

20.349

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I



* 5 3 0 9 5 3 9 6 2 X *
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

**RELACIONES ESTRUCTURA-INMUNOGENICIDAD
EN LAS FORMAS NATIVA Y RECOMBINANTE
DEL ALERGENO PRINCIPAL DE LA MOSTAZA**

TESIS DOCTORAL

Autor: Manuel Angel González de la Peña

Directoras:

Rosalía Rodríguez García

María Teresa Villalba Díaz

Madrid, Mayo de 1995

A MIS PADRES

Durante los últimos seis años he trabajado y convivido con una serie de personas que han contribuído de manera decisiva a mi formación como científico y como ser humano. De todos vosotros guardo un recuerdo imborrable, y a todos quiero expresaros, ahora, mi gratitud y mi respeto.

A Pepe y Rosalía deseo agradecerles su confianza y apoyo, que me han permitido llegar hasta aquí. Especialmente, agradezco a Pepe su comprensión en los momentos más difíciles.

A mis directoras he de agradecerles su estímulo y enseñanza constantes; ellas son, sin duda, las "culpables" de los aciertos que puedan hallarse en esta Tesis. Agradezco a Eva, con profundo cariño, su amistad y el haber trabajado conmigo codo con codo los últimos años; también a Mayte y Rafa, porque sin su camaradería y su paciencia, este trabajo hubiera sido, sencillamente, imposible. No quiero dejar de mencionar aquí a "las nuevas", Amalia y Eva (G.), cuya simpatía ha sido para mí un estímulo importante en los últimos meses.

También quiero agradecer a Paco Gavilanes por estar siempre dispuesto a ayudarme, "al Turnay" por su indestructible buen humor, y, en fin, a todos los demás compañeros del L3, por haberme aguantado y enseñado tanto.

Finalmente, deseo agradecer a los Doctores Carlos López-Otín, José Luis García-López, Alvaro Martínez, Fernando Vivanco, Manuel Rico, Luis Menéndez-Arias, Manuel Martín Esteban, Cristina Pascual, M^a Luisa González, M^a Isabel Esteban, Ana Fiandor, Mercedes Barba, Javier Domínguez e Ignacio Moneo su amable y valiosa colaboración científica, que ha hecho posible la realización del presente trabajo.

"El corazón tiene razones que la razón no puede comprender"

Blaise Pascal (1623-1662)

ABREVIATURAS

APC:	Célula presentadora de antígeno.
C-LYTA:	Dominio C-terminal de unión a colina de la N-acetilmuramoil-L-alanina amidasa de <i>Streptococcus pneumoniae</i> .
CTAB:	Bromuro de cetiltriethylamonio.
dNTPs:	Mezcla equimolar de los cuatro desoxirribonucleótidos.
EDTA:	Acido etilendiaminotetracético.
ELISA:	Ensayo de inmunoabsorción con enzimas ligadas.
FcR:	Receptor del fragmento Fc de las inmunoglobulinas.
GST:	Glutación S-transferasa del hongo <i>Schistosoma japonicum</i> .
IL-4:	Interleuquina 4.
IPTG:	Isopropiltiogalactósido.
mAb:	Anticuerpo monoclonal.
PAGE:	Electroforesis en geles de poliacrilamida.
PBS:	Tampón fosfato salino.
PCR:	Reacción en cadena de la polimerasa.
PMSF:	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo.
RBS:	Sitio de unión al ribosoma.
rSina1:	Forma recombinante del alergeno principal de la mostaza, Sin a.
SDS:	Laurilsulfato de sodio.
TAE:	Tampón Tris-acetato-EDTA.
TBE:	Tampón Tris-borato-EDTA.
TE:	Tampón Tris-EDTA.
TFA:	Acido trifluoracético.
TLCK:	N-tosil-L-lisil clorometilcetona.
TPCK:	N-tosil-L-fenilalanil clorometilcetona.

INDICE

	Página
INTRODUCCION	1
ALERGIA A ALIMENTOS	3
La mucosa intestinal	5
El sistema inmune de la mucosa intestinal	6
<i>Células accesorias</i>	6
<i>Células T</i>	7
<i>Mastocitos</i>	8
Respuesta inmune a alergenitos alimentarios	8
ALERGENOS ALIMENTARIOS	10
Principales alergenitos alimentarios	10
Alergenitos alimentarios de origen animal	10
<i>Huevo</i>	10
<i>Leche</i>	11
<i>Pescado</i>	11
<i>Crustáceos</i>	12
Alergenitos alimentarios de origen vegetal	12
<i>Cacahuete</i>	12
<i>Soja</i>	12
<i>Cereales</i>	13
<i>Frutas</i>	13
<i>Mostaza</i>	13
<i>Otros alergenitos vegetales</i>	13
Epítotos alergénicos y reacciones cruzadas	14
Diagnosis y tratamiento	15
El alergenito principal de la mostaza, Sin a 1	16
BIOLOGIA MOLECULAR APLICADA	
AL ESTUDIO DE ALERGENOS	20
OBJETIVOS DE LA PRESENTE INVESTIGACION	23

	Página
MATERIALES Y METODOS	24
MATERIALES	24
Bacterias	24
Medios de cultivo	24
Oligonucleótidos	24
Plásmidos	24
Enzimas para la manipulación del DNA	25
Semillas de crucíferas	25
Sueros de individuos alérgicos	25
Extractos digestivos humanos	25
TECNICAS BASICAS DE MANIPULACION DE DNA	25
Electroforesis en geles de agarosa	25
Aislamiento de plásmidos y fragmentos de DNA	25
Digestión de DNA con enzimas de restricción	26
Transformación de células competentes de <i>E. coli</i>	26
AISLAMIENTO DE DNA GENOMICO	
DE SEMILLAS DE <i>Sinapis alba</i>	26
AMPLIFICACION DE DNA MEDIANTE PCR	27
SECUENCIACION DE DNA	27
EXPRESION Y PURIFICACION DEL ALERGENO RECOMBINANTE	28
Inducción de cultivos de <i>E. coli</i>	28
Aislamiento de fracción periplásmica	28
Obtención de la fracción soluble de lisados bacterianos	28
Purificación de rSina1 expresado como proteína de fusión con la glutatión S-transferasa de <i>Schistosoma japonicum</i> (GST)	29
AISLAMIENTO Y PURIFICACION DE ALBUMINAS 2S	29
ELECTROFORESIS DE PROTEINAS EN GELES	
DE POLIACRILAMIDA	29
TRANSFERENCIA ELECTROFORETICA DE PROTEINAS	
A MEMBRANAS	30
ESPECTROS DE ABSORCION ULTRAVIOLETA	30

	Página
ANALISIS DE AMINOACIDOS	31
AISLAMIENTO DE LAS SUBUNIDADES DEL ALERGENO	31
Reducción y carboxiamidometilación del alergeno	31
Separación de las cadenas	31
SECUENCIACION AUTOMATICA DE PROTEINAS	31
OBTENCION DE ANTICUERPOS ESPECIFICOS FRENTE A Sin a 1	32
Suero policlonal	32
Anticuerpos monoclonales	33
ENZIMOINMUNOENSAYO (ELISA) INDIRECTO	33
Titulación de anticuerpos	33
Ensayos de inhibición	34
INMUNODETECCION DE PROTEINAS	
TRANSFERIDAS A SOPORTES SOLIDOS	34
ENSAYOS DE ESTABILIDAD GASTROINTESTINAL	
DE PROTEINAS	35
Hidrólisis con tripsina	35
Hidrólisis con quimotripsina	35
Hidrólisis con pepsina	35
Tratamiento <i>in vitro</i> con extractos digestivos humanos	35
CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCION (HPLC)	35
RESULTADOS	37
EXPRESION DEL ALERGENO Sin a 1 EN <i>E. coli</i>	37
Estrategia general	37
Clonación del alergeno	38
Construcciones pINS3 y pTrcS3	43
Construcción pCES3	47
Construcción pompAS3	50
Construcción pGEXS3	53
Solubilización de rSina1	53
Aislamiento de la fracción soluble de rSina1	58

	Página
CARACTERIZACION INMUNOLOGICA Y ESTRUCTURAL DE rSna1	59
Reconocimiento por suero de conejo específico para Sin a 1	59
Reconocimiento por anticuerpos monoclonales específicos para Sin a 1	60
Reconocimiento por IgE de pacientes alérgicos a mostaza	60
Resistencia a proteasas	63
ESTABILIDAD DE LA ACTIVIDAD ALERGENICA DE Sin a 1	64
Separación de las cadenas	64
Reconocimiento de las cadenas por sueros de pacientes alérgicos	65
Ensayos <i>in vitro</i> de estabilidad gastrointestinal	66
Digestión con pepsina	66
Digestiones con tripsina y quimotripsina	68
Tratamiento con extracto digestivo humano	72
REACTIVIDAD CRUZADA CON LAS NAPINAS DE COLZA	73
Especificidad del suero de paciente alérgico a colza	73
Reactividad cruzada en inmunotransferencia	75
Reactividad cruzada en ELISA	76
Titulación de IgE presentes en el suero de paciente alérgico a colza	76
Inhibición de la unión de IgG de suero de conejo desarrollado frente a Sin a 1	77
Inhibición de la unión de IgE	77
DISCUSION	
EXPRESION EN <i>E. coli</i> DEL ALERGENO PRINCIPAL DE LA MOSTAZA	79
CARACTERIZACION ALERGENICA DE Sin a 1	87
MODELIZACION DE LA ESTRUCTURA TERCIARIA DE Sin a 1	91
CONCLUSIONES	93
BIBLIOGRAFIA	95

INTRODUCCION

Las reacciones de hipersensibilidad constituyen un conjunto muy heterogéneo de patologías (tabla 1). De todas ellas, la alergia atópica, también llamada de tipo I o hipersensibilidad inmediata, es, con mucho, la más común, estimándose que afecta a cerca de un 20% de la población en los países desarrollados [Smith, 1988]. La alergia es uno de los mecanismos efectores más potentes del sistema inmune y es el resultado de la reacción producida por la estimulación, dependiente de IgE, de mastocitos y basófilos. Cuando un antígeno se une a las moléculas de IgE previamente ancladas a través de receptores a la superficie de dichas células, tiene lugar la liberación de distintos mediadores que provocan toda una serie de efectos nocivos en los distintos órganos blanco (tabla 2). Esta reacción se denomina hipersensibilidad inmediata porque tiene lugar de forma muy rápida, a los pocos minutos de la exposición al antígeno. En su forma más extrema puede llegar a producir la muerte del individuo por obstrucción total de las vías respiratorias y colapso cardiovascular.

Tabla 1. Clasificación de las reacciones de hipersensibilidad.

Tipo	Mecanismo inmunológico
Tipo I: Hipersensibilidad inmediata	Anticuerpos IgE
Tipo II: Mediada por anticuerpos	Anticuerpos (IgG o IgM) contra antígenos propios
Tipo III: Mediada por inmunocomplejos	Inmunocomplejos de antígeno e IgG o IgM
Tipo IV: Mediada por células T	1. Células CD4 ⁺ (hipersensibilidad retardada) 2. Células CD8 ⁺ (Citólisis mediada por células T)

Tabla 2. Efectos de los principales mediadores químicos liberados por mastocitos y basófilos durante la reacción alérgica (Metcalf, 1987).

Mediador	Actividad
Histamina	Broncoconstricción; aumento de la permeabilidad vascular; vasodilatación; estimulación de la secreción nasal; dolor de cabeza; prurito; taquicardia; estímulo de la síntesis de prostaglandinas.
Prostaglandina E ₂	Estimulación de la migración de neutrófilos; inducción de fiebre y eritema; aumento de la permeabilidad vascular; inhibición de la liberación de histamina; potenciación del edema y el dolor producidos por otros mediadores.
Prostaglandina F _{2α}	Broncoconstricción.
Prostaglandina D ₂	Broncoconstricción.
Tromboxano A ₂	Broncoconstricción.
Leucotrieno B ₄	Quimiotaxis de neutrófilos.
Leucotrieno C ₄	Broncoconstricción; aumento de la permeabilidad vascular; vasoconstricción.
Leucotrieno D ₄	Broncoconstricción; aumento de la permeabilidad vascular.
Leucotrieno E ₄	Broncoconstricción, aumento de la permeabilidad vascular.

La secuencia típica de acontecimientos en el desarrollo de la alergia es como sigue (figura 1):

- 1.- Producción de IgE por células B en respuesta a la primera exposición al antígeno.
- 2.- Unión de las IgE a receptores específicos de Fc en la superficie de mastocitos y basófilos.
- 3.- Interacción de dichos receptores debida al entrecruzamiento de las IgE unidas al antígeno (segunda exposición y siguientes).
- 4.- Activación de mastocitos y basófilos y liberación de los mediadores almacenados en su citoplasma.
- 5.- Acción de dichos mediadores sobre sus tejidos diana. Esta última etapa es la responsable de todos los síntomas clínicos asociados a la alergia.

La presente introducción se centrará fundamentalmente en los aspectos bioquímicos de la alergia a alimentos. En primer lugar, se hará una breve exposición de los conocimientos inmunológicos en dicho tema, y a continuación se resumirán los principales logros en el campo de la caracterización de alérgenos alimentarios. Finalmente, se tratarán las aportaciones de las técnicas de la biología molecular al estudio y tratamiento de la alergia.

ALERGIA A ALIMENTOS

Aunque el término 'alergia' suele emplearse para referirse a todo tipo de reacciones adversas frente a la ingestión de alimentos, su uso debería restringirse a aquéllas en las que está implicada una respuesta inmune [Anderson, 1984]. En la presente introducción, nos referiremos exclusivamente a las manifestaciones alérgicas que pueden ser clasificadas como reacciones de hipersensibilidad de tipo I, tal y como han sido descritas anteriormente. Los síntomas clínicos de la alergia alimentaria incluyen: irritación oral, desórdenes gástricos, diarrea, vómitos, rinitis, urticaria, eczema, asma y anafilaxis [Holgate y Church, 1993]. La boca y el tracto gastrointestinal se ven afectados en la mayor parte de los casos, pero las reacciones dermatológicas, respiratorias o sistémicas, no son infrecuentes, pudiendo constituir los únicos síntomas clínicos. Los individuos con una fuerte hipersensibilidad a veces presentan alergia a dos, tres o más alimentos, con un tipo diferente de reacción para cada uno de ellos.

Los mecanismos biológicos que intervienen en el desarrollo de la alergia a antígenos alimentarios son muy poco conocidos, y, hasta el momento, casi todos los estudios realizados al respecto se han llevado a cabo únicamente a nivel histológico.

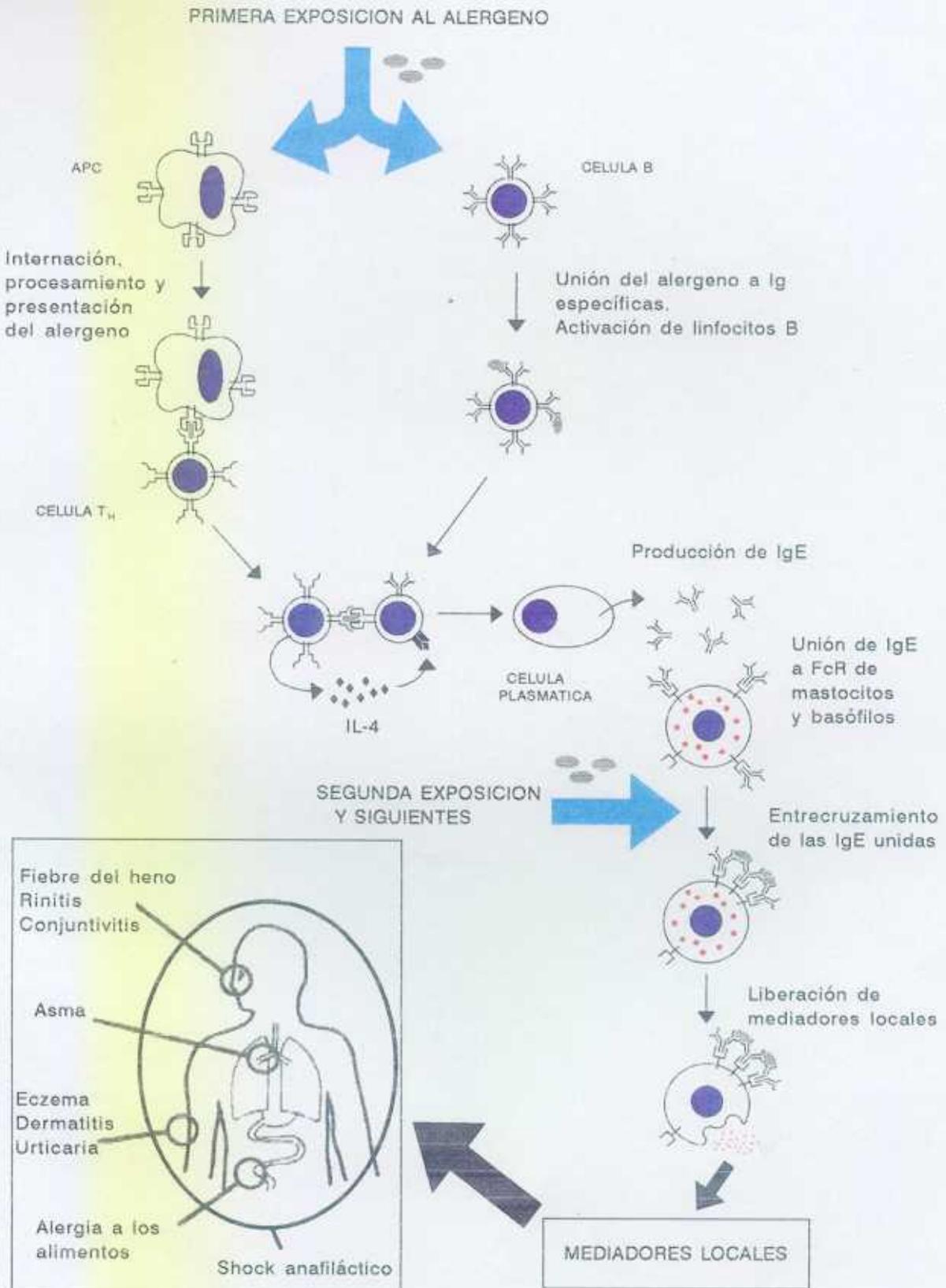


Figura 1. Secuencia de acontecimientos en la hipersensibilidad inmediata (ver texto). El contacto inicial con el alergeno conduce a la síntesis de grandes cantidades de IgE circulante. Estos anticuerpos se unen a la superficie de mastocitos o basófilos a través de los receptores de Fc de alta afinidad (FcR), lo que, en las siguientes exposiciones, desencadena la liberación de los mediadores químicos responsables de los síntomas clínicos de la alergia. APC, células presentadoras de antígeno; IL-4, interleucina-4.

LA MUCOSA INTESTINAL

La inmensa mayoría de los antígenos potenciales presentes en la dieta son excluidos por el organismo mediante una combinación de mecanismos de carácter no inmune que tienen lugar en el lumen del tracto gastrointestinal. En primer lugar, las funciones digestivas gástrica y pancreática limitan en gran medida la cantidad de antígeno que puede llegar a entrar en contacto con la mucosa intestinal, lugar donde se realiza la absorción de sustancias. Dicha mucosa, por su parte, actúa como una auténtica barrera frente a la entrada de antígenos. La capa de mucus que recubre a las células epiteliales puede llegar a tener en algunos puntos hasta 600 μm de espesor y es muy efectiva excluyendo todas las moléculas mayores de unos 17 kDa. De esta manera se impide el contacto de la superficie de la mucosa con las enzimas proteolíticas y la mayor parte de las proteínas alimentarias intactas, pero se permite el paso de pequeños polipéptidos y de los productos de la digestión. Además, a medida que la superficie luminal de la capa de mucus es degradada, va siendo sustituida mediante síntesis, lo que da lugar a un flujo continuo y unidireccional que tiende a contrarrestar la penetración por parte de los antígenos alimentarios. Por otra parte, el tiempo disponible para la absorción de los antígenos se ve reducido en gran medida por los movimientos peristálticos.

La composición de la membrana plasmática de las células de la superficie de la mucosa intestinal es de gran importancia a la hora de impedir o permitir la absorción de macromoléculas. Dicha composición cambia considerablemente durante el desarrollo del individuo, siendo mucho mayor la permeabilidad a macromoléculas durante la infancia [Shub y col., 1983]. Además, en los recién nacidos las células epiteliales tienen la capacidad de llevar a cabo la ingestión directa de macromoléculas mediante endocitosis. Esta propiedad es necesaria para la absorción de las inmunoglobulinas maternas contenidas en la leche, y desaparece a partir de los tres meses de edad [Hyman y col., 1985].

A pesar de todo lo dicho anteriormente, la mucosa intestinal también dispone de un mecanismo que permite la absorción de aquellos antígenos capaces de alcanzar la superficie del epitelio. Existen células epiteliales muy especializadas, denominadas células M, que se encuentran formando pequeños grupos, especialmente en la porción distal del intestino delgado. Estas células poseen pocos *microvilli*, apenas están cubiertas por una capa de mucus y carecen de lisosomas [Owen y Jones, 1974]. Las células M (figura 2) se sitúan sobre pequeños agregados de tejido linfoide asociado a la mucosa intestinal (placas de Peyer), y su función es, precisamente, permitir a los posibles antígenos atravesar la barrera epitelial e iniciar una respuesta inmune adecuada [Owen, 1977; Wolf y col., 1981].

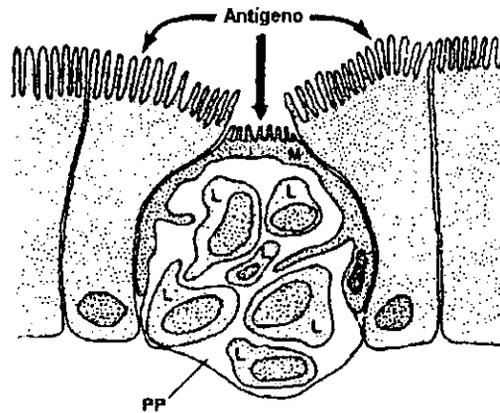


Figura 2. Los linfocitos (L) de las placas de Peyer (PP) son estimulados por los antígenos que atraviesan la mucosa intestinal a través de las células M (M).

El sistema inmune de la mucosa intestinal

Dentro del epitelio intestinal existe una gran cantidad y variedad de células no epiteliales implicadas en la respuesta inmune. Estas células comprenden macrófagos, mastocitos, linfocitos, eosinófilos, neutrófilos y células plasmáticas, aunque estas últimas se encuentran principalmente en la lámina propia.

Células accesorias.

En la pared intestinal se distinguen dos tipos principales de células presentadoras de antígeno:

- Células presentadoras de antígeno. Se trata de células de gran tamaño y forma irregular, que expresan grandes cantidades de moléculas MHC de clase II en su superficie y están especializadas en la presentación de antígenos a las células T. Estas células son escasamente fagocíticas y carecen de actividad lisosómica. Son potentes estimuladoras de los linfocitos CD4⁺.
- Histiocitos. Son verdaderos macrófagos, derivados de médula ósea. Al contrario que las anteriores, estas células llevan a cabo una actividad fagocítica intensa y contienen gran cantidad de enzimas lisosomales.

Ambos tipos celulares se encuentran ampliamente distribuidos por el tejido linfoide asociado a la mucosa intestinal, mezclados con las células T.

Células T.

En el ser humano, la mayoría de las células T circulantes expresan un receptor específico de antígeno compuesto de dos cadenas polipeptídicas, α y β , unidas por puentes disulfuro. Este receptor, en combinación con las moléculas CD4 y CD8, es el responsable del reconocimiento específico de los antígenos asociados con las moléculas MHC de clase II o de clase I, respectivamente.

Además de los linfocitos T circulantes que llevan el heterodímero α/β , existe otra pequeña población que expresa un receptor γ/δ . La proporción de estas células en la circulación y en los órganos linfoides periféricos es pequeña, pero en diversos tejidos epiteliales, incluyendo el intestinal, constituyen la población mayoritaria [Porcelli y col., 1991]. La función de los linfocitos γ/δ aún no se conoce. Poseen un repertorio inmunológico limitado, debido al pequeño número de genes V disponibles que presentan. Se ha descrito la existencia de actividad citotóxica en estos linfocitos [Goodman y Lefrancois, 1988], y una hipótesis para explicar su presencia en los epitelios es que intervienen en algún tipo de respuesta inmune primitiva. Esto podría explicar la escasa variabilidad del receptor γ/δ . Sin embargo, hasta el momento, en el ser humano no ha sido suficientemente demostrada la participación de los linfocitos T γ/δ en la inmunidad intestinal. Esto se debe a que en humanos, al contrario de lo que ocurre en otras especies de mamíferos estudiadas, existen numerosos linfocitos T α/β presentes en la mucosa. Por este motivo, el posible papel de los linfocitos T γ/δ en la alergia a alimentos y otras patologías intestinales aún no ha sido determinado.

La mayoría de las células T presentes en el intestino humano son CD8⁺ [Holgate y Church, 1993]. Por extrapolación de los conocimientos disponibles sobre el sistema inmune periférico, estas células deben ser de carácter citotóxico o supresor. Exceptuando las células con actividad inespecífica (NK), los linfocitos T intraepiteliales no presentan actividad citotóxica conocida. Sí se dispone de datos que demuestran la existencia de actividad supresora [Holgate y Church, 1993].

En la lámina propia, la población de linfocitos es más compleja que la del epitelio. En lo referente a las células T, la principal diferencia es que las de la lámina propia son preferentemente del tipo CD4⁺. Aproximadamente la mitad de dichas células llevan el marcador intraepitelial HML-1, y probablemente se trata de células en tránsito hacia el epitelio. En estos linfocitos, al igual de lo que ocurre en el epitelio, no se ha descrito actividad citotóxica específica. Un dato de especial interés en las células T de la lámina propia es la expresión de CD44, un receptor selectivo para las vénulas de endotelio alto [Stoolman, 1989].

Mastocitos.

Los mastocitos se hallan presentes en la mucosa intestinal de individuos sanos e hipersensibles a alimentos, aunque en estos últimos su número es mayor. La población de mastocitos de la mucosa gastrointestinal se diferencia de los mastocitos presentes en tejido conectivo por su bajo contenido en histamina, así como por su dependencia de células T [Stevens y Austen, 1989].

La liberación de histamina y otros mediadores inflamatorios tiene un profundo efecto en la función intestinal. Se incrementa la producción de mucus, aumenta la permeabilidad epitelial y la actividad peristáltica y tiene lugar una disminución de la capacidad de absorción, que origina diarrea [Holgate y Church, 1993]. Como se ha señalado anteriormente, la activación de los mastocitos se produce como consecuencia del entrecruzamiento de las IgE unidas a su superficie, pero también puede ocurrir como resultado de la estimulación directa por parte de determinadas proteínas alimentarias o neuropéptidos [Stevens y Austen, 1989].

RESPUESTA INMUNE A ANTIGENOS ALIMENTARIOS

En los individuos sanos (no hipersensibles) la absorción intestinal de un antígeno conduce siempre, en primer lugar, a una respuesta inmune de carácter local. Dicha respuesta consiste en la estimulación de las células plasmáticas presentes en la lámina propia, las cuales producen IgA específicas, que son secretadas al lumen del intestino [Mestecky y McGhee, 1987]. Estos anticuerpos, en las subsiguientes exposiciones, previenen la absorción del antígeno mediante su unión al mismo [Walker y Isselbacher, 1977].

En segundo lugar, a nivel sistémico, la respuesta inmune normal frente a un antígeno alimentario puede adoptar dos formas distintas. Primeramente, puede inducirse tolerancia. Se piensa que las células T supresoras presentes en el epitelio intestinal pueden ser activadas por la exposición a ciertos antígenos. Estas células no sólo actuarían a nivel local, sino que, bajo determinadas circunstancias, su migración contribuiría a reducir la respuesta inmune sistémica frente a un antígeno alimentario dado [Challacombe y Tomasi, 1980]. Parece plausible que la naturaleza química del antígeno sea la responsable de determinar tanto la aparición o no de tolerancia, como su carácter local o sistémico. Aunque los datos experimentales son escasos, se cree que tanto las células accesorias como los linfocitos T presentes en el epitelio y la lámina propia, contribuyen a mantener el estado de tolerancia frente a algunos antígenos presentes en la dieta.

La otra posibilidad es la aparición de una respuesta inmune humoral sistémica mediada por IgG e IgA [Kletter y col., 1971]. Aunque la combinación de mecanismos inmunes y no inmunes presentes en la mucosa intestinal impide de un modo muy efectivo la interacción de la mayoría de los antígenos del alimento con el sistema inmune periférico, la absorción de proteínas alimentarias dentro de la circulación sistémica es muy frecuente, y debe ser considerada como un suceso completamente normal. De hecho, todos los individuos, sanos o alérgicos, desarrollan y mantienen altos niveles de anticuerpos neutralizantes frente a antígenos alimentarios específicos. Dichos anticuerpos son del tipo IgG e IgA, dando lugar a la formación de inmunocomplejos que son eliminados por las vías normales (fagocitosis, etc.) sin que tenga lugar ningún proceso nocivo.

Dado el escaso conocimiento de los estímulos que determinan la selección del isotipo en los linfocitos B, se ignoran prácticamente por completo los mecanismos que, en los individuos hipersensibles, conducen a la producción y el mantenimiento de elevados niveles de IgE frente a determinados antígenos alimentarios.

Los alimentos más comúnmente implicados en reacciones alérgicas se resumen en la tabla 3.

Tabla 3. Principales alimentos implicados en reacciones alérgicas.

Leche
Huevos
Pescados y mariscos
Frutos secos (nueces, cacahuets y otros)
Derivados de cereales
Levaduras
Carne de cerdo y derivados
Alcohol, chocolate, té y café
Frutas (manzana, cítricos y otras)
Semillas (soja, sésamo, anís y otras)
Espicias (ajo, canela, mostaza y otras)
Aditivos (colorantes y conservantes)

ALERGENOS ALIMENTARIOS

Todos los alimentos, tanto de origen animal como vegetal, contienen un gran número de sustancias potencialmente alergénicas. Para evitar confusiones, en la presente introducción reservaremos el término 'alergeno' para aquellas proteínas purificadas de un extracto alergénico de alimento que son reconocidas por IgE de pacientes alérgicos y que están bien caracterizadas (tabla 4). Emplearemos, por el contrario, las denominaciones de 'fracción' o 'proteína alergénica' para referirnos a las fracciones proteicas reactivas con IgE cuya identidad molecular o alergenicidad no hayan sido aún bien establecidas.

Los alimentos suelen tener uno o varios alergenos principales, esto es, que son reconocidos por más del 50% de los pacientes sensibles [King y col., 1994]. La mayoría de los alergenos alimentarios conocidos, aunque no todos, han recibido un nombre sistemático siguiendo las normas de nomenclatura de la IUIS (*International Union of Immunology Societies*) [Marsh y col., 1986; King y col., 1994].

Los alergenos presentes en la dieta parecen poseer un cierto número de características comunes. Así, suelen ser proteínas de pequeño tamaño, resistentes al calor, a la digestión proteolítica y a pH ácido. Dichos alergenos pueden suponer desde una mínima cantidad en el alimento, como ocurre en las frutas, o hasta más del 80% de la proteína total, como es el caso de la leche o la clara de huevo.

Debido a los diferentes hábitos alimentarios existentes en las distintas partes del mundo, la incidencia de determinados alimentos en las reacciones alérgicas de la población varía considerablemente a nivel geográfico. Tal es el caso, por ejemplo, de la elevada incidencia de la alergia a cacahuete en los EE.UU o a la soja en Japón [Sampson y Metcalfe, 1991; Shibaski y col., 1980].

PRINCIPALES ALERGENOS ALIMENTARIOS

Alergenos de origen animal

Huevo. Los alergenos principales del huevo de gallina fueron identificados hace más de diez años (tabla 4). Se conoce la secuencia de aminoácidos de todos ellos [Canfield, 1963; Catterall y col., 1980; Nisbet y col., 1981; Williams y col., 1982] y se ha descrito la estructura antigénica de la lisozima [Atassi y Lee, 1978], así como los epítomos de la ovalbúmina para IgG e IgE [Elsayed y col., 1988].

En ocasiones, la alergia alimentaria al huevo va precedida de síntomas respiratorios por contacto con aves, apareciendo posteriormente síntomas clínicos con la ingesta de huevo [Mandallaz y col., 1988].

Tabla 4. Principales alérgenos alimentarios caracterizados.

Alimento	Alergeno	Tamaño (kDa)	Referencia
Huevo	Ovalbúmina Gal d 1	45.0	Nisbet y col., 1981
	Ovomucoide Gal d 2	28.0	Catterall y col., 1980
	Ovotransferrina Gal d 3	77.0	Williams y col., 1982
	Lisozima	14.0	Atassi & Lee, 1978
Leche de vaca	Caseína	19-24	Laughlan y col., 1981
	β -Lactoglobulina	18.3	Huang y col., 1985
	α -Lactalbúmina	14.4	Laughlan y col., 1985
Bacalao	Parvalbúmina Gad c 1	12.2	Elsayed y Bennich, 1975
Langostino	Tropomiosina Pen a 1	34.0	Subba Rao y col., 1993
Melocotón	Pru p 1	8-10	Lleonart y col., 1992
Cacahuete	Ara h 1	63.5	Yunginger y col., 1987
	Ara h 2	17.0	Burks y col., 1992
Soja	Inhibidor de tripsina	20.5	Moroz & Yang, 1980
Ricino	Albúmina 2S Ric c 1	11.0	Sharief y Li, 1982
Mostaza	Albúmina 2S Sin a 1	14.1	Menéndez-Arias y col., 1988

Leche. La leche de vaca contiene unas 20 proteínas diferentes, de las cuales la más abundante es la caseína, que representa el 80% del contenido proteico total. El resto está constituido por las proteínas solubles del suero. La actividad alérgica está ligada fundamentalmente a β -lactoglobulina, α -lactalbúmina y caseína (tabla 4).

Es frecuente que en los pacientes alérgicos a la leche de vaca se utilicen hidrolizados de caseína o de seroproteínas como tratamiento sustitutivo. Sin embargo, los hidrolizados de caseína y aún más los de proteínas séricas de la leche, pueden producir reacciones alérgicas en los casos en los que exista un alto grado de sensibilización [Bock, 1989].

Pescado. Las alergias a pescado más frecuentes se dan frente a especies de gádidos, merlúcidos, escómbridos y peces planos. Las proteínas alérgicas de mayor

importancia clínica existentes en los peces pertenecen a la familia de las parvalbúminas, las cuales son proteínas del sarcoplasma muscular, de pequeño tamaño y punto isoeléctrico ácido, alrededor de 4.6. Una de ellas ha sido caracterizada como el alérgeno principal del bacalao, Gad c 1 [Elsayed y Bennich, 1975]. Se trata de una proteína de 12.3 kDa, resistente a proteólisis y termoestable. En ella se ha localizado un epítopo alérgico de carácter secuencial [Elsayed y Apold, 1983].

Crustáceos. Los crustáceos más frecuentemente implicados en alergias son los decápodos, concretamente la familia de los peneidos (gambas y langostinos). Hace unos 10 años se describieron dos proteínas alérgicas en la gamba (*Penaeus aztecus*) cocida, denominadas antígeno I y antígeno II [Hoffman y col., 1981]. Otras dos proteínas similares a las anteriores, denominadas Sa I (8.2 kDa) y Sa II (34 kDa) se han encontrado en el langostino del Indico (*Penaeus indicus*), tanto crudo como cocido [Nappal y col., 1989]. Posteriormente, se describió la tropomiosina del músculo de gamba como el alérgeno principal de este alimento, otorgándosele el nombre sistemático de Pen a 1. Esta proteína, de 34 kDa, posee reactividad cruzada con extractos de otras especies de crustáceos, como langosta, cangrejo de mar y langostino [Subba y col., 1993; Beach-Daul y col., 1993]. Recientemente se ha descrito la expresión en *E. coli* de la tropomiosina de otra especie de langostino, *Metapenaeus ensis*, la cual, tras ser identificada como alérgeno principal de dicho alimento, ha recibido el nombre sistemático de Met e 1 [Leung y col., 1994].

Alérgenos de origen vegetal

Cacahuete. En general, todos los estudios coinciden en la existencia de varias proteínas alérgicas en el cacahuete, algunas de ellas comunes con otras leguminosas [Barnett y col., 1987]. Se han caracterizado dos alérgenos de cacahuete, denominados Ara h 1 y Ara h 2. El primero de ellos es una glicoproteína ácida ($pI=4.55$) de 63.5 kDa [Burks y col., 1991]. Ara h 2 tiene un peso molecular de 17 kDa [Burks y col., 1992].

Soja. De la harina de soja se obtienen, mediante precipitación ácida, dos fracciones proteicas: las globulinas, que comprenden el 85 % de la proteína total, y el suero, cuyo componente más abundante es el inhibidor de tripsina. Este último ha sido descrito como proteína alérgica [Moroz y Yang, 1980]. Recientemente, se ha caracterizado una globulina 7S como alérgeno principal de la semilla de soja [Ogawa y col., 1993]. Este alérgeno (Gly m 1), de 34 kDa, es una proteína asociada a cuerpos grasos, y muestra un 30% de similitud de secuencia con Der p 1 (alérgeno principal del ácaro *Dermatophagoides pteronissynus*).

Cereales. En las harinas obtenidas de las semillas de gramíneas comestibles se distinguen cuatro fracciones proteicas, dos hidrosolubles (albúminas y globulinas) y dos insolubles en medio acuoso (gliadinas y glutelinas). Aunque se ha descrito la actividad alergénica de la albúmina 2S de semillas de arroz [Matsuda y col., 1988], los trofoalergenos de cereales parecen estar más ligados a globulinas y glutelinas.

Una proteína del endospermo de cebada, de 14.5 kDa de peso molecular, se ha caracterizado como uno de los alergenios principales implicados en el llamado asma de panadero (alergia a la inhalación de harinas de cereales). Se trata de una glicoproteína perteneciente a la familia de inhibidores de α -amilasa [Barber y col., 1989].

Frutas. Se ha descrito la existencia de una proteína de 30 kDa, común a diversas frutas (plátano, guayaba, melocotón, mandarina y fresa), que es reconocida por IgE de individuos hipersensibles a este tipo de alimentos [Wadee y col., 1990]. Recientemente, se ha aislado un alergenio principal de la piel de melocotón (Pru p 1). Esta proteína presenta un tamaño de 8-10 kDa y es reconocida por el 75% de los sueros de los pacientes analizados [Leonart y col., 1992].

Mostaza. Un estudio clínico del suero de individuos susceptibles de hipersensibilidad a alergenios de alimentos revela que más de un 17% de ellos poseen IgE específicas contra los alergenios de mostaza [Niinimäki y Hannuksela, 1981]. La mostaza de mesa se elabora normalmente a partir de una mezcla de las harinas obtenidas de las semillas de dos especies de crucíferas: la mostaza amarilla (*Sinapis alba*) y la oriental (*Brassica juncea*), variando las proporciones de ambos tipos según el fabricante.

La mayor alergenicidad de las semillas de *S. alba* se observa en la fracción correspondiente a las albúminas 2S, a la que, comprobada su pureza, se le asignó la denominación Sin a 1 [Menéndez-Arias y col., 1988]. Asimismo, también ha sido aislado y caracterizado el alergenio principal de la mostaza oriental Bra j 1 [González de la Peña y col., 1990; Monsalve y col., 1993]. Ambos alergenios son proteínas homólogas, poseyendo alrededor de un 90% de similitud en su estructura primaria.

Otros alergenios vegetales. En el guisante, la alergenicidad del extracto se concentra en la fracción de las albúminas de bajo peso molecular [Malley y col., 1975], si bien también se ha descrito un componente alergénico de 1.8 kDa, con un 30% de azúcares [Malley y col., 1976].

Entre los vegetales usados como condimento (aparte de la mostaza) los que presentan una actividad alergénica más importante son el cilantro, el anís, el apio y el sésamo. En todos los casos, la fracción alergénica principal está constituida por proteínas de bajo peso molecular [Van Toorenbergen y col., 1988].

Finalmente, en extractos de patata [Wahl y col., 1990] y zanahoria [Castillo y col., 1991] se han encontrado diversas proteínas que son reconocidas por IgE en pacientes aislados, pero aún no se ha llevado a cabo su caracterización.

EPITOPOS ALERGENICOS Y REACCIONES CRUZADAS

La acción del calor sobre los alimentos, mediante cocción u otra forma de calentamiento por encima de 60°C, puede cambiar el perfil de unión de IgE a los extractos alérgicos. La utilización de extractos de pescados cocidos para diagnóstico *in vitro*, disminuye la unión de IgE específica a un tercio de la obtenida cuando el extracto es de pescado crudo. El calor aplicado durante el envasado de latas de atún, que puede llegar a 120°C, hace que estas conservas sean bien toleradas por pacientes que tendrían reacción alérgica con el mismo pescado hervido en la forma habitual [Pascual y col., 1992]. Por otra parte, parece que el calor no modifica la alergenidad de la soja y el cacahuete, pero sí lo hace la digestión enzimática. La unión de IgE disminuye unas 100 veces en el cacahuete y 10 en la soja por acción de pepsina y tripsina [Burks y col., 1992]. La hidrólisis enzimática intensiva constituye un mecanismo de destrucción de la alergenidad de alimentos muy utilizado.

Sin embargo, los resultados de los estudios de inmunotransferencia con sueros de pacientes alérgicos sugieren, en su conjunto, que los epítomos alérgicos de alimentos tienen un carácter preferentemente secuencial. Antes de la electroforesis, las muestras son hervidas de modo rutinario en un tampón que contiene SDS y, en muchos casos, agentes reductores. Cabría esperar que tales tratamientos destruyeran los epítomos conformacionales. Sin embargo, la capacidad de unión de IgE suele mantenerse en su mayor parte. Esto es frecuente también en otros tipos de alérgenos. Por ejemplo, en muchos pólenes, así como en proteínas del endospermo de cereales [Ford y Baldo, 1986; Ipsen y Löwenstein, 1983; Ipsen y col., 1985; Donovan y Baldo, 1990] los estudios muestran que la integridad de los puentes disulfuro no parece ser importante para la capacidad de unión de IgE en los extractos. No ocurre lo mismo en el caso de los alérgenos de ácaros, donde se vio que la utilización de agentes reductores durante el proceso de extracción hace disminuir considerablemente en algunas proteínas su capacidad de unir IgE [Baldo y col., 1989; Tovey y col., 1987].

En el caso de algunos alérgenos, hay un pequeño número de epítomos dominantes que son reconocidos tanto por las IgE humanas como por anticuerpos desarrollados en animales [Olsen y Klapper, 1986]. Por el contrario, en otros casos, las IgE reconocen determinantes distintos a los reconocidos por anticuerpos monoclonales específicos [Chapman y col., 1984]. Recientemente, se ha visto que, en sueros de pacientes alérgicos a la ovalbúmina de clara de huevo, los anticuerpos IgE muestran distinta especificidad que los IgG o IgA en la unión a diferentes preparaciones de ovalbúmina desnaturalizada o digerida [Honma y col., 1994].

Aunque se han llevado a cabo diversos estudios de caracterización de epítomos alérgicos utilizando proteínas modificadas o desnaturalizadas, productos resultantes

de tratamientos proteolíticos y péptidos sintéticos [King y col., 1974; Atassi y Atassi, 1986; Baur y col., 1986; Shen y col., 1988; Mazur y col., 1988; Lombardero y col., 1990], el mayor potencial para el conocimiento de dichos epítomos se encuentra en la aplicación de las técnicas de biología molecular, que será tratada posteriormente en esta introducción.

La alergia a alimentos vegetales es frecuente entre pacientes con polinosis, debido a la existencia de determinantes alergénicos comunes. Tal es el caso de la reactividad cruzada entre el polen del abedul y varias frutas de la familia *Rosaceae*, por ejemplo, la manzana [Lahti y col., 1980; Dreborg y Foucard, 1983; Löwenstein y Eriksson, 1983; Halmeपुरo y col., 1984; Halmeपुरo y Löwenstein, 1985]. Asimismo, la alergia a polen de artemisa se ve frecuentemente acompañada de síntomas similares producidos por la ingestión de zanahoria o apio [Wüthrich y col., 1990], y algo similar ocurre con el polen de ambrosía y algunas frutas como el melón y el plátano [Anderson y col., 1970; Enberg y col., 1987]. Entre los alimentos de origen animal también se produce este tipo de reacciones cruzadas, por ejemplo, la alergia alimentaria a caracoles es común entre pacientes alérgicos a ácaros [Ardito y col., 1990].

En el caso del polen del abedul, el alérgeno más importante implicado en la reacción cruzada con frutas es Bet v 1 [Calkhoven y col., 1987; Ebner y col., 1991]. Por otra parte, las profilinas parecen ser responsables de la reactividad cruzada entre una amplia variedad de alimentos vegetales [Calkhoven y col., 1987; Vallier y col., 1988; Van Toorenbergen y col., 1988]. Como en el caso de Bet v 1, los síntomas clínicos relacionados con las profilinas parecen estar restringidos al consumo de vegetales crudos [Van Ree y Aalberse, 1993].

Además de Bet v 1 y las profilinas, los azúcares de algunas glicoproteínas también están implicados en la reactividad cruzada entre pólenes y frutas. Aún no se ha establecido, sin embargo, el valor que dicha reactividad cruzada puede tener a nivel clínico [Van Ree y Aalberse, 1993].

DIAGNOSIS Y TRATAMIENTO

No existe una referencia internacional disponible para alérgenos alimentarios. Algunos alimentos como la leche de vaca o el huevo son de composición conocida, pero la mayoría de los extractos comerciales para diagnóstico de alergia a alimentos son de características desconocidas [Dreborg, 1991].

La práctica del Prick-test con el alimento fresco, llamada "*prick by prick*" ha dado buenos resultados para frutas, hortalizas y frutos secos. Consiste en realizar una punción en el alimento e, inmediatamente después, en la piel del paciente, de la forma habitual [Dreborg y Foucard, 1983].

La utilización de extractos alimentarios para diagnóstico *in vitro* ofrece los mismos problemas de falta de patrón de referencia que presentan las pruebas cutáneas. La correlación de estos dos métodos diagnósticos suele ser buena, pero existe gran variabilidad según cual sea el alimento considerado [Chua y col., 1976; Campbell y col., 1987; Sampson y Albergo, 1984].

Tradicionalmente se ha considerado que el único tratamiento para la alergia a alimentos son las dietas de eliminación. En los EE.UU., donde se estima que pueden producirse más muertes por anafilaxia a alimentos que por picaduras de insectos [Yunginger, 1992], se estableció un programa interestatal de desensibilización al cacahuete por vía parenteral. Desgraciadamente, dicho estudio tuvo que ser interrumpido debido a la muerte, por un error técnico, de uno de los pacientes del grupo de control. En ese momento, los tres únicos pacientes que habían finalizado el estudio toleraban perfectamente la dosis de mantenimiento [Oppenheimer y col., 1992]. Hasta ahora, no existe ningún otro estudio clínico que aclare la eficacia de la inmunoterapia en el caso de las alergias alimentarias.

EL ALERGENO PRINCIPAL DE LA MOSTAZA, Sin a 1

Sin a 1 es una proteína de 14100 Da, aislada de semillas de *Sinapis alba* (mostaza amarilla), cuyo análisis de aminoácidos revela un contenido en glutamina y prolina de alrededor del 35% del total, mientras que los aminoácidos básicos suponen alrededor de un 15%, y la cisteína un 7% aproximadamente [Menéndez-Arias y col., 1987]. Estos datos relacionan estrechamente a este alergeno con las albúminas 2S de otras especies vegetales. Al igual que las otras albúminas de bajo peso molecular aisladas de semillas de crucíferas, también Sin a 1 está constituida por dos cadenas polipeptídicas de distinto tamaño, (9700 Da la cadena pesada y 4300 Da la ligera), que se encuentran unidas mediante dos puentes disulfuro, existiendo, además, otros dos puentes intracatenarios en la cadena pesada. Los espectros de dicroísmo circular de Sin a 1 en el ultravioleta lejano muestran un contenido en α -hélice en su estructura secundaria en torno al 50%, mientras que el contenido en estructura β es muy pequeño o incluso inapreciable, apareciendo también varios giros β [Menéndez-Arias y col., 1987].

La estructura primaria del alergeno presenta un gran número de residuos de glutamina entre las posiciones 39-51 de la cadena pesada (figura 3), región en la que se observa la repetición de un tetrapéptido constituido por Val-X-Gln-Gln, donde X puede ser lisina o arginina, y que aparece en las posiciones 37-40 y 41-44, además de un tripéptido (Gln-Gln-Gly) que se localiza en las posiciones 47-49 y 50-52. Esta región de la cadena pesada podría desempeñar una función importante en el aporte de nitrógeno durante el proceso de germinación.

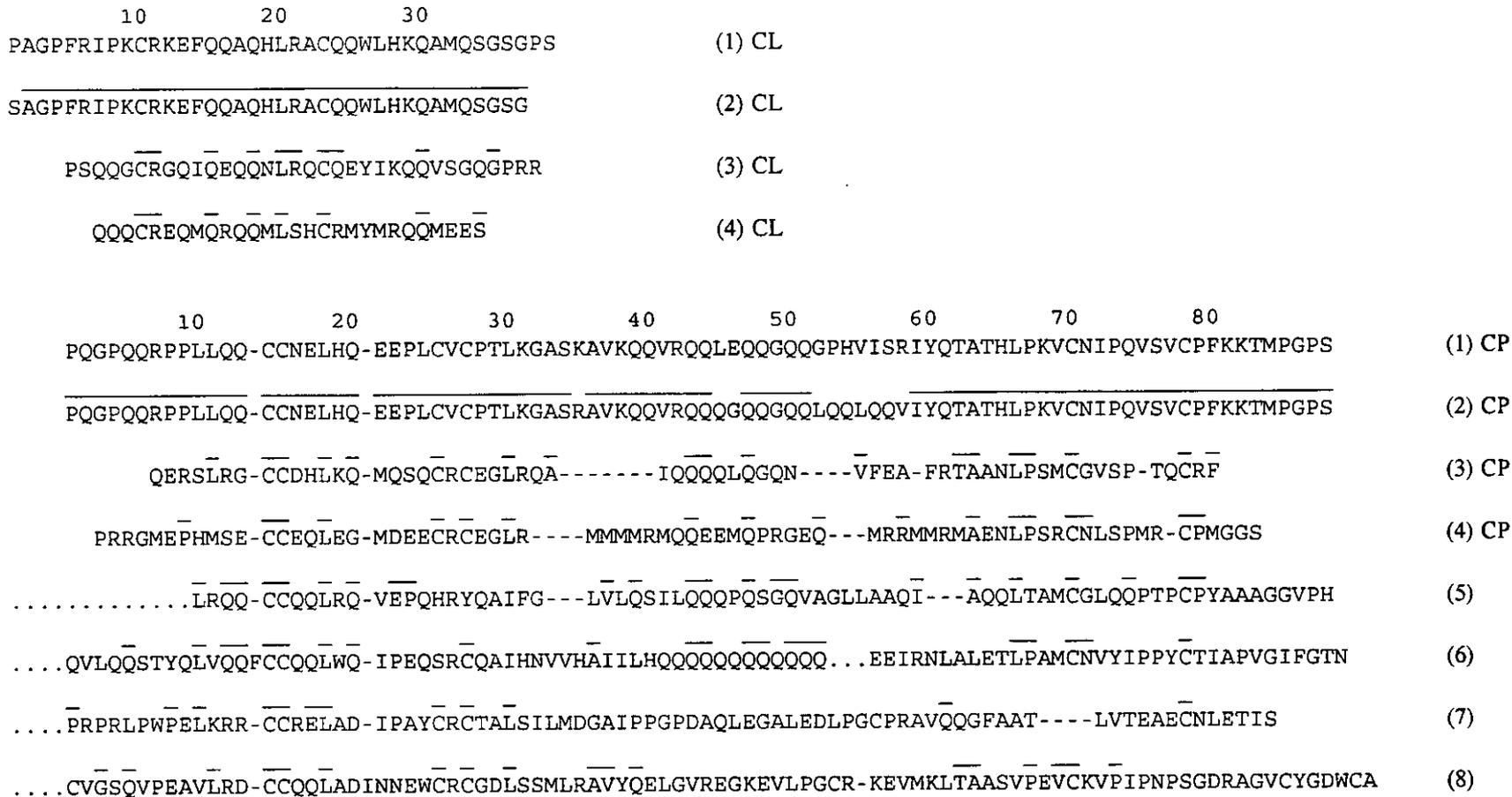


Figura 3. Comparación de las estructuras primarias del alérgeno principal de la mostaza amarilla (Sin a 1) y de otras proteínas de semillas. (1) Sin a 1; (2) napina de colza (BnII); (3) albúmina 2S del ricino; (4) albúmina 2S de la nuez del Brasil; (5) precursor de la glutelina-2 de maíz (zeína rica en prolina); (6) pre- α/β gliadina A-IV de trigo; (7) factor de inhibición de Hageman del maíz; (8) inhibidor de α -amilasa de trigo. La nomenclatura CL y CP hace referencia a la cadena ligera o pesada, respectivamente, en el caso de proteínas constituidas por dos subunidades. Los aminoácidos coincidentes con la secuencia del alérgeno de mostaza aparecen señalados con barras. Figura tomada de Menéndez-Arias y col.(1988), con modificaciones.

Cuando se comparan entre sí las secuencias de aminoácidos de las dos cadenas polipeptídicas del alérgeno, se aprecia una similitud estructural a nivel de los extremos amino y carboxilo de los dos polipéptidos que constituyen el alérgeno, observándose la localización de prolina y glicocola en posiciones homólogas, pudiendo relacionarse estos datos con el reconocimiento de secuencias o estructuras concretas por parte de las proteasas implicadas en el proceso de maduración de Sin a 1 [Monsalve y col., 1990].

Cuando la estructura primaria de ambas cadenas polipeptídicas se compara con las secuencias de diferentes proteínas almacenadas en distintos bancos de estructuras primarias de proteínas, y de secuencias derivadas de ácidos nucleicos, la máxima homología se detecta entre Sin a 1 y las albúminas 2S de otras crucíferas, ricino y nuez del Brasil [Menéndez-Arias y col., 1988]. Las cadenas pesadas de las albúminas 2S también exhiben cierta homología con otras proteínas de semillas de monocotiledóneas, como gliadinas, inhibidores de tripsina y α -amilasa, y fosfolípido transferasas (figura 3). A excepción de los alérgenos de mostaza, hasta el momento no se ha descrito ninguna otra albúmina 2S de crucíferas como trofoalérgeno. Sin embargo, las napinas podrían estar implicadas en la alergia respiratoria a colza.

Los determinantes antigénicos de Sin a 1 han sido estudiados usando anticuerpos monoclonales (mAb) de ratón [Menéndez-Arias y col., 1990]. Los ensayos de competición y complementación de 10 mAb (figura 4) revelan la existencia de dos regiones antigénicas principales en la molécula del alérgeno. Los anticuerpos empleados no reconocen las cadenas carboxiamidometiladas, a excepción del mAb denominado 2B3, el cual es capaz de unirse a la cadena pesada alquilada. Sin embargo, este anticuerpo no reconoce a la proteína nativa modificada con tetranitrometano, que sí mantiene la conformación nativa. Estos hechos sugieren que la única tirosina de Sin a 1, situada en la cadena pesada, puede ser parte de un epítipo secuencial del alérgeno. La nitración de la proteína también afecta a la unión de otros dos mAb: 4A11 y 3F3, los cuales pertenecen al mismo grupo de complementación que 2B3. Por otra parte, el anticuerpo 4A11 causa la mayor inhibición de los 10 mAb en la unión de IgE humana, lo que apunta la posibilidad de que la tirosina, y/o el determinante antigénico secuencial en el que está implicada, desempeñen un importante papel en la alergenidad de Sin a 1.

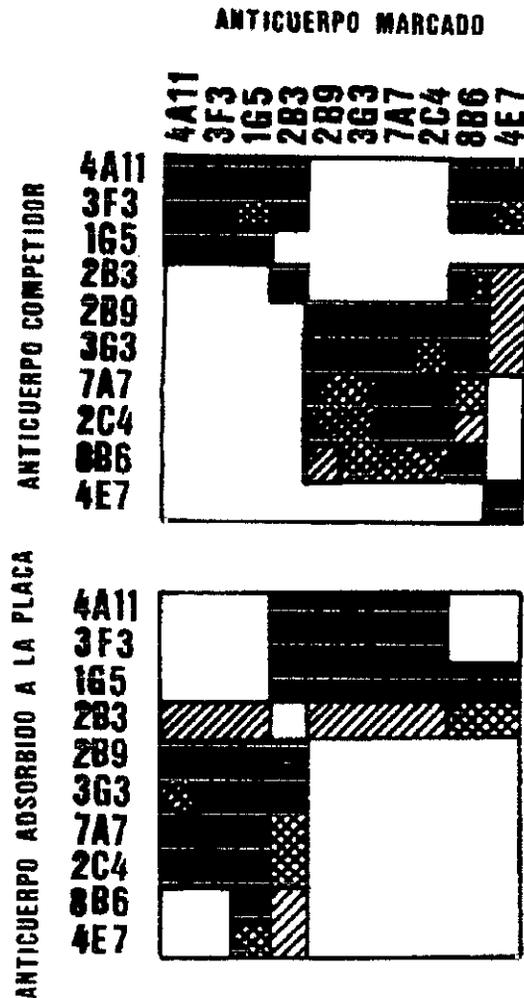


Figura 4. Patrones de competición (arriba) y complementación (abajo) de los mAb anti-Sin a 1, estudiados por ensayo de inmunoensayo indirecto. En el caso de los ensayos de competición, se representan los valores de la relación molar (R) del anticuerpo competidor necesaria para producir una inhibición del 50% de la unión del anticuerpo marcado, de la siguiente manera: los cuadros negros significan que $R < 5$, correspondiente al anticuerpo compitiendo consigo mismo; la trama formando una red, $5 \leq R < 30$; la diagonal, $30 \leq R < 100$; y los blancos indican que no hay competición a $R \geq 100$. En los ensayos de complementación, la cantidad de anticuerpo marcado unido a Sin a 1 se midió como densidad óptica (DO) a 492 nm en ELISA, estableciéndose las siguientes categorías representadas por cuadrados: blancos, $DO < 0.075$; rayados, $0.075 \leq DO < 0.5$; cruzados, $0.5 \leq DO < 1.0$; y negros, $DO \geq 1.0$. Figura tomada de Menéndez-Arias y col., 1990.

BIOLOGIA MOLECULAR APLICADA AL ESTUDIO DE ALERGENOS

En 1988, Thomas y colaboradores clonaron, por primera vez, una proteína alergénica, concretamente el alérgeno Der p 1 del ácaro *Dermatophagoides pteronissynus*. Desde entonces, se han clonado y, en menor medida, expresado como proteínas recombinantes, diversos alérgenos (tabla 5). El elevado número de alérgenos clonados en los últimos cinco años demuestra el gran impacto de la biología molecular en este campo de investigación. Cabe puntualizar, sin embargo, que convendría reservar el término 'alérgeno recombinante' para aquellos que han sido expresados completos, libres de toda secuencia "carrier" y que conservan su capacidad de unir IgE de pacientes alérgicos [Scheiner, 1992].

Aunque la secuencia de aminoácidos de los alérgenos pueda ser obtenida mediante la degradación de Edman de la proteína pura, la aplicación de esta técnica pocas veces resulta posible en la práctica. Esto se debe a que los alérgenos, obtenidos a partir de extractos de productos naturales, suelen resultar difíciles de purificar, bien porque constituyen un componente menor del extracto, bien porque poseen un elevado grado de heterogeneidad, lo que imposibilita la obtención de cantidades suficientes de una especie molecular pura. Además, la purificación de proteínas y, más aún, su posterior secuenciación, son siempre procesos muy costosos en tiempo y dinero. Por estos motivos, las técnicas de biología molecular constituyen la alternativa más conveniente para la elucidación de la estructura primaria de alérgenos.

Como resultado de la aplicación, cada vez más frecuente, de la tecnología del DNA recombinante al estudio de las proteínas alergénicas, ha sido posible conocer la estructura primaria de un número creciente de estas moléculas. Dicho conocimiento ha permitido establecer la existencia de familias de alérgenos homólogos, ya sospechada a partir de los datos de reactividad inmunológica cruzada. Además, la comparación de las secuencias de los alérgenos con las de proteínas conocidas ha posibilitado sugerir una función biológica para muchos de esos alérgenos. Así, se ha hallado homología entre las secuencias de los alérgenos de ácaros Der p 1 y Der f 1 y tiol-proteasas como la papaína o la catepsina B [Stewart y col., 1989]. También se ha demostrado que varios alérgenos de pólenes de árboles (Bet v 1, Aln g 1, Cor a 1 y Car b 1) [Walter y col., 1990] muestran un alto grado de similitud en su secuencia de aminoácidos con un grupo de proteínas que son inducidas en tejidos de plantas en respuesta a condiciones de estrés. De forma similar, se ha descubierto que Bet v 2 pertenece a la familia de las profilinas [Valenta y col., 1991], las cuales se encuentran presentes en todos los organismos eucariotas, participando en el control de la polimerización de la actina.

Tabla 5. Principales alérgenos clonados.

Origen biológico	Alérgeno	Referencia
Acaros	Der p 1	Thomas y col., 1988
	Der p 2	Chua y col., 1990
	Der f 1	Dilworth y col., 1991
	Der f 2	Trudinger y col., 1991
Pólenes	Aln g 1 (aliso)	Breiteneder y col., 1992
	Amb a 1 (ambrosía)	Rafnar y col., 1991
	Amb t 5 (ambrosía)	Gosh y col., 1991
	Bet v 1 (abedul)	Breiteneder y col., 1989
	Bet v 2 (abedul)	Valenta y col., 1991
	Bet v 3 (abedul)	Seiberler y col., 1994
	Cor a 1 (avellano)	Breiteneder y col., 1993
	Lol p 1	Perez y col., 1990
	Ole e 1 (olivo)	Villalba y col., 1994
Poa p 9	Silvanovich y col., 1991	
Animales domésticos	Fel d 1 (gato)	Morgenstern y col., 1991
Venenos de insectos	Api m 1 (abeja)	Kuchler y col., 1989
	Dol m 2 (avispa)	Lu y col., 1994
	Dol m 5 (avispa)	Fang y col., 1988
	Myr p 1 (hormiga)	Donovan y col., 1993
Alimentos	Met e 1 (langostino)	Leung y col., 1994

Recientemente, también se ha caracterizado a Bet v 3 como una proteína capaz de unir Ca^{2+} [Seiberler y col., 1994]. Finalmente, se ha visto que el alérgeno principal del polen del olivo (Ole e 1) forma parte de una familia de proteínas específicas de polen [Villalba y col., 1994] cuya función, aunque aún desconocida, parece estar relacionada con la germinación del grano de polen [Muschiatti y col., 1994].

La disponibilidad de alérgenos recombinantes abre la posibilidad de abordar desde una nueva perspectiva el mapeo de epítomos implicados en el reconocimiento por linfocitos B y T. De esta forma se han estudiado epítomos en alérgenos de ácaros [Nishiyama y col., 1994] y pólenes [Bufe y col., 1994].

Otros campos en los que el uso de alérgenos recombinantes muestra un gran potencial son el diagnóstico y la inmunoterapia. El uso de alérgenos recombinantes individuales para diagnóstico *in vivo* e *in vitro*, en lugar de extractos alérgicos, permitirá determinar todos los alérgenos a los que el paciente está sensibilizado, posibilitando así el empleo de mezclas de hiposensibilización adaptadas a las necesidades individuales específicas de cada paciente.

Hasta el momento, no existen ensayos clínicos que permitan evaluar la terapia con alérgenos recombinantes. Posiblemente, pronto pueda disponerse de datos en pacientes alérgicos a polen de abedul, debido a la disponibilidad de Bet v I recombinante y al pequeño número de proteínas alérgicas presentes en dicho material biológico. Sin embargo, las perspectivas a corto plazo no son tan buenas para otros extractos, ya que pueden ser necesarios varios años para disponer del número de alérgenos recombinantes necesario para una inmunoterapia efectiva. Por otra parte, la posibilidad de producir formas recombinantes modificadas de un alérgeno, abre las puertas a formas enteramente nuevas de inmunoterapia.

OBJETIVOS DE LA PRESENTE INVESTIGACION

Como hemos visto, la producción de alérgenos recombinantes puede aportar valiosa información estructural y funcional, así como nuevos datos acerca de cómo estas proteínas promueven la respuesta alérgica en individuos sensibles. Hasta el momento, la expresión de alérgenos recombinantes se ha limitado fundamentalmente a los procedentes de ácaros y de pólenes de plantas [Scheiner, 1992]. Sólo muy recientemente ha sido expresado en *E. coli* un alérgeno de alimentos, la tropomiosina de langostino (Met e 1) [Leung y col., 1994].

En nuestro laboratorio se llevó a cabo el aislamiento y la secuenciación del alérgeno de la mostaza amarilla, Sin a 1 [Menéndez-Arias y col., 1987; 1988], así como diversos estudios inmunológicos sobre esta proteína [Menéndez-Arias y col., 1990]. Basándonos en estos datos, nos proponemos profundizar en el estudio de las propiedades alérgicas de esta molécula. Los objetivos de la investigación aquí planteados pueden resumirse en los siguientes puntos:

- 1.- Clonaje y expresión en *E. coli* de una forma recombinante de Sin a 1 que conserve intactas la mayor parte de sus propiedades antigénicas y alérgicas.
- 2.- Estudio de la estabilidad de la actividad alérgica de Sin a 1 frente a diversas enzimas proteolíticas del tracto digestivo.
- 3.- Localización en Sin a 1 de regiones implicadas en su unión a IgE de pacientes alérgicos a mostaza.

MATERIALES Y METODOS

MATERIALES

Bacterias

Las cepas de *E. coli* utilizadas fueron: TG1 (*supE hsdΔ5 thi Δ(lac-proAB)* F'[*traD36 proAB⁺ lacI^h lacZΔM15*]) [Gibson, 1984]; DH5αF' (*supE44 ΔlacU169 (φ80 lacZΔM15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1* F') [Hanahan, 1983]; JA221 (*lpp⁻ hsdM⁺ trpE5 leuB6 lacY recA1/F' lacI^h lac⁺ pro⁺*) [Nakamura e Inouye, 1979]; RB791 (W3110 *lacI^h L8*) [Brent y Ptashne, 1978]; *lon-1* (*thr-1 leuB6 thi-1 argE3 hisG4 proA2 lon-1 lacY1 galK2 mtl-1 xyl-5 ara-14 strA31 tsx-33 λ⁻ supE44*) [Howard-Flanders y col., 1964].

Medios de cultivo

El medio de cultivo empleado para el crecimiento de las bacterias fue Luria-Bertani (LB) [Maniatis y col., 1982]. Para el cultivo de bacterias transformadas con plásmidos, se añadió ampicilina hasta una concentración final de 100 μg/ml. El cultivo en medio sólido se llevó a cabo en placas con el mismo medio LB conteniendo agar 15 g/l.

Oligonucleótidos

Los oligonucleótidos sintéticos empleados fueron sintetizados en el Departamento de Biología Funcional de la Facultad de Medicina de la Universidad de Oviedo, utilizando un sintetizador de DNA de Applied Biosystems, modelo 381A, de acuerdo a procedimientos estándar [Sambrook y col., 1989].

Plásmidos

El plásmido pUC18 [Norrander y col., 1983] se utilizó en la subclonación de los productos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Para la expresión de secuencias nucleotídicas en *E. coli* se emplearon los plásmidos pCE17 [Sánchez-Puelles y col., 1990], pIN-III-A2 [Masui y col., 1984], pIN-III-*ompA*-2 [Ghrayeb y col., 1984], pTrc 99A [Amann y col., 1988], y pGEX-2T [Smith y Johnson, 1988]. Los tres primeros nos fueron proporcionados amablemente por el Dr. José Luis García López, del Centro de Investigaciones Biológicas de Madrid. Los otros dos fueron suministrados por Pharmacia.

Enzimas para la manipulación del DNA

Las enzimas de restricción *EcoRI*, *BamHI* y *HindIII*, así como la T4 DNA ligasa fueron suministradas por Boehringer.

Semillas de crucíferas

Las semillas de mostaza amarilla (*Sinapis alba*) fueron proporcionadas por Herborem (Madrid). Las semillas de colza (*Brassica napus*) nos fueron suministradas por el Instituto Nacional de Investigaciones Agronómicas de Madrid.

Sueros de individuos alérgicos

Los sueros de pacientes alérgicos a mostaza nos fueron amablemente suministrados por las Dras. M^a Luisa González y M^a Isabel Esteban de la Unidad de Alergia del Hospital General de Segovia, y por los Dres. Manuel Martín Esteban y Cristina Pascual del Departamento de Inmunoalergia del Hospital Infantil "La Paz" de Madrid.

El suero de un paciente alérgico a colza fue generosamente suministrado por la Dra. Ana Fiandor, de la Unidad de Alergia del Hospital General de Guadalajara.

Extractos digestivos humanos

La secreción gástrica humana nos fue amablemente proporcionada por la Dra. Mercedes Barba, del Laboratorio de Gastroenterología del Hospital Ramón y Cajal de Madrid.

TECNICAS BASICAS DE MANIPULACION DE DNA

Electroforesis en geles de agarosa

El análisis de fragmentos de DNA se llevó a cabo mediante electroforesis en geles de agarosa (U.S. Biochemical Corp.) al 1-2%, en tampón TAE (Tris-acetato 40 mM pH 8.0, EDTA 2 mM), de acuerdo con el procedimiento descrito por Maniatis y col. (1982). Para las electroforesis preparativas se utilizaron geles de agarosa de bajo punto de fusión (U.S. Biochemical Corp.) al 1.5%, y el desarrollo se realizó a 4°C. El DNA se visualizó por tinción con bromuro de etidio e iluminación con luz ultravioleta [Sharp y col., 1973].

Aislamiento de plásmidos y fragmentos de DNA

La purificación de fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa o de mezclas de PCR se realizó utilizando el "kit" comercial Wizard™ PCR Preps, de Promega, siguiendo las instrucciones del fabricante.

El DNA plasmídico se aisló por el método de lisis alcalina descrito por Maniatis y col. (1982). Cuando fue necesario para su secuenciación, los plásmidos fueron purificados mediante el uso del "kit" Wizard™ MiniPreps de Promega.

Digestión de DNA con enzimas de restricción

Las digestiones de DNA con enzimas de restricción y las ligaciones de los fragmentos se llevaron a cabo según las indicaciones de Maniatis y col. (1982) y de las firmas suministradoras de las correspondientes enzimas.

Transformación de células competentes de *Escherichia coli*

La preparación de células competentes de las distintas cepas de *E. coli* utilizadas se realizó mediante el método del cloruro de rubidio [Hanahan, 1983].

Se añadieron entre 10 y 100 ng de DNA plasmídico a 200 μ l de células competentes recién descongeladas. Tras mantenerla en hielo durante 15 minutos, la mezcla de transformación se calentó 3 minutos a 37°C y se volvió a enfriar en hielo de nuevo. A continuación, se añadieron 800 μ l de medio LB y se incubaron las células durante 1 hora a 37°C. Las colonias transformantes se seleccionaron en placas de LB-agar con ampicilina.

AISLAMIENTO DE DNA GENOMICO DE SEMILLAS DE *Sinapis alba*

El DNA genómico fue aislado de la harina obtenida de la molturación de semillas de *S. alba*, por un procedimiento derivado de Murray y Thompson (1980). Se suspendieron 0.1 g de harina de semillas en 600 μ l de tampón CTAB (Tris-HCl 50 mM pH 8.0, EDTA 10 mM, bromuro de cetiltriethylamonio 1%) con NaCl 0.7 M y β -mercaptoetanol 1%, y se incubó la mezcla a 56°C durante 20 minutos, agitando vigorosamente varias veces. A continuación, se añadieron 600 μ l de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1), se emulsionó la mezcla y se centrifugó a 12000 g a temperatura ambiente durante 5 minutos. Se recogió la fase acuosa y se le añadieron 600 μ l de tampón CTAB. Tras mezclar bien, se incubó a temperatura ambiente durante 20 minutos y después se centrifugó durante 10 minutos en las mismas condiciones anteriores. El sedimento se redisolvió en 400 μ l de NaCl 1 M y a continuación se llevó a cabo una extracción con fenol:cloroformo (1:1), seguida de una precipitación con etanol, según los métodos descritos por Maniatis y col. (1982). La muestra se redisolvió en 200 μ l de tampón TE (Tris-HCl 10 mM, pH 7.6) y se trató con RNasa 0.1 mg/ml (Sigma) durante 2 horas a 37°C. Tras una nueva precipitación con etanol, el DNA se disolvió en 50 μ l de agua estéril. La concentración de DNA se estimó mediante el método de Cesarone y col. (1979) en un fluorímetro modelo TKO 100 (Hoefer Scientific Instruments).

AMPLIFICACION DE DNA MEDIANTE PCR

La secuencia genómica que codifica el precursor de Sin a 1 sin el péptido señal fue amplificada mediante PCR usando oligonucleótidos cebadores no degenerados correspondientes a los extremos N y C-terminales de dicho alérgeno [Menéndez-Arias y col., 1988]. En los extremos 5' de los cebadores se incorporaron diferentes dianas de restricción, con el fin de insertar los productos resultantes de la amplificación en los vectores plasmídicos deseados [Scharf y col., 1986].

Fueron amplificados 50 ng de DNA genómico en 100 μ l de mezcla de reacción conteniendo dNTPs (200 μ M cada uno), los dos cebadores (1 μ M cada uno), y 2 unidades de *Taq* polimerasa (Boehringer) en el tampón comercial suministrado con dicha enzima. Para reamplificar los productos, se utilizó 1 ng del molde en la misma mezcla de reacción. Todas las reacciones fueron llevadas a cabo por cuadruplicado en un aparato Techne Cycler PHC-3 (New Brunswick Scientific).

Los programas utilizados fueron los siguientes:

Para amplificar DNA genómico:

5 ciclos:	94°C	durante	1	minuto
	47°C	"	1	"
	72°C	"	1.5	"
20 ciclos:	94°C	durante	1	minuto
	55°C	"	1.5	"
	72°C	"	1.5	"

Para reamplificar productos de PCR y secuencias clonadas:

30 ciclos:	94°C	durante	15	segundos
	50°C	"	15	"
	72°C	"	1	minuto

En ambos casos, el programa fue precedido de una etapa de desnaturalización a 95°C durante 15 minutos, y seguido de una etapa final de elongación a 72°C durante 10 minutos.

SECUENCIACION DE DNA

Tras su purificación, los plásmidos recombinantes se desnaturalizaron con NaOH 0.2 N/EDTA 0.2 mM [Hattori y Sakaki, 1986]. La secuenciación del DNA bicatenario se llevó a cabo según las instrucciones del "kit" comercial Sequenase versión 2.0 (U.S. Biochemical Corp.), basado en el método de terminación de cadena por dideoxirribonucleótidos [Sanger y col., 1977]. Como nucleótido marcador se empleó ³⁵S- α -ATP (Amersham), y como cebadores se usaron: M13 Sequencing Primer (-40) de U.S.

Biochemical Corp., M13 Reverse Sequencing Primer (-48) de Biolabs, y oligonucleótidos sintéticos derivados de las secuencias obtenidas.

Las reacciones de secuenciación se analizaron por electroforesis en geles de poliácridamida (30 x 40 x 0.05 cm) al 6% en TBE (Tris-borato 45 mM, pH 8.0, EDTA 1 mM) en condiciones desnaturalizantes (urea 7 M). A continuación, los geles se fijaron en una solución de metanol al 10% y ácido acético al 10%, se secaron a vacío a 80°C durante 90 minutos, y se sometieron a autorradiografía.

EXPRESION Y PURIFICACION DEL ALERGENO RECOMBINANTE

Inducción de cultivos de E. coli

Las células de *E. coli* transformadas con las correspondientes construcciones de expresión se incubaron a 37°C en medio LB con ampicilina hasta que los cultivos alcanzaron la fase estacionaria (8-12 horas). A continuación se diluyeron 1:10 en medio fresco y se volvieron a incubar en las mismas condiciones hasta que la densidad óptica a 600 nm alcanzó un valor entre 0.6 y 0.8. Seguidamente se añadió isopropiltiogalactósido (IPTG) hasta una concentración 1 mM y se incubó durante otras 3 horas a 37°C. Después, los cultivos se centrifugaron, descartándose el sobrenadante.

Aislamiento de fracción periplásmica

Se resuspenden cuidadosamente las bacterias en tampón Tris-HCl 33 mM, pH 7.0, EDTA 33 mM, a razón de 5 ml/g de células. A continuación se añade un volumen de sacarosa al 40% en agua, y se agita la muestra suavemente durante 10 minutos a temperatura ambiente. Después se centrifuga la muestra, se descarta el sobrenadante, y se resuspende cuidadosamente el sedimento celular en agua destilada a 4°C (10 ml/g de células). Tras incubar la muestra a 4°C con agitación suave durante 10 minutos, se vuelve a centrifugar, obteniéndose la fracción de periplasma en el sobrenadante.

Obtención de la fracción soluble de lisados bacterianos

Las bacterias se resuspendieron en 1/20 volúmenes de cultivo de tampón PBS (NaCl 140 mM, KCl 2.7 mM, KH₂PO₄ 1.5 mM, Na₂HPO₄ 8.1 mM, pH 7.3) conteniendo fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 1 mM y fueron lisadas mediante sonicación. Para ello se sometieron a cinco periodos de sonicación (20 kc en un aparato MSE) de 30 segundos de duración cada uno separados entre sí por 30 segundos. Durante todo el proceso de sonicación, la muestra se mantuvo inmersa en hielo.

Tras la lisis, se añadió Triton X-100 hasta el 1% (v/v) y se mantuvo la muestra a 4°C en agitación magnética suave durante 30 minutos para favorecer la solubilización de las proteínas. A continuación, el lisado se centrifugó a 12000 g durante 10 minutos y se procedió a separar las fracciones soluble e insoluble.

Purificación de Sin a 1 recombinante expresado como proteína de fusión con la glutatión-S-transferasa de *Schistosoma japonicum* (GST)

La fracción soluble del lisado se incubó durante 1 hora con agitación suave a temperatura ambiente con glutatión-Sepharosa 4B (Pharmacia) a una relación de 0.5 ml de resina por cada litro de cultivo original. A continuación se centrifugó la muestra a 500 g durante 5 minutos y se desechó el sobrenadante. La resina se lavó 3 veces con 10 volúmenes de PBS, separando tras cada lavado el sobrenadante mediante una centrifugación realizada en las condiciones anteriormente descritas. Una vez retirado el exceso de tampón, se añadió 1 volumen de PBS conteniendo 1 μ l/ml de trombina concentrada de Pierce (1 μ l de enzima equivale aproximadamente a 10 unidades NIH) y la mezcla se incubó con agitación suave a temperatura ambiente durante 1 hora. Tras la digestión, se sedimentó la resina (a la que permaneció unida la GST) mediante centrifugación en microfuga y se recogió el sobrenadante, el cual contenía el alérgeno recombinante liberado. La proteína unida a la resina pudo liberarse de la misma mediante un lavado con un volumen de Tris-HCl 50 mM, pH 8.0 conteniendo glutatión reducido 10 mM.

AISLAMIENTO Y PURIFICACION DE ALBUMINAS 2S

El aislamiento del alérgeno de mostaza, Sin a 1, y de las napinas de colza, se realizó a partir de la harina obtenida por molturación de las correspondientes semillas, según los métodos descritos por [Menéndez-Arias y col., 1987] y [Monsalve y Rodríguez, 1990], respectivamente.

ELECTROFORESIS DE PROTEINAS EN GELES DE POLIACRILAMIDA

Se realizó en un sistema discontinuo, de acuerdo al procedimiento descrito por Laemmli (1970). La polimerización de los geles de poliacrilamida y el desarrollo de la electroforesis se llevó a cabo en un aparato Mini-Protean II de Bio-Rad. Los geles fueron de 0.75 mm de espesor, 7 cm de alto y 8 cm de ancho. En cada pocillo (de 5 mm) se aplicaron de 1 a 10 μ g de proteína, o bien lisado de células correspondiente a 50-100 μ l de cultivo, en un volumen máximo de 20 μ l.

Se prepararon geles homogéneos al 15% de poliacrilamida, con un gel concentrante del 4%. Las muestras de proteína se disolvieron en tampón de aplicación (Tris-HCl 50 mM, pH 6.8, SDS 2%, azul de bromofenol 0.1%, glicerol 10%) o el mismo tampón con β -mercaptoetanol al 5%, en cuyo caso se calentaron a 80°C durante 20 minutos antes de su aplicación en el gel. La electroforesis se llevó a cabo en un tampón compuesto por Tris-base 25 mM, glicina 192 mM y SDS al 0.1%. La corriente (25 mA por gel) se aplicó hasta que el marcador (azul de bromofenol) comenzó a salir del gel.

Las proteínas se detectaron mediante tinción con azul brillante de Coomassie R-250 [Fairbanks y col., 1971] durante 15 minutos en una disolución que contenía: Coomassie Brilliant Blue R-250 al 0.3% (p/v), metanol al 45% (v/v) y ácido acético al 10% (v/v). El exceso de colorante se eliminó por sucesivos lavados en ácido acético al 7.5%.

Como patrones de peso molecular se utilizaron las proteínas contenidas en el "kit" MW-SDS-70L de Sigma, que son las siguientes:

- Albúmina se suero bovino	(66000 Da)
- Ovalbúmina de clara de huevo de gallina	(45000 Da)
- Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa de músculo de conejo (subunidad)	(36000 Da)
- Anhidrasa carbónica de eritrocito bovino	(29000 Da)
- Tripsinógeno de páncreas bovino	(24000 Da)
- Inhibidor de tripsina de soja	(20100 Da)
- α -lactalbúmina de leche de vaca	(14200 Da)

TRANSFERENCIA ELECTROFORETICA DE PROTEINAS A MEMBRANAS

Se llevó a cabo esencialmente de acuerdo al procedimiento descrito por Towbin y col., (1979). Como membranas inmovilizantes se utilizaron láminas de nitrocelulosa (Bio-Rad) o Immobilon PVDF (Millipore). La transferencia se realizó en tampón Tris-base 48 mM, glicina 39 mM, SDS 0.0375%, Metanol 20%, a una intensidad de corriente constante de 1 mA/cm² durante 1 hora.

Para comprobar la eficacia de la transferencia a membranas de nitrocelulosa, las proteínas se visualizaron mediante tinción en una disolución de rojo Ponceau al 0.5% (p/v) en ácido acético 1 M, destiñéndose a continuación el fondo con varios lavados en ácido acético 1 M. En el caso de la transferencia a membranas de Immobilon, las proteínas se tiñeron con azul brillante de Coomassie (R-250) al 0.1% en metanol (20%), ácido acético (1)%, durante 1 minuto, seguido de lavados en metanol al 50%.

ESPECTROS DE ABSORCION ULTRAVIOLETA

La obtención del espectro ultravioleta de ácidos nucleicos y proteínas se llevó a cabo en cubetas de 1 cm de paso óptico, empleándose un espectrofotómetro Beckman modelo DU-7. Para eliminar la dispersión óptica, se corrigió el espectro obtenido a partir de la relación existente entre la absorción y $1/\lambda^4$.

ANALISIS DE AMINOACIDOS

Las muestras de proteína (0.1-2 nmoles) se hidrolizaron en 0.2 ml de HCl azeótropo 6 N conteniendo fenol al 0.1% (p/v) y norleucina como estándar interno, en tubos cerrados a vacío a 105°C durante 24 horas. Los hidrolizados fueron analizados en un equipo Beckman modelo system 6300 conectado a un módulo de interfase analógica System Gold. A partir de los datos del análisis se determinó la composición de aminoácidos en % molar así como la cantidad de proteína hidrolizada en cada caso.

AISLAMIENTO DE LAS SUBUNIDADES DEL ALERGENO

Reducción y carboxiamidometilación del alergeno

Se disolvieron 3 mg de Sin a 1 en 0.5 ml de tampón Tris-HCl 1 M, pH 8.5, conteniendo cloruro de guanidinio 6 M y EDTA 2 mM. La reducción se consiguió añadiendo ditioneitol (DTT) sólido hasta alcanzar una concentración final de 0.1 M, gaseando la mezcla con nitrógeno e incubándola a 37°C durante 90 minutos.

Para llevar a cabo la carboxiamidometilación de las cadenas reducidas, se añadió a la mezcla anterior iodoacetamida a una concentración final de 150 mM, y se incubó durante otros 90 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad.

Separación de las cadenas

La separación de las cadenas reducidas y carboxiamidometiladas se realizó mediante una cromatografía de penetrabilidad en Sephadex G-50 fine, en una columna de dimensiones 46 x 2 cm, equilibrada en bicarbonato amónico 0.1 M, pH 8.0. De esta forma se logró separar tanto los componentes polipeptídicos como los reactivos en exceso. Antes de aplicar la muestra se le añadieron 0.5 ml del mismo tampón en el que está equilibrada la columna. Se recogieron fracciones de 2.5 ml, registrándose la transmitancia del eluido en un espectrofotómetro de flujo continuo Uvicord II (LKB). Las fracciones correspondientes a cada una de las dos subunidades se identificaron a partir del perfil de absorbancia del eluido a 230 nm, obtenido en un espectrofotómetro Beckman modelo DU-7.

SECUENCIACION AUTOMATICA DE PROTEINAS

La secuencia amino-terminal de proteínas se determinó mediante degradación automática de Edman, en un secuenciador de fase gaseosa-pulsos líquidos Applied Biosystems modelo 477A en el Departamento de Biología Funcional de la Facultad de Medicina de la Universidad de Oviedo, utilizando el programa estándar, en presencia de polibreno [Tarr y col., 1978]. Los derivados feniltiohidantoínicos (PTHs) de los

aminoácidos fueron identificados y cuantificados mediante un analizador de PTHs, modelo 120A, de la misma casa comercial [Hewick y col., 1981].

En el caso de proteínas adsorbidas a Immobilon, se recortó la banda proteica de la membrana y se aplicó directamente al secuenciador bajo las condiciones descritas [Legendre y Matsudaira, 1988].

OBTENCION DE ANTICUERPOS ESPECIFICOS FRENTE A Sin a 1

Suero policlonal

Se obtuvo mediante la inmunización de conejos con el alergen Sin a 1. El procedimiento de inmunización se realizó una vez por semana, durante un periodo total de seis, inyectando a los conejos, intramuscularmente, 0.5 ml de una disolución del alergen (0.5 mg/ml) en tampón PBS, a la que se le añadieron 0.7 ml de adyuvante de Freund completo. Esta disolución se preparó en el momento de realizar la inyección y debe ser emulsionada previamente.

Al cabo de las seis semanas se llevó a cabo la sangría del conejo, extrayéndose unos 60 ml de sangre a través de la vena marginal. A partir de esta sangre se obtuvo el suero, que contiene las inmunoglobulinas específicas para el alergen Sin a 1. A continuación, si hace falta mayor cantidad de suero, pueden inyectarse intramuscularmente unos 100 μ g del antígeno disueltos en PBS y emulsionados con adyuvante de Freund completo. Tras estos "recuerdos", los conejos pueden sangrarse transcurridos 10 días, de la misma forma que se describió anteriormente. Sucesivos recuerdos habrán de espaciarse en el tiempo por periodos de uno o dos meses.

Para poder utilizar el suero obtenido en ensayos de inmunodetección de proteínas recombinantes en lisados de *E. coli*, es necesario eliminar aquellos anticuerpos que reconozcan proteínas bacterianas. Para ello, se procedió a la precipitación de dichos anticuerpos de la siguiente manera:

- Se diluye el suero 1:10 en PBS/Tween 20 0.05% y se le añaden 100 μ l de lisado bacteriano (que no exprese la proteína recombinante).
- Se incuba la mezcla durante 2 horas a 4°C con agitación suave.
- Se centrifuga la muestra a 10000 g durante 10 minutos y se descarta el sedimento.
- Se añaden otros 100 μ l de lisado y se repiten la incubación y la centrifugación anteriores. La fracción soluble resultante puede usarse para detectar de forma específica al alergen recombinante en lisados de *E. coli*.

Anticuerpos monoclonales

Los hibridomas productores de anticuerpos monoclonales se obtuvieron tras inmunizar ratones BALB/c con la fracción 2S de semillas de *S. alba*, según el protocolo de Köhler y Milstein (1975). Los sobrenadantes de cultivo fueron gentilmente cedidos por los Drs. J. Domínguez e I. Moneo, del Centro Especial "Ramón y Cajal" de Madrid.

La determinación de los isotipos correspondientes a las inmunoglobulinas producidas por los distintos hibridomas se hizo mediante ELISA indirecto [Menéndez-Arias y col., 1990].

ENZIMOINMUNOENSAYO (ELISA) INDIRECTO

Todos los ensayos se llevaron a cabo en placas Costar de 96 pocillos de fondo plano (cada uno de ellos de 0.32 cm² de superficie) y de alta capacidad de unión. Para cada punto se realizaron un mínimo de dos determinaciones independientes.

Titulación de anticuerpos

Se realizó del siguiente modo:

- 1.- Fijación del antígeno (100 ng/pocillo en 100 μ l de PBS) durante 12-16 h a 4°C.
- 2.- Bloqueo de los sitios de unión inespecíficos con 200 μ l de tampón de saturación (PBS / Tween 20 0.1% / leche en polvo 3%) durante 1 hora a 37°C.
- 3.- Incubación con las distintas diluciones del anticuerpo (100 μ l/pocillo) en tampón de saturación a 37°C durante 1 hora (ó 2 horas, cuando se pretendía titular IgE).
- 4.- Incubación con el segundo anticuerpo (100 μ l/pocillo) diluido en tampón de saturación a 37°C durante 1 hora. Para el suero de conejo se usó como segundo anticuerpo una dilución 1:3000 de anti-IgG de conejo obtenida en cabra (GAR) conjugada con peroxidasa (Bio-Rad), para los anticuerpos monoclonales se utilizó una dilución 1:5000 de anti-IgG de ratón obtenida en cabra (GAM) conjugada con peroxidasa (Pierce) y en el caso de suero humano (pacientes alérgicos) se empleó un anticuerpo monoclonal anti-IgE humana obtenido en ratón (1:5000) y cedido generosamente por los laboratorios Abelló (Madrid). En este último caso, se debe realizar una última incubación con GAM marcado con peroxidasa (1 hora a 37°C).
- 5.- Adición del sustrato de la peroxidasa (OPD 0.63 mg/ml) en citrato sódico 0.1 M, pH 5, con un 4% de metanol y un 0.03 % de H₂O₂ (100 μ l/pocillo).
- 6.- Detención de la reacción con 100 μ l de ácido sulfúrico 3 N.
- 7.- Lectura de la densidad óptica de cada pocillo a 492 nm en un lector de ELISA Uniskan II (Flow Labs.).

Ensayos de inhibición

Se preincubaron mezclas de 105 μ l de anticuerpo junto con 105 μ l de las distintas diluciones del antígeno que queríamos usar como inhibidor. La dilución del anticuerpo utilizada correspondió a la concentración del mismo necesaria para que en su titulación mediante ELISA indirecto la densidad óptica a 492 nm fuese de 0.5-1.0. Estas coincubaciones se mantuvieron en agitación suave a 4°C durante 14-16 horas y transcurrido ese tiempo se transfirieron 100 μ l de cada una de ellas a los distintos pocillos previamente tapizados y saturados según el mismo procedimiento descrito en el apartado anterior. A continuación se incubó la placa durante 1 hora (2 horas en el caso de la unión de IgE) a 37°C y se continuó de forma idéntica a como se ha descrito para el ELISA de titulación.

Los resultados obtenidos se expresaron como porcentaje de inhibición producido frente a concentración de inhibidor, estimándose de acuerdo a la siguiente expresión:

$$\% \text{ Inhibición} = 100 [1 - (DO_{\text{obs}} - DO_{\text{blanco}})/(DO_{\text{max}} - DO_{\text{blanco}})]$$

siendo: DO_{obs} = densidad óptica observada a 492 nm para la correspondiente concentración de inhibidor;

DO_{blanco} = densidad óptica a 492 nm en los pocillos en los que el tapizado inicial se ha hecho con tampón de dilución en lugar del alérgeno;

DO_{max} = absorción a 492 nm en aquellos pocillos en los que las coincubaciones se hacen en ausencia de inhibidor.

INMUNODETECCION DE PROTEINAS TRANSFERIDAS A SOPORTES SOLIDOS

Después de la transferencia de las proteínas del gel de poliacrilamida a la membrana de nitrocelulosa, ésta se incubó 1 hora a temperatura ambiente en tampón de saturación. Seguidamente se añadió el suero o anticuerpo diluido en el mismo tampón y se incubó 1 hora (2 horas en el caso de que se pretendiese detectar IgE) a temperatura ambiente. Después de lavar la membrana con PBS / Tween 20 0.1%, se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente con el correspondiente segundo anticuerpo diluido en el tampón de saturación (en el caso de la detección de IgE, y al igual que en el ELISA, fue necesaria una incubación adicional con GAM marcado con peroxidasa). Tras un nuevo lavado exhaustivo de la membrana, se ensayó la reacción de la peroxidasa. Para ello, cuando se trató de detectar la unión de IgG, se sumergió la membrana en una solución de 3, 3'-diaminobenzidina-HCl (DAB) a 0.3 mg/ml en PBS conteniendo un 0.05% de agua oxigenada. La reacción se detuvo sustituyendo la disolución de DAB por agua destilada. En el caso de la inmunodetección con sueros de pacientes alérgicos, y dada la baja concentración de IgE (comparada con las IgG), el

revelado se llevó a cabo mediante el método del ECL™ (Amersham), cuya sensibilidad es superior a la DAB [Rosewell y White, 1978].

ENSAYOS DE ESTABILIDAD GASTROINTESTINAL DE PROTEINAS

Hidrólisis con tripsina

La proteína sustrato se disolvió a una concentración de 0.5-1 mg/ml en bicarbonato amónico 0.2 M pH 8.0. Se añadió tripsina (Worthington) tratada con TPCK (N-tosil-L-fenilalanil clorometilcetona) hasta alcanzar una relación enzima:sustrato de 1:50 en peso. La hidrólisis se llevó a cabo a 37°C, recogiendo alícuotas a 3, 5, 8 y 24 horas. Tras la digestión, la muestra se liofilizó para ser analizada por PAGE-SDS y cromatografía líquida de alta resolución.

Hidrólisis con quimotripsina

La digestión y el análisis de los productos resultantes se llevó a cabo en las mismas condiciones descritas para la tripsina. La quimotripsina utilizada (Worthington) se trató con TLCK (N-tosil-L-lisil clorometilcetona) con objeto de inhibir la posible actividad triptica contaminante.

Hidrólisis con pepsina

Se realizó con la proteína sustrato disuelta a una concentración de 0.5-1 mg/ml en ácido fórmico al 5% (v/v). Se añadió pepsina hasta una relación en peso 1:100 con respecto al sustrato, y se incubó la mezcla en las mismas condiciones anteriormente descritas. El producto del tratamiento se analizó por PAGE-SDS y cromatografía líquida de alta resolución.

Tratamiento *in vitro* con extractos digestivos humanos

Para los ensayos de digestión *in vitro* se utilizó la secreción gástrica extraída de un individuo tras 15 minutos de estimulación con gastrina.

Se disolvieron 10 µg de proteína sustrato en 10 µl de secreción digestiva y se incubó la reacción durante 2 horas a 37°C, tras lo cual se analizaron los productos mediante PAGE-SDS.

CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCION EN FASE REVERSA (RP-HPLC)

Se llevó a cabo en un cromatógrafo Beckman equipado con dos bombas peristálticas modelo 110, un elemento organizador y controlador System Gold modelo Analog Interface Module 406 (Beckman), un detector ultravioleta de longitud de onda variable de doble canal, modelo 165, un inyector Vent 210 Altex y un registro gráfico

OmniScribe Recorder. La columna empleada para la separación de los péptidos fue una Nucleosil C18 (Scharlau) de 250 x 4.6 mm. Se recogieron fracciones de 1 ml en un microcolector Gilson TDC-80.

Las muestras se aplicaron disueltas en ácido trifluoracético (TFA) al 0.1% en agua, y como sistema de elución se empleó un gradiente lineal de acetonitrilo del 0 al 30%, con una concentración constante de TFA del 0.1%.

RESULTADOS

EXPRESION DEL ALERGENO Sin a 1 EN *E. coli*

Estrategia general

El alérgeno principal de la mostaza, Sin a 1, aparece en su forma nativa constituido por dos cadenas polipeptídicas de distinto tamaño unidas mediante dos puentes disulfuro [Menéndez-Arias y col., 1986]. En la familia de las napinas, a la que pertenece Sin a 1, estas dos cadenas se sintetizan durante la formación de la semilla en forma de un precursor que posee tres segmentos adicionales respecto a la proteína madura: uno en el extremo N-terminal, otro en la región comprendida entre las dos cadenas polipeptídicas que aparecen en la proteína nativa, y un residuo en la posición C-terminal. El alérgeno presente en la semilla madura es, por tanto, el resultado del procesamiento proteolítico postraducciona l de dicho precursor [Crouch y col., 1983; Ericson y col., 1986].

La estrategia utilizada para la expresión de Sin a 1 en *E. coli* se resume en la figura 5. En primer lugar, se procedió a amplificar mediante PCR una secuencia genómica de nucleótidos que codificara las dos cadenas polipeptídicas más la secuencia de conexión entre ambas. Los oligonucleótidos no degenerados utilizados como cebadores en dicha amplificación, SA-1 y SA-2, correspondían a secuencias que codifican, respectivamente, el extremo N-terminal de la cadena ligera y el extremo C-terminal de la cadena pesada del alérgeno. Los codones usados se seleccionaron en base a las secuencias nucleotídicas conocidas de proteínas homólogas [Crouch y col., 1983; Ericson y col., 1986; Josefsson y col., 1987; Scofield y Crouch, 1987; Baszczyński y Fallis, 1990; Raynal y col., 1991; Ericson y col., 1991]. Tras el análisis de las secuencias de los clones obtenidos, se escogió para su expresión el más similar a la estructura primaria del alérgeno natural, determinada previamente mediante degradación de Edman [Menéndez-Arias y col., 1988]. Este fragmento de DNA fue posteriormente subclonado en diferentes vectores de expresión, para lo cual se llevó a cabo una reamplificación del mismo mediante PCR, utilizando un par de cebadores que contuvieran los sitios de restricción adecuados en cada caso. Las secuencias de los distintos pares de oligonucleótidos usados como cebadores se recogen en la tabla 6.

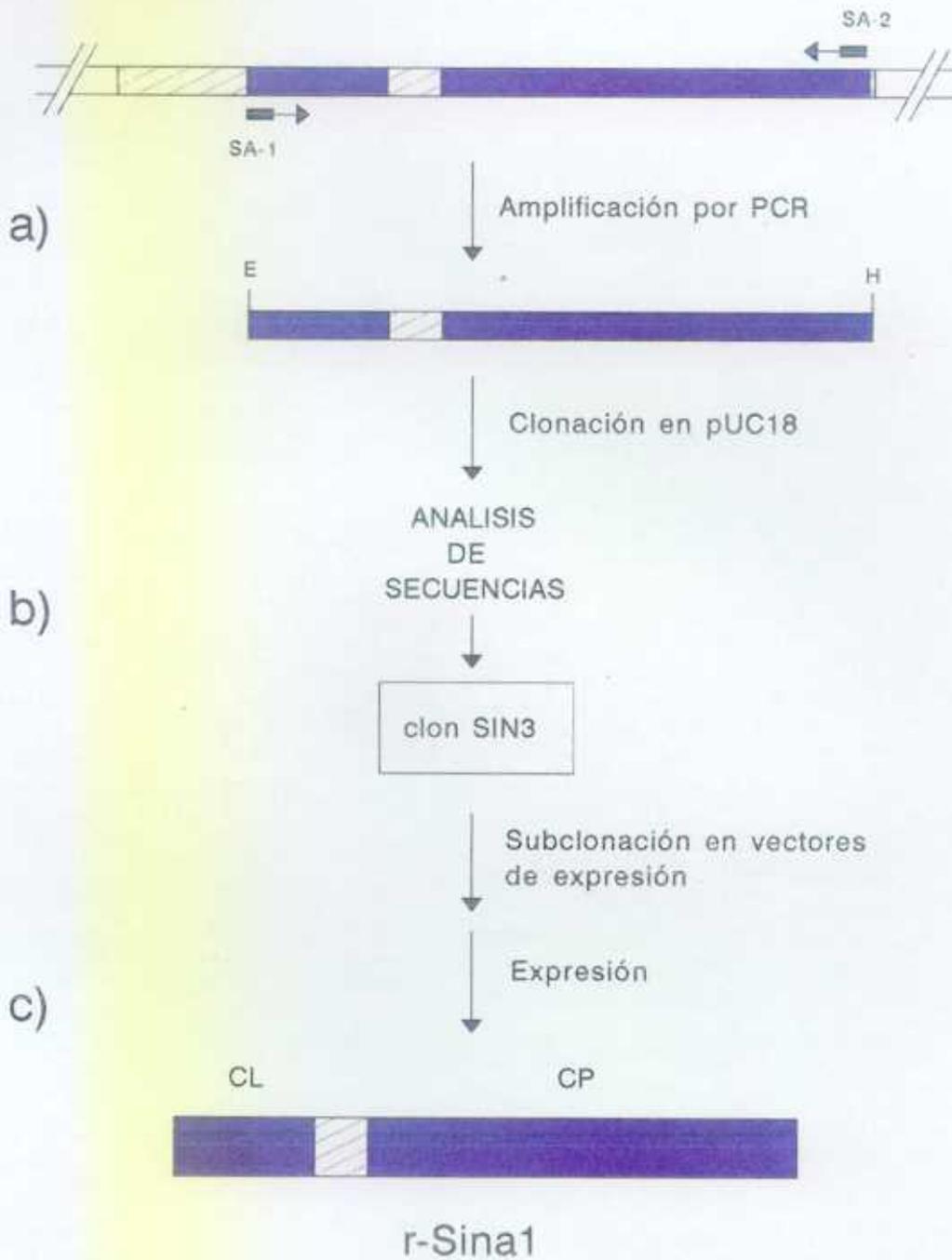


Figura 5. Estrategia empleada para la expresión del alergeno Sin a 1 en *E. coli*. Las zonas sombreadas representan regiones presentes en la proteína madura, mientras que las que aparecen rayadas corresponden a fragmentos eliminados durante el procesamiento postraduccional. E y H indican dianas de restricción *EcoRI* y *HindIII*, respectivamente. (a) La secuencia genómica que codifica las dos cadenas presentes en el alergeno nativo fue amplificada mediante PCR utilizando como cebadores los oligonucleótidos SA-1 y SA-2 (tabla 6). (b) El producto de la amplificación fue clonado en el plásmido pUC18 y se analizaron las secuencias resultantes. (c) Se eligió el clon SIN3 para su expresión en *E. coli*.

Tabla 6. Secuencias de los oligonucleótidos usados como cebadores en las reacciones de PCR. Los números entre paréntesis indican las posiciones correspondientes en la estructura primaria del alérgeno nativo. SA-2 y SA-4 son oligonucleótidos antisentido y ambos poseen un codón de terminación.

Oligonucleótido	Secuencia de nucleótidos	Secuencia de aminoácidos
SA-1	5' CCGGAATTC <u>CCAGCCGGCCCATTT</u> 3' <i>EcoRI</i>	PAGPF (1-5, cadena ligera)
SA-2	5' CCGAAGCTT <u>TCAGGAGGGTCCAGGCAT</u> 3' <i>HindIII</i>	MPGPS (84-89, cadena pesada)
SA-3	5' CCGGGATC <u>CCAGCCGGCCCATTT</u> 3' <i>BamHI</i>	PAGPF (1-5, cadena ligera)
SA-4	5' CCGGAATTC <u>TTCAGGAGGGTCCAGGCAT</u> 3' <i>EcoRI</i>	MPGPS (84-89, cadena pesada)

Clonación del alérgeno

La secuencia de nucleótidos que codifica las dos cadenas polipeptídicas de que consta el alérgeno Sin a 1 nativo fue amplificada mediante PCR a partir del DNA genómico de semillas de mostaza amarilla (*S. alba*). Los cebadores utilizados contenían en sus extremos 5' sitios de restricción para *EcoRI* (cebador correspondiente al extremo 5') y *HindIII* (el cebador del extremo 3') para facilitar la clonación de los productos resultantes de la amplificación en el plásmido pUC18.

En la primera reacción de amplificación se obtuvieron dos fragmentos de DNA de unos 440 y 370 pb (figura 6). Sólomente el mayor de estos productos (que también era el mayoritario) tenía el tamaño esperado para poder codificar las dos cadenas del alérgeno unidas por el péptido de conexión. Este fragmento fue aislado a partir de geles de agarosa y reamplificado mediante PCR utilizando los mismos cebadores que se emplearon en la primera reacción de amplificación. Tras su aislamiento, fue digerido con *EcoRI* y *HindIII* y clonado en el plásmido pUC18.

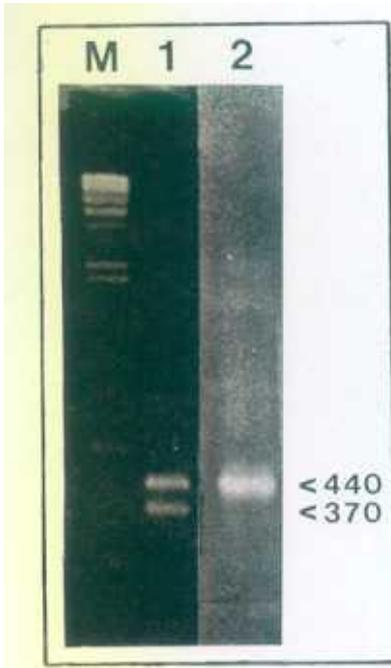


Figura 6. Electroforesis en gel de agarosa (2%) del DNA amplificado por PCR. La localización de los productos de amplificación está indicada por flechas. 1, amplificación del DNA genómico de *S. alba*; 2, banda de 440 pb reamplificada. La línea M contiene DNA del fago λ digerido con *Hind*III.

De esta forma se obtuvieron siete clones genómicos, cuyas secuencias de nucleótidos se muestran en la figura 7. Las correspondientes secuencias de aminoácidos deducidas a partir de estos clones aparecen recogidas en la figura 8, junto con la secuencia obtenida previamente a partir de la proteína nativa mediante degradación de Edman. Según lo esperado, todos ellos codifican las dos cadenas polipeptídicas presentes en el alérgeno nativo, más una secuencia de conexión entre ambas cuyo tamaño y naturaleza coinciden con la estructura correspondiente de los precursores de otras proteínas de semillas de crucíferas homólogas a Sin a 1 [Crouch y col., 1983; Ericson y col., 1986; Josefsson y col., 1987; Scofield y Crouch, 1987; Baszczyński y Fallis, 1990; Raynal y col., 1991; Ericson y col., 1991]. Todos los clones analizados presentan una inserción de tres residuos en la cadena pesada, entre las posiciones 54 y 55 de la secuencia determinada a partir de la proteína natural por degradación de Edman (que corresponde a las posiciones 109-111 de las secuencias deducidas de los clones). Los clones SIN3 y SIN5 codifican la misma secuencia para las cadenas presentes en el alérgeno maduro, aunque difieren en dos residuos del péptido de conexión (Glu/Asp y Gly/Asp). Las diferencias obtenidas por la comparación de cada una de las secuencias nucleotídicas, así como de las secuencias deducidas de aminoácidos se muestran en la tabla 7. Aparecen heterogeneidades en 11 posiciones en la estructura primaria de ambas cadenas, aunque cuando se comparan dos a dos las secuencias de aminoácidos deducidas, no hay más de 10 residuos diferentes, existiendo, por tanto, una identidad igual o mayor del 93% entre cada par de secuencias polipeptídicas. La identidad es aún mayor si se considera la naturaleza conservativa de algunos de los cambios, como Leu/Val o Arg/Lys.

																				60
SIN1	CCA	GCC	GGC	CCA	TTT	AGG	ATT	CCA	AAA	TGT	AGG	AAG	GAG	TTT	CAG	CAA	GCA	CAA	CAC	CTG
SIN2	---	---	---	---	---	G--	---	---	---	---	---	---	---	---	--A	---	---	---	---	--A
SIN3	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	CGA	---	---	---	---	---	---	--G	---	---
SIN4	---	---	---	---	---	G--	---	---	---	---	---	---	---	---	--A	---	---	---	---	--A
SIN5	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	--A	---	---	---	---	--A
SIN6	---	---	---	---	---	G--	---	---	---	---	---	---	---	---	--A	---	---	---	---	--A
SIN7	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	--A
																				120
SIN1	AGA	GCT	TGC	CAA	CAA	TGG	CTC	CAC	AAG	CAG	GCA	ATG	CAG	TCT	GGT	AGT	GGT	CCA	AGC	TGG
SIN2	---	---	---	--G	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
SIN3	---	---	---	---	---	---	---	---	---	--A	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
SIN4	---	---	---	---	---	---	---	---	---	--A	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
SIN5	---	---	---	--G	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
SIN6	---	---	---	--G	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
SIN7	---	---	---	--G	---	---	---	---	---	--A	---	---	---	--C	---	G--	---	--T	---	--T-
																				180
SIN1	ACC	CTC	GAC	GAT	GAG	TTT	GAT	TTT	GAA	GAT	GAC	ATG	GAG	AAC	CCA	CAG	GGA	CCA	CAG	CAG
SIN2	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
SIN3	---	---	--G	-G-	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	--C	---	---	--C	---	--A
SIN4	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	--A	---	---	---	--C	---	---	---
SIN5	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	--C	---	---	---	---	--A
SIN6	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	--C	---	---	---	---	---
SIN7	G--	---	T--	-G-	---	---	---	---	---	---	--C	---	---	---	---	---	---	---	---	--A
																				240
SIN1	AGG	CCA	CCA	CTA	CTC	CAG	CAG	TGC	TGC	AAC	GAG	CTC	CAC	CAG	GAA	GAG	CCA	CTT	TGC	GTT
SIN2	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
SIN3	---	--G	---	---	---	--A	--A	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	--T
SIN4	---	--G	---	---	---	--A	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	--T
SIN5	---	--G	---	---	---	--A	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
SIN6	-A-	--G	---	---	---	--A	---	---	---	---	---	--T	---	---	--G	---	---	---	---	---
SIN7	---	--G	---	---	---	--A	---	---	---	---	---	--T	---	---	---	---	---	---	---	---
																				300
SIN1	TGC	CCA	ACC	TTG	AAA	GGA	GCA	TCC	AAA	GCC	GTT	AAA	CAG	CAG	GTT	AGA	CAA	CAG	CTG	GAG
SIN2	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
SIN3	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	--A	---	---	---	---	---	---
SIN4	---	---	--T	---	---	--T	---	---	---	---	---	---	---	--A	---	---	---	---	---	-G-
SIN5	---	---	--T	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	--A	---	---	---	---	---	---
SIN6	---	---	--T	---	---	--T	---	---	---	---	---	---	---	--A	---	C--	---	---	T--	-G-
SIN7	---	---	--T	---	---	--T	---	---	---	---	---	---	---	--A	---	---	---	---	---	-G-
																				360
SIN1	CAG	CAG	GGA	CAG	CGG	GGA	CCG	CAC	CTG	CAG	CAT	GTA	ATT	AGC	CGT	ATC	TAC	CAG	ACT	GCT
SIN2	---	---	---	---	-A-	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	--C
SIN3	---	---	---	---	-A-	---	---	--T	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	--C
SIN4	---	---	---	---	-A-	---	--A	-G	G--	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
SIN5	---	---	---	---	-A-	---	---	--T	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	--C
SIN6	---	---	---	---	-A-	---	---	-G	G--	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	--C
SIN7	---	---	---	---	---	---	---	--T	---	---	--A	---	---	---	---	---	---	---	---	---
																				420
SIN1	ACA	CAC	TTA	CCT	AAA	GTT	TGC	AAC	ATC	AGG	CAA	GTT	AGT	GTT	TGT	CCC	TTC	CAG	AAG	ACC
SIN2	--G	---	---	---	-G-	---	---	---	--T	---	---	---	---	---	---	--C	---	---	---	---
SIN3	--G	---	---	---	---	---	---	---	---	CCC	---	---	---	--C	---	---	---	A--	---	---
SIN4	--G	---	---	---	---	---	---	---	---	CC-	---	---	---	--C	---	---	---	A--	---	---
SIN5	--G	---	---	---	---	---	---	---	---	CCC	---	---	---	--C	---	---	---	A--	---	---
SIN6	--G	---	---	---	---	---	---	---	---	CCC	---	--A	--C	---	---	---	---	A--	---	---
SIN7	--G	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
																				435
SIN1	ATG	CCT	GGA	CCC	TCC	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
SIN2	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
SIN3	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
SIN4	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
SIN5	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
SIN6	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
SIN7	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

Figura 7. Secuencias de nucleótidos de los clones genómicos de Sin a 1 obtenidos mediante PCR. Los guiones indican identidad de residuo respecto a la secuencia superior.

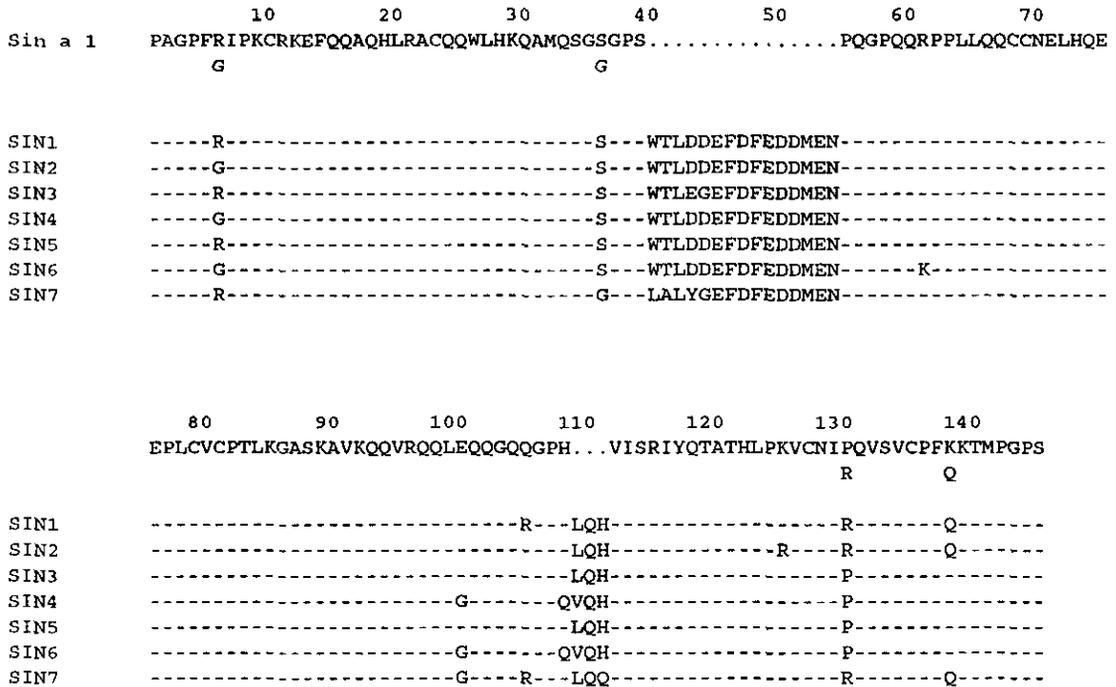


Figura 8. Secuencias de aminoácidos deducidas de los clones genómicos de Sin a 1 obtenidos mediante PCR. Se muestran en comparación con la estructura primaria del alérgeno determinada mediante la degradación de Edman de la proteína natural. Las microheterogeneidades detectadas en dicha proteína aparecen bajo la secuencia principal. Los puntos indican residuos ausentes en el alérgeno nativo. Los guiones señalan identidades de residuos en la secuencia. La numeración corresponde a las secuencias deducidas.

A partir de las secuencias de aminoácidos deducidas de los clones obtenidos, se escogió el clon SIN3 para su expresión en *E. coli*, por su mayor similitud con la secuencia obtenida del alérgeno purificado.

Tabla 7. Comparación de las secuencias de los clones obtenidos. El número de diferencias entre pares de nucleótidos y de aminoácidos se muestra en la parte superior derecha e inferior izquierda, respectivamente.

	SIN1	SIN2	SIN3	SIN4	SIN5	SIN6	SIN7
SIN1		10	25	22	18	28	23
SIN2	3		27	20	14	22	26
SIN3	3	6		22	15	26	28
SIN4	7	6	6		15	18	28
SIN5	2	4	2	4		9	25
SIN6	8	7	7	1	5		26
SIN7	4	6	10	8	6	9	

Construcciones pINS3 y pTrcS3

Estas dos construcciones permitirían la expresión del alérgeno recombinante en el citoplasma de *E. coli* con sólo unos pocos residuos añadidos en el extremo N-terminal (MKGKEF en pINS3 y MEF en el caso de pTrcS3). La construcción del plásmido recombinante pINS3 se realizó insertando el clon SIN3 en los sitios *EcoRI* y *HindIII* del plásmido pIN-III-A2 (figura 9). Este vector plasmídico, además de suministrar un adecuado sitio de unión al ribosoma (RBS) y el codón de iniciación ATG, contiene el promotor *lac*, de forma que la síntesis de la proteína recombinante puede ser inducida mediante la adición de IPTG.

El plásmido recombinante pTrcS3 se construyó a partir del plásmido pTrc 99A de forma similar a la descrita para pINS3 (figura 10). En este caso, la expresión del inserto se encuentra controlada por el promotor *trc*, el cual también es inducible por IPTG.

La expresión del clon SIN3 mediante estos dos vectores debería producir una proteína constituida por las dos cadenas del alérgeno Sin a 1 unidas a través de una secuencia de 15 residuos (a esta cadena polipeptídica la llamaremos a partir de ahora rSin1). Sin embargo, tras la inducción de los cultivos transformados de *E. coli* DH5 α F' con IPTG 1 mM durante 3 horas no se obtuvo producción detectable del alérgeno recombinante en ninguno de los dos casos.

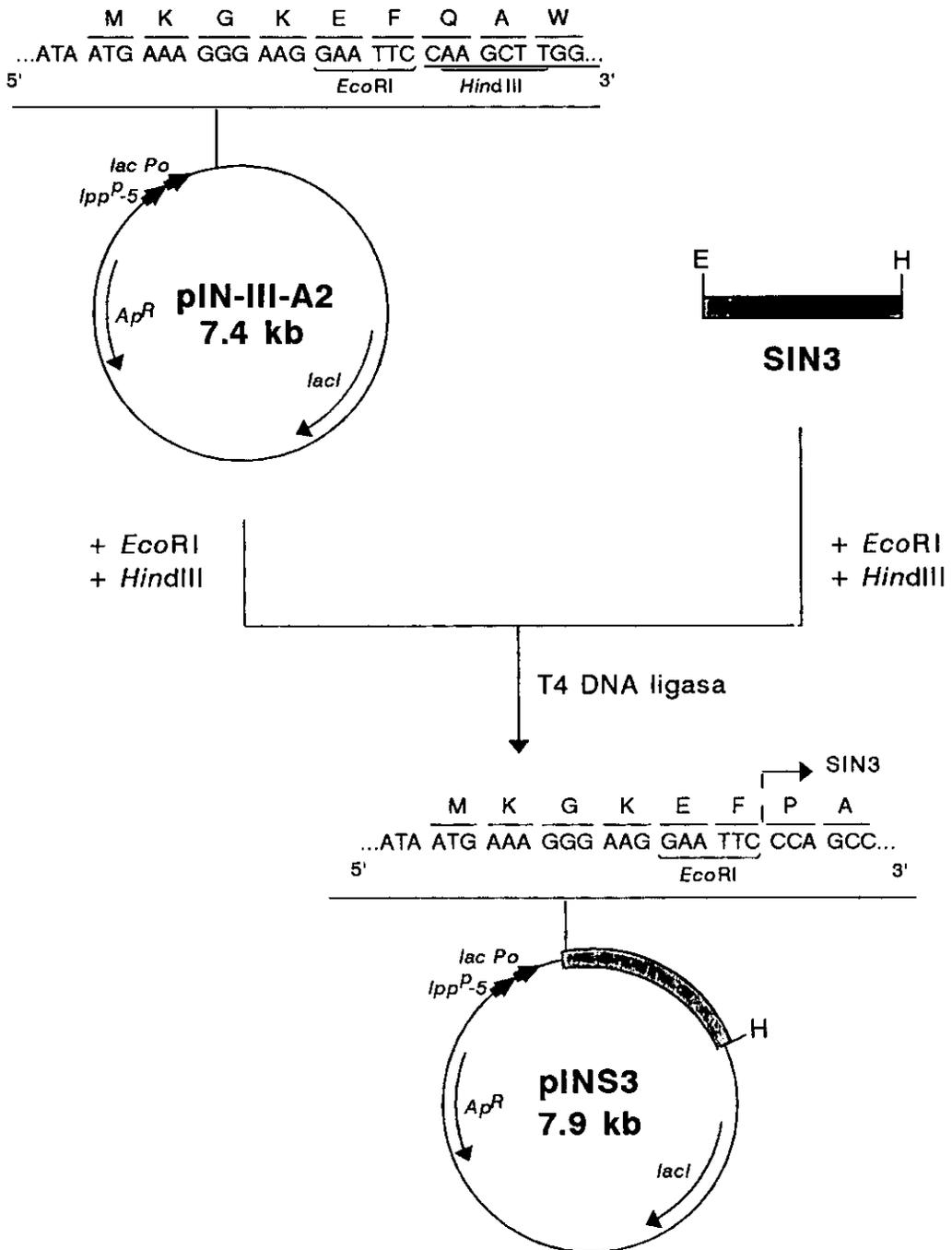


Figura 9. Representación esquemática de la construcción del vector pINS3. Las zonas sombreadas indican la secuencia que codifica el alergeno rSina1. Sitios de restricción: E, *EcoRI*; H, *HindIII*. Otros símbolos: *Ap^R*, gen de resistencia a ampicilina; *lpp^{P-5}*, promotor de lipoproteína; *lac Po*, promotor/operador de lactosa; *lacI*, gen del represor *lac*.

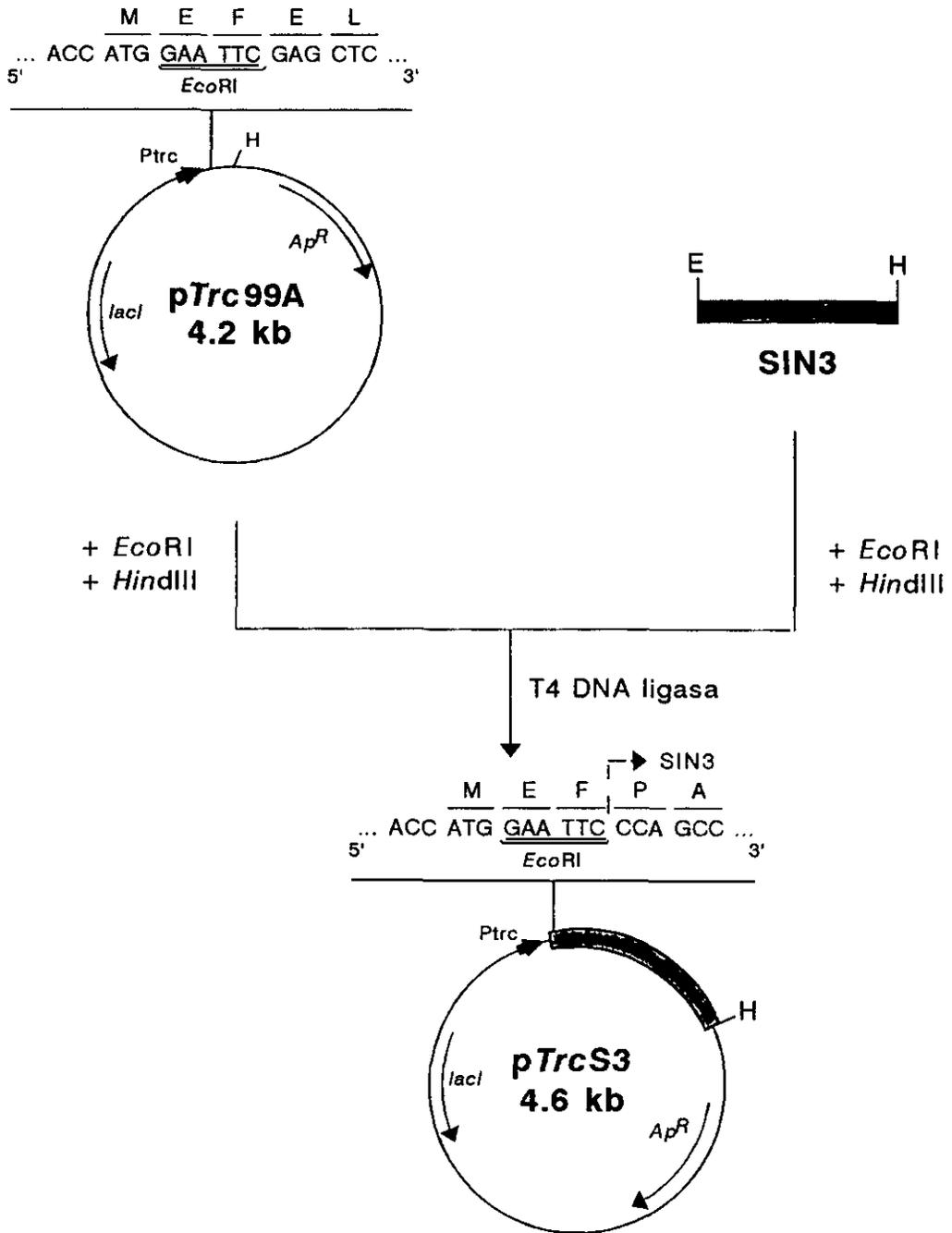


Figura 10. Representación esquemática de la construcción del vector pTrcS3. Las zonas sombreadas indican la secuencia que codifica el alergeno rSina1. Sitios de restricción: E, *EcoRI*; H, *HindIII*. Otros símbolos: *Ap^R*, gen de resistencia a ampicilina; *Ptrc*, promotor *trc*; *lacI*, gen del represor *lac*.

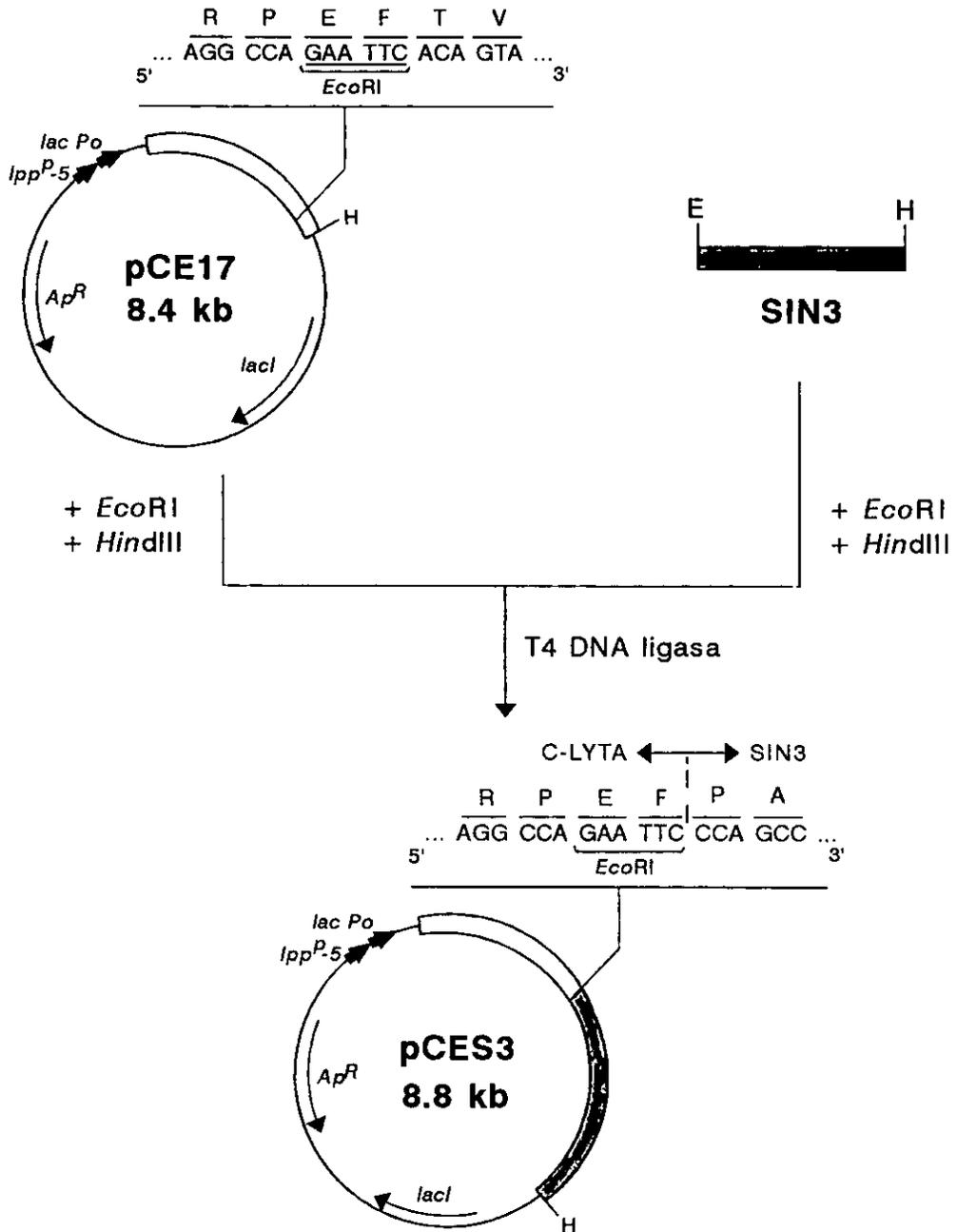


Figura 11. Representación esquemática de la construcción del vector pCES3. Las zonas sombreadas indican la secuencia que codifica el alérgeno rSina1. Sitios de restricción: E, *EcoRI*; H, *HindIII*. Otros símbolos: *Ap^R*, gen de resistencia a ampicilina; *lpp^{P-5}*, promotor de lipoproteína; *lac Po*, promotor/operador de lactosa; *lacI*, gen del represor *lac*.

Construcción pCES3

En este caso, a partir del plásmido pCE17 se construyó el plásmido recombinante pCES3, de forma similar a lo descrito para las construcciones anteriores (figura 11). El plásmido pCE17 contiene la región 3' del gen *lytA* de *Streptococcus pneumoniae* (C-LYTA), precedida por un promotor modificado de lipoproteína de *E. coli* (*lpp^p-5*) y la región promotora *lac^{po}*. C-LYTA es un dominio de unión a colina que exhibe una fuerte afinidad por matrices que contienen colina o algún análogo estructural como grupos dietilaminoetilo (DEAE) [Sanz y col., 1988]. La proteína de fusión resultante debería poder ser inmobilizada en una columna de DEAE-celulosa y obtenida con un alto grado de pureza mediante un lavado con colina al 2% [Sánchez-Puelles y col., 1992].

Tras la inducción durante 3 horas de las células transformadas DH5 α F' con IPTG 1 mM, puede apreciarse en los lisados la aparición de una banda de proteína en PAGE-SDS con un tamaño aparente de 32 kDa (figura 12). Este tamaño corresponde al que cabría esperar para la proteína de fusión C-LYTA-rSina1 (15.8 kDa correspondientes al dominio C-LYTA más unos 16 kDa de rSina1). Esta proteína resultó reconocida tanto por sueros policlonales de conejo específicos para C-LYTA como específicos del alérgeno Sin a 1 (figura 12). La proteína de fusión se produce en una concentración estimada de unos 5 mg por litro de cultivo, y se acumula en forma insoluble en el citoplasma de las células.

La naturaleza insoluble de la proteína de fusión obtenida impidió su purificación a partir del lisado mediante una sólo etapa cromatográfica en DEAE-celulosa. Los cuerpos de inclusión fueron aislados mediante centrifugación a 8000 g durante 10 minutos (figura 13), y a continuación fueron lavados con SDS 0.5% en agua. Este tratamiento permitió obtener la proteína de fusión mayoritariamente libre de otros componentes polipeptídicos contaminantes (figura 14) y con ella se llevaron a cabo diversos ensayos de solubilización, que aparecen recogidos en la tabla 8.



Figura 12. Inmunodetección de la proteína de fusión C-LYTA-rSina1. Líneas 1, lisado total de *E. coli* DH5 α F' [pCE17] inducidas con IPTG 1 mM; 2, lisado total de *E. coli* DH5 α F' [pCES3] inducidas con IPTG 1mM. (a) PAGE-SDS en condiciones reductoras teñida con azul de Coomassie; (b) inmunotransferencia teñida con suero anti-C-LYTA; (c) inmunotransferencia teñida con suero anti-Sin a 1. Las posiciones de los patrones de masa molecular se indican a la izquierda.

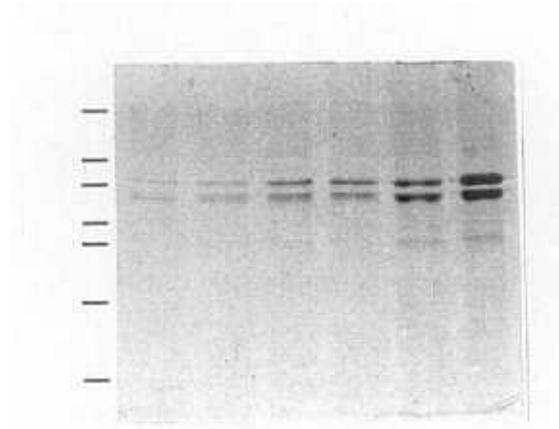


Figura 13. Aislamiento de los cuerpos de inclusión conteniendo la proteína de fusión C-LYTA-rSina1. La fotografía muestra una PAGE-SDS de los sedimentos obtenidos tras 10 minutos de centrifugación del lisado bacteriano en las siguientes condiciones (de izquierda a derecha): 500 g, 1000 g, 2000 g, 4000 g, 6000 g y 8000 g. Las barras de la izquierda indican las posiciones de los patrones de masa molecular, los mismos que en la figura 12.

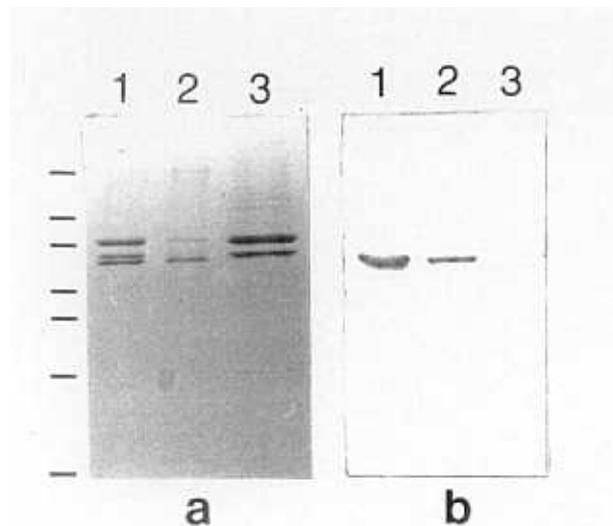


Figura 14. Lavado de los cuerpos de inclusión conteniendo la proteína de fusión C-LYTA-rSina1. Líneas: 1, cuerpos de inclusión antes del lavado; 2, fracción insoluble de 1 tras el lavado con SDS al 0.5%; 3, fracción soluble de 1 después de dicho lavado. (a) PAGE-SDS teñida con azul de Coomassie; (b) inmunotransferencia teñida con suero de conejo anti-Sin a 1. A la izquierda se indican, con barras, las posiciones de los patrones de masa molecular, como en figuras anteriores.

Tabla 8. Ensayos de solubilización llevados a cabo con la proteína de fusión C-LYTA-rSina1. Salvo otra indicación, todos ellos se llevaron a cabo en tampón Tris-HCl 50 mM, pH 8.0, conteniendo NaCl 100 mM. GuHCl, cloruro de guanidinio; 2-ME, 2-mercaptoetanol.

Ausencia de solubilización	Solubilización parcial	Solubilización total
Acido acético 0.1 M	Urea 8 M + EDTA 0.1 mM	GuHCl 6 M + 2-ME 1% + EDTA 1 mM
Triton X-100 1% + EDTA 1 mM		
SDS 0.5% en agua		

Construcción *pompAS3*

El plásmido recombinante *pompAS3* fue construido a partir del vector pIN-III-*ompA-2* en la misma manera que las construcciones anteriormente descritas (figura 15). La construcción resultante contiene los mismos elementos reguladores que el plásmido pIN-III-A2 (promotor *lac*, inducible por IPTG), pero, a diferencia de la construcción pINS3, la proteína recombinante posee en su extremo N-terminal el péptido señal de la proteína *ompA* de *E. coli* [Ghrayeb y col., 1984]. Este péptido debería permitir la secreción del alérgeno recombinante a través de la membrana plasmática de las células bacterianas. Una vez translocada la proteína, el péptido señal será eliminado por proteasas específicas, liberándose el producto procesado en el interior del espacio que separa la membrana plasmática de la membrana externa (espacio periplásmico o periplasma).

Tras la inducción habitual con IPTG, no pudo apreciarse la aparición de ninguna banda nueva importante de proteína del tamaño esperado (unos 16.4 kDa, si el péptido señal estuviera correctamente procesado) en el patrón electroforético del lisado total teñido con azul de Coomassie (figura 16). Sin embargo, la inmunodetección con suero policlonal de conejo frente a Sin a 1 mostró la existencia en los cultivos inducidos de dos bandas específicas con tamaños aparentes de unos 18.8 y 15.0 kDa. Estas dos bandas aparecieron en la fracción insoluble del lisado celular, no pudiendo ser detectadas en la fracción de periplasma. Esto parecía indicar que no se producía la exportación del alérgeno recombinante y el consiguiente procesamiento del péptido señal. La cantidad obtenida de cada una de estas dos proteínas fue de unos 2 mg por litro de cultivo.

Las dos proteínas reconocidas por el suero fueron parcialmente purificadas mediante el lavado de la fracción insoluble del lisado celular con SDS 0.5 % (figura 16). Su transferencia a membranas de Immobilon permitió llevar a cabo la secuenciación automática de su extremo N-terminal, cuyos resultados se muestran en la figura 17. Como puede observarse, ambos productos reconocidos por el suero poseen la misma secuencia N-terminal, que corresponde a la secuencia esperada para el alérgeno recombinante si el péptido señal hubiese sido procesado correctamente. Estos resultados indican que la proteína recombinante sí es exportada al espacio periplásmico, pero allí permanece en un estado insoluble. La aparición de dos bandas de distinto tamaño puede deberse a la existencia de degradación parcial o de terminación prematura de la transcripción.

Mediante la adición de un agente reductor (β -mercaptoetanol al 1 % v/v) fue posible solubilizar las dos proteínas reconocidas por el suero específico para Sin a 1. Sin embargo, la retirada de dicho agente mediante diálisis las condujo de nuevo a un estado insoluble.

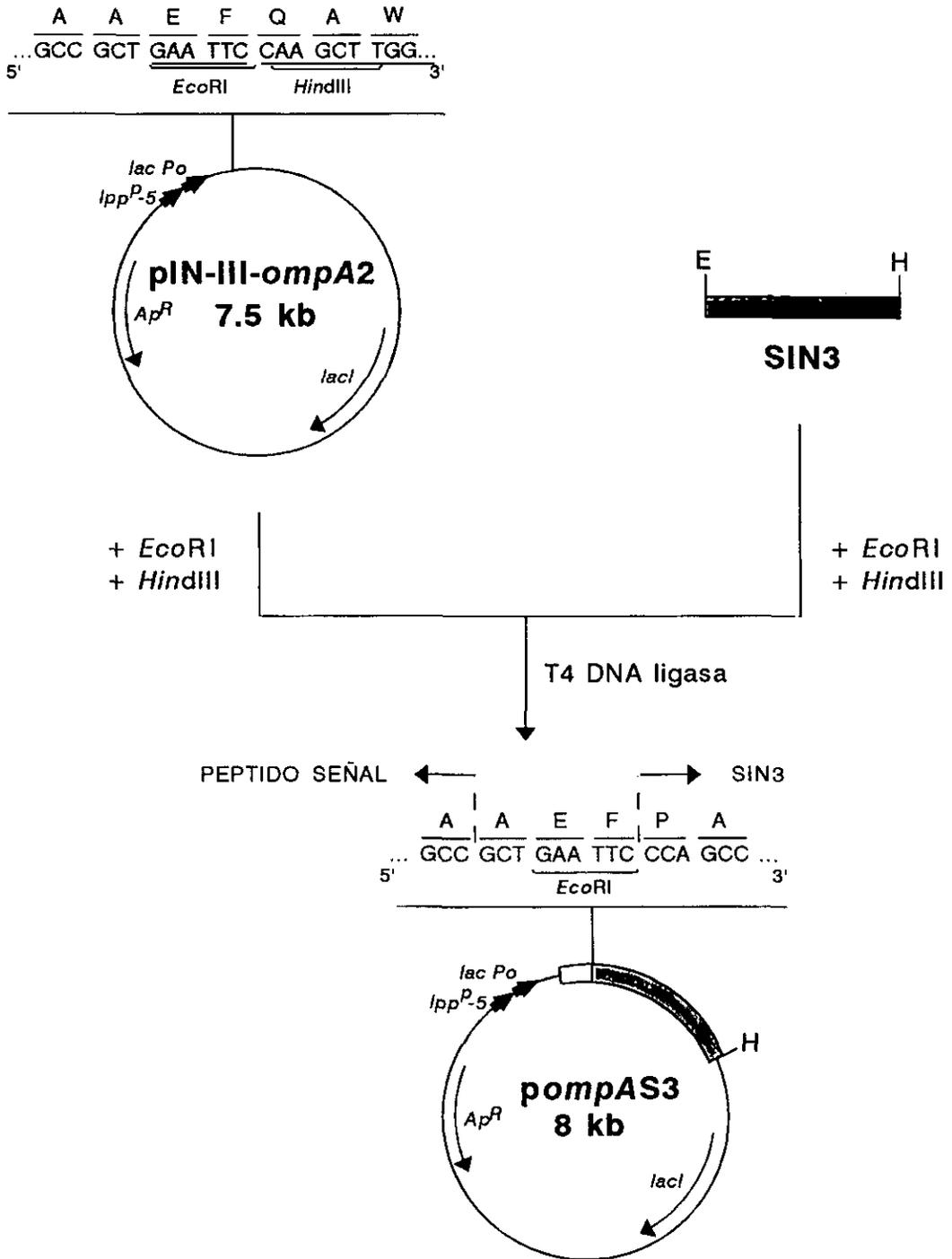


Figura 15. Representación esquemática de la construcción del vector *pompAS3*. Las zonas sombreadas indican la secuencia que codifica el alérgeno rSina1. Sitios de restricción: E, *EcoRI*; H, *HindIII*. Otros símbolos: *Ap^R*, gen de resistencia a ampicilina; *lpp^{P-5}*, promotor de lipoproteína; *lac Po*, promotor/operador de lactosa; *lacI*, gen del represor *lac*.

Construcción pGEXS3

Para la construcción del plásmido recombinante pGEXS3 se llevó a cabo la reamplificación mediante PCR del clon SIN3 utilizando como cebadores los oligonucleótidos SA-3 y SA-4 (tabla 6). El producto resultante de la amplificación contiene en sus extremos los sitios de restricción de *Bam*HI y *Eco*RI, lo cual permitió su clonación en los correspondientes sitios del plásmido pGEX-2T (figura 18). Este plásmido contiene el gen de la glutatión-S-transferasa (GST) de *Schistosoma japonicum* bajo el control del promotor *tac*, inducible químicamente por IPTG. La construcción realizada debería producir una proteína de fusión constituida por la GST y el alérgeno recombinante (GST-rSina1), unidos a través de un hexapéptido que contiene un sitio de ruptura proteolítica de trombina.

Como puede verse en la figura 19, la expresión del clon SIN3 en este sistema dio lugar a una proteína recombinante con una masa molecular aparente de unos 43 kDa, que concuerda bien con el tamaño esperado para la proteína de fusión GST-rSina1 (26 kDa para la GST y 16 kDa para rSina1). Dicha proteína fue reconocida en inmunotransferencia por el suero de conejo específico para Sin a 1, apareciendo también otras bandas menores, que corresponderían a fragmentos de la proteína de fusión (figura 19).

Aunque el rendimiento fue superior a 50 mg por litro de cultivo, menos del 2% de la proteína de fusión permanece soluble tras la lisis de las células. Al igual que ocurrió con las construcciones anteriores, ni el rendimiento ni la solubilidad del alérgeno recombinante mejoraron de manera apreciable cuando se utilizaron condiciones de inducción distintas de las descritas en la sección "Materiales y métodos".

Solubilización de rSina1

Con el fin de solubilizar la fracción insoluble de la proteína de fusión GST-rSina1, se probaron muy diversas condiciones experimentales. Los resultados más destacables obtenidos en dichos ensayos aparecen recogidos en la tabla 9. Tras un lavado con SDS al 0.5%, la proteína logró solubilizarse en urea 8 M, EDTA 1 mM y DTT 5 mM. A continuación, la muestra se diluyó 10 veces con agua y se sometió a diálisis exhaustiva frente a PBS 1/100 (v/v). Posteriormente, se procedió a la concentración de la muestra mediante liofilización, seguida de la adición de 1/100 volúmenes de agua destilada. Tras estos tratamientos, la proteína de fusión permaneció soluble, a una concentración de unos 0.5 mg/ml (figura 20).

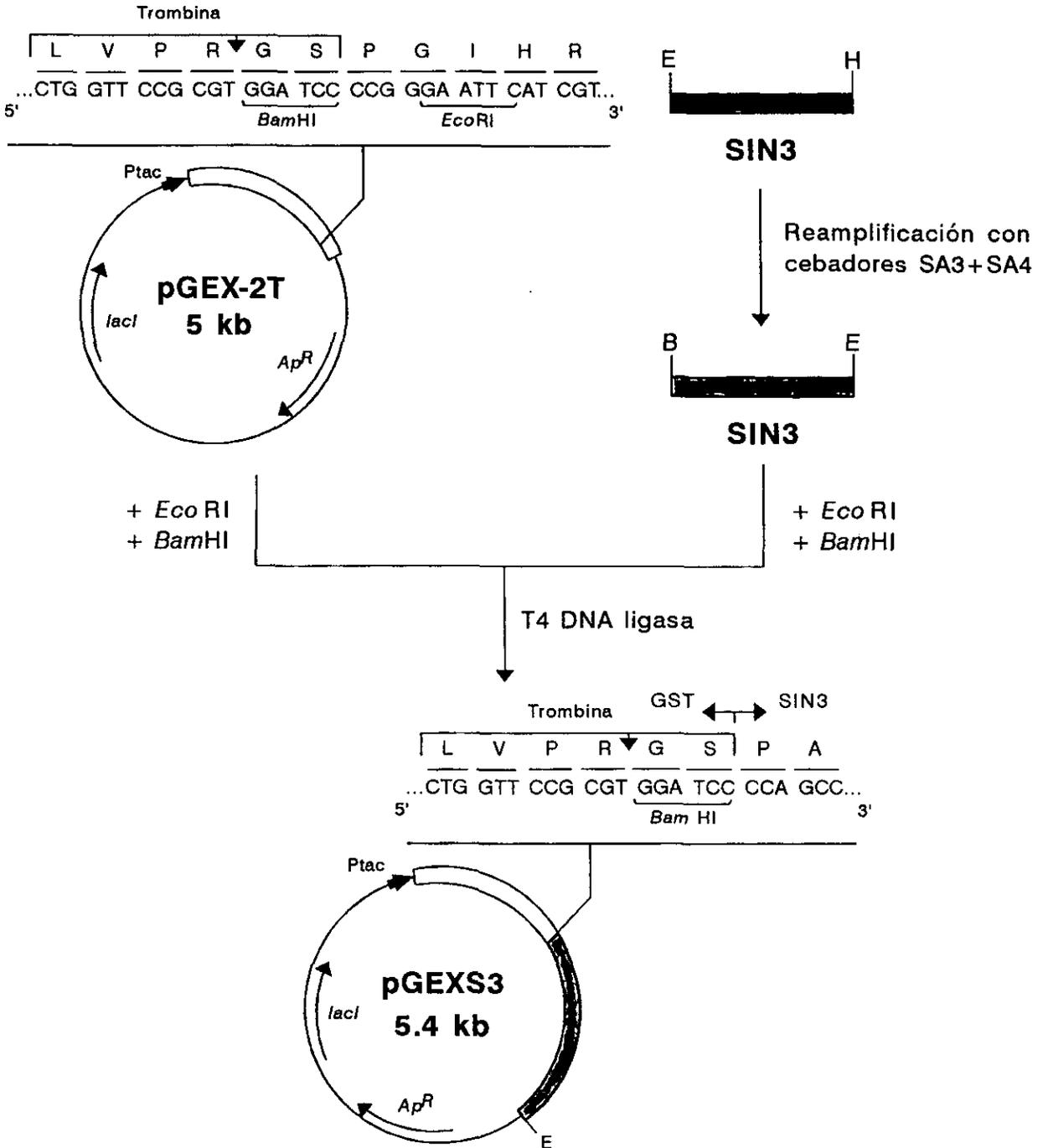


Figura 18. Representación esquemática de la construcción del vector pGEXS3. Las zonas sombreadas indican la secuencia que codifica el alérgeno rSina1. Sitios de restricción: E, *EcoRI*; H, *HindIII*; B, *BamHI*. Otros símbolos: *Ap^R*, gen de resistencia a ampicilina; *Ptac*, promotor *tac*; *lacI*, gen del represor *lac*.

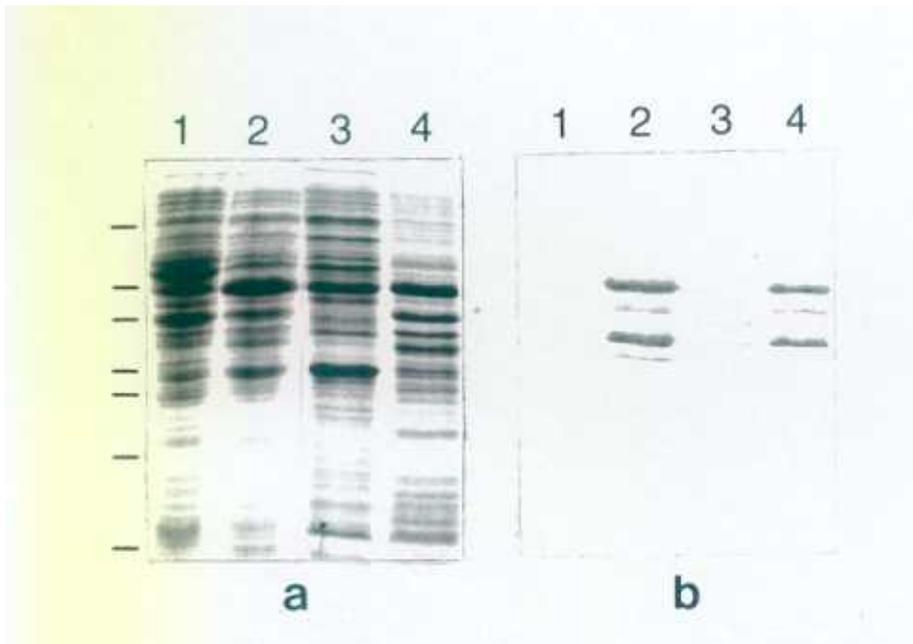


Figura 19. Expresión de la proteína de fusión GST-rSina1. Líneas: 1, lisado total de *E. coli* DH5 α F'[pGEXS3] sin inducir; 2, como 1, pero inducidas con IPTG 1 mM; 3, fracción soluble de 2; 4, fracción insoluble de 2. (a) PAGE-SDS teñida con azul de Coomassie; (b) inmunodetección con suero de conejo anti-Sin a 1.

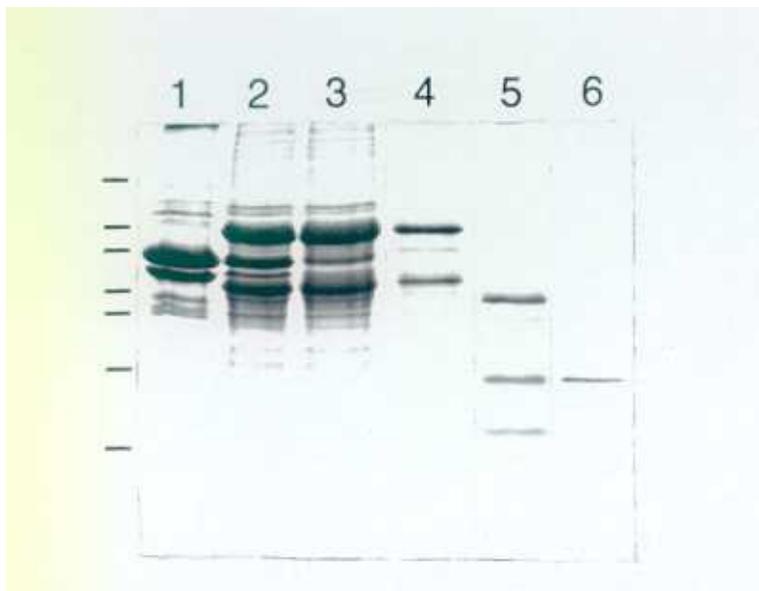


Figura 20. Solubilización de la fracción insoluble de la proteína de fusión GST-rSina1. Las líneas 1 a 5 son PAGE-SDS teñidas con azul de Coomassie. 1, Fracción soluble tras el lavado con SDS al 0.5%; 2, fracción insoluble tras dicho lavado; 3, fracción soluble tras el tratamiento de 2 con urea/DTT/EDTA; 4, fracción soluble de 3 tras la eliminación de los agentes desnaturizantes mediante diálisis; 5, la misma muestra que en 4, digerida con trombina; 6, inmunotransferencia de 5 teñida con suero anti-Sin a 1.

Tabla 9. Ensayos de solubilización llevados a cabo con la proteína de fusión GST-rSina1. Salvo otra indicación, todos ellos se llevaron a cabo en tampón Tris-HCl 50 mM, pH 8.0, conteniendo NaCl 100 mM. Los resultados fueron los mismos cuando la urea 8 M se sustituyó por cloruro de guanidinio 6 M. 2-ME, 2-mercaptoetanol.

Ausencia de solubilización	Solubilización parcial	Solubilización total
Acido acético 0.1 M	SDS 1% en agua	SDS 1% + EDTA 1 mM
Triton X-100 1% + EDTA 1 mM	Urea 8 M + EDTA 1mM	Urea 8 M + DTT 5 mM + EDTA 1mM
SDS 0.5% en agua		
2-ME 1%		
Urea 8 M		
Urea 8M + 2-ME 1%		

A continuación, la proteína de fusión se sometió a digestión con trombina a una concentración de unas 5 unidades NIH/mg de proteína. De esta manera se liberó el alérgeno recombinante, el cual dio lugar a una sola banda de un tamaño molecular aparente de unos 18.8 kDa reconocida específicamente mediante inmunotransferencia por el suero de conejo frente a Sin a 1 (figura 20). El procedimiento completo de lavado, solubilización y digestión con trombina de la proteína de fusión GST-rSina1 aparece resumido en la figura 21.



Figura 21. Esquema del proceso empleado en la solubilización y liberación de rSina1 a partir de la fracción insoluble de lisados de *E. coli* expresando la proteína de fusión GST-rSina1.

Aislamiento de la fracción soluble de rSina1

El alérgeno recombinante presente en la fracción soluble de lisados de cultivos de bacterias transformadas con la construcción pGEXS3 fue obtenido con un grado de pureza superior al 80% (figura 22) mediante el procedimiento descrito en la sección "Materiales y métodos" (pág. 29). El rendimiento fue escaso, de unos 60-100 μg por litro de cultivo, y, junto con la proteína obtenida, aparecen productos minoritarios de bajo peso molecular, que aparentemente son moléculas incompletas de alérgeno, dado su reconocimiento en inmunotransferencia por el suero específico de conejo.

Fue esta forma de rSina1 la que se utilizó en todos los ensayos inmunoquímicos cuyos resultados se detallan a continuación.

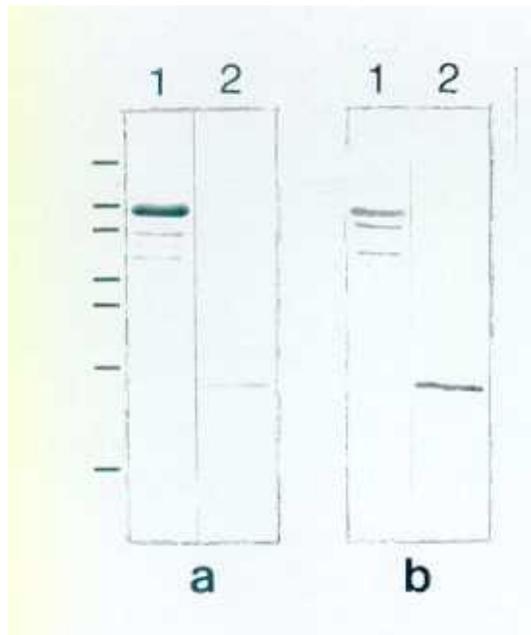


Figura 22. Aislamiento de rSina1 a partir de la fracción soluble de la proteína de fusión GST-rSina1. Líneas: 1, fracción retenida en glutatión-Sepharosa; 2, rSina1 liberado de la resina mediante digestión con trombina. (a) PAGE-SDS teñida con azul de Coomassie; (b) inmunotransferencia teñida con suero de conejo anti-Sin a 1.

CARACTERIZACION INMUNOLOGICA Y ESTRUCTURAL DE rSin a 1

Reconocimiento por suero de conejo específico para Sin a 1

Como se ha visto anteriormente, el alérgeno recombinante rSin a 1 fue reconocido en experimentos de inmunotransferencia por un suero policlonal de conejo desarrollado frente a la forma nativa de Sin a 1. La titulación de dicho suero mediante ELISA demostró que el título de IgG para rSin a 1 en fase sólida es el mismo que el obtenido para el alérgeno nativo (figura 23a).

Cuando se llevó a cabo un ELISA de inhibición de la unión del suero de conejo al alérgeno nativo, la forma recombinante fue capaz de producir el 100% de inhibición en la unión de IgG específicas a Sin a 1 en fase sólida (figura 23b). Además, las curvas obtenidas para la forma nativa y recombinante son virtualmente idénticas, lo que indica una misma afinidad en la interacción.

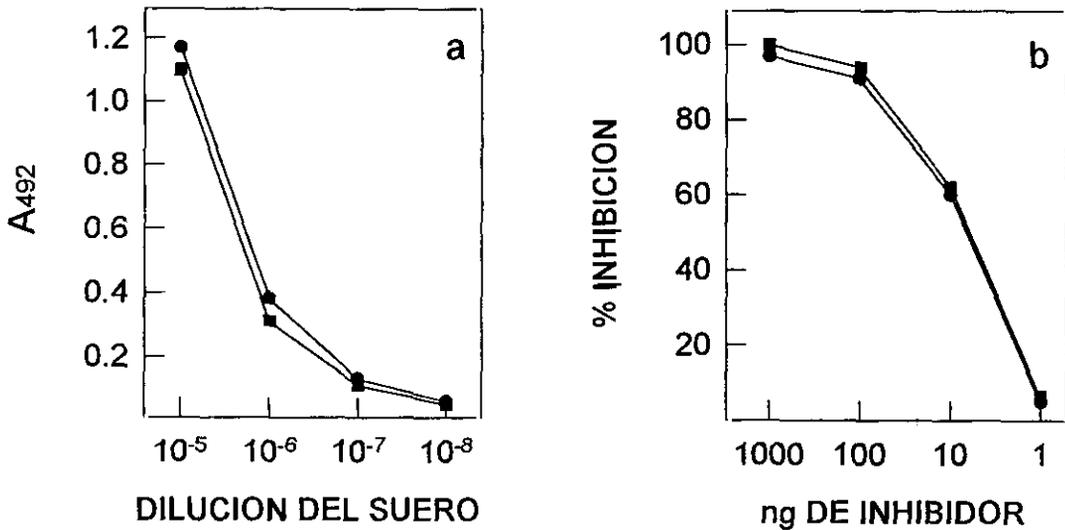


Figura 23. (a) Curvas de unión de IgG de suero de conejo anti-Sin a 1 a (●) Sin a 1 y (■) rSin a 1 previamente fijados a poliestireno. (b) Curvas de inhibición de la unión del mismo suero a Sin a 1 adsorbido a poliestireno, utilizando como inhibidores: el alérgeno nativo (●) o el recombinante (■).

Reconocimiento por anticuerpos monoclonales específicos para Sin a 1

Se ensayó el reconocimiento de la proteína de fusión GST-rSina1 transferida a membranas de nitrocelulosa por diez anticuerpos monoclonales de ratón específicos para el alérgeno nativo. El resultado de estos experimentos aparece recogido en la figura 24. La mitad de los anticuerpos monoclonales (2B9, 1G5, 4A11, 3F3 y 3G3) reconocieron a la proteína de fusión, así como a su fragmento de 31 kDa en condiciones reductoras. Estos anticuerpos son los mismos que, en idénticas condiciones, reconocen a la cadena pesada del alérgeno natural, con la excepción de 2B3, el cual, a pesar de dar lugar a la aparición de una banda muy intensa con la cadena pesada de Sin a 1, no reconoció en absoluto a GST-rSina1.

Para comprobar que rSina1 es también reconocido por los monoclonales en condiciones no desnaturizantes, se llevaron a cabo ELISA de inhibición de la unión de los anticuerpos 1G5, 3G3 y 2B3 con el alérgeno nativo unido a la fase sólida (figura 25). Los anticuerpos utilizados pertenecen a distintos grupos de complementación [Menéndez-Arias y col., 1992], y 2B3 reconoce un determinante antigénico de naturaleza secuencial [Monsalve y col., 1993]. La unión del alérgeno recombinante a 1G5 y 3G3 fue similar a la de la forma nativa, aunque la afinidad de la unión de 1G5 es ligeramente mayor para la proteína nativa, mientras que ocurrió lo contrario en el caso del anticuerpo 3G3. rSina1 no fue capaz de inhibir la unión del anticuerpo monoclonal 2B3, lo que concuerda con los resultados obtenidos previamente con la proteína de fusión transferida a nitrocelulosa.

Reconocimiento por IgE de pacientes alérgicos a mostaza

Para llevar a cabo todos los ensayos cuyos resultados se detallan a continuación, se utilizó una mezcla equivolúmica de 5 sueros de pacientes alérgicos a mostaza (numerados como 12, 13, 16, 17 y 18), con RAST 3-6.

Tanto la proteína de fusión GST-rSina1, como el alérgeno recombinante liberado mediante la digestión con trombina, fueron reconocidos por la mezcla de sueros en nitrocelulosa después de una PAGE-SDS en condiciones reductoras (figura 26).

En la titulación de IgE mediante ELISA, el alérgeno recombinante unido a fase sólida se comportó de forma similar a la proteína nativa. Como puede verse en la figura 27a, tanto la forma nativa como la recombinante dieron lugar a respuestas proporcionales a la concentración de suero utilizado, y significativamente superiores a las obtenidas con un suero control de individuo no alérgico (datos no mostrados).

Para realizar los ELISA de inhibición de la unión de IgE se tapizaron las placas con el alérgeno nativo, y se incubó la mezcla de sueros con diferentes diluciones del aler-

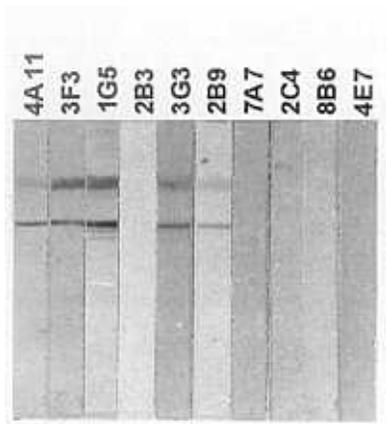


Figura 24. Inmunotransferencias de lisado de *E. coli* expresando la proteína de fusión GST-rSina1 teñidas con diez anticuerpos monoclonales específicos para el alérgeno de mostaza nativo.

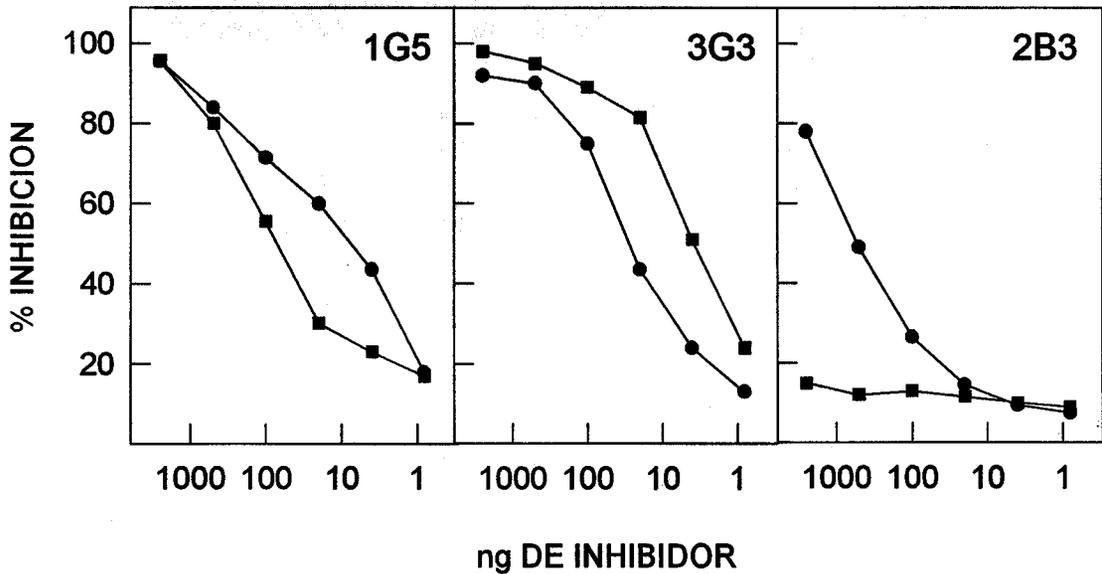


Figura 25. Curvas de inhibición de la unión de tres anticuerpos monoclonales a Sin a 1 adsorbido a poliestireno, utilizando como inhibidores (●) el alérgeno de mostaza nativo o (■) el recombinante. La desviación estándar en estos ensayos no supera en ningún caso el 5% del porcentaje de inhibición observado.

geno nativo, o recombinante en su caso. Los resultados se muestran en la figura 27b. Las curvas obtenidas muestran que la forma recombinante de Sin a 1 aislada mediante la digestión con trombina de la fracción soluble de la proteína de fusión GST-rSina1 conserva determinantes alérgicos similares a los del alérgeno natural.

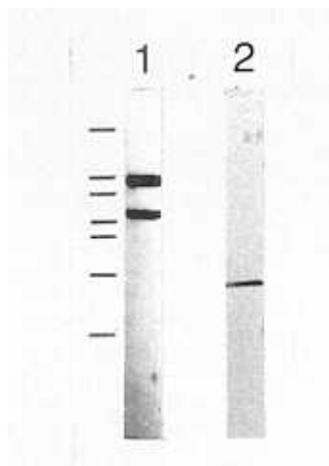


Figura 26. Inmunotransferencia teñida con IgE de pacientes alérgicos a mostaza (mezcla de sueros) de: 1, lisado total de *E. coli* expresando la proteína de fusión GST-rSina1; 2, rSina1 aislado de la fracción soluble de dicha proteína de fusión.

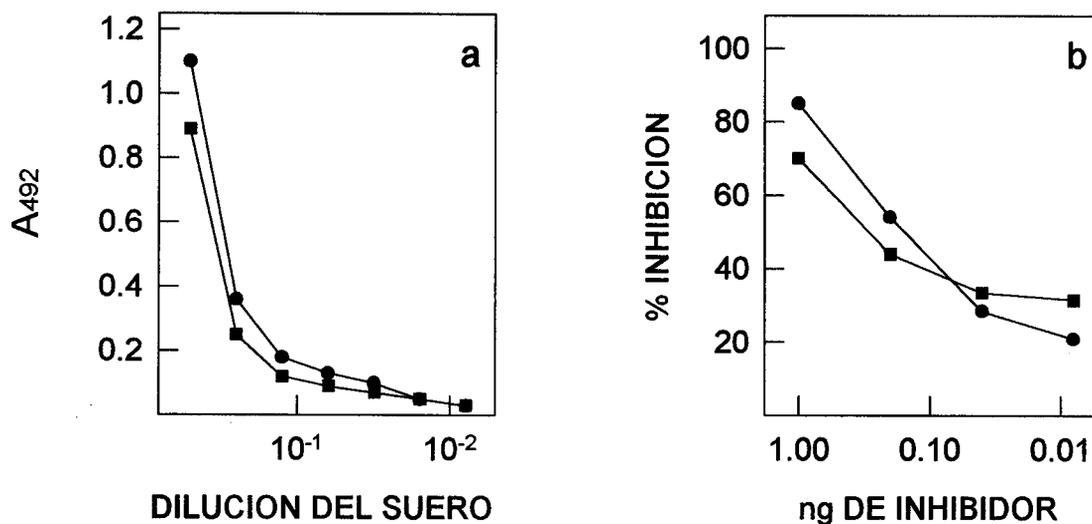


Figura 27. (a) Curvas de unión de IgE de pacientes alérgicos a mostaza (mezcla de sueros) a (●) Sin a 1 y (■) rSina1, previamente fijados a poliestireno. (b) Curvas de inhibición de la unión de dichas IgE a Sin a 1 adsorbido a poliestireno, utilizando como inhibidores: el alérgeno nativo (●) o el recombinante (■).

Resistencia a proteasas

Como se verá más adelante en la presente Memoria, el alergeno Sin a 1 en su estado nativo posee una gran resistencia a proteasas. Para comprobar que la forma recombinante obtenida poseía, como así sugerían los ensayos inmunológicos anteriormente descritos, una estructura tridimensional similar a la conformación natural del alergeno, se llevó a cabo un ensayo de digestión con tripsina de rSina1. Efectivamente, tras 20 horas de incubación a 37°C con tripsina a una relación 1/50 enzima/sustrato (p/p), el alergeno recombinante aislado de la fracción soluble del lisado pierde sólo un fragmento de unos 1300 Da, lo mismo que le ocurre al alergeno nativo (figura 28). Por el contrario, la forma de rSina1 obtenida a partir de la solubilización de la proteína de fusión GST-rSina1 presente en la fracción insoluble del lisado, es completamente degradada tras sólo 2 horas de digestión en las condiciones descritas, lo cual sugiere que, al contrario de lo que sucede con la proteína recombinante que procede de la fracción soluble, la forma solubilizada de rSina1 no posee la conformación nativa.

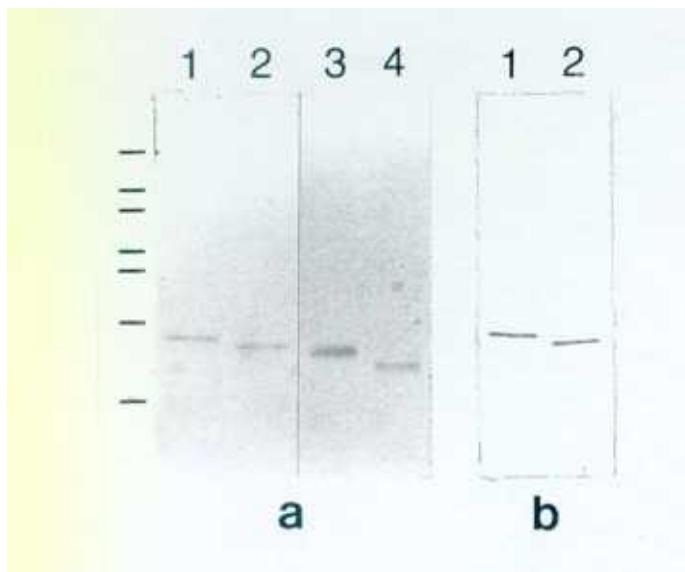


Figura 28. Resistencia a tripsina de rSina1. Líneas: 1, rSina1; 2, rSina1 digerido con tripsina; 3, Sin a 1; 4, Sin a 1 digerido con tripsina. (a) PAGE-SDS teñida con azul de Coomassie; (b) inmunotransferencia teñida con suero de conejo anti-Sin a 1.

ESTABILIDAD DE LA ACTIVIDAD ALERGENICA DE Sin a 1

Separación de las cadenas

Para comprobar la alergenicidad de cada una de las dos cadenas polipeptídicas que constituyen el alérgeno de mostaza nativo, se procedió a la separación de las mismas en condiciones reductoras. Las cadenas reducidas y carboxiamidometiladas se separaron mediante cromatografía de penetrabilidad. El perfil de elución correspondiente a dicha separación aparece recogido en la figura 29. Como pudo apreciarse mediante PAGE-SDS de los dos picos obtenidos, ambas cadenas polipeptídicas se resolvieron perfectamente usando el procedimiento descrito.

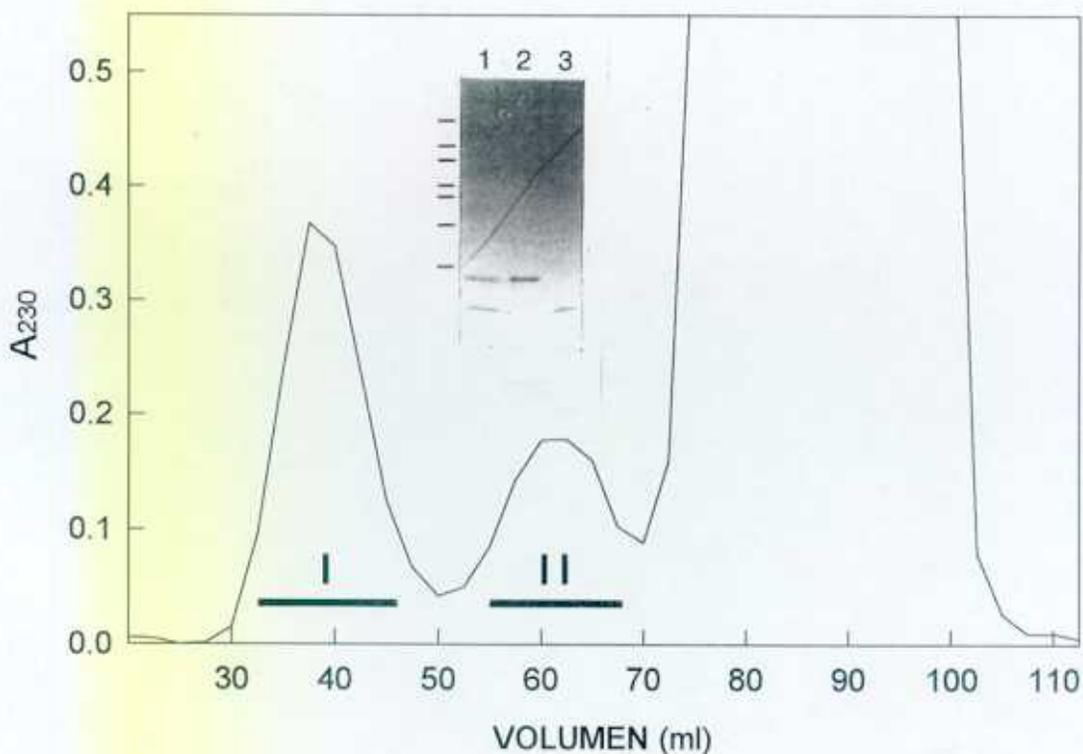


Figura 29. Perfil de elución de la cromatografía de penetrabilidad en Sephadex G-50 de Sin a 1 reducido y carboxiamidometilado. Las fracciones recogidas se señalan con barras. En el inserto se muestra la PAGE-SDS de las fracciones recogidas (tinción con Coomassie). 1, Sin a 1 reducido con un 5% de β -mercaptoetanol; 2, fracción I (cadena pesada); 3, fracción II (cadena ligera).

Reconocimiento de las cadenas por sueros de pacientes alérgicos

Cuando Sin a 1 fue transferido a nitrocelulosa tras una PAGE-SDS en condiciones reductoras, cinco de los 18 sueros probados reconocieron a la cadena pesada del alérgeno, tres de ellos de forma muy intensa (figura 30). En ningún caso pudo apreciarse unión específica de IgE a la cadena ligera. Estos resultados coinciden con los obtenidos para las IgG de suero de conejo, ya que éstas reconocieron a la cadena pesada, pero no a la ligera, en membranas de nitrocelulosa (figura 30).

La titulación mediante ELISA de las IgE específicas de mostaza (mezcla de sueros 12, 13, 16, 17 y 18) con la cadena ligera carboxiamidometilada del alérgeno resultó totalmente coincidente con los resultados obtenidos en inmunotransferencia, pues, como puede apreciarse en la figura 31, no existió unión de IgE a la cadena ligera en fase sólida. La cadena pesada carboxiamidometilada, al contrario de lo que ocurre en membranas de nitrocelulosa, tampoco fue reconocida de modo significativo por la mezcla de sueros de pacientes alérgicos.



Figura 30. Inmunotransferencias del alérgeno de la mostaza tras PAGE-SDS en condiciones reductoras teñidas con 18 sueros de pacientes alérgicos a mostaza (tiras 1 a 18). La tira P corresponde a la misma muestra teñida con suero de conejo anti-Sin a 1.



Figura 31. Curvas de unión de IgE de pacientes alérgicos a mostaza (mezcla de sueros) a: (●) Sin a 1; (■) su cadena pesada carboxiamidometilada; (▲) su cadena ligera carboxiamidometilada, adsorbidos a poliestireno.

Ensayos *in vitro* de estabilidad gastrointestinal

Digestión con pepsina

Para comprobar la resistencia a la degradación gástrica del alérgeno de mostaza en estado nativo, se llevó a cabo su digestión con pepsina a pH ácido. Como puede verse en la figura 32, el alérgeno permaneció aparentemente intacto tras 24 horas de digestión.

El perfil de elución en RP-HPLC del producto de la digestión con pepsina se recoge en la figura 33. En él se aprecia una absoluta ausencia de péptidos, a excepción de la proteína residual. La fracción excluida de la columna fue analizada para comprobar si contenía algún dipéptido polar o aminoácido libre. El resultado se presenta en la tabla 10, en la que puede observarse la presencia en dicha fracción de algunos aminoácidos, que no pueden encontrarse constituyendo péptidos, ya que si así fuera no aparecerían en ese lugar del eluido. Además, su cantidad (2.6 nmoles totales) no tiene ningún valor significativo respecto a la cantidad de proteína total (12.5 nmoles). La composición de ésta, asimismo, no reflejó la pérdida de ningún residuo.

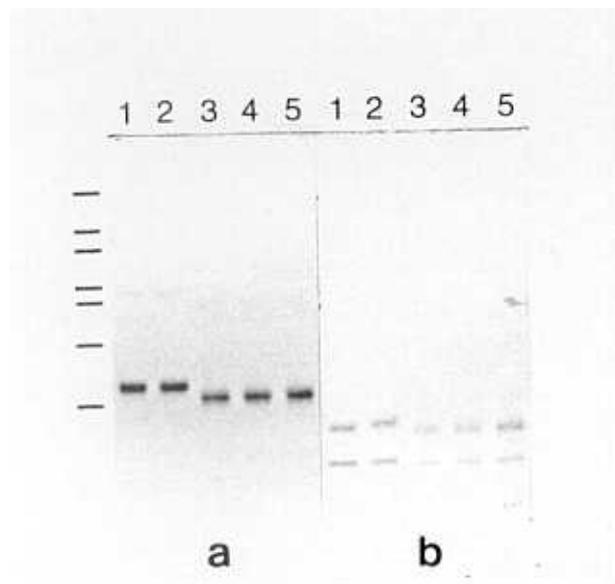


Figura 32. PAGE-SDS mostrando la resistencia a proteasas del alérgeno de la mostaza nativo. Líneas: 1, Sin a 1 sin digerir; 2, Sin a 1 tratado con pepsina; 3, Sin a 1 tratado con tripsina; 4, Sin a 1 tratado con quimotripsina; 5, Sin a 1 tratado simultáneamente con tripsina y quimotripsina. (a) Muestras sin reducir; (b) muestras reducidas con un 5% de β -mercaptoetanol.

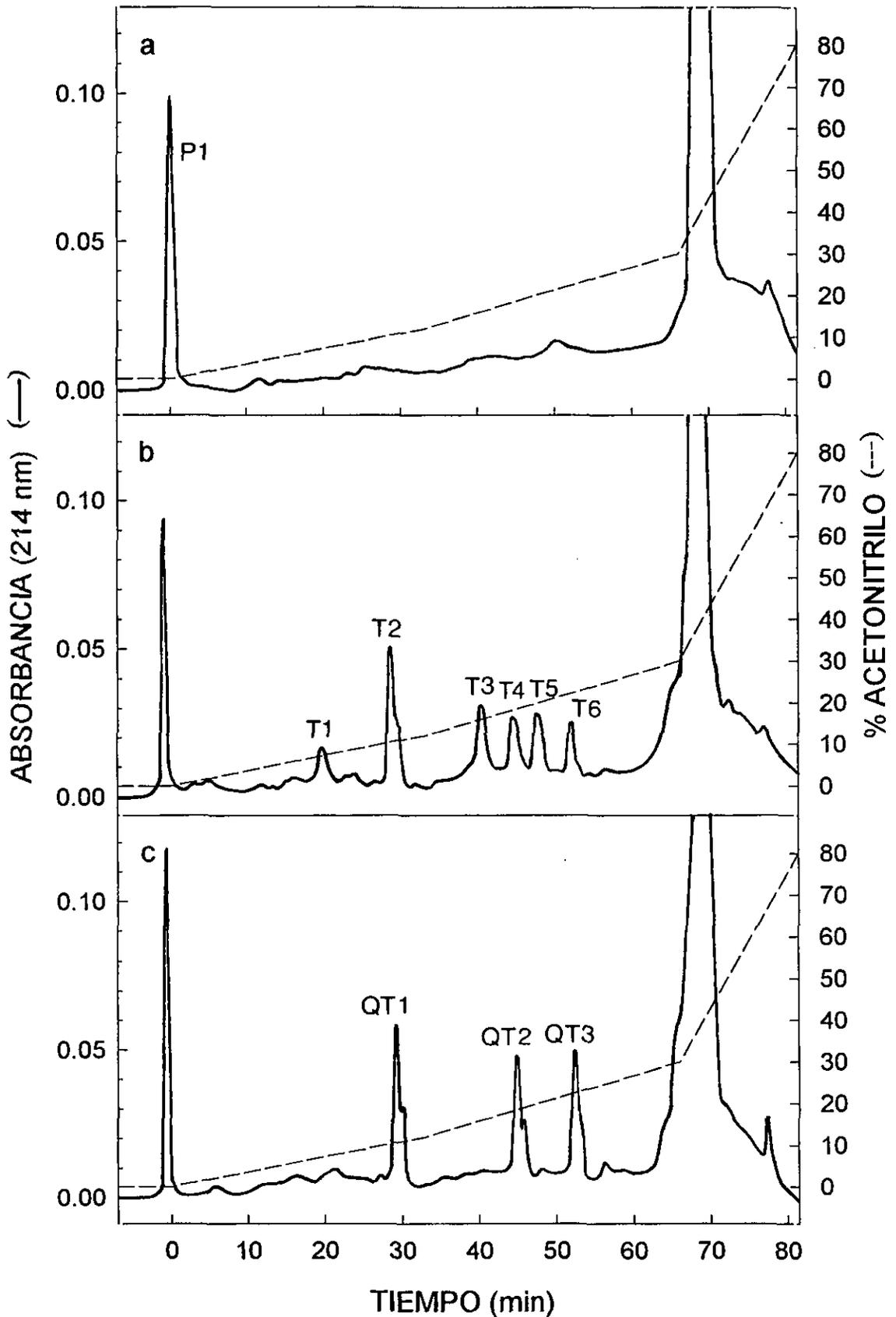


Figura 33. Perfiles de elución en RP-HPLC (columna Nucleosil C₁₈) de las digestiones de Sin a 1 con: (a) pepsina (pico P1); (b) tripsina (péptidos T1 a T6); (c) quimotripsina (péptidos QT1 a QT3).

Tabla 10. Composición de aminoácidos de los péptidos obtenidos en HPLC tras la digestión con pepsina del alérgeno *Sin a I* nativo.

	<u>P-1</u>	<u>proteína residual</u>	<u>proteína nativa</u>
Cys		N.D.	8
Asx	0.6	2.1 (2)	2
Thr		3.8 (4)	4
Ser	1.0	5.8 (6)	6
Glx	1.5	28.3 (28)	28
Pro		14.8 (15)	15
Gly	1.7	7.9 (8)	8-9
Ala	0.6	6.7 (7)	7
Val		5.5 (6)	6
Met		1.8 (2)	2
Ile		3.6 (4)	4
Leu	0.6	8.8 (9)	9
Tyr		1.0 (1)	1
Phe		2.8 (3)	3
His		4.7 (5)	5
Lys		8.3 (8-9)	9
Arg		5.7 (6)	5-6
Trp		N.D.	1
nmols	----- 2.6 Ser		

Digestiones con tripsina y quimotripsina

Sin a I fue sometido también a la acción digestiva de las dos principales proteasas pancreáticas, tripsina y quimotripsina. El análisis mediante PAGE-SDS de los productos resultantes de las digestiones con ambas enzimas, tanto por separado como juntas, se encuentra recogido en la figura 32. En todos los casos, tras 24 horas de digestión, el alérgeno sólo sufrió una disminución de tamaño aparente de unos 1300 Da, permaneciendo intacta la mayor parte de la molécula. Como puede verse en la figura 32, la disminución de tamaño afectó a ambas cadenas.

El perfil de elución en HPLC del producto obtenido en el tratamiento con tripsina se recoge en la figura 33. En la tabla 11 se muestra la composición de aminoácidos de los péptidos, así como la del pico correspondiente a la proteína residual. Como puede comprobarse, se produjo la digestión de un pequeño fragmento de la proteína, apareciendo sólo dos péptidos con rendimiento importante: T-2 y (T-3 + T-4 + T-5

+ T-6). Estos cuatro últimos picos corresponden al extremo N-terminal de la cadena ligera (ver figura 8: secuencia de Sin a 1), pero con mínimas diferencias entre sí. El péptido total sería: PAGPFR, que equivaldría a T-3; T-4 (PAGPF) sería el producto de una digestión parcial de T-3 debida a una contaminación quimotróptica residual. Los péptidos T-5 y T-6 darían cuenta de las secuencias AGPFR y AGPF, respectivamente, y procederían de moléculas de proteína en las que estaría ausente el residuo N-terminal (P) que aparece en los péptidos T-3 y T-4. El otro péptido que se libera mayoritariamente (T-2, 5.8 nmoles) debe corresponder, por su composición, al extremo carboxilo terminal de la cadena pesada (...TMPGPS). Finalmente, la fracción T-1 no puede estar constituida por un único péptido, pues su composición arroja un número de aminoácidos demasiado grande para eluir en la posición del gradiente en la que lo hace. Además, contiene leucina, isoleucina y valina, que deberían retrasar mucho la elución, de estar formando parte de un péptido mayor de tres o cuatro residuos. Ello implica que la cantidad obtenida de estos residuos debe ser muy pequeña en comparación con el total de proteína utilizada en el experimento y que, por tanto, han de estar constituyendo aminoácidos libres.

Tabla 11. Composición de aminoácidos de los péptidos obtenidos en HPLC tras la digestión con tripsina del alérgeno *Sin a I* nativo.

	<u>T-1</u>	<u>T-2</u>	<u>T-3</u>	<u>T-4</u>	<u>T-5</u>	<u>T-6</u>	Proteína residual	Proteína nativa	Diferencia	<u>T-2 + T-3</u>
Cys							N.D.	8		
Asx	1.0 (1)						2.3 (2)	2		
Thr	1.4 (1-2)	1.0 (1)					2.9 (3)	4	1	1
Ser	2.1 (2)	1.0 (1)					4.2 (4-5)	6	1-2	1
Glx	2.1 (2)		0.5	0.4			27.6 (28)	28		
Pro	2.9 (3)	1.9 (2)	1.9 (2)	2.0 (2)	1.1 (1)	1.3 (1)	10.8 (11)	15	4	4
Gly	2.9 (3)	1.2 (1)	1.2 (1)	1.1 (1)	1.3 (1)	1.4 (1)	5.8 (6)	8-9	2-3	2
Ala	1.0 (1)		1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	6.0 (6)	7	1	1
Val	0.5 (0-1)						6.0 (6)	6		
Met	0.6 (0-1)	0.9 (1)					1.1 (1)	2	1	1
Ile	0.7 (1)						3.3 (4)	4		
Leu	0.7 (1)						8.7 (9)	9		
Tyr	0.2						0.9 (1)	1		
Phe	0.2		0.7 (1)	0.7 (1)	0.7 (1)	0.6 (1)	1.9 (2)	3	1	1
His	0.2						4.5 (5)	5		
Lys	0.7 (1)						8.2 (8-9)	9	0-1	
Arg	0.6 (1)		0.9 (1)	0.3	0.8 (1)	0.3	5.1 (5)	5-6	0-1	1
Trp							N.D.	1		
nmoles	1.7 Met	5.8	3.4	3.5	2.3	2.5	8.6			

El perfil del eluido en HPLC de la digestión con quimotripsina (figura 33) sólo mostró tres péptidos y la proteína residual. La composición de aminoácidos de los péptidos obtenidos tras este tratamiento se recoge en la tabla 12. El análisis del péptido QT-1 eluyó al mismo porcentaje de acetonitrilo que el T-2 de la digestión trípica, y arrojó su misma composición (Thr, Ser, Pro₂, Gly, Met), correspondiente al extremo C-terminal de la cadena pesada (...TMPGPS). Ello significa que debe provenir de una contaminación trípica residual que resulta visible tras las 24 horas de digestión. Los péptidos QT-2 y QT-3 procederían, como ocurría con T-4 y T-6, de cadenas con y sin prolina en el extremo N-terminal. Los correspondientes péptidos con arginina (resultantes de la contaminación trípica) no aparecen debido a que la acción inicial de la quimotripsina dejaría la arginina como extremo amino, de manera que la presencia de carga impediría la subsecuente acción de la tripsina. La composición de aminoácidos de la proteína residual, al igual que ocurría en el caso de la digestión con tripsina, coincidió plenamente con lo que cabía esperar a partir de la pérdida de los péptidos analizados. Además, el tamaño de los péptidos obtenidos (1265-1380 Da) da perfecta cuenta del aumento de movilidad observado en PAGE-SDS.

Tabla 12. Composición de aminoácidos de los péptidos obtenidos en HPLC tras la digestión con quimotripsina del alérgeno *Sin a I* nativo.

	<u>QT-1</u>	<u>QT-2</u>	<u>QT-3</u>	<u>Proteína residual</u>	<u>Proteína nativa</u>	<u>Diferencia</u>	<u>QT-1 + QT-2</u>
Cys				N.D.	8		
Asx				2.1 (2)	2		
Thr	1.0 (1)			2.8 (3)	4	1	1
Ser	1.0 (1)			4.8 (5)	6	1	1
Glx	0.5			27.4 (28)	28		
Pro	1.7 (2)	1.8 (2)	0.9 (1)	10.7 (11)	15	4	4
Gly	1.2 (1)	1.1 (1)	1.1 (1)	6.1 (6)	8-9	2-3	2
Ala		1.0 (1)	1.0 (1)	6.0 (6)	7	1	1
Val				5.8 (6)	6		
Met	0.7 (1)			1.0 (1)	2	1	1
Ile				3.5 (4)	4		
Leu				8.8 (9)	9		
Tyr				0.9 (1)	1		
Phe		0.9 (1)	0.9 (1)	1.8 (2)	3	1	1
His				4.6 (5)	5		
Lys				7.6 (8)	9	1	
Arg				5.5 (5-6)	5-6		
Trp				N.D.	1		
nmoles	6.9	6.5	4.1	10			

La digestión con tripsina no afectó de modo significativo a la alergenicidad de Sin a 1, pues la curva de titulación en ELISA de las IgE de sueros de pacientes alérgicos a mostaza con el alérgeno digerido es prácticamente idéntica a la obtenida previamente con la proteína nativa (figura 34). Este resultado, a la luz de los datos conocidos de los péptidos perdidos durante la digestión con tripsina, indica que en los determinantes alergénicos no participan ni el extremo N-terminal de la cadena ligera, ni el C-terminal de la pesada.

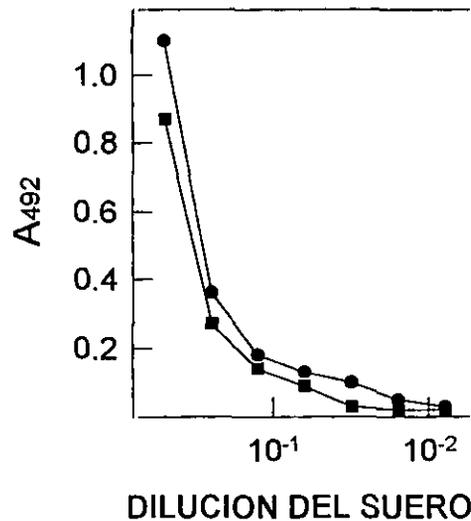


Figura 34. Curvas de unión de IgE de pacientes alérgicos a mostaza (mezcla de sueros) a (●) Sin a 1 y (■) Sin a 1 digerido con tripsina, previamente fijados a poliestireno.

Tratamiento con extracto digestivo humano

Con el fin de someter al alérgeno Sin a 1 a unas condiciones lo más similares posible a las presentes en el tracto gastrointestinal, se llevaron a cabo ensayos de digestión *in vitro* con extractos digestivos humanos. Para ello, se empleó la secreción gástrica de un individuo, obtenida tras 15 minutos de inducción con gastrina. Tras una digestión de 2 horas a 37°C (condiciones semejantes a la digestión *in vivo*) los productos obtenidos se analizaron mediante PAGE-SDS. Los resultados se muestran en la figura 35. Puede verse que el alérgeno permanece intacto después del tratamiento con el jugo gástrico, siendo degradada, en las mismas condiciones, la proteína control (lisozima de gallina).

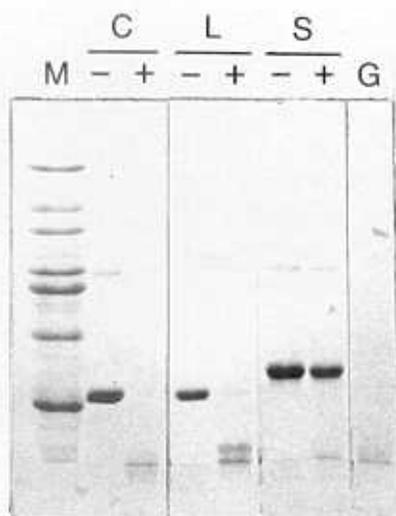


Figura 35. PAGE-SDS de la digestión del alérgeno de la mostaza nativo con secreción gástrica humana. Líneas: M, patrones de masa molecular (como en otras figuras); C, lisozima carboxiamidometilada como sustrato; L, lisozima nativa como sustrato; S, Sin a 1 nativo como sustrato; (-) sin añadir secreción gástrica; (+) añadiendo secreción gástrica; G, secreción gástrica humana.

REACTIVIDAD CRUZADA CON LAS NAPINAS DE COLZA

Especificidad del suero de paciente alérgico a colza

El suero de un paciente que sufría de reacciones alérgicas (dificultad respiratoria, rinorrea) frente a la exposición ocupacional a harina de semillas de colza (*Brassica napus*) se utilizó para estudiar la posible reactividad alérgica cruzada de Sin a 1 con otras albúminas 2S de crucíferas. Dicha reactividad resultaba altamente probable, dada la gran similitud estructural existente entre el alérgeno de la mostaza y las napinas de la colza. Además, el paciente había sufrido también en varias ocasiones fuertes reacciones alérgicas tras la ingestión de mostaza.

Para identificar los componentes de la semilla de colza responsables de la hipersensibilidad del paciente, se llevó a cabo con su suero la inmunodetección de las proteínas de un extracto de las semillas transferidas a nitrocelulosa. Como puede verse en la figura 36, las únicas proteínas del extracto (E) que unieron IgE parecían ser, por su tamaño aparente, las proteínas 2S, incluyendo sus dímeros y las napinas de bajo peso molecular. Efectivamente, cuando se realizó la inmunodetección de las napinas aisladas, todas las fracciones resultaron reconocidas por las IgE del paciente (figura 36). Es de destacar el menor nivel de unión de las napinas de bajo peso molecular, así como la gran intensidad de las señales correspondientes a las formas oligoméricas en todas las fracciones (tabla 13).

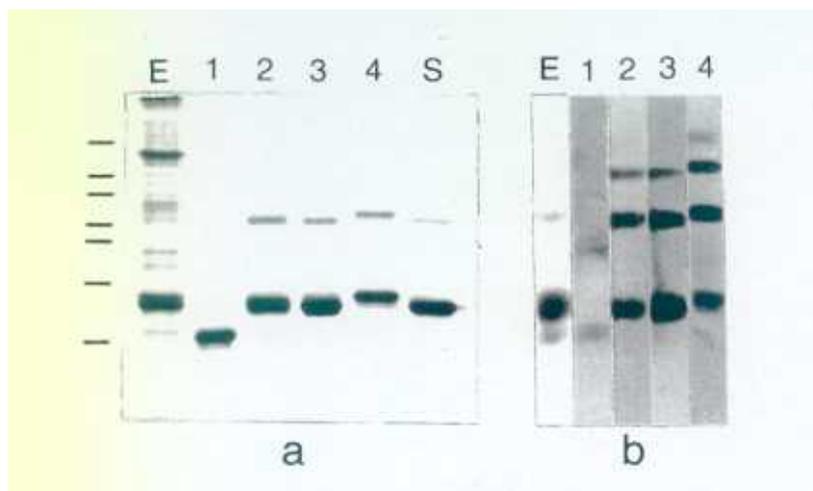


Figura 36. Reconocimiento en inmunotransferencia de las napinas de *B. napus* por IgE de un paciente alérgico a colza. Líneas: E, extracto salino de semillas de colza; 1, napina BnIb; 2, BnII; 3, BnIII; 4, BnIV; S, Sin a 1. (a) PAGE-SDS teñida con azul de Coomassie; (b) inmunotransferencia teñida con IgE de paciente alérgico a colza.

Tabla 13. Unión de las IgE de suero de paciente alérgico a colza a las proteínas 2S de esta semilla y al alérgeno principal de la mostaza. La cantidad de unión se estimó mediante el densitometrado de las autorradiografías de las correspondientes inmunotransferencias. El % de unión se da en relación a la señal total de BnIII. La relación en masa oligómero/monómero se determinó mediante el densitometrado de los correspondientes geles de poliacrilamida.

proteína		% unión	unión relativa oligómero/monómero
BnIb	monómero	4.5	1
	dímero	6	> 10
	trímero	0.5	-
	total	11	
BnII	monómero	27	1
	dímero	29	4
	trímero	9	3.3
	total	65	
BnIII	monómero	62	1
	dímero	33	3.1
	trímero	5	1.6
	total	100	
BnIV	monómero	21	1
	dímero	29	4.2
	trímero	14	6.2
	tetrámero	2.5	2.6
	total	66.5	
Sin a 1	monómero	54	1
	dímero	11	1.3
	total	65	

Reactividad cruzada en inmunotransferencia

Se llevaron a cabo ensayos de reactividad cruzada en inmunotransferencia con el alérgeno Sin a 1 y las proteínas 2S de la colza. Para ello se eligieron las proteínas BnIII y BnIb, por ser estos los componentes mayoritarios de las fracciones de alto y bajo peso molecular, respectivamente [Monsalve y Rodríguez, 1990]. Los resultados obtenidos se recogen en la figura 37, y pueden resumirse en los siguientes puntos:

- El alérgeno de la mostaza fue reconocido por las IgE del paciente alérgico a colza de forma similar a BnIII (fig. 37Ic). La baja señal de los dímeros de Sin a 1 (en comparación a los de BnIII) se debió en parte a que la muestra empleada en el ensayo mostraba un menor contenido en forma dimérica (figura 36).

- Tanto BnIII como BnIb se comportaron de forma indistinguible a Sin a 1 frente a las IgE de sueros de pacientes alérgicos a la mostaza, siendo intensamente reconocida la cadena pesada de las tres proteínas por la mezcla de sueros utilizada (fig. 37Ib y IIb).

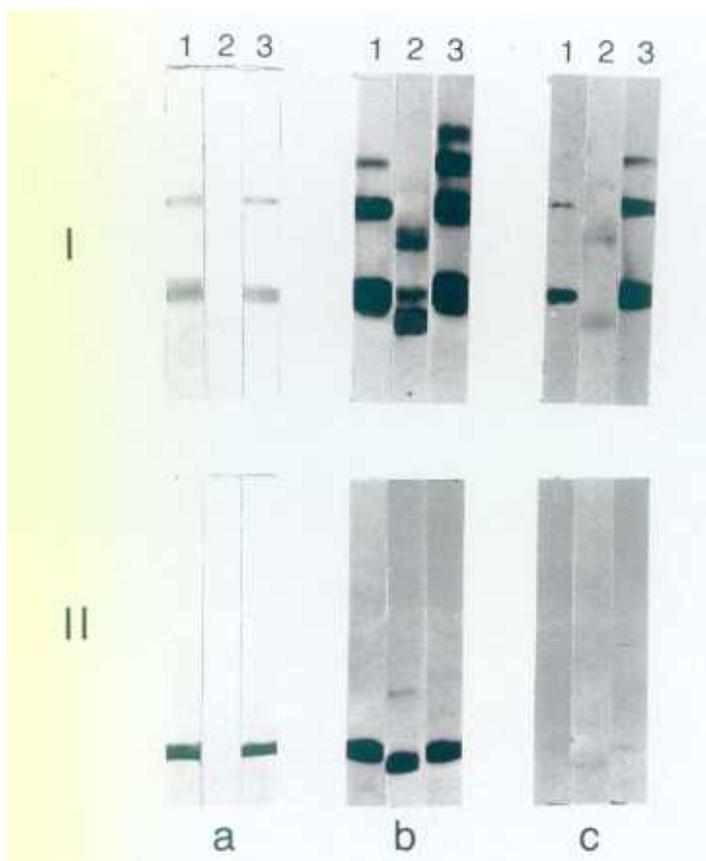


Figura 37. Reactividad cruzada en inmunotransferencia del alérgeno de la mostaza con las napinas de colza. Parte superior (I), proteínas sin reducir; parte inferior (II), proteínas reducidas. Líneas: 1, Sin a 1; 2, BnIb; 3, BnIII. (a) Inmunodetección con suero de conejo anti-Sin a 1; (b) inmunodetección con una mezcla de sueros de pacientes alérgicos a mostaza; (c) inmunodetección con suero de paciente alérgico a colza.

■ Por el contrario, las IgG de conejo desarrolladas frente al alérgeno de la mostaza sólo reconocieron a BnIII (tanto a la proteína completa como a la cadena pesada), pero no a la napina de bajo peso molecular, BnIb (fig. 37Ia y IIa).

■ Finalmente, las IgE presentes en el suero del paciente alérgico a colza no reconocieron de modo significativo a las cadenas pesadas de estas proteínas.

Reactividad cruzada en ELISA

Aunque los experimentos de inmunotransferencia son sumamente útiles a la hora de detectar la presencia de proteínas reconocidas por un suero, los resultados obtenidos no son fácilmente extrapolables a las condiciones que tienen lugar *in vivo* durante la respuesta inmune, ya que, en la PAGE-SDS previa a la transferencia, las muestras se ven sometidas a condiciones desnaturalizantes (más aún en el caso de que se emplee un agente reductor). Por este motivo, se llevaron a cabo los siguientes ensayos de reactividad cruzada en ELISA:

Titulación de IgE presentes en el suero de paciente alérgico a colza.

La titulación de las IgE del suero del paciente alérgico a colza demostró que su capacidad de reconocimiento del alérgeno de la mostaza es prácticamente la misma que para BnIII. El título de IgE de dicho suero para BnIb, aunque alto, fue cerca de un 30% menor que para BnIII (figura 38).

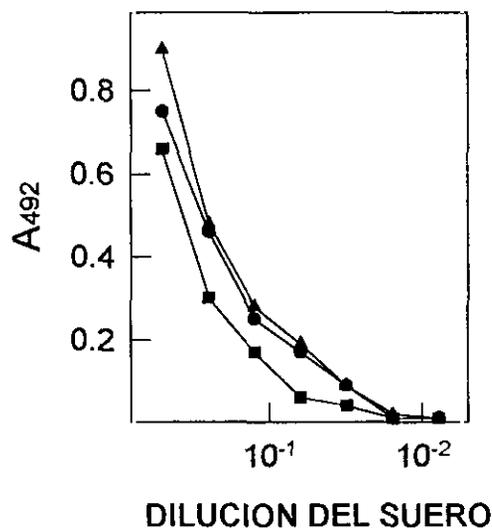


Figura 38. Curvas de unión de las IgE del suero de un paciente alérgico a colza a (●) Sin a 1; (■) BnIb y (▲) BnIII adsorbidos a poliestireno.

Inhibición de la unión de IgG de conejo desarrolladas frente a Sin a 1.

Los ensayos de inhibición de la unión de IgG de conejo a Sin a 1 unido a fase sólida mostraron una clara diferencia entre BnIb y BnIII. Esta última fue capaz de inhibir totalmente la unión de IgG, mostrando incluso mayor afinidad que el propio alérgeno de la mostaza. Por el contrario, utilizando BnIb, en las mismas condiciones no se llegó a alcanzar el 50% de inhibición (figura 39).

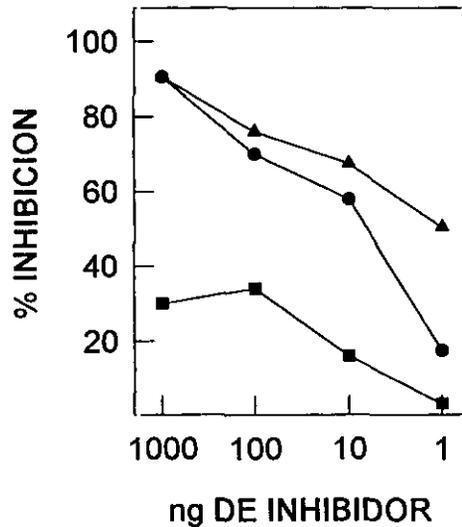


Figura 39. Curvas de inhibición de la unión de IgG de suero de conejo anti-Sin a 1 al alérgeno de mostaza adsorbido a poliestireno, utilizando como inhibidores: Sin a 1 (●), BnIb (■) y BnIII (▲).

Inhibición de la unión de IgE.

La reactividad alérgica cruzada entre Sin a 1, BnIb y BnIII pudo comprobarse mediante ELISA de inhibición. Los resultados fueron similares cuando se ensayaron las IgE específicas para mostaza (figura 40a) y cuando se utilizaron las presentes en el suero de paciente alérgico a colza (figura 40b). En el primer caso se tapizaron las placas con el alérgeno Sin a 1, mientras que en el segundo se hizo con BnIII. En ambos experimentos se comprobó que BnIII y el alérgeno de la mostaza comparten un gran número de epítomos comunes, pues con ambas proteínas se alcanzaron valores similares de inhibición, aunque la similitud de las curvas obtenidas fue mayor en el caso de los sueros de pacientes alérgicos a mostaza. La napina de bajo peso molecular dio, en las condiciones del ensayo, unos valores de inhibición inferiores al 50% tanto para las IgE específicas de colza como en el caso del suero de pacientes alérgicos a mostaza.

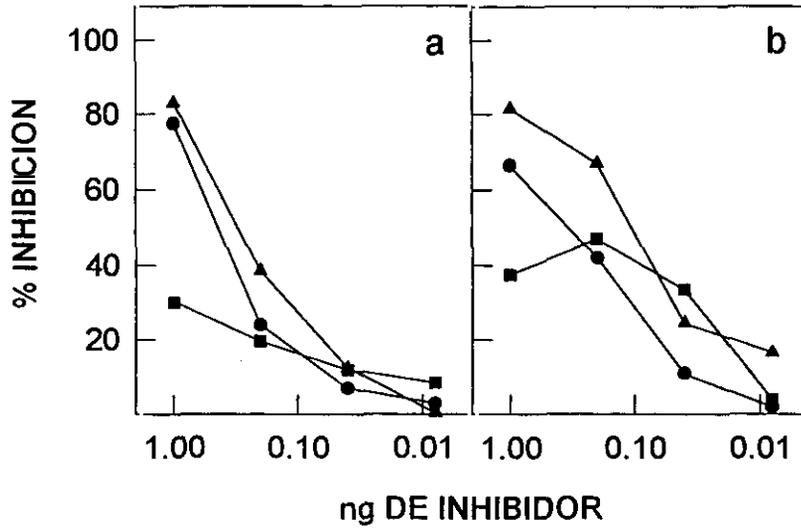


Figura 40. Reactividad alérgica cruzada en ELISA del alérgeno de mostaza con las napinas de colza. (a) Curvas de inhibición de la unión de IgE de sueros de pacientes alérgicos a mostaza (mezcla de sueros) a Sin a 1 adsorbido a poliestireno, utilizando como inhibidores: Sin a 1 (●), BnIb (■) y BnIII (▲). (b) Curvas de inhibición de la unión de IgE del suero de paciente alérgico a colza a la napina BnIII adsorbida a poliestireno, utilizando como inhibidores: Sin a 1 (●), BnIb (■) y BnIII (▲). La desviación estándar en estos ensayos no supera en ningún caso el 5% del porcentaje de inhibición observado.

DISCUSION

EXPRESION EN *E. coli* DEL ALERGENO PRINCIPAL DE LA MOSTAZA

Nuestro principal objetivo era conseguir la expresión de una forma recombinante de Sin a 1 que conservara intactas la mayor parte de sus propiedades antigénicas y alérgicas. La producción de una especie molecular pura de una proteína muy polimórfica, como es el alérgeno de la mostaza, posibilita una caracterización inmunológica más inequívoca de la molécula. Por otra parte, la disponibilidad de un alérgeno perfectamente definido a nivel molecular abre las puertas al diseño de nuevas formas de inmunoterapia altamente específicas.

Dado que las napinas, familia a la que pertenece Sin a 1, son codificadas por genes sin intrones [Josefsson y col, 1987; Scofield y Crouch, 1987; Krebbers y col., 1988; Baszcynski y Fallis, 1990; Ericson y col., 1991], fue posible utilizar secuencias genómicas para expresar el alérgeno, sin necesidad de sintetizar el correspondiente cDNA a partir del mRNA. La mayor dificultad a la hora de producir el alérgeno Sin a 1 en *E. coli* radica en el hecho de que esta proteína, en su estado nativo, está constituida por dos cadenas polipeptídicas unidas por puentes disulfuro, existiendo, además, otros dos puentes disulfuro intracatenarios en la cadena pesada. La estrategia utilizada consistió en expresar una secuencia continua de nucleótidos que codifica ambas cadenas, unidas por el fragmento peptídico que es procesado *in vivo* durante la maduración de la semilla. Podía esperarse que el producto obtenido mediante una construcción de este tipo poseyera unas propiedades estructurales muy similares a las de la proteína nativa, pues el plegamiento de la misma *in vivo* debe producirse antes de que tenga lugar la eliminación proteolítica del fragmento peptídico existente entre ambas cadenas [Monsalve y col., 1991].

Las secuencias de aminoácidos deducidas de los clones obtenidos difieren ligeramente entre sí y respecto a la estructura primaria determinada a partir del alérgeno maduro aislado de las semillas. Este hecho confirma la existencia de un gran polimorfismo en este alérgeno, lo cual ya había sido previamente detectado durante la elucidación de la secuencia de aminoácidos mediante degradación de Edman [Menéndez-Arias y col., 1988]. De hecho, algunas de las microheterogeneidades que aparecen en las secuencias deducidas de los clones ya fueron encontradas en el alérgeno nativo (Menéndez-Arias y Rodríguez, datos no publicados). Tal es el caso de los residuos

correspondientes a las posiciones 6 y 36 de la cadena ligera (Arg/Gly y Ser/Gly, respectivamente) y de las posiciones 73 y 81 de la cadena pesada (Arg/Pro y Lys/Gln). En cuanto al resto del polimorfismo observado, es poco probable que pueda deberse a artefactos de PCR, pues la frecuencia de error de la polimerasa *Taq* (10^{-5} nucleótidos/ciclo) es mucho menor que la cantidad de cambios que aparecen en las secuencias obtenidas [Erlich y col., 1991]. Además, el número de cambios silenciosos (que no se traducen en sustituciones de aminoácidos) es considerablemente mayor de lo que cabría esperar estadísticamente (alrededor del 75%). La principal diferencia entre las secuencias deducidas de los clones respecto a la secuencia del alérgeno nativo es que todas ellas presentan una secuencia adicional de tres residuos entre las posiciones 54 y 55 de la cadena pesada. Esto puede deberse al distinto origen de las semillas utilizadas para obtener los clones genómicos (españolas) y las que se usaron para aislar el alérgeno nativo (procedentes de EE.UU.).

Algunas de las heterogeneidades encontradas en las secuencias deducidas de los clones se localizan en el péptido de conexión eliminado durante el proceso de maduración de la proteína. Las heterogeneidades localizadas cerca de los sitios de procesamiento pueden jugar un papel importante en la maduración proteolítica de las proteínas 2S, ya que podrían afectar a los posibles motivos estructurales reconocidos por las actividades endoproteolíticas implicadas en dicho proceso. Tales microheterogeneidades pueden ser la causa de la existencia de moléculas de proteína madura con cadenas polipeptídicas de distinta longitud, lo cual ha sido observado en las napinas de la colza [Monsalve y col., 1990]. Es un hecho bien establecido que los cambios evolutivos son más rápidos en aquellas secuencias que codifican segmentos no funcionales o regiones eliminadas durante el procesamiento postraduccional de las proteínas [Poljac y col., 1976; Padlan y col., 1975]. Este no parece ser el caso de la secuencia del péptido de conexión de las albúminas 2S de crucíferas, pues si comparamos las secuencias deducidas de los clones obtenidos con las de otros genes conocidos de albúminas 2S (figura 41) se puede comprobar que la secuencia de dicho péptido está bastante conservada. Existe una identidad superior al 65% entre todas las secuencias analizadas, identidad que es igual o superior al 80% si excluimos de la comparación al clon AT2S2 de *A. thaliana*, que es el que presenta un mayor número de cambios con respecto a los demás. Un dato particularmente interesante en relación al procesamiento de estas proteínas *in vivo* es la conservación en todas las secuencias conocidas, incluidos los siete clones de *S. alba*, de los pares de residuos Phe-Asp (posiciones -9 y -8 de la cadena pesada) y Asp-Asp (posiciones -5 y -4). Estos residuos han sido identificados como sitios de corte para una endoproteinasa ácida descrita en semillas de *B. napus* como una de las enzimas implicadas en el proceso de maduración de las albúminas 2S [D'Hondt y col., 1993].

Con el fin de expresar el alérgeno recombinante en *E. coli*, se realizaron diversas construcciones utilizando el clon SIN3. Dicho clon fue elegido por su mayor identidad de secuencia con el alérgeno aislado de las semillas. Cuando se intentó llevar a cabo la expresión directa de rSina1 en el citoplasma de *E. coli*, utilizando para ello los vectores pIN-III-A2 o pTrc99A, en ninguno de los dos casos se obtuvo producto detectable por anticuerpos específicos para el alérgeno nativo. Esto puede deberse a varios motivos. En primer lugar, el producto de estas construcciones puede ser inestable en el citoplasma de las bacterias. Es un hecho muy común que los niveles de expresión de proteínas heterólogas en el citoplasma de *E. coli* se encuentren limitados debido a que dichas proteínas son reconocidas como extrañas y resultan degradadas [Wetzel y col., 1983]. Esto es particularmente frecuente en el caso de polipéptidos pequeños. Otras posibles explicaciones de la ausencia de niveles detectables de expresión directa de rSina1 son la inestabilidad del RNA o la ineficiencia de la traducción. Se ha visto que, en algunas ocasiones, los niveles de expresión pueden mejorarse usando secuencias que estabilizan el mRNA [Panayotatos y Truong, 1981; Studier y Moffatt, 1986; Rosenberg y col., 1987]. Asimismo, ha sido descrito en varias ocasiones que algunas secuencias de nucleótidos pueden dificultar el inicio de la traducción cuando se encuentran próximas al codón de iniciación, porque poseen algún tipo de estructura secundaria capaz de interferir con el sitio de unión al ribosoma [Iserentant y Fiers, 1980; Gold y col., 1981; Wood y col., 1984]. Dado que sí hubo producción de rSina1 tanto en forma de proteína de fusión como unida a un péptido señal (construcciones pCES3, pGEXS3 y *pompAS3*) la ausencia de niveles detectables de traducción en las construcciones pINS3 y pTrcS3 parece una explicación más plausible que la degradación total de los correspondientes productos.

La expresión de rSina1 unido al péptido señal de la proteína *ompA* produjo dos polipéptidos insolubles con la misma secuencia N-terminal. Dicha secuencia corresponde a la que cabría esperar como resultado de un correcto procesamiento del péptido señal. Esto indica que el producto de la expresión es exportado al espacio periplásmico, donde se acumula en un estado insoluble. El tamaño aparente del mayor de los dos productos obtenidos (18.8 kDa) resultó ser significativamente superior al esperado para rSina1 (16.4 kDa). Sin embargo, esta discrepancia se debe con toda seguridad a la escasa movilidad electroforética de esta proteína, pues esta circunstancia se da también en el caso del alérgeno nativo, que muestra un tamaño aparente de 16.5 kDa en PAGE-SDS, siendo su tamaño real 14.1 kDa. De esta forma, el menor de los dos polipéptidos obtenidos debe ser un fragmento de rSina1 originado por una rotura proteolítica de la molécula. En cualquier caso, dicho fragmento posee el tamaño suficiente como para ser reconocido por el suero de conejo obtenido frente a la proteína nativa.

Las proteínas de fusión C-LYTA-rSina1 y GST-rSina1 se produjeron también en una forma mayoritariamente insoluble. La expresión de proteínas recombinantes en bacterias frecuentemente conduce a la formación de polipéptidos inactivos que se acumulan intracelularmente en forma de agregados insolubles llamados cuerpos de inclusión [Marston, 1986]. La formación de cuerpos de inclusión parece ser independiente del tipo de proteína expresada. En el caso de la expresión de proteínas eucarióticas que poseen puentes disulfuro en su estado nativo, frecuentemente se produce la formación de puentes disulfuro incorrectos, tanto intra- como intermoleculares. Tal parece ser el caso de las proteínas de fusión C-LYTA-rSina1 y GST-rSina1, pues tras el aislamiento y lavado de los cuerpos de inclusión, su solubilización requirió el uso de agentes reductores, junto con agentes desnaturalizantes como urea o cloruro de guanidinio, para romper los puentes disulfuro y obtener las cadenas polipeptídicas monoméricas. La insolubilidad de rSina1 no es un hecho sorprendente, pues se sabe que las proteínas eucarióticas ricas en cisteína y prolina, como es el caso del alérgeno de la mostaza (8 Cys y 16 Pro, de un total de 145 residuos en rSina1), se pliegan de forma ineficiente en *E. coli* [Wilkinson y Harrison, 1991]. Por tanto, con toda probabilidad, los problemas de solubilidad encontrados a la hora de expresar rSina1 en *E. coli* tienen su origen en la dificultad de la correcta formación de los cuatro puentes disulfuro que posee la molécula nativa. De hecho, hasta la fecha, ninguna albúmina 2S ha sido expresada en *E. coli*, y, sólo muy recientemente, se ha llevado a cabo la producción de algunas de estas proteínas en levaduras [Pal y Biswas, 1995].

Para comprobar que la insolubilidad de rSina1 no era debida a ningún factor de tipo experimental, se probaron diferentes condiciones de cultivo. Así, y con todas las construcciones utilizadas, se llevó a cabo la expresión a distintas temperaturas, comprendidas entre 25°C y 38°C. También se probaron concentraciones de IPTG entre 0.1 y 5 mM, y tiempos de inducción entre 1 y 10 h. En ningún caso, ni el rendimiento ni la solubilidad de la proteína recombinante aumentaron de modo apreciable respecto a las condiciones habituales descritas en la sección "Materiales y métodos". La solubilidad de rSina1 tampoco se vio afectada por el método empleado para la lisis de las células, ya que cuando, en lugar de la sonicación, se utilizó una prensa francesa, o se trataron las células con lisozima y desoxicolato [Sambrook y col., 1989], el alérgeno recombinante obtenido también se encontró mayoritariamente en estado insoluble. Los resultados tampoco variaron cuando, en lugar de las habituales células DH5 α F', se utilizaron otras estirpes de *E. coli*, entre ellas una cepa deficiente en proteasas (*lon*-). Finalmente, el carácter insoluble de rSina1 tampoco puede achacarse a alguna peculiaridad estructural del clon expresado (SIN3), ya que se obtuvieron resultados similares con los clones SIN1, 2, 4 y 7.

Recientemente se ha descrito la capacidad del alérgeno de la mostaza para interactuar con lípidos de membrana [Oñaderra y col., 1994]. Este hecho, junto con la actividad antifúngica de las napinas [Terras y col., 1993], sugiere una posible citotoxicidad de Sin a 1. Sin embargo, esta posibilidad debería ser descartada como la causa de cualquier problema observado en la producción de rSin a 1 por *E. coli*, pues los cultivos transformados crecen con normalidad, y no se detectó en ningún caso la pérdida del plásmido recombinante, o la aparición de mutantes.

El rendimiento en la producción de la proteína de fusión GST-rSin a 1 fue más de diez veces superior al obtenido para el alérgeno expresado con péptido señal o como proteína de fusión con el dominio C-LYTA. Además, la proteína de fusión GST-rSin a 1 posee un sitio de rotura por trombina que permite la liberación del alérgeno recombinante, lo cual constituye una ventaja adicional respecto a la proteína de fusión C-LYTA-rSin a 1. Por estos motivos, fue la construcción pGEXS3 la finalmente elegida para la obtención del alérgeno recombinante de mostaza a ser empleado en los posteriores ensayos inmunológicos. La expresión del clon SIN3 en esta construcción dio lugar, además de a la proteína de fusión GST-rSin a 1, a diversos fragmentos de la misma, entre los cuales destaca uno de unos 31 kDa que es intensamente reconocido en inmunotransferencia por las IgE de pacientes alérgicos a mostaza. La aparición de estos fragmentos es muy probablemente el fruto de diversas roturas proteolíticas de la proteína de fusión, seguramente debidas al incorrecto plegamiento de la misma.

A pesar de encontrarse en poca cantidad, la forma soluble de la proteína de fusión GST-rSin a 1 pudo ser aislada mediante la incubación de la fracción soluble del lisado celular con glutatión anclado a una matriz de Sepharosa. La posterior digestión con trombina de la proteína unida a la matriz, permitió la obtención de rSin a 1 en forma soluble, y con sólo dos residuos adicionales en su extremo N-terminal. Todos los ensayos inmunológicos llevados a cabo con esta forma del alérgeno recombinante de mostaza muestran que éste posee unas propiedades antigénicas y alérgicas muy similares a las del alérgeno nativo. La mayoría de los alérgenos recombinantes producidos hasta la fecha han sido analizados antigénicamente usando sólo técnicas de inmunotransferencia, en las cuales las proteínas son previamente desnaturalizadas y que, por tanto, se basan fundamentalmente en el reconocimiento de epítomos de carácter secuencial. Por el contrario, la técnica del ELISA aquí utilizada permite también estudiar epítomos conformacionales [Rafnal y col., 1992; Sidoli y col., 1993].

La principal diferencia antigénica observada entre el alérgeno nativo y la forma recombinante estudiada, se encuentra en la unión al anticuerpo monoclonal 2B3, el cual no reconoce en absoluto a rSin a 1, tanto en ensayos de inmunotransferencia como en ELISA. Este anticuerpo reconoce un epítipo secuencial del alérgeno de la mostaza, localizado en su cadena pesada y en el que se halla involucrado el único residuo de tirosina de la molécula. De hecho, de los diez anticuerpos monoclonales disponibles frente a Sin a 1, 2B3 es el único que reconoce a la cadena pesada carboxiamidometilada, tanto en disolución como adsorbida a poliestireno [Menéndez-Arias y col., 1990]. Este anticuerpo reconoce, además, a las cinco fracciones alérgicas (Bra j 1) obtenidas de semillas de mostaza oriental (*Brassica juncea*), pero no a las albúminas 2S aisladas de otras especies de crucíferas [Monsalve, datos no publicados]. Si comparamos las secuencias de aminoácidos en la región de la cadena pesada próxima a la tirosina en las proteínas 2S reconocidas por el monoclonal 2B3 y en la del clon expresado (figura 42) parece claro que la causa de la ausencia de unión de rSin a 1 a dicho anticuerpo debe ser la existencia de los tres residuos adicionales LQH entre las posiciones equivalentes a los residuos 54 y 55 de la cadena pesada del alérgeno Sin a 1 aislado de las semillas. La pérdida de la unión a 2B3 por parte de la secuencia recombinante producida confirma, por tanto, la existencia de un determinante antigénico secuencial en la cadena pesada del alérgeno de la mostaza, en el que participarían residuos situados entre las posiciones 50 y 60 de dicha cadena, y que resultaría destruido por la inserción de los ya mencionados tres aminoácidos.

	50		60
Bra j 1	... Q Q L Q H - - -	E I S R I Y Q T A T H L P	...
Sin a 1	... Q Q G P H - - -	V I S R I Y Q T A T H L P	...
SIN3	... Q Q G P H L Q H V	I S R I Y Q T A T H L P	...

Figura 42. Secuencias de Bra j 1 (alérgeno principal de la mostaza oriental), Sin a 1 y el clon SIN3 alrededor de la tirosina de la cadena pesada.

Los otros dos anticuerpos monoclonales utilizados en la caracterización de rSina1 (1G5 y 3G3) pertenecen a distintos grupos de complementación y reconocen determinantes antigénicos de carácter conformacional [Menéndez-Arias y col., 1990]. Los resultados de los ensayos de inhibición en ELISA de la unión de dichos anticuerpos al alérgeno nativo unido a fase sólida (figura 25), muestran que rSina1 conserva las dos regiones inmunodominantes identificadas en el alérgeno nativo. Las ligeras diferencias observadas entre las formas nativa y recombinante del alérgeno de la mostaza en su unión a los monoclonales 1G5 y 3G3, así como en la unión a las IgE de pacientes alérgicos, son muy probablemente debidas al hecho de que el alérgeno aislado de las semillas presenta un significativo grado de polimorfismo. Por el contrario, rSina1 es una especie molecular pura, lo cual puede conducir a un comportamiento antigénico ligeramente distinto. Esto podría explicar, por ejemplo, la mayor afinidad observada en la interacción del anticuerpo monoclonal 3G3 con la forma recombinante respecto a la proteína nativa.

En cuanto a la interacción con IgE de pacientes alérgicos, de los ensayos realizados con rSina1 no pueden extraerse datos concretos a nivel de epítomos, pues se utilizó una mezcla de sueros de los cuales se desconoce su especificidad. Sí puede afirmarse, sin embargo, que algunos de los determinantes alérgicos de Sin a 1 son de carácter secuencial, pues la proteína recombinante es reconocida por las IgE de pacientes alérgicos en inmunotransferencia después de una electroforesis en condiciones reductoras.

La forma soluble aislada de rSina1 presenta una gran resistencia a la acción proteolítica de la tripsina, pues, tras 20 h de digestión en condiciones óptimas, sólo pierde unos 1300 Da. Este comportamiento es indistinguible del que muestra el alérgeno nativo, pero no es compartido por la forma recombinante obtenida a partir de la fracción insoluble de la proteína de fusión GST-rSina1, lo cual sugiere un incorrecto plegamiento de esta última. La resistencia a tripsina, junto con la gran semejanza en su comportamiento antigénico y alérgico, permite suponer que la fracción soluble de rSina1 posee una estructura prácticamente idéntica a la del alérgeno nativo. Estos resultados confirman, por tanto, la validez de la estrategia experimental utilizada, consistente en expresar el alérgeno Sin a 1 en su forma de precursor, ya que el polipéptido obtenido no sólo puede plegarse correctamente, sino que, además, el segmento peptídico adicional (ausente en la proteína madura) no interfiere de modo significativo con las propiedades antigénicas ni alérgicas de la molécula. Sin embargo, dado el escaso rendimiento obtenido, la producción en gran escala del alérgeno recombinante de mostaza requeriría la utilización de algún otro sistema de expresión que favorezca el correcto plegamiento de esta proteína.

CARACTERIZACION ALERGENICA DE Sin a 1

Las IgE de tres de los sueros de pacientes alérgicos a la mostaza utilizados (un total de 18) reconocieron muy intensamente a la cadena pesada de Sin a 1 en ensayos de inmunotransferencia. Este hecho, más que como una diferencia de especificidad, quizás deba ser interpretado como el resultado de una mayor reactividad, pues los tres sueros en cuestión poseen un valor de RAST de 6. Sin embargo, no es posible descartar totalmente la existencia de epítomos secuenciales que sean reconocidos de modo preferente por esos tres sueros, pues el de otro paciente (señalado con el número 18 en la figura 29), también con RAST 6, reconoce sólo muy débilmente a la cadena pesada del alérgeno.

Los ensayos de titulación de IgE en ELISA, parecen indicar que los epítomos alérgicos de Sin a 1 son de carácter preferentemente conformacional, ya que las cadenas aisladas del alérgeno no son reconocidas de modo significativo por las IgE de los pacientes. Es de destacar la gran diferencia existente entre los resultados obtenidos por medio de ELISA y los de inmunotransferencia, pues en estos últimos, las IgE de los pacientes (la misma mezcla de sueros utilizada en ELISA) sí reconocen muy intensamente a la cadena pesada del alérgeno. Esta circunstancia dificulta la interpretación de los resultados, ya que es prácticamente imposible discernir el efecto que la unión al soporte sólido puede tener sobre los determinantes antigénicos de la molécula.

Existen numerosas evidencias que indican que las proteínas experimentan cambios conformacionales al ser adsorbidas a superficies sintéticas, obtenidas tanto a partir de estudios físicos [Soderquist y Walton, 1980] como mediante métodos inmunoquímicos [Kennel, 1982; Holland y Katchalski-Katzir, 1986; Stevens y col., 1986]. Se cree que la adsorción pasiva de proteínas en superficies como el poliestireno o la nitrocelulosa es el resultado de la formación de fuertes uniones hidrofóbicas [Gardas y Lewartowska, 1988; Kenny y Dunsmoor, 1983]. Tales interacciones promueven cambios conformacionales que favorecen un mayor grado de exposición de los residuos hidrofóbicos [Conradie y col., 1983]. Dichos cambios conformacionales pueden conducir incluso a la aparición de epítomos nuevos, no presentes en la proteína en disolución [Friguet y col., 1984; Mierendorf y Diamond, 1983; Stevens y col., 1986; Vaidya y col., 1985]. Al contrario que en el caso del poliestireno, se han realizado pocos estudios acerca de las características de las proteínas adsorbidas a nitrocelulosa. En el caso de las inmunotransferencias, los cambios en la inmunorreactividad pueden ser debidos al proceso electroforético, la reducción de los puentes disulfuro, al proceso de transferencia o a cambios conformacionales resultantes de la adsorción. Puesto que

las fuerzas implicadas en la adsorción a nitrocelulosa son similares a las que participan en la unión a plástico [Bers y Garfin, 1985; Gershoni y Palade, 1982; Towbin y Gordon, 1984], cabe esperar que los cambios conformacionales debidos al proceso de adsorción sean los mismos en ambos casos. Por tanto, las diferencias de reactividad con IgE de la cadena pesada de Sin a 1 en ELISA y en inmunotransferencia deben ser, principalmente, resultado de los procesos electroforéticos y/o de transferencia llevados a cabo sobre la proteína previamente a su adsorción en nitrocelulosa.

La resistencia del alergen de la mostaza a la acción de proteasas *in vitro* sugiere que éste atraviesa el tubo digestivo sin sufrir notables modificaciones en su estructura, lo que querría decir que la mayoría, si no todos, los epítomos reconocidos por las IgE de pacientes alérgicos estarían presentes en la proteína nativa. En este sentido apuntan también los resultados de la unión de IgE de pacientes alérgicos a mostaza a Sin a 1 digerido con tripsina. La estabilidad gastrointestinal de los alergenitos alimentarios es una característica muy importante, pues la patogénesis de la alergia a alimentos requiere la penetración del alergenito o de fragmentos altamente inmunogénicos del mismo a través de la barrera de la mucosa intestinal [Walker, 1987]. La determinación de los dominios resistentes a la acción de las proteasas gastrointestinales en un alergenito alimentario resulta, por tanto, crucial para la comprensión de los mecanismos responsables del desarrollo de la reacción alérgica.

En inmunotransferencia, las napinas de la colza BnIb y BnIII se comportan de forma indistinguible a Sin a 1 en lo que se refiere a su unión a IgE de pacientes alérgicos a mostaza. No ocurre lo mismo con las IgG de conejo obtenidas frente a Sin a 1, las cuales reconocen a BnIII, pero no a BnIb. Esto indica que ambos tipos de anticuerpo están reconociendo distintos epítomos en estas proteínas. Dada la ausencia de unión a las napinas de bajo peso molecular (BnIb), es probable que las IgG de conejo estén dirigidas principalmente hacia la denominada región hipervariable de las proteínas 2S [Ampe y col., 1986; Krebbers y col., 1988], localizada, aproximadamente, entre los residuos 39 a 56 de la cadena pesada de Sin a 1. En la correspondiente región de BnIb existe una deleción de ocho aminoácidos que afecta a los residuos equivalentes a las posiciones 39 a 46 de la cadena pesada de Sin a 1 y en la secuencia contigua, hacia el extremo C-terminal, con la que presenta el alergenito de mostaza en esa misma región (figura 43). Tales variaciones son, posiblemente, la causa de la ausencia de unión de los anticuerpos de conejo a BnIb, pero no parecen afectar a la unión de las IgE de pacientes alérgicos a mostaza.

Si comparamos las secuencias de aminoácidos de las cadenas pesadas de Sin a 1, BnIb y BnIII (figura 43), podemos ver que la región más similar de BnIb respecto a las otras dos, es la mitad N-terminal de dicha cadena polipeptídica (residuos 1-38). Esta región es, además, una de las más expuestas en la estructura tridimensional de la proteína nativa (figura 44), por todo lo cual, es posible sugerir que la zona N-terminal de la cadena pesada de Sin a 1 contenga residuos implicados en algún epítipo alergénico importante. Por otra parte, la eliminación de los seis residuos C-terminales de la cadena pesada de Sin a 1 no conlleva apenas pérdida de unión a IgE, por lo que, a pesar de que esta región de la proteína también es una de las más expuestas, hay que descartar que posea importancia en la alergenicidad de la molécula.

	1	10	20	30	40	50
Sin a 1	PQGPQQRPPLLQCCNELHQEELCVCPTLKGASKAVKQQVRQQLEQQGQ					
BnIb	QSGPQQGPWLREQCCNELYQEDQVCVCPTLKQAAKSVR.....VQGQ					
	-----*-----*					
BnIII	PQGPQQRPPLLQCCNELHQEELCVCPTLKGASRAVKQQVRQQGQQGQ					
	-----*-----					
	60	70	80			
Sina1	QGPVISRIYQTATHLPKVCNIPQVSVCPPFKKTMGGS					
BnIb	HGPFQSTRIYQIAKNLPNVCNMKQIGTCPFLAI					
	--*-----					
BnIII	QLQQVISRIYQTATHLPRVCNIPQVSVCPPQKTMGGS					
	-----*-----					

Figura 43. Secuencias de aminoácidos de las cadenas pesadas de las napinas BnIb y BnIII, mostradas en comparación con la cadena pesada del alergeno Sin a 1 (secuencia superior). Bajo cada secuencia, los residuos conservados aparecen señalados con barras y los cambios conservativos se indican con un asterisco.

Dado que, hasta la fecha, no existen datos experimentales que avalen la posible existencia de restricción en la expresión del isotipo de un anticuerpo con una determinada especificidad, el hecho de que las IgG de conejo y las IgE de pacientes alérgicos estén dirigidas, aparentemente, hacia distintas regiones de la molécula de Sin a 1, sugiere una probable influencia de la vía de inmunización (intravenosa en el primer caso, digestiva en el segundo) sobre la localización de los principales determinantes antigénicos de la proteína.

Los resultados de las reacciones cruzadas de Sin a 1 con las proteínas 2S de semillas de *B. napus* no permiten extraer conclusiones muy generalizables, ya que sólo se dispuso del suero de un único paciente alérgico a colza. A pesar de todo, en los ensayos de inmunotransferencia sí pueden destacarse dos resultados. En primer lugar, la especificidad de las IgE del paciente sensible a colza parece ser más similar a la de las IgG de conejo que a la de las IgE de pacientes alérgicos a mostaza. En efecto, la escasa unión de BnIb a las IgE específicas de colza sugiere que éstas se encuentran principalmente dirigidas a una región distinta a la que reconocen preferentemente las IgE frente a mostaza. Dado que, en el caso clínico estudiado, las napinas de la colza actúan como aeroalergenos, este hecho apoya la idea, apuntada anteriormente, de que la vía de inmunización afecta a la especificidad de las IgE. En segundo lugar, al igual que ocurre con las IgE de pacientes alérgicos a mostaza, la unión observada para los oligómeros de las proteínas 2S (dímeros, trímeros, etc.) es, proporcionalmente, bastante superior a la obtenida para el monómero. Por ahora, no se dispone de ningún dato que permita saber si este fenómeno tiene alguna importancia *in vivo* o si sólo se trata de un artefacto experimental, aunque el hecho de que estas albúminas 2S posean una gran tendencia a la agregación podría conducir a la existencia de anticuerpos específicos para los oligómeros.

Hay que señalar que ésta es la primera vez que se describen las proteínas 2S de semillas de colza como alergenios atópicos, si bien se requerirá el estudio clínico de más pacientes para poder adjudicar a dichas proteínas la categoría de alergenios principales.

MODELIZACION DE LA ESTRUCTURA TERCIARIA DE Sin a 1

Durante la preparación de la presente Memoria, ha sido determinada mediante RMN la estructura tridimensional de la napina de bajo peso molecular, BnIb. Este logro ha sido llevado a cabo en el laboratorio del Dr. Manuel Rico, del Instituto de Estructura de la Materia del CSIC (Madrid), en colaboración con nuestro grupo de investigación. La disponibilidad de las coordenadas atómicas de una proteína homóloga al alergeno de la mostaza, ha permitido realizar una primera aproximación teórica a la estructura terciaria de Sin a 1. Para ello se utilizó el programa InsightII, versión 2.1.2 (Biosym Technologies) en una estación de trabajo Silicon Graphics tipo Iris 4D/310V6X. El modelo obtenido se muestra en la figura 44. Únicamente se modelizaron las regiones de Sin a 1 que poseen un alto grado de identidad con la secuencia de la napina BnIb. Dada la homología de las albúminas 2S de crucíferas, cabe esperar que la estructura de dichas regiones se encuentre altamente conservada en todas estas proteínas.

Pueden destacarse varios aspectos importantes en la estructura modelo. En primer lugar, el alto grado de compactación de la molécula, que explicaría su gran resistencia a proteasas. También resulta destacable el elevado contenido en hélice α , que ya había sido predicho anteriormente a partir de los datos de dicroísmo circular [Menéndez-Arias y col., 1987]. Por último, cabe resaltar que las dos regiones más expuestas de la cadena pesada son el extremo N-terminal y la región hipervariable. Esto apoya la idea anteriormente expuesta de que dichas regiones juegan un papel importante en el reconocimiento por anticuerpos (IgE de pacientes e IgG de conejo).

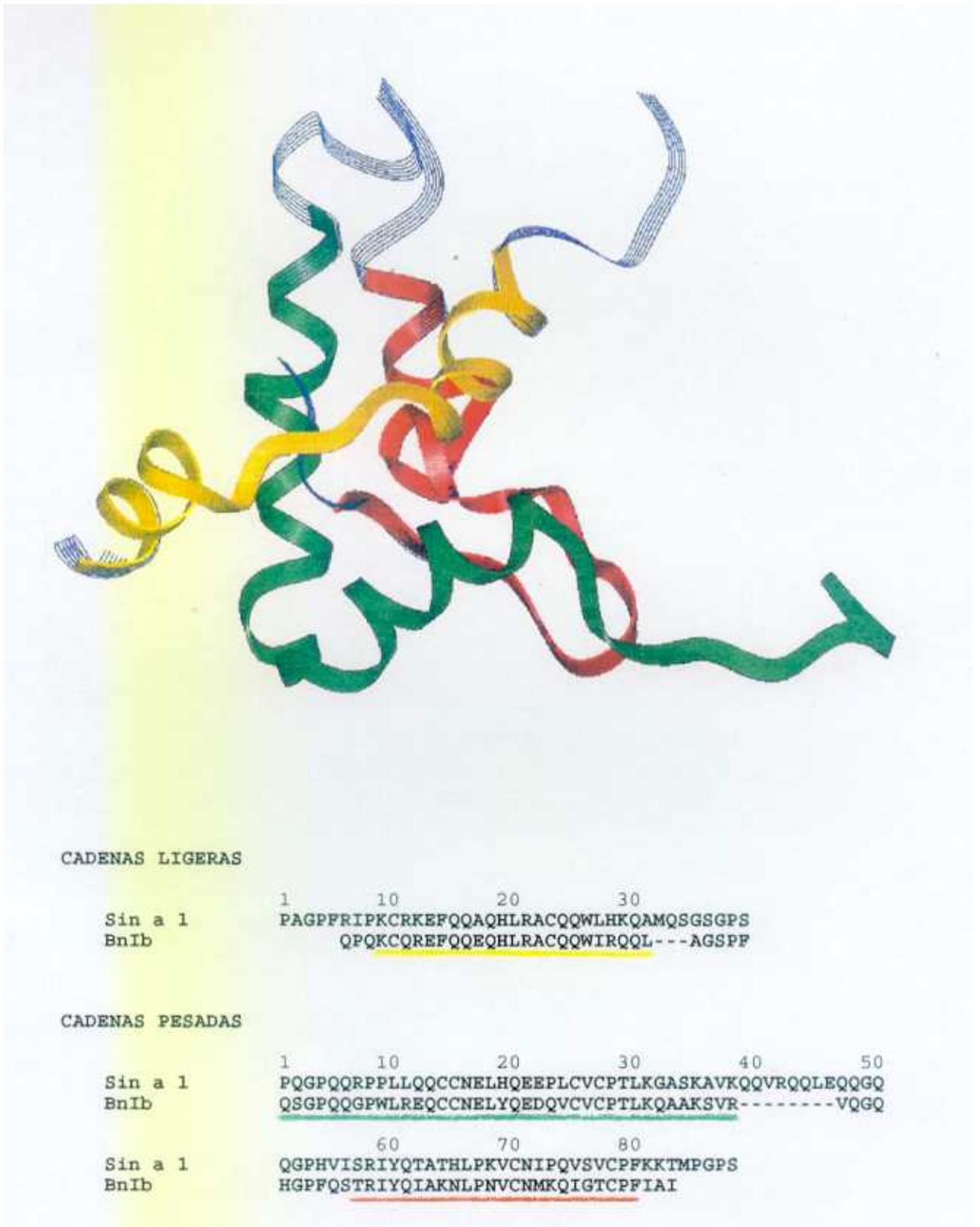


Figura 44. Modelo teórico de la estructura terciaria del alergeno de la mostaza (parte superior). En azul se representa la estructura correspondiente a BnIb, sobre la que se ha superpuesto la estructura teórica de los segmentos con mayor identidad de secuencia en Sin a 1. Dichos segmentos se indican con barras de distintos colores en la parte inferior, bajo las secuencias alineadas de ambas proteínas.

CONCLUSIONES

- 1.- Se ha desarrollado un método simple y eficiente para clonar secuencias genómicas de albúminas 2S de semillas de crucíferas mediante su amplificación por PCR, utilizando como cebadores oligonucleótidos que codifican los extremos N-terminal de la cadena ligera y C-terminal de la pesada. La secuencia clonada, por tanto, comprende la región que codifica las dos cadenas polipeptídicas presentes en la proteína madura, así como la secuencia que las une y que es eliminada *in vivo* durante el procesamiento proteolítico del precursor.
- 2.- Se ha determinado la secuencia de siete clones genómicos de Sin a 1. Las correspondientes secuencias de aminoácidos deducidas difieren ligeramente entre ellas y respecto a la estructura primaria determinada a partir del alérgeno nativo mediante degradación de Edman. Este hecho confirma la naturaleza polimórfica de Sin a 1.
- 3.- Ha sido posible expresar en *E. coli* una proteína de fusión del alérgeno de la mostaza con la glutatión-S-transferasa de *Schistosoma japonicum*, que retiene la mayor parte de la reactividad antigénica del alérgeno nativo. En un futuro próximo, la obtención de mutantes puntuales y formas truncadas de este alérgeno recombinante permitirá profundizar en el estudio de las relaciones estructura-alérgenicidad en Sin a 1.
- 4.- El alérgeno Sin a 1 es resistente a la hidrólisis con pepsina, así como al tratamiento con extracto gástrico humano. Su digestión con tripsina y/o quimotripsina únicamente libera el extremo N-terminal de la cadena ligera y el C-terminal de la pesada, quedando intacto el resto de la molécula. Dicho tratamiento no afecta de modo significativo a su capacidad de unión a IgE. Estos resultados sugieren que Sin a 1 atraviesa el tubo digestivo sin sufrir ninguna modificación importante en su estructura.
- 5.- Los resultados de reactividad cruzada con las napinas de la colza sugieren que la región N-terminal de la cadena pesada del alérgeno de la mostaza puede estar implicada en el reconocimiento por IgE de individuos sensibles. Por otra parte, los anticuerpos desarrollados en conejo frente a Sin a 1 parecen reconocer otra zona distinta de la molécula, probablemente la denominada región hipervariable, comprendida entre los residuos 39 a 56 de la cadena pesada.

- 6.- Las albúminas 2S de semillas de colza (*B. napus*) han sido descritas, por vez primera, como alérgenos atópicos para un individuo hipersensible a la inhalación de la harina de dichas semillas.
- 7.- A partir de la recientemente elucidada estructura tridimensional de la napina de bajo peso molecular BnIb, se ha llevado a cabo una modelización de las regiones conservadas en Sin a 1. La estructura modelo muestra un alto grado de exposición de las regiones propuestas como inmunodominantes en esta proteína, es decir, la región N-terminal de la cadena pesada y la zona comprendida entre los residuos 39 y 56 de la misma cadena (punto 4).

BIBLIOGRAFIA

Amann E., Ochs B. y Abel K.-J. (1988) Tightly regulated *tac* promoter vectors useful for the expression of unfused and fused proteins in *Escherichia coli*. *Gene*, **69**, 301.

Ampe C., Van Damme J., de Castro L.A.B., Sampaio M.J.A.M., Van Montagu M. y Vandekerckhove J. (1986) The amino-acid sequence of the 2S sulphur-rich proteins from seeds of Brazil nut (*Bertholletia excelsa* H.B.K.). *Eur. J. Biochem.*, **159**, 597.

Anderson J.A. (1984) En *American Academy of Allergy and Immunology (Committee on Adverse Reactions to Foods)*, p. 1. National Institutes of Health, Washington D.C.

Anderson L.B., Dreyfuss E.M., Logan J., Johnstone D.E. y Glaser J. (1970) Melon and banana sensitivity coincident with ragweed pollinosis. *J. Allergy*, **45**, 310.

Ardito S., Falagiani P., Giannoccaro F., Munno G., Riva G., Ferrannini A. y Tursi A. (1990) Reazione all'ingestione di lumache del genere *Helix pomatia* e possibile rapporto con la sensibilizzazione ai Dermatofagoidi. Studio clinico-immunologico. *Folia Allergol. Immunol. Clin.*, **37**, 199.

Atassi H. y Atassi M.Z. (1986) Antibody recognition of ragweed allergen Ra3: Localization of the full profile of the continuous antigenic sites by synthetic overlapping peptides representing the entire protein chain. *Eur. J. Biochem.*, **16**, 229.

Atassi M.Z. y Lee C.-L. (1978) The precise and entire antigenic structure of native lysozyme. *Biochem. J.*, **171**, 429.

Baldo B.A., Ford S.A. y Tovey E.R. (1989) Toward a definition of the 'complete' spectrum and rank order of importance of the allergens from the house dust mite *Dermatophagoides pteronyssinus*. *Adv. Biosci.*, **74**, 13.

Barber D., Sánchez-Monje R., Gómez L., Carpizo J., Armentia A., López-Otín C., Juan F. y Salcedo G. (1989) A barley flour inhibitor of insect α -amylase is a major allergen associated with baker's asthma disease. *FEBS Lett.*, **248**, 119.

- Barnett D., Bonham B. y Wowden M.E. (1987) Allergic crossreactions among legume foods- an *in vitro* study. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **79**, 433.
- Baszcynski C.L. y Fallis L. (1990) Isolation and nucleotide sequence of a genomic clone encoding a new *Brassica napus* napin gene. *Plant Mol. Biol.*, **14**, 633.
- Baur X., Aschauer H., Mazur G., Dewair M., Prelicz H. y Steigemann W. (1986) Structure and antigenic determinants of some clinically important insect allergens: Chironomid hemoglobins. *Science*, **233**, 351.
- Beach-Daul C., Slatter M. y Lehrer S.B. (1993) Shared antigenic/allergenic epitopes between shrimp *Pen a 1* and fruit fly extract. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **91**, 341.
- Bers G. y Garfin P. (1985) Protein and nucleic acid blotting and immunobiological detection. *Biotechniques*, **3**, 276.
- Bock S.A. (1989) Probable allergic reaction to casein hydrolysate formula. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **84**, 272.
- Breiteneder H., Ferreira F., Hoffmann-Sommersgruber K., Ebner C., Breitenbach M., Rumpold H., Kraft D. y Scheiner O. (1993) Four recombinant isoforms of *Cor a 1*, the major allergen of hazel pollen, showed different IgE-binding properties. *Eur. J. Biochem.*, **202**, 355.
- Breiteneder H., Ferreira F., Reikerstorfer A., Duchene M., Valenta R., Hoffmann-Sommersgruber K., Ebner C., Breitenbach M., Rumpold H., Kraft D. y Scheiner O. (1992) cDNA cloning and expression in *Escherichia coli* of *Aln g 1*, the major allergen in pollen of alder (*Alnus glutinosa*). *J. Allergy Clin. Immunol.*, **90**, 909.
- Breiteneder H., Pettenburgen K., Bito A., Valenta R., Kraft D., Rumpold H., Scheiner O. y Breitenbach M. (1989) The gene coding for the major birch allergen, *Bet v 1*, is highly homologous to a pea disease resistance response gene. *EMBO J.*, **8**, 1935.
- Brent R. y Ptashne M. (1978) Mechanism of action of the *lexA* gene product. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 4204.
- Bufe A., Becker W.-M., Schramm G., Petersen A., Mamat U. y Schloak M. (1994) Major allergen *Php p Va* (timoty grass) bears at least two different IgE-reactive epitopes. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **94**, 173.

Burks A.W., Williams L.W., Connaughton C., Cockrell G., O'Brien T.J. y Helm R.M. (1992) Identification and characterization of a second major peanut allergen, *Ara h* II, with use of sera of patients with atopic dermatitis and positive peanut challenge. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **90**, 962.

Burks A.W., Williams L.W., Helm R.M., Connaughton C., Cockrell G. y O'Brien T.J. (1991) Identification of a major peanut allergen, *Ara h* I, in patients with allergic dermatitis and positive peanut challenges. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **88**, 172.

Burks A.W., Williams L.W., Thresher W., Connaughton C., Cockrell G. y Helm R.M. (1992) Allergenicity of peanut and soybean extracts altered by chemical or thermal denaturation in patients with atopic dermatitis and positive food challenges. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **90**, 889.

Calkhoven P.G., Aalbers M., Koshte V.L. (1987) Cross-reactivity among birch pollen, vegetables and fruits as detected by IgE antibodies is due to at least three distinct cross-reactive structures. *Allergy*, **42**, 382.

Campbell D.E., Ngampaiboon J. y Clark M.M. (1987) Indirect enzyme-linked immunosorbent assay for measurement of human immunoglobulins E and G to purified cow's milk proteins: Application in diagnosis of cow's milk allergy. *J. Clin. Microbiol.*, **25**, 2114.

Canfield R.E. (1963) The amino acid sequence of hen egg-white lysozyme. *J. Biol. Chem.*, **238**, 2698.

Castells M.C., Pascual C., Martín Esteban M., Ojeda J.A. (1986) Allergy to white potato. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **78**, 1110.

Castillo R., Pascual C., Hernando de Larramendi C., Martínez Alzamora F. y Martín Esteban M. (1991) Alergia a vegetales en paciente polínica. *Rev. Esp. Alergol. Inmunol. Clin.*, **6**, 29.

Catterall J.F., Stein J.P., Kristo P., Means A.R. y O'Malley B.W. (1980) Primary sequence of ovomucoid messenger RNA as determined from cloned complementary DNA. *J. Cell Biol.*, **87**, 480.

Cesarone C.F., Bolognesi C. y Santi L. (1979) Improved microfluorometric DNA determination in biological material using 33258 Hoechst. *Anal. Biochem.*, **100**, 188.

- Conradie J.D., Govender M. y Visser L. (1983) ELISA solid phase: partial denaturation of coating antibody yields a more efficient solid phase. *J. Immunol. Meth.*, **59**, 289.
- Crouch M.L., Tenbarga K.M., Simon A.E. y Ferl R. (1983) cDNA clones for *Brassica napus* seed storage proteins: evidence from nucleotide sequence analysis that both subunits of napin are cleaved from a precursor polypeptide. *J. Mol. Appl. Genet.*, **2**, 273.
- Challacombe S.J. y Tomasi T.B. Jr. (1980) Systemic tolerance and secretory immunity after oral immunization. *J. Exp. Med.*, **152**, 1459.
- Chapman M.D., Sutherland W.M. y Platts-Mills T.A.E. (1984) Recognition of two *Dermatophagoides pteronyssinus* specific epitopes on antigen P1 by using monoclonal antibodies. *J. Immunol.*, **133**, 2488.
- Chua Y.Y., Bremner K. y Lakdawalla N. (1976) *In vivo* and *in vitro* correlates of food allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **58**, 229.
- Chua K.Y., Doyle C.R., Simpson R.J., Turner K.J. y Stewart G.A. (1990) Isolation of cDNA coding for the major mite allergen *Der p II* by IgE plaque immunoassay. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, **91**, 118.
- D'Hondt K., Bosch D., Van Damme J., Goethals M., Vandekerckhove J. y Krebbers E. (1993) An aspartic proteinase present in seeds cleaves *Arabidopsis* 2S albumin precursors *in vitro*. *J. Biol. Chem.*, **268**, 20884.
- Dilworth R.J., Chua K.Y. y Thomas W.R. (1991) Sequence analysis of a cDNA coding for a major house dust mite allergen, *Der f I*. *Clin. Exp. Allergy*, **21**, 25.
- Donovan G.R., Baldo B.A. y Sutherland S. (1993) Molecular cloning and characterization of a major allergen (*Myr p I*) from the venom of the Australian jumper ant, *Myrmecia pilosula*. *Biochem. Biophys. Acta*, **1171**, 272.
- Dreborg S. (1991) Skin test in diagnosis of food allergy. *Allergy Proc.*, **12**, 251.
- Dreborg S. y Foucard T. (1983) Allergy to apple, carrot and potato in children with birch pollen allergy. *Allergy*, **38**, 167.

- Ebner C., Birkner T., Valenta R. (1991) Common epitopes of birch pollen and apples - studies by western and northern blot. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **88**, 588.
- Elsayed S. y Apold J. (1983) Immunochemical analysis of cod fish allergen M: locations of the immunoglobulin binding sites as demonstrated by the native and synthetic peptides. *Allergy*, **38**, 449.
- Elsayed S. y Bennich H. (1975) The primary structure of allergen M from cod. *Scand. J. Immunol.*, **4**, 203.
- Elsayed S., Holen E. y Haugtaad M.B. (1988) Antigenic and allergenic determinants of ovalbumin. II. The reactivity of the NH₂ terminal decapeptide. *Scand. J. Immunol.*, **27**, 587.
- Enberg R.N., Leickly F.E., McCullough J., Bailey J. y Ownby D.R. (1987) Watermelon and ragweed share allergens. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **79**, 867.
- Ericson M.L., Murén E., Gustavsson H.-O., Josefsson L.-G. y Rask L. (1991) Analysis of the promoter region of napin genes from *Brassica napus* demonstrates binding of nuclear protein *in vitro* to a conserved sequence motif, *Eur. J. Biochem.*, **197**, 741.
- Ericson M.L., Rödin J., Lenman M., Glimelius K., Josefsson L.-G. y Rask L. (1986) Structure of the rapeseed 1.7 S storage protein, napin, and its precursor. *J. Biol. Chem.*, **261**, 14576.
- Erlich H.A., Gelfand D. y Sninsky J.J. (1991) Recent advances in the polymerase chain reaction. *Science*, **252**, 1643.
- Fairbanks G., Steck T.L. y Wallach D.F.H. (1971) Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane. *Biochemistry*, **10**, 2606.
- Fang K.S.F., Vitale M., Fehler P. y King T.P. (1988) cDNA cloning and primary structure of a white-face hornet venom allergen, antigen 5. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 895.
- Ford S.A. y Baldo B.A. (1986) A re-examination of ryegrass (*Lolium perenne*) pollen allergens. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, **81**, 193.

- Friguet B., Djavadi-Ohanian L. y Goldberg M.E. (1984) Some monoclonal antibodies raised with a native protein bind preferentially to the denatured antigen. *Mol. Immunol.*, **21**, 673.
- Gardas A. y Lewartowska A. (1988) Coating of proteins to polystyrene ELISA plates in the presence of detergent. *J. Immunol. Meth.*, **106**, 251.
- Gershoni J.M. y Palade G.E. (1982) Electrophoretic transfer of proteins from dodecyl sulfate-polyacrilamide gels to a positively charged membrane filter. *Anal. Biochem.*, **124**, 396.
- Ghrayeb J., Kimura H., Takahara M., Hsiung H., Masui Y. e Inouye M. (1984) Secretion cloning vectors in *Escherichia coli*. *EMBO J.*, **3**, 2437.
- Gibson T.J. (1984) Studies on the Epstein-Barr virus genome. Tesis doctoral, Universidad de Cambridge, Inglaterra.
- Gold L., Pribnow D., Schneider T., Shinedling S., Singer B.S. y Stormo G. (1981) Translational initiation in prokaryotes. *Annu. Rev. Microbiol.*, **35**, 365.
- González de la Peña M.A., Menéndez-Arias L., Monsalve R.I. y Rodríguez R. (1990) Isolation and characterization of a major allergen from oriental mustard seeds, *Bra j* I. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, **96**, 263.
- Goodman T. y Lefrancois L. (1988) Expression of the γ/δ T-cell receptor on intestinal CD8⁺ intraepithelial lymphocytes. *Nature*, **333**, 855.
- Gosh B., Perry M.P. y Marsh D.G. (1991) Cloning of the cDNA encoding the *Amb t* V allergen from Giant Ragweed (*Ambrosia trifida*) pollen. *Gene*, **101**, 2.
- Halmepuro L. y Löwenstein H. (1985) Immunological investigation of possible structural similarities between pollen antigens and antigens in apple, carrot and celery tuber. *Allergy*, **40**, 264.
- Halmepuro L., Vuontela K., Kalimo K. y Björkstén F. (1984) Cross-reactivity of IgE antibodies with allergens in birch pollen, fruits and vegetables. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, **74**, 235.
- Hanahan D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.*, **166**, 557.

- Hattori M. y Sakaki Y. (1986) Dideoxy sequencing method using denatured plasmid templates. *Anal. Biochem.*, **152**, 232.
- Hewick R.M., Hunkapiller M.W., Hood L.E. y Dreyer W.J. (1981) A gas-liquid-solid phase peptide and protein sequenator. *J. Biol. Chem.*, **256**, 7990.
- Hoffman D.R., Day E.D. y Miller J.S. (1981) The major heat-stable allergen of shrimp. *Ann. Allergy*, **47**, 17.
- Holgate S.T. y Church M.K. (1993) Allergy. Gower Medical Publishing, Nueva York.
- Holland Z. y Katchalski-Katzir E. (1986) Use of monoclonal antibodies to detect conformational alterations in lactate dehydrogenase isoenzyme 5 on heat denaturation and on adsorption to polystyrene plates. *Mol. Immunol.*, **23**, 927.
- Honma K., Kohno Y., Saito K., Shimojo M., Tsunoo H. y Niimi H. (1994) Specificities of IgE, IgG and IgA antibodies to ovalbumin. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, **103**, 28.
- Howard-Flanders P., Simson E. y Theriot L. (1964) A locus that controls filament formation and sensitivity to radiation in *Escherichia coli* K-12. *Genetics*, **49**, 237.
- Huang Q., Coleman J.W. y Stanworth D.R. (1985) Investigation on the allergenicity of β -lactoglobulin and its cleavage fragments. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, **78**, 337.
- Hyman P.E., Clarke D.D., Everett S.L., Sonne B., Stewart D., Harada T., Walsh H.L. y Taylor I.L. (1985) Gastric and secretory function in preterm infants. *J. Pediatr.*, **106**, 467.
- Ipsen H., Bowadt H., Janniche H., Nuchel Peterson B., Munch E.P., Wihl J.A y Löwenstein H. (1985) Immunochemical characterization of reference alder (*Alnus glutinosa*) and hazel (*Corylus avellana*) pollen extracts and the partial immunochemical identity between the major allergens of alder, birch and hazel pollens. *Allergy*, **40**, 510.
- Ipsen H. y Löwenstein H. (1983) Isolation and immunochemical characterization of the major allergen of birch pollen (*Betula verrucosa*) *J. Allergy Clin. Immunol.*, **72**, 150.
- Iserentant D. y Fiers W. (1980) Secondary structure of mRNA and efficiency of translation initiation. *Gene*, **9**, 1.

Josefsson L.-G., Lenman M., Ericson M.L. y Rask L. (1987) Structure of a gene encoding the 1.7 S storage protein, napin, from *Brassica napus*. *J. Biol. Chem.*, **262**, 12196.

Kennel S. (1982) Binding of monoclonal antibody in fluid phase and bound to solid supports. *J. Immunol. Meth.*, **55**, 1.

Kenny G.E. y Dunsmoor C.L. (1983) Principles, problems and strategies in the use of antigenic mixtures for the enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Clin. Microbiol.*, **17**, 655.

King T.P., Hoffman D., Löwenstein H., Marsh D.G., Platts-Mills T.A.E. y Thomas W. (1994) Allergen nomenclature. *Bull. WHO*, **72**, 797.

King T.P., Norman P.S. y Tao N. (1974) Chemical modifications of the major allergen of ragweed pollen, antigen E. *Immunochemistry*, **11**, 83.

Kletter B., Gery I., Freier S. y Davies A.M. (1971) Immune responses of normal infants to cow milk. I. Antibody type and kinetics of production. *Int. Arch. Allergy*, **40**, 656.

Köhler G. y Milstein C. (1975) Continuous cultures of fused cells secreting antibody of a predefined specificity. *Nature*, **256**, 495.

Krebbes E., Herdies L., De Clercq A., Sevrinck J., Leemans J., Van Damme J., Segura M., Gheysen G., Van Montagu M. y Vandekerckhove J. (1988) Determination of the processing sites of an *Arabidopsis* 2S albumin and characterization of the complete gene family. *Plant Physiol.*, **87**, 859.

Kuchler K., Gmachl M., Sippl M.J. y Kreil G. (1989) Analysis of the cDNA for phosphatase A2 from honeybee venom glands. The deduced amino acid sequence reveals homology to the corresponding vertebrate enzymes. *Eur. J. Biochem.*, **184**, 249.

Laemmli U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680.

Lahti A., Björkstén F. y Hannuksela M. (1980) Allergy to birch pollen and apple, and cross-reactivity of allergens studied with the RAST. *Allergy*, **35**, 297.

- Laughlan P.M. y Anderson K.J. (1981) Effect of heat on the anaphylactic sensitivity capacity of cow's milk, goat's milk and various infant formulae fed to Guinea-pigs. *Arch. Dis. Child.*, **56**, 165.
- LeGendre N. y Matsudaira P. (1988) Direct protein microsequencing from Immobilon-P transfer membrane. *Biotechniques*, **6**, 154.
- Leung P.S.C., Chu K.H., Chow W.K., Ansari A., Bandea C.L., Kwan H.S., Nagy S.M. y Gershwin M.E. (1994) Cloning, expression, and primary structure of *Metapenaeus ensis* tropomyosin, the major heat-stable shrimp allergen. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **94**, 882.
- Lleonart R., Cistero A., Carreira J., Batista A. y Moscoso del Prado J. (1992) Food allergy: identification of the major IgE-binding component of peach (*Prunus persica*). *Ann. Allergy*, **69**, 128.
- Lombardero M., Heymann P.W., Platts-Mills T.A.E., Fox J.W. y Chapman M.D. (1990) Conformational stability of B-cell epitopes on group I and group II *Dermatophagoides* spp. allergens. Effect of thermal and chemical denaturation on the binding of murine IgG and human IgE antibodies. *J. Immunol.*, **144**, 1353.
- Löwenstein H. y Eriksson N.E. (1983) Hypersensitibility to foods among birch pollen-allergic patients. *Allergy*, **38**, 577.
- Lu G., Kochoumian L. y King T.P. (1994) White face hornet venom allergen, hyaluronidase: cloning and its sequence similarity with other proteins. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **93**, 224.
- Malley A., Baecher L., Mackler B. y Perlman F. (1975) The isolation of allergens from the green pea. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **56**, 282.
- Malley A., Baecher L., Mackler B. y Perlman F. (1976) Further characterization of a low-molecular weight allergen fragment isolated from the green pea. *Clin. Exp. Immunol.*, **25**, 154.
- Mandallaz M.M., De Weck A.L. y Dahinden C.I. (1988) Bird egg syndrome. Cross reactivity between bird antigens and egg yolk livetins in IgE mediated hypersensibility. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, **87**, 81.
- Maniatis T., Fritsch E.F. y Sambrook J. (1982) Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, Nueva York.

- Marsh D.G., Goodfriend L., King T.P., Löwenstein H. y Platts-Mills T.A.E. (1986) Allergen nomenclature. *Bull. WHO*, **64**, 767.
- Marston F.A.O. (1986) The purification of eukaryotic polypeptides synthesized in *Escherichia coli*. *Biochem. J.*, **240**, 1.
- Masui Y., Mizuno T. e Inouye M. (1984) Novel high-level expression cloning vehicles: 10^4 fold amplification of *Escherichia coli* minor protein. *Biotechnology*, **2**, 81.
- Matsuda T., Sugiyama M., Nakamura R. y Torii S. (1988) Purification an properties of an allergenic protein in rice grain. *Agric. Biol. Chem.*, **52**, 1465.
- Mazur G., Baur X., Modrow S. y Becker W.-M. (1988) A common epitope on major allergens from non-biting midges (Chironomidae). *Mol. Immunol.*, **25**, 1005.
- Menéndez-Arias L., Domínguez J., Moneo I. y Rodríguez R. (1990) Epitope mapping of the major allergen from yellow mustard seeds, *Sin a I. Mol. Immunol.*, **27**, 143.
- Menéndez-Arias L., Moneo I., Domínguez J. y Rodríguez R. (1988) Primary structure of the major allergen of yellow mustard (*Sinapis alba* L.) seed, *Sin a I. Eur. J. Biochem.*, **177**, 159.
- Menéndez-Arias L., Monsalve R.I., Gavilanes G.J. y Rodríguez R. (1987) Molecular and spectroscopic characterization of a low molecular weight seed storage protein from yellow mustard (*Sinapis alba* L.). *Int. J. Biochem.*, **19**, 899.
- Mestecky J. y McGhee J.R. (1987) Immunoglobulin A (IgA): molecular and cellular interactions involved in IgA biosynthesis and immune response. *Adv. Immunol.*, **40**, 153.
- Metcalf D.D. (1987) Chemical mediators of allergic reactions. En *Food allergy* (R.K. Chandra, ed.), p. 117. Nutrition Research Education Foundation, St. John's Newfoundland.
- Mierendorf R.C. y Diamond R.L. (1983) Functional heterogeneity of monoclonal antibodies obtained using different screening assay. *Anal. Biochem.*, **135**, 221.
- Monsalve R.I., González de la Peña M.A., Menéndez-Arias L., López-Otín C., Villalba M. y Rodríguez R. (1993) Characterization of a new oriental-mustard (*Brassica juncea*) allergen, *Bra j I*: detection of an allergenic epitope. *Biochem. J.*, **293**, 625.

Monsalve R.I., Menéndez-Arias L., López-Otín C. y Rodríguez R. (1990) β -turns as structural motifs for the proteolytic processing of seed proteins. *FEBS Lett.*, **2**, 209.

Monsalve R.I. y Rodríguez R. (1990) Purification and characterization of proteins from the 2S fraction from seeds of the Brassicaceae family. *J. Exp. Botany*, **41**, 89.

Monsalve R.I., Villalba M., López-Otín C. y Rodríguez R. (1991) Structural analysis of the small chain of the 2S albumin, napin nIII, from rapeseed. Chemical and spectroscopic evidence of an intramolecular bond formation. *Biochem. Biophys. Acta*, **1078**, 265.

Morgenstern J.P., Griffith I.J., Brauer A.W., Rogers B.L., Bond J.F., Chapman M.D. y Kuo M. (1991) Amino acid sequence of *Fel d I*, the major allergen of the domestic cat: Protein sequence analysis and cDNA cloning. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 9690.

Moroz L.A. y Yang W.H. (1980) Kunitz soybean trypsin inhibitor: a specific allergen in food anaphylaxis. *New Engl. J. Med.*, **302**, 1126.

Murray H.G. y Thompson W.F. (1980) Rapid isolation of high molecular weight DNA. *Nucleic Acids Res.*, **8**, 4321.

Muschietti J., Dircks L., Vancanney G. y McCormick S. (1994) Lat52 protein is essential for tomato pollen development: pollen expressing antisense LAT52RNA hydrates and germinate abnormally and cannot achieve fertilization. *Plant J.*, **6**, 321.

Nagpal S., Metcalfe D.D. y Subba Rao P.V. (1987) Isolation and characterization of heat-stable allergens from shrimp (*Pennaeus indicus*). *J. Allergy Clin. Immunol.*, **83**, 26.

Nakamura K. e Inouye M. (1979) DNA sequence of the gene for the outer membrane lipoprotein of *E. coli*: an extremely AT-rich promoter. *Cell*, **18**, 1109.

Niinimäki A. y Hannuksela M. (1981) Immediate skin test reactions to sices. *Allergy*, **36**, 487.

Nisbet A.D., Saundry R.H., Moir A.J.G., Forthergill L.A. y Forthergill J.E. (1981) The complete aminoacid sequence of hen ovalbumin. *Eur. J. Biochem.*, **115**, 335.

- Nishiyama C., Yuuki T., Usui T., Iwamoto N., Okomura Y. y Okudaira H. (1994) Effects of amino acid variations in recombinant *Der f* II on its human IgE and mouse IgG recognition. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, **105**, 62.
- Norrander J., Kempe T. y Messing J. (1983) Construction of improved M13 vectors using oligodeoxynucleotide-directed mutagenesis. *Gene*, **26**, 101.
- Ogawa T., Tsuji H., Bando N., Kitamura K., Zhu Y.-L., Hirano H. y Nishikawa K. (1993) Identification of the soybean allergenic protein, *Gly m* Bd 30K, with the soybean seed 34-kDa oil-body-associated protein. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **57**, 1030.
- Olsen J.R. y Klapper D.G. (1986) Two major human allergenic sites on ragweed pollen allergen antigen E identified by using monoclonal antibodies. *J. Immunol.*, **136**, 2109.
- Oñaderra M., Monsalve R.I., Mancheño J.M., Villalba M., Martínez del Pozo A., Gavilanes J.G. y Rodríguez R. (1994) Food mustard allergen interaction with phospholipid vesicles. *Eur. J. Biochem.*, **225**, 609.
- Oppenheimer J.J., Nelson H.S., Bock S.A., Christensen F. y Eung D.Y.M. (1992) **90**, 256.
- Owen R.L. (1977) Sequential uptake of horseradish peroxidase by lymphoid follicle epithelium of Peyer's patches in the normal unobstructed mouse intestine: an ultrastructural study. *Gastroenterology*, **72**, 440.
- Owen R.L. y Jones A.I. (1974) Epithelial cell specialization within human Peyer's patches: an ultrastructural study of intestinal lymphoid follicles. *Gastroenterology*, **66**, 189.
- Padlan E.A. y Davies D.R. (1975) Variability of three-dimensional structure in immunoglobulins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **72**, 819.
- Pal M. y Biswas B.B. (1995) Expression of the *Arabidopsis thaliana* 2S albumin gene 3 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*, **153**, 175.
- Panayotatos N. y Truong K. (1981) Specific deletion of DNA sequences between preselected bases. *Nucleic Acids Res.*, **9**, 5679.
- Pascual C., Martín Esteban M. y Fernández Crespo J. (1992) Fish allergy: evaluation of the importance of cross-reactivity. *J. Pediat.*, **121**, 29.

- Perez M., Ishihoka G.Y., Walker L.E. y Chesnut R.W. (1990) cDNA cloning and immunological characterization of the ryegrass allergen, *Lol p I*. *J. Biol. Chem.*, **265**, 16210.
- Poljac R.J., Amzel L.M. y Phizackerley R.P. (1976) Studies on the three-dimensional structure of immunoglobulins. *Prog. Biophys. Molec. Biol.*, **31**, 67.
- Porcelli S., Brenner M.B. y Band H. (1991) Biology of the human $\gamma\delta$ T-cell receptor. *Immunol. Rev.*, **120**, 137.
- Rafnar T., Ghosh B., Metzler W.J., Huang S.-K., Perry M.P., Mueller L. y Marsh D. (1992) Expression and analysis of recombinant *Amb a V* and *Amb t V* allergens. Comparison with native proteins by immunological assays and NMR spectroscopy. *J. Biol. Chem.*, **267**, 21119.
- Rafnar T., Griffith I., Kuo M., Bond J.F., Rogers B.L. y Klapper D.G. (1991) Cloning of *Amb a I* (antigen E), the major allergen family of short ragweed pollen. *J. Biol. Chem.* **260**, 1229.
- Raynal M., Depigny D., Grellet F. y Delseny M. (1991) Characterization and evolution of napin-encoding genes in radish and related crucifers. *Gene*, **99**, 77.
- Rosemberg A.H., Lade B.N., Chui D., Lin S.-W., Dunn J.J. y Studier F.W. (1987) Vectors for selective expression of cloned DNAs by T7 RNA polymerase. *Gene*, **56**, 125.
- Rosewell D.F. y White E.H. (1978) The chemiluminiscence of luminol and related hydrazides. *Meth. Enzymol.*, **57**, 409.
- Sambrook J., Fritsch E.F. y Maniatis T. (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, Nueva York.
- Sampson H.A. y Albergo R. (1984) Comparison of results of prick skin tests, RAST, and double-blind placebo controlled food challenges in children with atopic dermatitis. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **74**, 26.
- Sampson H.A. y Metcalfe D.D. (1991) *En Immediate reactions to foods and food additives*, p. 99. Blackwell Scientific Publications, Boston.

Sánchez-Puelles J.M., Sanz J.M., García J.L. y García E. (1990) Cloning and expression of gene fragments encoding the choline-binding domain of pneumococcal murein hydrolases. *Gene*, **89**, 69.

Sánchez-Puelles J.M., Sanz J.M., García J.L. y García E. (1992) Immobilization and single-step purification of fusion proteins using DEAE-cellulose. *Eur. J. Biochem.*, **203**, 153.

Sanger F., Nicklen S. y Coulson A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 5463.

Sanz J.M., López R. y García J.L. (1988) Structural requirements of choline derivatives for 'conversion' of pneumococcal amidase. A new single-step for purification of this autolysin. *FEBS Lett.*, **232**, 308.

Scharf S., Horn G.T. y Erlich H.A. (1986) Direct cloning and sequence analysis of enzymatically amplified genomic sequences. *Science*, **233**, 1076.

Scheiner O. (1992) Recombinant allergens: Biological, immunological and practical aspects. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, **98**, 93.

Scofield S.R. y Crouch M.L. (1987) Nucleotide sequence of a member of the napin storage protein family from *Brassica napus*. *J. Biol. Chem.*, **262**, 12202.

Seiberler S., Scheiner O., Kraft D., Lonsdale D. y Valenta R. (1994) Characterization of a birch pollen allergen, *Bet v* III, representing a novel class of Ca²⁺ binding proteins; specific expression in mature pollen and dependence of patients' IgE binding on protein-bound Ca²⁺. *EMBO J.*, **13**, 3481.

Sharief F.S. y Li S.S.-L. (1982) Amino acid sequence of small and large subunits of seed storage protein from *Ricinus communis*. *J. Biol. Chem.*, **257**, 14753.

Sharp P.A., Sugden B. y Sambrook J. (1973) Detection of two restriction endonuclease activities in *Haemophilus parainfluenzae* using analytical agarose-ethidium bromide electrophoresis. *Biochemistry*, **12**, 3005.

Shen H.-D., Chang L.-Y., Su S.-N y Han S.-H. (1988) Characteristics of five monoclonal antibodies to major allergens of the short ragweed pollen. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, **85**, 165.

- Shibasaki M., Szuki S., Tajina S., Nemoto H. y Kuroume T. (1980) Allergenicity of major components of soybean. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, **61**, 441.
- Shub M.D., Pang K.Y., Swann D.A. y Walker W.A. (1983) Age related chemical composition and physical properties of mucus glycoproteins from rat small intestine. *Biochem. J.*, **215**, 405.
- Sidoli A., Tamborini E., Giuntini I., Levi S., Volonté G., Pains C., De Lalla C., Siccardi A.G., Baralle F.E., Galliani S. y Arosio P. (1993) Cloning, expression, and immunological characterization of recombinant *Lolium perenne* allergen *Lol p* II. *J. Biol. Chem.*, **268**, 21819.
- Silvanovich A., Astwood J., Zhang L., Olson E., Kisil F., Sehon A., Mohapatra S. y Hill R. (1991) Nucleotide sequence analysis of three cDNAs coding for *Poa p* IX isoallergens of Kentucky Blue Grass pollen. *J. Biol. Chem.*, **266**, 1204.
- Smith J.M. (1988) Epidemiology and natural history of asthma allergic rhinitis and atopic dermatitis (eczema). En *Allergy Principles and Practice*, segunda edición. (E. Middleton, ed.), p. 891. C.V. Mosby Co., S. Luis.
- Smith D.B. y Johnson K.S. (1988) Single step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. *Gene*, **67**, 31.
- Soderquist M.E. y Walton A.G. (1980) Structural changes in protein adsorbed on polymer surfaces. *J. Colloid Interface Sci.*, **75**, 386.
- Stevens R.L. y Austen K.F. (1989) Recent advances in the cellular and molecular biology of mast cells. *Immunol. Today*, **10**, 381.
- Stevens F.J., Jwo O., Carperons W., Kohler H. y Schiffer M. (1986) Relationship between liquid- and solid-liquid antibody association characteristics: implications for the use of competitive ELISA techniques to map the spatial location of idiotypes. *J. Immunol.*, **137**, 1937.
- Stewart G.A., Lake F.R., Bird C.H. y Thompson P.J. (1989) Mite allergens as digestive enzymes. En *Epitopes of atopic allergens* (A. Sehon, D. Kraft y G. Kunkel, eds.), p. 83. UCB, Bruselas.
- Stoolman L.M. (1989) Adhesion molecules controlling lymphocyte migration. *Cell*, **56**, 907.

- Studier F.W. y Moffatt B.A. (1986) Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.*, **189**, 113.
- Subba Rao P.V., Shanti K.N., Martin B., Vekatraman G., Nagpal S. y Metcalfe D.D. (1993) Tropomiosin is the major shrimp allergen. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **91**, 341.
- Tarr G.E., Beecher J.F., Bell M. y McKean D.J. (1978) Polyquaternary amines prevent peptide loss from sequenator. *Anal. Biochem.*, **84**, 622.
- Terras F.R.G., Torrekens S., Van Leuven F., Osborn R.W., Vanderleyden J., Cammue B.P.A. y Broekaert W.F. (1993) A new family of basic cysteine-rich plant antifungal proteins from Brassicaceae species. *FEBS Lett.*, **316**, 233.
- Thomas W.R., Stewart G.A., Simpson R.J., Chua N.Y., Plozza T.M., Dilworth R.J., Nisbet A. y Turner K.J. (1988) Cloning and expression of DNA coding for the major house dust mite allergen, *Der p I* in *Escherichia coli*. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, **85**, 127.
- Tovey E.R., Ford S.A. y Baldo (1987) Protein blotting on nitrocellulose: some important aspects of the resolution and detection of antigens in complex extracts. *J. Biochem. Biophys. Meth.*, **14**, 1.
- Towbin H. y Gordon J. (1984) Immunoblotting and dot immunoblotting- current status and outlook. *J. Immunol. Meth.*, **72**, 313.
- Trudinger M., Chua K.Y. y Thomas W.R. (1991) cDNA encoding the major mite allergen, *Der f II*. *Clin. Exp. Allergy*, **21**, 33.
- Vaidya H.C., Dietzler D.N. y Ladenson J.H. (1985) Inadequacy of traditional ELISA for screening hybridoma supernatants for murine monoclonal antibodies. *Hybridoma*, **4**, 271.
- Valenta R., Duchêne M., Pettenburger K., Sillaber C., Valent P., Bettelheim P., Breitenbach M., Rumpold H., Kraft D. y Scheiner O. (1991) Identification of profilin as a novel pollen allergen: IgE autoreactivity in sensitized individuals. *Science*, **253**, 557.
- Vallier P., Dechamp C., Vial O. (1988) A study of allergens in celery with cross-sensitivity in mugwort and birch pollens. *Clin. Allergy*, **18**, 491.

- Van Ree R. y Aalberse R.C. (1993) Pollen-vegetable food crossreactivity: serological and clinical relevance of crossreactive IgE. *J. Clin. Immunoassay*, **16**, 124.
- Van Toorenenbergen A.W., Huijskes-Heins M.I.E., Leijnse B. y Dieges P.H. (1988) Immunoblot analysis of IgE-binding antigens in spices. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, **86**, 117.
- Villalba M., Batanero E., Monsalve I., González de la Peña M.A., Lahoz C. y Rodríguez R. (1994) Cloning and expression of *Ole e I*, the major allergen from olive tree pollen. *J. Biol. Chem.*, **269**, 15217.
- Wadee A.A., Botting L.A. y Rabson A.R. (1990) Fruit allergy: demonstration of IgE antibodies to a 30 kd protein present in several fruits. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **85**, 801.
- Wahl R., Lau S., Maasch H.J. y Wahn U. (1990) IgE mediated allergic reactions to potatoes. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, **92**, 168.
- Walker W.A. (1987) Role of the mucosal barrier in antigen handling by the gut. En *Food Allergy and intolerance* (J. Brostoff y S.J. Challacombe, eds.), pp. 209. Baillière Tindall, Londres.
- Walker W.A. e Isselbacher K.J. (1977) Intestinal antibodies. *N. Engl. J. Med.*, **297**, 767.
- Walter M.H., Liu J.-W., Grant C., Lamb C.J. y Hess D. (1990) Bean pathogenesis related (PR) proteins deduced from elicitor-induced transcripts are members of a ubiquitous new class of conserved PR proteins including pollen allergens. *Mol. Gen. Genet.*, **222**, 353.
- Wetzel R. y Goeddel D.V. (1983) En *The peptides* (E. Gross y J. Meienhofer, eds.), vol. 5, p. 1. Academic Press Inc., Nueva York.
- Wilkinson D.L. y Harrison R.G. (1991) Predicting the solubility of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Biotechnology*, **9**, 443.
- Williams J., Elleman T.C., Kington I.B., Wilkins A.G. y Kuhn K.A. (1982) The primary structure of hen ovotransferrin. *Eur. J. Biochem.*, **122**, 297.

Wolf J.L., Rubin D.H., Finberg R., Kauffman R.S., Sharpe A.H., Trier J.S. y Fields B.N. (1981) Intestinal M cells: a pathway for entry of reovirus into the host. *Science*, **212**, 471.

Wood C.R., Boss M.A., Patel T.P. y Emtage J.S. (1984) The influence of messenger RNA secondary structure on expression of an immunoglobulin heavy chain in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.*, **12**, 3937.

Wüthrich B., Dietschi R. y Johansson S.G.O. (1990) Celery allergy associated with birch and mugwort pollinosis. *Allergy*, **45**, 566.

Yunginger J.W. (1992) Letal food allergy in children. *N. Eng. J. Med.*, **327**, 421.