

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN
CIENCIAS QUÍMICAS

ANÁLISIS DE LA INTERACCIÓN
ANTICUERPO-HEVEÍNA MEDIANTE
ESPECTROSCOPIA DE RESONANCIA MAGNÉTICA
NUCLEAR

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

P R E S E N T A:

Q. ERNESTO LADRÓN DE GUEVARA REYES



Jurado asignado:

Presidente: Dr. Miguel A. Costas Basín. Facultad de Química, UNAM.

Vocal: Dr. Arturo Rojo Domínguez. UAM-Cuajimalpa.

Vocal: Dr. José Federico del Río Portilla. Instituto de Química, UNAM.

Vocal: Dra. Nuria Sánchez Puig. Instituto de Química, UNAM.

Secretario: Dr. Jorge Peón Peralta. Instituto de Química, UNAM.

Lugar donde se realizó la tesis:

Laboratorio de Química de Biomacromoléculas 3 (QB-3) en el Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

Laboratorio de Biología Molecular en el Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

Q. Ernesto Ladrón de Guevara Reyes

Sustentante

Dra. Adela Rodríguez Romero

Tutor

Agradecimientos:

A los doctores Adela Rodríguez Romero y Federico del Río Portilla por todo el apoyo para la realización de este trabajo de tesis.

A los doctores Patricia Cano Sánchez y Deyanira Fuentes Silva por su apoyo técnico.

A los técnicos académicos del Instituto de Química:
Dra. Isabel Chávez Uribe (Laboratorio de RMN), Q.
Eréndira García Ríos y M. en C. L. Carmen Márquez
Alonso (Lab. de cromatografía).

A la beca otorgada por el CONACyT Becario 227166.

A los proyectos CONACyT 82947 y DGAPA-UNAM
IN209506-3.

A todos mis compañeros del laboratorio.

Para Alina y Rosy

✧

Índice general

Resumen	X
1. Introducción	1
1.1. Alérgenos	3
1.2. Anticuerpos	4
1.2.1. Elementos estructurales de los anticuerpos	5
1.3. Parátomos y epítomos	7
1.3.1. Tipos de epítomos	8
1.4. Anticuerpos neutralizantes	9
1.5. Los epítomos de heveína	10
1.6. El estudio de complejos macromoleculares por RMN	12
1.6.1. Experimentos bidimensionales homonucleares $^1\text{H}^1\text{H}$	13
Objetivos	15
2. Metodología experimental	17
2.1. Extracción y purificación de la heveína natural (hev) del látex	18
2.2. Subclonación, expresión y purificación de alérgenos recombinantes	19
2.2.1. Subclonación de la heveína silvestre (rhev) y heveína con las mutaciones W21A W23A (rhevAA)	19
2.2.2. Expresión y purificación de los alérgenos recombinantes rhev y rhevAA obtenidos en células <i>E. coli</i> Rosetta gami (DE3) pLysS	20
2.2.3. Adaptación de las condiciones de expresión para la heveína recombinante enriquecida con ^{13}C y ^{15}N (rhevE)	22
2.3. Caracterización de los alérgenos natural y recombinante	23
2.4. Purificación de anticuerpos IgG de individuos sanos y alérgicos	24
2.5. Obtención de espectros de RMN $^1\text{H}^1\text{H}$ bidimensionales de hev, rhev y rhevAA	25
2.6. Obtención de espectros TOCSY de hev en complejo con IgGs	25
2.7. Asignación de los desplazamientos químicos	26

3. Resultados y Análisis	27
3.1. Purificación de heveína natural (hev)	28
3.2. Purificación de heveína recombinante (rhev)	29
3.3. Caracterización de heveína natural y recombinante	30
3.4. Resultados de RMN	32
3.4.1. Espectros de hev libre	32
3.4.2. Espectros de rhev libre	34
3.5. Espectros de hev en complejo con IgGs	36
3.6. Análisis de los epítomos	43
Conclusiones	49
Perspectivas	51
Apéndices	53
A. Inmunoglobulinas y sus receptores de membrana	55
B. Experimentos TOCSY y NOESY	57
B.1. TOCSY	57
B.2. NOESY	58
B.3. Estructura de heveína a pH fisiológico	59
C. HSQC de heveína	63
Bibliografía	67

Índice de figuras

1.1. Heveína y su plegamiento	3
1.2. Ejemplo de la estructura de un anticuerpo	6
1.3. Diferencias entre IgE y IgG	10
1.4. Ejemplo de un experimento bidimensional $^1\text{H}^1\text{H}$ de RMN	12
2.1. Construcción de Trx1-AMG ₅ M-rhev	23
3.1. Purificación de heveína natural (hev)	28
3.2. Cinética de expresión de rhev en <i>E. coli. Rosetta gami</i>	29
3.3. Purificación de heveína recombinante (rhev)	30
3.4. Caracterización de hev y rhev	31
3.5. Coelución de fracciones en FR-HPLC y superposición de espectros de masas de hev y rhev	32
3.6. Estadística de los desplazamientos químicos de cadena principal de heveína	33
3.7. Espectros TOCSY de hev y rhev	35
3.8. Resta de espectros de RMN	36
3.9. Resta de los espectros TOCSY (hev - hev+IgGs)	37
3.10. Espectro de diferencias de interacción de heveína con IgGs de individuo sano	39
3.11. Espectro de diferencias de la interacción de heveína con IgGs del individuo alérgico	41
3.12. Representación de las modificaciones al desplazamiento químico por la interacción.	42
3.13. Representación de los epítomos reportados de heveína.	46
A.1. Esquema de una IgE y su receptor de membrana	56
A.2. Esquema del entrecruzamiento de IgEs al reconocer alérgenos	56
B.1. Secuencia de pulsos del experimento TOCSY	57
B.2. Secuencia de pulsos del experimento NOESY	58
B.3. Estructura de heveína a pH fisiológico	60
C.1. HSQC de heveína.	64

Índice de tablas

1.1. Subtipos y subclases de anticuerpos.	7
1.2. Epítomos reportados de heveína.	11
2.1. Gradiente de elución cromatográfica en FR-HPLC para heveína	24
2.2. Individuos donantes de suero	25
3.1. Comparación de los epítomos reportados de heveína y los epítomos de este trabajo.	44
3.2. Análisis del área expuesta al solvente de la heveína (PDB 1Q9B).	45
B.1. Parámetros de convergencia de RMN para el cálculo de estructuras de la heveína	60

Resumen

Durante la última década se han realizado estudios de antígenos en complejo con anticuerpos por técnicas estructurales como resonancia magnética nuclear (RMN) y difracción de rayos X. Hasta el día de hoy se cuenta con cuatro estructuras cristalinas de anticuerpos con alérgenos (antígenos causantes de la alergia) y diversos estudios sobre la perturbación de desplazamientos químicos asociados a la interacción de alérgenos recombinantes enriquecidos con isótopos activos en RMN (^{15}N y ^{13}C) en presencia de anticuerpos monoclonales.

En este trabajo se estudiaron las propiedades antigénicas de la proteína heveína desde un punto de vista estructural. Se analizaron los estudios previos de ésta, con lo cual diseñamos y probamos una metodología para caracterizar la interacción de heveína con anticuerpos policlonales sin la necesidad de enriquecer a ninguno de ellos.

Se asignaron los desplazamientos químicos en el espectro bidimensional de ^1H ^1H TOCSY, para los átomos de hidrógeno de heveína modificados por la adición de anticuerpos policlonales tipo IgG para individuos sanos y alérgicos.

Se demostró que el reconocimiento de heveína es distinto entre los dos individuos:

- Para el individuo sano el reconocimiento es en una región rica en aminoácidos polares cercana al carboxilo terminal.
- Para el individuo alérgico el reconocimiento es en una región con mas variedad de aminoácidos en el amino terminal.

Además, se obtuvo a la heveína recombinante expresada en *Escherichia coli* para futuros experimentos con mutantes y se estandarizó su enriquecimiento con ^{15}N y ^{13}C .

Capítulo 1

Introducción

La heveína es una proteína de 43 aminoácidos que fue purificada y cristalizada por primera vez en 1960, y fue descrita como la proteína mayoritaria en las células laticíferas del árbol de *Hevea brasiliensis*¹. En 1990 se realizó una comparación con otras proteínas antifúngicas similares producidas en heridas de plantas y se reportó su actividad como lectina (proteína con sitio de reconocimiento a azúcares)², ésto debido a su similitud con la aglutinina de germen de trigo, una lectina con cuatro dominios similares a heveína³. El primer estudio estructural se llevó a cabo en 1991 por Rodríguez-Romero y cols., donde se reportó la estructura cristalográfica a 2.8 Å de resolución⁴, así también, en 1993 se obtuvo la estructura tridimensional por medio de resonancia magnética nuclear (RMN), la cual fue la primera de este tipo depositada en el Protein Data Bank (Clave PDB 1HEV)⁵. En los trabajos comentados anteriormente se realizó el estudio de sus propiedades químicas y de su estructura. Posteriormente, el interés en la heveína se enfocaría en su actividad como lectina y sus propiedades alergénicas. El primer estudio de la interacción de la heveína con oligosacáridos de N-acetilglucosamina por RMN fue reportado por Asensio y cols. en 1995, en donde se determinó que los aminoácidos aromáticos expuestos en la superficie son los responsables de interaccionar con los azúcares⁶. Las lectinas poseen una gran relevancia en el estudio de la glicobiología, pero nuestro interés se enfocará en el estudio de la lectina heveína como un alérgeno, ya que desde los años 60 se considera a la alergia al látex como un problema de salud pública⁷. Sin embargo, fue hasta 1998 cuando se anexó a la proheveína como el sexto alérgeno del látex en la lista del Subcomité de Nomenclatura

de Alérgenos de la Unión Internacional de Sociedades Inmunológicas (IUIS-ANS, por sus siglas en inglés).

La proheveína es una pro-proteína producida por la planta donde la heveína es el extremo amino terminal, el cual es cortado durante la maduración del precursor. Reportes posteriores demostraron que sólo la región amino terminal era responsable de la alergenicidad que presentaban los dos grupos más vulnerables al contacto con el látex, los trabajadores del sector salud y los niños con espina bífida⁸⁻¹⁰. El subcomité de nomenclatura de alérgenos clasifica a la proheveína como Hev b 6 (*Hevea brasiliensis* más el número de registro 6), heveína es denominada Hev b 6.02 y al carboxilo terminal de proheveína se le denominó Hev b 6.03. En la lista de la IUIS-ANS actualmente están clasificados 13 alérgenos de *H. brasiliensis*, algunos con diversos isoalérgenos como es el caso de la proheveína con tres. Cabe mencionar que la heveína es el segundo alérgeno más pequeño que se ha reportado, después del péptido hemolítico melitina (Api m 4), del veneno de abejas¹¹.

La heveína presenta un dominio estructural tipo nudo de cisteínas común en varias lectinas antifúngicas de plantas que se ha denominado "dominio de heveína". Su estudio ha sido de gran relevancia, ya que se conocen más de cincuenta secuencias homólogas presentes en diversas lectinas tanto de savia, frutos y polen.

La principal característica del dominio de heveína son cuatro puentes disulfuro, los cuales están distribuidos en los pares 1(C3)-4(C18), 2(C12)-5(C24), 3(C17)-6(C31) y 7(C37)-8(C41), según la aparición de cisteínas en la secuencia; dicha distribución es similar a algunas toxinas bloqueadoras de canales y péptidos inhibidores de proteasas. Sin embargo, para este nudo de cisteínas en particular, sobresale la distribución peculiar de las cisteínas 3 y 4, que son consecutivas en secuencia, lo que provoca el plegamiento del dominio de heveína (Fig. 1.1).

En el caso particular de la heveína la región de lectina está formada por los primeros 32 aminoácidos, la cual contiene a los puentes 1-4, 2-5, 3-6 y dentro del dominio de lectina los aminoácidos Ser19, Trp21, Trp23 y Tyr30 representan el sitio de interacción con azúcares.

El segmento 33-43 contiene al puente 7-8, este segmento no afecta su reconocimiento a azúcares, ya que existen lectinas homólogas sin él; sin embargo, se cree que éste le confiere estabilidad y se ha propuesto su implicación en la alergenicidad.

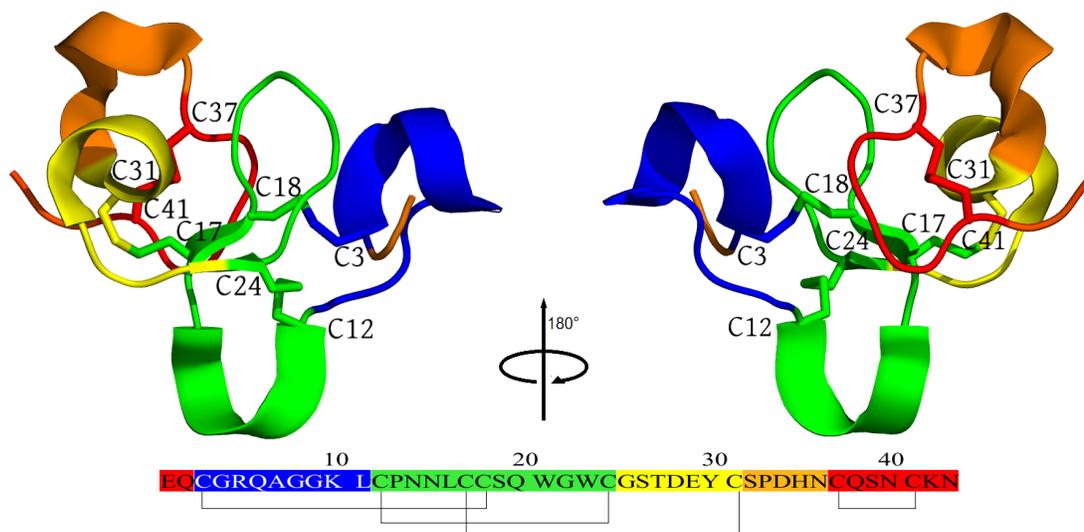


Figura 1.1: Heveína y su plegamiento. Representación de las coordenadas cristalográficas de la heveína a 1.5 Å (PDB 1Q9B), y en ella se representan a colores las asas formadas por el nudo de cisteínas. El dominio de lectina comprende la secuencia de los aminoácidos 1 al 32 y los residuos involucrados en la interacción con azúcares son S19, W21, W23 y Y30.

1.1. Alérgenos

Los antígenos son sustancias que son reconocidas por el sistema inmune e inducen una respuesta de éste. Nuestro interés en este caso son los alérgenos. Los cuales son antígenos *no parasitarios* que desencadenan una respuesta inmediata. Son moléculas externas a un organismo al cual sensibilizan y en subsecuentes exposiciones desencadenan una respuesta, provocando la alergia o hipersensibilidad inmediata (tipo I). El organismo sensibilizado produce inmunoglobulinas tipo E (IgE), las cuales tienen una gran especificidad por los alérgenos y son las encargadas de reconocerlos y desencadenar una respuesta celular compleja a través de receptores de alta afinidad presentes en la superficie de mastocitos y basófilos¹² (Apéndice A).

Actualmente están enlistados 678 alérgenos en la lista IUIS-ANS, de los cuales 319 corresponden a alérgenos del reino *Plantae*, 101 al reino *Fungi* y los restantes al reino *Animalia*.

Algunas plantas cuentan con un sistema de protección contra patógenos que consiste en la expresión de proteínas inhibitoras, proteasas, toxinas, hidrolasas, etc. A las proteínas que pertenecen a este sistema de protección se les ha denominado como "proteínas relacionadas con la patogénesis"(PRP). Diversos estudios proponen que algunos alérgenos de plantas son PRP¹³ y generalmente éstos son distintos a los alérgenos presentes en alimentos. Estos estudios concuerdan con los primeros reportes para heveína, donde se propuso su implicación como proteína de defensa antifúngica en el látex antes de ser clasificada como un alérgeno².

1.2. Anticuerpos

Las inmunoglobulinas o anticuerpos fueron descubiertos en 1890 como agentes en la sangre que podían neutralizar la acción de las toxinas de difteria. Al siguiente año se hizo referencia a los *Antikörper* en estudios donde estos agentes discriminaban entre dos sustancias. En 1939, Tiselius y Kabat usaron técnicas de electroforesis para separar un suero de un paciente inmunizado en fracciones de albumina, α -globulina, β -globulina y γ -globulina. Las proteínas mayoritarias de la fracción γ son las inmunoglobulinas tipo G (IgG). Posteriormente, se descubrieron dentro de esta fracción, diferentes isoformas separadas como *pesadas* (IgM), *regulares* (IgG, IgD, IgE y IgA) y *ligeras* (algunos dímeros de cadenas ligeras)¹⁴. Los anticuerpos son receptores de agentes extraños, que son producidos en las células linfoides tipo B maduras (linfocito B) y sirven a dos propósitos en general:

- Reconocer y activar una respuesta a través de receptores de la membrana celular, por la activación celular de la respuesta humoral en células mieloides granulares (eosinófilos, basófilos y neutrófilos).

- Como agentes que reconocen y neutralizan agentes externos para inactivar su actividad patógena hacia el organismo.

1.2.1. Elementos estructurales de los anticuerpos

Los anticuerpos son heterotetrámeros compuestos de dos cadenas pesadas (50-75 kDa) y de dos cadenas ligeras (25 kDa). Todos los anticuerpos son glicoproteínas, y los azúcares presentes en ellas son responsables de su reconocimiento por los receptores. Su estructura puede ser dividida por su funcionalidad, primero, la región variable (V) es la responsable de reconocer a los antígenos y la región constante (C) especifica la función del anticuerpo, las regiones variables y constantes están presentes tanto en la cadena pesada (VH-CH1-CH2-CH3) como en la ligera (VL-CL). Cada región variable tiene 3 regiones de alta variabilidad en secuencia, denominadas como regiones de alta complementariedad (CDR, por sus siglas en inglés), las regiones variables son los extremos amino terminal tanto de la cadena pesada como de la cadena ligera. Las regiones VH-CH1 y VL-CL forman un ensamble denominado *fragmento de unión a antígenos* (Fab, por sus siglas en inglés), las dos regiones CH2-CH3 de las cadenas pesadas forman el *fragmento cristizable* (Fc) y las regiones VH y VL forman el *fragmento variable* (Fv) (Fig. 1.2). En nuestro caso de estudio los anticuerpos responsables de la alergia son los IgE, reportados por primera vez en 1966¹⁵. Estos son los anticuerpos que se encuentran en menor cantidad en el organismo humano, presentes en un orden de microgramos por litro de sangre, aproximadamente 0.005 % de los anticuerpos totales, lo que dificulta su purificación.

Las IgEs son un tipo de anticuerpos presentes únicamente en mamíferos; están implicadas en la respuesta inmune contra diversos agentes parasitarios, además de estar implicadas en la alergia, en un proceso aún no esclarecido. La estructura de su cadena pesada (VH-CH1-CH2-CH3-CH4) tiene un dominio extra como en el caso

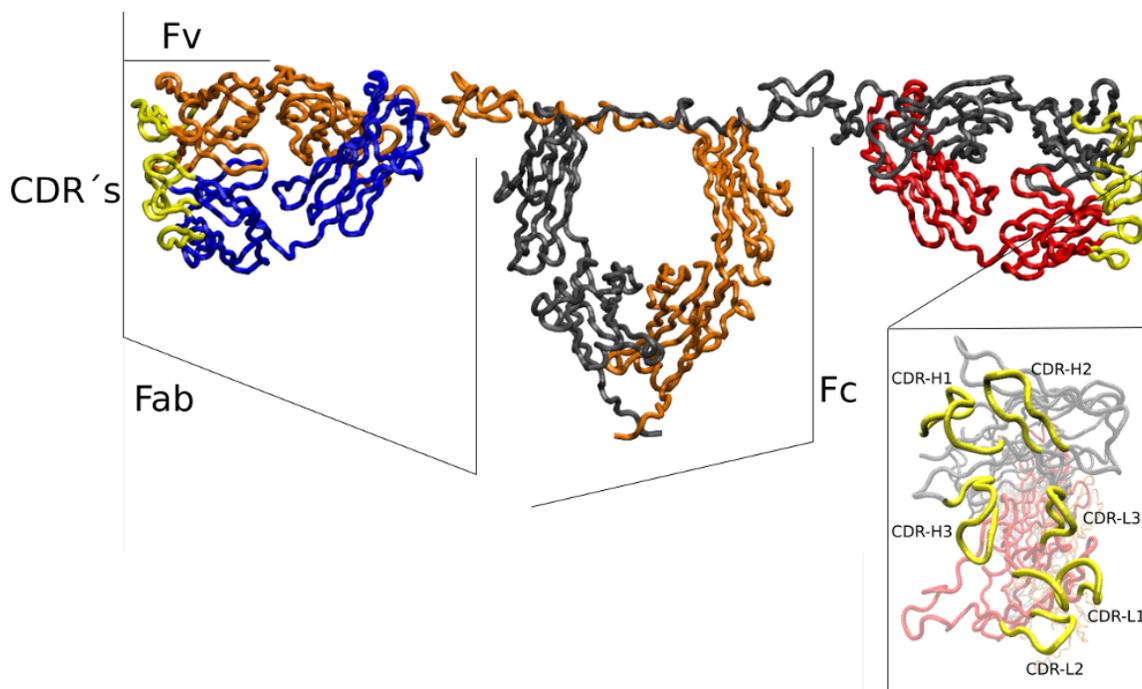


Figura 1.2: Ejemplo de la estructura de un anticuerpo. Representación de la cadena principal de una IgD (PDB 1ZVO) resuelta por dispersión de rayos X (small-angle X-ray scattering) en disolución. Su topología general es representada en forma de "Y", a la derecha se muestra un acercamiento de la zona de los CDRs. En la ampliación se representa los dominios VL (rojo), VH (negro) y CDRs (amarillo).

de las IgM y a diferencia de las cadenas pesadas de IgD, IgA e IgG (VH-CH1-CH2-CH3).

Los niveles en suero de IgE suelen estar elevados, tanto en pacientes alérgicos, como en personas que sufren de alguna parasitosis. Recientemente se ha relacionado el aumento en los niveles de las IgEs implicadas tanto en parasitosis como en alergia con una subclase de IgG, la IgG4¹⁶. Cabe mencionar que la IgG4 es el isotipo menos abundante de las IgG, alrededor de 3 % de los anticuerpos totales. Además, es la única subclase de IgG que no desencadena opsonización ni fijación del complemento¹⁷ (Tabla 1.1). Hasta el día de hoy, se sólo conoce a las IgG4 como un receptor soluble.

Tabla 1.1: Subtipos y subclases de anticuerpos.

	Suero (%)	Estructura	carbohidratos (%) ^a	Opsonización ^b	Algunas funciones	FcR ^c
IgG	75	Monómero		+++	Para todas las subclases de IgG:	Fc γ R
IgG1	67 % IgG	Monómero	2-3	Sí	Respuesta secundaria,	I, II, III
IgG2	22 % IgG	Monómero	2-3	Sí	neutralizar toxinas y virus	II
IgG3	7 % IgG	Monómero	2-3	Sí		I, II, III
IgG4	4 % IgG	Monómero	2-3	No		I, II
IgM	10	Pentámero	12	+++	Respuesta primaria	
IgA	15	Monom. o dímero		-	Respuesta en la mucosa	Fc α R
IgA1		Monom. o dímero	7-11	-		
IgA2		Monom. o dímero	7-11	-		
IgD	<0.5	Monómero	9-14	-	Homeostasis	Fc δ R
IgE	<0.01	Monómero	12	-	Alergia	Fc ϵ R I, II

Los cinco subtipos están enlistados conforme a su importancia inmunológica. Para los subtipos IgG y IgA están enlistadas las subclases conocidas hasta el momento. ^a Propiedades sólo de las inmunoglobulinas humanas. ^b Opsonización es el marcaje de antígenos para su ingestión y destrucción por un fagocito¹⁷. ^c Receptores de anticuerpos asociados a membranas de células del sistema inmune.

1.3. Parátomos y epítomos

Las interacciones de los anticuerpos con los antígenos típicamente se establecen entre el parátomo (sitio en el cual se encuentran los CDRs) y el epítomo (sitio que es reconocido por los anticuerpos). Si el reconocimiento se lleva a cabo cuando las IgEs están ancladas en la membrana plasmática de mastocitos y basófilos a través de los receptores de alta afinidad Fc ϵ RI o Fc ϵ RII, se lleva a cabo una cascada de señalización en estas células, provocando que se degranulen dando lugar a la inflamación (Apéndice A).

Tanto los epítomos como los parátomos, corresponden a regiones expuestas de las proteínas y se ha propuesto que el epítomo debe “introducirse” en el parátomo¹⁸. La cavidad de un parátomo puede visualizarse entre los 3 CDRs de la cadena ligera (L) y la cadena pesada (H) de una IgD (Fig. 1.2).

Así como el parátomo de un anticuerpo está definido en la región variable de las cadenas pesada y ligera, los epítomos pueden estar deslocalizados en cualquier

región de la superficie de un antígeno, por lo tanto la búsqueda de éstos es de relevancia para conocer el mecanismo de la enfermedad y para el desarrollo de herramientas de diagnóstico y terapia.

Los antígenos pueden tener uno o más epítomos, es decir, pueden ser monovalentes o multivalentes; sin embargo, los alérgenos deben ser monómeros multivalentes (o multímeros monovalentes) ya que se necesita llevar a cabo un entrecruzamiento de las IgE ancladas a los receptores de la membrana plasmática para iniciar la cascada de señalización de la alergia (Apéndice A). Esta afirmación nos indica que en una proteína de 43 aminoácidos por lo menos deben existir dos regiones que sean reconocidas por los anticuerpos o en su caso que la proteína forme un complejo con otra(s) molécula(s) con epítomos de IgE.

Recientemente Rubinstein y colaboradores, han desarrollado un estudio sobre la interacción entre anticuerpos y antígenos¹⁸, donde encuentran que la cavidad entre los CDR-L3 y CDR-H3 está ocupado por un aminoácido con carácter hidrofóbico del antígeno, flanqueado por tirosinas o histidinas del anticuerpo, las cuales son muy comunes en las secuencias de CDRs de los anticuerpos. Anterior a este trabajo, nuestro grupo fue el primero en proponer a los triptofanos expuestos 21 y 23 de la heveína, como parte de un epítomo conformacional reconocido por IgE¹⁹.

1.3.1. Tipos de epítomos

Los epítomos se pueden clasificar en dos tipos particulares: lineales (una secuencia de aminoácidos que es reconocida por el parátomo) y conformacionales (regiones que están expuestas en la superficie que no necesariamente son consecutivas en secuencia). Los epítomos lineales fueron los primeros en estudiarse mediante mutaciones puntuales en proteínas recombinantes, síntesis de péptidos y síntesis de péptidos con deleciones.

Generalmente las técnicas utilizadas para estudiar epítomos lineales (ELISA, InmunoBlot, WesternBlot, etc) son más sencillas que las que estudian epítomos

conformacionales, dado que para el estudio de estos últimos se deben utilizar técnicas estructurales. El estudio de epítomos conformacionales es relativamente nuevo. Hasta principios de la década aún se realizaban estudios de búsqueda de epítomos lineales y a finales de la misma la tendencia está marcada hacia la búsqueda de epítomos conformacionales. Para el caso de los alérgenos sólo han sido resueltas cuatro estructuras cristalinas por difracción de rayos X de los complejos anticuerpo-alérgeno²⁰⁻²³ y también se han realizado estudios de la interacción de estos complejos por RMN de alérgenos recombinantes enriquecidos (¹³C, ¹⁵N)²⁴.

1.4. Anticuerpos neutralizantes

Un anticuerpo es denominado neutralizante cuando sólo reconoce y une a un antígeno sin activar ninguna respuesta celular. Este anticuerpo no tiene una fracción cristalizable (Fc) por lo que no es reconocido por ningún receptor y por lo tanto no desencadena ninguna reacción²⁵. Varios antídotos contra venenos de animales están basados en este principio. Por la dificultad de trabajar con IgE, en este trabajo propusimos la posibilidad del uso de IgGs como anticuerpos neutralizantes de alérgenos como un modelo (anticuerpo-heveína) de la interacción real (IgE-heveína). Esto nos permitiría estudiar la interacción de heveína con anticuerpos de pacientes sanos tipo IgG o en su caso con anticuerpos obtenidos de librerías de genes. En este caso se optó por el uso de anticuerpos IgGs de pacientes sanos. Sin embargo, en nuestro grupo de trabajo, también se han realizado esfuerzos para obtener anticuerpos monoclonales IgG obtenidos de librerías de pacientes sanos²⁶. La diferencia entre los anticuerpos IgG y IgE es su cadena pesada, la cual le da su función. Se ha descrito que las cadenas ligeras (κ) de IgG y IgE pertenecen a la misma familia de genes, esto también es válido para otras inmunoglobulinas¹⁷ (Fig. 1.3). La IgG4 es la única subclase de anticuerpos de la cual no se conoce su función. A la fecha, lo más cercano a una función es la de ser un anticuerpo neutralizante ya que no produce opsonización, lo que lo hace sólo un anticuerpo soluble del cual no

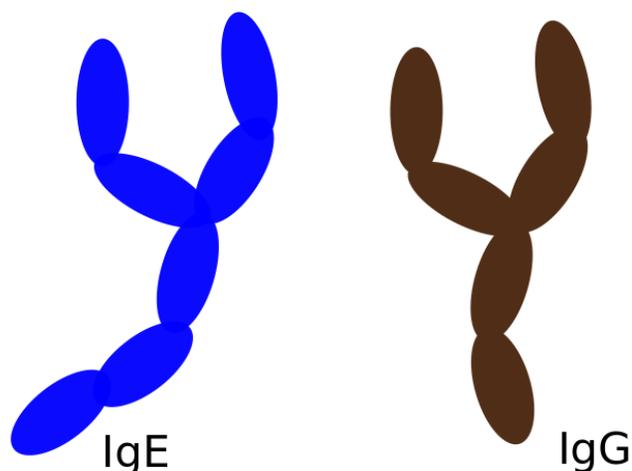


Figura 1.3: Diferencias entre IgE y IgG. Cada cadena pesada posee una diferencia sustancial en todo anticuerpo. En el caso de la IgE su cadena pesada tiene un dominio extra (CH4), el cual no interviene en el anclaje a la membrana (Apéndice A). Las IgG desencadenan opsonización sin embargo esta respuesta es menos drástica y más lenta que una reacción alérgica.

se ha descrito su interacción con su receptor (Tabla. 1.1).

Aún no se tiene evidencia sobre las características de la interacción de alérgenos con IgE ancladas. En este trabajo tomaremos a consideración que tanto el reconocimiento en disolución como el reconocimiento sobre la membrana son idénticos. Basados en esto, se desarrolló una metodología sin tener en cuenta este factor que está fuera del alcance de este trabajo.

1.5. Los epítomos de heveína

Los primeros reportes de epítomos para la heveína se encuentran resumidos en la tabla 1.2, en la cual se observa que en comparación con el plegamiento de heveína algunos epítomos contienen regiones continuas con residuos que ni siquiera están expuestos a la superficie en su forma nativa (Fig. 1.1). Además, se han estudiado estos epítomos sin tomar a consideración el plegamiento tipo nudo de cisteínas de la heveína, es decir, no se ha confirmado que las mutaciones, así como los péptidos

sintéticos estén plegados de la misma forma. Lo que es de gran relevancia para los estudios *in vitro*.

Por otra parte, dentro del organismo la “búsqueda de epítomos” es mas completa. Por un lado, los anticuerpos reconocen a proteínas solubles y plegadas, sin embargo, *in vivo* las células presentadoras de antígenos despliegan a las proteínas para desencadenar la cascada de producción de anticuerpos en linfocitos B. Por lo tanto, un organismo es capaz de producir anticuerpos para gran parte de la secuencia de un antígeno. De acuerdo a lo anterior, en las búsquedas previos de los epítomos de heveína, los péptidos sintetizados son reconocidos por IgE. Aunque en un grado distinto, ya sea mayor o menor al caso de la estructura de heveína plegada. La complementariedad de las técnicas inmunológicas y estructurales es necesaria para el estudio de los epítomos, pero la conexión entre ellas debe ser bastante cuidadosa. Como se comentó anteriormente, estudios inmunológicos han reportado epítomos que no están expuestos. En contraste, hay estudios estructurales de proteínas recombinantes donde no se comprueba la perturbación que las mutaciones puntuales tengan sobre la estructura, y con eso, se les atribuye todo el cambio en el reconocimiento a la perturbación en la cadena lateral y no a un cambio conformacional global.

Tabla 1.2: Epítomos reportados de heveína.

Epítomos reportados	Tipo	Referencia
EQCGRQAGGK LCPNNLCCSQ WG WCGSTDEY CSPDHNCQSN CKD	Lineal	Beezhold. ⁸
EQCGRQAGGK LCPNNLCCSQ WG WCGSTDEY CSPDHNCQSN CKD	Lineal	Banerjee. ⁹
EQCGRQAGGK LCPNNLCCSQ WG WCGSTDEY CSPDHNCQSN CKD	Conformacional†	Reyes-López. ¹⁹
EQCGR Q AGG K LCPNNLCCSQ WG WCGST DEY CSPD H NC Q SN CKD	Conformacional*	Karisola. ²⁷
EQCGRQAGGK LCPN N LCCSQ WG WCGSTDEY CSPDHNCQSN CKD	Conformacional	Reyes-López. ²⁸
EQCGRQAGGK LCPNNLCCSQ WG WCGSTDEY CSPDHNCQSN CKD	Lineal	De Silva. ¹⁰
EQCGRQAGGK LCPNNLCCSQ WG WCGSTDEY CSPDHNCQSN CKD		

(*) Karisola obtuvo los aminoácidos más importantes derivados de múltiples análisis de epítomos lineales tomando en cuenta cuales están en la superficie en forma nativa.(†) El presente trabajo es una derivación del reporte de Reyes-López donde se proponen al Trp21 y Trp23 como parte de un epítomo conformacional.

1.6. El estudio de complejos macromoleculares por RMN

Debido al tamaño de una proteína, en la mayoría de los casos se han tratado de obtener proteínas enriquecidas con ^{13}C , ^{15}N o ambos. Esto debido a que las señales de ^1H para una proteína tiene regiones traslapadas que son difíciles de asignar y con núcleos activos en RMN (^1H , ^{13}C y ^{15}N principalmente) se pueden separar señales a través de espectros multidimensionales heteronucleares.

En los primeros estudios de la interacción dos proteínas por RMN se analizaron las interacciones ambas, cuando sólo una de ellas estaba enriquecida con ^{13}C , observándose la desaparición de algunas señales relacionadas con la interacción en un espectro monodimensional²⁹. Posteriormente se comenzó a utilizar la transferencia de saturación para generar espectros selectivos (monodimensionales

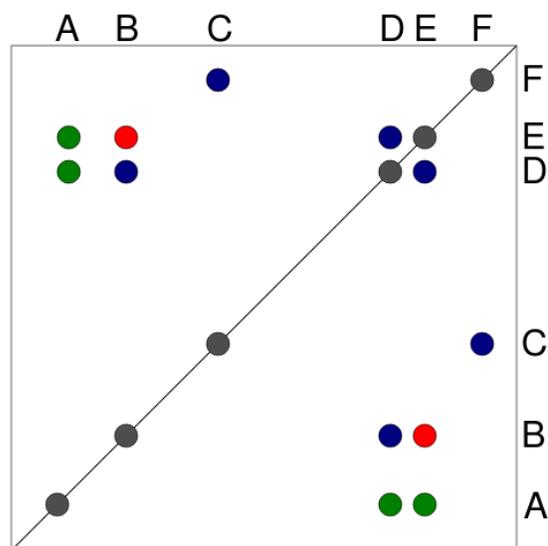


Figura 1.4: Ejemplo de un experimento bidimensional $^1\text{H}^1\text{H}$ de RMN. En azul se representan los picos de cruce de un experimento COSY, es decir, las correlaciones de primeros vecinos (protones a tres enlaces de distancia). Los picos de cruce generados a través de una cadena continua de acoplamientos da lugar a las señales TOCSY (rojo). Las señales NOE son generadas por la relajación cruzada de átomos cercanos en el espacio (verde).

o multidimensionales) donde solo se podrían observar las señales en la interacción. Al mismo tiempo, se hizo uso de experimentos bidimensionales heteronucleares (HSQC, TROSY), por medio de los cuales se puede cuantificar la modificación de la señales perturbadas por la interacción entre moléculas^{30,31}.

Por otra parte, el estudio de complejos de moléculas pequeñas con macromoléculas ha tenido un mayor desarrollo, de hecho, el estudio de la interacción de heveína con quitobiosa es un trabajo pionero de la interacción entre una proteína con ligantes orgánicos⁶. En años recientes, de la misma manera que con los complejos de macromoléculas, el desarrollo de las técnicas de transferencia de magnetización para los complejos de proteína-ligante (STD-TOCSY, ¹H-STD, TrNOESY) han generado avances en el estudio de las interacciones y en la determinación de los epítomos³².

1.6.1. Experimentos bidimensionales homonucleares ¹H¹H

Los experimentos bidimensionales de ¹H¹H fueron los primeros experimentos multidimensionales en aplicarse al estudio de moléculas. El caso más sencillo de un experimento bidimensional es el experimento COSY (Apéndice B), el cual está formado por una serie de espectros monodimensionales adquiridos en una segunda dimensión. En este experimento se pueden observar correlaciones (señales fuera de la diagonal) entre átomos de ¹H acoplados (el acoplamiento J_{ij} es una magnitud intrínseca de átomos unidos a través de enlaces). En el experimento ¹H²H COSY sólo se observan los picos de cruce de los átomos vecinos a tres enlaces de distancia (³ $J_{H_1H_2}$).

El experimento TOCSY permite observar correlaciones entre átomos acoplados a más de tres enlaces. Es decir, si existen las constantes ³ $J_{H_1H_2}$ (señal BD en la figura 1.4), ³ $J_{H_2H_3}$ (señal DE), ³ J_{HH} , etc., se observarán señales en el espectro.

Por otra parte, si dos espines están cercanos en el espacio, estos podrían relajarse entre ellos y generar una correlación debida a la “relajación longitudinal”, éste es el caso del experimento denominado Nuclear Overhauser Effect (NOE)³³. La

relajación longitudinal es la transferencia de magnetización entre átomos cercanos en el espacio en lugar de relajarse con el disolvente.

En este trabajo se realizó el estudio de un alérgeno nativo en disolución, en presencia de anticuerpos, para estudiar el posible epítipo a través de la modificación de los desplazamientos químicos de los aminoácidos involucrados en la interacción por medio de RMN. Además, se efectuó la clonación de la heveína para tener un modelo con el cual se podrán realizar mutaciones, para corroborar la implicación de los aminoácidos expuestos en el reconocimiento de los anticuerpos. Con estos experimentos se trató de corroborar si los aminoácidos propuestos por nuestro grupo en trabajos previos están implicados en algún epítipo conformacional¹⁹ (Tabla 1.2).

Objetivos

- Caracterizar la interacción de heveína con anticuerpos IgG de pacientes sanos y alérgicos.

Objetivos particulares

- Realizar la purificación de la heveína nativa y de anticuerpos IgG de pacientes sanos y alérgicos.
- Obtener los espectros de $^1\text{H}^1\text{H}$ TOCSY de la heveína y de heveína en complejo con anticuerpos y asignar las señales de los desplazamientos químicos de las señales modificadas por la interacción.
- Expresar la heveína recombinante en células de *E. coli*, y corroborar su plegamiento similar a heveína nativa.

Capítulo 2

Metodología experimental

La realización de este proyecto comprende diversas áreas de la química, biología molecular y bioquímica. En este capítulo se abordará de manera resumida cada uno de los pasos que se usaron en las etapas experimentales de este proyecto.

- Extracción y purificación de la heveína de los lutoideos del látex de *Hevea brasiliensis*.
- Subclonación, expresión y purificación de alérgenos recombinantes.
 - Subclonación de la heveína silvestre y heveína W21A W23A.
 - Expresión del alérgeno heveína recombinante silvestre (rhev) en células de *E. coli* y expresión de rhev con las mutaciones W21A W23A (rhevAA).
 - Adaptación de las condiciones de expresión para la heveína recombinante enriquecida con ^{13}C y ^{15}N (rhevE).
- Purificación de IgGs de sueros de pacientes sanos y alérgicos.
- Caracterización de las proteínas recombinantes y nativas.
- Obtención de espectros bidimensionales $^1\text{H}^1\text{H}$ TOCSY y NOESY de la heveína libre y en complejo con anticuerpos IgG de pacientes sanos y alérgicos.
- Obtención de espectros bidimensionales $^1\text{H}^1\text{H}$ TOCSY y NOESY de rhev y rhevAA.

2.1. Extracción y purificación de la heveína natural del látex

Para realizar la extracción de la proteína a partir de los lutoides del látex de *Hevea brasiliensis* se utilizó un amortiguador de Tris·HCl 50mM, NaCl 200mM a pH 8.2. Se pesaron 20 gramos de sedimento (lutoides) de látex ultracentrifugado de la clona GV-42 y se homogeneizaron a 4 °C con un homogenizador POLITRON PT-MR2100 agregando la mínima cantidad de disolución amortiguadora. El extracto se centrifugó (125,000 g, 4 °C, 40 min) y se midió el volumen del extracto para realizar una precipitación fraccionada con sulfato de amonio. Primero se llevó al 65 % de saturación para separar las proteínas de menor solubilidad en agua y después al 100 %. La muestra se dejó 16 horas en disolución saturada y después se centrifugó y el precipitado se suspendió en Tris·HCl 50 mM pH 8.2. En esta última fracción se encuentran la heveína y sus isoformas tales como Hev b 6.0202 y otras. Esta fracción fue dializada con el mismo amortiguador a 4°C durante una noche con una membrana de diálisis de ésteres de celulosa con un corte molecular de 3.5 kDa, con lo cual se logra solubilizar a las proteínas y eliminar el alto contenido de sulfato de amonio. Las proteínas se filtraron por una membrana de celulosa regenerada con un corte molecular de 10 kDa en un sistema de ultrafiltración Amicon (Millipore), y se obtuvo la fracción de proteínas menores del tamaño del corte, conteniendo a la heveína y otras proteínas. Esta fracción se aplicó a una columna C18 de fase reversa Ultrasphere 5µm ODS-DABS (Beckman-Coulter) en un cromatógrafo de líquidos de alta eficiencia (HPLC) Agilent-HP 1100 aplicando un método isocrático con acetonitrilo al 13.5 % en agua con 0.1 % ácido trifluoroacético (TFA). Se compararon perfiles cromatográficos del extracto de la heveína obtenidos en dos diferentes columnas de FR C18: Ultrasphere ODS-DABS 5µm 250mm-4.6mm (Beckman-Coulter) y Purosphere STAR 5µm 250mm-4.6mm (Merck).

2.2. Subclonación, expresión y purificación de alérgenos recombinantes

2.2.1. Subclonación de la heveína silvestre (rhev) y heveína con las mutaciones W21A W23A (rhevAA)

Anteriormente nuestro grupo clonó a la heveína silvestre amplificada del RNA de hojas del árbol del látex *H. brasiliensis* GV-42 (datos no publicados), en los sitios *NcoI/HindIII* del vector pET 32(a)+ obteniendo la construcción Trx1-EK-EK-rhev, la cual contiene a la heveína en el carboxilo terminal como parte de una proteína de fusión a tiorredoxina (Trx1) y dos sitios de corte de la enzima enterocinasa (EK) con una secuencia de aminoácidos DDDDK. La caracterización de rhev por masas demostró que la proteína obtenida de la construcción Trx1-EK-EK-rhev sólo fue hidrolizada en el primer sitio de corte, por lo cual diseñamos una nueva construcción en el donde el segundo sitio de EK se cambió por una metionina (M) antes del amino terminal para su hidrólisis selectiva con bromuro de cianógeno (CNBr). Las dos construcciones se representan como:

DDDDKAM**DDDDK**EQCGRQAGGKLCPNLCCSQWGWCGSTDEY CSPDHNCQSCKD
DDDDKAMGGGGG**M**EQCGRQAGGKLCPNLCCSQWGWCGSTDEY CSPDHNCQSCKD

El gen de la heveína se amplificó del molde pET32a(+)-Trx1-EK-EK-rhev por PCR con los oligonucleótidos: forward 5'-**GGCCATGGGTGGTGGTGGTGGTATGGA** GCAATGTGGTCGCCAAGCAGGTGGC-3' con el sitio de restricción *NcoI* (negritas) y el sitio de hidrólisis con CNBr (subrayado) y reverse 5'-**GCGAAGCTTTCAG** TCTTTGCAATTGCTTTG-3' con el sitio de restricción *HindIII* (negritas) y un codón de paro (subrayado). La reacción de PCR se llevó a cabo en 25 μ L de reacción con la mezcla Accuprime pfx supermix (Invitrogen) con 30 ciclos de amplificación (95 °C por 30 s, 55 °C por 30 s, 68 °C por 30 s) en un termociclador Techne TC-512. El producto de PCR se ligó en el vector pET32a(+) (Novagen) utilizando T4 DNA ligasa y se transformó en células *E. coli*. DH5 α .

***E. coli* DH5 α**

Genotipo: *F⁻ endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG Φ 80dlacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF)U169, hsdR17(rK⁻mK⁺), γ ⁻*

La construcción obtenida se denominó Trx1-AMG₅M-rhev y esta fue basada en un diseño para obtener la secuencia exacta de 43 aminoácidos de la heveína (Fig. 2.1). La mutante de la heveína W21A W23A ya estaba construida sobre el mismo plásmido y fue subclonada bajo las mismas condiciones y denominada Trx1-AMG₅M-rhevAA. La subclonación fue comprobada por secuenciación (datos no mostrados).

2.2.2. Expresión y purificación de los alérgenos recombinantes rhev y rhevAA obtenidos en células *E. coli* Rosetta gami (DE3) pLysS

La regulación de la expresión en el plásmido pET32a(+) se encuentra controlada por el represor de lactosa (represor Lac) y su expresión es inducida con isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG), el cual es un análogo de lactosa. Asimismo, el plásmido contiene un gen que le confiere resistencia a ampicilina, que le proporciona una selectividad contra otras bacterias.

***E. coli* Rosetta gami (DE3) pLysS**

Genotipo: *Δ (ara-leu)7697 Δ lacX74 Δ phoA PvuII phoR araD139 ahpC galE galK rpsL (DE3) F'[lac⁺ lacI^q pro] gor522::Tn10 trxB pLysSRARE (Cam^R, Str^R, Tet^R)*

Las células de *E. coli* Rosetta gami (DE3) pLysS son una cepa con un ambiente oxidante que tiene mutados los genes *TrxB* y *Gor* que codifican a las proteínas oxidoreductoras tiorredoxin reductasa y glutatión reductasa, insertadas en plásmidos con resistencia a kanamicina y tetraciclina respectivamente. Además la cepa tiene un plásmido que produce tRNA con la capacidad de reconocer codones de organismos eucariontes y le confiere una selectividad a cloramfenicol. Dado el ambiente

oxidante de Rosetta gami y las propiedades reductoras de la tiorredoxina, se completa el par redox necesario para generar un ambiente en el cual se formarán los puentes disulfuro necesarios para el plegamiento de la heveína.

Para la expresión de las proteínas rhev y rhevAA se utilizaron las mismas condiciones; sin embargo, hay algunas excepciones para la expresión de rhevE que serán descritas posteriormente.

Condiciones generales de la expresión y purificación:

Expresión

- Se transformaron células de Rosetta gami quimiocompetentes con el plásmido pET32a(+)-Trx1-AMG₅M-rhev. Las células transformadas se sembraron en medio sólido Luria Bertani (LB) en cajas petri sometidas a selección con los antibióticos ampicilina (100 mg/L), cloramfenicol (34 mg/L), kanamicina (30 mg/L) y tetraciclina (15 mg/L). Se incubaron a 37 °C durante una noche.
- Se seleccionó una colonia aislada y se cultivó en 5 mL de medio líquido LB con los mismos antibióticos durante una noche para obtener un preinóculo rico en células. Éste fue inoculado en 1 L de medio LB a 37 °C en agitación orbital a 200 rpm, y se monitoreó la densidad óptica (DO) a 600 nm hasta tener un valor entre 0.7 y 0.8, donde las bacterias están en la fase logarítmica de crecimiento. Cuando el medio se encuentra en esta condición se induce la expresión con IPTG 0.5 mM y se incuba a 30 °C de 14 a 18 horas. El cultivo celular inducido se centrifugó (6,000 g, 4 °C, 10 min) para obtener el paquete celular.

Purificación

- El paquete celular se resuspendió en amortiguador de lisis (NaCl 300 mM, Na₂HPO₄ 50 mM, pH 7) y se sonicó en intervalos de 30 s a 4 °C durante 10 minutos con una potencia de 60 W en un sonicador misonix 3000, las células

sonicadas fueron centrifugadas (25,500 g, 4 °C, 20 min). El extracto celular fue filtrado por membrana de 22 μm y se inyectó en una columna de afinidad HiTrap (GE-Healthcare) equilibrada con amortiguador de lisis al que se añadió imidazol 20 mM, la columna HiTrap acompleja preferentemente una secuencia de seis histidinas que son parte de la proteína de fusión. La proteína fue eluida con un amortiguador de elución (imidazol 250mM, NaCl 300 mM, Na_2HPO_4 50 mM, pH 7), dializada contra agua y concentrada. La proteína concentrada fue hidrolizada a 37 °C durante catorce horas con una unidad de enterocinasa Ekmax (Invitrogen) por cada 2 mg de proteína de fusión, después se pasó el extracto por la columna de HiTrap para retener a la tiorredoxina que contiene al péptido de histidinas y la fracción no retenida fue purificada por HPLC. La concentración de proteína fue estimada con el coeficiente de absortividad $\epsilon=12660 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [5].

- La proteína AMG₅M-rhev se liofilizó y se disolvió en TFA 50 % en agua, a la disolución se le añadió CNBr en cristales, para llegar a una relación molar de 200:1 con exceso de CNBr. Se incubó a 18 °C en oscuridad durante una noche y la mezcla de reacción se repurificó por HPLC.
- Para el caso de Trx1-AMG₅M-rhevAA se expresó y purificó bajo las mismas condiciones.

2.2.3. Adaptación de las condiciones de expresión para la heveína recombinante enriquecida con ¹³C y ¹⁵N (rhevE)

La proteína recombinante rhev fue enriquecida en ¹³C y ¹⁵N con un paquete comercial ISOGRO Complex Growth Media (Sigma-Aldrich), con el cual se tiene una capacidad 100 mL de medio enriquecido. Como la cantidad de medio es un limitante en este caso, se recurrió a un método descrito para incrementar el rendimiento de medios en volúmenes pequeños³⁴. Se cultivaron células transformadas con pET32a(+)-Trx1-AMG₅M-rhev en 400 mL de medio LB hasta que llegó a una

La proteína de fusión se purificó a través de una columna de afinidad HiTrap. Se hidrolizó con enterocinasa



La fracción no retenida se purificó por FR-HPLC y se hidrolizó con CNBr



La mezcla de reacción se purificó por FR-HPLC

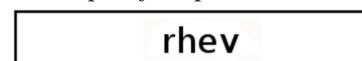


Figura 2.1: Construcción de Trx1-AMG₅M-rhev.

DO aproximada de 0.7 a 600 nm, este último fue centrifugado (6,000 g, 25 °C, 10 min) y lavado, por triplicado, con un amortiguador isotónico (fosfatos 200 mM, pH 7, estéril). Después de la última centrifugación el paquete celular se resuspendió en 100 mL del medio ISOGRO adicionado con las sales, K₂HPO₄ (0.9 g/L), KH₂PO₄ (0.7 g/L), MgSO₄ (0.5 g/L) y CaCl₂ (0.055 g/L) y se ajustó el pH a 7. El paquete celular se incubó a 37 °C durante 40 minutos y la expresión hizo 30 °C/14 h con IPTG 0.5 mM. La purificación de rhevE se realizó bajo las mismas condiciones que los demás alérgenos, descritas en el capítulo 2.1.

2.3. Caracterización de los alérgenos natural y recombinante

Se obtuvieron los perfiles cromatográficos de FR-HPLC para la heveína nativa, y sus recombinantes. La fracción purificada por el método isocrático se caracterizó a través de un gradiente de acetonitrilo optimizado para la purificación de la heveína (Tabla 2.1)³⁵. Se coeluyeron las muestras puras de hev y rhev para comparar si tenían la misma superficie hidrofóbica expuesta y tener un criterio si su plegamiento

era idéntico. Se obtuvieron las masas moleculares de todas las muestras por la técnica de MALDI-TOF en una matriz de ácido α -ciano-*p*-hidroxicinámico en un equipo Microflex Bruker Daltonics.

Tabla 2.1: Gradiente de elución cromatográfica en FR-HPLC para heveína

Minutos	Acetonitrilo (%)
0-5	8
5-8	12
8-28	35
28-35	100
35-39	8

2.4. Purificación de anticuerpos IgG de individuos sanos y alérgicos

Los anticuerpos humanos se purificaron directamente del suero de un individuo sano y de uno alérgico (Tabla. 2.2). Los sueros fueron obtenidos y manipulados mediante un protocolo aprobado por el comité de ética del Instituto Nacional de Pediatría. Se dializaron durante una noche en un amortiguador de unión (Na_3PO_4 100 mM, NaCl 150 mM, pH 7.2). Los anticuerpos se purificaron por cromatografía de afinidad con una columna de proteína A con afinidad a IgG (GE-Healthcare). La columna fue equilibrada con el amortiguador de unión y la fracción retenida se eluyó con 200 mM de glicina pH 3.5, las eluciones de la columna se recolectaron en tubos con Tris 1M para neutralizar el pH. Después se concentraron y dializaron contra el amortiguador para RMN (Na_2HPO_4 150 mM, pH 6.8, 10 % D_2O). La proteína A tiene la capacidad de unir únicamente tres de las cuatro subclases de IgG (IgG1, IgG2 y IgG4), entre ellas la IgG4 la cual hemos descrito como una subclase que se ha relacionado con la parasitosis y alergia, sin tener conocimiento aún de su función. Sin embargo, si fuera el caso de que la IgG4 fuera la responsable de neutralizar a los

alérgenos, esta subclase se enriqueció del 3 % al 5 % de total de los anticuerpos. La concentración estimada para la interacción alérgeno-IgG en los estudios de RMN se estimó por ELISA.

Tabla 2.2: Individuos donantes de suero

Paciente	Genero	Edad (años)	Intervenciones quirúrgicas	Contacto con alérgenos
Sano	Masculino	20-30	Sí	Sí
Alérgico	Femenino	20-30	Sí	Sí

2.5. Obtención de espectros de RMN $^1\text{H}^1\text{H}$ bidimensionales de hev, rhev y rhevAA

Se obtuvieron los espectros de resonancia magnética nuclear de protón en un equipo Varian Inova de 500 Mhz con una sonda de detección indirecta de tres núcleos (HCN) de 3 mm. Las muestras se disolvieron en un amortiguador de 150 mM Na_2HPO_4 , pH 6.8 con 10 % D_2O a 25°C. Se obtuvieron los espectros monodimensionales ^1H y bidimensionales $^1\text{H}^1\text{H}$ TOCSY y NOESY. El espectro TOCSY se obtuvo con un tiempo de mezclado de 70 ms y el espectro NOESY a 300 ms (Apéndice B). Para obtener los espectros se prepararon 270 μL de una disolución 10 mg/mL (aprox. 2.1 mM) de proteína.

2.6. Obtención de espectros TOCSY de hev en complejo con IgGs

Los espectros del complejo con anticuerpos IgG sólo fueron obtenidos para heveína natural. Primero, se obtuvo el espectro TOCSY para hev libre, después se procedió a la obtención del espectro TOCSY del complejo, para ello se tituló a la heveína dentro del espectrómetro con los anticuerpos IgGs, y se obtuvieron únicamente los

espectros monodimensionales de ^1H . Donde se observó una perturbación evidente se adquirió el espectro TOCSY. Los experimentos se procesaron con los mismos parámetros. Para llevar a cabo el análisis de los datos se restaron los espectros normalizados de la heveína libre y heveína en complejo con anticuerpos utilizando el software addNMR (NMRPipe). La masa aproximada de la heveína (4.7 kDa) corresponde a el 3 % de una IgG (150 kDa), por lo que podemos aproximar el experimento al caso de la interacción de una macromolécula con un ligando³².

2.7. Asignación de los desplazamientos químicos

Las señales de los espectros TOCSY y NOESY se asignaron de acuerdo con el método de Würtrich³⁶ y se compararon con las asignaciones reportadas por Andersen y Asensio respectivamente^{5,6}, quienes obtuvieron los espectros en otras condiciones. Los espectros de la heveína nativa fueron procesados en el software NMRPipe, las señales fueron asignadas en el programa CARA-NEASY.

Cálculo de estructuras

El cálculo de estructuras de la heveína se realizó con el software Atnos-Candid-Cyana a partir de las asignaciones de los aminoácidos y de las integrales de los picos del espectro NOESY de hev.

Capítulo 3

Resultados y Análisis

En este trabajo se empleó la RMN para identificar posibles epítomos conformacionales de heveína en presencia de anticuerpos IgG como modelo, utilizando las mismas restricciones empleadas para estudios de interacción proteína-ligante. La metodología usada se adaptó de trabajos en los cuales se estudian las interacciones de proteínas con ligantes de bajo peso molecular³⁷⁻³⁹. Dado el tamaño de la heveína y su proporción con el peso de un anticuerpo se utilizaron varias aproximaciones para el estudio de la interacción.

La heveína es un alérgeno reconocido por la mayoría de pacientes atópicos al látex (resultados de este grupo de trabajo, no publicados). Esta proteína tiene una alta solubilidad en agua y se cree que sólo existe en su forma monomérica y no hay ninguna evidencia que indique otro estado de oligomerización. Por lo tanto, ésta debe poseer al menos dos epítomos para ser reconocido por las IgEs ancladas a la membrana de las células mieloides (Apéndice A).

En un principio la búsqueda de los epítomos de heveína fue indirecto, a través de péptidos sintéticos. Ésto debido a que la expresión de proteínas de defensa de plantas como la heveína en sistemas heterólogos de bacteria presenta desventajas como un bajo rendimiento y problemas como un mal plegamiento. Lo anterior provocó que los grupos que no tenían acceso a la heveína natural del látex no comprobaran el plegamiento y aunado a esto, algunos, ni siquiera tomaron en cuenta a los

aminoácidos expuestos^{8-10,27}. Nuestro grupo de trabajo realizó el primer estudio en el que se propuso la existencia de un epítipo conformacional para heveína, éste se basó en la oxidación selectiva de los triptofanos 21 y 23 para demostrar que éstos estaban involucrados en el reconocimiento por las IgEs; sin embargo, los cambios conformacionales y la pureza de la mezcla de los productos no fue descrita¹⁹.

Este es el primer estudio de la interacción de un alérgeno como heveína con anticuerpos en disolución²⁴. Además, esta es la primera ocasión en la cual se utiliza técnicas estructurales como RMN para la búsqueda de epítipos en México.

3.1. Purificación de heveína natural (hev)

La heveína natural se precipitó al 100% de sulfato de amonio junto con otras proteínas cargadas al pH al cual se realizó la extracción. Esta fracción está enriquecida con heveína en más del 90% (datos no mostrados). El filtrado de esta fracción, con un peso relativo entre 3.5 y 10 kDa se purificó por cromatografía de FR-HPLC.

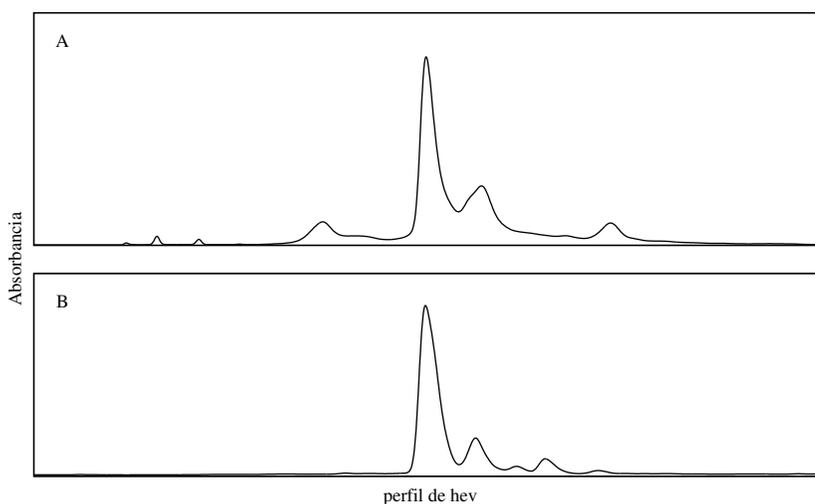


Figura 3.1: Purificación de heveína natural (hev). Perfiles cromatográficos de heveína del mismo extracto en la columna (A) Ultrasphere Beckman y (B) Purosphere Merck.

El perfil cromatográfico demuestra la separación de la heveína (pico mayoritario) de otras proteínas de bajo peso, algunas de ellas isoformas de heveína (Fig. 3.1). Ambos perfiles fueron medidos a una longitud de onda de 280 nm y eluidos isocráticamente con 13 % de acetonitrilo (Capítulo 2.1). Se trataron de eliminar las trazas de muy difícil separación, ya que éstas han causado diversos problemas en la calidad de datos estructurales de reportes anteriores de difracción de rayos X y RMN^{4,5}. Se purificó la heveína por duplicado primero con un método cromatográfico isocrático seguido de un gradiente optimizado (Capítulo 2.3) en la columna Ultrasphere para obtener una pureza cromatográfica mayor al 99 % (datos no mostrados). Ésto último nos da la certeza de que en nuestro estudio no habrá ninguna impureza que pueda tener algún efecto sobre la interacción de la heveína con los anticuerpos.

3.2. Purificación de heveína recombinante (rhev)

La heveína de fusión recombinante se obtuvo de la sonicación del paquete celular después de 14 horas de inducción. La figura 3.2 muestra la cinética de expresión después de la inducción a DO 0.7 a 30 °C, en la cual se observa una banda sobre el marcador de 21.5 kDa, que es congruente con el peso esperado de la proteína de fusión de 22.4 kDa. Toda la fracción soluble en el amortiguador de lisis se purificó

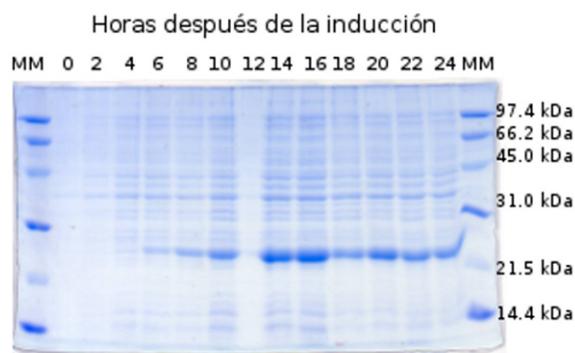


Figura 3.2: Cinética de expresión de rhev. Gel de SDS-PAGE al 15 % donde se observa la cinética de expresión de la proteína de fusión Trx1-AM₅GM-rhev.

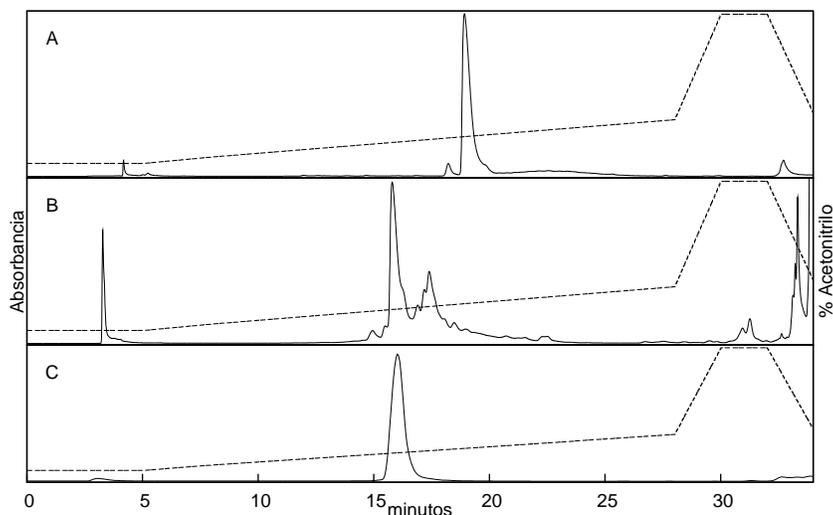


Figura 3.3: (A) Purificación de AMG₅M-rhev. (B) Mezcla de reacción de AMG₅M-rhev con CNBr después de una noche en oscuridad a temperatura ambiente. (C) rhev pura.

por la columna de HiTrap y se dializó contra agua para realizar el corte con Ekmax. El corte con Ekmax se purificó por FR-HPLC, y la proteína de fusión AMG₅M-rhev se hizo reaccionar con CNBr en 50 % TFA durante una noche en oscuridad a temperatura ambiente, y así hidrolizar al carboxilo de la metionina. Después de esto, la mezcla se purificó con el gradiente optimizado (Fig. 3.3). La proteína rhev pura se liofilizó para llevar a cabo las siguientes pruebas.

3.3. Caracterización de heveína natural y recombinante

La caracterización de los alérgenos natural y recombinante se llevó a cabo a través de su perfil cromatográfico por FR-HPLC y la obtención de su masa molecular promedio por MALDI-TOF. La cromatografía de FR-HPLC con una columna C18 es la técnica más sensible para caracterizar las propiedades hidrofóbicas de una molécula. Por lo tanto, se podría tener la certeza de que esta técnica podría separar péptidos muy parecidos, con algunas diferencias en grupos químicos. Las masas

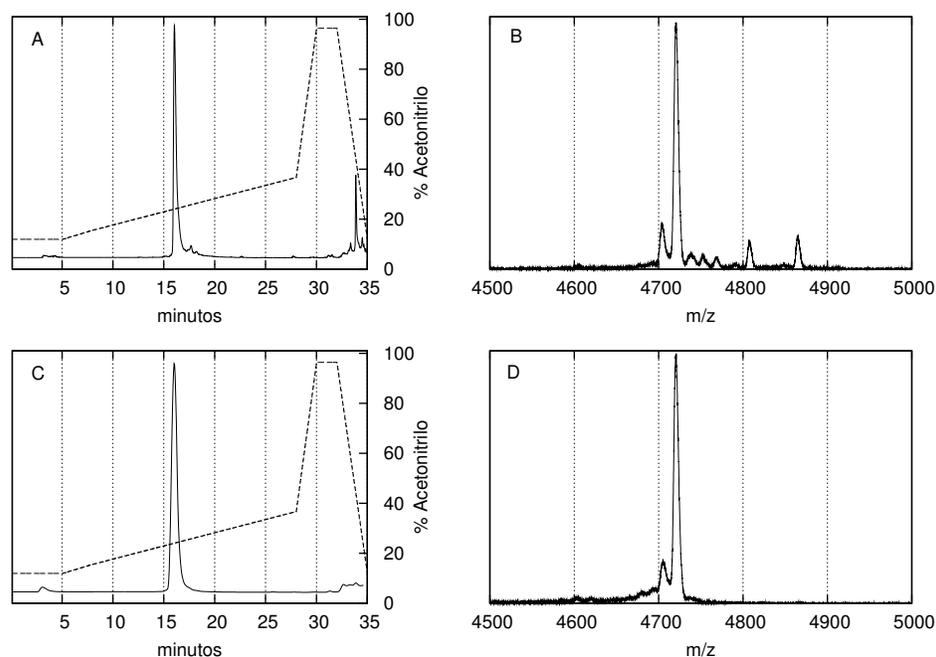


Figura 3.4: Caracterización de hev y rhev. (A) El cromatograma de fase reversa de una fracción de heveína nativa pura. (B) Espectro de masas de heveína, su masa molecular en este experimento corresponde a 4,719 Da, en la figura se llegan a observar sus isoformas. (C) Perfil cromatográfico de rhev pura. (D) La masa promedio de rhev corresponde a la misma masa observada para la heveína nativa.

moleculares de ambas proteínas corresponden a 4,719 Da; sin embargo, el espectro no fue calibrado con otras proteínas de mayor y menor tamaño; no obstante, la superposición demuestra que corresponden a la misma masa (Figura 3.4).

En la figura 3.5 se observa para (A) Coelución de hev con rhev, en donde se observa que ambas eluyen al mismo tiempo de retención, también está representada con una flecha un hombro de lo que podría ser un subproducto parcialmente hidrolizado de la reacción de hidrólisis en condiciones ácidas, en (B) se superponen los espectros de espectrometría de masas donde se demuestra la misma masa para ambas proteínas. Cabe resaltar que un estudio de nuestro grupo detalla la purificación de una isoforma de heveína con la mutación Asn15Asp proveniente del látex²⁸, por lo que creemos que las condiciones ácidas de hidrólisis con CNBr podrían acelerar la desaminación

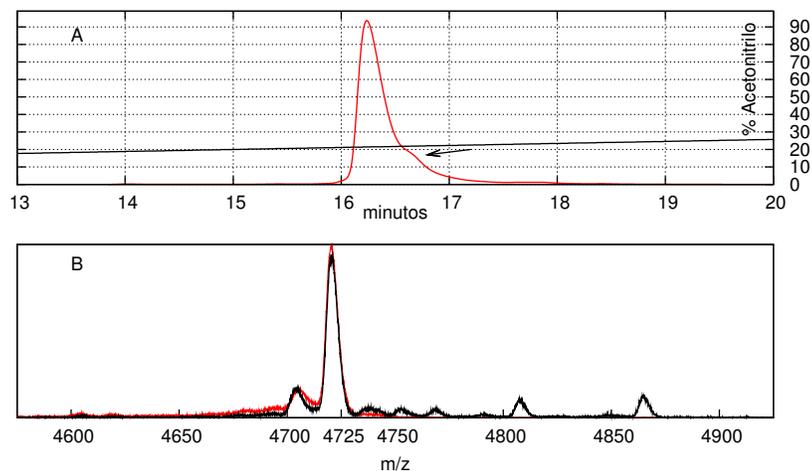


Figura 3.5: (A) Cromatograma de una mezcla de hev y rhev. La flecha muestra un hombro sobre el pico de coelución. (B) Superposición de los espectros de masas de MALDI-TOF para hev (negro) y rhev (rojo).

de amidas de asparaginas y más aun favorecer la desaminación de otras amidas de cadena lateral. Posteriormente se podría probar la hidrólisis en un ambiente menos drástico cambiando condiciones de acidez y concentración de CNBr.

3.4. Resultados de RMN

Entre los objetivos de este trabajo se trataban de asignar las señales de los desplazamientos químicos del complejo IgG-heveína, con tales asignaciones se pudieron determinar las regiones de la heveína involucradas en la interacción con anticuerpos. Para el desarrollo de este objetivo se obtuvieron los espectros de heveína libre y heveína en complejo con anticuerpos en las mismas condiciones para facilitar su procesamiento.

3.4.1. Espectros de hev libre

Andersen y colaboradores reportaron en 1993 la estructura tridimensional de la heveína, en disolución usando una mezcla de H₂O/dioxano al 10 % a pH 2.4 y 6.6 y

37 °C. El experimento a pH 2.4 demostró que hay una región cercana al carboxilo terminal en la cual se encuentran hidrógenos de la cadena principal que tienen intercambio de protones con el medio, por lo que estas señales no se encuentran presentes a pH mayor. En 1995 Asensio y cols. reportaron la interacción de heveína con quitobiosa, utilizando también técnicas de RMN y como disolvente H₂O/D₂O 85:15, pH 5.6 a 30 °C. En nuestro estudio, mimetizamos la disolución usada en pruebas inmunológicas. En el análisis de nuestros resultados se demuestra que hay variaciones en el desplazamiento químico de varios aminoácidos de la heveína, lo cual se esperaba con el cambio de pH.

Los desplazamientos químicos promedio de la cadena principal de todos los

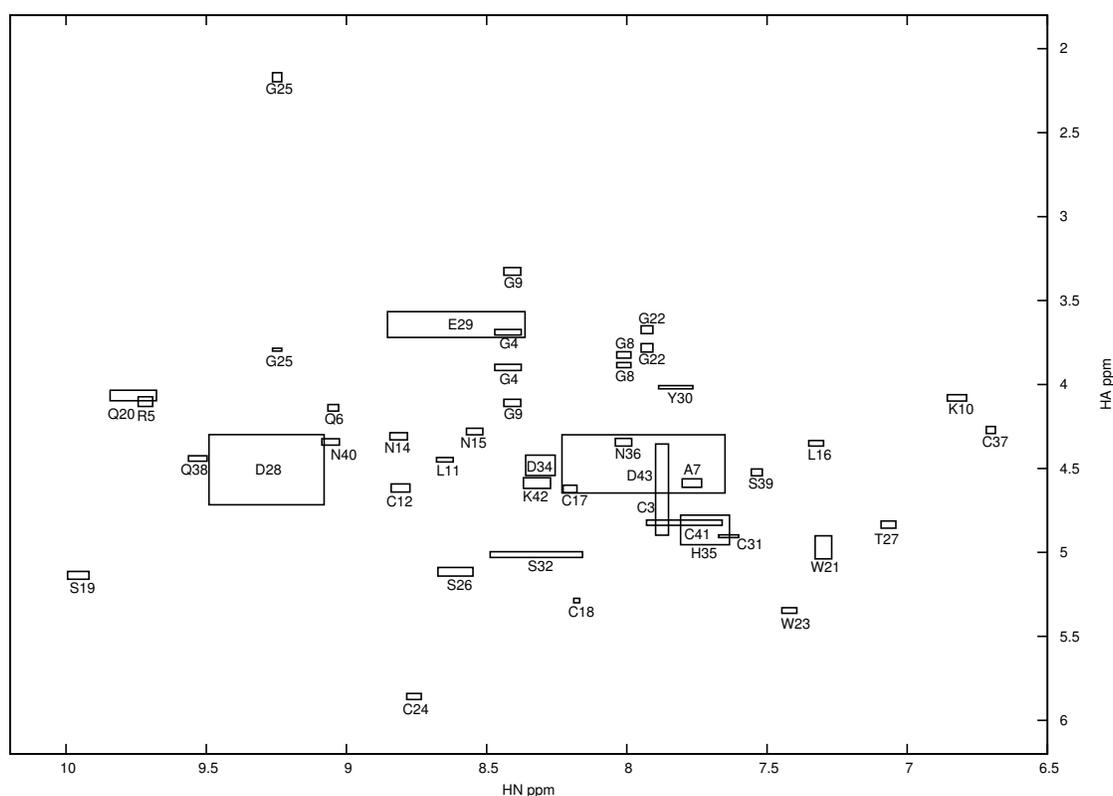


Figura 3.6: Estadística de los desplazamientos químicos de cadena principal de heveína. Los cuadros representan la desviación estándar poblacional para (x, y) . El centro del cuadro representa el δ promedio de los picos de cruce de HN con HA de todos los reportes de RMN de heveína.

reportes de heveína nos indican que la cadena principal de heveína es idéntica en todos los estudios (Fig. 3.6). Los cuadros representan la desviación estándar del desplazamiento químico de los hidrógenos de la cadena principal HN (x) y HA (y). Se puede observar que la cadena principal es significativamente idéntica en todos los reportes; sin embargo, los aminoácidos D28, E29 y D43 sufren cambios en función del pH. Para el caso de D28, sólo hay dos desplazamientos reportados Andersen (pH 2.4) y Asensio (pH 5.6). Lo cual es de esperarse por tratarse de residuos ácidos que se encuentran en la superficie de la proteína. En este trabajo se logró asignar el 86 % de las señales.

3.4.2. Espectros de rhev libre

Después de la expresión de la proteína de fusión Trx-EK-AM5GM-rhev a catorce horas de inducción se procedió a hidrolizar con Ekmax y CNBr (Fig. 3.2, 3.3). Sin embargo, después del corte con enterocinasa y de las pruebas cromatográficas realizadas, la cantidad de rhev obtenida para la caracterización no fue suficiente para una obtención de espectros de RMN a pH fisiológico. Por lo tanto, se optó por obtener espectros de RMN en H₂O/D₂O 93:7, en un medio más ácido que el utilizado para la interacción con anticuerpos para mejorar así la calidad de las señales. En la región de los picos de cruce de los hidrógenos de amida de la cadena principal, con su respectiva cadena lateral (Fig. 3.7). En la imagen se muestra un espectro TOCSY de heveína recombinante (rojo) superpuesto en un espectro de heveína nativa (negro). Las pequeñas diferencias en la superposición encontradas son debidas a la sensibilidad de heveína al pH en el carboxilo terminal. La sensibilidad al pH encontrada en este trabajo concuerda con descripciones hechas anteriormente en la determinación de la estructura de heveína por RMN⁵.

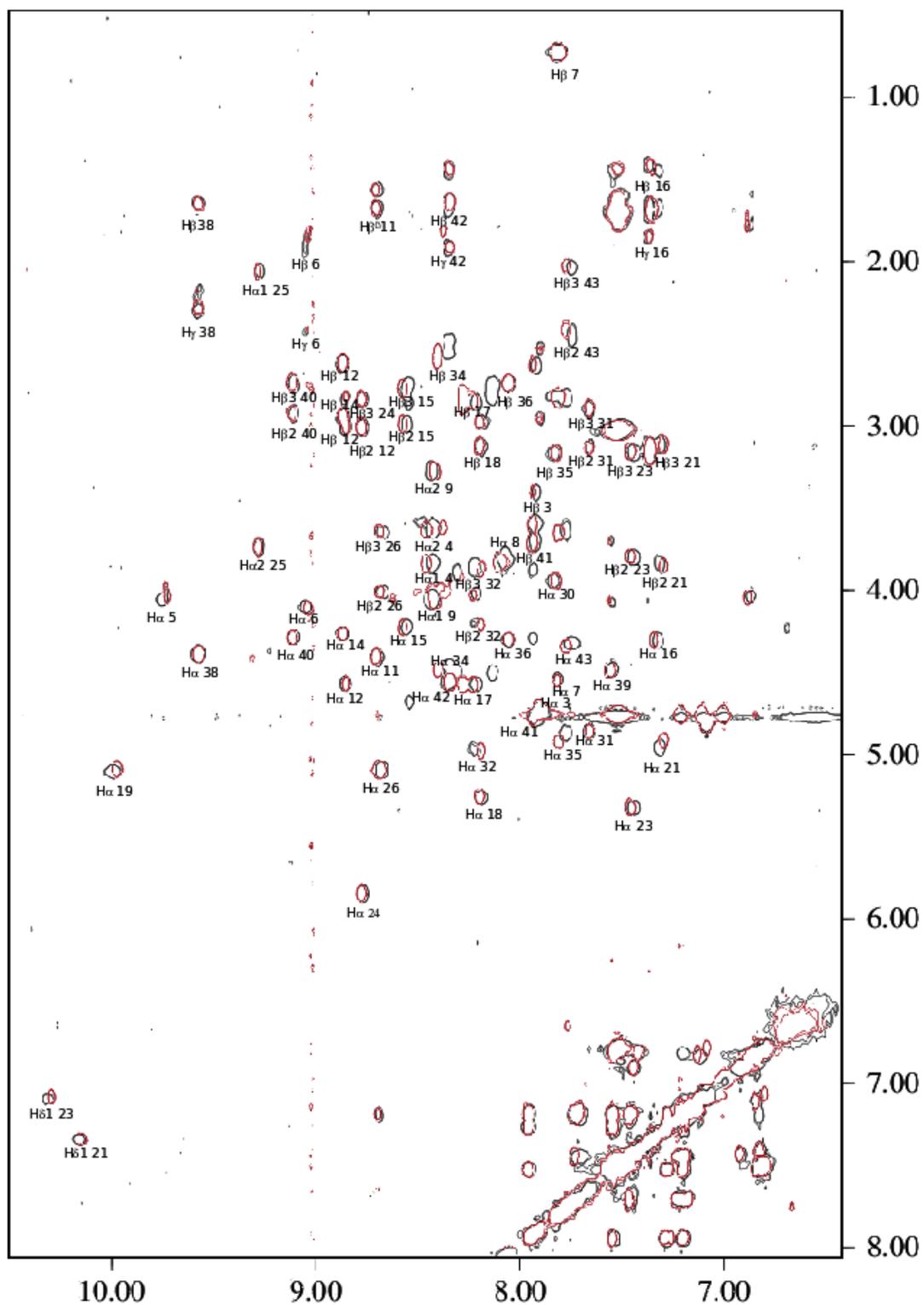


Figura 3.7: Espectros TOCSY de hev y rhev. Superposición de espectros TOCSY de hev (negro) y rhev (rojo). Los datos fueron adquiridos en H₂O/D₂O 95:5.

Además, se obtuvo un alérgeno recombinante enriquecido con ^{13}C y ^{15}N rhevE, se purificó y se adquirió un espectro bidimensional $^1\text{H}^{13}\text{N}$ -HSQC (Apéndice C). La proteína rhevE contiene un péptido residual en el amino terminal **AMDDDDK**. En un trabajo paralelo realizado por nuestro grupo se demostró que esta región cambia sustantivamente el reconocimiento con sueros de pacientes alérgicos en pruebas de ELISA (resultados no mostrados, tesis de maestría de Lissete Valenzuela). Dado que la construcción contiene este fragmento se podrán asignar señales de ésta molécula para tener un antecedente al obtener los espectros de la proteína enriquecida de la construcción AM5GM-rhev.

3.5. Espectros de hev en complejo con IgGs

Se obtuvieron los espectros de ^1H de la adición de anticuerpos en una muestra de heveína (datos no mostrados). En el espectro monodimensional donde se apreció una modificación evidente de las señales, fue la base para proceder a realizar la adquisición del espectro bidimensional $^1\text{H}^1\text{H}$ TOCSY.

En este trabajo se realizó un análisis basado en la modificación del desplazamiento químico (**MDQ**) de los átomos de hidrógeno del alérgeno que fueron perturbados por la adición de IgG, nuestro interés es sólo en el epítipo del alérgeno, ya que la titulación comenzó con una relación 1:1000 (anticuerpo-heveína) y la relación usa-

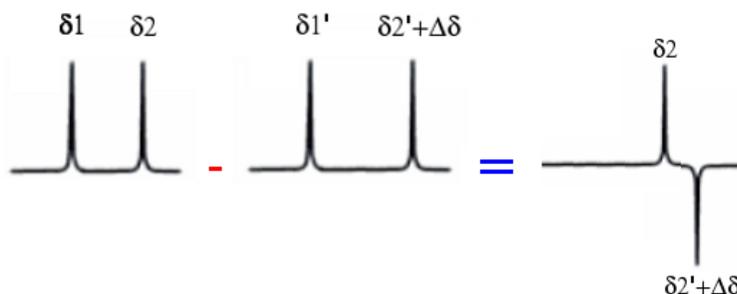


Figura 3.8: Las señales del espectro del complejo son restadas del experimento de la proteína libre. Las señales que no varían en su desplazamiento son anuladas.

da para obtener el espectro TOCSY fue de 1:500 para el caso del paciente sano. En estas condiciones las señales de anticuerpo se encuentran a nivel de ruido, lo que nos facilita el análisis de la MDQ de heveína.

Los espectros bidimensionales TOCSY fueron adquiridos en las mismas condicio-

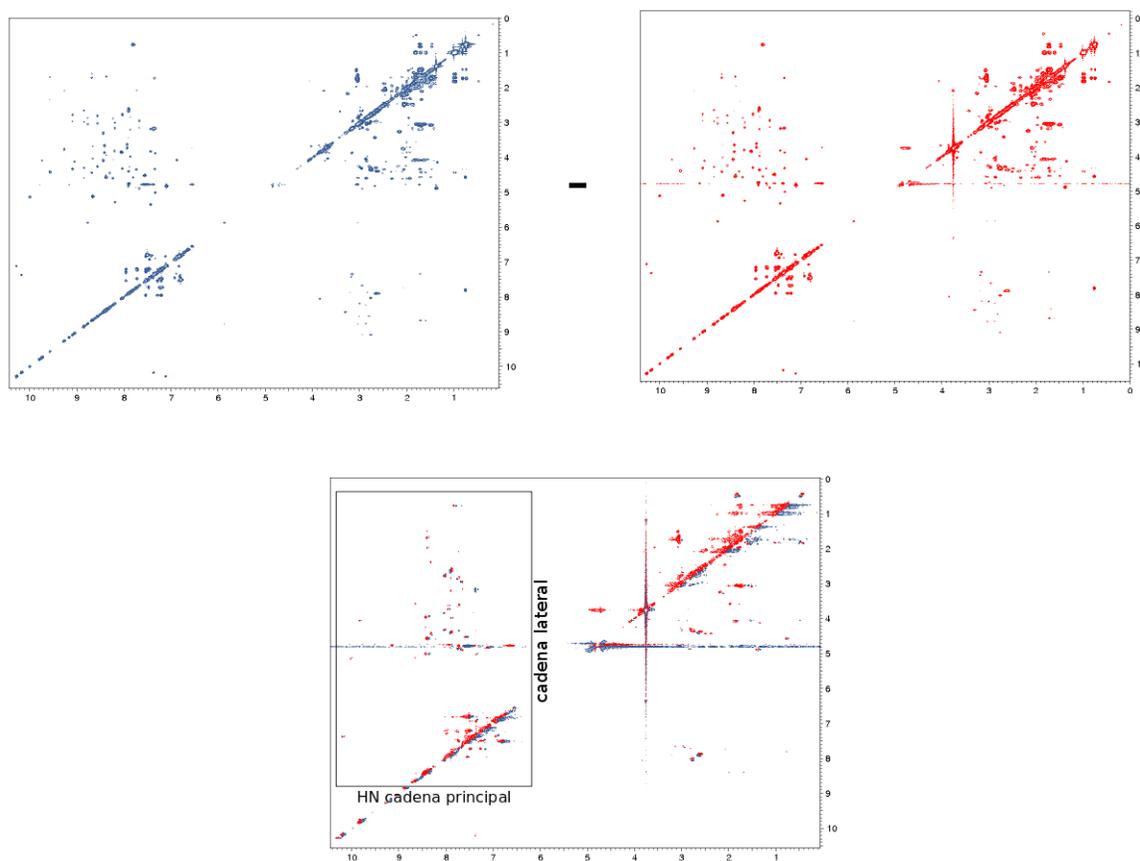


Figura 3.9: Resta de los espectros TOCSY (hev - hev+IgGs). Arriba: Se representa la substracción de los espectros TOCSY de heveína libre menos la heveína en complejo con IgGs. Abajo: Se representa el resultado de la resta, los desplazamientos químicos modificados se conservan en pares con magnitudes positiva (azul) y negativa (rojo).

nes y procesados con los mismo parámetros, tanto para heveína libre como para heveína con IgG.

Los resultados obtenidos se deben a que los átomos perturbados modificaron su desplazamiento químico a causa de la interacción, estos átomos se conservan en una resta y los que no fueron perturbados son anulados (Figura 3.8). Las señales que se

encuentran en pares positivo y negativo fueron analizadas, así también se tomaron en cuenta las señales que desaparecieron después de la adición, es decir, las que se mantienen como señales únicas positivas después de la resta.

La resta de un espectro TOCSY completo está esquematizada en la figura 3.9. Se analizó la región de picos de cruce marcada, la cual corresponde a los hidrógenos de amida de la cadena principal correlacionando con su cadena lateral.

IgG de pacientes sanos

Las asignaciones de las señales se realizaron en el espectro TOCSY de heveína libre y se compararon con las señales TOCSY del espectro del complejo.

El espectro de diferencias se generó a partir de los espectros en donde las señales modificadas se convirtieron a negativas y se conservaron (Fig. 3.9). Las señales obtenidas corresponden a protones de varios aminoácidos expuestos en una región localizada de la heveína (Fig. 3.10). El análisis de las señales demostró que tal región está cercana al carboxilo terminal y sufrió modificaciones en los desplazamientos químicos debidas a la adición de los anticuerpos IgGs de individuo sano. Dicha región esta conformada por varias secuencias de aminoácidos: R5, 19-SQWG-22, 30-YCSPDHN-36, C41K42. Aunque estas secuencias no son continuas, todos estos aminoácidos están cercanos en el espacio en la estructuras resueltas por difracción de rayos X (Fig. 3.12). Este análisis indica que una población de anticuerpos IgG de un paciente sano reconoce a heveína y probablemente es capaz de reconocerla y neutralizarla *in vivo* en este individuo.

Por tal motivo, se tiene evidencia de que existe una población de anticuerpos policlonales con especificidad hacia una región de heveína. Y esta población sólo reconoce ciertos aminoácidos localizados. Lo que significa que la región determinada es un sitio antigénico para un paciente sano.

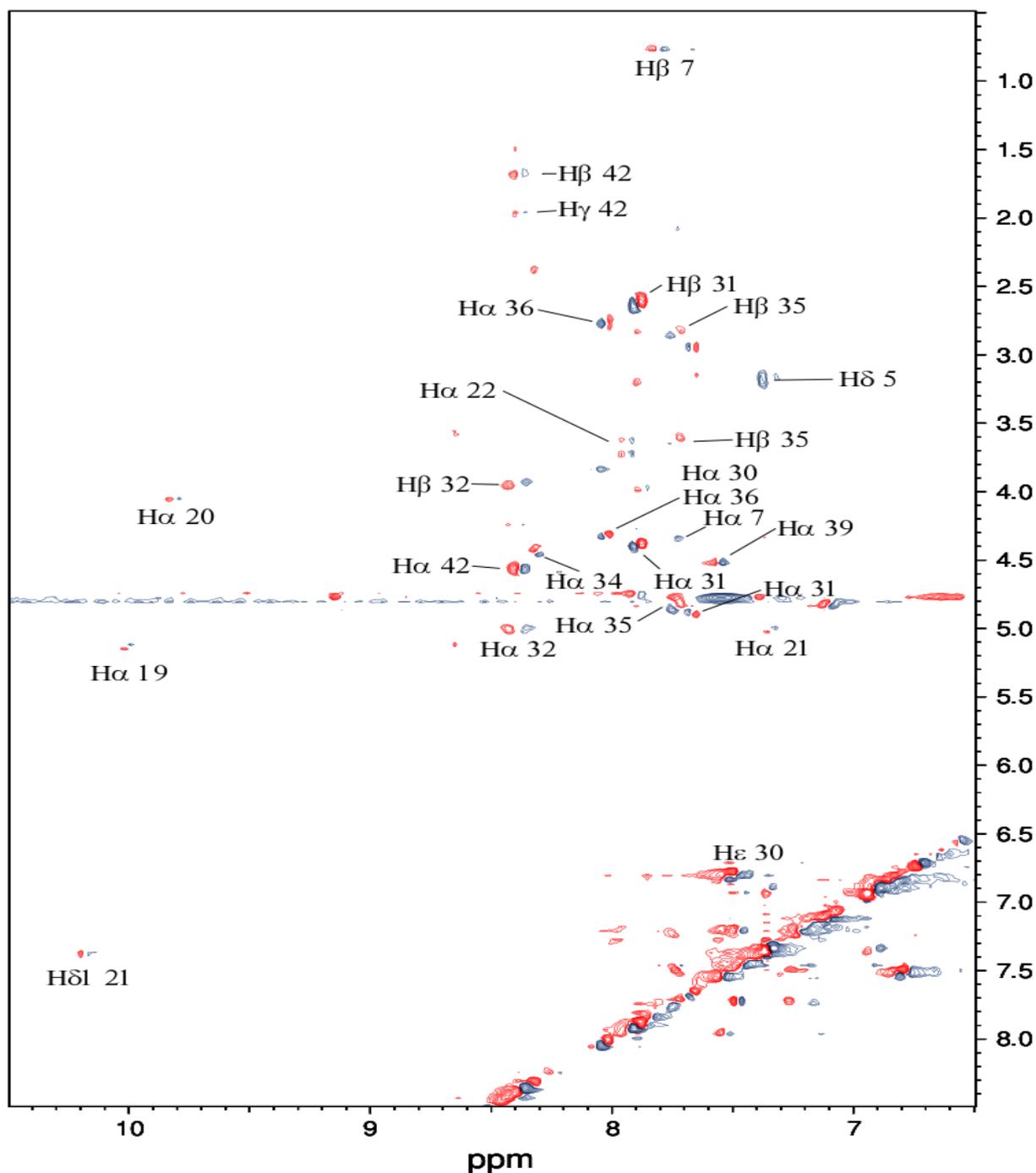


Figura 3.10: Espectro de diferencias de interacción de heveína con IgGs de individuo sano. Representación de las señales en curvas de niveles. Los átomos de heveína que sufrieron modificación en el desplazamiento químico por la interacción de IgGs se mantienen después de la resta (pares azul-rojo). Los anticuerpos se encuentran en una proporción ínfima y sus señales se encuentran a nivel ruido.

Cabe resaltar que el individuo sano, tuvo contacto con alérgenos del látex antes de la toma de muestra del suero, por lo que está inmunizado. Es decir, su organismo debe haber reconocido el alérgeno en exposiciones anteriores. Produciendo anticuerpos IgG para neutralizarlo como si fuera una toxina en el organismo. Esta reacción se presenta en todos los individuos, ya sean sanos o alérgicos; sin embargo, una evidencia de la patología es que en los individuos alérgicos las IgGs producidas no son suficientemente afines para neutralizar a los alérgenos. Durante la obtención de los experimentos se tuvieron diversos contratiempos, el más relevante se refiere a la adición de los anticuerpos al tubo de resonancia. En donde se observó que el anticuerpo contenía residuos del amortiguador de unión debido a una diálisis incompleta en el amortiguador de RMN, esto provocó la generación de una interferencia en una región del espectro cercana a 3.8 ppm, la cual contiene señales de la cadena lateral de los aminoácidos.

IgG de pacientes alérgicos

El experimento de interacción con anticuerpos IgG de un individuo alérgico se realizó en las mismas condiciones que el sano. La MDQ de los aminoácidos provocada por los anticuerpos IgGs del individuo alérgico fue distinta a la mostrada por las IgGs del sano. Para este caso se observan modificaciones en más señales del espectro de diferencias (Fig. 3.11). Los aminoácidos que sufrieron MDQ a causa de la interacción se corresponden a: G4R5, 7-AGGK-10, C12, 17-CCSQWGWCGS-26, Y30C31, 37-CQS-39 y K42 (Fig. 3.12).

En contraste con el caso del individuo sano, en el alérgico también se presentaron MDQ en una región localizada del alérgeno. Sin embargo, en este caso se presentaron modificaciones en átomos de aminoácidos centrales de la proteína que no están expuestos, principalmente seis de las ocho cisteínas que forman el arreglo de puentes disulfuro del dominio de lectina.

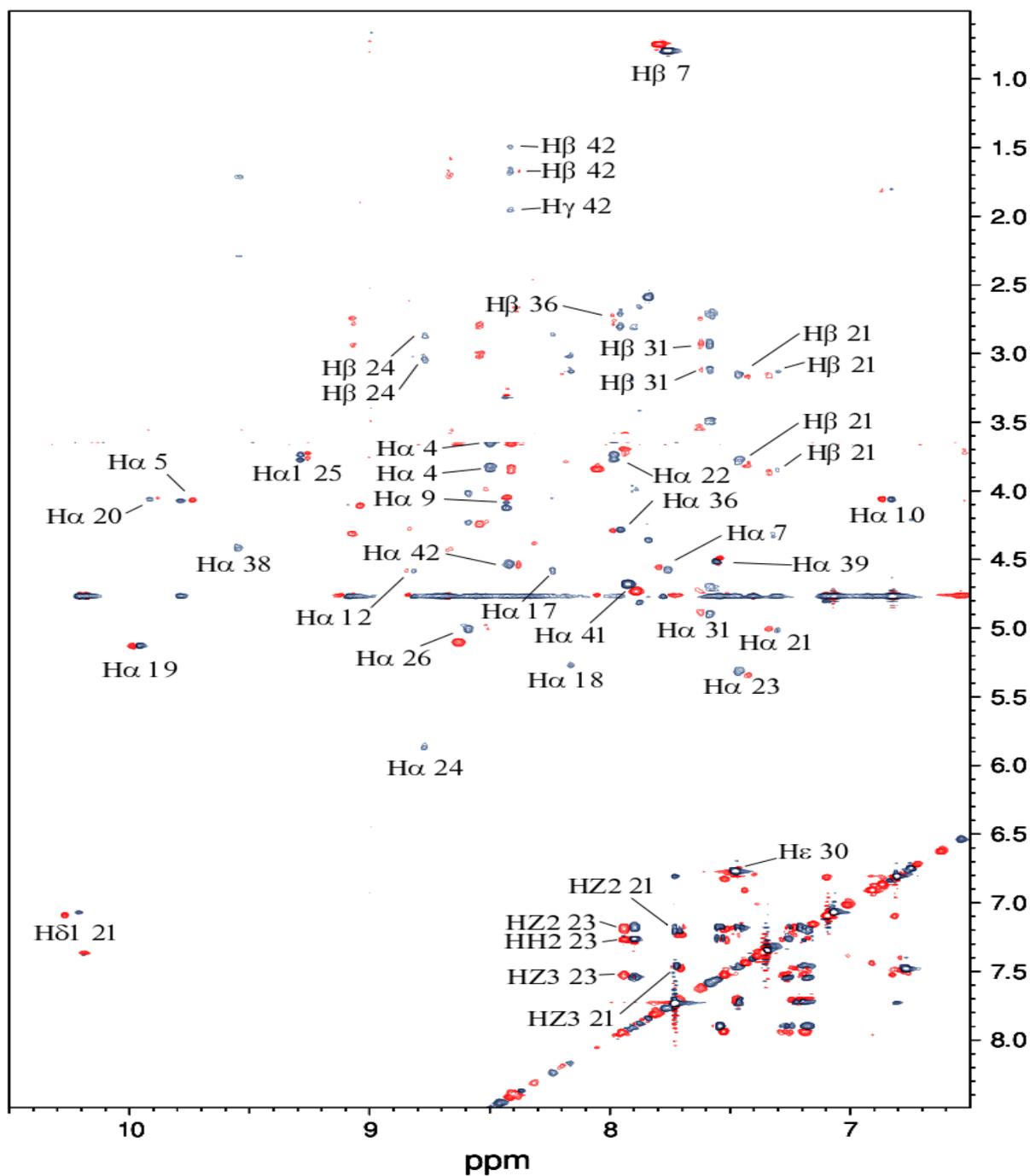


Figura 3.11: Espectro de diferencias de la interacción de heveína con IgGs del individuo alérgico. Representación de las señales en curvas de niveles. Los átomos de heveína que sufrieron modificación en el desplazamiento químico por la interacción de IgGs se mantienen después de la resta (pares azul-rojo). Los anticuerpos se encuentran en una proporción ínfima y sus señales se encuentran a nivel ruido.

Se tiene evidencia de que esto fue debido a un cambio conformacional que involucra a la cisteína 3 (C3) y que repercute en otros aminoácidos del núcleo proteico.

Aún con las MDQ presentadas por aminoácidos centrales, el análisis se basó en los aminoácidos que están expuestos. Por lo cual se realizó una discriminación entre los desplazamientos químicos modificados de las señales de aminoácidos internos y expuestos (Capítulo 3.6). Esto con el fin de representar una región expuesta como el caso más ideal, y así fuera comparable a la representación creada para el caso del individuo sano. Además, parte del núcleo de puentes disulfuro tuvo variaciones debido a algún cambio conformacional en la superficie de la heveína. Lo que podría sugerir que la perturbación de una zona expuesta sea suficiente para generar un gran cambio conformacional, sólo por que ésta tiene aminoácidos formando puentes disulfuro.

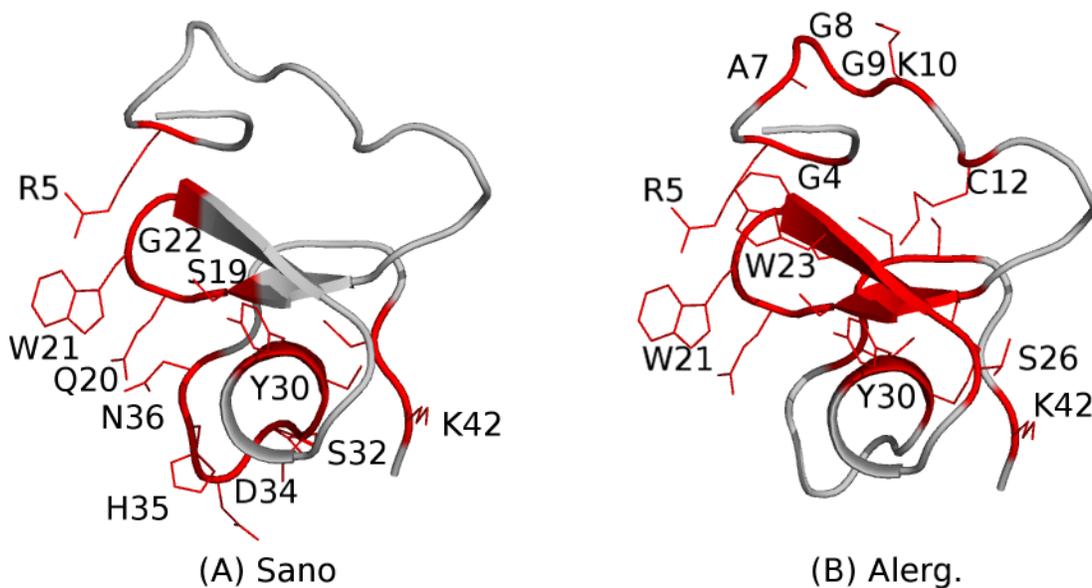


Figura 3.12: Representación de las modificaciones al desplazamiento químico por la interacción. La interacción de la heveína con IgG de individuos sano y alérgico. (A) Epítipo de IgG de paciente sano (en rojo), los aminoácidos perturbados que se encuentran en una región localizada cercana al carboxilo terminal de heveína. (B) Región de heveína que sufrió modificaciones por las IgGs del individuo alérgico, representado con el mismo código de colores.

La interacción con IgGs de pacientes alérgicos debería tener una menor especificidad por un sitio de heveína. Por lo tanto se esperaba la modificación de señales en toda la superficie de heveína, y no de una región localizada.

Cabe resaltar que la región reconocida por el individuo alérgico, tiene mucha similitud con todas las secuencias homólogas de dominios de lectina presentes en diferentes plantas. Tal vez, la especificidad mostrada hacia el amino terminal sea la responsable de que no se pueda neutralizar el alérgeno *in vivo*, así, otros anticuerpos causantes de la alergia pueden reconocer un epítopo de heveína localizado en otra región.

3.6. Análisis de los epítomos

Anteriormente varios grupos de investigación habían realizado búsquedas de epítomos de heveína con técnicas inmunológicas^{8-10,27}. En este trabajo se realizó la primera búsqueda a través de RMN para obtener la interacción en disolución de la forma nativa de la heveína con IgGs. Los resultados de investigaciones previas y los presentados en este trabajo demuestran que aún cuando la heveína es una proteína de 43 aminoácidos, la búsqueda de sus epítomos se puede tornar ambigua. En nuestro caso, el movimiento de residuos aislados puede interferir en el análisis de epítopo (Fig. 3.12), o bien es probable que efectivamente esos residuos sean parte del epítopo que le confiera selectividad, hecho que en esta tesis no estaba previsto.

La RMN es una técnica muy sensible que permite observar todos los MDQ después de la adición de anticuerpos, por lo cual pudimos identificar MDQ hasta de los aminoácidos internos de la proteína, tales como las cisteínas del núcleo que no están expuestas al disolvente (Figura 1.1). Por ello, podemos proponer que el aminoácido C3 pudo haber provocado todo el cambio conformacional del núcleo de la proteína, ya que está cercano a la zona que interaccionó correspondiente a los aminoácidos 4-GRXAGGK-10. Aunado a esto existen residuos expuestos al disolvente que son perturbados tanto por las IgG de individuo alérgico como por las de individuo sano.

Cabe mencionar que los anticuerpos purificados corresponden a 3 de las 4 subclases del isotipo IgG. Para el caso de la subclase IgG4 podría decirse que es la que tiene mayor probabilidad de interactuar con el alérgeno, ya que se ha comprobado que la expresión de esta subclase está ligada a la expresión de las IgEs, y que guardan alguna similitud biológica. En nuestro estudio hubiera sido interesante estudiar si los epítomos reconocidos por las IgGs del individuo sano son competidos por el suero total de un paciente alérgico, para conocer si el epítomo determinado para el individuo sano es competido por IgEs de un alérgico. Este dato proporcionaría avances para la obtención de proteínas hipoalérgicas u otras terapias. No obstante, se realizó un avance significativo en la determinación de zonas antigénicas de heveína para IgGs aun cuando estos anticuerpos no sean los responsables biológicos de la alergia.

Con el fin de simplificar el análisis se creó una representación de los epítomos reportados anteriormente, así como un análisis del área superficial accesible (GetArea⁴⁰, Tabla 3.2) y el epítomo encontrado en este trabajo para la interacción de IgGs de paciente sano y alérgico (Fig. 3.13).

Tabla 3.1: Comparación de los epítomos reportados de heveína y los epítomos de este trabajo.

Epítomos reportados	Tipo	Referencia
EQCGRQAGGK LCPNNLCCSQ <u>WG</u> WCGSTDEY CSPDHNCQSN CKD	Lineal	Beezhold. ⁸
EQCGRQAGGK LCPNNLCCSQ <u>WG</u> WCGSTDEY CSPDHNCQSN CKD	Lineal	Banerjee. ⁹
EQCGRQAGGK LCPNNLCCSQ <u>WG</u> WCGSTDEY CSPDHNCQSN CKD	Conformacional	Karisola. ²⁷
EQCGRQAGGK LCPNNLCCSQ <u>WG</u> WCGSTDEY CSPDHNCQSN CKD	Conformacional	Reyes-López. ^{19,28}
EQCGRQAGGK LCPNNLCCSQ <u>WG</u> WCGSTDEY CSPDHNCQSN CKD	Lineal	De Silva. ¹⁰
EQCGRQAGGK LCPNNLCCSQ <u>WG</u> WCGSTDEY CSPDHNCQSN CKN		GetArea ⁴⁰
EQCGRQAGGK LCPNNLCCSQ <u>WG</u> WCGSTDEY CSPDHNCQSN CKD	Conformacional IgG	P. sano
EQCGRQAGGK LCPNNLCCSQ <u>WG</u> WCGSTDEY CSPDHNCQSN CKD	Conformacional IgG	P. alérgico

Los aminoácidos propuestos como parte de un epítomo están subrayados. En la tabla se muestran los aminoácidos calculados con más de 50 % de exposición al solvente (GetArea).

Tabla 3.2: Análisis del área expuesta al solvente de la heveína (PDB 1Q9B).

Residuo	A. Total	A. Apolar	C. principal	C. lateral	Radio(%)	Interno/Externo
GLU 1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.0	i
GLN 2	91.51	33.50	17.77	73.74	51.3	e
CYS 3	0.00	0.00	0.00	0.00	0.0	i
GLY 4	7.35	7.35	7.35	0.00	8.4	i
ARG 5	176.90	83.45	31.09	145.81	74.6	e
GLN 6	72.37	45.30	36.21	36.16	25.2	
ALA 7	26.82	25.62	15.50	11.32	17.4	i
GLY 8	82.53	51.78	82.53	0.00	94.6	e
GLY 9	56.11	32.06	56.11	0.00	64.4	e
LYS 10	133.68	92.84	10.80	122.89	74.7	e
LEU 11	59.98	41.40	19.13	40.86	27.9	
CYS 12	9.60	1.57	9.55	0.05	0.0	i
PRO 13	81.10	80.29	15.75	65.35	62.1	e
ASN 14	127.82	32.85	25.94	101.87	89.1	e
ASN 15	121.76	26.23	17.11	104.66	91.6	e
LEU 16	62.33	62.31	1.61	60.73	41.5	
CYS 17	4.47	0.00	0.00	4.47	4.4	i
CYS 18	0.00	0.00	0.00	0.00	0.0	i
SER 19	5.97	5.31	0.00	5.97	7.7	i
GLN 20	43.38	7.54	1.96	41.42	28.8	
TRP 21	170.27	154.30	5.56	164.71	73.3	e
GLY 22	0.00	0.00	0.00	0.00	0.0	i
TRP 23	132.73	120.51	0.00	132.73	59.1	e
CYS 24	27.92	6.20	17.35	10.56	10.3	i
GLY 25	12.92	12.92	12.92	0.00	14.8	i
SER 26	54.99	48.89	6.67	48.31	62.4	e
THR 27	93.81	88.48	7.01	86.80	81.7	e
ASP 28	100.75	22.33	2.20	98.55	87.2	e
GLU 29	47.81	45.01	2.84	44.97	31.8	
TYR 30	65.61	26.04	0.00	65.61	34.0	
CYS 31	0.57	0.57	0.00	0.57	0.6	i
SER 32	19.79	8.92	1.26	18.54	23.9	
PRO 33	72.93	60.58	16.34	56.58	53.8	e
ASP 34	132.15	33.97	31.38	100.76	89.2	e
HIS 35	76.83	53.46	2.30	74.52	48.2	
ASN 36	93.12	27.34	10.57	82.55	72.2	e
CYS 37	17.67	0.00	17.67	0.00	0.0	i
GLN 38	58.83	25.34	33.93	24.90	17.3	i
SER 39	37.30	37.18	7.71	29.59	38.2	
ASN 40	66.30	18.45	27.53	38.77	33.9	
CYS 41	57.03	17.00	29.95	27.08	26.5	
LYS 42	119.43	86.26	11.19	108.24	65.8	e
ASP 43	183.57	43.21	52.40	131.17	100.0	e

Los aminoácidos marcados en el algoritmo como expuestos tienen más del 50 % de su área expuesta al disolvente. Estos aminoácidos fueron la base para el análisis de los posibles epítomos de heveína.

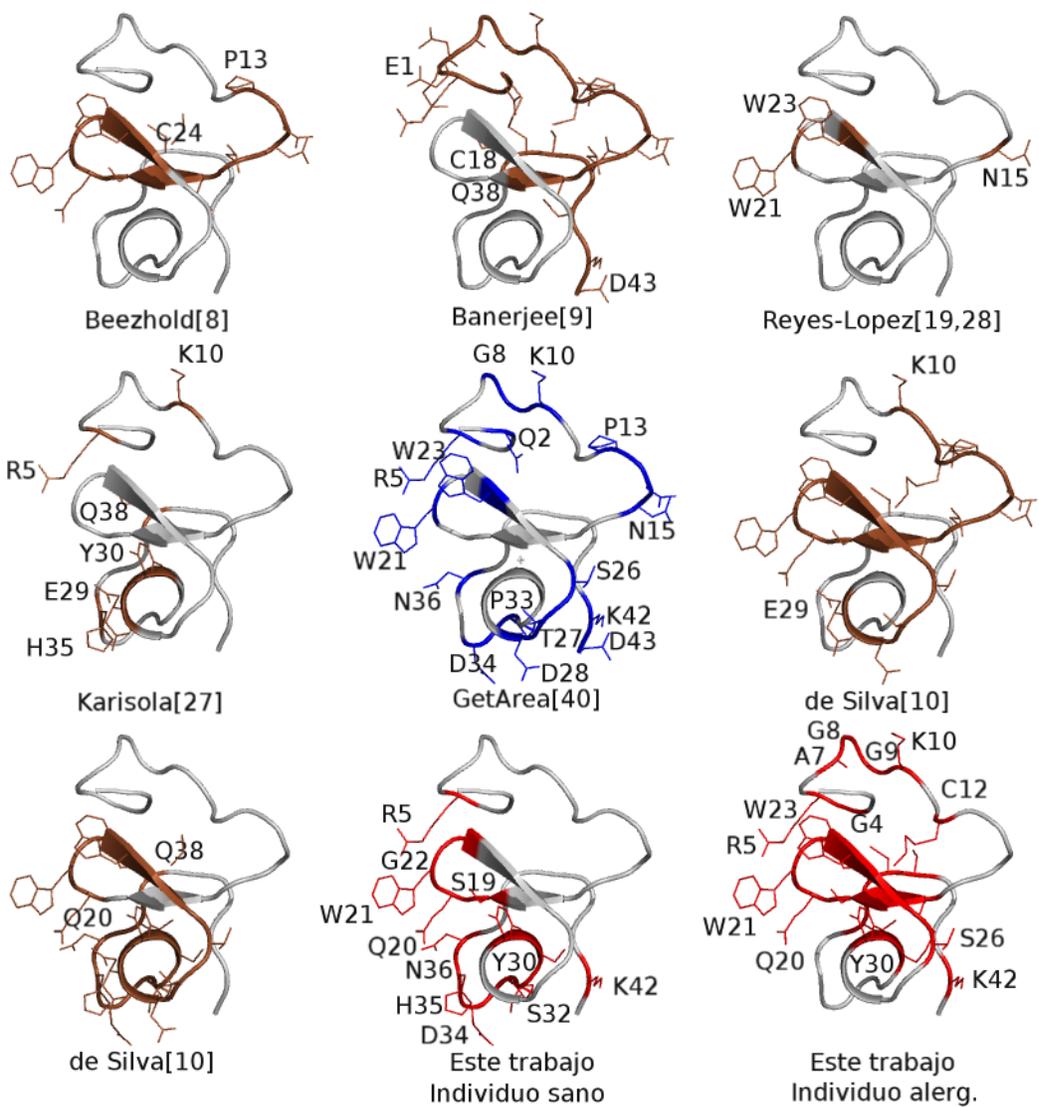


Figura 3.13: Representación de los epítomos de heveína sobre la estructura. Para los epítomos conformacionales sólo se etiquetan los residuos que están “de frente” a esta representación. Los epítomos lineales sólo están etiquetados en el primer y último aminoácido.

Tal análisis muestra que ciertos aminoácidos propuestos como parte de un epítomo lineal no están expuestos al disolvente en la estructura cristalográfica de heveína a alta resolución¹⁹. También se observa que los epítomos propuestos por nuestro grupo de trabajo son parte de la región expuesta de otros epítomos descritos.

Se han realizado varios estudios de interacción por medio de técnicas que utilizan la relajación cruzada^{32,39}, en el cual se obtiene una señal en el espectro si las moléculas interactuantes están cercanas en el espacio.

Para otros tipos de estudios inmunológicos, las muestras deben ser de pacientes inmunizados. En este caso el paciente inmunizado ideal debería ser un alérgico; sin embargo, por la dificultad de purificar IgEs procedimos a la alternativa de IgGs de un paciente sano que había tenido contacto con alérgenos. Es de esperarse que dos individuos tengan distinto reconocimiento. Pero en este trabajo se buscó dar un enfoque de estudio en función de la enfermedad. Así, las variaciones provocadas por factores como edad, raza, enfermedades previas, etc., están fuera de este análisis.

Por otra parte, un estudio completo podría ser realizado en individuos de una misma línea genética o familia (hermanos, por ejemplo). En el cual un individuo debería tener predisposición genética hacia la alergia y el otro no.

Las regiones reconocidas entre los dos individuos fueron distintas; sin embargo, hay coincidencias entre ellas. En esta técnica, se llegan a observar todas las MDQ de átomos que están involucrados en el epítipo y los vecinos cercanos de estos. A criterio del análisis de los residuos que están expuestos más de 50 % según el servidor GetArea, se discriminó a los residuos a los que en nuestro juicio si son parte de un epítipo y los que sólo sufrieron MDQ por el simple hecho de estar cercanos a un aminoácido interactuante. Los aminoácidos de la heveína modificados por la interacción de IgGs son:

- Para el individuo sano.
R5, W21, 33-PDHN-36, K42
- Para el individuo alérgico.
R5, 8-GGK-10, W21, W23, S26, K42

Conclusiones

- Los regiones de interacción encontradas en este trabajo representan el primer estudio de búsqueda de epítomos del alérgeno heveína a través de técnicas estructurales en disolución.
- Se comprobó que las IgGs policlonales son un modelo viable para el estudio de interacción de alérgenos pequeños sin enriquecer con anticuerpos libres y en disolución.
- Las regiones reconocidas por las IgGs de los dos individuos demostraron ser distintas:

Epítomos encontrados en este trabajo	
EQCGR <u>Q</u> AGGK LCPNNLCC <u>SQ</u> <u>WGW</u> CGSTDEY <u>CSPDH</u> NCQSN <u>CKD</u>	Sano
EQCGR <u>Q</u> AGGK LCPNNLCC <u>SQ</u> <u>WGW</u> CGSTDEY <u>CSPDH</u> NCQSN <u>CKD</u>	Alérgico
EQCGR <u>Q</u> AGGK LCPNNLCC <u>SQ</u> <u>WGW</u> CGSTDEY CSPDHNCQSN <u>CKN</u>	Expuestos

Las regiones que fueron perturbadas y sufrieron MDQ (rojo). Las regiones que están más de 50 % expuestas para todas las MDQ (azul).

- Se demostró que tanto las IgGs de pacientes sanos como las de alérgicos interactúan en regiones localizadas. Aunque el resultado que no era esperado, en ningún trabajo se habían descrito anticuerpos policlonales con especificidad para proteínas pequeñas.
- Los anticuerpos IgG de paciente alérgico perturbaron una zona que repercutió en un cambio conformacional del núcleo proteico.
- Los dos posibles epítomos sólo tienen una región de traslape compuesta por los aminoácidos R5, 19-SQWG-22, Y30C31, K42. De los cuales sólo

están expuestos R5, W21 y K42.

- Se logró clonar y purificar el alérgeno recombinante heveína. Se caracterizó cromatográficamente y se midió su masa molecular por MALDI-TOF. Así mismo se obtuvo su espectro de RMN y se demostró que su plegamiento era idéntico.
- Se obtuvo un alérgeno recombinante enriquecido con ^{13}C y ^{15}N , a través de la construcción EK-EK-rhev. Se estandarizó su obtención y se adquirió un espectro $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -HSQC como base para futuros trabajos con heveína.

Perspectivas

- Realizar los experimentos de competencia de IgGs contra suero total usando técnicas de ELISA. Así se podrá determinar si las IgGs del individuo sano compiten con anticuerpos del suero total de un individuo alérgico, que si contiene IgEs solubles en ínfimas cantidades.
- Realizar un estudio cuantitativo de las modificaciones del desplazamiento químico, o en su caso realizar estudio de transferencia de magnetización como STD-TOCSY, STD-HSQC, etc. Con el fin de obtener las correlaciones entre señales otro tipo de experimento para corroborar los resultados de este trabajo.
- Adquirir espectros de triple resonancia HNCA, HNCOC, HNCACO, HSQC-TOCSY, HSQC-NOESY para rhevE para determinar los desplazamientos químicos de toda su cadena, con el fin de determinar modificaciones más precisas en futuros trabajos de interacción.
- Afinar la estructura de RMN a pH 6.8 y determinar a ciencia cierta si el pH es un factor que afecta su conformación.
- Intentar obtener un anticuerpo monoclonal con afinidad a heveína con el cual se puedan realizar variaciones en los experimentos de RMN para obtener con certeza sus epítomos.

Apéndices

Apéndice A

Inmunoglobulinas y sus receptores de membrana

Las IgE pueden estar presentes en sangre o ancladas a sus receptores de membrana, los cuales están expresados en la superficie de los mastocitos y basófilos. Hasta este momento se conocen dos tipos de receptores a IgE: FcεRI y FcεRII. El primero de estos se clonó de mastocitos⁴¹; sin embargo, tiempo después se encontró que una isoforma de éste estaba presente en personas con alergias, es el caso del receptor denominado FcεRII, el cual tiene una mayor afinidad por las IgE que FcεRI y está sobreexpresado en pacientes alérgicos⁴².

En la alergia o hipersensibilidad tipo I el mecanismo general de interacción se basa en el entrecruzamiento generado por dos IgEs sobre la membrana (Fig. A.1) y para esto es necesario que dos IgEs reconozcan al menos a dos epítopos de un antígeno multivalente (alérgeno) o bien el mismo epítipo de un alérgeno en su forma de multímero. Así después del reconocimiento las regiones intracelulares de los receptores son fosforiladas en los dominios ITAM (immunoreceptor tyrosine-based activation motif) por las cinasas Lyn, las cuales forman un macrocomplejo citosólico después de que dos IgEs se aproximan⁴³. Esto finalmente conduce a la cascada de eventos que dan lugar a los síntomas de la alergia (Fig. A.2).

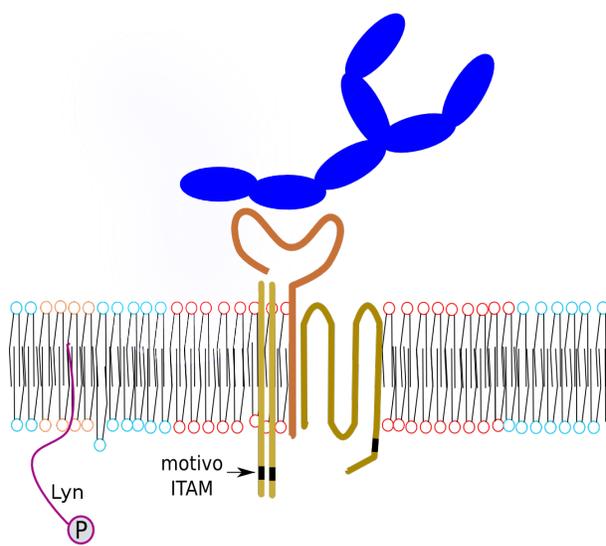


Figura A.1: Esquema de una IgE y su receptor de membrana. Las proteínas involucradas en el complejo transmembranal del FcεRI y la IgE. En otra región de la membrana se encuentra la tirosin-fosfatasa Lyn la cual interviene directamente en la fosforilación de los receptores.

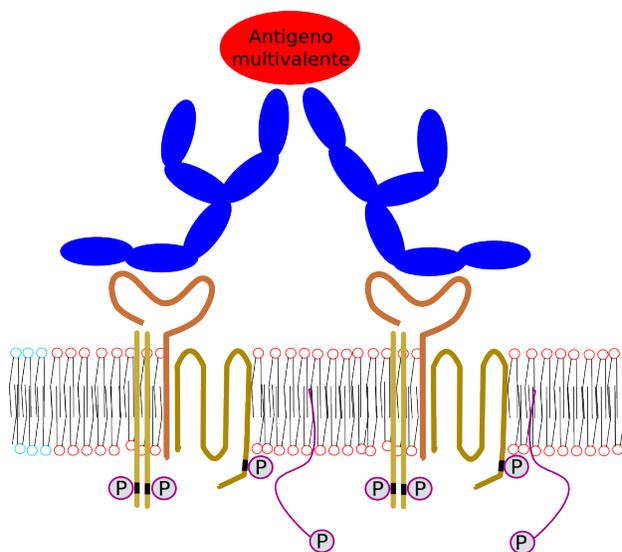


Figura A.2: Esquema del entrecruzamiento de IgEs al reconocer alérgenos. Complejo formado por las IgE al reconocer a un antígeno multivalente y la cascada de fosforilación generada por la aproximación de receptores y la cinasa Lyn.

Apéndice B

Experimentos TOCSY y NOESY

B.1. TOCSY

TOCSY (TOtal Correlation SpectroscopY) es un experimento homonuclear, generalmente utilizado para ^1H , en el cual se obtiene un espectro donde un acoplamiento entre dos espines es indicado por un pico de cruce. En el experimento TOCSY también se observan espines que están conectados a través de una *cadena continua de acoplamientos*, es decir, si el espín A está acoplado al espín B, y el espín B está acoplado a C, entonces

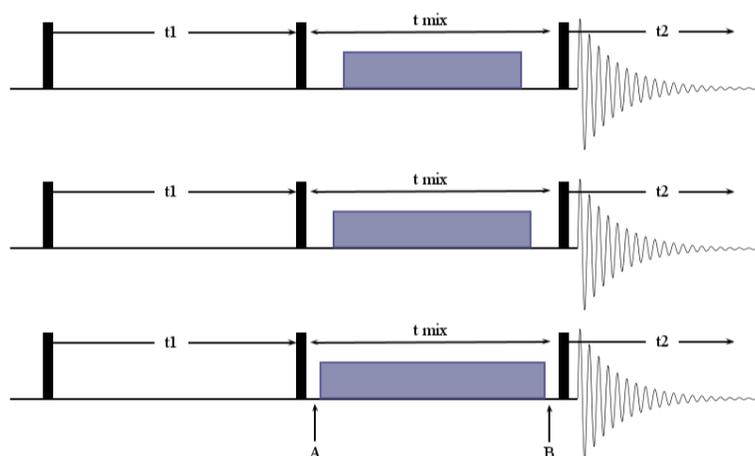


Figura B.1: Secuencia de pulsos del experimento TOCSY. Las regiones marcadas A y B son las que contribuyen al espectro.

ces se podrá observar el pico de cruce de A y C, aún cuando no haya un acoplamiento entre éstos dos. Caso contrario, en el experimento COSY (COrrrelation SpectroscopY) sólo se observan los picos de cruce de los espines acoplados, en el anterior ejemplo únicamente serían A y B, así como B y C. En un análisis completo de una molécula se obtienen experimentos a diferentes tiempos de mezclado⁴⁴(Fig. B.1).

B.2. NOESY

Un espectro bidimensional NOESY (Nuclear Overhauser Effect SpectroscopY) es muy similar a un espectro TOCSY, con la excepción de que los picos de cruce no son generados por la transferencia de coherencia entre acoplamientos, sino por relajación cruzada. Entonces, la aparición de un pico NOE en (Ω_i, Ω_j) significa que existe relajación cruzada entre los espines i y j . En otras palabras, los dos espines están cercanos en distancia. La relajación cruzada genera señales en el espectro gracias a la transferencia de magnetización entre núcleos, y no a la relajación con el solvente.

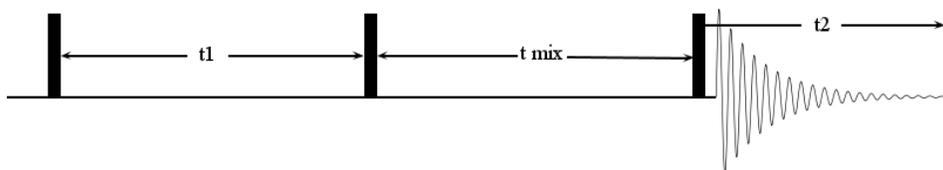


Figura B.2: Secuencia de pulsos del experimento NOESY. A diferencia del experimento TOCSY, en el experimento NOESY el tiempo de mezclado se mantiene constante mientras se obtiene el experimento a diferentes tiempos de t_1 .

B.3. Estructura de heveína a pH fisiológico

En reportes anteriores se han comentado las dificultades de la convergencia de los cálculos de la estructura de heveína a partir de datos de resonancia a pH neutro^{5,6}. En este trabajo obtuvimos la estructura tridimensional de heveína a través de las restricciones del experimento NOESY, el resultado final demuestra que la estructura calculada no es idéntica a las depositadas en el PDB, aún así, la estructura tiene la misma topología general en la región de los primeros tres puentes disulfuro. Los parámetros de convergencia arrojados por el programa Atnos-Candid-Cyana⁴⁵⁻⁴⁸ demuestran que las restricciones no fueron suficientes para minimizar la estructura (Tabla B.1).

Esto quiere decir que aunque las estructuras son superponibles, las diferencias son claras en los extremos amino y carboxilo terminal. En el análisis realizado en este trabajo únicamente se utilizaron 367 restricciones NOE, comparadas con las 458 con las que se determinó la estructura por primera vez⁵. La convergencia del RMSD llegó a un valor de 0.84Å esto quiere decir que las estructuras calculadas tienen congruencia y similitud entre ellas. También, la función de convergencia llegó a un valor bajo, lo que significa que durante el cálculo en esta función estaban representadas casi todas las restricciones de distancias y ángulos. El total de las señales NOE esta compuesto por señales provenientes de correlaciones secuenciales, intrarresiduo, etc. Para una proteína pequeña los valores de mediana y larga distancia deberían ser de mínimo de tres o cuatros señales por residuo para lograr estabilizar la estructura (Tabla B.1). Es relevante mencionar que entre los datos arrojados por el cálculo se determinó a las regiones 1E-33P y 37C-43D como regiones que tienen poca variación en el RMSD.

Lo que nos ayuda a proponer que la región de 34-DHS-36 esta causando parte del problema de la convergencia de la estructura en la conformación

Tabla B.1: Parámetros de convergencia de RMN para la heveína

Número de residuos	43
Peso molecular(Da)	4717.1
Número de modelos	20
Función de convergencia	1.86 ± 0.49
Intervalo RMSD	3-41
-Cadena principal	0.84 ± 0.14
-Átomos pesados	1.19 ± 0.15
RMSD óptimo	1-33, 37-43
Restricciones NOE	367
-Intrarresiduo	75 (20.44 %)
-Secuencial	124 (33.79 %)
-Media distancia	83 (22.62 %)
-Larga distancia	85 (23.16 %)
Restricciones NOE por residuo	8.53
Restricciones ángulos diedro	174

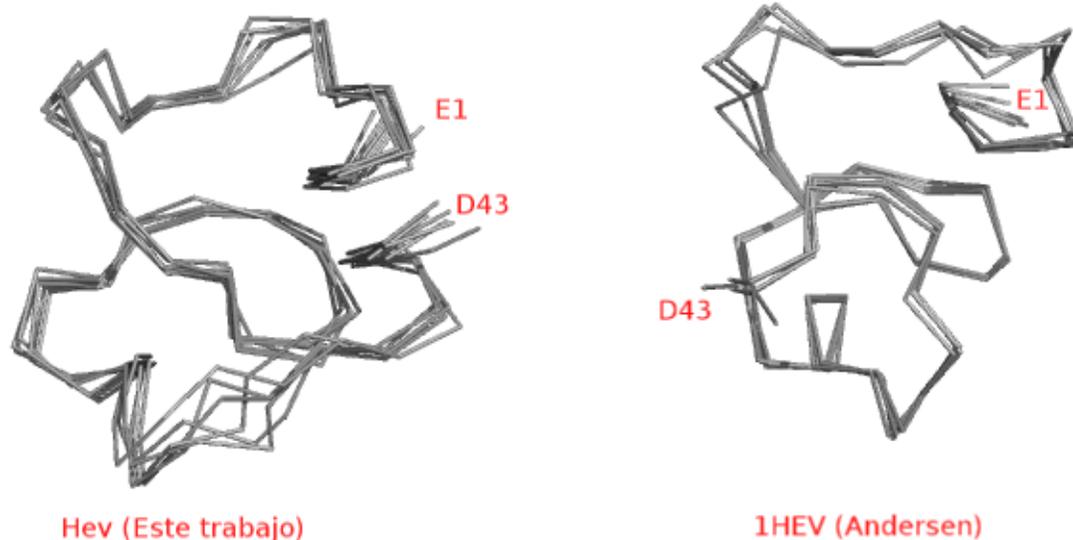


Figura B.3: Estructura de rhev a pH 6.8. En la figura están representadas las dos estructuras resueltas de heveína por RMN. En gris se encuentran las 6 estructuras de menor energía de la heveína, la estructura resuelta en este trabajo Hev a pH 6.8 y la estructura depositada en la base de datos PDB con clave 1HEV⁵.

del carboxilo terminal. Las diferencias obtenidas se deben a la pérdida de señales NOE al aumentar el pH lo cual fue propuesto también por otros grupos^{5,6}. El RMSD entre las estructuras es de 6.20 Å para todos los átomos pesados de la cadena principal, y de 2.22 Å para la región de los primeros tres puentes disulfuro, de los aminoácidos 3-31. La representación de las dos estructuras de heveína resueltas por RMN se representan con las seis estructuras de menor energía obtenidas a pH 6.8 y las seis estructuras depositadas por Andersen⁵(Fig. B.3). La estructura resuelta en este trabajo no tiene ningún afinamiento. En la figura B.3 se muestran los dos carboxilos terminales, tienen diferente conformación, esto debido a que la calidad de nuestra estructura no es suficiente para una buena comparación.

Apéndice C

HSQC de heveína

Se obtuvo el espectro HSQC de rhevE, la proteína fue obtenida de una construcción con doble sitio de enterocinasa (Capítulo 2.2.1). Los picos de cruce están representadas en azul para las correlaciones (HN,N) de la cadena lateral y las correlaciones de hidrógeno con nitrógeno de cadenas laterales como lisina, arginina, histidina y triptofano (Fig. C).

heveína (const. EK-EK-rhev)

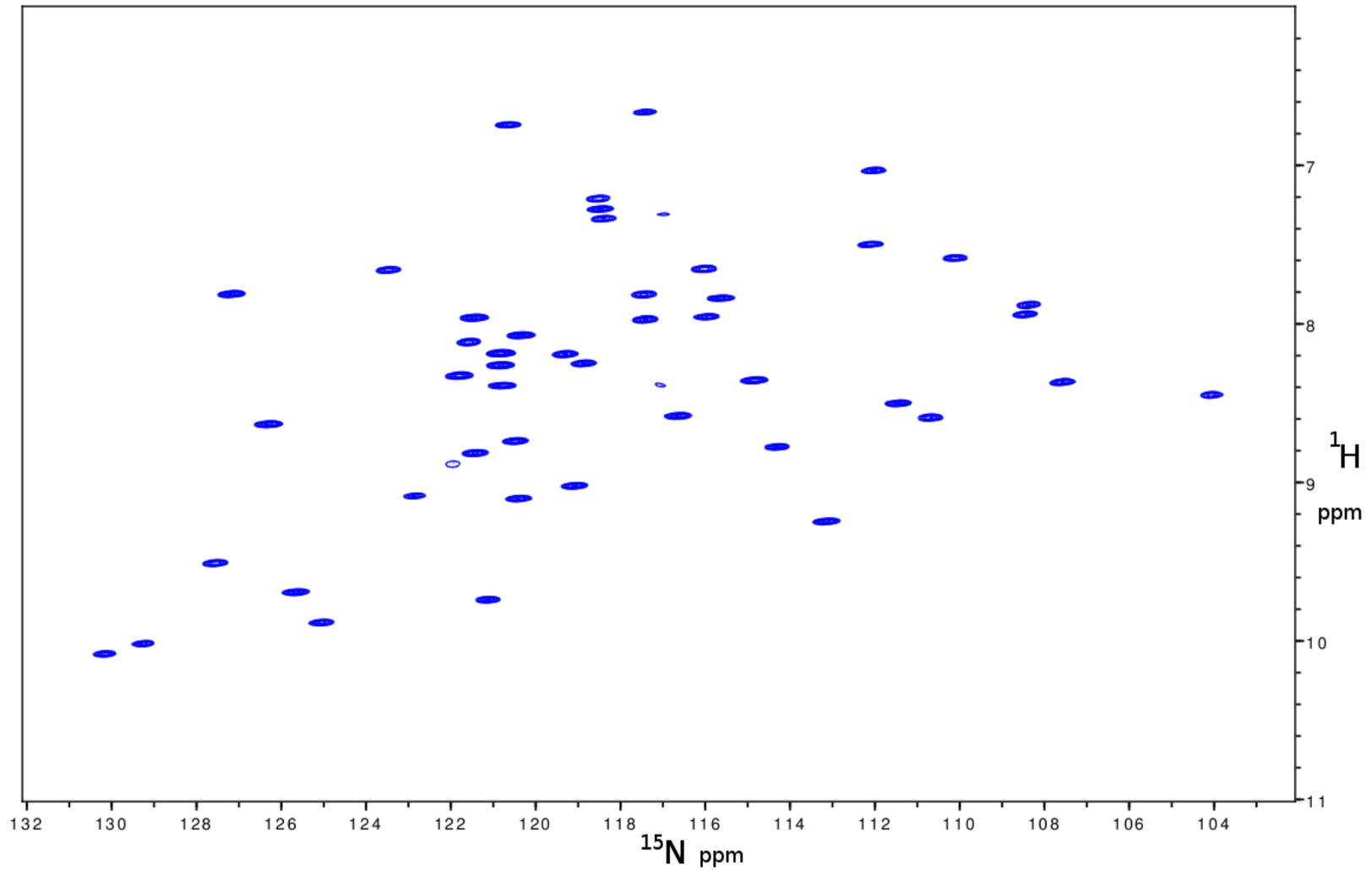


Figura C.1: HSQC de heveína. Espectro bidimensional de $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -HSQC de heveína marcada (rhevE) obtenido en un campo magnético de 700 MHz de un equipo Varian VNMR-S.

Bibliografía

- [1] Archer BL. The proteins of *Hevea brasiliensis* latex. *Biochemical Journal*, 75:236–240, 1960.
- [2] Van Parijs J; Broekaert WF; Goldstein IJ y Peumans WJ. Hevein: an antifungal protein from rubber-tree *Hevea brasiliensis* latex. *Planta*, 183(2):258–264, 1991.
- [3] Wright CS. Structural comparison of the two distinct sugar binding sites in wheat germ agglutinin isolectin II. *Journal of Molecular Biology*, 178(1):91–104, 1984.
- [4] Rodríguez-Romero A; Ravichandran KG y Soriano-García M. Crystal structure of hevein at 2.8 Å resolution. *FEBS Letters*, 291(2):307–309, 1991.
- [5] Andersen NH; Cao B; Rodríguez-Romero A y Arreguín B. Hevein: NMR assignment and assessment of solution-state folding for the agglutinin-toxin motif. *Biochemistry*, 32:1407–1422, 1993.
- [6] Asensio JL; Cañada FJ; Rodríguez-Romero A y Jimenez-Barbero J. The interaction of hevein with n-acetylglucosamine-containing oligosaccharides. solution structure of hevein complexed to chitobiose. *European Journal of Biochemistry*, 230(2):621–633, 1995.
- [7] Gerber AC; Jörg W; Zbinden S; Seger RA y Dangel PH. Severe

intraoperative anaphylaxis to surgical gloves: Latex allergy, an unfamiliar condition. *Anesthesiology*, 71(5):800–802, 1989.

[8] Beezhold DH; Kostyal DA y Sussman GL. IgE epitope analysis of the hevein preprotein; a major latex allergen. *Clinical & Experimental Immunology*, 108(1):114–121, 1997.

[9] Banerjee B; Wang X; Kelly KJ; Fink JN; Sussman GL y Kurup VP. IgE from latex-allergic patients binds to cloned and expressed B cell epitopes of prohevein. *Journal of Immunology*, 159(11):5724–5732, 1997.

[10] de Silva HD; Gardner LM; Drew AC; Beezhold DH; Rolland JM y O’Hehir RE. The hevein domain of the major latex-glove allergen Hev b 6.01 contains dominant t cell reactive sites. *Clinical & Experimental Allergy*, 34(4):611–618, 2004.

[11] King TP; Kochoumian L y Joslyn A. Melittin-specific monoclonal and polyclonal IgE and IgG1 antibodies from mice. *Journal of Immunology*, 133(5):2668–2673, 1984.

[12] Abbas AK; Lichman AH y Pillai S. *Inmunología celular y molecular*. Elsevier, 2006.

[13] Midoro-Horiuti T; Brooks EG y Goldblum RM. Pathogenesis-related proteins of plants as allergens. *Annals of allergy asthma and immunology*, 87(4):261–271, 2001.

[14] Tiselius A y Kabat EA. An electrophoretic study of immune sera and purified antibody preparations. *The Journal of Experimental Medicine*, 69(1):119–131, 1939.

- [15] Ishizaka K; Ishizaka T y Hornbrook MM. Physico-chemical properties of human reaginic antibody: IV. Presence of a unique immunoglobulin as a carrier of reaginic activity. *Journal Immunology*, 97(1):75–85, 1966.
- [16] Turner JD; Faulkner H; Kamgno J; Kennedy MW; Behnke J; Bousines M y Bradley JE. Allergen-specific IgE and IgG4 are markers of resistance and susceptibility in a human intestinal nematode infection. *Microbes and Infection*, 7(7-8):990–996, 2005.
- [17] Schroeder HW y Cavacini L. Structure and function of immunoglobulins. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 125(2):S41–S52, 2010.
- [18] Rubinstein ND; Mayrose I; Halperin D; Yekutieli D; Gershoni JM y Pupko T. Computational characterization of B-cell epitopes. *Molecular Immunology*, 45(12):3477–3489, 2008.
- [19] Reyes-López CA; Hernández-Santoyo A; Pedraza-Escalona M; Mendoza G; Hernández-Arana A y Rodríguez-Romero A. Insights into a conformational epitope of Hev b 6.02 (hevein). *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 314(1):123–130, 2004.
- [20] Niemi M; Jylhä S; Laukkanen ML; Söderlund H; Mäkinen-Kiljunen S; Kallio JM; Hakulinen N; Haahtela T; Takkinen K y Rouvinen J. Molecular interactions between a recombinant IgE antibody and the β -lactoglobulin allergen. *Structure*, 15(11):1413–1421, 2007.
- [21] Padavattan S., Schirmer T., Schmidt M., Akdis C., Valenta R., Mittermann I., Soldatova L., Slater J., Mueller U., y Markovic-Housley Z. Identification of a B-cell epitope of hyaluronidase, a

major bee venom allergen, from its crystal structure in complex with a specific Fab. *Journal of Molecular Biology*, 368(3):742–752, 2007.

- [22] Li M; Gustchina A; Alexandratos J; Wlodawer A; Wünschmann S; Kepley CL; Chapman MD y Pomés A. Crystal structure of a dimerized cockroach allergen Bla g 2 complexed with a monoclonal antibody. *Journal of Biological Chemistry*, 283(33):22806–22814, 2008.
- [23] Padavattan S; Flicker S; Schirmer T; Madritsch C; Randow S; Reese G; Vieths S; Lupinek C; Ebner C; Valenta R y Markovic-Housley Z. High-affinity IgE recognition of a conformational epitope of the major respiratory allergen Phl p 2 as revealed by X-Ray crystallography. *Journal of Immunology*, 182(4):2141–2151, 2009.
- [24] Mandar TN; Chi-Fon C; I-Chun K; Camy CHK; Fong-Cheng Y; Kaw-Yan C; Tai-Huang H. Roles of structure and structural dynamics in the antibody recognition of the allergen proteins: An nmr study on *blomia tropicalis* major allergen. *Structure*, 16(1):125–136, 2008.
- [25] Juárez-González VR; Riaño-Umbarila L; Quintero-Hernández V; Olamendi-Portugal T; Ortiz-León M; Ortíz E; Possani LD y Becerril B. Directed evolution, phage display and combination of evolved mutants: A strategy to recover the neutralization properties of the scFv version of BCF2 a neutralizing monoclonal antibody specific to scorpion toxin Cn2. *Journal of Molecular Biology*, 346(5):1287–1297, 2005.
- [26] Pedraza-Escalona M; Becerril-Luján B; Agundis C; Domínguez-Ramírez L; Pereyra A; Riaño-Umbarila L y Rodríguez-Romero A. Analysis of B-cell epitopes from the allergen Hev b 6.02 revealed

- by using blocking antibodies. *Molecular Immunology*, 46:668–676, 2008.
- [27] Karisola P; Mikkola J; Kalkkinen N; Airene KJ; Laitinen OH; Repo S; Pentikainen OT; Reunala T; Turjanmaa K; Johnson MS; Palosuo T; Kulomaa MS y Alenius H. 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. *Journal of Immunology*, 172(4):2621–2628, 2004.
- [28] Reyes-López CA; Pedraza-Escalona M; Mendoza G; Hernández-Santoyo A y Rodríguez-Romero A. A single amino acid substitution on the surface of a natural hevein isoform (Hev b 6.0202), confers different IgE recognition. *FEBS Letters*, 580(10):2483–2487, 2006.
- [29] Kato K; Matsunaga C; Odaka A; Yamato S; Takaha W; Shimada I y Arata Y. Carbon-13 NMR study of switch variant anti-dansyl antibodies: antigen binding and domain-domain interactions. *Biochemistry*, 30(26):6604–6610, 1991.
- [30] Wüthrich K. Protein recognition by NMR. *Nature Structural & Molecular Biology*, 7:188–189, 2000.
- [31] Takahashi H; Nakanishi T; Kami K; Arata Y y Shimada I. A novel NMR method for determining the interfaces of large protein-protein complexes. *Nature Structural & Molecular Biology*, 7:220–223, 2000.
- [32] Meyer B y Peters T. NMR spectroscopy techniques for screening and identifying ligand binding to protein receptors. *Angewante Chemie International Edition*, 42(8):864–890, 2003.

-
- [33] Kumar A; Ernst RR y Wüthrich K. A two-dimensional nuclear Overhauser enhancement (2D NOE) experiment for the elucidation of complete proton-proton cross-relaxation networks in biological macromolecules. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 95(1):1–6, 1980.
- [34] Marley J; Lu M y Bracken C. A method for efficient isotopic labeling of recombinant proteins. *Journal of Biomolecular NMR*, 20:71–75, 2001.
- [35] Ladrón de Guevara E. *Caracterización de la modificación química de triptofanos en la superficie del alérgeno heveína*. Tesis de licenciatura en Química. Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México, 2009.
- [36] Wüthrich K. *NMR of Proteins and Nucleic Acids*. John Wiley & Sons, 1986.
- [37] Mayer M y Meyer B. Characterization of ligand binding by saturation transfer difference NMR spectroscopy. *Angewante Chemie International Edition*, 38(12):1784–1788, 1999.
- [38] Mayer M y Meyer B. Group epitope mapping by saturation transfer difference NMR to identify segments of a ligand in direct contact with a protein receptor. *Journal of the American Chemical Society*, 123(25):6108–6117, 2001.
- [39] Houliston RS; Jacobs BC; Tio-Gillen AP; Verschuuren JJ; Khieu NH; Gilbert M y Jarrell HC. STD-NMR used to elucidate the fine binding specificity of pathogenic anti-ganglioside antibodies directly in patient serum. *Biochemistry*, 48(2):220–222, 2009.

- [40] Fraczkiewicz R y Braun W. Exact and efficient analytical calculation of the accessible surface areas and their gradients for macromolecules. *Journal of Computational Chemistry*, 19(3):319–333, 1998.
- [41] Metzger H; Alcaraz G; Hohman R; Kinet JP; Pribluda V y Quarto R. The receptor with high affinity for Immunoglobulin E. *Annual Review of Immunology*, 4(1):419–470, 1986.
- [42] Grangette C; Gruart V; Ouaiissi MA; Rizvi F; Delespesse G; Capron A y Capron M. IgE receptor on human eosinophils (FcERII). Comparison with B cell CD23 and association with an adhesion molecule. *Journal of Immunology*, 143(11):3580–3588, 1989.
- [43] Brown DA. Lipid rafts, detergent-resistant membranes, and raft targeting signals. *Physiology*, 21(6):430–439, 2006.
- [44] Keeler J. *Understanding NMR spectroscopy*. John Wiley & Sons, 2005.
- [45] Herrmann T; Güntert P y Wüthrich K. Protein NMR structure determination with automated NOE assignment using the new software CANDID and the torsion angle dynamics algorithm DYANA. *Journal of Molecular Biology*, 319(1):209–227, 2002.
- [46] Herrmann T; Güntert P y Wüthrich K. Protein NMR structure determination with automated NOE-identification in the NOESY spectra using the new software ATNOS. *Journal of Biomolecular NMR*, 24:171–189, 2002.
- [47] Fiorito F; Herrmann T; Damberger F y Wüthrich K. Automated amino acid side-chain NMR assignment of proteins using ^{13}C - and ^{15}N -resolved 3D $[^1\text{H}, ^1\text{H}]$ -NOESY. *Journal of Biomolecular NMR*, 42:23–33, 2008.

-
- [48] Volk J; Herrmann T y Wüthrich K. Automated sequence-specific protein NMR assignment using the memetic algorithm MATCH. *Journal of Biomolecular NMR*, 41:127–138, 2008.