 181}. De manera general los residuos hidrofóbicos se encuentran ocultos al disolvente, pero pueden exponerse por la pérdida de su ligando específico⁶⁴ y en ocasiones aún cuando están presentes, como en el caso de ligandos pequeños⁶⁵. Estos resultados concuerdan con reportes recientes que indican que el sistema inmune pudo haber evolucionado para detectar también regiones hidrofóbicas de proteínas inmunogénicas, las cuales consisten principalmente de parches ricos en residuos aromáticos^{63, 183, 184}. En la Tabla 9 se muestran algunas de las características de las interacciones alérgeno-anticuerpo, reportadas hasta el momento, obtenidos de datos estructurales^{63, 148, 151, 185}. Notablemente, se observa que los epítomos conformacionales se encuentran en zonas protuberantes, mayoritariamente asas, en donde existe la presencia de residuos aromáticos.

7 CONCLUSIONES GENERALES

La elaboración de anticuerpos específicos, contra los principales alérgenos reportados, permite crear herramientas útiles en el proceso de purificación y detección de dichas proteínas. No obstante, estos pueden ayudar a la determinación de los epítomos conformacionales que interactúan con los anticuerpos de pacientes, al presentar la característica de inhibir dicha interacción ya sea parcial o totalmente. En este trabajo se obtuvo una batería de anticuerpos funcionales provenientes de dos procesos de selección diferente, lo cual aseguró encontrar repertorios heterogéneos que interactuaron con el alérgeno Hev b 6.02. Estos anticuerpos recombinantes mostraron diferente capacidad inhibitoria de la interacción alérgeno-IgE y un reconocimiento hacia más de una región de la estructura 3D en este alérgeno. Estas características los hacen imitar a aquellos anticuerpos obtenidos por un proceso de respuesta policlonal que depende de la predisposición genética de los individuos y la naturaleza del alérgeno. Cabe destacar que se observó un efecto sinérgico en la capacidad inhibitoria de la interacción IgE-Hev b 6.02 al utilizar una mezcla de los anticuerpos obtenidos. Es importante mencionar que aún cuando los fragmentos variables de cadena sencilla provenían de un banco no inmune presentaron una alta similitud con regiones variables de IgEs de pacientes alérgicos a diferentes proteínas, lo que además de corroborar

reportes previos, podría explicar la presencia de algunos procesos de reactividad cruzada entre ciertos alergenos de plantas.

En este trabajo se identificaron residuos, por medio de pruebas inmunológicas y fisicoquímicas, que parecen ser claves en la interacción entre los anticuerpos recombinantes y las IgE de suero de pacientes, esta información fue confirmada por los ensayos de acoplamiento realizados *in silico*. Estos residuos, ubicados esencialmente en dos zonas de Hev b 6.02, comprenden el sitio de reconocimiento a carbohidratos y las partes cercanas a las regiones amino y carboxilo terminal, con lo que se establece que las discrepancias observadas en reportes previos son producto de análisis unitario.

Por ultimo, el aumento en la afinidad del scFv M8 no incrementó la capacidad inhibitoria de este anticuerpo. Esto último indicaría que dicha capacidad no está involucrada con la afinidad sino con la especificidad del sitio de reconocimiento, haciendo a esta última característica, la más importante en el proceso de selección de anticuerpos bloqueadores hacia alergenos.

El conocimiento de los epítomos de Hev b 6.02 será fundamental en el diseño racional de variantes hipoalergénicas, cuyas modificaciones estén basadas en la estructura de los determinantes antigénicos. Por otra parte, la producción de anticuerpos recombinantes específicos que compitan con las IgEs de suero de pacientes podría tener dos aplicaciones principales, una como herramienta de diagnóstico y la segunda permitiría el desarrollo de inmunoterapia alergeno-específica.

8 PERSPECTIVAS

El presente estudio aporta información relevante en relación a la interacción y reconocimiento de los diferentes epítomos del alérgeno Hev b 6.02 con diversos anticuerpos; sin embargo, aún hay varias cuestiones por investigar. Estudios estructurales de los complejos Hev b 6.02-scFv H8, Hev b 6.02-scFv G7 y Hev b 6.02-scFv A6, por medio de cristalografía de rayos X o bien estudios por resonancia magnética nuclear, nos permitiría analizar a detalle las interacciones alérgeno-anticuerpo y determinar con mayor precisión los epítomos conformacionales de Hev b 6.02, así como los residuos determinantes en el reconocimiento.

De igual forma, es importante determinar la capacidad bloqueadora *in vitro* e *in vivo* de los anticuerpos obtenidos en este estudio, a través de la inhibición de la liberación de mediadores de la inflamación en basófilos y por estudios de inhibición en roedores, respectivamente. Esta información permitirá analizar la posibilidad de que estos anticuerpos sean utilizados como herramientas terapéuticas.

9 REFERENCIAS

1. Janeway, C. Travers, P., Walport, M., Capra, D. (2000) *Inmunobiología. El sistema inmunitario en condiciones de salud y enfermedad*. 4ª. Edición. Editorial Masson. pp. 461-488.
2. Roitt, I.; Brostoff, J.; Male, D. (1998) *Immunology*. 5a. edición. Editorial Mosby, UK pp.301-305.
3. Coombs RRA, Gell, PHD. (1963) The classification of allergic reactions underlying disease. *Clinical aspects of Immunology*. Blackwell Scientific Publications: Oxford, 317-37.
4. Holgate, S., Church, M., Lichtenstein, L. (2001). *Allergy*. Segunda edición. Editorial Mosby. Pp 3-16.
5. Thomas, WR., Hales, BJ., Smith, WA. (2005) Structural biology of allergens. *Curr Allergy Asthma Rep* 5(5):388-93
6. Romagnani, S. (2004) Immunological influences on allergy and the TH1/TH2 balance. *J Allergy Clin Immunol* 113(3):395-400.
7. Prussin, C., Metcalfe, D. (2003) IgE, mast cells, basophils and eosinophils. *J Allergy Clin Immunol* 111 (2):S486-94.
8. Corry, DB., Kheradmand, F. (1999). Induction and regulation of the IgE response. *Nature*. S402:B18-23.
9. Romagnani, S. (2004) Hygiene hypothesis. *Immunology*. 112:352-363
10. Novack, N., Bieber, T., Leung, DY. (2003) Immune mechanisms leading to atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 112(6) S128-39
11. Rivera, J. (2002) Molecular adapters in Fc(epsilon)RI signaling and the allergic response. *Curr Opin Immunol* 14(6): 688-93
12. Lambrecht, BN. (2005) Dendritic cells and the regulation of the allergic immune response. *Allergy*. 60(3): 271-82
13. Wollenberg, A., Bieber, T. (2000) Atopic dermatitis: from the genes to skin lesions. *Allergy*. 55(3):205-13.
14. Furuno, T., Nakanishi, M. (2005) Live cell imaging to study signaling molecules in allergic reactions. *Biol Pharm Bull*. 28(9):1551-9
15. Drunen, CM., Fokkens, WJ. (2006) Basophils and mast cells at the centre of the immunological response. *Allergy*. 61(3):273-5

16. Gelfand, EW. (2002) Role of histamine in the pathophysiology of asthma: immunomodulatory and anti-inflammatory activities of H1-receptor antagonists. *Am J Med.* 113:2S-7S.
17. Umetsu, DT., Dekruyff, RH. (1997) Th1 and Th2 CD4+ cells in the pathogenesis of allergic disease. *P.S.E.B.M.* 215:11-20.
18. Ring, J., Kramer, U., Schafer, T., Behrendt, H. (2001) Why are allergies increasing? *Current Opinion in Immunology.* 13: 701-708
19. Noverr, MC., Huffnagle, GB. (2005) The 'microflora hypothesis' of allergic diseases. *Clin Exp Allergy.* 35(12):1511-20
20. Ivanciuc, O., Schein, CH., Braun, W. (2003) SDAP: Database and Computational Tools for Allergenic Proteins. *Nucleic Acids Res.*, 31, 359-362.
21. Schein, C., Ivanciuc, O., Braun, W. (2007) Bioinformatics approaches to classifying and predicting cross-reactivity. *Immunol Allergy Clin N Am.* 27, 1-27.
22. Chapman, M., Pómes, A., Breiteneder, H., Ferreira, F. (2007) Nomenclature and structural biology of allergens. *J Allergy Clin Immunol.* 119, 414-20.
23. Vercelli, D. (2008) Discovering susceptibility genes for asthma and allergy. *Nature Reviews Immunology.* 8: 169-182.
24. Bufe A. (1998) The biological function of allergens relevant for the induction of allergic diseases. *Int Arch Allergy Immunol* 117: 215-219.
25. Aalberse RC. (2006) Structural features of allergenic molecules. *Chem Immunol Allergy.* 91:134-146
26. Rouvinen, J., Rautiainen, J., Virtanen, T., Zeiler, T., Kauppinen, J., Taivainen, A., Mantyjarvi, R. (1999) Probing the molecular basis of allergy. three-dimensional structure of the bovine lipocalin allergen Bos d 2. *J Biol Chem.* 274(4):2337-43.
27. Aalberse, RC. (2000) Structural biology of allergens. *J. Allergy and Clinical Immunology.*106: 228-238.
28. Furmonaviciene R, Shakib F. (2001) The molecular basis of allergenicity: comparative analysis of the three dimensional structures of diverse allergens reveals a common structural motif. *Mol Pathol.* 54(3):155-9.
29. Aalberse RC, Platts-Mills TA. (2004) How do we avoid developing allergy: modifications of the TH2 response from a B-cell perspective. *J Allergy Clin Immunol.* 113(5):983-6
30. FAO/WHO. (2003) Report of the fourth session of the codex ad hoc intergovernmental task force on foods derived from biotechnology. (<http://www.codexalimentarius.net/download/report/46/AI0334ae.pdf>).

31. Hileman, RE., Silvanovich, A., Goodman, RE., Rice, EA., Holleschak, G., Astwood, J.D., Hefle, S.L. (2002) Bioinformatic methods for allergenicity assessment using a comprehensive allergen database. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 128, 280–291
32. Kleter, GA., Peijnenburg, AA. (2002) Screening of transgenic proteins expressed in transgenic food crops for the presence of short amino acid sequences identical to potential IgE-binding linear epitopes of allergens *BMC Struct Biol* 12,2:8: 28-39
33. Van Regenmortel, MHV. (1998) From absolute to exquisite specificity. Reflections on the fuzzy nature of the species, specificity and antigenic sites. *J Immunol Methods* 216; 37-48.
34. Padlan, E. (1994) Anatomy of the antibody molecule. *Molecular Immunology* 31: 169.
35. Fischmann, TO., Bentley, GA., Bhat, TN., Boulot, G., Mariuzza, RA., Phillips, SEV., Tello, D., R.J. Poljak. (1991). Crystallographic Refinement of the Three-dimensional Structure of the FabD1.3-Lysozyme Complex at 2.5-Å Resolution. *J. Biol. Chem.* 266: 12915-12920.
36. Borrebaeck, C. (1995) Antibody engineering. Second Edition Oxford University Press. 3-51.
37. Hoogenboom H (2004) Selecting and screening recombinant antibody libraries. *Nature Biotechnology* 23: 1105-1116
38. Tomlinson, IM., Walter, G., Marks, JD., Llewelyn, MB., Winter, G. (1992) The repertoire of human germline VH sequences reveals about fifty groups of VH segments with different hypervariable loops, *J Mol Biol.* 227, 776-98.
39. Cox, JP., Tomlinson, IM., Winter, G. (1994) A directory of human germ-line V kappa segments reveals a strong bias in their usage. *Eur J Immunol.* 24, 827-36.
40. Barbie, V., Lefranc, M. P. (1998) The human immunoglobulin kappa variable (IGKV) genes and joining (IGKJ) segments, *Exp Clin Immunogenet.* 15, 171-83.
41. Winter, G. (1998) Synthetic human antibodies and a strategy for protein engineering, *FEBS Lett.* 430, 92-4.
42. Wagner, SD., Neuberger, MS. (1996) Somatic hypermutation of immunoglobulin genes, *Annu Rev Immunol.* 14, 441-57.
43. Li, Z., Woo, C., Iglesias-Ussel, M., Ronai, D., Scharff, M. (2004) The generation of antibody diversity through somatic hypermutation and class switch recombination. *Genes and Dev.* 18, 1-11
44. Poole, J., Matangkasombut, P., Rosenwasser, L. (2004) Targeting the IgE molecule in allergic and asthmatic diseases: Review of the IgE molecule and clinical efficacy. *J Allergy Clin Immunol.* 115, S376-S385
45. Sutton, BJ., Gould, HJ. (1993) The human IgE network. *Nature.* 366:421-8.

46. Mekori, YA.(1996) Introduction to allergic diseases. *Crit Rev Food Sci Nutr.* S36:S1-18.
47. Wan, T., Beavil, R., Fabiane, S., Beavil, A., et al (2002) The crystal structure of IgE Fc reveals an asymmetrically bent conformation. *Nature Immunology.* 3 (7) 681-686.
48. Benjamin, DC., Perdue, SS. (1996) An analysis of site-directed mutagenesis in epitope mapping. *Methods: A Companion Meth Enzymol* 9, 508-515.
49. Lehrer, SB., Horner, WE., Reese, G. (1996) Why are some proteins allergenic? Implications for biotechnology. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 36(6):553-64.
50. Irving, M., Pan, O., Scott, J. (2001) Random-peptide libraries and antigen-fragment libraries for epitopes mapping and the development of vaccines and diagnostics. *Current Opinion in Chemical Biology.*5:314-324
51. Padlan, EA. (1990) On the nature of antibody combining sites: unusual structural features that may confer on these sites an enhanced capacity for binding ligands. *Proteins.* 7(2):112-24
52. Lo Conte, L., Chothia, C., Janin, J. (1999) The atomic structure of protein-protein recognition sites. *J Mol Biol.* 285(5):2177-98.
53. Sundberg, EJ., Urrutia, M., Braden, BC., Isern, J., Tsuchiya, D., Fields, BA., Malchiodi, EL., Tormo, J., Schwarz, FP., Mariuzza, RA. (2000) Estimation of the hydrophobic effect in an antigen-antibody protein-protein interface. *Biochemistry.* 39(50):15375-87
54. Li, Y., Huang, Y., Swaminathan, CP., Smith-Gill, SJ., Mariuzza, RA. (2005) Magnitude of the hydrophobic effect at central versus peripheral sites in protein-protein interfaces. *Structure.*13(2):297-307
55. Davies, DR., Cohen, GH. (1996) Interactions of protein antigens with antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93(1):7-12.
56. Sundberg, EJ., Mariuzza, RA.(2002) Molecular recognition in antibody-antigen complexes. *Adv Protein Chem.* 61:119-60.
57. Takai, T., Yuuki, T., Okumura, Y., Mori, A., Okudaira, H. (1997) Determination of the N- and C-terminal sequences required to bind human IgE of the major house dust mite allergen Der f 2 and epitope mapping for monoclonal antibodies. *Mol Immunol.* 34:255-61
58. Ramachandran, H., Banerjee, B., Greenberger, PA., Nelly, KJ., Fink, JN., Kurup, VP. (2004) Role of C-terminal cysteine residues of *Aspergillus fumigatus* allergen Asp f 4 in immunoglobulin E binding. *Clin Diag lab Immunol.* 11(2):261-5.
59. Droupadi, PR., Varga, JM., Linthicum, DS. (1994) Mechanism of allergenic cross-reactions--IV. Evidence for participation of aromatic residues in the ligand binding site of two multi-specific IgE monoclonal antibodies. *Mol Immunol.* 31(7):537-48

60. Furmonaviciene, R., Sutton, B., Glaser, T., et al. (2005) An attempt to define allergen-specific molecular surface features: a bioinformatic approach. *Bioinformatics*. 2005 21(23):4201-4.
61. Mine, Y., Rupa, P. (2003) Fine mapping and structural analysis of immunodominant IgE allergenic epitopes in chicken egg ovalbumin. *Protein Eng*. 16(10):747-52.
62. Maglio, O., Saldanha, JW., Vrtala, S., Spitzauer, S., Valenta, R., Pastore, A. (2002) A major IgE epitope-containing grass pollen allergen domain from Phl p 5 folds as a four-helix bundle. *Protein Eng*. 15(8):635-42.
63. Padavattan, S., Schirmer, T., Schmidt, M., Akdis, C., Valenta, R., Mittermann, I., Soldatova, L., Slater, J., Mueller, U., Markovic-Housley, Z., (2007). Identification of a Bcell epitope of hyaluronidase, a major bee venom allergen, from its crystal structure in complex with a specific Fab. *J Mol Biol*. 368, 742-52.
64. Valenta, R., Kraft, D. (2001) Recombinant allergen molecules: tools to study effector cell activation. *Immunological Reviews*. 179, 119-127.
65. Breiteneder, ., Mills, R. (2005). Molecular properties of food allergens. *J. Allergy Clin Immunol*. 115, 14-23
66. Reese, G., Ayuso, R., Leong-Kee, SM., Plante, M., Lehrer, S. (2001) Characterization and identification of allergen epitopes. Recombinant peptide libraries and synthetic, overlapping peptides. *Journal of Chromatography B*. 756, 157-163.
67. Sussman, G., Beezhold, D., Kurup, V. (2002) Allergens and natural rubber proteins. *J Allergy Clin Immunol*. 110:S33-9
68. Kelly, K. (2001) Natural rubber latex induced anaphylaxis. FAAAAI
69. Kurup, V., Fink, J. (2001) The spectrum of immunologic sensitization in latex allergy. *Allergy*. Vol. 56. No. 1 pp. 2-12.
70. Turjanmaa, K., Alenius, H., Mäkinen-Kiljunen, S., Reunala, T., Palosuo, T. (1996) Natural rubber allergy. *Allergy*. 51:593-602.
71. Turjanmaa, K. (1988). Latex glove contact urticaria. Thesis. University of Tampere, Acta Universitatis Tamperensis Ser A Vol 254, 1-86, Tampere, Finland
72. Raulf-Heimsoth, M., Rozynek, P., Brüning, T., -P.Rihs, H. (2004). Characterization of B- and T-cell responses and HLA-DR4 binding motifs of the latex Hev b 6.01 (prohevein) and its post-transcriptionally formed proteins Hev b 6.02 and Hev b 6.03. *Allergy*. 59, 724-733.
73. Ownby, D. (2002) A history of latex allergy. *J Allergy Clin Immunol*. 110:S27-32).
74. Chiu, AM., Kelly, KJ. (2005) Anaphylaxis: drug allergy, insect stings, and latex. *Immunol Allergy Clin North Am*. 25(2).389-405.

75. Lopes, RA., Benatti, MC., Zollner, RL. (2004) A review of latex sensitivity related to the use of latex gloves in hospitals, *AORNJ* 80: 64-71
76. Chardin, H., Mayer, C. Desvaux, F., et al. (1999) Latex allergy: characterization of major allergens an isotypic expression. *Allergy*. 54:872-877.
77. WHO/IUIS' allergen list:<http://www.allergen.org>
78. Poley, GE., Slater, JE. (2000) Latex allergy. *J Allergy Clin Immunol*. 105, 1054-62.
79. Kurup, VP., Sussman, GL., Yeang, HY., Elms, N., Breiteneder, H., Arif, SA., Kelly, KJ., Bansal, NK., Fink, JN. (2005) Specific IgE response to purified and recombinant allergens in latex allergy. *Clin Mol Allergy*. 10; 3:11.
80. Camacho-Ibarra, VC., López-García, AL., Galindo-García, JA., Paz-Martínez, D., Papaqui-Tapia, JS. (1997). Prevalence of latex hypersensitivity among medical personnel. *Rev Alerg Mex*. 44, 150-2.
81. Moreno, HL., Avila, E., Angulo, Y., Portillo, J., Moreno, L. Reza, G., Hernández, V. Levario, M. (2005) Frequency in allergy to proteins of latex in health care workers. *Allergol Immunopathol (Madr)*. 33, 210-3.
82. Blanco, C. (2003) Latex-fruit syndrome. *Currenr Allergy and Asthma Reports*. 3: 47-53.
83. Blanco, C., Carillo, T., Castillo, R., Quilraltae, J., Cuevas, M. (1994) Latex allergy: Clinical features and cross-reactivity with fruits. *Ann Allergy*. 73:309-14.
84. Wagner, S., Breiteneder, H. (2002) The latex-fruit syndrome. *Biochemical Society*. 30, 935-940.
85. Raulf-Heimsoth, M., Kespohl, S., Sander, I., Bruning, T., Rihs, HP. (2007) Cross-reactivity of food allergens with latex-diagnostic and clinical implications. *Current Allergy and clinical immunology*. 2, 88-90.
86. Chen, Z., Posch, A., Cremer, R., Raulf-Heimsoth, M., Baur, X. (1998) Identification of hevein (6.02) in *Hevea* latex as a major cross-reacting allergen with avocado fruit in patients with latex allergy. *J Allergy Clin immunol*. 102:476-81.
87. Diaz-Perales, A., Collada, C., Blanco, C., Sánchez-Monge, R., Carillo, T., Aragoncillo, C., Salcedo, G. (1998) Class I chitinases with hevein-like domain, but not class II enzymes, are relevant chestnut and avocado allergens. *J Allergy Clin Immunol*. 102:127-33.
88. Mikkola, J., Alenius, H., Kalkkinen, N., Turjanmaa, K., Palosuo, T., Reunala, T. (1998) Hevein-like protein domains as a possible cause for allergen cross-reactivity between latex and banana. *J Allergy Clin Immunol*. 102:1005-12.
89. Posch, A., Wheeler, CH., Chen, Z., et al.(1999) Class I encochitinase containing a hevein domain is the causative allergen in latex associated avocado allergy. *Clin Exp Allergy*. 29:667-72.

90. Sánchez-Monge, R., Blanco, C., Diaz-Perales, A., Collada, C., Caprillo, T., Arangoncillo, C., Salcedo, G. (1999) Isolation and characterization of major banana allergens: identification as fruit class I chitinases. *Clin Exp Allergy*. 29:673-80.
91. Breiteneder, H., Ebner, C. (2000) Molecular and biochemical classification of plant-derived food allergens. *J Allergy Clin Immunol*. 106:27-36.
92. Yeang, HY., Hamilton, RG., Bernstein, DI., Arif, S., Chow, S., Loke, H., Heimsoth, MR., Wagner, S., Breiteneder, H., Biagini, RE. (2006) Allergen concentration in natural rubber latex. *Clinical and Experimental Allergy*. 36(8); 1078
93. Palosuo, T., Lehto, M., Kotovouri, A., Nalkkinen, N., Blanco, C., Pozaz, P., Carrillo, T., Hamilton, R., Alenius, H., Reunala, T., Turjanmaa, K. (2007) Latex allergy: low prevalence of immunoglobulin E to highly purified proteins Hev b 2 and Hev b 13. *Clin Exp Allergy*. 37, 1502-1511.
94. Soedjanaatmadja, UM., Subroto, T., Beintema, JJ. (1995) Processed products of the hevein precursor in the latex of the rubber tree (*Hevea brasiliensis*). *FEBS Lett*. 24;363(3):211-3.
95. Chen, Z., Posch, A., Lohaus, C., et al (1997) Isolation and identification of hevein as a major IgE-binding polypeptide in *Hevea* latex. *J Allergy Clin Immunol*. 99:402-409.
96. Ylitalo, L., Alenius, H., Turjanmaa, K. (1998) IgE antibodies to prohevein, hevein, and rubber elongation factor in children with latex allergy. *J Allergy Clin Immunol*. 102:659-664.
97. Gidrol, X. (1994) Hevein –a lectin- like protein from *Hevea brasiliensis* (rubber tree) is involved in the coagulation of latex. *J Biol Chem*. 269(12): 9278-83.
98. Beezhold, D., Kostyal, D., Sussman, G., et al (1997) IgE epitope analysis of the hevein preprotein; a major latex allergen. *Clin Exp Immunol*. 108:114-121.
99. Banerje, B., Wang, X., Kelly, K., Fink, JN., Sussman, JN., Kurup, VP. (1997) IgE from latex-allergic patients binds to cloned and expressed B cell epitopes of prohevein. *J Immunol*. 159(11):5724-32.
100. Karisola, P., Alenius, H., Mikkola, J., Kalkkinen, N., Helin, J., Pentikainen, OT., Repo, S., Reunala, T., Turjanmaa, K., Jhonson, M., Palosuo, T., Kulomaa, S. (2002). The major conformational IgE-binding epitopes of hevein (Hev b 6.02) are identified by a novel chimera-based allergen epitope mapping strategy. *J Biol Chem*. 227, 22656-22661.
101. Karisola, P., Mikkola, J., Kalkkinen, N., Airene, K., Laitinen, OH., Repo, S., Pentikainen, OT., Reunala, T., Turjanmaa, K., Jonhson, M., Palosuo, T., Kulomaa, M., Alenius, H. (2004). Construction of hevein (Hev b 6.02) with reduce allergenicity for immunotherapy of latex allergy by comutation of six amino acid residues on the conformational IgE epitopes. *J Immunology*. 172, 2621-2628.

102. Drew, A., Eusebius, N., Kenins, L., D. De Silva, H., Suphioglu, C., Rolland, J., O'Heir, R., 2004. Hypoallergenic variants of the major latex allergen Hev b 6.01 retaining human T lymphocyte reactivity. *J Immunol.* 173, 5872-5879.
103. Reyes-López, CA., Hernández-Santoyo, A., Pedraza-Escalona, M., Mendoza, G., Hernández-Arana, A., Rodríguez-Romero, A. (2004) Insights into a conformational epitope of Hev b 6.02 (hevein). *Biochem Biophys Res Commun.* 314(1):123-30.
104. Reyes-López CA, Pedraza-Escalona M, Mendoza G, Hernández-Santoyo A, Rodríguez-Romero, A. 2006. A single amino acid substitution on the surface of a natural hevein isoform (Hev b 6.0202), confers different IgE recognition. *FEBS Lett.* 2006 580, 2483-7.
105. Edwards, MR., Collins, Am., Ward, RL. (2001). The application of phage display in allergy research: Characterization of IgE, Identification of allergens and development of novel therapeutics. *Current Pharm Biotech.* 2: 225-240.
106. Davies, J., O'Heir, R., Suphioglu, C. (2000). Use of phage display technology to investigate allergen-antibody interactions. *J Allergy Clin Immunol.* 105, 1085-1092.
107. Aalberse, RC., Van Ree, R. (2000) Monoclonal antibody assays for allergens: Pick your antibodies with care! *J Allergy Clin Immunol.* 106, 625-6
108. Flicker, S., Valenta, R. (2003) Renaissance of the blocking antibody concept in type I allergy. *Int Arch Allergy Immunol.* 132, 13-24.
109. Valenta, R.,Almo S, Ball T, Dolecek C, Steinberger P, Laffer S, Eibensteiner P, Flivker S, Vrtala S, Spitzauer S, Valenta P, Denepoux S, Kraft D, Banchereau J, Lebecque S. 1998. The immunoglobulin E-allergen interaction: a target for therapy of type I allergic diseases. *Int Arch Allergy Immunol.* 116, 167-176.
110. Laukkanen ML, Mäkinen-Klijunen S, Isoherranen Km Hahtela T, Söderlund H, Takkinen K. (2003). Hevein-specific recombinant IgE antibodies from human single-chain antibody phage display libraries. *J Immunol Methods.* 278(1-2):271-81
111. Rodríguez-Romero, A.; Ravichandran, KG, Soriano-Garcia M. (1991) Crystal structure of hevein at 2.8 Å resolution. *FEBS Lett.* Vol. 291No. 2 pp. 307-9.
112. Wisdom, GB. (1994) Peptide antigens. A practical approach. Oxford University Press. Pp 89.
113. Köhler G, Milstein C. 1975 Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature.* 256(5517):495-7.
114. Harlow, E., Lane, D. (1988) Antibodies. A laboratory manual. Primera Edición. Cold Spring Harbor Laboratory. USA.
115. Smith, GP. (1985) Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science;* 228:1315-7.

116. Azzasy, H. (2002) Phage display technology: clinical applications and recent innovations. *Clin Biochem* 35:425-445.
117. O'Brien, Aiken R. (2002) Antibody phage display: Methods and protocols. *Methods in molecular biology*. Humana Press. USA. pp259-267
118. Kay, B., Winter, J., McCafferty, J. (1996) Phage display of peptides and proteins. A laboratory manual. Academic Press. USA. pp 55-65.
119. Riaño-Umbarila, L., Juárez-González, R., Olamendi-Portugal, T., Ortíz-León, M., Possani, LD., Becerril, B. (2005) A strategy for the generation of specific human antibodies by directed evolution and phage-display. An example of a single-chain antibody fragment that neutralizes a major component of a scorpion venom. *FEBS Vol. 272*. pp. 2591-2601.
120. Marks, JD., Hoogenboom, HR., Bonnert, TP., McCafferty, J., Griffiths, AD., Winter, G., 1991. By-passing immunization: human antibodies from V-gene libraries displayed on phage. *J Mol Biol* 222, 581-597.
121. Leung, DW., Chen, E., Goeddel, DV., 1989. A method for random mutagenesis of a defined DNA segment using a modified polymerase chain reaction. *Technique* 1, 11-15.
122. Cadwell, RC., Joyce, GF., 1992. Randomization of genes by PCR mutagenesis. *PCR Methods Appl* 2, 28-33.
123. Cirino, P., Mayer, K., Umeno, D.. (2003) Directed evolution library creation. *Methods and protocols*. Vol. 231 pp. 3- 10.
124. Schier, R., Marks, JD., Wolf, EJ., Apell, G., Wong, C., McCartney, JE., Bookman, MA., Huston, JS., Houston, LL., Weiner, LM., 1995. In vitro and in vivo characterization of a human anti-c-erbB-2 single-chain Fv isolated from a filamentous phage antibody library. *Immunotechnology*. 1,73-81.
125. Wiedemann, P., et al (1996) Molecular and structural analysis of a continuous birch profilin epitope defined by a monoclonal antibody. *Journal of Biological Chemistry* 271; 29915-29921.
126. Friguet, B., et al. (1985) Measurements of the true affinity constant in solution of antigen-antibody complexes by enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of immunological methods*, 77; 305-319.
127. Lakowicz, JR., 1986. Fluorescence studies of structural fluctuations in macromolecules as observed by fluorescence spectroscopy in the time, lifetime, and frequency domains. *Methods Enzymol*. 131, 518-67.

128. Komiyama, T., Miwa, M., 1980. Fluorescence Quenching as an Indicator for the Exposure of Tryptophyl Residues in *Streptomyces subtilisin* Inhibitor. J. Biochem. 87,1029-1036
129. Whitelegg, N., Rees, A., 2000. WAM: an improved algorithm for modeling antibodies on the WEB. Protein Engineering. 13, 819-824.
130. Šali, A. and Blundell, TL., 1993.. Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. J. Mol. Biol. 234, 779-815
131. Lambert, C., Leonard, N., De Bolle X, Depiereux E.,2002. ESyPred3D: Prediction of proteins 3D structures. Bioinformatics. 18, 1250-1256.
132. Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. & Lipman, D.J. (1990) "Basic local alignment search tool." J. Mol. Biol. 215:403-410.
133. Meng EC, Pettersen EF, Couch GS, Huang CC, Ferrin TE. Tools for integrated sequence-structure analysis with UCSF Chimera. BMC Bioinformatics. 2006 Jul 12;7:339
134. Tovchigrechko, A., Vakser, IA., 2006. GRAMM-X public web server for protein-protein docking. Nucleic Acids Res. 34, W310-4.
135. Wiehe K, Pierce B, Mintseris J, Tong WW, Anderson R, Chen R, Weng Z.(2005) ZDOCK and RDOCK performance in CAPRI rounds 3, 4, and 5. Proteins. 60:207-13.
136. Gray JJ, Moughon S, Wang C, et al (2003) Protein-protein docking with simultaneous optimization of rigid-body displacement and side-chain conformations: J Mol Biol. Aug 1;331(1):281-99.
137. DeLano, W.L. The PyMOL Molecular Graphics System (2002) DeLano Scientific, Palo Alto, CA, USA. <http://www.pymol.org>
138. KABAT, E.A. et al (1991) Sequences of proteins of immunological interest, 5th ed. National Institutes of Health, Bethesda, USA.
139. Lefranc, MP., 2003. IMGT, the international ImMunoGeneTics database. Nucleic AcidsRes. 31, 307-310.
140. Denepoux, S., Eibensteiner, P., Steinberger, P., Vítala, S., Visco, V., Sèller, A., 2000. Molecular characterization of human IgG monoclonal antibodies specific for the major birch pollen allergen Bet v 1. Anti-allergen IgG can enhance the anaphylactic reaction. FEBS Lett. 465, 39-46.
141. Flicker, S., Steinberger, P., Ball, T., Krauth, MT., Verdino, P., Valent, P., Almo, S.,Valenta, R., 2006. Spatial clustering of the IgE epitopes on the major timothy grass pollen allergen Phl p 1: importance for allergenic activity. J Allergy Clin Immunol. 117, 1336-43.

142. Chomczynski, P., Sacchi, N. (2006) The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. *Nat. Protoc.* 1(2):581.
143. Gluber, U., Hoffman, B.J. (1983) A simple and very efficient method for generating cDNA libraries. *Gene* 25, 263-9.
144. Stanfield R, Cabezas E, Satterthwait A, Stura E, Profy A, Wilson I. (1999) Dual conformations for the HIV-1 gp120 V3loop in complexes with different neutralizing fabs. *Structure* 15;7(2):131-42.
145. Andréasson, U., Flicker, S., Lindstedt, M., Valenta, R., Greiff, L., Korsgren, M., Borrebaeck, C., Ohlin, M., 2006. The human IgE-encoding transcriptome to assess antibody repertoires and repertoire evolution. *J Mol Biol.* 362, 212-227.
146. Coker, H., Harries, H., Banfield, G., Carr, V., Durham, S., Chevetton E., Hobby, P., Sutton, B., Gould, H., 2005. Biased use of VH5 IgE-positive B cells in the nasal mucosa in allergic rhinitis. *J Allergy Clin Immunol.* 116, 445-52.
147. Persson, H., Sadegh, MK., Greiff, L., Ohlin, M., 2007. Delineating the specificity of an IgE-encoding transcriptome. *J Allergy Clin Immunol.* 120, 1186-92.
148. Niemi, M., Jylha, S., Laukkanen, ML., Söderlund, H., Mäkimen-Kiljunen, S., Kallio, JM., Hakulinen, N., Haahtela, T., Takkinen, K., Rouvinen, J., 2007. Molecular interactions between a recombinant IgE antibody and the β -lactoglobulin allergen. *Structure.* 15, 1413-1421.
149. Fuchs T, Spitzauer S, Vente C, Hevler J, Kapioties S, Rumpold H, Kraft D, Valenta R. 1997. Natural latex, grass pollen, and weed pollen share IgE epitopes. *J Allergy Clin Immunol.* 100(3):356-64.
150. Ponomarenko, J., Bourne, P., 2007. Antibody-protein interactions: benchmark datasets and prediction tools evaluation. *BMC Structural Biology.* 7, 64.
151. Mirza, O., Henriksen, A., Ipsen, H., Larsen, JN., Wissenbach, M., Spangfort, MD., Gajhede, M., 2000. Dominant epitopes and allergic cross-reactivity: complex formation between a Fab fragment of a monoclonal murine IgG antibody and the major allergen from birch pollen Bet v 1. *J Immunol.* 165, 331-8.
152. Hantusch, B., Scholl, I., Harwanegg, C., Krieger, S., Becker, W.M., Spitzauer, S., Boltz-Nitulescu, G., Jensen-Jarolim, E., 2005. Affinity determinations of purified IgE and IgG antibodies against the major pollen allergens Phl p 5a and Bet v 1a: discrepancy between IgE and IgG binding strength. *Immunol Lett,* 97, 81-89.
153. de Lalla, C., Tamborini, E., Longhi, R., Tresoldi, E., Manoni, M., Siccardi, A.G., Arosio, P., Sidoli, A., 1996. Human recombinant antibody fragments specific for a rye-

- grass pollen allergen: characterization and potential applications. *Mol Immunol.* 33, 1049-58
154. Loveless MH: Immunological studies of pollinosis I. The presence of two antibodies related to the same pollen antigen in the serum of treated hay fever patients. *J Immunol* 1940; 38: 25-50.
155. Loveless MH: Immunological studies of pollinosis IV. The relationship between thermostable antibody in the circulation and clinical immunity. *J Immunol* 1943; 47: 165-180.
156. Lichtenstein LM, Holtzman NA, Burnett LS: A quantitative in vitro study of the chromatographic distribution and immunoglobulin characteristics of human blocking antibody. *J Immunol* 1968; 101: 317-324.
157. Lichtenstein LM, Ishizaka K, Norman PS, Sobotka AK, Hill BM: IgE antibody measurements in ragweed hay fever. Relationship to clinical severity and the results of immunotherapy. *J Clin Invest* 1973; 52: 472-482.
158. Djurup R, Malling HJ, Sondergaard I, Weeke B: The IgE and IgG subclass antibody response in patients allergic to yellow jacket venom undergoing different regimens of venom immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 1985; 76: 46-55.
159. Sehra S, Pynaert G, Tournoy K, Haegeman A, Matthys P, Tagawa Y, Pauwels R, Grooten J: Airway IgG counteracts specific and bystander allergen-triggered pulmonary inflammation by a mechanism dependent on FcγR and IFN-γ. *J Immunol* 2003; 171: 2080-2089.
160. van Neerven, RJJ., Knol, EF., Eijraes, A., Wurtzen, PA., 2006. IgE-mediated allergen presentation and blocking antibodies: Regulation of T-cell activation in allergy. *Int Arch Allergy Immunol.* 141, 119-129.
161. Naik, MT., Chang, CF., Kuo, IC., Kung, CC., Yi, FC., Chua, KY, Huang, TH., 2008. Roles of structure and structural dynamics in the antibody recognition of the allergen proteins: An NMR study on *Blomia tropicalis* major allergen. *Structure.* 16, 125-36.
162. Nishiyama C, Hatanaka H, Ichikawa S, Fukada M, Akagawa-Chihara M, Yuuki T, Yokota T, Inagaki F, Okumura Y. (1999) analysis of human IgE epitope of Der f 2 with anti-Der f 2 mouse monoclonal antibodies. *Molecular Immunology* 36, 53-60.
163. Vrtala S, Akdis C, Budak F, Akdis M, Blaser K, Kraft D, Valenta R. (2000). T cell epitope-containing hypoallergenic recombinant fragments of the major birch pollen allergen, Bet v 1, induce blocking antibodies. *Journal of Immunology.* 165, 6653-6659.
164. Eibensteiner, P., Denépoux, S., Steinberger, P., Kraft, D., Visco, V., Banchereau, J., Lebecque, S., Valenta, R. (1999) Expression of a human IgG4 antibody, BAB2, with

- specificity for the major Birch pollen allergen, Bet v1 in *Escherichia coli*: recombinant BAB2 Fabs enhance the allergic reaction. *Int Arch Allergy Immunol.* 118:190-2.
165. Vivian, JT., Callis, PR. (2001) Mechanisms of tryptophan fluorescence shifts in proteins. *Biophys J.* 80, 2093-109.
 166. Tallmadge, DH., Hueber, JS., Borkman, RF. (1989) Acrylamide quenching of tryptophan photochemistry and photophysics. *Photochem Photobiol.* 4:381-6.
 167. Ghiron, C., Bazin, M., Santus, R. (1988) Determination of the acrylamide quenching constant for protein and model indole triplets *Photochem Photobiol.* 48:539-43.
 168. Laskowski R A, MacArthur M W, Moss D S & Thornton J M (1993). PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J. Appl. Cryst.*, 26, 283-291.
 169. Li, CH., Ma, XH., Chen, WZ., Wang, CX. (2003). A soft docking algorithm for predicting the structure of antibody-antigen complexes. *Proteins.* 52:47-50
 170. Jackson, RM. (1999) Comparison of protein-protein interactions in serine protease inhibitor and antibody-antigen complexes: Implication for the protein docking problem. *Protein Science* Vol. 8. pp. 603-613.
 171. Collis, AV., Brouwer, AP., Martin, AC., 2003. Analysis of the antigen combining site: correlations between length and sequence composition of the hypervariable loops and the nature of the antigen. *J Mol Biol.* 325, 337-354.
 172. Moreira IS, Fernandes P, Ramos M. (2007) Hot spots-A review of the protein-protein interface determinant amino-acid residues. *Proteins* 68, 803-812.
 173. Rubinstein ND, Mayrose I, Halperin D, Yekutieli D, Gershoni J, Pupko T. 2008. Computational characterization of B-cell epitopes. *Molecular Immunology* 45, 3477-3489.
 174. Furmonaviciene, R., Sewell, HF., Shakib, F., 2000. Comparative molecular modeling identifies a common putative IgE epitope on cysteine protease allergens of diverse sources. *Clin Exp Allergy.* 30, 1307-13.
 175. Pantoja-Uceda, D., Palomares, O., Bruix, M., Villalba, M., Rodriguez, R., Rico, M., Santoro, J., (2004). Solution structure and stability against digestion of rproBnIb, a recombinant 2S albumin from rapeseed: relationship to its allergenic properties. *Biochemistry.* 43, 16036-45.
 176. Lee, LH., Tam, MF., Chou, H., Tai, HY., Shen, HD., 2007. Lys, pro and trp are critical core amino acid residues recognized by FUM20, a monoclonal antibody against serine protease pan-fungal allergens. *Int Arch Allergy Immunol.* 143, 194-200.
 177. Bradford, JR., Westhead, DR., 2005. Improved prediction of protein-protein binding sites using a support vector machines approach. *Bioinformatics.* 21, 1487-94.

178. Radauer, C., Lackner, P., Breiteneder, H. (2008) The Bet v 1 fold: an ancient, versatile scaffold for binding of large, hydrophobic ligands. *BMC Evolutionary Biology*. 8:286.
179. López-Torrejón, G., Díaz-Perales, A., Rodríguez, J., Sánchez-Monge, R., Crespo, J., Salcedo, G., Pacios, L. (2007). An experimental and modeling-based approach to locate IgE epitopes of plant profilin allergens. *J. Allergy Clin. Immunol.* 119, 1481-8.
180. Pomés A, Smith AM, Grégoire C, Vailes LD, Arruda LK, Chapman MD. Functional properties of cloned allergens from dust mite, cockroach and cat – are they relevant to allergenicity? *Allergy Clin Immunol Int*, 2001; 13:162-169.
181. Ichikawa K, Vailes LD, Pomés A, Chapman MD. Molecular cloning, expression and modeling of cat allergen, cystatin, a cysteine protease inhibitor. *Clin Exp Allergy* 1991; 31:1279-1286.
182. Konieczny A, Morgenstern JP, Bizinkauskas CB, Lilley CH, Brauer AW, Bond JF, Aalberse RC, Wallner BP, Kasaian MT. The major dog allergens, Can f 1 and Can f 2, are salivary lipocalin proteins: cloning and immunological characterization of the recombinant forms. *Immunology*; 1997; 92:577-586.
183. Seong SY, Matzinger P. (2004) Hydrophobicity: an ancient damage-associated molecular pattern that initiates innate immune response. *Nature Reviews Immunology*. 4, 469-478.
184. Hofständer, K., Stuart, F., Jiang, L., Vrijbloed, J., Robinson, J. (1999) On the importance of being aromatic at an antibody-protein antigen interface: Mutagenesis of the extracellular interferon γ receptor and recognition by the neutralizing antibody A6. *J. Mol. Biol.* 285, 805-815.
185. Li, M., Gustchina, A., Alexandratos, J., Wlodawer, A., Wunschmann, S., Kepley, C.L., Chapman, M., Pomés, A., 2008. Crystal structure of a dimerized cockroach allergen Bla g 2 complexed with a monoclonal antibody. *J. Biol. Chem.* 283, 22806–22814.
186. Oezgüen, N., Zhou, B., Negi, S.S., Ivanciuc, O., Schein, C.H., Labesse, G., Braun, W. (2008) Comprehensive 3D-modeling of allergenic proteins and amino acid composition of potential conformational IgE epitopes. *Mol Immunol.* 45:3740-7.

10 ANEXOS

Artículos Indexados

Artículo 1

PEDRAZA-ESCALONA M, BECERRIL-LUJAN B, AGUNDIS, C, DOMÍNGUEZ-RÁMIREZ L, PEREYRA A, RIAÑO-UMBARILA L, RODRÍGUEZ-ROMERO A. (2008). Analysis of B-cell epitopes from the allergen Hev b 6.02 revealed by using blocking antibodies. *Molecular Immunology*. Doi:10.1016/j.molimm.2008.08.282

Artículo 2

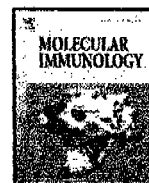
REYES-LOPEZ CA, PEDRAZA-ESCALONA M, MENDOZA G, HERNANDEZ-SANTOYO A, RODRIGUEZ-ROMERO A (2006) A single amino acid substitution on the surface of a natural hevein isoform (Hev b 6.0202), confers different IgE recognition. *FEBS Lett*. 580(10):2483-7.

Artículo 3

REYES-LÓPEZ C, HERNÁNDEZ SANTOYO A, PEDRAZA-ESCALONA M, MENDOZA G, HERNÁNDEZ-ARANA A, RODRÍGUEZ-ROMERO A. (2004) Insights into a conformational epitope of Hev b 6.02 (hevein) *Biochem Biophys Res Commun* 314; 123-130.

Artículos no indexados

PEDRAZA-ESCALONA M, RODRIGUEZ-ROMERO A. (2004) Bases inmunológicas y moleculares de la alergenicidad. *Alergia, asma e inmunología pediátricas*. 13(1) 5-10.



Analysis of B-cell epitopes from the allergen Hev b 6.02 revealed by using blocking antibodies

Martha Pedraza-Escalona^a, Baltazar Becerril-Luján^b, Concepción Agundis^c,
Lenin Domínguez-Ramírez^d, Ali Pereyra^c, Lidia Riaño-Umbarila^b, Adela Rodríguez-Romero^{a,*}

^a Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior, Cd. Universitaria, Coyoacán, México, D.F. 04510, Mexico

^b Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Mor. 62250, Mexico

^c Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Coyoacán, México, D.F. 04510, Mexico

^d College of Biological Sciences, University of California at Davis, 1 Shields Avenue, Davis, CA 95616, USA

ARTICLE INFO

Article history:

Received 11 August 2008

Accepted 27 August 2008

Available online xxx

Keywords:

Allergen

B-cell epitope

Docking

Hevein

Hev b 6.02

Human scFv

Latex allergy

Monoclonal antibody

Protein–protein interaction

ABSTRACT

Hev b 6.02 (hevein), identified as a major allergen from natural rubber latex (NRL), is involved in the latex-fruit syndrome and also acts as a pathogenesis defense-related protein. Its 3D structure has been solved at high resolution, and its linear epitopes have already been reported. However, information about conformational epitopes is still controversial, even though it is relevant for an accurate diagnosis and treatment, as well as for the study of allergen–antibody molecular interactions. We sought to analyze the B-cell epitopes of Hev b 6.02 at a molecular and structural level, using specific recombinant antibodies. We obtained a murine monoclonal antibody (mAb 6E7) and three human single chain fragments (scFvs A6, H8, and G7) anti-Hev b 6.02 that were able to compete for hevein binding with serum IgEs from latex allergic patients. *In vitro* assays showed that the mAb 6E7 and scFv H8 recognized the area of Hev b 6.02 where the aromatic residues are exposed; while the scFv G7 defined the amino and carboxy-terminal regions that lie close to each other, as a different epitope. The structural modeling of the Hev b 6.02–scFv H8 and Hev b 6.02–scFv G7 complexes revealed the putative regions of two conformational epitopes. In one of these, the aromatic residues, as well as polar side chains are important for the interaction, suggesting that they are part of a dominant conformational epitope also presented on the Hev b 6.02–IgE interactions. Antibodies recognizing this important allergen have potential to be used to diagnose and ultimately treat latex allergy.

© 2008 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

It is now widely recognized that IgE-mediated reactions (type I hypersensitivity) and contact dermatitis to NRL proteins are important medical problems, particularly in countries that are striving to attain higher technological standards (Wagner and Breiteneder, 2005). The high-risk population includes individuals exposed to proteins found in products manufactured with this material, such as gloves and surgical devices (Bernstein et al., 2003). Hev b 6.02 (hevein), one of the major NRL allergens existing in high con-

centration, is a 4.7-kDa lectin that also acts as a pathogenesis defense-related protein (Yeang et al., 2006). Several analyses of different plant-derived food allergens have also shown the presence of this polypeptide chain as a chitin-binding domain in class I endochitinases. This accounts for the cross-reactivity between latex and some fruits (Blanco, 2003).

The first mapping of the linear epitopes of Hev b 6.02, using overlapping peptides in direct or inhibition ELISA was performed by Beezhold et al. (1997) and Banerjee et al. (1997). They independently confirmed that two peptides containing residues Ser¹⁹-Cys²⁴ and Gly²⁵-Cys³⁷, as well as Pro¹³-Cys²⁴ and Glu²⁹-Asn³⁶, respectively, were responsible for Hev b 6.02-specific IgE binding. Subsequently, Drew et al. (2004) and Raulf-Heimsoth et al. (2004) reported that the tertiary structure of this allergen was relevant for IgE binding. In both works, the Cys residues were mutated to Ser or Ala and, therefore, IgE antibodies did not recognize the mutants. Karisola et al. (2002, 2004), using chimeric-hevein and hevein mutants, reported that IgE conformational epitopes are in the N-terminal and C-terminal regions and suggested that the inter-

Abbreviations: ASA, accessible surface area; BSA, bovine serum albumin; CDR, complementary determining region; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; FR, framework region; mAb, monoclonal antibody; NRL, natural rubber latex; RMSD, root mean square deviation; scFv, single chain variable fragment; V_H, variable region heavy chain; V_L, variable region light chain.

* Corresponding author. Fax: +52 55 56 16 2217.

E-mail address: adela@servidor.unam.mx (A. Rodríguez-Romero).

0161-5890/\$ – see front matter © 2008 Elsevier Ltd. All rights reserved.

doi:10.1016/j.molimm.2008.08.282

Please cite this article in press as: Pedraza-Escalona, M., et al., Analysis of B-cell epitopes from the allergen Hev b 6.02 revealed by using blocking antibodies. *Mol. Immunol.* (2008), doi:10.1016/j.molimm.2008.08.282

acting residues are Arg⁵, Lys¹⁰, Glu²⁹, Tyr³⁰, His³⁵ and Gln³⁸. In a parallel study, our group used an alternative strategy that consisted in oxidizing the two solvent-exposed tryptophans (Trp²¹ and Trp²³) through chemical modification (Reyes-López et al., 2004), producing a modified Hev b 6.02 that showed only 20% inhibition of IgE binding. It was then suggested that these two residues were important in the IgE–Hev b 6.02 interaction. Recently, we found a natural hevein isoform (Hev b 6.0202) with only one change (Asn¹⁴Asp) that showed reduced IgE-binding capacity using serum pools of adult and pediatric patients (Reyes-López et al., 2006). These discrepancies suggested the presence of more than one conformational epitope on this small allergen and, therefore, the way in which IgEs recognize Hev b 6.02 remains an open question.

Hybridoma and phage display technology are the methods currently available to produce and isolate allergen-specific antibodies, which are able to inhibit the binding of serum IgE from allergic individuals (Davies et al., 2000; Edwards et al., 2001). Blocking antibodies have been used to learn more about the specific residues that are crucial to allergen–antibody interactions. Nonetheless, to date there are only a few reports on the structure of antibody–allergen complexes (Mirza et al., 2000; Padavattan et al., 2007; Niemi et al., 2007; Li et al., 2008). Furthermore, it has been shown that allergen-specific IgG antibodies, which inhibit the IgE–allergen interaction, have been tested in specific immunotherapy (Flicker and Valenta, 2003).

Laukkanen et al. (2003) obtained two hevein-specific recombinant IgE antibodies from a human scFv library, and proposed them as potential reagents for the analysis of latex allergens. Nevertheless, these antibodies have not been used for the epitope analysis. Consequently, to gaining insights into the location and characterization of the conformational epitopes of this important latex allergen, in the present study three scFvs and one mAb Hev b 6.02-specific were selected. The purified antibodies were able to compete with the binding of sera IgEs from latex allergic patients. Additionally, isoforms and chemically modified Hev b 6.02 were tested with the recombinant antibodies. The structural modeling of different Hev b 6.02–scFv complexes provided complementary information on the Hev b 6.02–IgE interaction.

2. Materials and methods

2.1. Allergens

Hev b 6.02, Hev b 6.0202, pseudohevein (*Hevea brasiliensis* clone GV42) and chemically modified hevein were obtained following the procedures reported by Reyes-López et al. (2004, 2006).

2.2. Characterization of allergenic patient and sera

Twenty adult and pediatric NRL allergic patients were characterized by positive clinical history and skin prick testing. Additionally, sera were tested for reactivity with Hev b 6.02 by direct ELISA.

2.3. IgE ELISA

Hev b 6.02 diluted in 50 mM carbonate buffer, pH 9.6 was coated on microtiter plate (Corning, NY, USA) at 3 µg/mL (100 µL/well) and incubated overnight at 4 °C. The wells were emptied, and the remaining protein binding sites were blocked with 1% bovine serum albumin (Sigma, St. Louis, MO) in phosphate-buffered saline (PBS), at 37 °C for 2 h. After rinsing, 100 µL of latex allergic patients serum (diluted 1:10 in PBS) were added and incubated at 37 °C for 3 h. Biotinylated mouse anti-human IgE (Zymed; diluted 1:1000) was added, followed sequentially by streptavidin conjugated peroxidase

(Zymed; diluted 1:2000) after washing. Produced color was read at 490 nm by using an automated Dynatech MR 5000 ELISA reader (Dynatech Laboratories, Inc., Chantilly, Va.). The mean + 3 S.D. of the control individuals was chosen as the threshold value for a positive result.

2.4. Hev b 6.02-specific monoclonal antibodies: production, isotyping and purification

Four to eight-week-old female BALB/c mice were immunized intraperitoneally (i.p.) with Hev b 6.02–BSA conjugated, and emulsified in complete Freund's adjuvant. Thirty and 45 days later, mice were boosted with an identical amount of antigen in incomplete Freund's adjuvant. The mAbs were derived by somatic cell hybridization of Sp2 mouse myeloma cell line to 1.35×10^7 spleen cells at a ratio of 1:10 in the presence of polyethylene glycol (PEG) 1500. Hybridoma cells were selected by Hypoxanthine–Aminopterin–Thymidine (HAT) medium as previously described (Galfré and Milstein, 1981) and further selection of the secreted antibody to Hev b 6.02 were chosen by direct ELISA. Positive cell cultures were cloned at least five times by limiting dilution. Isotype detection was done using a commercial kit (Bio-Rad Laboratories, CA, USA). For the production of ascites, hybridoma cells were i.p. injected into pristinely-primed female BALB/c mice and ascites were collected 30 days after injection. Antibodies were purified from hybridoma culture and ascites fluid by affinity chromatography using a Protein G Column (Amersham Biosciences; Uppsala, Sweden). Protein concentration was measured assuming that $A_{280}^{1\text{mg/mL}} = 1.40$ or $\epsilon_{279}^{\text{M}} = 140\,000\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ corresponds to a purified antibody solution with a concentration of 1 mg/mL.

2.5. Hev b 6.02-specific human scFvs phage display selection

A human combinatorial library of scFvs, prepared by Riaño-Umbarila et al. (2005) with diversity close to 1.2×10^8 , was displayed in filamentous phages and used for the selection of antibodies that recognized Hev b 6.02. Rescue of phagemid particles was done as described by Marks et al. (1991). Before the biopanning, 1 mL of the library (1×10^{13} phage antibodies) in PBS was incubated for 90 min in the presence of different blocking agents (BSA and gelatin). Biopanning was performed by adding the pre-blocked phages to immunotubes (Maxisorp; Nunc, Roskilde, Denmark) and microplates (Covalink; Nunc, Roskilde, Denmark) coated with purified Hev b 6.02 and Hev b 6.02–BSA at the concentrations of 10 µg/mL (cycle 1) and 5 µg/mL (cycles 2–4), then washing 20 times with PBST (PBS with 0.1% Tween 20) and 20 times with PBS. The bound phage antibodies were recovered by the addition of one mL of *E. coli* strain TG1 ($A_{600} = 0.7$) for 30 min without agitation and then 30 min with agitation (37 °C). Finally the cells were plated on agar ampiciline for overnight growth. The panning procedure was repeated twice. In the third round, the selection was performed using a Surface Plasmon Resonance instrument (BIAcore X, Uppsala, Sweden). Twenty-five micrograms of Hev b 6.02 were covalently bound onto a CM5 sensor chip using an equimolar mix of *N*-hydroxysuccinimide and *N*-ethyl-*N*-(dimethyl-aminopropyl) carbodiimide in 10 mM acetate buffer pH 3.0. Approximately 370 resonance units (RU) were coupled. The phage antibodies were injected and eluted with different concentrations of NaOH (2.5–25 mM) and were recovered as explained above. In the fourth round, the selection was performed in immunotubes and microplates, with some variations. After the washing steps, one mL of 100 mM triethylamine (Pierce, Rockford, IL, USA) was added followed by a 10 min incubation, to remove the less stable phage antibodies. The remaining phage antibodies were

		CDRH1		CDRH2	
A6	1	EVQLVESGAEVKKPGASVKV	SCKASGYIFTN	YGISVWRKAPGQG	LEWVANI
H8	1	EVQLVESGGGLVKGGLR	LSCAASGFTFGG	YSMMVVRQAPGK	LEWVSSIS
M8	1	QVQLVQSGAEVVKMPGES	LKISCKGSAYN	FSNWIWVVRQMPGEG	LEWVGIVYP
G7	1	QVQLVQSGAEVVKMPGES	LKISCKGSAYN	FSNWIWVVRQMPGEG	LEWVGIVYP
CDRH3					
A6	61	AQRFQGRVTLTTD	ISTTTAYMELRS	LRSDDTAVYYC	ARSGMYKDGSGSYTG--MDVWGQG
H8	61	ADSVKGRFTISR	DNAKNSLYLQ	MNSLRAEDTAVYYC	ARQAVR----GPARG--MDVWGQG
M8	61	RPSFQGQVTISADK	SISFVYLQWSS	LKASGTAIYCARQ	SIIIPVG-GLMRGDAFDIWGQG
G7	61	RPSFQGQVTISADK	SISFVYLQWSS	LKASGTAIYCARQ	SIIIPVG-GLMRGDAFDIWGQG
LINKER					
		CDRL1		CDRL2	
A6	119	TTVTVSSGGGGSGGG	GGGGSDIQMTQ	SPSLSASVGD	RVTITCRAS---QNDKFLNW
H8	115	TTVTVSSGGGGSGGG	GGGGSDIQMTQ	SPSLSLSTVGD	RVTISCRAS---HSISYVNW
M8	120	TMVTVSSGGGGSGGG	GGGGSHVILTQ	-PPSVVSPGQ	TATITCSGQLEHMERLSICW
G7	120	TMVTVSSGGGGSGGG	GGGGSHVILTQ	-PPSVVSPGQ	TATITCSGQLEHMERLSICW
		CDRL3		CDRL3	
A6	176	FQQKPGKAPRLLI	YGATNLD	SGVPSRISGSG	SGTDFTLTIS
H8	172	YQQKPGKAPKLLI	SATSTLQ	NAVPSRFSGSG	SGTDFTLTIS
M8	179	YQQKPGQSPVVVI	YQATSR	PPGIPERFSGS	YSGNTATLTIS
G7	179	YHQKPGQSPVVVI	YQATYR	PPGIPERFSGT	YSGNTATLTIS
A6	235	PRSFQGGTKLEIK	RAAAEQKLI	SEEDLN	GAAHHHHHH 271
H8	231	SVTFGQGRLEIK	RAAAEQKLI	SEEDLN	GAAHHHHHH 267
M8	239	ELVFGSGTQLTVL	SAAAEQKLI	SEEDLN	GAAHHHHHH 275
G7	239	ELVFGSGTQLTVL	SAAAEQKLI	SEEDLN	GAAHHHHHH 275

Fig. 1. Amino acid sequence alignment of three Hev b 6.02-specific scFvs selected from human repertoire, and the matured clone G7. These sequences include the c-myc C-terminal tag followed by a hexameric His tag. CDRs and FRs are indicated in agreement with Kabat definition (<http://www.bioinf.org.uk/abs/>).

neutralized with 1 M Tris-HCl, pH 7 and recovered as explained above. After each round of panning, supernatants of single phage antibody clones were analyzed for specific binding to Hev b 6.02 and Hev b 6.02-BSA in microtitre ELISA plates (Corning, NY, USA) coated at 3 µg/mL in 50 mM bicarbonate buffer. The phage binding was revealed by incubation with horseradish peroxidase (HRP)-conjugated anti-M13 (Amersham Pharmacia Biotech).

2.6. Affinity maturation by error-prone PCR

Selected clones from the scFv library were subjected to mutagenesis by error-prone PCR with high, medium and low mutagenesis rate (Cadwell and Joyce, 1992). PCR products were mixed and digested with SfiI and NotI (New England Biolabs, Beverly, MA, USA), gel purified and then ligated into the phagemid pSyn2. Ligated DNA was electroporated into E. coli strain TG1 cells and the library variability (mutation rate) was determined. Each new library was subjected to three or four rounds of biopanning using immunotubes. Three cycles of evolution were performed. The sequences of the clones were determined with the primers forward (5'ATA CCT ATT GCC TAC GCC 3') and reverse (5'TTT CAA CAG TCT ATG CGG 3') in the Applied Biosystems 3100 Gene Analyzer (Foster City, CA, USA).

2.7. Soluble single chain antibodies expression and purification

The scFv inserts from the selected clones were ligated into the expression vector Psyn1. This vector allows E. coli periplasmic expression of the scFv fused to cmyc epitope tag and hexahistidine (His)₆ tag under the control of the lac promoter. Soluble scFv was produced as described elsewhere (Nielsen et al., 2006). Finally, the monomers were separated from dimers and higher aggregates by applying the samples onto a Superdex 75 column (Amersham Biosciences, England). Protein concentrations were determined spectrophotometrically using extinction coefficients estimated individually for each clone. Typically, 0.6 mg of purified scFv was obtained from 500 mL of culture of E. coli TG1.

2.8. Binding sites analysis using natural variants of Hev b 6.02 by ELISA inhibition assay

ELISA plates were coated with 3 µg/mL Hev b 6.02 diluted in 50 mM carbonate buffer, pH 9.4 (100 µL/well; Costar) and incubated overnight at 4°C. Wells were blocked with 1% BSA in phosphate-buffered saline, at 37°C for 2 h. Afterwards, human single chain antibodies were co-incubated with different concentrations (0.005–33 µg/mL) of the inhibitors (Hev b 6.02, Hev b

Table 1
Comparison of the DNA sequences of the V_H and V_L regions (scFv clones A6, H8 and M8) with their closest related germline sequences (IMGT/V-QUEST).

Clone	Germline V, D, J (hc), V, J (hl)	Complete variable region		CDRs		FRs	
		n	Percent	n	Percent	n	Percent
A6 hc	IGHV1-18*01, IGH D3-10*01, IGHJ6*01	42/369 bp	11	25/114 bp	21	17/255 bp	7
H8 hc	IGHV3-21*01, IGH D3-10*01, IGHJ6*01	20/357 bp	6	20/102	20	0/255 bp	0
M8 hc	IGHV5-51*01, IGH D6-19*01, IGHJ3*02	30/372 bp	8	16/114 bp	14	14/258 bp	5
A6 lc	IGKV1-39*01, IGKJ1*01	24/324 bp	7	11/81 bp	14	13/243 bp	5
H8 lc	IGKV1-39*01, IGKJ5*01	25/324 bp	8	15/81 bp	19	10/243 bp	4
M8 lc	IGLV3-1*01, IGLJ1*01	56/333 bp	17	29/93 bp	31	27/240 bp	11

Please cite this article in press as: Pedraza-Escalona, M., et al., Analysis of B-cell epitopes from the allergen Hev b 6.02 revealed by using blocking antibodies. Mol. Immunol. (2008), doi:10.1016/j.molimm.2008.08.282

Table 2
Inhibition percentage of IgE binding from natural rubber latex positive sera to native Hev b 6.02 by recombinant antibodies.

Individual	scFv M8	scFv G7	scFv A6	scFv H8	mAb 6E7	scFvs and mAb 6E7
Inhibition percentage						
1	32.6	28.5	22.6	19.0	9.5	24.3
2	14.4	18.5	8.0	6.1	18.8	20.2
3	20.7	18.9	51.3	42.7	9.6	13.2
4	24.9	6.9	–	55.1	20.6	63.4
5	22.0	26.5	8.3	35.7	12.9	15.0
6	8.2	–	–	37.3	30.6	33.6
7	12.1	34.1	14.1	45.3	40.6	71.5
Mean	19.3	22.3	20.9	34.5	20.4	34.5

6.0202, modified Hev b 6.02, and pseudohevein) in PBS for 3 h and were added to the wells for 45 min at 37 °C. The colorimetric reaction was revealed as mentioned above. Results were expressed as percentage of inhibition using the following formula: [(absorbance in the absence of inhibitor X – absorbance in the presence of inhibitor X)/absorbance in the absence of the inhibitor] × 100.

2.9. IgE inhibition assay using recombinant antibodies

ELISA plates were coated with 3 µg/mL Hev b 6.02 overnight at 4 °C. The plates were blocked with 1% Casein (Sigma, St. Louis, MO) in PBS and incubated 2 h at 37 °C with the human scFvs or monoclonal antibodies (diluted 1:100). After washing, the plates were incubated with 1:10 diluted sera from natural rubber latex allergic patients for 2 h at 37 °C and bound human IgE antibodies were detected as explained before. We use a toxin-specific human scFv like negative control.

2.10. Fluorescence measurements

Fluorescence experiments were carried out on a fluorescence spectrometer PerkinElmer BL50 (USA) in a 1 cm quartz cell, with

the FL Winlab software for collecting data. All measurements were done at an excitation of 295 nm and an emission of 320–440 nm, in a cell thermostated at 25 °C. The excitation slit was set to 2.5 and the emission slit to 3.5. The buffering system was PBS pH 7.4, 137 mM NaCl. Hev b 6.02 concentration was 2.11×10^{-6} M for all experiments. Antibodies were prepared in different molar ratios with respect to the allergen. Spectral centers of mass of intrinsic fluorescence (intensity-weighted average emission wavelengths, SCM) were calculated as $SCM = \frac{\sum \lambda I(\lambda)}{\sum I(\lambda)}$, where λ is the emission wavelength and $I(\lambda)$ represents the fluorescence intensity at wavelength.

In fluorescence quenching experiments aliquots of 3.0 M acrylamide (Aldrich, St. Louis, MO) were added directly to the sample up to a total concentration of 200 mM, with 10 mM increments. The Hev b 6.02 samples were allowed to equilibrate with acrylamide for 5 min before each measurement. For those experiments with Hev b 6.02 in the presence of different molar ratios of recombinant antibodies, Hev b 6.02 was incubated with these antibodies for 12 h before adding the acrylamide solution. Fluorescence values were corrected for dilution by the titrant. Fluorescence was not observed in control titrations with buffer and acrylamide. The decrease in fluorescence intensity is described by the Stern–Volmer

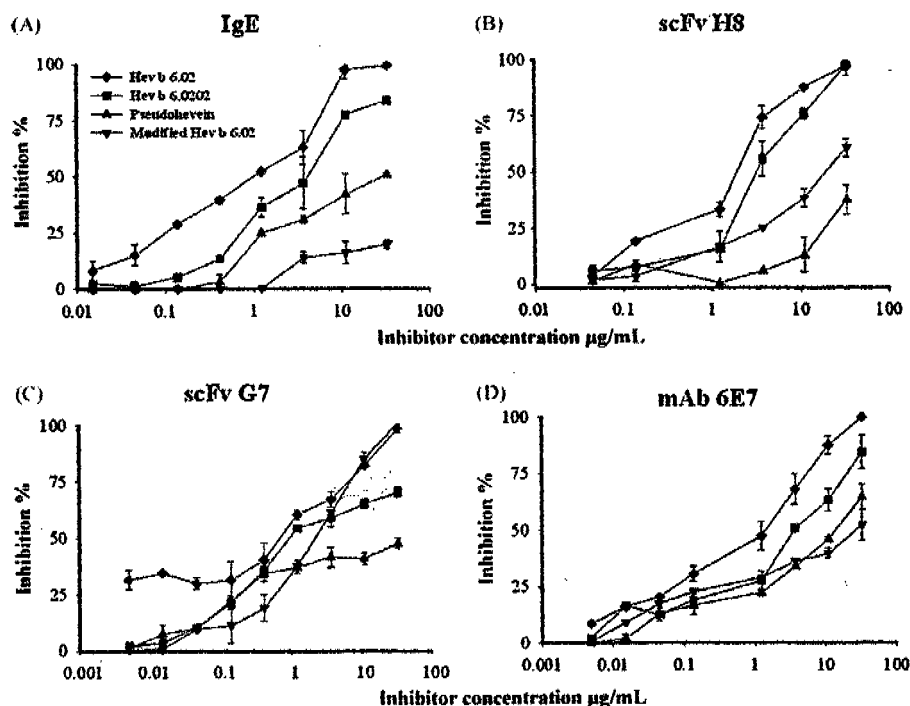


Fig. 2. ELISA inhibition assays. The average inhibition of IgE (A), scFv H8 (B), scFv G7 (C) and mAb 6E7 (D) binding to solid-phase Hev b 6.02 was determined using chemically modified hevein and two natural mutants. The inhibition curve with Hev b 6.02 as the inhibitor is shown for comparison.

equation $F_0/F = 1 + K_{SV} [Q]$, where F_0 and F are the corrected fluorescence intensities in the absence and presence of acrylamide, respectively. K_{SV} is the collisional Stern–Volmer constant, and $[Q]$ is the molar concentration of acrylamide. All measurements were performed in at least triplicate series.

2.11. Sequence alignment and homology modeling of the recombinant antibodies

The three-dimensional structure models of scFvs were built by using the web-based antibody modeling program WAM (Whitelegg and Rees, 2000), ESyPred3D server (Lambert et al., 2002), as well as the program suite Modeller 9v2 (Šali and Blundell, 1993). The framework regions were generated by using homologous antibody templates according to the sequence alignments obtained with BLAST (Protein Data Bank). The best alignments were selected according, not only to the alignment score, but also to the selection of the template structures solved at the highest resolution. CDRs from the light and heavy chains, except CDRH3, were built from homologous loops of the same canonical class. The antibodies were modeled in the form of scFv, with the light and heavy chains connected by a flexible linker segment. The minimization of the structures was performed with UCSF Chimera software (www.cgl.ucsf.edu/chimera) through the MMTK routines.

2.12. Simulated docking of scFv–Hev b 6.02 complexes

The rigid-body docking approach of GRAMM-X (Tovchigrechko and Vakser, 2006) was used to construct models of two scFvs with Hev b 6.02, using the crystal structure obtained at 1.5 Å resolution (PDB code 1Q9B) (Reyes-López et al., 2004). To perform the rotation and translation searches of the allergen around the surface of the antibody-binding region we used RosettaDock (Gray et al., 2003). In the high-resolution refinement step, where the Monte Carlo minimization procedure was applied, the side-chain degrees of freedom were optimized simultaneously, in the context of a detailed all-atom energy function, where short-range hydrogen bonding, van der Waals interactions, and desolvation were the greatest contributors. The search procedure was repeated from different random starting orientations to create 1000 structures. The RMSD values were calculated over the scFv molecules after superposition of the ligand (Hev b 6.02) with the starting model. To rank the results we used Fnac (fraction of native contacts), defined as the residue–residue correct contact number of the predicted complex divided by the number of contacts in the target complex, and the L_{rms} value defined as the main-chain displacement of the predicted ligand against the target structure. Polar contacts were analyzed with the PISA server (Krissinel and Henrick, 2007) and the apolar ones with the PIC server (Tina et al., 2007). The models were visualized with Pymol v1.0r2 (DeLano, 2002).

3. Results

3.1. Selection of Hev b 6.02-specific murine monoclonal antibodies

After immunization with Hev b 6.02 purified from natural rubber latex and covalently bound to BSA, a panel of murine mAbs was obtained. Direct ELISA using Hev b 6.02 in the solid phase screened all the hybridoma candidates. mAb 6E7 (IgG1 κ) presented a high degree of recognition.

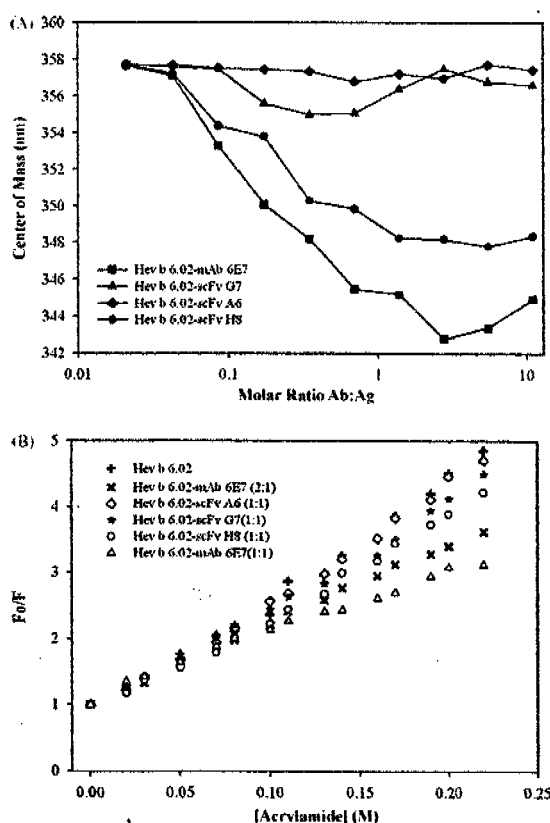


Fig. 3. Tryptophan fluorescence in the identification of Hev b 6.02 epitopes. (A) Tryptophan intrinsic fluorescence of the complexes Hev b 6.02–recombinant antibodies at different molar ratios. (B) Stern–Volmer plots for acrylamide quenching effects on Hev b 6.02 and on its complexes with recombinant antibodies.

3.2. Selection and molecular analysis of the Hev b 6.02-specific human scFvs

A human random combinatorial phage library (Riaño-Umbarila et al., 2005) was screened with immunotubes and microplates coated with Hev b 6.02 and Hev b 6.02–BSA at a low density. Three clones were found to express Hev b 6.02 binding activity, scFv antibodies M8, A6 and H8 (Fig. 1). A sequence alignment of the three light chains (V_L) showed an identity ranging from 39% to 75%, whereas for the three heavy chains (V_H) it ranged from 41% to 49%. Framework regions (FRs) and one complementary determining region of the light chain (V_L -CDR2) were of equal size; CDRL1 and CDRL3 were of different sizes for M8 only. Concerning the V_H s, CDRH3 of different sizes were observed for the three scFvs with 12 (H8), 16 (A6) and 17 (M8) residues, respectively.

The DNA sequences of these scFvs (GenBank accession nos. EU934735, EU934736 and EU934737) were compared with germline sequences deposited in the IMGT database (Lefranc, 2003). The heavy chains of A6 and H8 are related to VH1 and VH3 families, respectively, while M8 is related to VH5. The light chains of A6 and H8 belong to the Vk1 family, whereas M8 is related to VL3. Notably, there were more variations in the V_L -CDRs (14–31%) than in the FRs (5–11%). In the V_H -CDR regions, the variation level accounts for 14% to 21%, while for the FRs, it ranged from 0% to 7% (Table 1). It was very interesting to observe that the rate and distribution of somatic mutations were comparable with those observed for two important human antibodies anti-allergen; IgG anti-Bet v 1 (Denepoux et al., 2000) and IgE anti-Phl p 1 (Flicker et al., 2006).

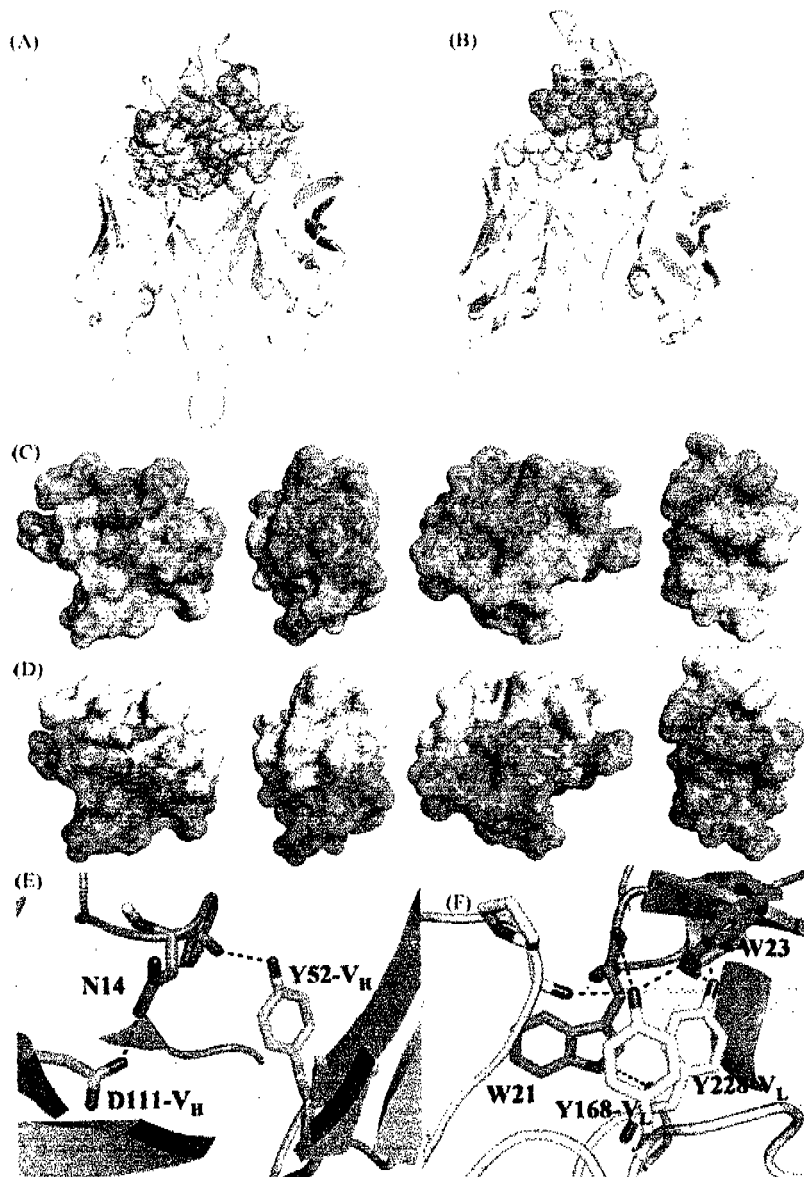


Fig. 4. Models for the interaction of recombinant antibodies with Hev b 6.02. (A and B) Front views of hevein (violet)-scFv G7 (green) and hevein-scFv H8 (yellow), respectively. Hotspot residues are shown as spheres; (C and D) conformational epitope on the hevein surface when interacts with scFv G7, and with H8, respectively. The four views are shown rotated every 90°; (E and F) some interactions at the Hev b 6.02-antibody interfaces. Hydrogen bonds are colored black.

3.3. Affinity maturation

To determine whether the increase in the affinity of the scFv could improve the IgE-Hev b 6.02 inhibition, three cycles of directed evolution were carried out with the clone M8. In the first cycle, the library (7.3×10^6 variants; mutation rate 1.1%) was evaluated by phage display against Hev b 6.02 by three rounds of biopanning. The improved recognition of the variant F6 was determined by three mutations in the frameworks of the heavy chain: Met⁴⁸Val, Ile⁷⁶Phe and Gly⁹⁰Ser. This variant was subjected to a second maturation cycle, where the library size was 2.4×10^6 variants and the mutation rate 1%. In this case, the clone F7 was selected. The changes were located at V_H-CDR3: (Ile¹⁰²Lys) FRV_H, (Met¹²¹Val), FRV_L; (Ser²⁰⁸Thr), FRV_L; (Ser²⁵²Gly) and FRV_L (Ala²⁵⁵Gly). For the third cycle (2.3×10^6 variants and mutation rate 1%), the clone G7

was chosen and its DNA sequence showed only two changes with respect to clone F7, FRV_L (Gln¹⁸⁰His) and V_L-CDR2 (Ser¹⁹⁶Tyr).

3.4. Inhibition of IgE binding to Hev b 6.02 by recombinant antibodies

ELISA inhibition assays were performed to verify whether the *in vitro* selected anti-hevein murine mAb (6E7) and human scFvs (M8, G7, A6 and H8) had epitopes in common with the IgEs from latex allergic patients (Table 2). Sera from seven allergic individuals showed that the binding of each recombinant antibody inhibited up to 55% of the IgE-Hev b 6.02 interaction. The combination of the four scFvs and the mAb 6E7 inhibited more than 70% for the sera of two out of the seven patients. These results demonstrate the polyclonal nature of the Hev b 6.02-specific IgE response. Analyzing the results

obtained for the matured G7 compared with M8, we observed only a slight improvement in the percentage of inhibition.

3.5. Mapping of the binding sites of the recombinant antibodies using natural and chemically modified variants of Hev b 6.02

For identification and comparison of the Hev b 6.02 regions recognized by scFvs, mAb and native IgE, two of its natural isoforms and one chemically modified variant were used. Hev b 6.0202 has a single mutation in the position N¹⁴D (Reyes-López et al., 2006), while pseudohevein presents six mutations Trp²¹Tyr, Thr²⁷Ser, Glu²⁹Asp, Asp³⁴Ser, His³⁵Lys and Asp⁴³Gly. For the chemically modified hevein both, Trp²¹ and Trp²³ were oxidized as described previously (Reyes-López et al., 2004). Increasing concentrations of the proteins were added to each recombinant antibody and the residual binding activity to Hev b 6.02 was measured as a percentage of inhibition by ELISA (Fig. 2). The inhibitory effect of Hev b 6.0202 (86%), pseudohevein (50%) and modified hevein (20%) at the highest concentration in the IgE–Hev b 6.02 interaction is shown (Fig. 2A). This establishes the importance of the tryptophans' solvent-accessible surface area (ASA), and some residues located in the carboxy-terminal region, to be recognized by IgEs. In the scFv H8–Hev b 6.02 interaction, only the modified allergen (60%) and pseudohevein (37%) showed changes in the percentage of inhibition (Fig. 2B). For the scFv G7–Hev b 6.02 interaction, the isoform Hev b 6.0202 inhibited 70%, while pseudohevein inhibited 48.5% (Fig. 2C). The highest concentration of pseudohevein and modified hevein showed reduced mAb 6E7-binding capacity, 36% and 58%, respectively, whereas Hev b 6.0202 only reduced it by 15% (Fig. 2D).

3.6. Fluorescence measurements

Two different experiments were performed to analyze the interaction of hevein with the recombinant antibodies. We used the intrinsic fluorescence of the tryptophan residues Trp²¹ and Trp²³ (ASA of 165.9 and 112.1 Å², respectively) and, the acrylamide-dependent quenching. In the first case, the binding of H8 and mAb 6E7 to Hev b 6.02 promotes an emission shift from 358 to 348 and 345 nm, respectively (Fig. 3A). These results are explained by a decrease in the polarity of the environment of the tryptophans' area (Lakowicz, 1986). In the second case, acrylamide was used to quench the fluorescence of hevein and the antibodies either alone or while in a complex. Fig. 3B shows a Stern–Volmer analysis of the acrylamide-dependent quenching of hevein–antibody complexes, where important differences are observed. The Hev b 6.02–mAb 6E7 complex showed a substantial decrease in the K_{sv} value ($12.1 \pm 0.15 \text{ M}^{-1}$) compared to that of Hev b 6.02 ($17.68 \pm 0.4 \text{ M}^{-1}$); the Hev b 6.02–scFv G7 and Hev b 6.02–scFv H8 complexes produced a slightly decrease, and Hev b 6.02–scFv A6 did not affect the K_{sv} value (Fig. 3B). These results indicated that in addition to a change in the polar nature of the environment of the tryptophan residues, they also became less accessible to acrylamide. Therefore, it may be concluded that at least one Trp is in fact involved in interactions with the mAb 6E7 and the scFv H8.

3.7. Homology modeling, simulated docking of scFvs–Hev b 6.02 complexes and epitope analysis

For the homology modeling, we compared all the models obtained as described in Section 2, and selected the best results for each scFv. To further elucidate the structural characteristics of hevein bound to the scFvs, the described filter and selection procedure yielded a final model for the docking complex Hev b 6.02–scFv G7 and one for the Hev b 6.02–scFv H8 complex (Fig. 4). In the

Table 3
Antibody interface residues.

Hev b 6.02–scFv G7	Hev b 6.02–scFv H8
Number of residues	
16	15
Buried surface area (Å ²)	
787.7	613.8
P-value	
0.415 (Hev b 6.02), 0.515 (scFv G7)	0.533 (Hev b 6.02), 0.459 (scFv H8)
Residues involved in polar interactions	
Hev b 6.02–scFv G7 (CDRs)	Hev b 6.02–scFv H8 (CDRs)
Gln2–His109 (H3)	Arg5–Gly103 (H3)
Lys10–Tyr196 (L2)	Gln6–Gly103 (H3)
Leu11–Gln193 (L2)	Ser19–Tyr228 (L3)
Cys12–Ser175 (L1)	Gln20–Tyr228 (L3)
Asn14–Tyr52 (H2), Asp111 (H3)	Trp21–Tyr168 (L1)
Asn15–Tyr52 (H2), Arg59 (H2), Trp234 (L3)	Trp23–Tyr168 (L1), Tyr228 (L3)
Ser26–Asp55 (H2)	Gln29–His163 (L1)
Asn40–Asp235 (L3)	Pro33–Tyr59 (H2)
Lys42–Asp55 (H2)	Asp34–Tyr59 (H2)

A contact is made when two side chains have at least one nonhydrogen atom pair within 4 Å.

The P-value is a measure of interface specificity. A value of $P > 0.5$ means that the interface is less hydrophobic. On the other hand, $P < 0.5$ indicates that the interface can be interaction-specific (Krisinel and Henrick, 2007).

first case, the buried accessible surface area was 1485 Å², involving 26 residues of the paratope, and 16 residues of the epitope (Fig. 4A, C and E). Asparagine 14 establishes three hydrogen bonds with residues located in the deep cavity of the antibody, validating the *in vitro* assays (Fig. 2C). This complex reveals a slightly more hydrophilic interface than the average found in antibody–antigen interfaces (Lo Conte et al., 1999). Table 3 lists the interface residues of the resulting models and their interactions. Comparatively, H8 established ten hydrogen bonds with the CDRs, including more hydrophobic residues that made contact with the two aromatic residues (Trp²¹ and Trp²³) in hevein (Fig. 4B, D and F).

For comparison, the coordinates of Hev b 6.02 were submitted to several servers for the prediction of conformational epitopes (Ponomarenko and Bourne, 2007). The server PIPRED (Bradford and Westhead, 2005) predicted three discontinuous epitopes; the first involved Gln², Ser¹⁹, Trp²¹, Trp²³–Ser²⁶ and Glu²⁹ and Tyr³⁰, the second Gly⁹, Leu¹¹–Asn¹⁵, Ser³⁹ and Asn⁴⁰; and the third conformational epitope involved the residues Pro¹³–Cys¹⁷, Cys²⁴–Thr²⁷ and Lys⁴², which are in accordance with our docking results.

4. Discussion

It is well recognized that the latex allergen Hev b 6.02 is an important cause of type I hypersensitivity in latex gloves users, particularly health care workers, children submitted to multiple operations, and more recently laboratory scientists. The fact that several studies have associated Hev b 6.02 sensitization with the latex-fruit syndrome highlights the importance of this small and stable allergen. Such associations establish cross-reactivity as a consequence of the presence of hevein-like domains in some fruits (Blanco, 2003). In this study, we present a structural characterization based on molecular modeling and *in vitro* experiments, of putative B-cell epitopes of Hev b 6.02, using three human scFv antibody fragments and one murine monoclonal antibody. We observed that these recombinant antibodies inhibited the binding of human IgEs to Hev b 6.02, to a varying degree depending on each individual, with a maximum value of 55% for scFv H8, 51% for scFv A6, 37% for scFv G7, and 41% for mAb 6E7. Similar results have been reported for different monoclonal antibodies anti-allergens (Mirza

et al., 2000; Padavattan et al., 2007; Naik et al., 2008; Flicker et al., 2006). Notably, in our case, a synergic effect was observed when a mixture of all the recombinant antibodies was able to inhibit the IgE binding to the allergen, up to 71% in some patients (Table 2). It is evident that this battery of antibodies recognizes different regions of the Hev b 6.02 surface, thus resembling the IgE polyclonal response from allergic patients and allowing for the individual analysis of each B-cell epitope. The overlapping between IgE and IgG epitopes could be useful for the identification of immunodominant regions that are essential for diagnostic and therapeutic studies (van Neerven et al., 2006). For these reasons, the hevein-specific antibodies might be used as potential blocking antibodies, as well as diagnostic and research tools.

Concerning the primary structure, the three scFv anti-hevein obtained in this work, display CDR loops of the V_H and V_L chains that are, surprisingly, highly identical to those regions of a few available sequences of IgE antibodies raised against different allergens. The BLAST analysis showed that the V_L s of A6 and H8 presented a sequence identity of 81–83%, respectively, with V_L s of scFv antibodies against Phl p 5 (Persson et al., 2007). CDRL3 showed the highest sequence variation, as expected; however, the aromatic residues remained. For the V_H different results were obtained: The H8 V_H had an 85% identity with one ϵV_H from antibodies of grass pollen allergic patients (Andréasson et al., 2006), while the A6 V_H presented a 74% sequence identity with another ϵV_H obtained from allergic patients antibodies (Coker et al., 2005). CDRH1 and CDRH2 loops were quite conserved and the largest differences were found in the CDRH3 regions. In accordance with our results, Niemi et al. (2007) reported a high identity among V_L s of anti-grass pollen, anti-latex and anti-bovine milk antibodies, suggesting the presence of similar epitopes on these allergens. It is worth mentioning that the IgEs anti-hevein reported by Laukkanen et al. (2003) present an identity of 63% when compared to H8, with the highest similarities between CDRL1 and CDRL3.

To further analyze the epitope regions, we performed ELISA inhibition experiments testing two natural isoforms and the allergen chemically modified at the tryptophan residues. These isoforms are polymorphic variants of the same allergen, which present small variations in the discontinuous epitopes that could translate in important changes in the binding strength. We found that each recombinant antibody recognized in a different way the isoallergens tested. The local change in charge distribution present in Hev b 6.0202 might explain why the scFv G7 binding ability was reduced, meaning that Asn¹⁴ is part of the epitope recognized by this antibody. On the contrary, when the milieu of the aromatic residues (Trp²¹ and Trp²³) was changed, the scFv H8 and mAb 6E7-binding abilities were decreased, suggesting their participation in another immunodominant region. Lastly, pseudohevein that includes mutations at the C-terminal region and at the aromatic area (Trp²¹Tyr) showed a reduction in the binding capacity for all the antibodies, thus suggesting the participation of those residues in the antibodies recognition (Fig. 2). Comparatively pseudohevein and modified hevein presented the lowest IgE recognition, indicating that the residues Trp²¹, Trp²³, Thr²⁷, Glu²⁹, Asp³⁴, His³⁵, and Asp⁴³ are relevant for this interaction.

In agreement with the results presented above, when intrinsic fluorescence spectra were recorded in the presence of increasing concentrations of scFv H8 and mAb 6E7, it was observed that the relative emission of the two tryptophans in hevein shifted. The dose-dependent shift in fluorescence emission could be mediated by a conformational change in the protein once the antibodies were bound, or by a change in the local environment of the two tryptophans, reflected as polarity. With regard to the fluorescence quenching with acrylamide, the presence of the two antibodies provoked a decrease in the accessibility to at least one of the

tryptophans. This is consistent with our previous report, where we established the importance of the aromatic residues exposed to the solvent for Hev b 6.02–IgE interaction (Reyes-López et al., 2004).

The crucial event for triggering an allergic response is the allergen–antibody interaction; therefore, determining the structure of these complexes is a way to identify relevant epitopes. These molecular determinants can be predicted by molecular modeling, using suitable software. For this purpose, we obtained two docked models using the scFvs H8 and G7 with hevein. They suggested two putative discontinuous epitopes, the first comprising a patch of exposed aromatic residues surrounded by polar ones, and the latter including the amino and carboxy-terminal ends. These results are in agreement with the experimental assays presented above, and are consistent with some characteristics of antigen–antibody complexes from crystallographic data (Table 3) (Lo Conte et al., 1999; Collis et al., 2003).

It is increasingly evident that aromatic patches on the surface of allergens are important. For example, a common putative IgE epitope present in cysteine protease allergens shows a conserved Tyr localized in the center of the epitopes (Furmonaviciene et al., 2000). In another case, one Trp is a critical residue, recognized by monoclonal antibodies, in the serine protease allergens (Lee et al., 2007). Furthermore, the epitope of albumin 2S, from sunflower seeds, consists of a hydrophobic patch including one Trp and five methionines (Pantoja-Uceda et al., 2004). Recently, the crystal structure of the complex Api m 2–Fab reported by Padavattan et al. (2007) presented an epitope formed by a central hydrophobic patch, which is surrounded by charged and polar residues. Two aromatic residues, a Trp and one Phe, establish six apolar contacts with the Fab. All these results support the idea that aromatic residues participate in networks of co-operative interactions with not only hydrophobic, but also charged and hydrogen bond donor and acceptor groups in the IgG and IgE–allergen interactions.

In summary, the use of oligoclonal antibodies (i.e. mixtures of monoclonal antibodies or human scFvs) proved useful in this kind of studies. The identification of Hev b 6.02 B-cell epitopes will allow for a structure-based rational modification of these regions aimed at producing allergen variants with low IgE-binding activity.

Acknowledgments

The authors thank QFB. Sandra Suárez for their help to the production of monoclonal antibodies; M. C. Timoteo Olamendi-Portugal for the DNA sequences determination; Dr. César A. Reyes-López for providing some of the allergens, and M.C. Teresa Ramírez-Apan for technical assistance. We also thank Dr. Socorro Orozco from I.N.P., Mexico City for providing the allergic patients sera (The ethics committee of the Institution approved this study). This work was partially supported by DGAPA-UNAM (IN209506-3). The PDCB-UNAM and the scholarship to MPE from CONACyT and DGEP-UNAM are also acknowledged.

References

- Andréasson, U., Flicker, S., Lindstedt, M., Valenta, R., Greff, L., Korsgren, M., Borrebaeck, C., Ohlin, M., 2006. The human IgE-encoding transcriptome to assess antibody repertoires and repertoire evolution. *J. Mol. Biol.* 362, 212–227.
- Banerjee, B., Wang, X., Kelly, K., Fink, J.N., Sussman, G.L., Kurup, V.P., 1997. IgE from latex-allergic patients binds to cloned and expressed B cell epitopes of pseudohevein. *J. Immunol.* 159, 5724–5732.
- Beezhold, D., Kostyal, D., Sussman, G., 1997. IgE epitope analysis of the hevein pre-protein: a major latex allergen. *Clin. Exp. Immunol.* 108, 114–121.
- Bernstein, D.I., Biagini, R.E., Karmani, R., Hamilton, R., Murphy, K., Bernstein, C., Arija, M., Arif, S., Berendts, B., Yeang, H., 2003. In vivo sensitization to purified Hevea

- brasilienis* proteins in healthcare workers sensitized to natural rubber latex. *J. Allergy Clin. Immunol.* 111, 610–616.
- Blanco, C., 2003. Latex-fruit syndrome. *Curr. Allergy Asthma Rep.* 3, 47–53.
- Bradford, J.R., Westhead, D.R., 2005. Improved prediction of protein–protein binding sites using a support vector machines approach. *Bioinformatics* 21, 1487–1494.
- Cadwell, R.C., Joyce, G.F., 1992. Randomization of genes by PCR mutagenesis. *PCR Methods Appl.* 2, 28–33.
- Collis, A.V., Brouwer, A.P., Martin, A.C., 2003. Analysis of the antigen combining site: correlations between length and sequence composition of the hypervariable loops and the nature of the antigen. *J. Mol. Biol.* 325, 337–354.
- Coker, H., Harries, H., Banfield, G., Carr, V., Durham, S., Chevretton, E., Hobby, P., Sutton, B., Gould, H., 2005. Biased use of V_H5 IgE-positive B cells in the nasal mucosa in allergic rhinitis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 116, 445–452.
- Davies, J., O'Heir, R., Suphioglu, C., 2000. Use of phage display technology to investigate allergen–antibody interactions. *J. Allergy Clin. Immunol.* 105, 1085–1092.
- DeLano, W.L., 2002. The PyMOL Molecular Graphics System. DeLano Scientific, San Carlos, CA, USA.
- Denepoux, S., Eibensteiner, P., Steinberger, P., Vitala, S., Visco, V., Weyer, A., Kraft, D., Banchereau, J., Valenta, R., Lebecque, 2000. Molecular characterization of human IgG monoclonal antibodies specific for the major birch pollen allergen Bet v 1. Anti-allergen IgG can enhance the anaphylactic reaction. *FEBS Lett.* 465, 39–46.
- Drew, A.C., Eusebius, N.P., Kenins, L., de Silva, H.D., Suphioglu, C., Rolland, J.M., O'heir, R.E., 2004. Hypoallergenic variants of the major latex allergen Hev b 6.01 retaining human T lymphocyte reactivity. *J. Immunol.* 173, 5872–5879.
- Edwards, M.R., Collins, A.M., Ward, R.L., 2001. The application of phage display in allergy research: characterization of IgE, identification of allergens and development of novel therapeutics. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 2, 225–240.
- Flicker, S., Steinberger, P., Ball, T., Krauth, M.T., Verdino, P., Valent, P., Almo, S., Valenta, R., 2006. Spatial clustering of the IgE epitopes on the major timothy grass pollen allergen Phl p 1: importance for allergenic activity. *J. Allergy Clin. Immunol.* 117, 1336–1343.
- Flicker, S., Valenta, R., 2003. Renaissance of the blocking antibody concept in type I allergy. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 132, 13–24.
- Furmonaviciene, R., Sewell, H.F., Shakib, F., 2000. Comparative molecular modeling identifies a common putative IgE epitope on cysteine protease allergens of diverse sources. *Clin. Exp. Allergy* 30, 1307–1313.
- Galfre, G., Milstein, C., 1981. Preparation of monoclonal antibodies: strategies and procedures. *Methods Enzymol.* 73, 3–46.
- Gray, J.J., Moughon, S., Wang, C., Schueler-Furman, O., Kuhlman, B., Rohl, C.A., Baker, D., 2003. Protein–protein docking with simultaneous optimization of rigid-body displacement and side-chain conformations. *J. Mol. Biol.* 331, 281–299.
- Karisola, P., Alenius, H., Mikkola, J., Kalkkinen, N., Helin, J., Penttinen, O.T., Repo, S., Reunala, T., Turjanmaa, K., Jhonson, M., Palosuo, T., Kulomaa, S., 2002. The major conformational IgE-binding epitopes of hevein (Hev b 6.02) are identified by a novel chimera-based allergen epitope mapping strategy. *J. Biol. Chem.* 277, 22656–22661.
- Karisola, P., Mikkola, J., Kalkkinen, N., Alrenne, K.J., Laitinen, O.H., Repo, S., Penttinen, O.T., Reunala, T., Turjanmaa, K., Jhonson, M.S., Palosuo, T., Kulomaa, M.S., Alenius, H., 2004. Construction of hevein (Hev b 6.02) with reduced allergenicity for immunotherapy of latex allergy by computation of six amino acid residues on the conformational IgE epitopes. *J. Immunol.* 172, 2621–2628.
- Krissinel, E., Henrick, K., 2007. Inference of macromolecular assemblies from crystalline state. *J. Mol. Biol.* 372, 774–797.
- Lakowicz, J.R., 1986. Fluorescence studies of structural fluctuations in macromolecules as observed by fluorescence spectroscopy in the time, lifetime, and frequency domains. *Methods Enzymol.* 131, 518–567.
- Lambert, C., Leonard, N., De Bolle, X., Deplereux, E., 2002. ESyPred3D: prediction of proteins 3D structures. *Bioinformatics* 18, 1250–1256.
- Laukkanen, M.L., Mäkinen-Kiljunen, S., Isoherranen, K., Haahtela, T., Söderlund, H., Takkinen, K., 2003. Hevein-specific recombinant IgE antibodies from human single-chain antibody phage display libraries. *J. Immunol. Methods* 278, 271–281.
- Lee, L.H., Tam, M.F., Chou, H., Tai, H.Y., Shen, H.D., 2007. Lys, Pro and Trp are critical core amino acid residues recognized by FUM20, a monoclonal antibody against serine protease pan-fungal allergens. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 143, 194–200.
- Lefranc, M.P., 2003. IMGT, the international ImMunoGeneTics database. *Nucleic Acids Res.* 31, 307–310.
- Li, M., Gustchina, A., Alexandratos, J., Wlodawer, A., Wunschmann, S., Kopley, C.L., Chapman, M., Pomés, A., 2008. Crystal structure of a dimerized cockroach allergen Bla g 2 complexed with a monoclonal antibody. *J. Biol. Chem.* 283, 22806–22814.
- Lo Conte, L., Chotia, C., Janin, J., 1999. The atomic structure of protein–protein recognition sites. *J. Mol. Biol.* 285, 2177–2198.
- Marks, J.D., Hoogenboom, H.R., Bonner, T.P., McCafferty, J., Griffiths, A.D., Winter, G., 1991. By-passing immunization: human antibodies from V-gene libraries displayed on phage. *J. Mol. Biol.* 222, 581–597.
- Mirza, O., Henriksen, A., Ipsen, H., Larsen, J.N., Wissenbach, M., Spangfort, M.D., Gajhede, M., 2000. Dominant epitopes and allergic cross-reactivity: complex formation between a Fab fragment of a monoclonal murine IgG antibody and the major allergen from birch pollen Bet v 1. *J. Immunol.* 165, 331–338.
- Naik, M.T., Chang, C.F., Kuo, I.C., Kung, C.C., Yi, F.C., Chua, K.Y., Huang, T.H., 2008. Roles of structure and structural dynamics in the antibody recognition of the allergen proteins: An NMR study on *Blomia tropicalis* major allergen. *Structure* 16, 125–136.
- Nielsen, U.B., Kirpotin, U.B., Pickering, E.M., Drummond, D.C., Marks, J.D., 2006. A novel assay for monitoring internalization of nanocarrier coupled antibodies. *BMC Immunol.* 7, 24.
- Niemi, M., Jytha, S., Laukkanen, M.L., Söderlund, H., Mäkinen-Kiljunen, S., Kallio, J.M., Hakulinen, N., Haahtela, T., Takkinen, K., Rouvinen, J., 2007. Molecular interactions between a recombinant IgE antibody and the β -lactoglobulin allergen. *Structure* 15, 1413–1421.
- Padavattan, S., Schirmer, T., Schmidt, M., Akdis, C., Valenta, R., Mittermann, I., Soldatova, L., Slater, J., Mueller, U., Markovic-Housley, Z., 2007. Identification of a B-cell epitope of hyaluronidase, a major bee venom allergen, from its crystal structure in complex with a specific Fab. *J. Mol. Biol.* 368, 742–752.
- Pantoja-Uceda, D., Palomares, O., Bruix, M., Villalba, M., Rodriguez, R., Rico, M., Santoro, J., 2004. Solution structure and stability against digestion of rproBnfb, a recombinant 2S albumin from rapeseed: relationship to its allergenic properties. *Biochemistry* 43, 16036–16045.
- Persson, H., Sadegh, M.K., Greiff, L., Ohlin, M., 2007. Delineating the specificity of an IgE-encoding transcriptome. *J. Allergy Clin. Immunol.* 120, 1186–1192.
- Ponomarenko, J., Bourne, P., 2007. Antibody–protein interactions: benchmark datasets and prediction tools evaluation. *BMC Struct. Biol.* 7, 64.
- Raulf-Heimsoth, M., Rozynek, P., Brüning, T., Rihs, H.P., 2004. Characterization of B- and T-cell responses and HLA-DR4 binding motifs of the latex allergen Hev b 6.01 (prohevein) and its post-transcriptionally formed proteins Hev b 6.02 and Hev b 6.03. *Allergy* 59, 724–733.
- Reyes-López, C.A., Hernández-Santoyo, A., Pedraza-Escalona, M., Mendoza, G., Hernández-Arana, A., Rodríguez-Romero, A., 2004. Insights into a conformational epitope of Hev b 6.02 (hevein). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 314, 123–130.
- Reyes-López, C.A., Pedraza-Escalona, M., Mendoza, G., Hernández-Santoyo, A., Rodríguez-Romero, A., 2006. A single amino acid substitution on the surface of a natural hevein isoform (Hev b 6.0202), confers different IgE recognition. *FEBS Lett.* 580, 2483–2487.
- Riaño-Umbarila, L., Juárez-González, V.R., Olamendi-Portugal, T., Ortiz-León, M., Posasani, L.D., Becerril, B., 2005. A strategy for the generation of specific human antibodies by directed evolution and phage display. An example of a single-chain antibody fragment that neutralizes a major component of scorpion venom. *FEBS J.* 272, 2591–2601.
- Šali, A., Blundell, T.L., 1993. Comparative protein modeling by satisfaction of spatial restraints. *J. Mol. Biol.* 234, 779–815.
- Tina, K.G., Bhadra, R., Srinivasan, N., 2007. PIC: protein interactions calculator. *Nucleic Acids Res.* 35, W473–W476.
- Tovchigrechko, A., Vakser, I.A., 2006. GRAMM-X public web server for protein–protein docking. *Nucleic Acids Res.* 34, W310–W314.
- van Neerven, R.J.J., Knol, E.F., Eijnaes, A., Wurtzen, P.A., 2006. IgE-mediated allergen presentation and blocking antibodies: regulation of T-cell activation in allergy. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 141, 119–129.
- Wagner, S., Breiteneder, H., 2005. *Hevea brasiliensis* latex allergens: current panel and clinical relevance. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 136, 90–97.
- Whitelegg, N., Rees, A., 2000. WAM: an improved algorithm for modeling antibodies on the WEB. *Protein Eng.* 13, 819–824.
- Yeang, H.Y., Hamilton, R.G., Bernstein, D.L., Arif, S., Chow, S., Loke, H., Heimsoth, M.R., Wagner, S., Breiteneder, H., Biagini, R.E., 2006. Allergen concentration in natural rubber latex. *Clin. Exp. Allergy* 36, 1078–1086.

A single amino acid substitution on the surface of a natural hevein isoform (Hev b 6.0202), confers different IgE recognition

César A. Reyes-López^a, Martha Pedraza-Escalona^a, Guillermo Mendoza^b,
Alejandra Hernández-Santoyo^a, Adela Rodríguez-Romero^{a,*}

^a Instituto de Química, Universidad Nacional, Autónoma de México, Circuito Exterior, Cd. Universitaria, México, D.F. 04510, Mexico

^b Facultad de Medicina, Universidad Nacional, Autónoma de México, México, D.F. 04510, Mexico

Received 2 February 2006; revised 23 March 2006; accepted 28 March 2006

Available online 17 April 2006

Edited by Miguel De la Rosa

Abstract Decreased immune reactivity of isoforms of major allergens has been reported. However, such claims have always been based on experiments with recombinant proteins. This work describes the molecular and physicochemical characterization of a hevein (Hev b 6.0201) natural isoform (Hev b 6.0202), which is present in rubber latex from *Hevea brasiliensis*. The isoallergen has a single substitution Asn14Asp, which gives rise to local differences in the surface potential, as observed from the crystal structure presented here. Besides, ELISA inhibition using serum pools of adult and pediatric patients showed reduced IgE-binding capacity (~27%) with the isoallergen. Overall, these results are relevant to delineate crucial residues involved in this dominant discontinuous epitope.

© 2006 Federation of European Biochemical Societies. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Crystal structure; Isoallergens; Hevein; Hev b 6.0201; IgE-epitope

1. Introduction

Allergic responses to natural rubber latex (NRL) proteins have been recognized as a severe health problem. Unlike many IgE-mediated allergies that are induced by a single or a few allergens, there are hundreds of proteins in NRL that vary in their allergenic potential. Fifty-six different allergens, which are recognized by IgE from people allergic to this material, have been identified [1]. Of those, 13 proteins officially accepted by the International Union of Immunological Societies-WHO are recognized as the main cause of sensitization of susceptible individuals, and most of them consist of a mixture of closely related isoforms, as has been shown by cDNA cloning [2]. The isoforms that have been reported for different allergens are: two for Hev b 7 [3]; six for Hev b 8 [4]; three for Hev b 10 [5] and two for Hev b 11 [6].

Overall, a great variety of isoallergens have been studied, essentially at an immunological level; however, little is known about structural differences between them. For instance, it has been found that Bet v 1 isoforms from *Betula verrucosa* pollen bind with different affinities to the IgEs and that they provoke different inflammatory responses [7]. Isoforms of Der f 2, a

major sensitizing allergen present in house dust mites, have also been reported and are known to have different antigenicities [8]. Consequently, in some cases, isoforms can be used in immunotherapy treatments with less side-effects [9]. Nonetheless, in all these cases recombinant proteins were used, natural isoforms have not been studied in this context.

Hevein is one of the major allergens present in NRL. It is a lectin that belongs to the defense related family of proteins [10,11]. This polypeptide chain is present as a chitin-binding domain in several plant proteins, such as multi-hevein domain lectins and class I chitinases [12,13], which have been associated with cross-reactivity between latex and some fruits [14,15]. Recently, information regarding conformational epitopes of this allergen has been described: Karisola et al. [16,17], using chimeric-hevein, hevein mutants and molecular modeling suggested that the N-terminal and C-terminal regions essentially determined the IgE binding activity. In a parallel work, our group described critical residues, (W²¹, W²³) in an immunodominant IgE-epitope [18], which were also present in the linear or sequential epitopes described by Beezhold et al. [19] and Banerjee et al. [20].

Several molecular forms of hevein have been identified in NRL, being pseudohevein the only one widely characterized [21]. The importance of natural hevein isoallergens in the sensitization of people allergic to NRL has not been determined. With the aim of gaining insights into these issues, here we report the 3D structure at 1.7 Å resolution of the isoallergen Hev b 6.0202. Additional biochemical and immunological data of this molecule are reported and compared with those for hevein.

2. Materials and methods

Hev b 6.0202 was purified as described in a previous report [22], with some modifications. Briefly, the fresh luteoid fraction from latex was homogenized in 50 mM Tris, 0.15 M NaCl (pH 8.2). The proteins which precipitated with ammonium sulfate (65–100% saturation) were fractionated in a Superdex-75 column (Amersham Biosciences) equilibrated with the same buffer. Fractions containing hevein and other isoforms were applied to a C-18 reverse phase (RP) column (Beckman Co.) in a high performance liquid chromatography (HPLC) system, equilibrated with 0.1% TFA in deionized water. The elution of Hev b 6.0202 was obtained with 0.12% TFA in acetonitrile.

The electrophoretic migration of hevein and its isoform was determined in a 20% PAGE gel at native conditions (pH 8.4). Additionally, capillary zone electrophoresis (CZE) was performed at 18 kV using a Beckman P/ACE System 5500, with diode array detector. The capillary tubing was of uncoated fused silica (75 µm × 57 cm). The samples were introduced into the capillary in a 0.05 M phosphate buffer, pH 2.5, and detection was performed at 200 nm.

*Corresponding author. Fax: +52 55 56 16 2217.

E-mail address: adela@servidor.unam.mx (A. Rodríguez-Romero).

The sequence of the isoallergen was determined by automated Edman degradation on a gas-phase protein sequencer (LF 3000, Beckman Instruments, Irvine, CA) using the purified peptides from enzymatic hydrolysis. Two peptides were obtained from the reduced and alkylated allergen when hydrolyzed with trypsin (Sigma Chemical Co.) (0.15 M Tris-HCl, pH 8.2, for 24 h at 37 °C) and two peptides when Glu-C (Boehringer-Mannheim) was used (0.15 M Tris-HCl, pH 8.8, for 60 h at 37 °C). In both cases, the resulting fragments were separated by RP chromatography and each purified chain was subjected to automated Edman sequencing analysis.

Hev b 6.0202 crystals were grown at 18 °C from hanging drops by mixing 5 µl of isoallergen (6.0 mg/ml) with 5 µl of reservoir solution (60% MPD, 20 mM Tris-HCl, pH 7.5). Diffraction data were collected using a Rigaku R-axis IIC image plate system with a rotating anode generator, at 100 K after soaking a crystal in cryoprotectant solution (70% MPD). The data were processed and scaled with d*TREK [23]. It is interesting to note that, even though the crystallization conditions for both allergens were very similar, they crystallized in different space groups (hevein, orthorhombic and the isoform, trigonal).

The 3D structure was solved by molecular replacement using the program AMoRe [24] and Hev b 6.0201 (PDB code 1Q9B) as the search probe. After finding a clear solution, the structural model was subjected to rigid body refinement using CNS [25] and revised with QUANTA2000 (Accelrys). Further refinement with the simulated annealing protocol of CNS, followed by individual temperature-factor refinement, gave R and R_{free} values of 22.3% and 24.7%, respectively. At the final stage of this process, an anisotropic refinement was made using the REFMAC-TLS program from the CCP4 suite [26], dropping the R_{free} value to 19.2% (R -factor = 15.1%). A summary of the data-collection and refinement statistics is given in Table 1. Coordinates for the isoform have been deposited at the RSCB Protein Data Bank (accession code 1WKX).

Calorimetric assay was performed using a VP-ITC instrument (MicroCal Inc.). The binding reaction was monitored by recording the heat released upon small additions of a N - N' - N'' -triacetyl- D -glucosamine (chitotriose) solution to the protein (100 mM phosphate buffer, pH 7.4). In the experiment, 25 aliquots (9 µl each) of an 8 mM chitotriose were titrated into a 0.249 mM protein solution at 25 °C. The heat of dilution of the saccharide was obtained by adding ligand to the buffer solution under identical conditions and injection schedule used with the protein sample. The enthalpy change (ΔH) and binding constant (K_b) were determined from the experimental titration curve using the software ORIGIN.

Table 1
Data collection and refinement statistics

Data collection	
Space group	P3 ₁ 21
Unit cell parameters (Å): a , b , c	37.22, 37.22, 48.79
Resolution range (Å)	16–1.7
Number of observations	17304
Number of unique reflections	4440
$I/\sigma(I)$	25.2
Completeness (%)	97.1
Multiplicity	3.9
R_{sym} (%)	3.7
Refinement	
R -factor (%) / R_{free} (%)	15.2/19.1
Number of atoms: protein/solvent	321/40
RMS deviation from ideal values	
Bond length (Å)	0.014
Bond angle (°)	2.1
Residues in Ramachandran plot (%)	
Most allowed region	91.8
Allowed region	8.2
Average B -factors (Å ²): protein/water	15.2/24.9

^a $R_{\text{sym}} = 100 \sum_h \sum_k |I(h) - \langle I(h) \rangle| / \sum_h I(h)$, where $I(h)$ is the h th measurement of the h reflection and $\langle I(h) \rangle$ is the average value of the reflection intensity.

^b R_{free} is for 10% of the total reflections.

The ability of Hev b 6.0202 to inhibit the binding of allergic patients' IgE to hevein was investigated by ELISA inhibition assay as described previously [18].

3. Results and discussion

3.1. Purification and characterization of Hev b 6.0202

One main fraction containing hevein (90%) and its isoform (~5%), was obtained from the molecular exclusion chromatography, then the proteins were separated by reverse phase chromatography (results not shown). The presence and proportion of this particular isoallergen was constant in all the latex samples used, no matter the clone (GV-42 and IAN-710) or the season of recollection of latex and it was independent on the age of the preparation. At this point it is important to stress that latex was always processed immediately.

A native PAGE gel showed single bands for the purified proteins, being the isoform the more anionic (Fig. 1A). These results were confirmed by CZE, where retention times of 4.66 min and 13.51 min were obtained for hevein and its isoallergen, respectively.

Regarding the primary structure, analysis of the isoallergen peptides obtained after hydrolysis with trypsin and Glu-C, demonstrated the presence of an aspartyl residue in position 14, which corresponds to asparagine in hevein. The origin of this deamidation is uncertain; chemical deamination by aging of the samples or purification procedures is unlikely due to the fact that under the conditions used (Tris, pH 8.2, and 4 °C) this modification has not been described [27,28]. Besides, deamination occurs more readily at sequences where the side chain of the carboxyl adjacent residue does not impose steric hindrance, which is not the case for hevein (Fig. 1B). Enzymatic deamination is not probable, because to date there are no exam-

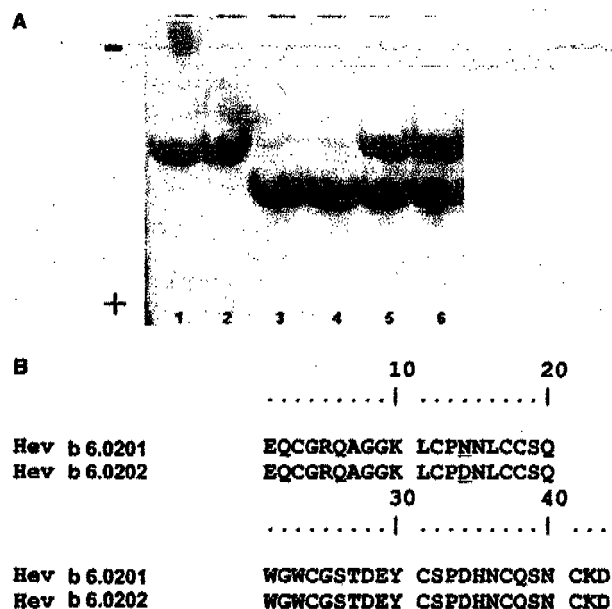


Fig. 1. (A) Electrophoretic profile of hevein and its isoform. Lanes 1 and 2 contain hevein; 3 and 4 the isoform; 5 and 6 have a mixture of both allergens (20 µg each). (B) Sequence comparison between both isoallergens. Residues involved in hevein linear epitopes are 13–24 and 29–36.

ples of naturally occurring asparaginases that deaminate Asn residues within a peptide or protein (XxxAsnYyy). It is then likely that non-enzymatic deamination of Asn14 actually occurs in the plant tissues; however, no isoAsp was detected, probably due to the presence of enzymes that have been found to be widespread *in vivo*, which convert isoAsp to L-Asp [29].

Finally, a genetic allelic isoform cannot be excluded at this time either. There are reports of hevein isoforms (pseudohevein and others with different C-terminal residues) in the GenBank.

3.2. The overall structure of the isoallergen and comparison with the structure of hevein

The 3D-structure of Hev b 6.0202 at 1.7 Å resolution is comparable with the one of hevein (1.5 Å resolution); with a root mean square deviation (r.m.s.d.) of C α positions of 0.23 Å. A stereoscopic view of the superposed molecules is shown in Fig. 2A. An insert showing details of the loop Pro13-Leu16

indicates that the side chains of Pro13 and Asn15 have different conformations in both allergens. Most of the residues were clearly modeled, with the exceptions of Lys⁴² and Asp⁴³, since the former lacked density for some atoms of the side chain, while the latter had to be modeled as Ala because no density was observed further the C β . An analysis of $F_o - F_c$ and $2F_o - F_c$ electron density maps (Fig. 2B) at position 14 showed no evidence for an isoaspartyl residue, eliminating the possibility of Asn deamination during the purification procedures.

The surface electrostatic potentials of both allergens are slightly different (Fig. 2C), being more negative at the position 14 for the isoform. The effect on the binding of specific serum IgE (Fig. 3) due to the minor change described here suggests that Asn¹⁴ is an important residue in the human IgE recognition, and consequently as being part of this dominant conformational epitope. It is worth noting that Asn¹⁴ has been described as being part of one of the two linear epitopes pres-

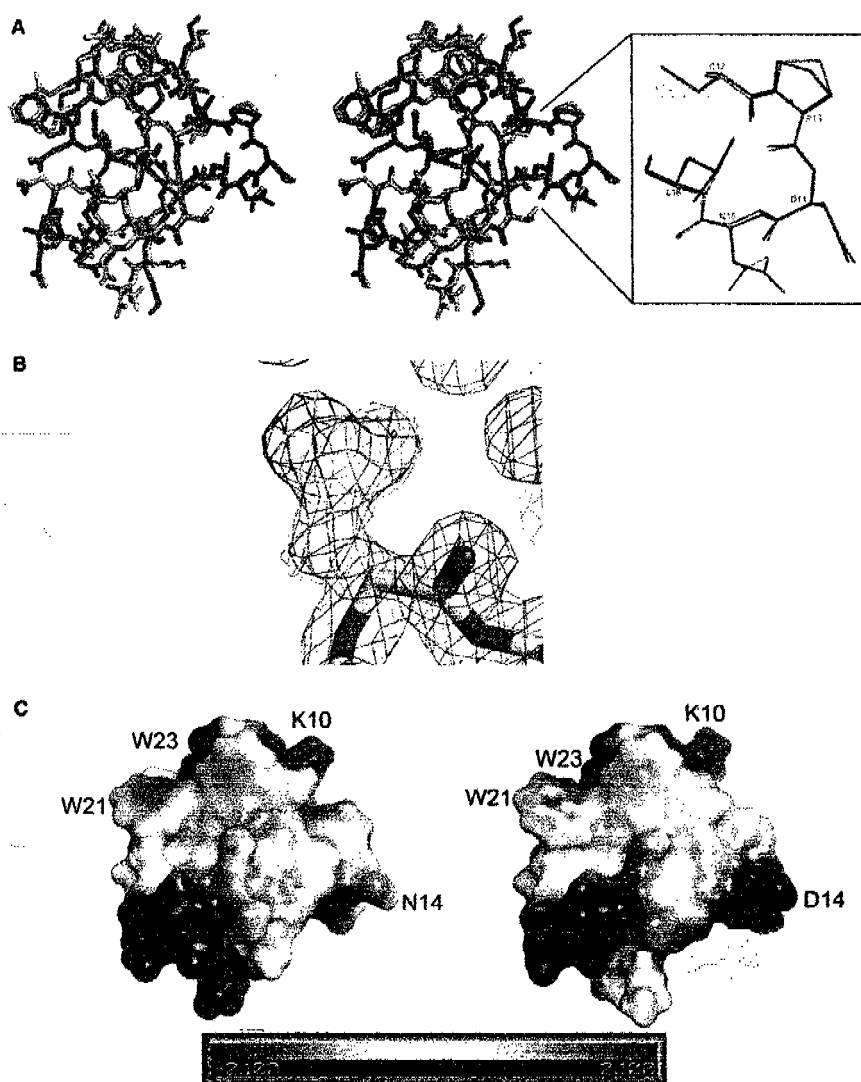


Fig. 2. (A) Stereoscopic view of the superposition of hevein (green) and its isoform (blue). Inset shows details of residues 12–16. (B) Details of the $2F_o - F_c$ (1σ) and the $F_o - F_c$ (3σ) electronic density maps, in blue and green, respectively, in the Asp¹⁴ region for Hev b 6.0202. (C) Electrostatic potentials for hevein (left) and its isoform (right). The negative potentials are shown in red ($-2.1k_B T/e$) and the positive ones in blue ($2.1k_B T/e$). Calculations were done with the program APBS [33] and the figures with PyMOL.

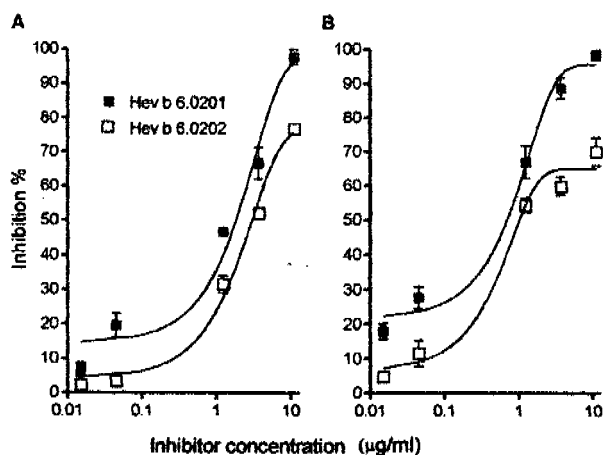


Fig. 3. ELISA inhibition was performed with hevein and its isoform at five different concentrations (0.01–10 µg/ml). Serum pool (diluted 1:27) was obtained from 10 high-risk pediatric patients and another pool from 10 adult high-risk health care workers (Instituto Nacional de Pediatría, México City). The inhibition curve for hevein is shown for comparison. (A) Results for a pool of pediatric sera. (B) Results for an adult sera pool.

ent in hevein [19,20]. It should be mentioned that previous strategies were not effective in detecting this residue as being part of a conformational epitope [16–18].

3.2.1. Binding energetics of Hev b 6.0202 to chitotriose. There were no significant differences in the K_a or in the ΔH values for both allergens ($14250 \pm 770 \text{ M}^{-1}$ and $7.04 \pm 0.13 \text{ kcal/mol}$ for hevein [30] and $14640 \pm 1300 \text{ M}^{-1}$ and $7.2 \pm 0.3 \text{ kcal/mol}$ for the isoform). The stoichiometry (η) was also nearly one in both cases. Taken together, these results indicate that the residues in the sugar binding site, essentially Trp²¹, Trp²³, Tyr³⁰ and Ser¹⁹, are spatially arranged in a similar way in both isoallergens [10], giving approximately the same affinity for the chitotriose moiety. Interestingly, Asensio et al. [31] have also demonstrated, using nuclear magnetic resonance (NMR) techniques that the interactions of hevein with (GlcNAc)₅ oligomers involve, not only the residues indicated above, but also the loop region (Pro¹³, Lue¹⁶) and Cys²⁴. We could speculate that differences in this loop could also reflect differences in the chitin binding.

3.2.2. Inhibition ELISA. An inhibition of 76% of the IgE–hevein interaction was detected with the isoallergen in the case of pediatric patients and 70% for adults (Fig. 2); thus, one amino acid substitution decreased the binding of both pools of patients' serum IgE to hevein. In our previous work [18], based on results obtained after chemical modification of the Trp residues present in hevein, prompted us to postulate the region on the surface, which comprises the aromatic residues and other polar residues, as one dominant IgE epitope. In this work we found that both allergens are almost identical; however, the net charge and the superficial charge distribution are different, mainly in the substitution site (Asn14Asp) of the isoform (Fig. 2C). Consequently, the change in the immunological activity of the isoallergen can be directly ascribed to the single amino acid substitution, which results in alteration of local molecular surface area and its electrostatic potential that could lead to a reduction in IgE binding affinity. Similar results have been reported for Bet v 1, where the mutation Glu⁴⁵–Ser inhibited IgE binding between 20% and 50% [32].

Several attempts have been made to delineate conformational epitopes of hevein-like molecules. Karisola et al. reported that Arg⁵, Lys¹⁰, Glu²⁹, Tyr³⁰, His³⁵, and Gln³⁸, were responsible for IgE interaction using a chimera based epitope mapping, hevein mutants and molecular modeling [16,17]. These results are, however, at variance with previous reports [19,20], which independently demonstrated the presence of the aromatic residues in linear hevein epitopes (Fig. 1B). In contrast, using X-ray crystallography and chemical modification of Trp²¹ and Trp²³, we determined that these aromatic residues were relevant for the interaction with model antibodies and IgE [18]. Besides, the relevance that aromatic and polar side chains might have in IgE recognition by hevein-like domains was made apparent from a primary-structure comparison including 60 domains found in proteins that are recognized as allergens (Hev b 6.02, Hev b 11, wheat germ agglutinin, WGA) or potential plant allergens belonging to the pathogenesis-related family. We observed that in 45 cases (75%), the following motif is conserved (hevein numbering; see Fig. 1B): C¹²XXX¹⁵XCCSX²⁰φ²¹XφCGXΩXAcYC³¹, where φ represents an aromatic side chain, Ω is Thr, Ser or Gly, and Ac is, in most cases (84%), either Glu or Asp. Analyzing the same data, but now at position 14, Asn was present in 25 cases (41.4%), whereas Asp appeared just in two (3.3%). These results reinforce the experimental evidence that Asn could also be an important residue in IgE recognition and are in accordance with the concept that dominating IgE binding epitopes may be preferentially located in conserved surface areas. Interestingly, it looks as if some hevein residues that are involved in IgE recognition are the same that participate in the binding of large (GlcNAc)₅ oligomers [31].

New strategies for type I allergy treatment favor the use of recombinant allergens; however, the results presented in this work show that differential behavior in natural isoform has potentially important immunological implications. Additionally, structural studies can provide critical insights to delineate conformational epitopes.

Acknowledgments: We are grateful to Dr. Michael K. Gilson from CARB-UMBI, USA for helpful discussion and Dr. Socorro Orozco and José Huerta from the Instituto Nacional de Pediatría, México City for providing the adult and children sera (The ethics committee of the Institution approved this study). X-ray data were collected at the L.U.E.P., U.N.A.M. This research was supported in part by the Dirección General de Asuntos del Personal Académico UNAM (IN209506-3).

Appendix A. Supplementary material

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.febslet.2006.03.085.

References

- [1] Kurup, V.P., Alenius, H., Kelly, K.J., Castillo, L. and Fink, J.N. (1996) A two-dimensional electrophoretic analysis of the latex peptides reacting with IgE and IgG antibodies from patients with latex allergy. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 109, 58–67.
- [2] Bhalla, P.L. and Singh, M.B. (2004) Engineered allergens for immunotherapy. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* 4, 569–573.
- [3] Sowka, S., Hafner, C., Radauer, C., Focke, M., Brehler, R., Astwood, J.D., Arif, S.A., Kanani, A., Sussman, G.L., Scheiner, O., Beezhold, D.H. and Breiteneder, H. (1999) Molecular and

- immunologic characterization of new isoforms of the *Hevea brasiliensis* latex allergen Hev b 7: evidence of no cross-reactivity between Hev b 7 isoforms and potato patatin and proteins from avocado and banana. *J. Allergy Clin. Immunol.* 104, 1302–1310.
- [4] Rihs, H.P., Chen, Z., Rozynek, P., Baur, X., Lundberg, M. and Cremer, R. (2000) PCR-based cloning, isolation, and IgE-binding properties of recombinant latex profilin (rHev b 8). *Allergy* 55, 712–717.
- [5] Rihs, H.P., Chen, Z., Rozynek, P. and Cremer, R. (2001) Allergenicity of rHev b 10 (manganese-superoxide dismutase). *Allergy* 56, 85–86.
- [6] Rihs, H.P., Dumont, B., Rozynek, P., Lundberg, M., Cremer, R., Bruning, T. and Raulf-Heimsoth, M. (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.
- [7] Sparholt, S.H., Larsen, J.N., Ipsen, H., Schou, C. and Van Neerven, R.J. (1997) Cross-reactivity and T-cell epitope specificity of Bet v 1-specific T cells suggest the involvement of multiple isoallergens in sensitization to birch pollen. *Clin. Exp. Allergy* 27, 932–941.
- [8] Jeong, K.Y., Jin, H.S., Oh, S.H., Hong, C.S., Lee, I.Y., Rec, H.I. and Yong, T.S. (2002) Monoclonal antibodies to recombinant Der f 2 isoallergen in Korea. *Allergy* 57, 29–34.
- [9] Ferreira, F., Hirtenlehner, K., Jilek, A., Odnik-Cvar, J., Breiteneder, H., Grimm, R., Hoffmann-Sommergruber, K., Scheiner, O., Kraft, D., Breitenbach, M., Rheinberger, H.J. and Ebner, C. (1997) Dissection of immunoglobulin E and T lymphocyte reactivity of isoforms of the major birch pollen allergen Bet v 1: potential use of hypoallergenic isoforms for immunotherapy. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 113, 125–127.
- [10] Asensio, J.L., Cañada, F.J., Bruix, M., Rodríguez-Romero, A. and Jimenez-Barbero, J. (1995) The interaction of hevein with *N*-acetylglucosamine-containing oligosaccharides. Solution structure of hevein complexed to chitobiose. *Eur. J. Biochem.* 230, 621–633.
- [11] Breiteneder, H. and Ebner, C. (2000) Molecular and biochemical classification of plant-derived food allergens. *J. Allergy Clin. Immunol.* 106, 27–36.
- [12] Peumans, W.J., Rouge, P. and Van Damme, E.J. (2003) The tomato lectin consists of two homologous chitin-binding modules separated by an extensin-like linker. *Biochem. J.* 376, 717–724.
- [13] Collinge, D.B., Kragh, K.M., Mikkelsen, J.D., Nielsen, K.K., Rasmussen, U. and Vad, K. (1993) Plant chitinases. *Plant J.* 3, 31–40.
- [14] Blanco, C., Diaz-Perales, A., Collada, C., Sanchez-Monge, R., Aragoncillo, C., Castillo, R., Ortega, N., Alvarez, M., Carrillo, T. and Salcedo, G. (1999) Class I chitinases as potential panallergens involved in the latex-fruit syndrome. *J. Allergy Clin. Immunol.* 103, 507–513.
- [15] Lavaud, F., Prevost, A., Cossart, C., Guerin, L., Bernard, J. and Kochman, S. (1995) Allergy to latex, avocado pear, and banana: evidence for a 30 kDa antigen in immunoblotting. *J. Allergy Clin. Immunol.* 95, 557–564.
- [16] Karisola, P., Alenius, H., Mikkola, J., Kalkkinen, N., Helin, J., Pentikainen, O.T., Repo, S., Reunala, T., Turjanmaa, K., Johnson, M.S., Palosuo, T. and Kulomaa, M.S.J. (2002) The major conformational IgE-binding epitopes of hevein (Hev b6.02) are identified by a novel chimera-based allergen epitope mapping strategy. *J. Biol. Chem.* 277, 22656–22661.
- [17] Karisola, P., Mikkola, J., Kalkkinen, N., Airenne, K.J., Laitinen, O.H., Repo, S., Pentikainen, O.T., Reunala, T., Turjanmaa, K., Johnson, M.S., Palosuo, T., Kulomaa, M.S. and Alenius, H. (2004) Construction of hevein (Hev b 6.02) with reduced allergenicity for immunotherapy of latex allergy by comutation of six amino acid residues on the conformational IgE epitopes. *J. Immunol.* 172, 2621–2628.
- [18] Reyes-López, C.A., Hernández-Santoyo, A., Pedraza-Escalona, M., Mendoza, G., Hernández-Arana, A. and Rodríguez-Romero, A. (2004) Insights into a conformational epitope of Hev b 6.02 (hevein). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 314, 123–130.
- [19] Beezhold, D.H., Kostyal, D.A. and Sussman, G.L. (1997) IgE epitope analysis of the hevein preprotein; a major latex allergen. *Clin. Exp. Immunol.* 108, 114–121.
- [20] Banerjee, B., Wang, X., Kelly, K.J., Fink, J.N., Sussman, G.L. and Kurup, V.P. (1997) IgE from latex-allergic patients binds to cloned and expressed B cell epitopes of prohevein. *J. Immunol.* 159, 5724–5732.
- [21] Soedjanaatmadja, U.M., Hofsteenge, J., Jeronimus-Stratingh, C.M., Bruins, A.P. and Beintema, J.J. (1994) Demonstration by mass spectrometry that pseudo-hevein and hevein have ragged C-terminal sequences. *Biochim. Biophys. Acta* 1209, 144–148.
- [22] Rodríguez, A., Tablero, M., Arreguin, B., Hernandez, A., Arreguin, R., Soriano-García, M., Tulinsky, A., Park, C.H. and Seshadri, T.P. (1988) Preliminary X-ray investigation of an orthorhombic crystal of hevein. *J. Biol. Chem.* 263, 4047–4048.
- [23] Pflugrath, J.W. (1999) The finer things in X-ray diffraction data collection. *Acta Crystallogr. D* 55, 1718–1725.
- [24] Navaza, J. (2001) Implementation of molecular replacement in AMoRe. *Acta Crystallogr. D* 57, 1367–1372.
- [25] Brünger, A.T., Adams, P.D., Clore, G.M., DeLano, W.L., Gros, P., Gross-Kunstleve, R.W., Jiang, J.S., Kuszewski, J., Nilges, M., Pannu, N.S., Read, R.J., Rice, L.M., Simonson, T. and Warren, G.L. (1998) Crystallography & NMR system: a new software suite for macromolecular structure determination. *Acta Crystallogr. D* 54, 905–921.
- [26] The CCP4 suite: programs for protein crystallography, Collaborative Computational Project, Number 4 (1994) *Acta Crystallogr. D* 50, 760–763.
- [27] McKerrow, J.H. and Robinson, A.B. (1971) Deamidation of asparaginyl residues as a hazard in experimental protein and peptide procedures. *Anal. Biochem.* 42, 565–568.
- [28] Reissner, K.J. and Aswad, D.W. (2003) Deamidation and isoaspartate formation in proteins: unwanted alterations or surreptitious signals? *Cell Mol. Life Sci.* 60, 1281–1295.
- [29] Robinson, N.E. and Robinson, A.B. (2004) *Molecular Clocks: Deamidation of Asparaginyl and Glutaminyl Residues in Peptides and Proteins*, Althouse Press, Cave Junction, OR.
- [30] García-Hernández, E., Zubillaga, R.A., Rojo-Domínguez, A., Rodríguez-Romero, A. and Hernández-Arana, A. (1997) New insights into the molecular basis of lectin carbohydrate interactions: a calorimetric and structural study of the association of hevein to oligomers of *N*-acetylglucosamine. *Proteins* 29, 467–477.
- [31] Asensio, J.L., Canada, F.J., Siebert, H.C., Laynez, J., Poveda, A., Nieto, P.M., Soedjanaatmadja, U.M., Gabius, H.J. and Jimenez-Barbero, J. (2000) Structural basis for chitin recognition by defense proteins: GlcNAc residues are bound in a multivalent fashion by extended binding sites in hevein domains. *Chem. Biol.* 7, 529–543.
- [32] Spangfort, M.D., Mirza, O., Ipsen, H., Van Neerven, R.J., Gajhede, M. and Larsen, J.N. (2003) Dominating IgE-binding epitope of Bet v 1, the major allergen of birch pollen, characterized by X-ray crystallography and site-directed mutagenesis. *J. Immunol.* 17, 3084–3090.
- [33] Baker, N.A., Sept, D., Joseph, S., Holst, M.J. and McCammon, J.A. (2001) Electrostatics of nanosystems: application to microtubules and the ribosome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 10037–10041.



Insights into a conformational epitope of Hev b 6.02 (hevein)

César A. Reyes-López,^a Alejandra Hernández-Santoyo,^a Martha Pedraza-Escalona,^a Guillermo Mendoza,^b Andrés Hernández-Arana,^c and Adela Rodríguez-Romero^{a,*}

^a Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior, Cd. Universitaria, Coyoacán México, DF 04510, Mexico

^b Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Coyoacán México, DF 04510, Mexico

^c Departamento de Química, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, P.O. Box 55-534, Iztapalapa México, DF 09340, Mexico

Received 27 November 2003

Abstract

Hevein (Hev b 6.02) is a major IgE-binding allergen in natural rubber latex and manufactured products. Both tryptophans (Trp²¹ and Trp²³) of the hevein molecule were chemically modified with BNPS-skatole (2-nitrophenylsulfenyl-3-methyl-3'-bromoindole-nine); derivatized allergen failed to significantly inhibit binding of serum IgE in ELISA assays. Similarly, skin prick tests showed that hevein-positive patients gave no response with the modified allergen. Dot blot experiments carried out with anti-hevein mono- and polyclonal antibodies confirmed the importance of Trp²¹ and Trp²³ for antibody-recognition, and demonstrated the specific cross-reactivity of other molecules containing hevein-like domains. We also report the structure of Hev b 6.02 at an extended resolution (1.5 Å) and compare its surface properties around Trp residues with those of similar regions in other allergens. Overall our results indicate that the central part of the protein, which comprises three aromatic and other acidic and polar residues, constitutes a conformational epitope.

© 2003 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Allergens; Hev b 6.02; Hevein; Latex; IgE-epitope; X-ray structure

Type I allergic diseases are the result of inappropriate immune responses to certain otherwise innocuous proteins (allergens), in people with a genetic predisposition or atopy. It is well established that the recognition of allergens by immunoglobulin E (IgE) is the key step to the allergic response. The allergen is bound to the IgE high-affinity receptor complex on mast cells and, if this occurs, mediator release is induced leading to the allergic inflammation [1].

Allergenic proteins are structurally and functionally a heterogeneous group, including hydrolytic enzymes, enzyme inhibitors, carbohydrate-binding proteins, actin-binding proteins, and others without a known biological activity [2]. Many structural features of proteins could potentially contribute towards their allergenicity, including availability and identity of the epitopes. However, the stability, the presence of glycosyl groups, and enzymatic or lectin activities can influence allergenicity

[3], although in many instances the mechanisms remain unclear. Natural rubber latex (NRL) proteins are a well-recognized cause of type-I allergic reactions that increasingly affect health-care workers and other people using latex products. It is also known that latex allergy is often combined with allergy to certain fruits such as banana, avocado, and kiwi [4], which contain class I chitinases with a hevein-like domain. In addition, cross-reactivity of latex allergens with pollen allergens from ragweed, timothy grass, and mugwort has been described [5]. In general, the presence of similar or common epitopes might explain this cross-reactivity.

Basically two types of IgE epitopes have been identified. Epitopes that consist of a few continuous amino-acid residues are referred to as linear or sequential [6], whereas those composed of at least two non-adjacent regions of the molecule that are brought into close proximity within the folded structure are named discontinuous or conformational. Since most IgE epitopes appear to be conformational [7], it is clear that a proper understanding of the interactions by which allergens are

* Corresponding author. Fax: +52-55-56-16-22-17.

E-mail address: adela@servidor.unam.mx (A. Rodríguez-Romero).

recognized by IgE antibodies would benefit greatly from the accurate knowledge of allergen structures.

Hev b 6.02, one of the main allergens from rubber (*Hevea brasiliensis* latex), is a lectin-like protein that also acts as a defense-related protein [8] and whose presence has been demonstrated in NRL products [9]. In addition, nature furnishes several isoforms of hevein, one of them, known as pseudohevein (isoform 1), with six amino acid mutations [10]. Hevein-like domains are also present in agglutinins from wheat germ (four domains) [11] and from *Urtica dioica* (two domains) [12]. In these agglutinins the sugar-binding site is mainly constituted by three aromatic amino acids, which interact with sugar rings through stacking contacts.

To gain new insight into the nature of the IgE epitopes for these proteins, we performed immunological experiments using Hev b 6.02, isoform 2, and the protein modified at positions Trp²¹ and Trp²³ with BPNS-skatoles. We also describe the characterization of the chemical modification by MALDI-TOF experiments. Finally, due to the importance of the carbohydrate-binding region and that some conformational differences were reported between the structure solved by X-ray techniques (2.8 Å) [13] and the one in solution [14,15], we performed a crystallographic study of the allergen at high resolution (1.5 Å). Based on a detailed structural comparison of this protein with allergens from plants such as Bet v 2 (*Betula verrucosa*), Hev b 8 (*H. brasiliensis*), and the agglutinin from wheat germ (WGA), we propose an explanation for the observed cross-reactivity pattern among the allergens under consideration.

Experimental procedures

Protein purification and crystallization. Purification and crystallization of Hev b 6.02 (clon IAN-710) have been described elsewhere [13]. In this work, crystals were grown at 18 °C by the sitting drop method, from a solution containing 60% MPD, 40 mM Tris-HCl, pH 7.1.

Chemical modification of the tryptophan residues of Hev b 6.02. Modification was carried out according to Omenn et al. [16]. Briefly, to a solution of 1 mg Hev b 6.02 in 60% acetic acid, 28 µl of a 2 mg/ml solution of 3-BNPS-Skatoles in glacial acetic acid was added (15 min at room temperature). The mixture was then applied to a Sephadex G-10 column (1.0 × 100 cm) equilibrated with 1.5 M acetic acid. The fraction containing modified Hev b 6.02 was dialyzed against distilled water.

Enzymatic digestion of natural and modified Hev b 6.02 with Glu-C and characterization using MALDI-TOF mass spectrometry. Natural (control) and oxidized Hev b 6.02 (350 µg) were treated with 6 M guanidine HCl for 15 min (37 °C). Dithiothreitol (5 mM) in 0.15 M Tris, pH 8.8, was then added to the samples (37 °C, 20 min). Iodoacetamide (10 mM) in the same buffer was added to the samples (20 min at room temperature). The reaction mixtures were then transferred to a High-Trap desalting column (Pharmacia). Five micrograms of each of the samples was applied to a Superdex-peptide column (16/30) (Pharmacia) equilibrated with the Tris buffer. The rest of the proteins were digested with 5 µg endoproteinase Glu-C (Boehringer-Mannheim), which selectively cleaves peptide bond's C-terminal to glutamic acid residues, for 60 h at 37 °C, in the same Tris buffer. After this, the

N-terminal sequence for the peptides obtained was determined by automated Edman degradation on a gas-phase protein sequencer (LF 3000, Beckman Instruments, Irvine, CA).

For the matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry (MS) experiments, 270 µg of the digested proteins was applied to a reversed phase column (C-18, 4.6 × 150 mm, Waters). The purified peptides were mixed with α -cyano-4-hydroxycinnamic acid in 30% acetonitrile, 70% water, and 0.1% TFA, and analyzed in a OMNIFLEX MALDI-TOF instrument (Bruker-Daltonics) which has a 337.1 nm nitrogen laser and 19 kV accelerating voltage in the linear mode.

CD analysis of native and chemically modified Hev b 6.02. CD spectra were recorded on a JASCO J-700 spectropolarimeter at 20 °C. The spectral range was 200–260 nm at 10 nm/min and three scans were accumulated. The protein concentration was 0.2 mg/ml in a 10 mM phosphate buffer, pH 7.0.

Enzyme-linked immunosorbent assay inhibition experiments. Briefly, microplates were coated with 5 µg/well of hevein in sodium carbonate buffer (pH 9.6) and blocked. Afterwards, a serum pool of 10 high-risk pediatric patients (Instituto Nacional de Pediatría, Mexico City), diluted 1:10, was co-incubated (2 h at 37 °C) with either Hev b 6.02, isoform 2, or the allergen chemically modified, at five different concentrations (0.1–25 µg/ml). Plates were washed and biotin-labeled mouse anti-human IgE (1:500 dilution) was allowed to react for 1 h at 37 °C. The plates were then washed and incubated with 100 µl/well of streptavidin-peroxidase diluted 1:2000 for 1 h at 37 °C. Produced color was read at 490 nm using an automated Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) reader (Dynatech MR5000).

Dot blot assays. These experiments were performed to assess the possible cross-reactivity among allergens. Proteins (Hev b 6.02, Hev b 8 (profilin), Hev b 11 (class I chitinase), pseudohevein (isoform 1), isoform 2, chemically modified Hev b 6.02, WGA, and bovine serum albumin (BSA) as a negative control) were applied to nitrocellulose membranes (25 µg/dot), and then washed and blocked. The membranes were incubated with either rabbit polyclonal (PAb) or mouse monoclonal (MAb) IgGs raised against Hev b 6.02. The reaction was revealed by incubation with peroxidase-conjugated anti-rabbit or anti-mouse IgGs and the binding was detected by chemiluminescence.

Skin prick tests. Tests were performed using intact Hev b 6.02 and the protein modified at positions Trp²¹ and Trp²³ in 100 volunteer health-care workers (50% high-risk individuals). The Ethics Committee of the Instituto Nacional de Pediatría, Mexico City, approved this study. The negative control was allergen diluent (Evans solution) and the positive 1.0 mg/ml histamine solution. Five milliliters of solution containing an allergen (1.0–10.0 µg/ml) was placed on the skin, which was then pricked with the tip of a needle. The presence of a wheal larger than the one produced by histamine (2–4 mm) and no reaction with the Evans solution indicated the presence of IgE against the allergen.

X-ray diffraction analysis. X-ray diffraction data were collected, from a single crystal, at 277 K at the Stanford Synchrotron Radiation Laboratory (Station 7-1) using a MAR 30 image plate detector. Diffraction data were processed with the programs DENZO [17] and CCP4 [18]. The structure was solved by molecular replacement using CNS [19] with the protein solved by NMR methods as the search model (PDB entry 1HEV). Initial crystallographic refinement was done with CNS. Simulated annealing was used and each refinement cycle was followed by fitting of the model into sigma weighted electron density maps using QUANTA2000 (Molecular Simulations Inc., San Diego, CA). Cross-validation [20] was employed throughout and 10% of the data were used for the R_{free} calculation. The initial structure and topology files of MPD were obtained from the website HIC-Up [21]. Solvent molecules were placed using the X-SOLVE routine in QUANTA2000 [22].

High-resolution refinement with SHELX97 [23] was started using the model from the CNS refinement. Protein bond and angle restraints used were of Engh and Huber [24]. Anisotropic atom B-factors were

introduced in a conjugate gradient least-squares (CGLS) minimization, in which the data-to-parameter ratio was 2.1. Anti-bumping distances restraints were added to prevent non-bonded collisions. The refinement of the MPD molecules was carried out against parameters of the SHELXL dictionary [25]. With this model, the R_{free} from the isotropic refinement dropped by 3.1 percentage points to 16.01%. A final step was carried out using a least-squares cycle (including all data) converging at R -factor = 0.128 ($F > 4\sigma$). A summary of the data-collection and refinement statistics is given in Table 1.

Structure analysis and comparisons. Analysis of the stereochemistry of the model was done using the program PROCHECK [26]. The molecular superposition of Hev b 6.02 with the two structures obtained by NMR methods was carried out with the program ALIGN [27]. The crystal structures of Bet v 2 (PDB code 1CQA), Hev b 8 (1G5U), and domain C WGA (9WGA) were obtained from the Protein Data Bank.

Table 1
Data collection and refinement statistics

(A) Data collection	
Space group	P2 ₁ 2 ₁ 2
Unit cell parameters (Å)	
<i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i>	31.81, 60.95, 22.51
No. of monomers per asymmetric unit	4
Resolution range (Å)	15–1.5
No. of observations	57,822
No. of unique reflections	7113
<i>I</i> / σ (<i>I</i>)	6.7
Completeness (%)	95.5
Multiplicity	4.7
R_{sym} (%)	5.0
(B) Refinement	
R -factor (%)	12.8
R_{free} (%)	14.5
No. of atoms	
Protein	345
Solvent	39
MPD	32
RMS deviation from ideal values	
Bond length (Å)	0.011
Bond angle (Å)	0.03
Residues in Ramachandran plot (%)	
Most allowed region	88.2
Allowed region	11.8
Average <i>B</i> -factors (Å ²)	
Protein	17.4
Water	33.3
MPD	36.7

^a $R_{\text{sym}} = 100 \sum_h \sum_i |I_i(h) - [I(h)]| / \sum_h I(h)$, where $I_i(h)$ is the *i*th measurement of the *h* reflection and $[I(h)]$ is the average value of the reflection intensity.

^b R_{free} is for 10% of the total reflections.

Results and discussion

Characterization of Chemically Modified Hev b 6.02

Hev b 6.02. Hevein, either modified or not by BNPS-Skatole, was purified by reverse-phase HPLC and submitted to reduction with DTT to break its disulfide bridges; sulfhydryl groups so produced were alkylated with iodoacetamide. The alkylated forms gave nearly identical elution volumes on gel filtration, indicating that the polypeptide chain was not cleaved by treatment with BNPS-Skatole. MALDI-TOF mass spectrometry gave for the modified hevein a mass 40 Da larger than that for the untreated protein. The first five residues, as determined by sequence analysis, were the same for both proteins, confirming that the polypeptide chain was not cleaved by the oxidation treatment.

In parallel experiments, samples of both hevein forms were digested with Glu-C after reduction and alkylation. With both samples two peptides were separated by reverse-phase HPLC. The larger peptide obtained from hevein had a mass of 3424.7 Da, corresponding to the mass of segment 1–29 with its five cysteines alkylated. As determined by Edman degradation, the N-terminal residue of this peptide was Glu, which is the N-terminus of the whole protein. Thus, Glu-C cleaved the peptide bond C-terminal of Glu²⁹ (see Fig. 1). The larger peptide from chemically modified hevein showed a 40-Da increase in mass (3465.5 Da) with respect to the larger peptide from untreated hevein, and Glu was also its N-terminus. In contrast, the mass of the smaller peptide was the same regardless of which sample it came from. This mass corresponds to that of segment 30–43 with its three cysteines alkylated. Tyr was found at the N-terminus of this peptide, confirming the cleavage point of Glu-C. It is clear, therefore, that changes brought about by BNPS-Skatole were restricted to the region where the two Trp residues are located, whereas segment 30–43, which comprises one of the two IgE sequential epitopes of this protein [28] (see Fig. 1), was unaffected. The mass increase of 40 Da suggests that both tryptophans were modified, because derivatives with mass differences of +4 and +20 are known to result from oxidation of tryptophan residues [29,30]. Furthermore, the absorption spectrum of modified hevein increased at 250 nm and decreased at longer wavelengths with respect to that

	10	20	30	40
Hev b 6.02	EQCGRQAGGK	LCPNNLCCSQ	WGWCSTDEY	CSPDHNCQSN CKD
Pseudo-hevein	EQCGRQAGGK	LCPNNLCCSQ	YGWCGSSDDY	CSPSKNCQSN CKGGG
Hev b 11	EQCGRQAGGA	LCPGGLCCSQ	YGWCANTPEY	CGSGCQSQCD GGV
WGA3	IKCGSQAGGK	LCPNNLCCSQ	WGYCGLGSEF	CGEGCQNGAC STD

Fig. 1. Sequence comparison of Hev b 6.02, pseudohevein, isoform 3 of WGA (domain C), and class I chitinase (Hev b 11, hevein domain). The linear IgE epitopes of Hev b 6.02 are shadowed.

for the untreated protein, supporting the formation of oxindole moieties (results not shown) [16].

Circular dichroic spectra of Hev b 6.02 and its derivative (not shown) were found to be nearly identical from 250 to 200 nm. It has been reported previously that hevein exhibits an intense positive peak at 221 nm [31], which is also found between 220 and 228 nm in spectra of other small, disulfide-rich proteins [32]. Because this rather peculiar band is thought to be originated from amide groups adjacent to disulfide bridges [33], it is likely that neither disulfide bonds, which are essential for the global stability in proteins of this type, nor other structural characteristics of the polypeptide chain around these bonds were affected by chemical modification of Hev b 6.02.

ELISA inhibition and dot blot assays

ELISA inhibition with a serum pool from pediatric patients is shown in Fig. 2A. It is clear from these ex-

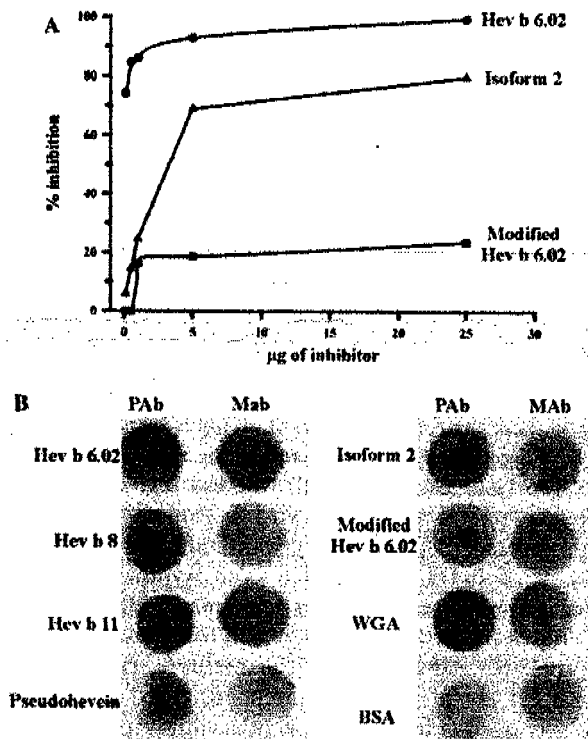


Fig. 2. (A) ELISA inhibition assays. The average inhibition of IgE binding to solid-phase Hev b 6.02 was determined using isoform 2 and the chemically modified allergen with BPNS-skatole in sera from 10 pediatric patients. An average of 75% inhibition was found with isoform 2 and only 20% with the chemically modified allergen at the maximum concentration used. The inhibition curve with Hev b 6.02 as the inhibitor is shown for comparison. (B) Specificity of the polyclonal and monoclonal anti-Hev b 6.02 antibodies in a dot blot assay. The membranes were incubated with the rabbit and mouse IgGs. Proteins used are indicated in the left margin of both figures. BSA was used as negative control.

periments that no significant inhibition of IgE binding to solid-phase Hev b 6.02 was observed with the modified allergen; in contrast, the isoform 2 inhibited binding in 75%. These results strongly suggest that the two Trp residues are necessary for the recognition of the molecule by IgE. Besides, it is evident that subtle differences are important for recognition, because the molecular characteristics of the isoform 2, which are currently under study, are likely to be very similar to those of Hev b 6.02, as judged from the small 3-Da mass difference between them (unpublished results). Additionally, dot blot assays were done in an effort to determine if model antibodies could specifically recognize surface epitopes on hevein-like antigens. We prepared a rabbit polyclonal antibody as well as a murine monoclonal antibody (6E7) raised against Hev b 6.02 (results not published). Experiments were carried out to test the reactivity of MAb 6E7 and the polyclonal Abs with several lectins (Hev b 6.02, isoform 2, pseudohevein, and WGA), a profilin (Hev b 8), and the chitinase (Hev b 11) from NRL, chemically modified Hev b 6.02, and bovine serum albumin as a control. The results obtained are shown in Fig. 2B. As can be observed, the MAb raised against Hev b 6.02 only reacted with WGA and the chitinase, indicating that antigen recognition is not due to unspecific lectin-carbohydrate reactions. It is noteworthy that the sequence identity between Hev b 6.02 and pseudohevein is 86%, whereas the chitinase is 60% and WGA domains are only about 50% identical to hevein. Indeed, only residues Trp²¹, Glu²⁹, and Thr²⁷ in Hev b 6.02 are conserved (either one or two of them) at equivalent positions in WGA domains and the chitinase, but not in pseudohevein (Fig. 1). This strongly suggests, therefore, that these residues, which are part of Hev b 6.02 linear epitopes and belong to the carbohydrate-binding region, are essential for the interaction of MAb 6E7 with hevein-like domains. This proposal is supported by the absence of reactivity of the MAb with chemically modified Hev b 6.02. Furthermore, the general relevance that aromatic and acidic side chains may have in IgE recognition by hevein-like domains is made apparent from a primary-structure comparison including 60 domains found in proteins that are recognized as allergens (WGA, Hev b 6.02, and Hev b 11) or potential allergens, belonging to the pathogenesis-related family of plant proteins [34]. In 45 cases (75%), the following motif is conserved (hevein numbering; see Fig. 1): C¹²XXX¹⁵X CCSX²⁰φ²¹XφCGXΩX AcYC³¹, where φ represents an aromatic side chain, Ω is Thr, Ser or Gly, and Ac is, in most cases (84%), either Glu or Asp. Positions marked by X are occupied by any type of residue, those of a polar character being much more frequent. The remaining 15 sequences under consideration differ from the mentioned motif only in that either Tyr³⁰ is substituted by Phe (six cases) or one of the aromatic residues at positions 21 and 23 is changed for His, Ser or Gly (nine cases).

On the other hand, all the proteins whose structure contain hevein-like domains were recognized by the PABs anti-Hev b 6.02, and even the modified hevein gave a positive reaction. Interestingly, however, the PAB also reacted with the profilin Hev b8 (Fig 2B). The folding pattern exhibited by the profilin molecule is completely unrelated to, and its sequence shows no evidence of the typical motif present in the structure of, hevein-like domains. However, the actin-binding region in this molecule shares the aromatic and acidic characteristics attributed to antibody-binding sites in hevein-like proteins, and could be responsible, therefore, for the PAB reactivity towards the profilin. Moreover, the observed cross-reactivity among NRL allergens and those from pollen seed, considered in this work, might be explained by the similar features of the binding regions.

Skin prick tests

To assess the relevance that the two Trp residues of Hev b 6.02 may have on defining B cell (conformational) epitopes, SPT were performed using the native protein and the one that had Trp²¹ and Trp²³ residues chemically modified. Hev b 6.02 gave immediate wheal and flare skin-test responses at concentrations as low as 1.0 µg/ml in 8 of the 50 high-risk volunteers. In contrast, the chemically modified allergen induced no response at all, even at a concentration of 10 µg/ml. These results show that Hev b 6.02 can elicit immediate hypersensitivity responses; however, this capacity is abolished by chemical modification of the Trp residues, thus suggesting that the region responsible for sugar-binding and formed by sequential epitopes (Fig. 4) forms a conformational epitope when the protein folds.

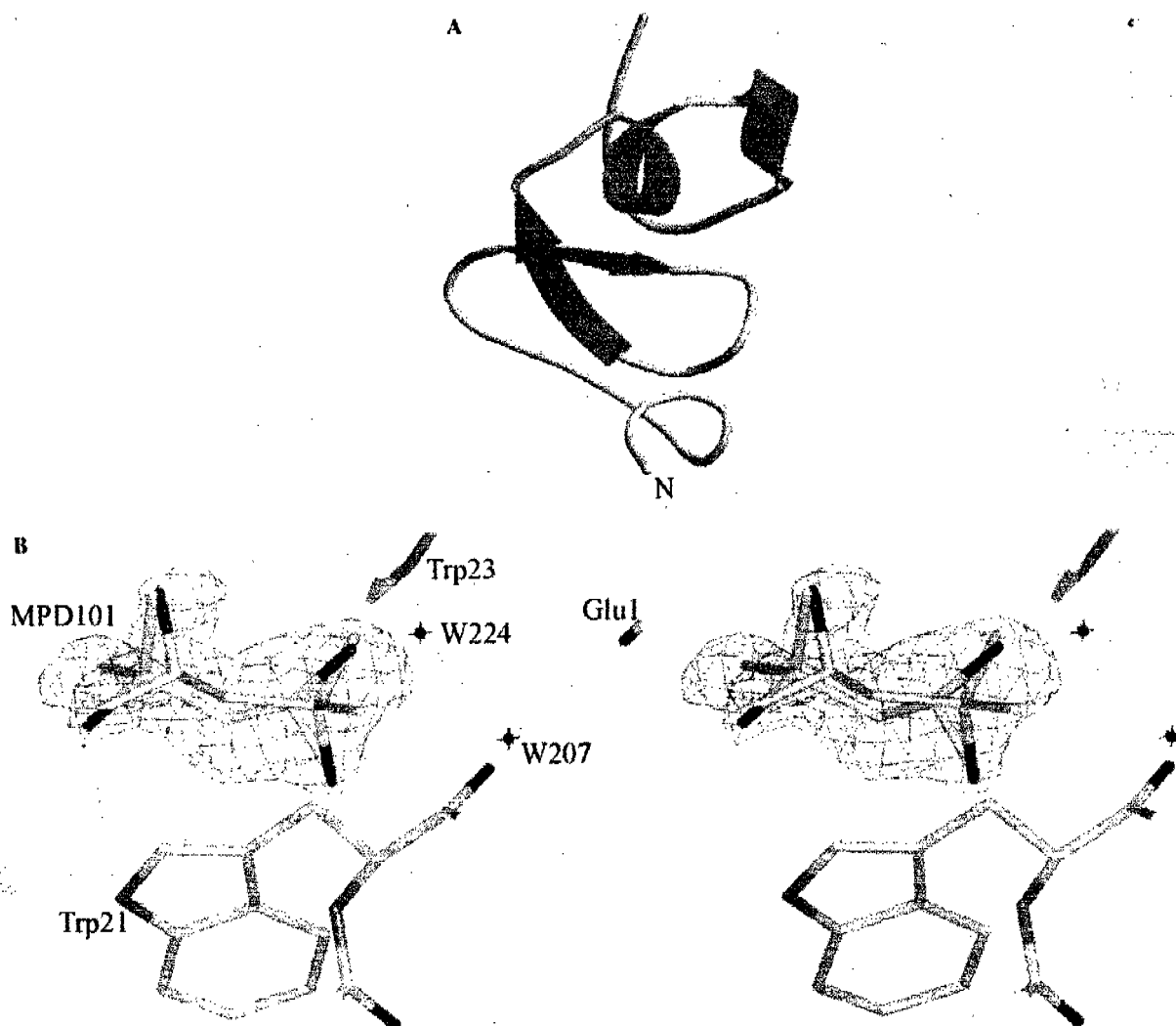


Fig. 3. (A) Overall structure of Hev b 6.02. The figure was generated with MOLSCRIPT [38]. (B) Stereo view of the electron density ($|F_o| - F_c$) corresponding to the MPD¹⁰¹ molecule and residues at hydrogen-bond distance. Water (W) mediated interactions are also shown. The contours are drawn at 3.0 σ level and the hydrogen bonds are represented by broken lines.

Molecular structure

The refined model is ovoid in shape and contains 43 residues, 39 water molecules, and two molecules of MPD in two conformations. Four small regions of secondary structure characterize the molecule (Fig. 3A). The most interesting feature of the structure is the carbohydrate-combining site, which shows an aromatic patch (Trp²¹, Trp²³, and Tyr³⁰) encircled by the side chains of Glu¹, Gln⁶, Gln²⁰, and Glu²⁹. It was interesting to find two molecules of MPD in this region, which are making hydrogen bonds to different residues: MPD¹⁰¹ (O2 MPD-NHE1 Trp²¹) (Fig. 3B) and MPD¹⁰² (O4 MPD-OH Tyr³⁰). On the other hand, the side chains for six residues: Glu¹, Leu¹¹, Pro¹³, Ser²⁶, Glu²⁹, and Pro³³ were built using two conformations.

The overall structure of Hev b 6.02, at this resolution, is very similar to the solution structure obtained by NMR methods [15]. A CA superposition between this model and the two models obtained by NMR methods shows an rmsd of 0.62 Å for the model with bound chitobiose, and 0.83 Å for the one with an empty binding site, while the superposition of the two structures solved by NMR methods shows an rmsd of 1.03 Å. An analysis of the solvent molecules found in the structure shows that the sugar-binding site is full with MPD molecules plus some waters. Thirty-four out of thirty-nine water molecules were found near polar residues exposed to the solvent and five were buried in the structure. Regarding solvent accessibility, the binding-site residues Trp²¹ and Trp²³, as well as neighbor residues such as Glu¹ and Glu²⁹, share high values, as determined with the program NACCESS (S.J. Hubbard, J.M. Thornton, University College, London, 1993), and are not involved in crystal packing interactions. Indeed, the solvent accessibility of Trp²¹ is 63% (when its solvent-accessible surface area is expressed as a percentage of the accessible area of the side chain in the tripeptide Gly-Trp-Gly in extended conformation [35]), which makes this residue one of the most exposed in Hev b 6.02; Trp residues located at equivalent positions in WGA are also highly exposed (about 67% accessibility). In profilins, one Trp also displays high accessibility (63%).

Structural comparison of Hev b 6.02 with different allergens

When we analyzed structures of other plant allergens such as Bet v 2, Hev b 8, and WGA, we noticed a similar motif, which involves a number of solvent-accessible aromatic, polar, and ionizable (mostly acidic) residues on the surface of the protein. Fig. 4 shows these exposed regions on the three-dimensional structures of the four proteins. It should be mentioned that three sequential epitopes have been reported for Bet v 2 (residues 2–19,

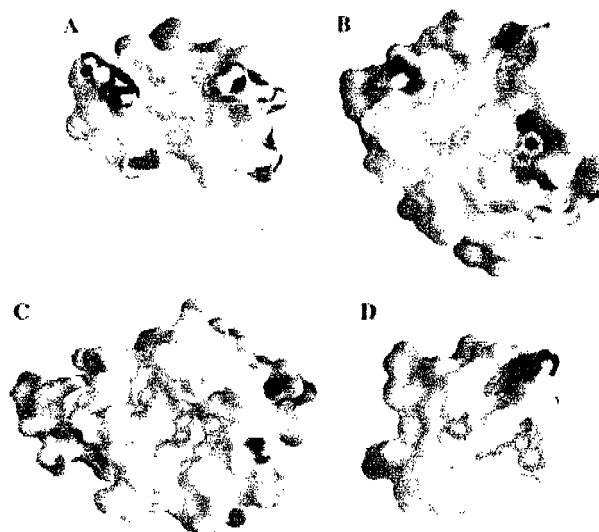


Fig. 4. Electrostatic surface-potential of four allergens. Comparison of Hev b 6.02 (A) with three plant allergens: Bet v 2 (B), Hev b 8 (C), and domain C of WGA (D). In green the aromatic residues comprising binding sites; for Hev b 6.02 and Bet v 2 these residues are also part of the linear epitopes. The protein surfaces have been produced with GRASP [39].

28–47, and 108–133; [36]), and two for Hev b 6.02 (residues 13–24 and 29–36; [28]) (Fig. 1). For these allergens the highlighted residues in green belong to their linear epitopes, indicating that those areas of the molecular surface constitute conformational epitopes. On account of the structural resemblances shown in Fig. 4, it is possible that the corresponding regions in the other allergens may play similar roles as superficial epitopes and yet conform to common determinants of allergenicity. Thus, although these proteins possess binding sites widely varying in selectivity (i.e., Hev b 6.02 and WGA bind carbohydrates, whereas Hev b 8 and Bet v 2 bind actin), it is evident that such sites could potentially contribute towards their allergenicity.

Very recently Karisola et al. [37] described a major conformational IgE binding site epitope of Hev b 6.02 using a chimera-based allergen epitope mapping strategy and molecular modeling. They suggested that its N-terminal and C-terminal regions essentially determined its IgE binding activity. In this study we present evidence supporting that the central part of the polypeptide chain is fundamental for the constitution of a conformational epitope and, therefore, for the interaction with model antibodies. This region includes the binding site, with three aromatic residues and other residues such as Glu, Gln, Asp, and Asn exposed to the solvent. These results support the existence of a main unifying feature as a common critical determinant of allergenicity in plant allergens.

The atomic coordinates and structure factors (code 1Q9B) have been deposited in the Research Collaboratory for Structural Bioinformatics Protein Data Bank.

Acknowledgments

We thank Peter Kuhn for beamline support. This work is based on research conducted at SSRL, which is funded by the Department of Energy, Office of Basic Energy Sciences. The Biotechnology Program is supported by the National Institutes of Health, National Center for Research Resources, Biomedical Technology Program and the Department of Energy. Preliminary X-ray experiments were done at LUEP IQ-UNAM. We thank Dr. Edgar Zenteno and Dra. Concepción Agundis (School of Medicine-UNAM) for their help with the production of antibodies and CONACYT (Grant 32417-E).

References

- [1] B.J. Sutton, H.J. Gould, The human IgE network, *Nature* 366 (1993) 421–428.
- [2] A. Bufe, The biological function of allergens: relevant for the induction of allergic diseases? *Int. Arch. Allergy Immunol.* 117 (1998) 215–219.
- [3] D.J.R. Huby, J.R. Dearman, I. Kimber, Why are some proteins allergens? *Toxicol. Sci.* 55 (2000) 235–246.
- [4] R. Brehler, U. Theissen, C. Mohr, T. Luger, Latex-fruit syndrome: frequency of cross-reacting IgE antibodies, *Allergy* 52 (1997) 404–410.
- [5] T. Fuchs, S. Spitzauer, C. Vente, J. Hevler, S. Kapiotis, H. Rumpold, D. Kraft, R. Valenta, Natural latex, grass pollen, and weed pollen share IgE epitopes, *J. Allergy Clin. Immunol.* 100 (1997) 356–364.
- [6] J.A. Berzofsky, Intrinsic and extrinsic factors in protein antigenic structure, *Science* 229 (1985) 932–940.
- [7] R.C. Aalberse, Structural biology of allergens, *J. Allergy Clin. Immunol.* 106 (2000) 228–238.
- [8] J. van Parijs, W.F. Broekaert, I.J. Goldstein, W.J. Peumans, Hevein: an antifungal protein from rubber-tree (*Hevea brasiliensis*) latex, *Planta* 183 (1991) 258–264.
- [9] H. Alenius, N. Kalkkinen, T. Reunala, K. Turjanmaa, T. Palosuo, The main IgE-binding epitope of a major latex allergen, prohevein, is present in its N-terminal 43-amino acid fragment, hevein, *J. Immunol.* 156 (1996) 1618–1625.
- [10] U.M. Soedjanaatmadja, J. Hofsteenge, C.M. Jeronimus-Stratingh, A.P. Bruins, J.J. Beintema, Demonstration by mass spectrometry that pseudo-hevein and hevein have ragged C-terminal sequences, *Biochim. Biophys. Acta* 1209 (1994) 144–148.
- [11] H.T. Wright, G. Sandrasegaram, C.S. Wright, Evolution of a family of N-acetylglucosamine binding proteins containing the disulfide-rich domain of wheat germ agglutinin, *J. Mol. Evol.* 33 (1991) 283–294.
- [12] K. Harata, M. Muraki, Crystal structures of *Urtica dioica* agglutinin and its complex with tri-N-acetylchitotriose, *J. Mol. Biol.* 297 (2000) 673–681.
- [13] A. Rodriguez-Romero, K.G. Ravichandran, M. Soriano-Garcia, Crystal structure of hevein at 2.8 Å resolution, *FEBS Lett.* 291 (1991) 307–309.
- [14] N.H. Andersen, B. Cao, A. Rodriguez-Romero, B. Arreguin, Hevein: NMR assignment and assessment of solution-state folding for the agglutinin-toxin motif, *Biochemistry* 32 (1993) 1407–1422.
- [15] J.L. Asensio, F.J. Cañada, M. Bruix, A. Rodriguez-Romero, J. Jimenez-Barbero, The interaction of hevein with N-acetylglucosamine-containing oligosaccharides. Solution structure of hevein complexed to chitobiose, *Eur. J. Biochem.* 230 (1995) 621–633.
- [16] G.S. Omenn, A. Fontana, C.B. Anfinsen, Modification of the single tryptophan residue of staphylococcal nuclease by a new mild oxidizing agent, *J. Biol. Chem.* 254 (1970) 1895–1902.
- [17] Z. Otwinowski, W. Minor, Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode, *Methods Enzymol.* 276 (1997) 307–326.
- [18] The CCP4 suite: programs for protein crystallography, Collaborative Computational Project, Number 4, *Acta Crystallogr. D* 50 (1994) 760–763.
- [19] A.T. Brünger, P.D. Adams, G.M. Clore, W.L. DeLano, P. Gros, R.W. Grosse-Kunstleve, J.S. Jiang, J. Kuszewski, M. Nilges, N.S. Pannu, R.J. Read, L.M. Rice, T. Simonson, G.L. Warren, *Crystallography & NMR system: a new software suite for macromolecular structure determination*, *Acta Crystallogr. D* 54 (1998) 905–921.
- [20] A.T. Brünger, Free R-value: a novel statistical quantity for assessing the accuracy of crystal structures, *Nature* 355 (1992) 472–474.
- [21] G.J. Kleywegt, T.A. Jones, Databases in protein crystallography, *Acta Crystallogr. D* 54 (1998) 1119–1131.
- [22] T.J. Oldfield, Macromolecular refinement, in: *Proceedings of the CCP4 Study Weekend*, SRS Daresbury Laboratory, Warrington, UK.
- [23] G.M. Sheldrick, T.A. Schneider, SHELXL: high-resolution refinement, *Methods Enzymol.* 277 (1997) 319–343.
- [24] R.A. Engh, R. Huber, Accurate bond and angle parameters for X-ray protein structure refinement, *Acta Crystallogr. A* 47 (1991) 392–400.
- [25] W.R. Patterson, D.H. Anderson, W.F. DeGrado, D. Cascio, D. Eisenberg, Centrosymmetric bilayers in the 0.75 Å resolution structure of a designed alpha-helical peptide, D,L-alpha-1, *Protein Sci.* 8 (1999) 1410–1422.
- [26] R.A. Laskowski, M.W. MacArthur, S.C. Hutchinson, J.M. Thornton, *PROCHECK*: a program to check the stereochemical quality of protein structures, *J. Appl. Crystallogr.* 26 (1993) 283–291.
- [27] G.H. Cohen, *ALIGN*: a program to superimpose protein coordinates, accounting for insertions and deletions, *J. Appl. Crystallogr.* 30 (1997) 1160–1161.
- [28] D.H. Beezhold, D.A. Kostyal, G.L. Sussman, IgE epitope analysis of the hevein preprotein; a major latex allergen, *Clin. Exp. Immunol.* 108 (1997) 114–121.
- [29] M.M. Vestlin, A.M. Kelly, C. Fenselau, Optimization by mass spectrometry of a tryptophan-specific protein cleavage reaction, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 8 (1994) 786–790.
- [30] V. Argali, J. Gueguen, Chemical cleavage of bovine β-lactoglobulin by BNPS-skatole for preparative purposes: comparative study of hydrolytic procedures and peptide characterization, *J. Protein Chem.* 18 (1999) 1–12.
- [31] A. Rodriguez-Romero, B. Arreguin, A. Hernandez-Arana, Unusual far-ultraviolet circular dichroism of wheat germ agglutinin and hevein originated from cystine residues, *Biochim. Biophys. Acta* 998 (1989) 21–24.
- [32] M.W. Thomas, E.F. Walborg, B. Jirgensons, Circular dichroism and saccharide-induced conformational transitions of wheat germ agglutinin, *Arch. Biochem. Biophys.* 178 (1977) 625–630.
- [33] J.P. Casey, R.B. Martin, Disulfide stereochemistry. Conformations and chiroptical properties of L-cystine derivatives, *J. Am. Chem. Soc.* 94 (1972) 6141–6151.
- [34] H. Breiteneder, C. Ebner, Molecular and biochemical classification of plant-derived food allergens, *J. Allergy Clin. Immunol.* 106 (2000) 27–36.
- [35] S. Miller, J. Janin, A.M. Lesk, C. Chothia, Interior and surface of monomeric proteins, *J. Mol. Biol.* 196 (1987) 641–656.
- [36] A.A. Fedorov, T. Ball, M.N. Mahoney, R. Valenta, C.S. Almo, Crystal structure and IgE-epitope mapping of birch pollen profilin: molecular basis for allergen cross-reactivity, *Structure* 5 (1997) 33–45.

- [37] P. Karisola, H. Alenius, J. Mikkola, N. Kalkkinen, J. Helin, T.O. Pentikäinen, S. Repo, T. Reunala, K. Turjanmaa, S.M. Johnson, T. Palosuo, S.M. Kulomaa, The major conformational IgE-binding epitopes of hevein (Hev b 6.02) are identified by a novel chimera-based allergen epitope mapping strategy, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 22656–22661.
- [38] P.J. Kraulis, MOLSCRIPT: a program to produce both detailed and schematic plots of protein structures, *J. Appl. Crystallogr.* 24 (1991) 946–950.
- [39] A. Nicholls, K.A. Sharp, B. Honig, Protein folding and association: insights from the interfacial and thermodynamic properties of hydrocarbons, *Proteins* 11 (1991) 281–296.

Bases inmunológicas y moleculares de la alergenidad

QFB. María Martha Pedraza Escalona,* Dra. Adela Rodríguez Romero**

RESUMEN

Las alergias mediadas por anticuerpos IgE son consideradas un grave problema de salud en los países industrializados, debido a la capacidad de algunas proteínas normalmente inocuas (alergenos) para inducir reacciones alérgicas en pacientes sensibilizados. La comunidad científica realiza diversos estudios inmunológicos y moleculares para determinar los fundamentos del potencial alérgico y de la reactividad cruzada de los alergenos, los cuales podrían estar relacionados con las características intrínsecas de estas moléculas. Como objetivos principales se tienen el desarrollar inmunoterapias apropiadas para evitar estas enfermedades, predecir dicho potencial en productos y alimentos nuevos, y establecer las herramientas de diagnóstico adecuadas. En este trabajo se describen algunos estudios realizados primordialmente a las regiones inmunodominantes que interaccionan con los anticuerpos IgE.

Palabras clave: Alergenos, alergenidad, reactividad cruzada, epítopos.

ABSTRACT

IgE-mediated allergies are considered a serious problem of health in the industrialized world, due to the capacity of some normally innocuous proteins (allergens) to induce allergic reactions in sensitized patients. The scientific community realizes several immunological and molecular studies to determine the basis of the allergenic potential and the cross-reactivity of the allergens, which could be related to the intrinsic characteristics of these molecules. The main goals are to develop appropriate immunotherapy to avoid these diseases, to predict such potential in products and new foods, and to establish suitable tools of diagnosis. In this work we described several studies performed fundamentally in the regions that interact with the IgE antibodies.

Key words: Allergens, allergenicity, cross-reactivity, epitopes.

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades alérgicas representan un grave problema de salud pública, principalmente en los países industrializados, afectando a casi 500 millones de personas en el mundo, sobre todo a la población infantil y

juvenil. Enfermedades tales como rinitis, asma, dermatitis atópica y conjuntivitis están condicionadas a factores ambientales y a la predisposición genética de cada individuo, manifestándose como una respuesta exagerada contra sustancias normalmente inocuas denominadas alergenos. Los alergenos de naturaleza proteica son capaces de inducir una respuesta inmune, al interactuar con anticuerpos IgE presentes en la superficie de mastocitos que, al activarse, liberan mediadores de la inflamación como histamina, prostaglandina y leucotrienos entre otros, desencadenando las reacciones alérgicas.^{1,2}

En la estructura molecular de las proteínas alérgicas, existen regiones inmunodominantes, denominadas epítopos, las cuales interaccionan con los

Departamento de Bioquímica del Instituto de Química, UNAM.

* Estudiante de Doctorado en el Posgrado de Ciencias Biomédicas.

** Investigadora Titular de tiempo completo.

fragmentos de unión al antígeno (Fab) de los anticuerpos IgE. Si el alérgeno fuera una proteína globular de aproximadamente 20 kDa, con un área superficial de 500 nm², el Fab cubriría sólo entre el 5 al 10% de esta superficie al formarse el complejo inmune Fab-alérgeno.³

A nivel estructural se han realizado estudios cristalográficos de algunos complejos inmunes Fab-antígeno, estableciendo que son entre 15 a 22 residuos de aminoácidos de cada molécula los que están involucrados en esta interacción. De éstos sólo de 3 a 5 residuos son los que contribuyen a la energía de unión (epítotos energéticos) a través de múltiples enlaces complementarios de tipo no covalente, originados por fuerzas electrostáticas, de van der Waals e hidrofóbicas, las cuales generan constantes de asociación con valores que fluctúan entre 10⁵ a 10⁸ M⁻¹.⁴⁻⁷

Diversos estudios inmunológicos, utilizando péptidos derivados de la secuencia lineal de algunos alérgenos, han permitido establecer la presencia de epítotos lineales reconocidos por IgE de sueros de pacientes sensibilizados. Sin embargo, de manera general, los residuos que conforman un epítoto se encuentran en la superficie de dichas proteínas, localizados en diferentes posiciones de la secuencia lineal, pero muy cercanos si la proteína se encuentra en su forma plegada, razón por lo cual se les ha denominado como epítotos conformacionales.³ El conocimiento de la estructura tridimensional de los alérgenos está revelando a los epítotos conformacionales presentes en éstos; no obstante, existe un número limitado de dichos reportes, entre los que se encuentran, sólo por mencionar algunos a Bet v 1, Bet v 3, y Bet v 4 del abedul, Phl p 7 del heno, Aln g 4 del aliso, Bra r 1 del nabo y Der f 2 del ácaro.^{8,9}

A nivel internacional se realizan estudios para determinar si estas regiones inmunodominantes en los alérgenos se relacionan con sus características intrínsecas. Es decir, si la complejidad molecular (secuencia de aminoácidos, tipo de estructura secundaria, forma de plegamiento), la solubilidad, la estabilidad, el tamaño y la actividad bioquímica de un alérgeno pueden promover las condiciones inmunológicas necesarias para la sensibilización en el huésped, la interacción con anticuerpos IgE y la inducción de reacciones alérgicas (alergenicidad).¹⁰ Estas investigaciones permitirán determinar las características estructurales e inmunológicas que le confieren a una proteína las propiedades para ser considerada un alérgeno. Esto con el fin de desarrollar métodos clínicos eficaces que permitan controlar los procesos alérgicos a través de inmunoterapia específica. En esta revisión describiremos estudios recientes sobre las relaciones existentes entre las características intrínsecas de este tipo de proteínas y su capacidad alérgica.

CARACTERÍSTICAS INTRÍNSECAS DE LOS ALÉRGENOS Y SU RELACIÓN CON LA ALERGENICIDAD

A) Modificaciones postraduccionales

La mayoría de los alérgenos son proteínas extracelulares, que suelen sufrir modificaciones postraduccionales, siendo la principal la glicosilación. Las glicoproteínas se forman en el retículo endoplásmico, donde se unen de manera covalente oligosacáridos a los residuos de asparaginas (N-glicanos), de serinas/treoninas (O-glicanos) o bien de prolínas y lisinas en las proteínas de plantas. Estas reacciones se llevan a cabo gracias a la acción de glicosiltransferasas y de algunas glicosidasas. Las glicoproteínas presentan cambios en la estabilidad, la solubilidad, la hidrofobicidad y en la carga eléctrica, ocasionando que los sitios glicosilados sean más visibles al sistema inmune del huésped.^{9,10}

Algunos alérgenos N-glicosilados de plantas, altamente inmunogénicos, presentan azúcares como manosa, fucosa, xilosa y N-acetilglucosamina, en un orden que no se encuentra en los glicanos de mamíferos, estableciendo que este orden es precisamente la clave de la alergenicidad.¹¹⁻¹³ Se ha podido demostrar para el caso de alérgenos de olivo como Ole e 1 y de heno como Phl p 1, que después de ser sometidos a procesos de desglucosilación, tales como la oxidación con periodato o ácido trifluorometanosulfónico (TFMS), ambas proteínas perdieron sus propiedades alérgicas, por lo que se pudo deducir que, en estos casos, los azúcares presentes son parte esencial de los epítotos reconocidos por los anticuerpos IgE.^{10,13, 14}

B) Estabilidad de los alérgenos

Los principales alérgenos son termoestables y mantienen su alergenicidad después del calentamiento, mientras que otros son considerados incompletos por ser susceptibles a pH's bajos y a la acción de enzimas proteolíticas.¹⁵

En experimentos realizados con algunos alérgenos ricos en puentes disulfuro intramoleculares se ha determinado la importancia de éstos en la conservación de la alergenicidad. Ejemplos de esto se encuentran en los alérgenos Der f 1, Der f 2, Lep d 2 (alérgenos de ácaros del polvo casero),^{16,17} Sin a 1 (mostaza), Ole e 1 (olivo),¹⁴ la aglutinina del germen de trigo¹⁸ y la lactoglobulina,^{9,19} en donde al reducir dichos puentes o bien eliminarlos por mutagénesis dirigida, los alérgenos pierden su capacidad de unión a IgE's. Este detrimento en la alergenicidad se podría explicar esencialmente por la pérdida de la conformación original del alérgeno y por lo tanto de los epítotos conformacionales; o bien, a una menor estabilidad de los mismos, siendo más susceptibles a la digestión enzimática.

C) Similitud con proteínas endógenas

Los alérgenos más potentes son aquellos que presentan las mayores diferencias a las proteínas endógenas del hospedero, puesto que aquellas que presentan gran similitud molecular están involucradas en mecanismos de tolerancia. Sin embargo, recientemente se ha comprobado que el débil estímulo de las proteínas de estructuras relacionadas favorece la respuesta de células TH2, las cuales a través de la producción de citocinas específicas, estimulan la formación de anticuerpos IgE en las células B.^{2,10} Un ejemplo lo encontramos en las lipocalinas exógenas, las cuales tienen una alta similitud con las endógenas y generan alergia.^{21,22} Por otra parte, se ha descrito que las albúminas alérgicas del gato y el perro presentan una alta similitud entre ellas, pero no con las albúminas del humano, lo cual puede indicar que los epítomos de unión a IgE de estos alérgenos son las áreas no homólogas entre estas moléculas.³

D) Enzimas

Los alérgenos con capacidad enzimática presentan en su mayoría actividad de proteasas y nucleasas.¹⁰ Un ejemplo, es el alérgeno del ácaro de polvo casero Der p 1, el cual tiene actividad de cistein-proteasa lo que ayuda a incrementar su permeabilidad en el epitelio bronquial, facilitando así su propio procesamiento. Este alérgeno es además capaz de cortar a CD23 (receptor de baja afinidad para IgE's, el cual regula la síntesis de estas inmunoglobulinas), y a CD25 (la subunidad α del receptor para interleucina-2), ocasionando un desequilibrio en la respuesta inmune, así como un aumento en la producción de IgE's.¹⁹ Las proteasas del ácaro y la fosfolipasa A₂ (principal alérgeno del veneno de abeja) ocasionan la producción de citocinas pro-inflamatorias al estimular directamente a células epiteliales bronquiales, mastocitos y basófilos, aumentando su respuesta alérgica.¹⁰ Phl p 5 (alérgeno del polen del heno), es una nucleasa, que puede reducir su efecto alérgico en presencia de inhibidores de RNAsa, no porque pierda su actividad como enzima, sino porque al parecer el inhibidor al unirse a la proteína bloquea los epítomos que son reconocidos por IgE's.^{10,19}

Existen alérgenos que tienen la estructura de enzima, pero en estado inactivo, como en el caso de Bla g 2 (de cucaracha alemana), la cual es una aspártico-proteasa que induce la producción de IgE a niveles más altos que Der p 1, indicándonos que posiblemente sean más importantes las estructuras presentes en estas enzimas y no su función, lo que ocasione la alergenicidad.¹⁰

E) Alérgenos que unen calcio

Algunos alérgenos encontrados en plantas y animales unen y transportan Ca²⁺. Éstos presentan de 2 a 8 dominios denominados EF-hands o plegamientos tipo calmodulina, los cuales interactúan con diferentes ligandos

dependientes de calcio.²³ Dentro de esta categoría se ha identificado a la parvalbúmina, el principal alérgeno del pescado, a Phl p 7 del heno, a Aln g 4 del aliso, a Bet v 3 del abedul, a Ole e 3 y Ole e 8 del olivo, a Cyn d 7 del pasto bermuda, a Bra r 1 del orujo, entre otros.²⁴

En estudios realizados con Bet v 3, el cual presenta 3 sitios de unión a Ca²⁺, se propuso que un alérgeno puede asumir de manera reversible diferentes conformaciones, exponiendo epítomos variables que ocasionan interacciones diferentes con IgE de suero de pacientes. Esto se observó debido a que cuando el alérgeno está unido al Ca²⁺ presenta una conformación abierta, haciendo que los residuos expuestos en la superficie sean accesibles a los anticuerpos; mientras que cuando el alérgeno está libre de calcio, éste presenta una conformación cerrada que impide la interacción con estas inmunoglobulinas.²⁵

F) Alérgenos transportadores

En esta categoría se encuentran las lipocalinas, proteínas altamente solubles que transportan retinol, esteroides, lípidos y feromonas.²¹ Los principales alérgenos de este grupo están presentes en animales domésticos comunes de las ciudades industrializadas y en animales de granja; destacando como aeroalérgenos Can f 1 y Can f 2 (perro), Mus m 1 (ratón), Rat n 1 (rata), Equ c 1 y Equ c 2 (caballo) y Bos d 2 (vaca), así como los alérgenos encontrados en alimentos como Bla g 4 (cucaracha) y Bos d 5 (beta-lactoglobulina de leche de vaca).²² Este último, presenta seis regiones de unión a IgE's de suero de pacientes sensibilizados, destacando una secuencia altamente conservada en las lipocalinas rica en ácido aspártico.^{2,22,26}

G) Alérgenos que unen actina

Las profilinas son proteínas de unión a actina, aunque también interactúan con cadenas de poli L-prolina y con algunos fosfolípidos. Se ha encontrado que las áreas superficiales que contienen los epítomos de unión a IgE de este tipo de alérgenos, son las mismas que interactúan con actina, indicando que las áreas expuestas a la superficie, que muestran afinidad por ligandos naturales, son también reconocidas por las regiones variables de estos anticuerpos.²⁵

H) Lectinas

Algunos alérgenos interactúan con carbohidratos. Ejemplos de esto, lo encontramos en los alérgenos más importantes del látex del árbol del hule *Hevea brasiliensis*, tales como Hev b 6.01, Hev b 6.02 y Hev b 11, los cuales unen oligosacáridos de N-acetilglucosamina, gracias a un dominio de heveína. También se ha descrito este tipo de dominios en otras plantas, destacando Pers a 1 (aguacate), y algunos otros presentes en el plátano, kiwi, y castaña, lo cual podría explicar el hecho

de que aquellas personas sensibles a látex lo son también a estas frutas.²⁷

ESTRUCTURA DE ALERGENOS

En los últimos años se han resuelto varias estructuras cristalográficas de alergenios, las cuales han servido para los primeros análisis comparativos entre ellos. En 1998, Rouvinen y col. realizan un análisis de las primeras ocho estructuras de alergenios reportadas en el PDB (Protein Data Bank), estableciendo que éstas tienen en común ser esféricas y elípticas.²⁸ Aalberse y col. en el 2000, realizan una clasificación de alergenios en base a los plegamientos de estructura secundaria predominantes en 40 de éstos (utilizando la base de datos SCOP), proponiendo una subdivisión en cuatro familias estructurales definidas: aquellos alergenios con plegamiento tipo hebras β antiparalelas, tipo hélices α , tipo hojas β antiparalelas asociadas íntimamente a una o más hélices α y aquéllos tipo hojas β y hélices α poco asociadas.³ A continuación mostraremos un ejemplo de cada una de las familias estructurales:

1) Hebras beta antiparalelas

Como ejemplo, mencionaremos al principal alergeno del ácaro americano, Der f 2. Éste tiene un plegamiento típico de inmunoglobulina, presentando dos hojas β , la primera de tres hebras β y la segunda de cuatro. Como se mencionó anteriormente, este alergeno necesita estar en su conformación nativa, dada por sus tres puentes disulfuro, para poder interactuar con IgE's. Se ha sugerido que los residuos involucrados en esta interacción son en su mayoría residuos cargados como lisina y el ácido aspártico, aromáticos como la fenilalanina y algunas cisteínas.²⁹

2) Hélices α

Phi p 7, considerado el principal alergeno de polen del heno, el cual une y transporta Ca^{2+} , es un dímero que presenta motivos estructurales hélice α - asa- hélice α . La capacidad de reconocimiento por parte de los anticuerpos IgE hacia este tipo de alergenios depende de la presencia de iones calcio unidos a estas proteínas. Residuos tales como aspárticos, asparaginas y glutámicos altamente conservados, que conforman el asa, están involucrados en la coordinación de estos iones. Proteínas recombinantes carentes de estos residuos pierden en su totalidad la capacidad de unión a IgE.³⁰

3) Hojas β antiparalelas asociadas íntimamente con una o más hélices α .

El primer alergeno del cual se obtuvo la estructura cristalográfica acoplada al Fab de un anticuerpo monoclonal murino fue Bet v 1, el principal alergeno del abedul. Su estructura terciaria presenta siete hojas beta antipa-

ralelas que envuelven a una hélice alfa anfipática de cerca de 25 residuos y a dos hélices pequeñas. El epítipo conformacional encontrado está formado por 17 residuos, doce de los cuales están localizados en un asa entre dos hojas β . En este epítipo destacan cuatro glicinas, dos asparaginas, dos ácidos glutámicos y dos isoleucinas, residuos que interactúan con el Fab a través de puentes de hidrógeno e interacciones de van der Waals.³¹

4) Hojas β y hélices α poco asociadas

La lisozima de huevo blanco de gallina es otra molécula ampliamente estudiada como alergeno presenta dentro de su estructura hélices α asociadas por largas asas a hojas β . Se ha observado que los residuos de la parte amino y carboxilo-terminal, correspondientes a la superficie de una región apolar en esta molécula, forman al epítipo reconocido por un anticuerpo monoclonal anti-lisozima.^{3,32}

No contemplada en esta clasificación se encuentran las proteínas alergénicas pequeñas, tales como Hev b 6.02, uno de los principales alergenios del látex de hule natural. Recientemente, nuestro grupo de trabajo, describió un epítipo conformacional de esta molécula, en donde la presencia de aminoácidos aromáticos, tales como triptófano y tirosina, así como algunos residuos polares son relevantes en la interacción con IgE's de suero de pacientes y con IgG's monoclonales murinos anti-Hev b 6.02.³³

Esta clasificación muestra que no existen características estructurales definidas que determinen si una proteína pueda o no ser alergénica. No obstante podemos señalar la importancia de algunos residuos esenciales en la interacción con sus anticuerpos, donde sobresalen los aminoácidos aromáticos y los polares.

REACTIVIDAD CRUZADA

Dos alergenios presentan reactividad cruzada sólo si comparten características estructurales, que hacen que sean reconocidos por anticuerpos IgE de sueros de pacientes contra alguna de estas dos proteínas. Es interesante mencionar que todos los alergenios que presentan reacción cruzada tienen un plegamiento similar, en la mayoría de los casos, con más del 70% de identidad en la secuencia de aminoácidos; mientras que aquéllos con plegamiento similar no necesariamente pueden mostrar reactividad cruzada.³

Mediante experimentos de ELISA competitiva e inmunoblots, utilizando a alergenios de diferentes especies de plantas no relacionadas que contienen dominios EF-hand de unión a Ca^{2+} , se estableció que sólo aquellos que contaban con el mismo número de dominios,

presentaban una inhibición del 100%, estableciendo la mayor reactividad cruzada.²³

En otro estudio se comparó a dos alérgenos de la misma especie que unen calcio, Ole e 3 y Ole e 8 (del olivo), observando que cada uno presenta epítomos específicos de unión a IgE, por lo que los dominios estructurales EF-hands de estos alérgenos no son los epítomos responsables de la reactividad cruzada, indicando que éstos se encuentran en sitios menos conservados.²⁴

Finalmente, la reactividad cruzada entre algunos alérgenos glicosilados de diferentes especies de plantas, depende en cierto grado de los carbohidratos presentes en la superficie de estas proteínas, denominados carbohidratos determinantes de la reactividad cruzada (CCD), aunque por sí solos éstos son clínicamente irrelevantes y con baja afinidad para un entrecruzamiento efectivo.^{11,12}

CONCLUSIONES

De acuerdo a lo anteriormente expuesto y considerado dentro de los mecanismos que siguen algunas proteínas para la inducción de alergia, son importantes la ruta de exposición, las características físicas, la actividad biológica y la estructura de las mismas, que en conjunto hacen más factible su entrada al organismo, su procesamiento y sobre todo la posibilidad de interactuar con anticuerpos IgE's. Los ejemplos mostrados en esta revisión, establecen que los alérgenos son proteínas heterogéneas; sin embargo, de manera general, si sus características intrínsecas no son preservadas, la capacidad para interactuar con las IgE's se reduce.

Es evidente que todavía se requiere más información en este aspecto, tanto identificar las características de aquellos antígenos que son capaces de inducir una respuesta inmune sin llegar a ser alérgicos, como establecer los mecanismos inespecíficos de los alérgenos para el desarrollo de la alergia. El conocimiento de las áreas y los residuos de alérgenos involucrados en la interacción con los anticuerpos IgE, así como el tipo de interacciones presentes, permitirán llevar a cabo el diseño de inmunoterapias específicas. Éstas podrán utilizar proteínas recombinantes y derivados hipoaérgicos, que presenten el plegamiento original con modificaciones en dichos residuos, lo que permitirá evitar el desarrollo de las reacciones alérgicas, logrando en un futuro cercano la vacunación profiláctica en contra de la alergia.

BIBLIOGRAFÍA

1. Ring J, Kramer U, Schafer T et al. Why are allergies increasing? *Curr Opin Immunol* 2001; 13: 701-708.
2. Aalberse RC, Stapel SO. Structure of food allergens in relation to allergenicity. *Pediatr Allergy Immunol* 2001; 12: 10-14.
3. Rob C, Aalberse RC. Structural biology of allergens. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 106: 228-238.
4. Roitt I, Brostoff J, Male D. *Immunology*. 5th edition. UK Mosby International Ltd, 1998: 107-119.
5. Holgate S, Church M, Lichtenstein L. *Alergia*. 2a Edición Española Editorial Harcourt, 2001: 3-16.
6. Sela M, Pecht I. The nature of the antigen. *Adv Protein Chem* 1996; 49: 289-328.
7. Valenta R. The future of antigen-specific immunotherapy of allergy. *Nat Rev Immunol* 2002; 2: 446-453.
8. Valenta R, Hayek B, Selberler S et al. Calcium-binding allergens: from plants to man. *Int Arch Allergy Immunol* 1998; 117: 160-6.
9. Flicker S, Vrtala S, Steinberger et al. A human monoclonal IgE antibody defines a highly allergenic fragment of the major timothy grass pollen allergen, Phl p 5: Molecular, immunological and structural characterization of the epitope-containing domain. *J Immunol* 2000; 165: 3849-3859.
10. Pómes A. Intrinsic properties of allergens and environmental exposure as determinants of allergenicity. *Allergy* 2002; 57: 673-679.
11. Huby R, Dearman R, Kimber I. Why are some protein allergens? *Toxicol Sci* 2000; 55: 235-246.
12. Fötisch F, Vieths S. N- and O-linked oligosaccharides of allergenic glycoproteins. *Glycoconj J* 2001; 18: 373-390.
13. Van Ree R. Carbohydrate epitopes and their relevance for the diagnosis and treatment of allergic diseases. *Int Arch Allergy Immunol* 2002; 129: 189-97.
14. Lombardero M, Quirce S, Duffort O et al. Monoclonal antibodies against Olea europea major allergen: Allergenic activity of affinity-purified allergen and depleted extract and development of a radioimmunoassay for the quantification of the allergen. *J Allergy Clin Immunol* 1992; 89: 884-94.
15. González EM, Villalba M, Lombardero M et al. Influence of the 3D-conformation, glycan component and micro-heterogeneity on the epitope structures of Ole e 1 the major olive allergen. Use of the recombinant isoforms and specific monoclonal antibodies as immunological tools. *Mol Immunol* 2002; 39: 93-101.
16. Taylor SB, Lenher SL. Principles and characteristics of food allergens. *Crit Rev Food Sci Nutr* 1996; 36: S91-S118.
17. Brederhost R, Kerstin D. What establishes a protein as an allergen? *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 2001; 756: 33-40.
18. Takai T, Yuuki T, Okumura Y et al. Determination on the N- and C-terminal sequences required to bind human IgE of the major house dust mite allergen Der f 2 and epitope mapping for monoclonal antibodies. *Mol Immunol* 1997; 34: 255-261.
19. Buchanan BB, Adamidi C, Lozano MR et al. Thioredoxin-linked mitigation of allergic response to wheat. *Proc Natl Acad Sci* 1997; 94: 5372-77.
20. Bufe A. The biological function of allergens relevant for the induction of allergic diseases. *Int Arch Allergy Immunol* 1998; 117: 215-219.
21. Tinghino R, Twardosz A, Barletta B et al. Molecular, structural, and immunologic relationships between different families of recombinant calcium-binding pollen allergens. *J Allergy Clin Immunol* 2002; 109: 314-20.
22. Ledesma A, González E, Pascual CY et al. Are Ca²⁺-binding motifs involved in the immunoglobulin E-binding of allergens? Olive pollen allergens as model of study. *Clin Exp Allergy* 2002; 32: 1476-83.
23. Valenta R. Recombinant allergen molecules: tools to study effector cell activation. *Immunol Rev* 2001; 179: 119-127.
24. Mäntyjärvi R, Rautiainen J, Virtanen T. Lipocalins as allergens. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1482: 308-17.
25. Virtanen T. Lipocalin allergens. *Allergy* 2001; 56: 48-51.

26. Wai JM. Structure and function of milk allergens. *Allergy* 2001; 56: 35-38.
27. Breiteneder H, Ebner C. Molecular and biochemical classification of plant-derived food allergens. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 106: 27-36.
28. Rouvinen J, Rautiainen J, Virtanen T et al. Probing the molecular basis of allergy. Three-dimensional structure of the bovine lipocalin allergen Bos d 2. *J Biol Chem* 1999; 274: 2337-2343.
29. Ichikawa S, Hatakana H, Yuuki T et al. (1998) Solution structure of Der f 2, the major mite allergen for atopic diseases. *J Biol Chem* 1998; 273: 356-60.
30. Verdino P, Westritschnig K, Valenta R et al. The cross-reactive calcium-binding pollen allergen, Phl p 7, reveals a novel dimer assembly. *Embo J* 2002; 21: 5007-16.
31. Mirza O, Henriksen A, Ipsen H et al. Dominant epitopes and allergic cross-reactivity: complex formation between a Fab fragment of a monoclonal murine IgG antibody and the major allergen from birch pollen Bet v 1. *J Immunol* 2000; 165: 331-338.
32. Li Y, Li H, Yang F et al. X-ray snapshots of the maturation of an antibody response to a protein antigen. *Nat Struct Biol* 2003; 10: 482-8.
33. Reyes-Lopez C, Hernandez-Santoyo A, Pedraza-Escalona M et al. Insights into a conformational epitope of Hev b 6.02 (hevein). *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 314: 123-130.

Dirección para correspondencia:
QFB María Martha Pedraza Escalona
Instituto de Química, UNAM,
Circuito Exterior, Ciudad Universitaria,
Delegación Coyoacán, C. P. 04510,
México, D. F.
Tel. 56-22-45-68, Fax: 56-16-22-17
E-mail: mapedmx@yahoo.com