

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



TESIS DOCTORAL

**Familias isoflavona reductasa y Ole e 1-like: relevancia de alérgenos
minoritarios en especies vegetales de climas mediterráneos**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Lourdes Castro de las Cuevas

Directoras
M^a Teresa Villalba Díaz
Rosalía Rodríguez García

Madrid, 2016

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I



Familias Isoflavona reductasa y Ole e 1 - like: relevancia de alérgenos minoritarios en especies vegetales de climas mediterráneos

TESIS DOCTORAL

Lourdes Castro de las Cuevas

Madrid, 2015

VºBº Directores de la Tesis

Dra M^a Teresa Villalba Díaz Dra Rosalía Rodríguez García

más de cien mentiras que valen la pena

INDICE

<u>Abreviaturas</u>	- 23 -
<u>Resumen</u>	- 23 -
<u>Introducción</u>	- 23 -
Reacción alérgica.....	- 23 -
Mecanismo de la reacción alérgica	- 23 -
Diagnóstico y terapia de la alergia	- 25 -
Alérgenos.....	- 27 -
Fuentes alergénicas.....	- 30 -
Alergia al polen: polinosis.....	- 30 -
Alergia a alimentos	- 41 -
Reactividad cruzada.....	- 42 -
Reacciones cruzadas en la familia <i>Oleaceae</i>	- 43 -
Reactividad cruzada entre pólenes y alimentos.....	- 44 -
Alérgenos recombinantes.....	- 45 -
Herramientas proteómicas.....	- 47 -
Proteómica y alérgenos.....	- 48 -
Proteómica y extractos alergénicos	- 49 -
<u>Objetivos</u>	- 53 -
<u>Materiales y Métodos</u>	- 53 -
Soluciones de uso general.....	- 53 -
Purificación y caracterización de proteínas.....	- 53 -
Fuentes alergénicas	- 53 -
Preparación de extractos de proteínas alergénicas	- 54 -
Aislamiento de Ole e 12 en polen de olivo.....	- 54 -
Aislamiento de Sal k 5 del polen de <i>Salsola kali</i>	- 55 -

Indice

Valoración de proteínas.....	- 55 -
Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS (PAGE-SDS)	- 55 -
Tinción de geles de poliacrilamida con nitrato de plata.....	- 56 -
Transferencia electroforética	- 56 -
Tinción con Concanavalina A.....	- 57 -
Electroforesis bidimensional	- 57 -
Huella peptídica y secuenciación de aminoácidos <i>de novo</i>	- 58 -
Determinación de la masa molecular y de la secuencia amino-terminal.....	- 58 -
Proteólisis limitada	- 58 -
Digestión en SGF (<i>simulated gastric fluid</i>).....	- 59 -
Determinación de parámetros moleculares y búsquedas de homologías	- 59 -
Determinación de la actividad diaforasa.....	- 60 -
Caracterización espectroscópica de proteínas.....	- 60 -
Espectros de absorción ultravioleta y cálculo del coeficiente de extinción	- 60 -
Espectros de dicroísmo circular (DC).....	- 61 -
Curvas de desnaturalización térmica.....	- 61 -
Espectros de emisión de flourescencia	- 61 -
Caracterización inmunológica de proteínas	- 62 -
Sueros de pacientes alérgicos	- 62 -
Anticuerpos policlonales y monoclonales	- 62 -
Enzimoimmunoensayo (ELISA) indirecto.....	- 63 -
Inmunodetección de proteínas transferidas a membrana de nitrocelulosa	- 63 -
Inmunolocalización de Ole e 12 mediante microscopía electrónica de transmisión	- 64 -
Técnicas de manipulación de ácidos nucleicos	- 65 -
Cepa de <i>E. coli</i> TOP10	- 65 -
vectores plasmídicos	- 65 -
Medios de cultivo	- 65 -
Aislamiento de RNA.....	- 66 -
Electroforesis de RNA en condiciones desnaturalizantes	- 66 -

Síntesis de cDNA.....	- 67 -
Amplificación de cDNA mediante PCR.....	- 67 -
Electroforesis de DNA en geles de agarosa	- 68 -
Aislamiento de fragmentos de DNA	- 69 -
Clonación de los fragmentos amplificados en el plásmido pCR2.1	- 69 -
Transformación de células competentes	- 69 -
Aislamiento y secuenciación del DNA plásmidico	- 70 -
Producción y aislamiento de alérgenos recombinantes	- 70 -
Bacterias	- 70 -
Levaduras.....	- 70 -
Medios de cultivo	- 71 -
Vectores plasmídicos.....	- 71 -
Construcción del vector de expresión pET16b	- 72 -
Construcción del vector de expresión pPICZ α A	- 72 -
Digestión de DNA con enzimas de restricción.....	- 73 -
Transformación de células competentes	- 73 -
Producción y purificación de los alérgenos recombinantes: Ole e 12 Y Fra e 12.....	- 73 -
Digestión del <i>Tag</i> de histidinas de rOle e 12	- 74 -
Producción y purificación del alérgeno recombinante: rSal k 5.....	- 74 -
<u>Resultados Familia Isoflavona Reductasa</u>	- 77 -
Detección e identificación	- 77 -
Clonaje y secuenciación del cDNA codificante de Ole e 12.....	- 81 -
Análisis a partir de la estructura primaria de Ole e 12.....	- 83 -
Expresión y purificación de la proteína recombinante.....	- 86 -
Estudios de integridad durante el proceso de purificación.....	- 89 -
Caracterización estructural.....	- 90 -
Determinación de la masa molecular de rOle e 12	- 90 -
Análisis de la estructura secundaria	- 91 -
Emisión de fluorescencia	- 91 -

Indice

Estudio de la actividad diaforasa	- 92 -
Caracterización inmunológica	- 94 -
Obtención de un anticuerpo.....	- 94 -
Obtención de un antisuero policlonal específico de rOle e 12.....	- 96 -
Estudio de la capacidad de unión de IgG.....	- 97 -
Estudio de la capacidad de unión de IgE	- 98 -
Prevalencia de rOle e 12.....	- 100 -
Estabilidad estructural e inmunológica de rOle e 12	- 102 -
Efecto de agentes reductores y tratamiento térmico	- 102 -
Estabilidad enzimática	- 102 -
Estabilidad térmica	- 105 -
Ole e 12 como responsable de reactividad cruzada.....	- 107 -
Identificación de proteínas homólogas en extractos de pólenes y alimentos	- 107 -
Estudio de las proteínas homólogas a Ole e 12 en melocotón	- 108 -
Ole e 12 en la fuente natural.....	- 109 -
Purificación de nOle e 12.....	- 109 -
Inmunolocalización de Ole e 12 en grano de polen germinado.....	- 112 -
Detección de la proteína homóloga a Ole e 12 en fresco	- 115 -
Clonaje y secuenciación de Fra e 12.....	- 117 -
Análisis a partir de la estructura primaria de Fra e 12	- 119 -
Predicción de estructura secundaria	- 119 -
Predicción de hidrofobicidad y antigenicidad	- 120 -
Predicción de estructura terciaria de Fra e 12	- 120 -
Expresión y purificación de la proteína recombinante.....	- 122 -
Equivalencia inmunológica con Ole e 12	- 123 -
Detección de la proteína homóloga a Ole e 12 en <i>Chenopodium album</i>	- 126 -
Clonaje y secuenciación de Che a 12.....	- 126 -
Predicción de estructura secundaria	- 127 -
Predicción de hidrofobicidad y antigenicidad	- 128 -

Predicción de estructura terciaria de Che a 12	- 129 -
<u>Discusión Familia Isoflavona Reductasa</u>	- 132 -
Identification of a new pollen allergen in olive	- 132 -
Cloning and sequencing of IFR homologous allergens	- 135 -
Recombinant technology: r Ole e 12 and rFra e 12.....	- 141 -
Expression and purification of rOle e 12	- 142 -
Natural Ole e 12.....	- 143 -
Molecular characterization.....	- 146 -
Enzymatic activity	- 148 -
Immunological characterization	- 151 -
Ole e 12 relevance in the population analyzed	- 154 -
<u>Resultados Familia Ole e 1-like</u>	- 156 -
Identificación de una proteína de 19 kDa como una proteína alergénica relevante.....	- 156 -
Aislamiento y caracterización molecular del alérgeno Sal k 5	- 158 -
Clonación por PCR y análisis de la secuencia primaria	- 160 -
Análisis a partir de la estructura primaria de Sal k 5	- 162 -
Predicción de hidrofobicidad y antigenicidad	- 162 -
Expresión y purificación de cDNA rSal k 5	- 163 -
Validación de rSal k 5 con su forma natural nSal k 5.....	- 164 -
Propiedades inmunológicas de Sal k 5 en comparación con homólogos Ole e 1-like.....	- 166 -
<u>Discusión Familia Ole e 1-like</u>	- 169 -
Identification of Sal k 5, a member of the Ole e 1-like family	- 169 -
Recombinant expression and comparison with natural counterpart	- 172 -
<u>Final Remars</u>	- 169 -
<u>References</u>	- 169 -

Indice

ABREVIATURAS

βME	2-mercaptoetanol
Aa	Aminoácido
Ab	Anticuerpo
ADVIA centauro	Inmunoensayo con detección por quimioluminiscencia directa usando la tecnología del éster de acridinio
Ag	Antígeno
Alum	Hidróxido de aluminio ((OH) ₃ Al)
Amp	Ampicilina
APC	Célula presentadora de antígeno
BA	Bicarbonato amónico
BCR	Receptor de las células B
Bet v 1	Alérgeno principal del polen de abedul
BSA	Albúmina de suero bovino
CBS	Tinción con Azul de Coomassie
CHAPS	3-[(3-Colamidopropil)-dimetilamonio]-propano sulfonato
Con A	Concanavalina A
CRD	Diagnóstico basado en componentes
Ct	Extremo carboxilo terminal
DAB	3'-diaminobencidina-HCl
DC	Dicroísmo circular
DCPIP	2, 6-diclorofenol-indol-fenol
DEPC	Dietil pirocarbonato
DO o OD	Densidad óptica
DTT	Ditiotreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	Reactivo quimioluminiscente para la detección de la HRP
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ELISA	Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima
EXPOs	Orgánulos positivos a exocistos
FcεRI	Receptor de la fracción constante (Fc) de IgE de alta afinidad

Abreviaturas

FcεRII	Receptor de la fracción constante (Fc) de IgE de baja afinidad
FPLC	Cromatografía líquida rápida de proteínas
GAM	Anticuerpo secundario en cabra anti-IgG de ratón
GAR	Anticuerpo secundario de cabra anti-IgG de conejo
GlcNAc	N-acetilglucosamina
GST	Glutación S-transferasa
HisTag	Secuencia “Tag” de histidinas
HLA	Antígeno de histocompatibilidad de leucocitos humanos
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
HPLC-MS/MS	Cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masas
HRP	Peroxidasa de rábano
IFN	Interferón
IFR	Isoflavona reductasa
Ig	Inmunoglobulina
IL	Interleuquina
InmunoCAP	Ensayos cuantitativos <i>in vitro</i> para la medición de anticuerpos específicos de alérgeno en suero o plasma humano
IPTG	Isopropiltiogalactósido
IT	Inmunoterapia
kDa	Kilodalton
LB	Luria Bertani
LTPs	Proteína transferidora de lípidos
mAb	Anticuerpo monoclonal
MALDI	Desorción/ionización láser asistida por matriz
MCH	Moléculas de histocompatibilidad
Mm	Masa molecular
MOPS	Ácido (N-morfolino) propanosulfónico
mRNA	RNA mensajero
MS	Espectrometría de masas
NADH	Dinucleótido de nicotinamida y adenina
NADPH	Dinucleótido fosfato de nicotinamida y adenina
Nt	Extremo amino terminal

Ole e 1	Alérgeno principal del polen de olivo
p/v	Relación peso/volumen
pAb	Anticuerpo policlonal
pAb CtOle e 12	Anticuerpo policlonal frente al extremo C-terminal de la proteína Ole e 12
pAb rOle e 12	Anticuerpo policlonal frente a la proteína recombinante Ole e 12
PBS	Tampón fosfato salino
PBS-T	Tampón fosfato salino con Tween 20
PCBER	Reductasa del eter bencílico de fenil coumaran
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pl	Punto isoeléctrico
PLR	Pinoresinol-Lariciresinol Reductasa
PME	Pectin metilesterasa
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
RAM	Anticuerpo de rata anti-IgG de ratón
RAST	Radioalergosorbent test
rRNA	RNA ribosómico
SCIT	Inmunoterapia específica subcutánea
SD	Desviación estándar
SDS	Dodecilsulfato sódico
SDS-PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato sódico
SEM	Microscopía electrónica de barrido
SGF	Simulación del fluido gástrico
SIT	Inmunoterapia específica
SLIT	Inmunoterapia específica sublingual
SPT	Prueba de punción cutánea
ST	Estreptavidina
TAE	Tampón Tris-Base-acetato- EDTA
TBP	Tributil fosfina
TBS	Tampón Tris salino
TBS-T	Tampón Tris salino con Tween 20
TE	Tampón Tris-Base-EDTA

Abreviaturas

TCR	Receptor para antígeno específico de células T
TEM	Microscopía electrónica de transmisión
TGF	Factor de crecimiento transformante
Th	Célula T colaboradora
TLR	Receptor tipo <i>Toll</i>
Tm	Temperatura de desnaturalización
TNF	Factor de necrosis tumoral
TOF	Analizador de iones de tiempo de vuelo, del inglés <i>Time-Of-Flight</i>
Treg	Célula T reguladora
Triton X-100	Octilfenol etoxilato
tRNA	RNA de transferencia
Tween 20	Monolaurato de Polioxietileno Sorbitan
UV	Ultravioleta
v/v	Relación volumen/volumen
2D-EF	Electroforesis bidimensional

RESUMEN

La hipersensibilidad de tipo I, conocida como alergia atópica, es una respuesta inmunológica alterada y mediada por anticuerpos IgE (inmunoglobulina E), dirigida frente a determinados antígenos denominados alérgenos, la gran mayoría de los cuales son moléculas inocuas para el ser humano en condiciones normales. Esta hiperreactividad o reacción excesiva del sistema inmune resulta perjudicial para el organismo y su incidencia ha aumentado de forma notable en los últimos años, estimándose que afecta aproximadamente al 35% de la población europea y al 25% de la población de los países desarrollados.

Actualmente, tanto el diagnóstico y la inmunoterapia de la alergia se llevan a cabo mediante la exposición del paciente a los extractos de la fuente alérgica.

El diagnóstico de la alergia de tipo I se basa en la combinación de criterios sintomatológicos clínicos y características fisiopatológicas, determinadas por pruebas *in vivo*, como pruebas cutáneas (SPT), test de provocación nasal u oral con el extracto alérgico o pruebas *in vitro*, como los ensayos mediante radioalergoabsorción (RAST) o inmunocaptura (InmunoCAP/ADVIA centauro). En general, el SPT se complementa con ensayos *in vitro* que permiten cuantificar los niveles de IgE total y específica presente en el suero del paciente: RAST e InmunoCAP/ADVIA centauro. Estos ensayos, al contrario que el SPT, no se ven afectados por el empleo de fármacos como los antihistamínicos.

Sin embargo, la utilización de extractos alérgicos para el diagnóstico presenta algunos problemas, como la variabilidad en la composición de los extractos, la presencia de alérgenos lábiles en la fuente natural que no estén presentes en el extracto o que se encuentren poco representados en la fuente alérgica. De esta forma, la identificación y aislamiento de alérgenos naturales, producción de alérgenos recombinantes y caracterización de sus propiedades, ofrece nuevas perspectivas desde un punto de vista clínico para la mejora de los protocolos de diagnóstico, así como futuras aplicaciones para el tratamiento de la enfermedad. En la actualidad, la utilización de moléculas recombinantes para este fin no está permitida en España.

Resumen

El empleo de alérgenos recombinantes en tests *in vivo* ha dado lugar a ensayos de diagnóstico basados en componentes (CRD), en los que se discrimina la sensibilización de un paciente a un alérgeno particular o hacia diversos alérgenos de diferentes fuentes naturales, lo que permite conocer el perfil de reactividad del paciente. Recientemente se ha introducido en el campo de la alergia el empleo de microarrays de proteínas para facilitar el diagnóstico de los pacientes. Los alérgenos recombinantes que representan las principales fuentes alérgicas se inmovilizan en un chip permitiendo la determinación de los niveles de IgE presentes en el suero de cada individuo frente a un gran número de alérgenos, así como la reproducción de la complejidad epitópica presente en los extractos alérgicos naturales. En último término, estos ensayos diagnósticos que emplean moléculas recombinantes permiten una prescripción más fiel y segura de la inmunoterapia-

El olivo (*Olea europaea*) es un árbol rústico de la familia de las Oleáceas, muy apreciado por el interés económico de sus frutos (aceitunas, como alimento, y para la obtención de aceite), por el interés ornamental de su madera y en cosmética. Comenzó a cultivarse hace unos 5000 años en el Mediterráneo oriental, propagándose rápidamente a lo largo de toda la costa, de Este a Oeste, a través de Grecia, Italia y sur de Francia; alcanzando finalmente, la península ibérica y convirtiéndose en el cultivo oleaginoso por excelencia de las civilizaciones mediterráneas.

El polen de olivo es uno de los causantes de alergia estacional con afección respiratoria más importante en los países mediterráneos, donde esta especie se encuentra intensamente cultivada. Concretamente, en España existen 165 variantes, siendo el acebuche (*Olea oleaster*) la especie silvestre.

La respuesta inmunológica al extracto completo de polen de olivo es muy heterogénea. Cuando se comenzó este proyecto de Tesis Doctoral se habían identificado y purificado once proteínas que actúan como alérgenos y cuya nomenclatura es Ole e 1-11. Actualmente son trece alérgenos descritos, incluyendo el objeto de estudio de este trabajo.

Salsola kali es una maleza, las cuales constituyen un grupo muy heterogéneo de plantas, generalmente definido por su escaso valor estético o comercial. El empleo de

algunas especies con fines ornamentales ha ido aumentando en los últimos años, lo cual ha originado, a su vez, un mayor número de sensibilizaciones frente a estos pólenes. Este es el caso de algunas variedades de la familia *Amaranthaceae*, familia a la que pertenecen varias malezas con pólenes alergénicos. Algunas de estas especies son autóctonas de climas semidesérticos (el Norte de África y los países árabes) y tienen una especial resistencia a la sequía y en España *Salsola kali*, también conocida como *Salsola pestifer*, cardo ruso (Russian thistle), “capitana (Aragón)”, “barrilla”, “rodadera”, “espantalobos (Soria)”, es una hierba anual, predominante en áreas con baja pluviosidad como el Valle del Ebro y la confluencia entre Almería, Albacete y Murcia.

Es importante resaltar el aumento en la prevalencia de sensibilización a los pólenes de malezas en los últimos años, destacando el incremento significativo de la alergia a la ambrosía en Italia desde un 20% hasta un 60%.

En este contexto, el propósito de este estudio se divide en dos objetivos distintos, agrupados de acuerdo con las familias de proteínas relacionadas:

Familia Isoflavona reductase en el polen de olivo y en familias relacionadas

El análisis por inmunotinción tras 2D-EF del extracto proteico del polen de olivo mediante el uso de sueros de pacientes alérgicos, mostró diferentes patrones en la capacidad de unión a IgE de un grupo de isoformas aún no descritas en el polen de olivo. Para obtener una mayor comprensión de las propiedades estructurales de estas moléculas, nos propusimos los siguientes objetivos:

- A. Identificar un nuevo alérgeno en el polen de olivo que pudiera estar implicado en procesos de reactividad cruzada. Los objetivos propuestos para conseguir esto fueron:
 - a. Identificar mediante secuenciación *de novo* en espectrometría de masas de las bandas con unión a IgE, y obtener las secuencias de nucleótidos correspondientes a este potencial alérgeno.
 - b. Llevar a cabo su expresión como proteína recombinante para que esté disponible para fines clínicos y de investigación.

Resumen

- c. Caracterizar a estructuralmente e inmunológicamente la proteína obtenida, utilizando para ello un antisuero policlonal e IgE de sueros de pacientes alérgicos.
- B. Identificar nuevos alérgenos; homólogos a la proteína identificada en el polen de olivo, en otras especies relacionadas y no relacionadas filogenéticamente.
- C. Analizar la reactividad cruzada entre el polen de olivo y otros pólenes y alimentos.

Familia Ole e 1-like en el polen de *Salsola kali*

La familia Ole e 1-like contiene numerosos miembros de proteínas alergénicas que pertenecen a muy diferentes pólenes de malezas, hierbas y árboles. En este trabajo, un nuevo alérgeno del polen de *Salsola kali* perteneciente a la ubicua familia de proteínas Ole e 1-like ha sido identificado, lo que puede explicar la reactividad cruzada con otros miembros de la familia *Chenopodiaceae*. Para obtener una mayor comprensión de las propiedades estructurales de estas moléculas, nos propusimos los siguientes objetivos:

- A. La identificación de un posible miembro de la familia Ole e 1-like en el polen de *S. kali*, Sal k 5, utilizando anticuerpos específicos e IgE de pacientes alérgicos.
- B. La purificación a través de tres etapas cromatográficas de su fuente natural y posterior caracterización de nSal k 5.
- C. Obtención, a partir de la forma natural, por espectrometría de masas y secuenciación *de novo*, de las secuencias de nucleótidos correspondiente a este potencial alérgeno.
- D. Llevar a cabo su expresión como proteína recombinante en la levadura *Pichia pastoris*.
- E. Caracterizar estructural y inmunológicamente ambas proteínas obtenidas, utilizando un antisuero policlonal e IgE de sueros de pacientes alérgicos.
- F. Analizar la reactividad cruzada entre el polen de *Salsola* y otros pólenes filogenéticamente relacionados y no relacionados.

En resumen, en el primer grupo de estudios del presente trabajo, se ha logrado la identificación de varios alérgenos de la familia de isoflavonas reductasa. En primer lugar, se ha detectado un nuevo alérgeno del polen del olivo, Ole e 12, mediante el uso de técnicas inmunoproteómicas. Ole e 12 se clonó a partir de cDNA, sintetizado a partir de RNA total de polen de olivo, y se ha llevado a cabo un protocolo para su producción recombinante. La comparación de la secuencia obtenida con las contenidas en las bases de datos, permitió la descripción de Ole e 12 como una proteína perteneciente a la familia de isoflavona reductasa, que presenta alta identidad de secuencia con Bet v 6, alérgeno de polen de *Betula verrucosa*, o Pyr c 5, alérgeno presente en el fruto de *Pyrus communis*. La caracterización molecular e inmunológica de la proteína recombinante ha demostrado su equivalencia a la presente de forma natural en el polen de olivo.

En segundo lugar, también se ha identificado la presencia de proteínas homólogas a Ole e 12 en el polen de varias especies filogenéticamente relacionadas y no relacionadas, pero también en varios alimentos, lo que podría indicar que estuviera implicada en procesos de reactividad cruzada.

En tercer lugar, se ha evaluado la capacidad de Ole e 12 para unir anticuerpos IgE, lo que permite la clasificación de esta proteína como un alérgeno minoritario en el polen de olivo, con una prevalencia del 4-33% en pacientes con síntomas al polen de olivo y mostrando también sensibilización a melocotón. Además, con el fin de obtener estos resultados hemos generado dos anticuerpos específicos para Ole e 12: un antisuero monoclonal específico para el fragmento del Ct de Ole e 12 y un antisuero policlonal obtenido frente a rOle e 12.

En la segunda parte de este trabajo, se ha identificado un nuevo alérgeno en el polen de *S. kali*, Sal k 5, perteneciente a la familia de proteínas homólogas a Ole e 1. En primer lugar, se ha clonado el cDNA específico de Sal k 5, sintetizado a partir del RNA total a partir del polen de *S. kali*. Sal k 5 se ha producido de forma recombinante en la levadura *P. pastoris*.

En segundo lugar, se ha realizado la comparación entre rSal k 5 y su homólogo natural, lo que demuestra que esta molécula podría ayudar en el diagnóstico de la alergia a *S. kali*. Los resultados aquí presentados demuestran los procesos de alta

Resumen

reactividad cruzada, observados entre las dos especies de la familia *Chenopodiaceae* (quenopodio y salsola) en comparación con la familia *Oleaceae*, como consecuencia de la elevada similitud de secuencia entre estas fuentes estrechamente relacionadas.

En tercer lugar, se alcanzó una prevalencia de más del 30% en poblaciones de pacientes alérgicos a *S. kali* para nSal k 5, purificado a partir de polen, que indica la importancia de este alérgeno.

En conclusión, este trabajo aporta una comprensión adicional de las moléculas alergénicas, que podría mejorar el diagnóstico de la polinosis a *O. europaea* y *S. kali*, mediante la identificación y caracterización de moléculas que podrían ser útiles en el tratamiento clínico de la alergia y en la inmunoterapia personalizada.

SUMMARY

Type I hypersensitivity, known as atopic allergy, is an altered immune response, mediated by IgE antibodies (immunoglobulin E) directed against certain antigens called allergens, which most of them are, in standard conditions, molecules harmless to humans. This hyperreactivity or overreaction of the immune system is harmful to the body and its incidence has increased significantly in recent years, estimated to affect about 35% of the European population and 25% of the population of developed countries.

Currently, both the diagnosis and immunotherapy of allergy are conducted by exposing the patient to extracts of the allergen source.

The diagnosis of Type I allergy is based on the combination of clinical and symptomatological criteria determined by *in vivo* tests such as skin tests (SPT), nasal or oral test provocation with allergen extract or *in vitro* tests such as tests using radioallergosorbent (RAST) or immunocapture (ImmunoCAP / ADVIA centaur) assays. In general, the SPT is complemented by *in vitro* assays to quantify levels of total and specific IgE present in the patient's serum: ImmunoCAP RAST and / ADVIA Centaur. These tests, unlike the SPT, are not affected by the use of drugs such as antihistamines.

However, the use of allergen extracts for diagnosing presents some problems, such as variability in the composition of the extracts, the presence of labile allergens in the natural source which is not present in the extract or who are underrepresented compared to the allergenic source. Thus, identification and isolation of natural allergens, production of recombinant allergens and characterization of their properties, offers new perspectives from a clinical point of view to improve diagnostic protocols and future applications for disease treatment. Currently, the use of recombinant molecules for this purpose is not allowed in Spain.

The use of recombinant allergens for *in vivo* tests led to diagnostic tests based on components (CRD), in which discriminates the sensitization of a patient to a particular allergen or allergens to many different natural sources, allowing to know the

Resumen

reactivity profile of the patient. It has recently been introduced in the field of allergy the use of protein microarrays to help with diagnosis of patients. Recombinant allergens representing the main allergenic sources are immobilized on a chip allowing the determination of IgE levels in the serum of each individual from a large number of allergens and reproducing the complexity epitope present in allergen extracts natural. Ultimately, these diagnostic assays, that employ recombinant molecules, allow a more accurate and safe prescribing immunotherapy.

The olive tree (*Olea europaea*) is a rustic family tree from the *Oleaceae* family, very appreciated because of economic interest of its fruits (olives, for food, and for obtaining olive oil) and because of the ornamental value of its wood and cosmetics. It began to be cultivated about 5000 years ago in the eastern Mediterranean, quickly spread along the entire coast, from east to west through Greece, Italy and southern France; finally reaching the Iberian Peninsula and becoming the quintessential crop of Mediterranean civilizations.

Olive pollen is one of the causes of seasonal allergies more important in Mediterranean countries, where this species is intensively cultivated. Specifically, in Spain there are 165 variations, being *Olea oleaster* the wild species.

The immune response to complete olive pollen extract is very heterogeneous. When this doctoral thesis project began it had been identified and purified eleven proteins that act as allergens and whose nomenclature is Ole e 1-11. Currently thirteen allergens are described, including the object of study of this work.

Salsola kali is a weed, usually defined by its lack of aesthetic or commercial value. The use of some species for ornamental purposes has been increasing in recent years, which has led, in turn, into a greater number of sensitivities against these pollens. This is the case of some varieties of the *Amaranthaceae* family, family that owned several weed pollen allergens. Some of these species are native to semi-desert climates (North Africa and Arab countries) and have a special resistance to drought, and in Spain *Salsola kali*, also known as Russian thistle, is an annual herb, predominantly in areas with low rainfall as the Ebro Valley and the confluence of Almería, Albacete and Murcia.

Is important to emphasize the increase in the prevalence of sensitization to these pollens of weeds in recent years, highlighting the significant increase of ragweed allergy in Italy from 20% to 60%.

In this context, the aim of this study is divided into two distinct objectives, grouped according to related protein families

Isoflavone reductase family in olive pollen and related families

The analysis by 2DE of the pollen protein extract by using sera from allergic patients, showed different patterns in the IgE-binding ability of a group of isoforms not yet described in olive pollen. To gain further insight into the structural properties of these molecules, we aimed the following objectives

- A. To identify a new allergen in olive pollen that might be involved in processes of cross-reactivity. The objectives proposed to get this were:
 - a. To identify by *de novo* sequencing mass spectrometry the IgE-binding spots and obtain the nucleotide sequences corresponding to this potential allergen.
 - b. To conduct its expression as recombinant protein to make it available for clinical and research purposes.
 - c. To characterize structurally and immunologically the protein obtained, using a polyclonal antiserum and IgE from sera of allergic patients.
- B. To identify new allergens; homologous to the one identified in olive pollen, in other phylogenetically related and unrelated species.
- C. To analyze the cross-reactivity between olive pollen and other pollens and foods.

Ole e 1-like family in Russian thistle (*Salsola kali*) pollen

Ole e 1-like family contains numerous allergenic protein members which belong to very different pollens from weeds, grasses and trees. In this work, a new allergen from *Salsola kali* pollen belonging to the ubiquitous Ole e 1-like family has been identified, which can explain the cross-reactivity with other *Chenopodiaceae* members. To gain further insight into the structural properties of these molecules, we aimed the following objectives:

Resumen

- D. Identification of a potential member of the Ole e 1-like family in *S. kali* pollen, Sal k 5 using specific antibodies and IgE from allergic patients.
- E. Purification through three chromatographic steps from its natural source and characterization of nSal k 5.
- F. Obtention, from the natural form, by *de novo* sequencing mass spectrometry, the nucleotide sequences corresponding to this potential allergen.
- G. It was conducted its expression as recombinant protein in *Pichia pastoris* yeast.
- H. Characterize structurally and immunologically both proteins obtained, using a polyclonal antiserum and IgE from sera of allergic patients.
- I. To analyze the cross-reactivity between salsola pollen and other pollens from phylogenetically related and unrelated species.

In summary, in the first group of studies of the present work, the identification of several allergens from the Isoflavone reductase family has been accomplished. First, it has been detected a new allergen from olive tree pollen, Ole e 12, by using an immunoproteomic approach. Ole e 12 was cloned from cDNA, synthesized from olive pollen total RNA and it has been conducted a protocol for its recombinant production. Comparison of the sequence obtained with those contained in the databases, allowed the description of Ole e 12 as a protein belonging to the family of isoflavone reductases, exhibiting high sequence identity with Bet v 6, pollen allergen from *Betula verrucosa*, or Pyr c 5, allergen present in *Pyrus communis* fruit. The molecular and immunological characterization of the recombinant protein validated its equivalence to the one naturally present in olive pollen.

Second, it has also been identified the presence of homologous proteins to Ole e 12 in phylogenetically related and unrelated pollen from various species, but also in several foods, which could be involved in processes of cross-reactivity.

Third, it has been evaluated the ability of Ole e 12 to bind IgE antibodies, allowing the classification of this protein as a minor allergen from olive pollen, with a prevalence of 4-33% among patients with either pollen symptoms and showing also sensitization to peach. Furthermore, in order to help these findings we have obtained two specific

antibodies for Ole e 12: a monoclonal antiserum specific for the Ct fragment of Ole e 12 and a polyclonal antiserum rose against rOle e 12.

In the second part of this work, it has been identified a new allergen in *Salsola kali* pollen, Sal k 5, belonging to the family of proteins homologous to Ole e 1. First, it has been cloned Sal k 5-specific cDNA, synthesized from total RNA from *Salsola kali* pollen, then, Sal k 5 has been recombinantly produced in *Pichia pastoris* yeast.

Second, it has been performed the comparison between rSal k 5 and its natural counterpart demonstrating that this molecule could help in the diagnosis of *S. kali* allergy. The here presented results demonstrates the high cross-reactivity processes observed between both species of the *Chenopodiaceae* family (chenopod and salsola) compared to the *Oleaceae* family, as a consequence of the high amino acid sequence similarity between these closely related sources.

Third, a prevalence of more than 30% for natural Sal k 5 purified from pollen was reached in populations from patients allergic to *S. kali* indicating the importance of Sal k 5.

In conclusion, this work has got further insights into the allergenic molecules that might improve the diagnosis of pollinosis to *O. europaea* and *S. kali* by identifying and characterizing molecules that could be useful on personalized clinical treatment of allergy by immunotherapy.

Resumen

INTRODUCCIÓN

REACCIÓN ALÉRGICA

La hipersensibilidad de tipo I, conocida como alergia atópica, es una respuesta inmunológica alterada y mediada por anticuerpos IgE (inmunoglobulina E), dirigida frente a determinados antígenos denominados alérgenos, la gran mayoría de los cuales son moléculas inocuas para el ser humano en condiciones normales (1). Esta hiperreactividad o reacción excesiva del sistema inmune resulta perjudicial para el organismo y su incidencia ha aumentado de forma notable en los últimos años, estimándose que afecta aproximadamente al 35% de la población europea (2) y al 25% de la población de los países desarrollados (3).

Los alérgenos son moléculas de origen muy diverso, capaces de desencadenar la producción de IgE específicas por parte del sistema inmune e inducir, como consecuencia de su unión a éstas, una reacción alérgica. Suelen ser proteínas o glicoproteínas de bajo peso molecular, entre 5 y 70 kDa, y un alto grado de solubilidad y estabilidad. Sin embargo, también se han descrito como alérgenos determinadas moléculas de naturaleza no proteica (fármacos o incluso metales) que resultan inmunogénicas como consecuencia de su asociación a otras macromoléculas -generalmente proteínas del propio organismo-. La restricción del tamaño vendría dada por la dificultad que tendrían las moléculas excesivamente grandes para atravesar las barreras epiteliales de las mucosas (4).

Mecanismo de la reacción alérgica

Aunque las bases moleculares y celulares de las reacciones alérgicas no se conocen con exactitud, en la secuencia de acontecimientos que se desarrollan en la hipersensibilidad inmediata se pueden distinguir dos fases: una fase de sensibilización al alérgeno y otra posterior de provocación por parte de éste, en la que se manifiestan los síntomas clínicos, Figura 1 (5).

Introducción

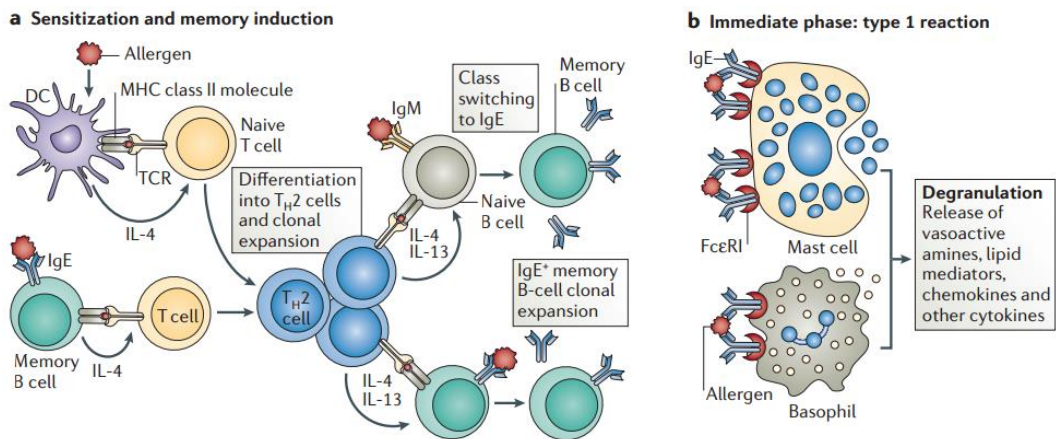


Figura 1: Representación esquemática de la secuencia de acontecimientos que tienen lugar en la alergia tipo I: (a) sensibilización y (b) provocación. Tomado de (5).

La **Sensibilización** tiene lugar cuando el individuo entra en contacto por primera vez con el alérgeno a través de su inhalación, ingestión o por contacto cutáneo. Al atravesar la primera barrera de defensa el alérgeno es captado y transportado por las células presentadoras de antígeno (APC) hasta las estructuras linfáticas más próximas, dónde la molécula es procesada y presentada a los linfocitos T naíve $CD4^+$. Estos linfocitos reconocen, a través de su receptor para antígeno específico de células T (TCR), los fragmentos del alérgeno expuestos en las superficies de las APC, asociados a moléculas de histocompatibilidad de tipo II (MHC-II). Esta interacción conlleva su activación y diferenciación a células colaboradoras de tipo 2 (Th_2), productoras, entre otras, de interleucina IL-4 e IL-13, responsables estas últimas de inducir tanto la expansión clonal de linfocitos B naíve como el cambio de isotipo de las inmunoglobulinas de tipo M (IgM) a IgE características de la alergia.

Las IgE producidas durante este proceso son alérgeno-específicas y capaces de sensibilizar al individuo al unirse a los receptores de IgE de alta afinidad ($Fc\epsilon R1$) que se expresan fundamentalmente en la superficie de mastocitos y basófilos. Así el individuo queda preparado para que, ante nuevos contactos con el alérgeno, se produzca la etapa de provocación.

En las siguientes exposiciones (fase de **provocación**), el alérgeno se une a las moléculas de IgE de la superficie de mastocitos y basófilos, proceso que posibilita el entrecruzamiento de los $Fc\epsilon R1$. Esta interacción activa una cascada de señalización

que induce la desgranulación de las células efectoras, con la consiguiente liberación al medio extracelular del contenido de sus gránulos citoplasmáticos cargados de mediadores como histamina y serotonina. Esta cascada también promueve la síntesis y secreción de citoquinas (IL-4, IL-5 e IL-13) y de mediadores lipídicos procedentes del metabolismo del ácido araquidónico, como leucotrienos y prostaglandinas. Los mediadores químicos liberados por los mastocitos y los basófilos interactúan con los tejidos diana (principalmente en las mucosas) para desencadenar los síntomas típicos de la alergia entre los que se pueden citar: rinitis, conjuntivitis, asma, urticaria, eccema o trastornos gastrointestinales. En los casos más graves puede llegar a producirse la muerte del individuo por obstrucción de las vías respiratorias y colapso cardiovascular, lo que se conoce como shock anafiláctico.

Diagnóstico y terapia de la alergia

Actualmente, tanto el diagnóstico como la inmunoterapia de la alergia se llevan a cabo mediante la exposición del paciente a extractos de la fuente alérgica.

El diagnóstico de la alergia de tipo I se basa en la combinación de criterios sintomatológicos clínicos y características fisiopatológicas, determinadas por pruebas *in vivo*, como pruebas cutáneas (SPT), test de provocación nasal u oral con el extracto alérgico o pruebas *in vitro*, como los ensayos mediante radioalergoabsorción (RAST) o inmunocaptura (InmunoCAP/ADVIA centauro). En general, el SPT se complementa con ensayos *in vitro* que permiten cuantificar los niveles de IgE total y específica presente en el suero del paciente: RAST e InmunoCAP/ADVIA centauro. Estos ensayos, al contrario que el SPT, no se ven afectados por el empleo de fármacos como los antihistamínicos.

Sin embargo, la utilización de extractos alérgicos para el diagnóstico presenta algunos problemas, como la variabilidad en la composición de los extractos, la presencia de alérgenos lábiles en la fuente natural que no estén presentes en el extracto o que se encuentren poco representados en la fuente alérgica. De esta forma, la identificación y aislamiento de alérgenos naturales, producción de alérgenos recombinantes y caracterización de sus propiedades, ofrece nuevas perspectivas desde un punto de vista clínico para la mejora de los protocolos de diagnóstico, así

Introducción

como futuras aplicaciones para el tratamiento de la enfermedad. En la actualidad, la utilización de moléculas recombinantes para este fin no está permitida en España.

El empleo de alérgenos recombinantes en tests *in vivo* ha dado lugar a ensayos de diagnóstico basados en componentes (CRD), en los que se discrimina la sensibilización de un paciente a un alérgeno particular o hacia diversos alérgenos de diferentes fuentes naturales, lo que permite conocer el perfil de reactividad del paciente (6). Recientemente se ha introducido en el campo de la alergia el empleo de microarrays de proteínas para facilitar el diagnóstico de los pacientes. Los alérgenos recombinantes que representan las principales fuentes alérgicas se inmovilizan en un chip permitiendo la determinación de los niveles de IgE presentes en el suero de cada individuo frente a un gran número de alérgenos, así como la reproducción de la complejidad epitópica presente en los extractos alérgicos naturales (7). En último término, estos ensayos diagnósticos que emplean moléculas recombinantes permiten una prescripción más fiel y segura de la inmunoterapia (8).

Una vez diagnosticada la alergia, el tratamiento sintomático consiste tanto en la administración de fármacos que mitiguen la afección (p. ej, antihistamínicos, glucocorticoides o antileucotrienos), como en la evitación del alérgeno para reducir el contacto con el agente sensibilizante. No obstante, estas terapias son de tipo paliativo ya que reducen los síntomas de la enfermedad sin modificar el curso de la misma. Hoy en día, la inmunoterapia específica (IT) es el único tratamiento curativo que existe para las enfermedades alérgicas. Ésta consiste en la inyección de dosis crecientes del extracto alérgico durante un largo periodo de tiempo (en torno a 4-5 años) hasta un nivel máximo tolerado, con el objetivo de inducir la desensibilización del paciente (9). Sin embargo, el empleo de extractos alérgicos naturales en inmunoterapia conlleva una serie de problemas, como el riesgo de sensibilizaciones secundarias o el desarrollo de efectos secundarios que provienen de la falta de estandarización de su composición y la presencia de componentes proteicos y no proteicos -alérgicos o no alérgicos- que contaminan estas preparaciones. Por este motivo, se están desarrollando nuevos métodos para la mejora de la IT que hacen uso de alérgenos puros perfectamente caracterizados, bien sean aislados de la fuente natural u obtenidos como proteína recombinante.

ALÉRGENOS

Los alérgenos son moléculas de origen muy diverso, que se nombran de acuerdo con la nomenclatura propuesta por la International *Union of Immunology Societies* (IUIS) (10). Así, las tres primeras letras del alérgeno corresponden al organismo del que procede, seguidas de la inicial de la especie y un número de serie. Este número representa el orden en el que ha sido descrito entre los alérgenos de la misma especie, o en referencia al grupo de alérgenos homólogos que han sido descritos en otras fuentes biológicas.

Un alérgeno es una molécula con capacidad para provocar una reacción alérgica tipo I mediada por IgE. Por lo general, se trata de moléculas de naturaleza proteica, aunque también se ha asociado capacidad alérgica a carbohidratos (11).

Los materiales biológicos suelen ser importantes fuentes alérgicas y la capacidad de dichos materiales para inducir procesos alérgicos guarda relación directa con su grado de accesibilidad en el organismo. Es por ello que los alérgenos más comúnmente asociados a enfermedades atópicas son los inhalados (aerolérgenos) y los ingeridos (alérgenos alimentarios). Las fuentes más comunes de aeroalérgenos son los pólenes de árboles, arbustos y gramíneas, los excrementos de ácaros, las esporas de hongos y el epitelio de animales domésticos. Otras importantes fuentes biológicas de alérgenos, además de los alimentos, son el veneno de insectos y el látex, Tabla 1.

Actualmente tampoco se tiene certeza de que existan claros patrones moleculares que determinen que una molécula sea o no un alérgeno, pero el número de proteínas que reconoce un paciente sensibilizado dependerá de la base genética del individuo, de la complejidad de la fuente, de la accesibilidad y estabilidad de dichas moléculas, así como de la sensibilidad y características de la técnica empleada para determinar la alergenicidad. Los alérgenos procedentes de una determinada fuente cuya frecuencia de reconocimiento es superior al 50% de los pacientes alérgicos a dicha fuente se denominan alérgenos principales, y son secundarios cuando los reconoce menos del 50%.

Introducción

Tabla 1: Principales fuentes biológicas de alérgenos

Aeroalérgenos	
Pólenes: Hierbas	<i>Lolium perenne</i>
	<i>Phleum pratense</i>
	<i>Dactylis glomerata</i>
Pólenes: Arbustos	<i>Chenopodium album</i>
	<i>Parietaria judaica</i>
	<i>Artemisia vulgaris</i>
Pólenes: Árboles	<i>Olea europaea</i>
	<i>Betula verrucosa</i>
	<i>Fraxinus excelsior</i>
Ácaros	<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>
	<i>Dermatophagoide farinae</i>
Epitelio y orina de mamíferos	<i>Felix domesticus</i>
	<i>Canis familiaris</i>
Hongos y levaduras	<i>Alternaria alternata</i>
	<i>Aspergillus fumigatus</i>
Semillas de cereales	<i>Triticum aestivum</i>
	<i>Secale cereale</i>
Alérgenos inyectados	
Venenos de insectos	<i>Polistes annularis</i>
	<i>Apis mellifera</i>
	<i>Solenopsis invicta</i>
Alérgenos ingeridos	
Alimentos	<i>Arachis hypogaea</i>
	<i>Malus domestica</i>
	<i>Gadus callarias</i>
Alérgenos de contacto	
Látex	<i>Hevea brasiliensis</i>

En la actualidad se sabe que muchos de los alérgenos clínicamente importantes son bioquímicamente activos. Algunos alérgenos presentan **actividad enzimática** (principalmente hidrolítica), otros son **inhibidores enzimáticos**, **proteínas de transporte** o bien **proteínas reguladoras**, Tabla 2.

Tabla 2: Principales funciones bioquímicas descritas en alérgenos

ACTIVIDAD BIOQUÍMICA	ALÉRGENOS
ENZIMAS HIDROLÍTICAS	
Proteasas	
serín-proteasas	Der p 3, Der f 3, Der p 6, Der p 9
cisteín-proteasas	Der p 1, Der f 1
metaloproteasas	Colagenasa
Glicosidasas	
amilasas	Der p 4, Blo t 4
Pectín metilesterasas	Act d 7, Bet v 8, Ole e 11
polimetilgalacturonidasas	Cry j 2, Phl p 13
glucanasas	Ole e 9, Hev b 2
Ribonucleasas	Asp f 1, Dau g 5, Lol p 5
ENZIMAS NO HIDROLÍTICAS	Der p 8
INHIBIDORES ENZIMÁTICOS	Act d 6, Ara h 3, Pla a 1, Tri a 15
PROTEÍNAS DE TRANSPORTE	
citocromo C	Lol p 10, Poa p 10, Cyn d
lipocalinas	Bla g 4, Mus m 1, Rat n 2
LTPs	Pru p 3, Mal d 3
PR (pathogenesis related)-10	Api g 1, Bet v 1, Cor a 1
PROTEÍNAS REGULADORAS	
profilinas	Ole e 2, Bet v 2
tropomiosina	Der f 10, Der p 10
alérgenos ligantes de Ca ²⁺	Bet v 3, Ole e 3, Ole e 8, Jun o 2

La posible relación entre la actividad bioquímica del alérgeno y su capacidad inmunogénica es un tema abierto a la especulación. Para provocar una respuesta alérgica, los alérgenos deben cruzar las mucosas y penetrar a través de las uniones de las células epiteliales y así entrar en contacto con las células del sistema inmune. Se sabe que las **proteasas** pueden alterar la permeabilidad de las mucosas y se ha sugerido que los alérgenos que presentan dicha actividad podrían romper

Introducción

directamente la barrera que ésta representa (12). Entre ellos el caso más conocido es Der p 1, alérgeno principal de *Dermatophagoides pteronyssinus*. Este alérgeno posee actividades cisteín y serín-proteasa, lo que parece aumentar la permeabilidad del epitelio en el tracto respiratorio, favoreciendo su entrada en el organismo (13). Además, es capaz de hidrolizar CD23 (receptor de IgE de baja afinidad) en células B (14) y CD25 (subunidad α del receptor de IL-2) en células T favoreciendo la producción de IgE (15). Por el contrario existen otros alérgenos homólogos a proteasas celulares, pero inactivos catalíticamente y que sin embargo son altamente alergénicos. Así Bla g 2, alérgeno principal de cucaracha, es una aspartato proteasa inactiva ya que carece de uno de los residuos clave para su actividad (16).

Como conclusión, la actividad bioquímica de los alérgenos podría modular la alergenicidad en algunos casos, pero existen factores como la dosis, la vía de entrada del alérgeno y la genética del paciente que deben ser determinantes en el desarrollo de la respuesta alérgica.

FUENTES ALERGÉNICAS

La capacidad de un alérgeno para desarrollar un proceso alérgico está directamente relacionada con su accesibilidad al individuo. Así, en función de la fuente alergénica existen diferentes rutas de acceso al interior del organismo: respiratoria, para alérgenos aerotransportados; ingestiva, para alérgenos presentes en los alimentos; o por contacto directo, como ocurre con los alérgenos del látex. En otros casos, el alérgeno es inyectado por la picadura de un insecto, como en el caso de la alergia a himenópteros. Entre todas estas fuentes alergénicas, las productoras de alérgenos inhalados o aeroalérgenos, así como los alimentos son las que presentan mayor incidencia clínica.

Alergia al polen: polinosis

En el caso de las alergias a pólenes, la vía de acceso es la respiratoria. Durante el proceso de inhalación de aire, una gran cantidad de estructuras de tamaño micrométrico acceden a las mucosas respiratorias de los alvéolos pulmonares. Así, los pólenes son responsables de gran cantidad de alergias conocidas, denominadas

genéricamente polinosis. En España, los pólenes están considerados como la primera causa de rinitis alérgica y la segunda de asma.

En la actualidad no se conoce porqué algunas proteínas son capaces de inducir alergia y otras no. Sin embargo las proteínas y glicoproteínas alérgicas caracterizadas hasta el momento a menudo comparten una serie de características estructurales o funcionales como:

- Tener un diámetro pequeño comprendido entre 15 y 60 μm
- Proceder de plantas anemófilas, es decir polinizadas por el viento, que incluyen árboles, malezas y gramíneas (hierbas)
- Accesibilidad de los alérgenos para ser liberados fácilmente al llegar a las mucosas del individuo alérgico

Su incidencia clínica es altamente dependiente de factores medioambientales tales como la época estacional, el hábitat geográfico del paciente o las características intrínsecas de los diferentes pólenes, Figura 2.

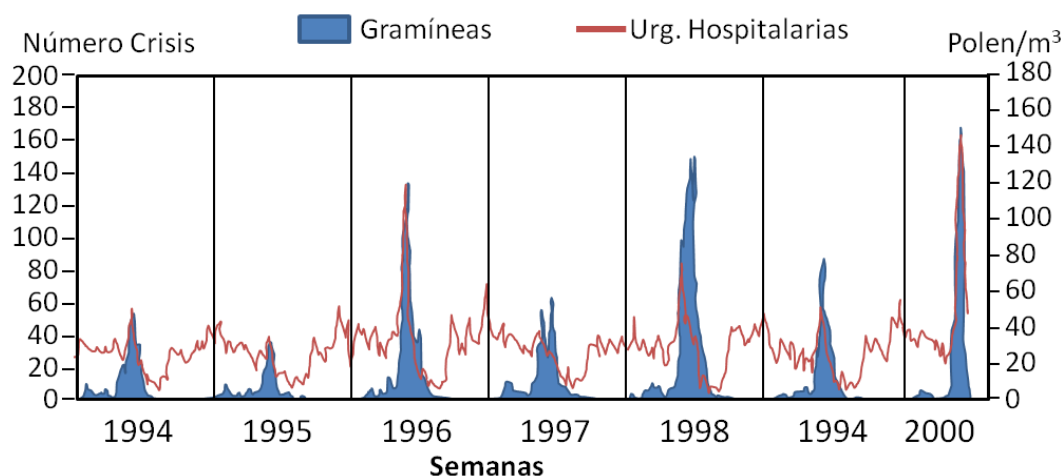


Figura 2: Número de agudizaciones de asma atendidas en el servicio de Urgencias de Hospital Gregorio Marañón y su correlación con los recuentos de pólenes de gramíneas (Boletín epidemiológico Madrid Mayo-Junio 2000).

Las especies vegetales cuyos pólenes son alérgicos son las **gramíneas**, los **árboles** y las **malezas** que generalmente tienen como característica general ser anemófilas:

Introducción

- Las gramíneas son las más abundantemente representadas en los extractos utilizados para el diagnóstico de la alergia e incluyen una gran diversidad de especies distribuidas por todo el mundo. El polen de gramíneas es, con mucho, la causa más importante de polinosis en todo el continente europeo, incluyendo el área mediterránea - entre el 8% y el 35% de los adultos jóvenes en los países de la Comunidad Europea presentan anticuerpos de IgE a los alérgenos de polen de gramíneas (17).
- En cambio, las especies pertenecientes a malezas y a árboles están localizadas de forma más específica ya que sus miembros son especies autóctonas de regiones geográficas concretas. Por ejemplo, el polen más alergénico es producido por *Olea europaea*, el olivo, que en el área mediterránea ha sido reconocida como una de las causas más importantes de alergia respiratoria estacional.

Así, la distribución de los pacientes alérgicos depende del ámbito geográfico en el que se encuentren estas plantas. Los síntomas derivados de la sensibilización a los pólenes son de carácter estacional. En general, los síntomas por pólenes de árboles aparecen durante el invierno y a principios de primavera, los derivados de pólenes de gramíneas durante la primavera y verano y los de malezas en verano y otoño. En Madrid se observa asma epidémico en las últimas semanas de mayo y primeras de junio, pero sólo en los años en que los recuentos de gramíneas son elevados (18). Los órganos que se ven afectados son la vía conjuntiva y las vías respiratorias superiores porque las manifestaciones clásicas consisten en ataques de rinitis y conjuntivitis alérgica ("fiebre del heno"), siendo también frecuente la aparición de asma.

La cuantificación de los granos de polen en el aire es importante para prevenir a los pacientes de exposiciones elevadas a los alérgenos. Los datos se hacen públicos en el llamado "recuento de polen", disponible y documentado en la mayoría de las ciudades. Los pólenes más importantes productores de polinosis en España son los procedentes de los cipreses en enero-marzo, *Platanus hispanica* (marzo-abril), las gramíneas y olivo en abril-junio, la *Parietaria* (maleza) de abril-julio y el *Chenopodium* (otra maleza) de julio-septiembre. Por áreas geográficas, la primera causa de polinosis son las gramíneas en el Centro y Norte de la Península, el olivo en el Sur (Jaén, Sevilla, Granada, Córdoba) y *Parietaria* en las regiones costeras mediterráneas (Barcelona,

Murcia, Valencia) (19). Por el contrario, *Chenopodium* y *Salsola* destacan sobre todos los demás en Elche y Aragón (20).

Alergia al polen de olivo

El olivo (*Olea europaea*) es un árbol rústico de la familia de las Oleáceas, muy apreciado por el interés económico de sus frutos (aceitunas, como alimento, y para la obtención de aceite), por el interés ornamental de su madera y en cosmética. Comenzó a cultivarse hace unos 5000 años en el Mediterráneo oriental, propagándose rápidamente a lo largo de toda la costa, de Este a Oeste, a través de Grecia, Italia y sur de Francia; alcanzando finalmente, la península ibérica y convirtiéndose en el cultivo oleaginoso por excelencia de las civilizaciones mediterráneas.

El olivo es un árbol muy resistente a los calores y a la sequía, características adecuadas para el clima de todo el sur peninsular, Figura 3.

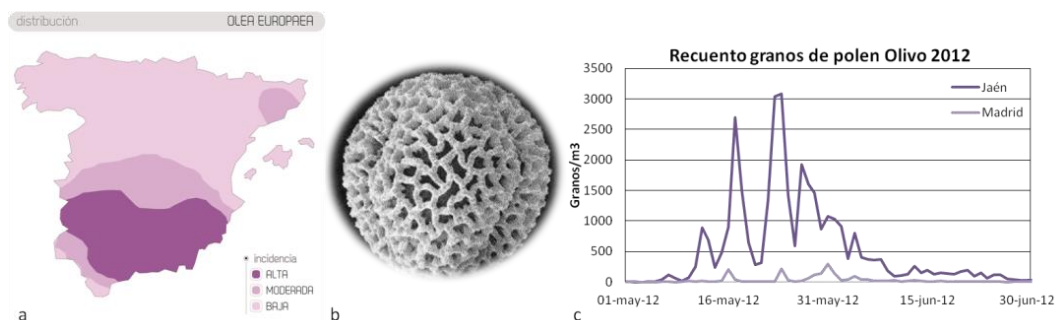


Figura 3: (a) incidencia del polen de olivo en la atmósfera de España, (b) micrografía electrónica de un grano de polen de olivo y (c) recuento de granos de polen de olivo en dos poblaciones distintas.

El polen de olivo es uno de los causantes de **alergia estacional** con afección respiratoria más importante en los países mediterráneos, donde esta especie se encuentra intensamente cultivada. Concretamente, en España existen 165 variantes, siendo el acebuche (*Olea oleaster*) la especie silvestre.

El grano de polen de olivo es de pequeño tamaño (17-21 μm de diámetro), ligeramente elíptico, tricolporado y presenta una densa reticulación. Su diseminación es eminentemente entomófila, aunque también poliniza de forma anemófila si hay niveles altos en el ambiente. La polinización abarca un periodo de tiempo

Introducción

comprendido entre la segunda mitad de abril y finales de junio y presenta una gran variabilidad interanual, con cierta alternancia entre concentración de pólenes y producción de frutos, que depende de la competencia entre la maduración de éste y el desarrollo de las yemas. Si los árboles no han empleado muchas reservas para producir frutos en otoño, las yemas indiferenciadas seguirán su desarrollo a flores durante la siguiente primavera. Si los nutrientes escasean entonces las yemas se diferenciarán a hojas y ramas (21). Las zonas oliveras de nuestro país muestran una moderada alternancia en la concentración de pólenes de olivo relacionada igualmente con la temperatura y pluviosidad estacionales (22).

A partir del extracto de polen de olivo se han realizado análisis, mediante PAGE-SDS, de los componentes alergénicos del mismo con sueros de pacientes alérgicos. Esto es lo que se conoce como perfil alergénico o Alergograma del polen de olivo. Mediante estos análisis se han observado bandas de proteínas que son reconocidas por anticuerpos IgE de sueros de pacientes hipersensibles a este polen (23, 24), Figura 4.

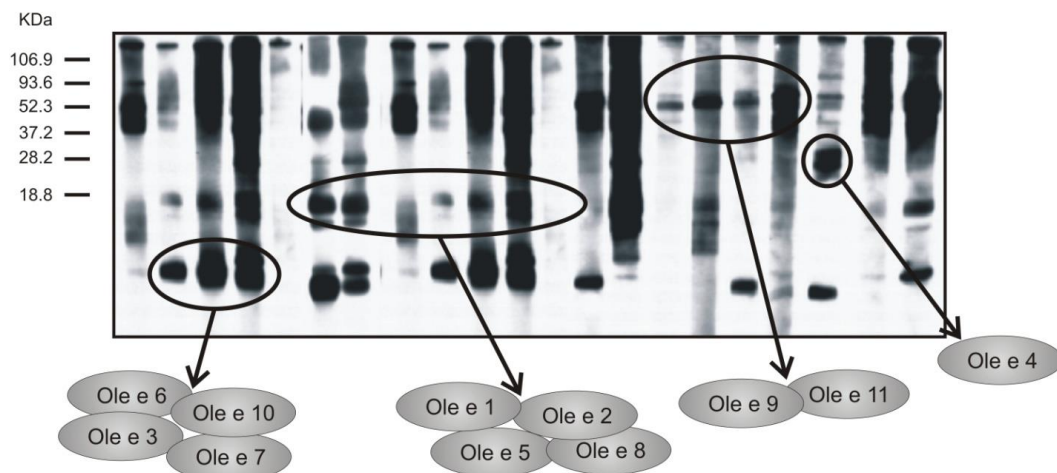


Figura 4: Inmunotinción de extracto de polen de olivo con sueros de pacientes alérgicos a olivo. Cada carril corresponde a un paciente.

La respuesta inmunológica al extracto completo de polen de olivo es muy heterogénea. Cuando se comenzó este proyecto de Tesis Doctoral se habían identificado y purificado once proteínas que actúan como alérgenos y cuya nomenclatura es Ole e 1-11. Actualmente son trece alérgenos descritos (23, 25), incluyendo el objeto de estudio de este trabajo, Tabla 3. Entre ellos hay alérgenos

principales, secundarios y panalérgenos. La prevalencia de uno u otro alérgeno depende de los niveles de polen en la atmósfera. Ello está directamente relacionado con la zona geográfica en que el paciente haya sido sensibilizado.

Estos alérgenos se han purificado y se han caracterizado sus propiedades moleculares, Tabla 3 y Figura 5.

Tabla 3: Alérgenos identificados del polen de olivo

Alérgeno	MM (kDa) ¹	pl ²	Preval. (%) ³	Familia	Ref.
Ole e 1	16.3/18.5*	4.8-8.0*	55-90*	Ole e 1-like	(26, 27)
Ole e 2	14-16**	5.1**	24	Profilina	(28)
Ole e 3	9.2*	4.3*	20-30	Polcalcina	(29, 30)
Ole e 4	32**	4.6-5.1*	80	Desconocida	(31)
Ole e 5	16**	5.1-6.5*	35	Superóxido dismutasa	(31)
Ole e 6	5.8*	4.2*	10-55*	Desconocida	(32)
Ole e 7	9.9-10.3*	≥9*	<10-47*	nsLTP	(33)
Ole e 8	18.8*	4.5**	<5	Proteína ligante de Ca ⁺²	(34)
Ole e 9	46.4*	4.8-5.4*	<10-65*	1,3-β-glucanasa	(35)
Ole e 10	10.8*	5.8*	<10-69*	CBM43	(36)
Ole e 11	39.4**	6.3-9.3*	56-77*	Pectin metilesterasa	(37)
Ole e 13	24**	4.5*	6.9-78	Taumatina	(25)

¹MM, masa molecular determinada mediante espectrometría de masas (*) o PAGE-SDS (**). Para Ole e 1 se muestran las masas moleculares de las formas no glicosilada y glicosilada, respectivamente.

²pl, punto isoeléctrico determinado experimentalmente (*) o deducido de la secuencia de aminoácidos (**).

³Prevalencia: (*) dependiente de la población.

CBM, módulo de unión de carbohidratos; nsLTP, proteína transferidora de lípidos no específica.

Introducción

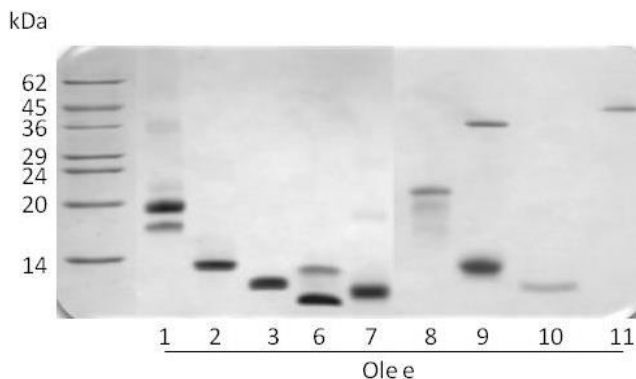


Figura 5: Alérgenos del polen de olivo purificados. Tomado de (23)

Ole e 1: Es la proteína más abundante en el extracto de polen de olivo. Ole e 1 es el agente sensibilizante más frecuente, afectando a más del 70% de los pacientes alérgicos al polen de olivo. A su vez, es también el mejor caracterizado (23, 24).

Se trata de una glicoproteína ácida (pI 4.5-6.5) y muy polimórfica, compuesta por una única cadena polipeptídica de 145 residuos y una masa molecular de 16.3-16.6 kDa, la forma no glicosilada, y aproximadamente 18 kDa, la variante glicosilada (38). Presenta un oligosacárido polimórfico unido a la Asn¹¹¹, lo que aumenta la masa molecular del alérgeno en 1.5 kDa (38). Este oligosacárido es una estructura que parece estar implicada en la actividad antigénica y alérgica de la proteína (38-40). Está compuesto por dos oligosacáridos principales cuya estructura es (41):

- N-glicano rico en manosa
- N-glicano que presenta $\beta(1,2)$ -xilosa y $(\beta(1,2)\text{-GlcN-Man})(1,3)$ unido a ManNAcGlc-NAcGlc.

Se ha visto que tanto la xilosa como la fucosa presentan un papel importante en la inmunogenicidad de glicoproteínas de plantas (41), lo que explica la capacidad antigénica del carbohidrato de Ole e 1, en el que además se ha observado, mediante aislamiento e inmunotinción con IgE, que contiene un epítipo alérgico de IgE (40).

Ole e 1 se expresa sólo en tejidos polínicos, concretamente en el retículo endoplásmico, la pared del polen y el tapetum durante la formación del grano, no encontrándose en aceitunas, ni hojas ni tallo (42). Su función no ha sido esclarecida

hasta la fecha. Sin embargo, LAT52, una proteína específica del polen de tomate y perteneciente a esta misma familia, parece regular la fertilización mediante la interacción con proteína quinasas desencadenantes del proceso (43), así, la función de estas proteínas reguladoras sería mantener bloqueado el proceso de germinación mediante la unión a quinasas y desencadenarlo cuando se libera de ellas.

Ole e 2 pertenece a la familia de las profilinas, que son panalérgenos - proteínas sumamente conservadas entre especies diferentes. Presenta una masa molecular aparente comprendida entre 14-16 kDa y un pI de 5.1 (28). Las profilinas son proteínas altamente conservadas estructuralmente y funcionalmente, sobretodo en especies vegetales. Son proteínas muy solubles y multifuncionales, ampliamente distribuidas en las células eucariotas. Regulan la polimerización de los filamentos de actina al estimular el intercambio de ADP a ATP y están implicadas en la transducción de señales intracelulares ya que pueden unir fosfoinosítidos, poli-L-prolina y proteínas ricas en motivos de prolina (44).

Se ha comprobado la capacidad de unir IgE de esta proteína en pacientes alérgicos al polen de olivo obteniéndose unos valores de prevalencia del 24% mediante inmunotransferencia y del 40% mediante ELISA, lo que indica que éste alérgeno pierde capacidad de unión a IgE bajo condiciones desnaturalizantes y lo que apunta a la presencia de epítomos conformacionales (28). Se ha observado un alto grado de similitud de secuencia en las profilinas de una gran variedad de fuentes biológicas como las de fresno, abedul y maíz, por lo que se le considera un panalérgeno. Esto explica las frecuentes reacciones cruzadas existentes entre ellas (28).

Las profilinas están comúnmente involucradas en la polisensibilización de pacientes alérgicos, sin que exista correlación entre el nivel de la respuesta de IgE de pacientes individuales a profilinas específicas y a la correspondiente fuente primaria de sensibilización, por tanto, usando los marcadores adecuados se facilitaría el diagnóstico por componentes (57).

Ole e 3 y Ole e 8: Pertenecen a la familia de proteínas de tipo EF-Hand. Ambas proteínas presentan segmentos de 12 residuos ricos en aminoácidos ácidos y flanqueados por 2 hélices α y denominados motivos EF ("EF-Hand"), que forman un bucle capaz de unir iones calcio.

Introducción

Ole e 3 es una proteína formada por una única cadena de 84 residuos y pI 4.3; ha sido clonada, secuenciada y producida de forma recombinante en *E. coli*. Posee dos sitios "EF-Hand" y su función biológica parece ser tamponadora de iones Ca^{2+} . Este panalérgeno pertenece a la familia de las polcalcinas (al ser específicas de polen) y es homóloga de Phl p 7, Aln g 4, Bet v 4 y Cyn d 7, polcalcinas respectivas de la hierba timotea (*Phleum pratense*), el aliso (*Alnus glutinosa*), abedul y el Cynodon (29, 30).

Ole e 8 es una cadena de 171 aminoácidos, con 4 sitios "EF-Hand" cuya función biológica podría ser regular rutas de transducción de señales. El hecho de que estos dos alérgenos unan iones Ca^{2+} resulta interesante ya que, sobre todo en Ole e 8, su capacidad para unirse a IgE depende de la presencia en la estructura de la proteína de este ión (34). Esto posibilitaría el diseño de derivados recombinantes que hubieran perdido la capacidad de unirse al calcio, pero mantuviesen intactas las propiedades antigénicas, y que podrían emplearse en inmunoterapia (45).

Ole e 4 y Ole e 5 y Ole e 6: Son los alérgenos menos estudiados. Ole e 4, es un fragmento de Ole e 9, presenta una masa molecular de 32 kDa, está constituido por una sola cadena polipeptídica correspondiente al dominio catalítico, y presenta un pI que oscila entre 4.6 y 5.1 (31).

Ole e 5 tiene una masa molecular de 16 kDa y presenta homología con superóxido dismutasas de algunas plantas como la espinaca o el tomate (31). De estas proteínas solo se tiene un conocimiento parcial de sus secuencias.

Ole e 6 es el alérgeno más pequeño encontrado en el polen de olivo (5.6 kDa) y presenta un pI de 4.2. Consta de una única cadena polipeptídica de 50 residuos con un alto contenido en Cys (32). Se ha expresado de forma recombinante en *P. pastoris* (46) y su estructura tridimensional ha sido determinada por RMN (47).

Ole e 7: Es una proteína transferidora de lípidos no específica (LTPs) con una masa molecular aparente de 10 kDa. Ha sido purificada y caracterizada (33). Su prevalencia puede llegar al 47% en aquellas poblaciones que están expuestas a altos niveles de polen de olivo. Las LTPs son moléculas muy estables que unen ácidos grasos y poseen propiedades antibacterianas y antifúngicas. Se piensa que juegan un papel importante en el desarrollo de las partes aéreas de la planta, realizando una función

de defensa (48). Se han descrito LTPs en otros pólenes (Art v 3 en *Artemisia vulgaris* o Par j 1 en *Parietaria judaica*) (49, 50) así como en frutas de la familia de las rosáceas, Pru p 3 en melocotón, Mal d 3 en manzana (51, 52) o procedente de otras familias, Vit v 1 en uva (53), en hortalizas, Aspa o 1 en espárrago (54), Cor a 8 en frutos secos en avellana (55)...

Se ha demostrado tanto *in vivo* como *in vitro*, reactividad cruzada entre varios de estos alérgenos, en particular con Pru p 3 ensayado como miembro modelo de la familia, aunque no con Ole e 7.

Ole e 9: Se trata de una β -1,3-glucanasa con un bajo pero significativo polimorfismo (35). Consta de una cadena de 434 aminoácidos, organizados tridimensionalmente en dos dominios, y al menos una posición de N-glicosilación ocupada. Las β -1,3-glucanasas están ampliamente distribuidas en el reino vegetal, lo que las hace un posible nuevo tipo de panalérgeno por su potencial para provocar reacciones cruzadas (35, 56).

Las β -1,3-glucanasas pertenecen a la familia de proteínas relacionadas con la patogénesis (subfamilia PR-2) y se cree que desempeñan un papel importante en las respuestas de defensa de las plantas a la infección por patógenos. Las β -1,3-glucanasas son capaces de catalizar la escisión de los enlaces β -1,3-glucosídico en β -1,3-glucano (57) componente estructural principal de las paredes celulares de muchos hongos patógenos (58, 59). Las β -1,3-glucanasas en la planta también tienen otras funciones, tales como la división celular y el elongamiento celular (60, 61), la germinación del polen y el crecimiento del tubo (62, 63), la fertilización (64), la embriogénesis somática [85], las semillas de germinación (65, 66) y la formación de flores (67, 68).

Ole e 10: Consta de una cadena de 102 aminoácidos con un péptido señal de 21 aminoácidos. Se trata de una proteína de 10,8 kDa con capacidad para unir 1,3- β -glicanos, por lo que se ha propuesto como el primer miembro de una nueva familia de módulos de unión de carbohidratos (CBM), la familia CBM43 (36). Ole e 10 presenta similitud de secuencia con el dominio Ct de otro alérgeno del polen de olivo, Ole e 9 (identidad 53%), con secuencias deducidas de genes de *Arabidopsis thaliana*

Introducción

(identidad 42-46%) y con segmentos polipeptídicos (cajas Cys) de proteínas implicadas en el desarrollo de levaduras (familias EPD1 / Gas-1p / PHR2; 42-43% de similitud).

Ole e 11: Es una pectín-metilesterasa que consta de una cadena de 342 aminoácidos, tras la ruptura del péptido señal de 22 aminoácidos, con una masa molecular de 37.4 kDa, aunque también se han detectado isoformas de 39 kDa, posiblemente debido a la presencia de formas glicosiladas y no glicosiladas, y pI 7.8. Cataliza la metil-esterificación de los componentes homogalacturonanos de la pectina, pudiendo estar implicados en el desarrollo del tubo polínico. La prevalencia de este alérgeno oscila entre el 56% y el 76% en diferentes poblaciones alérgicas (37).

Ole e 13: Es el alérgeno aislado, secuenciado y clonado más recientemente (25). Ole e 13 es la única proteína que ha sido caracterizada como alérgeno en la aceituna sin procesar (69). Este alérgeno no parece ser causante de sintomatología por ingestión, a pesar de estar presente en la aceituna cruda y de que la inhalación de partículas procedentes de su molturado sea capaz de inducir alergia ocupacional.

Alergia al polen de Salsola

Salsola kali es una maleza, las cuales constituyen un grupo muy heterogéneo de plantas, generalmente definido por su escaso valor estético o comercial. El empleo de algunas especies con fines ornamentales ha ido aumentando en los últimos años, lo cual ha originado, a su vez, un mayor número de sensibilizaciones frente a estos pólenes. Este es el caso de algunas variedades de la familia *Amaranthaceae*, familia a la que pertenecen varias malezas con pólenes alergénicos (70). Algunas de estas especies son autóctonas de climas semidesérticos (el Norte de África y los países árabes) y tienen una especial resistencia a la sequía (71) y en España *Salsola kali*, también conocida como *Salsola pestifer*, cardo ruso (Russian thistle), “capitana (Aragón)”, “barrilla”, “rodadera”, “espantalobos (Soria)”, es una hierba anual, predominante en áreas con baja pluviosidad como el Valle del Ebro y la confluencia entre Almería, Albacete y Murcia.

Es importante resaltar el aumento en la prevalencia de sensibilización a los pólenes de malezas en los últimos años, destacando el incremento significativo de la alergia a la ambrosía en Italia desde un 20% hasta un 60% (72).

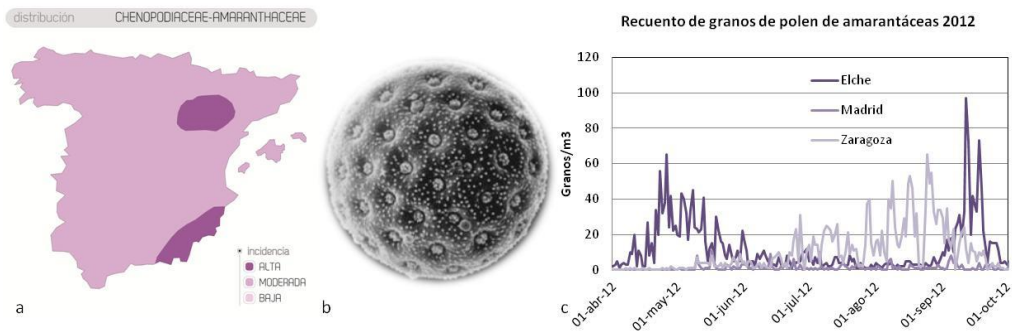


Figura 6: (a) incidencia del polen de Salsola en la atmósfera de España, (b) micrografía electrónica de un grano de polen de Salsola y (c) recuento de granos de polen de Salsola en tres poblaciones distintas.

Son plantas fundamentalmente anemófilas con un amplio período de polinización (marzo – octubre) aunque los picos se obtienen en los meses de agosto y septiembre. En algunas ciudades como Elche pueden llegar a representar hasta el 18% de los pólenes recogidos, aunque la media en la península ibérica supone alrededor del 5% de todos los pólenes recogidos (73).

Alergia a alimentos

Gran relevancia muestran las reacciones alérgicas que se producen por la ingesta de determinados alimentos. Es la denominada alergia alimentaria, que supone en países desarrollados un problema sanitario en constante crecimiento y de importantes consecuencias, tanto por la elevada prevalencia de este trastorno como por la posible gravedad de dichas reacciones, llegando a poner en peligro la vida del paciente. No es por tanto una alergia estacional, sino ocasional que depende de la ingesta de un determinado alimento. En muchos casos la alergia a alimentos aparece como consecuencia de una sensibilización primaria en el sistema gastrointestinal a través de alérgenos ingeridos (alergia alimentaria de clase I), pero también puede ser resultado de procesos de reactividad cruzada cuando la sensibilización primaria tiene lugar frente a un alérgenos inhalado (alergia alimentaria de clase II) (74).

Los síntomas asociados a la alergia alimentaria son varios y muy distintos, incluyen:

- Piel: urticaria, angioedema, prurito, enrojecimiento, dermatitis atópica.
- Tracto intestinal: prurito oral, náuseas, vómitos, diarrea, dolor abdominal, etc.

Introducción

- Sistema respiratorio: estornudos, rinorrea, congestión nasal, sibilancias, disnea, asma, etc.
- Sistema cardiovascular: hipotensión, mareo, inestabilidad, pérdida de conciencia, etc.
- El síndrome de alergia oral (SAO) se define como la aparición de prurito oral, labial y/o faríngeo, con o sin eritema labial y faríngeo, y angioedema en esa zona.

Estos síntomas aparecen rápidamente, de forma que el cuadro de síntomas locales queda establecido en menos de 30 minutos. Aparece frecuentemente relacionado con algunos alimentos vegetales frescos. Puede aparecer como síntoma aislado o asociado a un cuadro de mayor gravedad. La mayor parte de estos pacientes suelen presentar polinosis (75).

La anafilaxia alérgica es una reacción de hipersensibilidad, generalizada o sistémica, grave y potencialmente mortal mediada por un mecanismo inmunológico. Evoluciona con una reacción orgánica múltiple, dominada por asma grave y que puede culminar en hipotensión, broncoespasmo severo y shock anafiláctico.

Aunque los síntomas clínicos dependen de cada alimento, se ha observado que en una población de pacientes alérgicos a alimentos en España, los síntomas más comunes son los cutáneos (65%), seguidos de SAO (33.6%), síntomas digestivos (24.7%) y anafilaxia (17.9%) (76).

REACTIVIDAD CRUZADA

La reactividad cruzada es un fenómeno en el cual las IgE inducidas frente a un alérgeno determinado pueden reaccionar frente a otros alérgenos localizados en fuentes alergénicas diferentes. La similitud estructural entre los alérgenos es crucial en el desarrollo de la reactividad cruzada, de manera que proteínas homólogas son buenas candidatas para presentar este fenómeno (77). A los alérgenos implicados en reactividad cruzada, con un alto grado de similitud estructural, y que se encuentran ubicuamente distribuidos se les denomina panalérgenos. Los procesos de reactividad cruzada son frecuentes en individuos alérgicos que reaccionan frente a diferentes

pólenes (filogenéticamente relacionados o no), o frente a pólenes y ciertos alimentos de origen vegetal (78, 79).

La reactividad cruzada se demuestra en el laboratorio por medio de experimentos de inhibición de la captación de IgE (inhibición en ELISA o en inmunotransferencia).

Reacciones cruzadas en la familia *Oleaceae*

Aunque el olivo constituye el miembro más alergénico dentro de la familia de las Oleáceas, otras especies como fresno, aligustre y lila también han sido descritas como importantes fuentes de alérgenos. De hecho, ya en los años 80 se describieron procesos de reactividad cruzada en la familia de las Oleáceas (80), que han sido posteriormente confirmados (81-83). Desde entonces se ha demostrado la existencia de al menos cuatro alérgenos del polen de olivo implicados en mayor o menor medida en reactividad cruzada: Ole e 1, Ole e 2 (profilina), Ole e 3 (polcalcina) y Ole e 9 (β -1,3-glucanasa).

Familia de proteínas homólogas a Ole e 1

Las proteínas homólogas a Ole e 1 en los pólenes de lila, aligustre y fresno han sido aisladas, caracterizadas y producidas de forma recombinante respectivamente, Lig v 1 (83), Syr v 1 (84) y Fra e 1 (85), alérgeno principal del fresno y responsable de sensibilizaciones en Europa central. Los alérgenos homólogos a Ole e 1, pertenecientes a Oleáceas, han sido clonados y secuenciados, y muestran una identidad de secuencia con Ole e 1 de más de un 85%, lo que permite explicar la existencia de reactividad cruzada entre ellos.

Otros miembros alergénicos de esta familia pertenecen a la familia de las malezas como Che a 1 (76) o Pla I 1 (77) y de gramíneas como Lol p 11 (86) y aunque pertenecen a esta familia de proteínas homologas a Ole e 1, poseen un grado de identidad de secuencia lo suficientemente bajo como para no producir reactividad cruzada (76-78).

Reactividad cruzada entre pólenes y alimentos

La reactividad cruzada entre pólenes y alimentos ha sido ampliamente documentada (87) y, de hecho, se ha descrito la existencia de varias familias de panalérgenos conservados en las distintas fuentes biológicas. Un ejemplo bien estudiado a este respecto es la familia de proteínas homólogas a Bet v 1, que está implicada en alergias a pólenes de betuláceas (como el abedul, el avellano y el aliso), a alimentos vegetales (apio, manzana, zanahoria) y especias (comino, cilantro) (88-91). Así mismo, las profilinas constituyen una amplia familia de proteínas presentes en pólenes, frutas, hortalizas, ácaros y látex. Se ha demostrado que estas proteínas no sólo están implicadas en procesos de reactividad cruzada entre distintos pólenes (28, 92, 93), sino también entre pólenes y hortalizas (apio, tomate), o frutas (albaricoque, cereza) (86, 94).

La alergia a las rosáceas (especialmente a la manzana) es la alergia a frutas más frecuentemente asociada al polen de abedul. Sin embargo, también se observa alergia a esta familia de frutas en zonas desprovistas de abedules. La alergia a rosáceas en el área mediterránea es, en comparación, más grave con menos manifestaciones orales y frecuente afectación sistémica del tipo urticaria y/o anafilaxia. Los alérgenos mayoritarios de las rosáceas son las LTPs, detectándose respuestas IgE en el 62-100% de los pacientes (52, 94-100).

Familia IFR (isoflavona reductasa)

Como se ha comentado anteriormente entre las actividades enzimáticas atribuidas a los alérgenos se encuentran las isoflavonas reductasas. La función catalítica de estas proteínas se caracteriza por ser capaz de producir la reducción NADPH-dependiente de éteres bencílicos fenil cumaranos. Las proteínas pertenecientes a las familias pinosinol-lariciresinol e isoflavona reductasa están filogenéticamente relacionadas, así como un tercer grupo, los llamados "homólogos a isoflavona reductasas". Las tres clases de reductasas están implicadas en la biosíntesis de importantes compuestos derivados de los fenilpropanoides, relacionados en la defensa de las plantas (101).

Bet v 6 (inicialmente denominado Bet v 5) es un alérgeno minoritario del polen de abedul reconocido por un 12 % de los pacientes alérgicos a este polen (102). Presenta una masa molecular de 35 kDa y tiene reactividad cruzada con proteínas de alimentos

como la pera (Pyr c 5), lichi, manzana, melocotón, fresa (103). También con calabacín y zanahoria. Pero no se ha establecido aún su relevancia clínica en el síndrome abedul-alimentos vegetales (103).

ALÉRGENOS RECOMBINANTES

En la actualidad la Biología Molecular, y concretamente la tecnología del DNA recombinante, ha experimentado un gran desarrollo. Esto ha conducido a la clonación de un gran número de proteínas y ha supuesto una gran ventaja en la caracterización de alérgenos. Por una parte han permitido descifrar la estructura primaria completa de muchos de los principales alérgenos, lo que ha facilitado su comparación con el fin de encontrar homologías estructurales y funcionales entre los mismos (104-106). Esto resulta de gran interés en el estudio de panalérgenos y reacciones cruzadas. Por otra parte la obtención de alérgenos por vía recombinante, producidas en diversos sistemas heterólogos, permite obtener moléculas homogéneas en grandes cantidades, evitando problemas de polimorfismo, tan frecuentes en las proteínas alergénicas naturales, y además conservando intactas la mayor parte de las propiedades antigénicas y alergénicas de la proteína. La equivalencia inmunológica de las formas recombinantes- 29 -con las formas naturales se ha demostrado mediante análisis in vitro (ensayos de inhibición en ELISA o inmunotransferencia) e in vivo (activación de basófilos, liberación histamina o pruebas cutáneas).

Del complejo alergograma del polen de olivo, once alérgenos - Ole e 1 a Ole e 11 - se han identificado y caracterizado hasta la fecha. La mayoría de ellos han sido clonados y producidos como formas recombinantes, cuya disponibilidad ha permitido el análisis de sus estructuras tridimensionales, mapeo de sus epítomos de células T y B, y determinar de forma precisa el perfil alergénico de los pacientes para una inmunoterapia adaptada al paciente, Tabla 4.

Introducción

Tabla 4: Alérgenos del polen de olivo producidos en sistemas heterólogos (23).

Alérgeno natural	Alérgenos recombinantes	Sistema de expresión	Ref.	Objetivos principales
Ole e 1	<i>Proteína de fusión</i> GST-Ole e 1	Bacteria <i>E. coli</i>	(42)	·Primer alérgeno recombinante del polen de olivo
	<i>Isoformas de Ole e 1</i> Ole e 1/3c Ole e 1/5c	Levadura <i>P. pastoris</i>	(107-112)	·Equivalencia con Ole e 1 natural, mapeo epitópico y localización puentes disulfuro ·Marcador de sensibilización a Oleáceas ·Estandarización en diagnóstico <i>in vivo</i> ·Modelo de sensibilización de ratón alérgico
	<i>Homólogos</i> rSyr v 1/rLig v 1/rFra e 1	Levadura <i>P. pastoris</i>	(83-85)	·Establecimiento de la familia Ole e 1-like en Oleáceas ·Estudio clínico con rFra e 1 en una población Estrasburgo
	<i>Polipéptidos mutantes</i> 135Δ10/140Δ5/Y141A/OB ₅₅₋₅₈ <i>Mutantes glicosilados</i> mOle e 1	Levadura <i>P. pastoris</i>	(97, 113, 114)	·Papel de la fracción de glicanos principales ·Confirmación de un epitopo inmunodominante en el extremo Ct ·Estudios de modelos animales
Ole e 2	<i>Fragmentos derivados de alérgenos</i> GST-F1/ GST-F2/ GST-F3/ GST-F4/ GST-F5	Bacteria <i>E. coli</i>	(97)	·Mapeo epitópico
	rOle e 2	Bacteria <i>E. coli</i>	(115)	·Estudios estructurales
Ole e 3	Homólogos rChe a 2, rSin a 4	Bacteria <i>E. coli</i>	(20, 116, 117)	·Estudios reactividad cruzada ·Estudio EXPO
	rOle e 3	Bacteria <i>E. coli</i>	(30)	·Equivalencia con nOle e 3 ·Estudios de unión a Ca ²⁺
	Homólogos rOle e 3/rSyr v 3	Bacteria <i>E. coli</i>	(118, 119)	·Establecimiento de la familia de las polcalcinas ·Estudios reactividad cruzada
Ole e 5	rOle e 3	Planta <i>A. thaliana</i>	(120)	·Líneas transgénicas estables
Ole e 5	<i>Proteína de fusión</i> GST-Ole e 5	Bacteria <i>E. coli</i>	(121)	·Estudios de alergenicidad
Ole e 6	rOle e 6	Levadura <i>P. pastoris</i>	(46, 47)	·Determinación de la estructura 3D (NMR) ·Equivalencia inmunológica con nOle e 6
Ole e 8	rOle e 8	Levadura <i>P. pastoris</i>	(34, 119, 122, 123)	·Estudios de intra- e inter-reactividad ·Equivalencia con nOle e 8 ·Estudios de unión a Ca ²⁺
	rOle e 8	Planta <i>A. thaliana</i>	(120)	·Líneas transgénicas estables
Ole e 9	rOle e 9	Bacteria <i>E. coli</i>	(35, 124)	·Transcripción específica de Ole e 9 en el polen ·Alergia ocupacional
	<i>Fragmento recombinante</i> dominio Nt	Levadura <i>P. pastoris</i>	(56, 110, 125)	·Actividad enzimática ·Reactividad cruzada polen/alimentos/látex ·Tratamiento profiláctico en ratones ·Contribución alérgica de los dominios ·Variabilidad de los extractos en contenido
	<i>Fragmento recombinante</i> dominio Ct	Levadura <i>P. pastoris</i>	(110, 125-128)	·Estudios de intra-reactividad cruzada: Ole e 9-Ole e10 ·Nuevas familia de proteínas con unión a carbohidratos (CBM-43) ·Determinación de la estructura 3D (NMR) ·Tratamiento profiláctico en ratones ·Contribución alérgica de los dominios ·Variabilidad de los extractos en contenido
Ole e 10	rOle e 10	Levadura <i>P. pastoris</i>	(129)	·Nt truncado
	rOle e 10	Baculovirus <i>S. frugiperda</i>	(130)	·Integridad Ole e 10
Ole e 11	rOle e 11	Levadura <i>P. pastoris</i>	(37, 131)	·Estudios epidemiológicos ·Equivalencia con nOle e 11

Dada la dificultad que el aislamiento de los alérgenos supone, unido a que normalmente éstos se encuentran a bajas concentraciones en su fuente natural, actualmente se recurre a la producción de alérgenos mediante la expresión de sus cDNAs en sistemas heterólogos tales como levaduras y bacterias, que permiten obtener la proteína de forma homogénea y funcional. Por tanto, el hecho de poder obtener una mayor cantidad de alérgeno supone en sí una ventaja más de la tecnología de la producción recombinante.

El hecho de disponer de una gran cantidad de proteína homogénea ha permitido la aplicación de técnicas de resonancia magnética nuclear o difracción de rayos X para determinar la estructura terciaria de algunos de los alérgenos de mayor relevancia y estudiar la prevalencia de estos alérgenos en amplios muestrarios de población (20, 132).

Con respecto a las aplicaciones clínicas de los alérgenos recombinantes, hasta el momento el diagnóstico de las alergias se realiza con extractos de fuentes alérgicas poco estandarizados y de composición no definida. Esto supone un importante inconveniente, debido a la presencia de otros compuestos que pueden distorsionar los resultados del análisis, así como un riesgo para la salud del paciente, ya que se expone al individuo a una nueva sensibilización por parte de otro alérgeno que estuviera en el extracto.

Actualmente pueden prepararse cócteles de alérgenos recombinantes para así sustituir a los alérgenos naturales que se emplean en el diagnóstico y la inmunoterapia, aunque las legislaciones vigentes aún no permiten su utilización en pruebas cutáneas (133-135).

HERRAMIENTAS PROTEÓMICAS

La proteómica comprende tanto las técnicas para el estudio en gran escala de las proteínas expresadas (proteoma) como las aplicaciones de estas técnicas al análisis de problemas biológicos.

Introducción

Las técnicas aplicadas a la proteómica se han convertido en una herramienta básica para el estudio de los alérgenos implicados en la sensibilización. Se pueden distinguir dos grandes grupos de técnicas:

- a. Técnicas de separación de muestras biológicas, destinadas a purificar y obtener alérgenos aislados: Electroforesis uni- (PAGE-SDS) o bidimensional (2D-PAGE), técnicas cromatográficas como FPLC o HPLC, etc.
- b. Técnicas de identificación o análisis de proteínas, entre las que destaca es la espectrometría de masas, con todas sus variantes.

El objetivo de estas técnicas es la identificación de la secuencia y estructura de los alérgenos para correlacionarlos con su actividad biológica. La electroforesis bidimensional es hasta el presente, la única técnica que permite resolver con alta eficiencia las isoformas que difieren en punto isoeléctrico y por ello, se sigue utilizando ampliamente.

Proteómica y alérgenos

Desde que hace ya más de 30 años se purificaran los primeros alérgenos y se relacionaran directamente como causantes de sensibilización, la descripción de la estructura proteica (primaria, secundaria, terciaria o cuaternaria) o la función biológica de éstos se ha incrementado exponencialmente en los últimos años.

La espectrometría de masas juega un papel fundamental en la identificación de alérgenos. Una vez identificada la proteína causante de la sensibilización en los pacientes, es de gran interés el conocimiento de su secuencia de aminoácidos, ya que nos proporcionará información acerca de su función o de las características de esta. En la actualidad, cientos de alérgenos de todas las fuentes alérgicas posibles se han caracterizado y este número se incrementa de forma continua (www.allergen.org o www.allergome.com). Cada día se publican estudios describiendo nuevos alérgenos o agrupándolos en función de su estructura o de alguna de sus características biológicas.

En otros casos, el uso de técnicas como la electroforesis bidimensional, han permitido identificar isoformas de los diferentes alérgenos, o incluso nuevos alérgenos en

especies muy relacionadas, explicando diferentes perfiles de sensibilización en distintas poblaciones.

Proteómica y extractos alérgicos

Si bien las técnicas de proteómica han contribuido significativamente a la descripción, clasificación y descubrimiento de nuevos alérgenos (investigación básica), el empleo de estas técnicas se utiliza también para desarrollar mezclas de alérgenos para inmunoterapia o para controlar la calidad de los extractos. Por ejemplo, el empleo de técnicas de electroforesis como el SDS-PAGE ha permitido analizar la composición antigénica de los extractos, así como comparar las modificaciones en el perfil antigénico después de procesos de purificación de los extractos, con el objetivo de demostrar que la composición antigénica se mantiene inalterada.

Según la normativa europea (Guideline allergen products - European Medicines Agency), se consideran productos alérgicos a las preparaciones farmacéuticas obtenidas de extractos de materias primas de origen natural que contienen alérgenos. En este grupo se incluyen las vacunas derivadas de extractos alérgicos nativos, modificados (alergoides), productos conjugados de alérgenos con otras sustancias, o productos alérgicos fabricados mediante la tecnología del DNA recombinante (esto es, por clonación y obtención de formas recombinantes). Todos estos productos son, o están en vía de serlo, formas de tratamiento de la enfermedad alérgica. Por ello, la caracterización detallada de cada uno de los componentes de estas vacunas es un requisito indispensable para garantizar la calidad del producto que recibe el paciente.

Sin embargo, en las últimas décadas se han desarrollado vacunas más complejas con el objetivo de poder incrementar las dosis de alérgeno que se administra, manteniendo o incrementando así la eficacia, al mismo tiempo que mejoran considerablemente la seguridad del producto. Obviamente, la mayor complejidad de las moléculas supone también sistemas de caracterización y estandarización más sofisticados. A los métodos habituales que se emplean en la estandarización y caracterización de los extractos alérgicos (136), se han unido las nuevas técnicas de proteómica desarrolladas en los últimos años, como por ejemplo desarrollo de

Introducción

espectrometría de masas (MS) para la cuantificación *Phleum pratense* (137). Otro de estos ejemplos son los alergoides, moléculas de elevado peso molecular obtenidas tras la polimerización de los alérgenos individuales procedentes de los extractos alergénicos (138).

Podemos concluir que la proteómica aplicada constituye una herramienta eficaz, no sólo para el estudio y descripción de nuevos alérgenos, sino también para la caracterización de los extractos alergénicos, permitiendo dar un paso más en su conocimiento.

Debido al potencial que este tipo de técnicas proporcionan, y la información que genera respecto a los componentes básicos de las proteínas, puede convertirse en una herramienta imprescindible para la cuantificación y la caracterización de los extractos. En este último aspecto, la espectrometría de masas puede jugar un papel activo en la identificación de alérgenos e isoalergenos que forman parte de los extractos, y en especial de los alergoides, impulsándose definitivamente la estandarización de los extractos.

OBJETIVOS

La identificación, aislamiento y caracterización de alérgenos es uno de los principales objetivos en el área de investigación de la alergia. La caracterización de alérgenos resulta de gran utilidad tanto para la diagnosis, permitiendo complementar los problemas que plantea la falta de estandarización y la presencia de contaminantes en los extracto alergénicos, así como ayudando al diseño de tratamientos más efectivos y seguros.

El polen de olivo es una de las principales causas de polinosis en los países del área mediterránea, como España, Italia, Grecia o Israel, mientras que el polen de Salsola, una planta herbácea propia de zonas desérticas o de suelos ricos en sales, es una importante causa de polinosis en países desérticos o regiones semidesérticas, como (Arabia Saudí, Irán y Kuwait), algunas zonas de Estados Unidos y sur de Europa.

Teniendo en cuenta estos aspectos, el objetivo fundamental de esta Tesis Doctoral es contribuir a mejorar el diagnóstico molecular mediante la identificación y caracterización de nuevos alérgenos implicados en esta enfermedad.

Para ello los objetivos particulares que se plantean son los siguientes:

1. Identificar un nuevo alérgeno en el polen de olivo que pudiera estar implicado en procesos de reactividad cruzada, así como llevar a cabo su expresión como proteína recombinante para que esté disponible con fines clínicos y de investigación.
2. Analizar la reactividad cruzada entre el polen de olivo y otros pólenes y alimentos en pacientes alérgicos.
3. Identificar nuevos alérgenos homólogos al identificado en el polen de olivo en otras especies filogenéticamente relacionadas y no relacionadas con esta especie.
4. Purificación y caracterización de un potencial miembro de la familia de proteínas Ole e 1-like en el polen de *S. kali* y producción de la forma recombinante.

Identification, isolation and characterization of allergens is one of the main objectives in the area of allergy research. Characterization of allergens is useful for diagnosis, improving the problems due to lack of standardization and the presence of contaminants in the allergenic extracts, as well as helping to design more effective and safer treatments.

The olive pollen is a major cause of pollinosis in Mediterranean countries such as Spain, Italy, Greece and Israel, while the pollen of *Salsola*, a herbaceous plant characteristic of desert areas or soils rich in salts, is a major cause of pollinosis in desert countries (Saudi Arabia, Iran and Kuwait), parts of United States and southern Europe.

Considering these aspects, the main objective of this thesis is to improve the molecular diagnosis through the identification and characterization of new allergens involved in this disease.

To this end, the particular objectives proposed are:

1. To identify a new allergen in olive pollen that might be involved in processes of cross-reactivity, as well as conducting its expression as recombinant protein to make it available for clinical and research purposes.
2. To analyze the cross-reactivity between olive pollen and other pollens and foods in allergic patients.
3. To identify new allergens; homologous to the one identified in olive pollen, in other phylogenetically related and unrelated species.
4. Purification and characterization of a potential member of the Ole e 1-like family in *S. kali* pollen as well as its recombinant expression.

MATERIALES Y MÉTODOS

SOLUCIONES DE USO GENERAL

PBS (Tampón fosfato salino): NaCl 140 mM, KCl 2.7 mM, KH_2PO_4 1.5 mM, $\text{Na}_2\text{H}_2\text{PO}_4$ 8.1 mM, pH 7.2.

TBS (Tampón Tris salino): Tris-HCl 50 mM, NaCl 0.5 M, pH 7.5

Tampón de aplicación de proteínas en geles de poliacrilamida en presencia de SDS: Tris-HCl, pH 6.8, SDS 2% (p/v), glicerol 10% (v/v) y azul de bromofenol 0.01% (p/v).

PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PROTEÍNAS

Fuentes alergénicas

Los pólenes de *Ambrosia trifida* (ambrosía), *Artemisia vulgaris* (artemisa), *Betula verrucosa* (abedul), *Chenopodium album* (cenizo o quenopodio), *Cupressus sempervirens* (ciprés), *Dactylis glomerata* (dactilo), *Eleagnus angustifolia* (paraíso), *Fraxinus excelsior* (fresno), *Juniperus communis* (enebro), *Ligustrum vulgare* (aligustre), *Lolium perenne* (ballica), *Olea europaea* (olivo), *Parietaria judaica* (pelosilla o pelitre), *Phleum pratense* (fleo), *Pinus sylvestris* (pino), *Platanus acerifolia* (plátano de sombra), *Salsola kali* (barrilla) y *Syringa vulgaris* (lila) fueron suministrados por la compañía ALK-Abelló y por BioPol.

También se emplearon extractos de los frutos de *Actinia chinensis* (kiwi), *Arachis hypogaea* (cacahuete), *Brassica napus* (colza), *Brassica oleracea* (coliflor), *Capsicum annuum* (pimiento), *Cicer arietinum* (garbanzo), *Corylus avellana* (avellana), *Cucumis melo* (melón), *Glycine max* (soja), *Juglans regia* (nuez), *Lycopersicon esculentum* (tomate), *Musa acuminata* (plátano), *Pinus pinea* (piñón), *Pistacia vera* (pistacho), *Prunus dulcis* (almendra) y *Pyrus communis* (pera).

Preparación de extractos de proteínas alergénicas

Los extractos proteicos se prepararon tras la suspensión al 5% (p/v) de los diferentes pólenes en bicarbonato amónico 50 mM, pH 8.0, 1 mM fluoruro de metilfenilsulfonilo (PMSF). Se homogeneizaron en potter y la mezcla se mantuvo en agitación durante 1 h a temperatura ambiente. Transcurrido ese tiempo la mezcla se centrifugó durante 20 min a 10000 g a 4 °C. El sobrenadante se recogió y con el sedimento se repitió la operación dos veces más. Los sobrenadantes de cada etapa se reunieron, liofilizaron y almacenaron a -20 °C hasta su utilización.

Los extractos de alimentos se prepararon según el protocolo descrito por Díaz-Perales (139). Los alimentos liofilizados fueron triturados y sometidos a tres etapas sucesivas de deslipidación en éter:etanol (3:1, v/v) al 4% (p/v). El sedimento resultante fue extraído en PBS (5%, p/v) mediante agitación 1 h a 4 °C. La muestra se centrifugó durante 20 min a 4 °C y 10000 g, y el sobrenadante se dializó frente a agua toda la noche a 4 °C. El extracto se liofilizó y se guardó a -20 °C hasta su uso.

Aislamiento de Ole e 12 en polen de olivo

El polen de olivo fue homogeneizado (5% (p/v)) y extraído durante 1 h a temperatura ambiente en bicarbonato amónico 50 mM, pH 8.0, PMSF 1 mM. A continuación el homogeneizado se centrifugó a 10000 rpm, 20 min a 4 °C. Al sobrenadante se le realizó una precipitación fraccionada con sulfato amónico al 20%, 50%, 70% y 100%, durante 1.5 h y con agitación magnética. El sedimento correspondiente al 70%, que contenía Ole e 12, se resuspendió en BA 20 mM, se dializó frente al mismo tampón y se liofilizó. El liofilizado se resuspendió en BA 20 mM y se fraccionó en una columna de penetrabilidad Sephadex G-75 (Amersham Bioscience) equilibrada en el mismo tampón. El flujo se mantuvo a 36 ml/h y se registró el perfil de absorbancia a 280 nm. Las fracciones que contenían Ole e 12, se identificaron tras tinción con un anticuerpo específico, se juntaron, se liofilizaron y se resuspendió en el tampón Tris-HCl 50 mM, pH 7.4, NaCl 4 M y a continuación se aplicó la disolución en una columna de hidrofobicidad en el sistema FPLC (Phenyl HP 5ml en un Äkta purifier, Amersham Bioscience). La elución de la muestra se llevó a cabo con el tampón Tris-HCl 50 mM, pH 7.4, con un gradiente de

concentración de NaCl decreciente comprendido entre 4 y 0 M. El flujo se mantuvo a 5ml/min y se registró la absorbancia a 280 nm.

Aislamiento de Sal k 5 del polen de *Salsola kali*

El polen de *Salsola kali* fue homogeneizado (5% (p/v)) y extraído durante 1 h en bicarbonato amónico 50 mM, pH 8.0, PMSF 1 mM. A continuación el homogeneizado se centrifugó a 10000 rpm, 20 min a 4 °C. Sobre el sedimento se repitió la extracción dos veces, recogiendo todos los sobrenadantes que posteriormente se liofilizaron. El liofilizado se resuspendió en BA 20 mM y se fraccionó en una columna de penetrabilidad Sephacryl-100 (68 x 2.5 cm) (Amersham Bioscience) equilibrada en el mismo tampón. A continuación las fracciones que contenían Sal k 5 se juntaron, se liofilizaron y se resuspendió en el tampón Tris-HCl 50 mM, pH 7.4, NaCl 2 M y a continuación se aplicó en una columna de hidrofobicidad de Fenil-Sefarosa. La muestra se eluyó con tampón Tris-HCl 50 mM, pH 7.4. La última etapa de purificación se llevó a cabo en el HPLC en una columna Nucleosil C18 en fase reversa con un gradiente de acetonitrilo (0-60%) en ácido trifluoroacético 0.1%. El perfil de elución se registró a 214 nm.

Valoración de proteínas

La estimación de la concentración de proteína total en disolución se realizó según el método de Lowry (140).

Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS (PAGE-SDS)

Las electroforesis se llevaron a cabo en un sistema discontinuo siguiendo el procedimiento descrito por (141). La polimerización de los geles y el desarrollo de la electroforesis se llevaron a cabo en un sistema Mini-Protean III de Bio-Rad. Se usaron geles de 0.75 mm de espesor. Se prepararon al 12% ó al 15% de poliacrilamida, con un gel concentrante al 4%.

Las muestras de proteína se disolvieron directamente en tampón de aplicación. La electroforesis se desarrolló en tampón de electroforesis constituido por Tris-base 25 mM, glicina 192 mM y SDS al 0.1% (p/v). En algunos casos se añadió β -mercaptoetanol

Materiales y Métodos

(β ME) al 0.5%, en cuya presencia las muestras se calentaron durante 20 min a 90 °C. La intensidad de corriente aplicada fue de 25 mA por gel y ésta se mantuvo hasta que el marcador del frente (azul de bromofenol) alcanzó el extremo inferior del gel. Finalizada la electroforesis las proteínas se detectaron mediante tinción con azul de Coomassie R-250 (Coomassie brilliant blue R-250 0.3% (p/v), metanol 45% (v/v) y ácido acético 10% (v/v)) (142). El exceso de colorante se eliminó mediante sucesivos lavados con metanol 40% (v/v) y ácido acético 10% (v/v). Como patrones de peso molecular se utilizaron las proteínas contenidas en el kit MW-SDS-70L de Sigma disueltas a 0.5-1 mg/ml en tampón de aplicación con β ME al 5% (v/v). La estimación de la masa molecular aparente de las proteínas se realizó según el método descrito por (143).

Tinción de geles de poliacrilamida con nitrato de plata

En aquellos desarrollos electroforéticos en los que, debido a una baja concentración de proteína se requería una mayor sensibilidad en la detección, se empleó una tinción con plata. El protocolo empleado fue descrito por (144). Tras la fijación de las proteínas en el gel durante 1 h en metanol 50% (v/v), ácido acético 12% (v/v), formaldehído al 0.02% (v/v), se realizaron tres lavados de 20 min con etanol al 50% (v/v). El gel se trató a continuación durante 1 min con una disolución de tiosulfato sódico pentahidratado (0.2 g/l). Los restos de dicha disolución se eliminaron mediante tres lavados de 30 seg con agua destilada. A continuación, el gel se impregnó con una disolución de nitrato de plata (2 g/l) y formaldehído al 0.03% durante 20 min en agitación suave. Tras realizar dos lavados con agua, se reveló el color mediante la incubación durante 3-15 min en una disolución de carbonato sódico 60 g/l y formaldehído 0.02% (v/v), tiosulfato sódico pentahidratado 4 mg/l. Una vez eliminada la solución de teñido, la reacción de revelado se detuvo mediante agitación del gel durante 10 min en una disolución de metanol al 50% (v/v) y ácido acético al 12% (v/v). Por último, con el fin de fijar las proteínas teñidas, el gel se incubó en metanol al 50%.

Transferencia electroforética

La transferencia electroforética de proteínas a membranas de nitrocelulosa (Amersham) se realizó básicamente según el procedimiento descrito por (145). La transferencia se realizó en tampón Tris-base 48 mM, glicina 39 mM, SDS 0.0375% (p/v) y metanol 20%

(v/v), con una intensidad de corriente de 1 mA/cm^2 durante 1 h. La eficacia de la transferencia se comprobó mediante visualización directa de los patrones de proteínas preteñidas con azul de Coomassie (Prestained SDS-PAGE Standard, low range; Bio-Rad).

Tinción con Concanavalina A

Las glicoproteínas se detectaron sobre membranas de nitrocelulosa después de transferencia electroforética mediante tinción con Concanavalina A (146). Las membranas se incubaron durante 1 h en tampón de bloqueo (TBS, polivinilpirrolidona 2% (w/v)), y a continuación con la lectina Concanavalina A (Con A) marcada con biotina (10 $\mu\text{g/ml}$, Pierce) durante 1 h en tampón de bloqueo. Tras lavar la membrana con PBS/Tritón X-100 0.1% (v/v), ésta se incubó con streptavidina-HRP (dilución 1:10.000) durante 1 h. La lectina unida se detectó midiendo la actividad peroxidasa sobre el sustrato 3'-diaminobencidina-HCl (DAB) 0.3 mg/ml en TBS, H_2O_2 0.05% (v/v).

Electroforesis bidimensional

Esta metodología se empleó para determinar el punto isoeléctrico (pI) experimental de las muestras de proteínas y para obtener una mayor separación de las proteínas presentes en los distintos extractos, ya que con esta técnica las proteínas se separan en función de dos parámetros, su peso molecular y su pI. En la primera dimensión las proteínas se separaron mediante isoelectroenfoque empleando un sistema Protean IEF (Bio-Rad). Las muestras se resuspendieron en el tampón de rehidratación suministrado por Bio-Rad (8 M urea, 2% CHAPS, 50 mM DTT, 0.2% Bio-Lyte™ 3/10 ampholyte, 0.001% azul de bromofenol) y se añadieron sobre los geles (7cm) con gradiente de pH preformado (pH 3-10 y pH 4-7) suministrados por Bio-Rad. El isoelectroenfoque se desarrolló utilizando el siguiente protocolo: 20 min a 250 V; 2 h a 4000 V; voltaje creciente lineal hasta 10000 V. Los geles en gradiente se calibraron utilizando la mezcla de proteínas contenidas en el kit IEF Standard con rango de pI 4.54-9.6 (Bio-Rad). La segunda dimensión se llevó a cabo tras equilibrado de los geles en gradientes en tampones de reequilibrado I (375 mM Tris-HCl, pH 8.8, 6 M urea, 2% SDS, 2% DTT) y II (375 mM Tris-HCl, pH 8.8, 6 M urea, 2% SDS) suministrados por Bio-Rad y finalmente en el tampón de desarrollo de electroforesis. Las proteínas se separaron en una segunda dimensión mediante SDS-PAGE según el protocolo descrito anteriormente y se

Materiales y Métodos

detectaron por tinción con azul de Coomassie R-250 o tras transferencia a membrana e inmunodetección con un anticuerpo policlonal específico o con sueros de pacientes.

Huella peptídica y secuenciación de aminoácidos *de novo*

La determinación de la masa de los péptidos resultantes de la digestión trípica de proteínas se realizó mediante la obtención de la huella peptídica en un espectrofotómetro de masas con fuente de ionización MALDI y analizador de tiempo de vuelo (TOF) modelo Voyager DE-SRT Biospectrometry Workstation de Bio-Rad.

Para la secuenciación *de novo* de algunos péptidos se empleó un espectrómetro de masas 4700 Proteomics Analyzer con TOF/TPFTM, con fuente de ionización tipo MALDI y dos analizadores tipo tiempo de vuelo en tándem y cámara de colisión (CID), para la fragmentación de iones, de Applied Biosystems.

Ambas técnicas se realizaron en la unidad de proteómica del Centro de Apoyo a la Investigación de la Universidad Complutense de Madrid.

Determinación de la masa molecular y de la secuencia amino-terminal

La determinación de la masa molecular de proteínas se llevó a cabo mediante espectrometría de masa MALDI-TOF. Las muestras se analizaron en un espectrómetro de masas de MALDI-TOF Autoflex III (Bruker) que permite determinar masas moleculares, la identificación de proteínas mediante su huella peptídica y la fragmentación de péptidos para conocer su secuencia.

La secuencia Nt de proteínas se determinó mediante degradación de Edman automática a partir de muestras de la proteína purificada.

Ambas técnicas se realizaron en la unidad de proteómica del Centro de Apoyo a la Investigación de la Universidad Complutense de Madrid.

Proteólisis limitada

Se realizó en bicarbonato amónico 0.1 M, pH 8.0 utilizando tripsina a una relación enzima/sustrato de 1/250 (p/p) y a 25 °C. La reacción se detuvo añadiendo tampón de

aplicación para PAGE-SDS y congelando en nitrógeno líquido hasta el análisis. Se tomaron alícuotas a tiempos de digestión comprendidos entre 0 y 5 h que fueron analizadas mediante PAGE-SDS, tinción con azul de Coomassie, inmunotinción con anticuerpos IgG y con sueros de pacientes.

Digestión en SGF (*simulated gastric fluid*)

Se realizó con pepsina 0.32% (w/v) en NaCl 30 mM, pH 1.2, siguiendo el protocolo descrito por (147). La pepsina se utilizó a una relación 1/16 (p/p). La reacción se detuvo añadiendo Na₂CO₃ hasta una concentración final 100 mM. Se tomaron alícuotas a tiempos comprendidos entre 0 y 3 h que fueron analizadas mediante PAGE-SDS, tinción con azul de Coomassie, inmunotinción con anticuerpos y con sueros de pacientes.

Determinación de parámetros moleculares y búsquedas de homologías

El cálculo teórico de la masa molecular y punto isoeléctrico de las proteínas se llevó a cabo a partir de su estructura primaria empleando el programa Protparam disponible en el servidor Expasy (<http://www.expasy.ch>).

La búsqueda de homología con proteínas contenidas en las bases de datos se llevó a cabo en los bancos de datos de SwissProt, Genbank y MBL. Los alineamientos de secuencias de aminoácidos se realizaron empleando el programa CLUSTALW. Estos programas se recogen en el servidor Expasy.

La predicción de estructura secundaria de las proteínas a partir de su secuencia de aminoácidos se llevó cabo mediante la aplicación de métodos estadísticos descritos por Jones (148).

La predicción de hidrofobicidad y de antigenicidad se realizó a partir de la secuencia de aminoácidos mediante la aplicación de los métodos diseñados por Kyte y Welling (149, 150), respectivamente.

Los modelados de estructuras tridimensionales de proteínas basándose en su homología con otras proteínas ya descritas se llevaron a cabo con el servidor Swiss model (151).

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DIAFORASA

Se conoce como actividad diaforasa a la oxidación de β -NADH o β -NADPH en presencia de aceptores artificiales de electrones como el 2, 6-diclorofenol-indofenol (generalmente denominado DCPIP), o el azul de metileno. El ensayo se realizó usando la siguiente mezcla de reacción: NADPH (0-100 μ M), DCPIP 95 μ M, que garantiza condiciones de saturación y ρ de 12 21.5 nM (152).

Como reacciones control se usaron:

- NADPH+DCPIP
- NADPH+BSA+DCPIP

La actividad diaforasa se detectó en el espectrofotómetro con el descenso de $A_{595\text{nm}}$ frente al tiempo. El coeficiente de extinción molar del DCPIP oxidado es $21 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$, mientras que la forma reducida no absorbe.

CARACTERIZACIÓN ESPECTROSCÓPICA DE PROTEÍNAS

Espectros de absorción ultravioleta y cálculo del coeficiente de extinción

La obtención del espectro ultravioleta de proteínas se realizó en cubetas de cuarzo de 0.1 ó 1 cm de paso óptico en un espectrofotómetro Beckman modelo DU-7. El coeficiente de extinción molar se estimó a partir de su composición de aminoácidos (153). Del coeficiente de extinción molar de la tirosina, triptófano y cistina a una longitud de onda dada, se puede calcular el coeficiente de extinción molar de una proteína usando la ecuación:

$$\epsilon_{280\text{nm}} = n^{\circ}(\text{Tyr}) * \epsilon(\text{Tyr}) + n^{\circ}(\text{Trp}) * \epsilon(\text{Trp}) + n^{\circ}(\text{Cistina}) * \epsilon(\text{Cistina})$$

Donde: $\epsilon(\text{Tyr}) = 1490$, $\epsilon(\text{Trp}) = 5500$, $\epsilon(\text{Cistina}) = 125$;

Espectros de dicroísmo circular (DC)

Los espectros se obtuvieron en un equipo Jasco J-175 equipado con una lámpara de xenón de 150 W y conectado a un baño Neslab RTE-111. Para los espectros en el UV lejano (250 -190 nm) se emplearon cubetas cilíndricas de cuarzo de 0.1 cm de paso óptico y una concentración de proteína inferior a 0.5 mg/ml en tampón bicarbonato amónico 20 mM, pH 8.0 a 10 °C. Los espectros en el UV próximo (250-320 nm) se registraron en cubetas de paso óptico de 0.4 cm a 10 °C y con una concentración de proteína de 0.5 mg/ml. Todos los espectros se corrigieron mediante la resta de la línea base correspondiente. Los valores de elipticidad a cada longitud de onda se expresaron como elipticidad molar por residuo de aminoácido en grados $\times \text{cm}^2 \times \text{dmol}^{-1}$. El peso molecular medio por aminoácido se obtuvo a partir de la composición de aminoácidos de cada proteína. La estructura secundaria de la proteína se estimó a partir de los ajustes proporcionados por los valores de elipticidad de Perczel (154).

Curvas de desnaturalización térmica

Con el fin de calcular la temperatura de desnaturalización (T_m) de una proteína se realiza la desnaturalización térmica. Para ello se registraron los cambios de elipticidad molar a 220 nm en un rango de temperaturas entre 10 °C y 80 °C, con un incremento de temperatura de 0.5 °C/min. Se utilizaron cubetas cilíndricas de paso óptico 0.1 cm y a una concentración de proteína de 0.2 mg/ml en tampón bicarbonato amónico 20 mM, pH 8.0.

Espectros de emisión de fluorescencia

Se utilizó espectrofluorímetro SLM Aminco 8000C (SLM instruments) equipado con un arco de xenón de 450 W. Se emplearon cubetas de 0.2 cm de paso óptico para la excitación y de 1 cm para la emisión. La anchura de rendija es de 4 nm. Los espectros de emisión para proteínas se registraron en un intervalo de longitudes de onda entre 300-450 nm tras excitación a 275 nm, y entre 280-450 nm tras excitación a 295 nm. La temperatura de la muestra se mantuvo a 10 °C mediante un baño Polystat (Haber). Las proteínas se usaron a una concentración de 0.1 mg/ml en bicarbonato amónico 20 mM, pH 8.0. La señal de emisión de fluorescencia de la muestra se dividió por la señal de

Materiales y Métodos

emisión del canal de referencia para corregir las variaciones debidas a fluctuaciones de la tensión eléctrica. Tras restar la línea base los espectros se corrigieron con el factor de respuesta instrumental del aparato. El espectro del triptófano se normalizó asumiendo que a partir de 380nm la emisión de tirosinas es despreciable.

CARACTERIZACIÓN INMUNOLÓGICA DE PROTEÍNAS

Sueros de pacientes alérgicos

Los sueros de pacientes alérgicos a melocotón y que presentaban polinosis fueron amablemente reclutados por el Dr. Jesús Fernández Crespo (Hospital Universitario Doce de Octubre. Servicio de Alergia).

Los sueros de pacientes alérgicos al polen de olivo fueron responsabilidad del Dr. Joaquín Quiralte (Unidad de Alergia del Hospital Ciudad de Jaén) y Cristina Pascual (Hospital infantil La Paz de Madrid). Se emplearon sueros de pacientes que cumplían los siguientes criterios: 1) rinitis y/o asma estacional durante los meses de abril a junio, 2) pruebas cutáneas positivas al extracto de *Olea europaea*, y 3) no haber sido sometidos a inmunoterapia frente al polen de olivo.

Los sueros de individuos alérgicos a fresno fueron suministrados por la Dra. Gabrielle Pauli (L'Hôspitaux Universitaires de Estrasburgo, Francia).

Los sueros de pacientes alérgicos a *Salsola kali*, procedían del Hospital Virgen de la Arrixaca, y fueron amablemente cedidos por el Dr. Javier García-Selles.

Anticuerpos policlonales y monoclonales

Los anticuerpos policlonales frente al péptido carboxilo terminal de Ole e 12 (Ct-Ole e 12), rOle e 12, rNtD-Ole e 9 y rOle e 11 fueron obtenidos por el Dr. Fernando Vivanco, en la Fundación Jiménez Díaz de Madrid. La obtención de los mismos se llevó a cabo mediante la inmunización de conejos especie neozelandés blanco con 100 µg de cada antígeno, junto con el adyuvante de Freund y un lisado de micobacterias potenciador del sistema inmune, en un total de 4 inmunizaciones realizadas con periodicidad semanal. El anticuerpo policlonal frente a Ole e 1 se preparó mediante inmunización de

un conejo de aproximadamente 6 semanas con 100 µg de la proteína junto con el adyuvante de Freund. El anticuerpo monoclonal frente Ole e 1 (OL3) se obtuvo según González y col (107).

El anticuerpo policlonal de cabra frente a IgG de conejo (GAR) y de ratón (GAM) conjugados con peroxidasa del rábano (HRP), fueron suministrados por Bio-Rad y Pierce, respectivamente. El mAb anti-IgE humana fue producido por los Drs. Florentino Polo y Óscar Duffort de los laboratorios ALK-Abelló (Madrid).

Enzimoinmunoensayo (ELISA) indirecto

Se tapizaron placas Costar de 96 pocillos y fondo plano con 100 µl por pocillo y por duplicado de una disolución 1 µg/ml de antígeno en PBS, pH 7.2 y se incubaron toda la noche a 4 °C. Transcurrido este tiempo las placas se lavaron cuatro veces con 200 µl de PBS/Tween-20 0.5% (v/v). Tras los lavados, los sitios de unión inespecíficos se bloquearon incubando las placas, durante 1 h a 37 °C, con 200 µl por pocillo de tampón de saturación (PBS/Tween-20 0.1% / leche en polvo 3% (p/v)). A continuación las placas se incubaron 2 h con los sueros de pacientes o 1 h a 37 °C con el anticuerpo policlonal, diluidos en tampón de saturación. Tras repetir los lavados con PBS/Tween-20 0.5% (v/v), las placas se incubaron durante 1 h con 100 µl por pocillo de un anticuerpo secundario monoclonal αIgE humana obtenido en ratón (dilución 1/5000) para el caso de sueros de pacientes alérgicos o con un anticuerpo GAR-HRP (dilución 1/2500) para el caso de anticuerpos policlonales. Para los sueros de pacientes se realizó una última incubación con GAM-HRP (dilución 1:3.000) durante 1 h. Tras repetir los lavados se procedió al revelado de las placas con el cromógeno o-fenilendiamina (Merck) 0.6 mg/ml en citrato sódico 0.1 M, pH 5.0, metanol 4% (v/v) y H₂O₂ 0.003% (v/v). La reacción se detuvo con 100 µl por pocillo de ácido sulfúrico 3 N, midiéndose la densidad óptica de cada pocillo a 492 nm en un lector de ELISA Expert 96 (AYS Hitech).

Inmunodetección de proteínas transferidas a membrana de nitrocelulosa

Después de la transferencia electroforética, la membrana de nitrocelulosa se incubó durante 10 min en PBS. A continuación se bloqueó, mediante incubación de 1 h con

Materiales y Métodos

tampón de saturación (PBS/Tween-20 0.1%/leche en polvo 3%). Seguidamente, la membrana se incubó durante 2 h a temperatura ambiente con los sueros de pacientes alérgicos (dilución 1/10) ó 1 h con anticuerpos policlonales, diluidos en tampón de saturación. Tras realizar 3 lavados de 10 min con PBS/Tween-20 0.1%, se llevó a cabo una incubación de 1 h a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario correspondiente, mAb secundario anti-IgE humana obtenido en ratón (dilución 1/5000) para el caso de sueros de pacientes alérgicos o anticuerpo GAR (dilución 1/2500) para el caso de pAb, diluidos en tampón de saturación. En el caso de la detección de IgE, se realizó una incubación adicional con GAM (dilución 1/5000) en tampón de saturación diluido a la mitad. Tras repetir los lavados se analizó la actividad peroxidasa mediante el sistema de detección ECL (Amersham) según las instrucciones del fabricante.

En el caso de los ensayos de inhibición mediante inmunodetección, los sueros o anticuerpos específicos se preincubaron durante 2 h a temperatura ambiente con distintas cantidades de los extractos proteicos o de las proteínas puras. Transcurrido ese tiempo se incubó la membrana con esa mezcla durante 2 h y se continuó el protocolo tal y como se ha indicado para la inmunodetección de proteínas.

Inmunolocalización de Ole e 12 mediante microscopía electrónica de transmisión

Medios de germinación *in vitro* del polen de angiospermas (155), ácido bórico al 0.03 % (p/v), nitrato potásico al 0.01 % (p/v), nitrato cálcico al 0.03 % (p/v), sacarosa al 10 % (p/v) y penicilina/estreptomicina/anfotericina B (100 U/ml, 100 µg/ml, 0.025 mg/ml, Lonza). El medio se esterilizó mediante filtración por 0.22 µm.

La inmunolocalización de Ole e 12 en los granos de polen de olivo germinados *in vitro* durante 8 h se realizó según el protocolo descrito por Alché (155). Tras centrifugar el medio de germinación a 5.000 g durante 10 min, los granos germinados se fijaron durante 16 h a 4 °C con paraformaldehído al 4% (p/v) y glutaraldehído al 0.2% (v/v), en tampón cacodilato sódico 0.2 M, pH 7.2. Las muestras se deshidrataron mediante inmersión en una serie de soluciones de etanol de graduación creciente, se transfirieron gradualmente a óxido de propileno y se infiltraron en resina Unicyl (BB International). Las secciones ultrafinas (80 nm) se obtuvieron en un ultramicrotomo Reichert-Jung y se

transfirieron a rejillas de níquel-carbono (nickel-formwar/carbon-coated grids 300 mesh, Fedelco). Los sitios de unión inespecífica se bloquearon mediante incubación de las secciones en PBS-BSA al 5% (p/v) durante 15 min. Seguidamente, las muestras se incubaron con el pAb CtOle e 12 (1/50) durante 2.5 h. Después de varios lavados con PBS, las rejillas se incubaron durante 2 h con el anticuerpo secundario anti-IgG de conejo conjugado con oro coloidal de 30 nm (1/100, BB International). Tras 2 lavados con PBS y con agua destilada, las muestras se contrastaron con acetato de uranilo al 5% (p/v) durante 10 min. Las muestras se procesaron por duplicado y en los controles negativos se omitió el anticuerpo primario. Todas las incubaciones se realizaron a temperatura ambiente. Las muestras se observaron en un microscopio electrónico de transmisión JEOL 1011 (JEOL), empleando un voltaje de trabajo de 80 kV.

Estos ensayos se realizaron en el laboratorio del Dr. Juan de Dios Alché del Departamento de Bioquímica, Biología Celular y Molecular de Plantas de la Estación Experimental de Zaidín (CSIC, Granada).

TÉCNICAS DE MANIPULACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

Cepa de *E. coli* TOP10: F- mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) ϕ 80lacZ Δ M15 Δ lacX74 nupG recA1 araD139 Δ (ara-leu)7697 galE15 galK16 rpsL(Str^R) endA1 λ ⁻

Vectores plasmídicos

pCR2.1: Se utilizó para clonar los fragmentos de DNA obtenidos por PCR siguiendo el protocolo del kit *TOPO TA Cloning* (Invitrogen). El plásmido de 3.9 kb contiene un gen de resistencia a ampicilina, está linealizado y contiene residuos de timidina protuberantes en el extremo 5'. De esta forma se facilita la inserción de fragmentos amplificados por PCR que presentan una adenosina protuberante en 3'.

Medios de cultivo

Los medios utilizados a continuación se utilizaron para el cultivo de células de *E. coli*, tras esterilización por autoclavado durante 20 min a 120 °C.

Materiales y Métodos

El medio LB (156) se empleó para el crecimiento en medio líquido de las colonias seleccionadas y posterior purificación del DNA plasmídico. Contiene bacto triptona 1% (p/v), extracto de levadura 0.5% (p/v) y NaCl 1% (p/v). Para el crecimiento de las células en placa se añadió al LB agar 15 g/l. La selección y crecimiento de transformantes de *E. coli* se realizó añadiendo a los medios ampicilina 50 µg/ml.

El medio SOC se empleó para el crecimiento de las células durante el proceso de transformación. Contiene triptona 2.0% (p/v), extracto de levadura 0.5% (p/v), NaCl 10 mM, KCl 2.5 mM, MgCl₂ 10 mM, MgSO₄ 10 mM y glucosa 20 mM.

Aislamiento de RNA

Un gramo de polen se homogeneizó en una solución desnaturante compuesta por isotiocianato de guanidinio 4 M, citrato sódico 2 M, pH 7.0, lauril sarcosinato 0.5% (p/v) y 2-mercaptoetanol 0.1% (v/v) utilizando un homogenizador Polytron (Brinkmann Instruments). A continuación, la mezcla se centrifugó a 4500 rpm a 20 °C durante 30 min. El sobrenadante se volvió a centrifugar a 6000 rpm durante 10 min. Este sobrenadante, en alícuotas de 1.5 ml, se depositó sobre 3.1 ml de CsCl 5.7 M en EDTA 10 mM y se centrifugó a 40000 rpm durante 12 h a 22 °C, con un rotor flotante SW65 (Beckman) (156). El sedimento se lavó dos veces con etanol al 70%, para eliminar el CsCl y facilitar su resuspensión. La muestra se disolvió en 100 µl de Tris-EDTA (TE) con SDS al 0.1%. Para llevar a cabo la precipitación con etanol se completó el volumen a 200 µl de TE y se continuó con la precipitación según los métodos descritos por Sambrook (156). El RNA se disolvió en 100 µl de agua estéril previamente tratada con dietilpirocarbonato (DEPC). La concentración de RNA se estimó midiendo la absorción a 260 nm en un espectrofotómetro. La integridad del RNA se comprobó mediante geles de agarosa en condiciones desnaturizantes.

Electroforesis de RNA en condiciones desnaturizantes

La electroforesis para el fraccionamiento de la preparación de RNA se llevó a cabo en geles de agarosa al 1% (p/v) en presencia de formaldehído al 6% (v/v). El tampón de desarrollo contenía MOPS 20 mM (ácido (N-morpholino) propanesulfónico), acetato sódico 5 mM, pH 7.0, EDTA 1 mM. Las muestras de RNA se aplicaron disueltas en

tampón de desarrollo con formamida al 45% (v/v), formaldehído al 16% (p/v), glicerol al 5% (v/v), azul de Bromofenol al 0.02% (p/v) y bromuro de etidio 0.1 mg/ml. El RNA se visualizó por iluminación con luz ultravioleta a 312 nm (157).

Síntesis de cDNA

El cDNA se sintetizó a partir de 1 µg de RNA total mediante el kit SMART™ RACE cDNA (Clontech), siguiendo las indicaciones del fabricante. Este kit permite sintetizar cDNA de doble hebra a partir de RNA total usando los cebadores 5'-CDS y SMART-II o al cebador 3'-CDS y la enzima transcriptasa inversa MMLV contenida en el kit. La selección de uno u otro cebador depende del extremo del gen cuya amplificación se quiera dirigir y posteriormente clonar, 3' o 5' respectivamente, Figura 7.

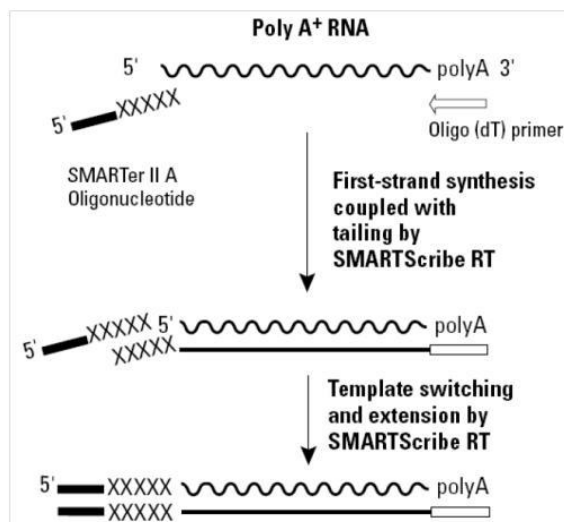


Figura 7: Esquema para la síntesis de cDNA mediante el kit SMART™ RACE cDNA

Amplificación de cDNA mediante PCR

Todas las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un termociclador Mastercycler (Eppendorf). Para la amplificación de la secuencia completa de cada alérgeno fueron necesarias varias etapas de PCR. En todas ellas se utilizó como molde el cDNA total obtenido de polen de olivo, fresno, chenopodio y salsola. Todos los oligonucleótidos utilizados están representados en la Tabla 5.

Materiales y Métodos

Tabla 5: Oligonucleotidos utilizados para la clonación de los alérgenos en las distintas fuentes polínicas

Cebador	Secuencia de nucleótidos	Secuencia de aminoácidos
IFRA 1	5' RTCNACRTCRTTNCRAAYTC 3' (antisense)	EFGNDVD
IFRS1	5' GARTTYGGNAAYGAYGTNGAY 3' (sense)	EFGNDVD
Lur2	5' NGTYTTNCCDATYTTYTYTC 3' (antisense)	EKKIGKT
IFRS2	5' ATCCTCTACATCAAGCCTCCC 3' (sense)	ILYIKPP
IFRA5	5' TACAAAGGTGTAAGGAATTCCTTC 3' (antisense)	GIPTYTFV
NtO1	5' atacatATGGCTGACAAAACCAAGATTTTG 3' (sense)	MADKTKIL
CtO1	5' aTaggatcctcgagTTAAACAAATTGATCAAGGTAAGGACTC 3' (antisense)	EYLDQFV
NtF1	5' atactaATGGCTGAGAAAACCAAGATTTTG 3' (sense)	MAEKTIL
CtF1	5' aTaggatcctcgagTTAAACAAATTGATTAAGGGACTC 3' (antisense)	ESLNQFVstop
Sal 1	5' -GTNTAYTGYGAYACNTGYCG-3' (sense)	VYCDTCR
Sal 2	5' -RTCRCYTCRTGRTCNCRTC-3' (antisense)	DGDHEDD
Sal 3	5' -ACCCTCCATCATGGTGCTAAC-3' (antisense)	VSTMMEGA
Sal 4	5' -ATGTACACCATCAAAGTCGACGG-3' (sense)	MYTIKVDG
Sal 5	5' -ccg ctcgag aaaagaAARGGNAAYGGNGNCAYAYCT-3' (sense)	KGNGGHNL
Sal 6	5' -ct gcggccgc TCARTTYTGNGTNACRCTNCCNGG-3' (antisense)	PGSVTQN
UPM	5' CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTAACAACGCAGAGT 3'	

R: A/G, D: G/A/T, N: A/C/G/T, Y: C/T

Las enzimas utilizadas para la amplificación de DNA fueron:

- *AdvanTage 2* Polymerase (Clontech), que posee actividad 3'→5' exonucleasa, que permite la corrección de errores durante la amplificación. Esta se utilizó en reacciones de PCR destinadas a obtener la secuencia de cDNA.
- *AmpliQ gold DNA polymerase* (Applied Biosystems), utilizada para PCR de colonias.

Electroforesis de DNA en geles de agarosa

El análisis de plásmidos y fragmentos de DNA se llevó a cabo mediante electroforesis en geles de agarosa a distintos porcentajes dependiendo del tamaño de los DNAs (0.7-1.5 %), en tampón TAE (Tris-Acetato 40 mM pH 8.0, EDTA 2 mM), de acuerdo con el procedimiento descrito por Sambrook (156). Para las electroforesis preparativas se utilizaron geles de agarosa de bajo punto de fusión al 1.5% y el desarrollo de esta

electroforesis se realizó a 4 °C. El DNA se visualizó por tinción con bromuro de etidio e iluminación con luz ultravioleta a 312 nm.

Aislamiento de fragmentos de DNA

La purificación de los fragmentos de DNA se llevó a cabo a partir de las bandas obtenidas en geles de agarosa de bajo punto de fusión, utilizando las soluciones suministradas en el kit “Wizard PCR Preps” (Promega) y siguiendo las instrucciones del fabricante.

Clonación de los fragmentos amplificados en el plásmido pCR2.1

Los productos de PCR amplificados con la TaqGold polimerasa presentan por lo general en sus extremos 3' un nucleótido extra de desoxiadenosina que dicha enzima añade siempre al final de la amplificación. Aprovechando los extremos complementarios del vector y del inserto se puede llevar a cabo la ligación siguiendo los pasos del fabricante. Se emplearon 4 fmoles de plásmido con una relación vector/inserto de 1/7. La reacción se incubó a temperatura ambiente durante 10 min y con esta construcción se llevó a cabo la transformación de las células TOP10. Para seleccionar los transformantes se aprovechó la resistencia a ampicilina.

Transformación de células competentes

Células TOP10 en estado competente, incluidas en el kit “TOPO TA cloning” fueron transformadas con el DNA plásmidico obtenido tras la ligación. La mezcla se sometió a un choque térmico de 42 °C durante 30 seg. A continuación las células se crecieron durante 1 h a 37 °C en medio de cultivo SOC y se sembraron en placas de LB-Agar con ampicilina (50 µg/ml). La selección de las colonias transformadas se realizó de dos formas distintas:

- Minis de colonias. Son preparaciones a pequeña escala de plásmidos a partir de colonias transformadas. Tras lisar las células con un tampón que contiene Tris 10 mM pH 7.5, EDTA 10 mM pH 8.0, NaOH 100 mM y SDS 1% se separó el DNA cromosómico del plasmídico mediante precipitación con SDS a -80 °C y posterior centrifugación. Tras aplicar una muestra del sobrenadante conteniendo el DNA

Materiales y Métodos

plasmídico, y empleando como control el vector pCR2.1 sin inserto, se comprueba si se trata de plásmido recombinante.

- PCR de colonias. Consiste en realizar una amplificación por PCR a partir de las células previamente lisadas utilizando para ello los oligonucleótidos específicos.

Aislamiento y secuenciación del DNA plásmidico

Para el aislamiento de pequeñas cantidades de DNA plasmídico (20 µg) a partir de cultivos bacterianos, se usó el kit “GenEluted™ Plasmid Miniprep kit” de Sigma. La secuenciación del DNA de los plásmidos recombinantes seleccionados se llevó a cabo basándose en el método de terminación de cadena por dideoxirribonucleótidos (158). Ésta se realizó de forma automática en el servicio de secuenciación de la Universidad Complutense de Madrid, utilizando un equipo ABI Prism 3730 (Applied Biosystems).

PRODUCCIÓN Y AISLAMIENTO DE ALÉRGENOS RECOMBINANTES

Bacterias

DH5α: *endA1 hsdR17 (r_k⁻ m_k⁺) supE44 thi-1 recA1 gyrA (Nal^R) relA1 Δ (lacZYA- argF) U169 deoR [Φ80 *dlac* Δ (*lacZ*)M15]*

BL21(DE3) de *E. coli*: F- *ompT r_B⁻, m_B⁻* (DE3) *hsdS gal 1clts857, ind1Sam7nin5lacUV5-T7 gene 1*.

Levaduras

Se ha utilizado la cepa de *P. pastoris* KM71: *aox1Δ::SARG4 his4 arg4*. El gen AOX1 presenta en esta cepa una delección y ha sido reemplazado con el gen *arg4* de *S. cerevisiae*. Esta cepa presenta una mutación en el gen de la histidinol deshidrogenasa *his4*, enzima implicada en la biosíntesis de la histidina. Esta alteración permite transformarla con plásmidos que contengan una copia correcta de *his4*, seleccionándose los transformantes en medio mínimo carente de histidina.

Medios de cultivo

Además de LB, anteriormente descrito se utilizó el medio Ψ Broth. Este último se empleó para la obtención de células competentes de *E. coli* y para su crecimiento. Contiene bacto triptona 2% (p/v), extracto de levadura 0.5% (p/v), $MgSO_4$ 0.4% (p/v) y KCl 10 mM.

LB de baja fuerza iónica (bajo en sales): utilizado para el crecimiento de células transformantes de *E. coli* con resistencia a ampicilina. Contiene: bacto triptona 1% (p/v), extracto de levadura 0.5% (p/v) y NaCl 0.5% (p/v). Para el crecimiento de células en medio sólido se añadió agar 15 g/l. La selección de células transformantes se añadió al medio zeocina (25 μ g/ml).

YPD: extracto de levadura 10 g/l, peptona 20 g/l, D-glucosa 20 g/l, agar 15 g/l (medio sólido).

YPDS: extracto de levadura 10 g/l, peptona 20 g/l, D-glucosa 20 g/l, sorbitol 182.2 g/l, agar 15 g/l (medio sólido).

BMGY: extracto de levadura 10 g/l, peptona 20 g/l, glicerol 10 ml/l, base de nitrógeno para levaduras sin aminoácidos 13.4 g/l, biotina 400 μ g/l y fosfato potásico 0.1 M, pH 6.0.

BMMY: extracto de levadura 10 g/l, peptona 20 g/l, metanol 5 ml/l, base de nitrógeno para levaduras sin aminoácidos 13.4 g/l, biotina 400 μ g/l y fosfato potásico 0.1M, pH 6.0.

Vectores plasmídicos

pET16b: Para la expresión en sistema eucariota del cDNA se utilizó este vector (Novagen) de 5711 pb, Figura 8, que contiene una secuencia His *Tag* en el N terminal seguido de un sitio de corte para el factor Xa y un gen de resistencia a ampicilina para la selección de células transformantes.

Materiales y Métodos

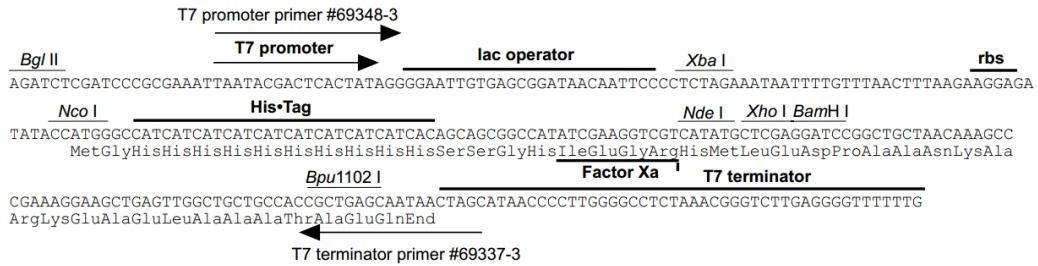


Figura 8: Secuencia de clonación del vector de expresión pET16b

pPICZ α A: plásmido de 3.6 kb que contiene un gen de resistencia al antibiótico zeocina para la selección de las células transformantes. Presenta además la región promotora y la terminación de la transcripción del gen AOX1, entre las cuales se encuentra el sitio de clonaje múltiple, lo que permite clonar el gen de interés bajo el control de dicho promotor. A continuación del promotor se encuentra la señal de secreción del factor α de *S. cerevisiae* que permitirá dirigir la proteína recombinante hacia el medio extracelular.

Construcción del vector de expresión pET16b

Una vez determinada la secuencia de nucleótidos que codifica para los alérgenos Ole e 12 y Fra e 12, se seleccionó un clon específico de cada uno de ellos y se subclonó en los sitios *NdeI/XhoI* del plásmido de expresión pET-16b (Novagen), que contiene una secuencia de histidinas en el N terminal y portador de un gen de resistencia a ampicilina. La ligación de fragmentos de DNA en el vector de expresión se realizó utilizando la enzima DNA ligasa del bacteriófago T4 (Gibco). La mezcla de reacción se completó con el tampón de la ligasa y se incubó a 15 °C durante 16 h.

Construcción del vector de expresión pPICZ α A

Una vez determinada la secuencia de nucleótidos que codifica para el alérgeno Sal k 5, se seleccionó un clon específico y se subclonó en los sitios *XhoI/NotI* del plásmido de expresión pPICZ α A. La ligación de fragmentos de DNA se realizó como en el caso anterior.

Digestión de DNA con enzimas de restricción

Las enzimas de restricción *NdeI/XhoI/NotI* fueron suministradas por Fermentas. Las digestiones de plásmidos y fragmentos se llevaron a cabo utilizando el tampón correspondiente, e inactivadas en un tratamiento de 10 min a 65 °C.

Transformación de células competentes

Para la preparación de células competentes DH5 α se siguió el método de (159) con una modificación que implica el empleo de cloruro de rubidio. Las células competentes fueron transformadas con la mezcla de ligación (50 ng). Para ello se incubó la mezcla de ligación en hielo 15 min, a continuación se facilitó la entrada del DNA mediante choque térmico por incubación a 37 °C durante 4 min y enfriamiento posterior en hielo durante 2 min. Se añadieron 4 volúmenes de Ψ Broth y se mantuvo en agitación suave a 37 °C durante 1 h. Las células se plaquearon en placa LB/Ampicilina 50 μ g/ml.

Producción y purificación de los alérgenos recombinantes: Ole e 12 Y

Fra e 12

La producción de proteínas solubles se llevó a cabo después de transformar células competentes BL21(DE3) con el plásmido correspondiente (pET-OL12, pET-FRA12). Las células de *E. coli* transformadas con la correspondiente construcción se incubaron a 37 °C en medio LB en constante agitación (240 rpm) hasta que los cultivos alcanzaron fase estacionaria (8-12 h). A continuación se diluyeron diez veces en LB y se volvieron a incubar a 25 °C hasta que la densidad óptica a 600 nm alcanzó un valor de 1.0. Seguidamente se añadió isopropiltiogalactósido (IPTG) (Sigma) a una concentración final 0.4 mM y se prosiguió la incubación a 25 °C. Se recogieron muestras a distintos tiempos para seleccionar el tiempo óptimo de expresión teniendo en cuenta no sólo la cantidad de proteína obtenida, sino también los posibles productos de degradación que aparecen a tiempos largos. El tiempo óptimo de expresión resultó ser 8 h a partir de la inducción con IPTG.

Los cultivos se centrifugaron a 4000 g durante 20 min a 4 °C, decantando el sobrenadante. El sedimento de células se resuspendió en bicarbonato amónico 20 mM,

Material y Métodos

pH 8.0, PMSF 1 mM, en un volumen igual a 1/10 parte del volumen inicial del cultivo. Las células fueron lisadas mediante dos ciclos de congelación en nitrógeno líquido y descongelación a 42 °C. A continuación el lisado celular se centrifugó a 10000 g durante 20 min a 4 °C y la fracción soluble, que contenía la mayor parte de la proteína recombinante se dializó frente a Tris 50 mM, pH 7.4. Antes de la purificación de la proteína, se somete a un tratamiento con yodoacetamida (20 mM de Iodoacetamida por cada 5 mg de proteína) 1 h en oscuridad a T ambiente con agitación suave. La purificación se llevó a cabo en el sistema FPLC (HisTrap FF crude en el Äkta purifier, Amersham Bioscience) equilibrado con Tris 100 mM pH 7.4, NaCl 0.5 M, Imidazol 20 mM y eluyendo con Tris 100 mM pH 7.4, NaCl 0.5 M, Imidazol 500 mM. Se recogieron fracciones de 2 ml y una vez determinadas aquellas que contenían el alérgeno rOle e 12 se juntaron y se dializaron frente a 500 mM Tris pH 8.0, 1 ml NaCl, 50 mM CaCl₂, en el caso de continuar con la digestión del *Tag* de Histidinas, o en BA 50 mM pH 8.0. El proceso se desarrolló a 4 °C, durante 24 h, realizándose durante ese tiempo varios cambios.

Digestión del *Tag* de histidinas de rOle e 12

La digestión del *Tag* de Histidinas se realizó con la serín-endopeptidasa Factor Xa (Novagen) en relación 1 U / 50 µg de proteína durante 11 h a 21 °C. La enzima se elimina del medio mediante una reacción de afinidad con Xarrest™ Agarose, también incluida en el *Factor Xa* Cleavage Capture Kit siguiendo las instrucciones del fabricante. Recromatografiando la muestra mediante el sistema FPLC (HisTrap FF crude) se separa la proteína digerida del fragmento con el *Tag* de Histidinas.

Producción y purificación del alérgeno recombinante: rSal k 5

Las células de *P. pastoris* se transformaron por electroporación con la construcción pPICZαA/Sal k 5 previamente linealizada con la enzima de restricción *Bst*XI. La transformación por electroporación facilita la obtención de transformantes multicopia.

Para llevar a cabo su transformación, se incubaron en hielo durante 5 min las células junto con 10 µg del plásmido recombinante en una cubeta de electroporación. A continuación las células se sometieron a un pulso eléctrico (25 µF, 200 ohmios, 2000 V)

utilizando un electroporador Gene Pulser (BioRad). Inmediatamente se añadió sobre la suspensión celular 1 ml de sorbitol 1 M frío y se mantuvieron en hielo durante 12 h. Transcurrido ese tiempo se añadió 1 ml de YPD y se continuó la incubación durante 24 h a 30 °C. Por último, las células se sembraron en placas YPDS/zeocina y se incubaron a 30 °C durante 24 días hasta la aparición de colonias. Para seleccionar los transformantes multicopia se sembraron en paralelo placas con diferentes concentraciones de zeocina (100, 750 y 1500 µg/ml).

Para producir rSal k 5 las células transformantes se crecieron en un incubador durante 48 h a 30 °C y 250 rpm en 50 ml de medio de crecimiento /BMGY). A continuación las células se recogieron por centrifugación 4000 g durante 10 min. Los sedimentos celulares se resuspendieron en 10 ml de medio de inducción (BMMY) y se incubaron en erlenmeyer de 100 ml tapado con dos capas de gasa Miracloth, para favorecer su aireación. Este cultivo se continuó durante 72 h a 30°C. El medio extracelular de los cultivos se separó por centrifugación a 4000 g, 20 min y se analizó por PAGE-SDS.

El medio extracelular dializado frente a bicarbonato amónico 20 mM, pH 8.0 durante 16-18 h, a 4 °C, se fraccionó en DEAE-celulosa con un gradiente de bicarbonato amónico (0.02 - 0.5 M). Las fracciones que contenían la proteína se liofilizaron y se cromatografiaron en una columna de pentrabilidad Sephacryl S-100 con bicarbonato amónico 0.2 M pH 8.0. Finalmente las fracciones de rSal k 5 se aplicaron en una columna Nucleosil C18 para HPLC en fase reversa con un gradiente (0-60%) en ácido trifluoroacético al 0.1% (v/v).

UN NUEVO ALÉRGENO DEL POLEN DE OLIVO: OLE E 12

DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN

Para realizar este estudio se han utilizado los sueros de una población de pacientes que habían acudido a consulta con síntomas alérgicos al consumir melocotón y que además presentaban sensibilización a distintos pólenes, entre ellos al de olivo. Tras hacer una inmunodetección de las proteínas reconocidas por las IgEs de los sueros de cada uno estos pacientes sobre un extracto de polen de olivo (Figura 9), se observaron diferencias con respecto al alergograma típico que los pacientes alérgicos al polen de olivo tienen cuando se han sensibilizado de forma primaria a este polen (Figura 4).

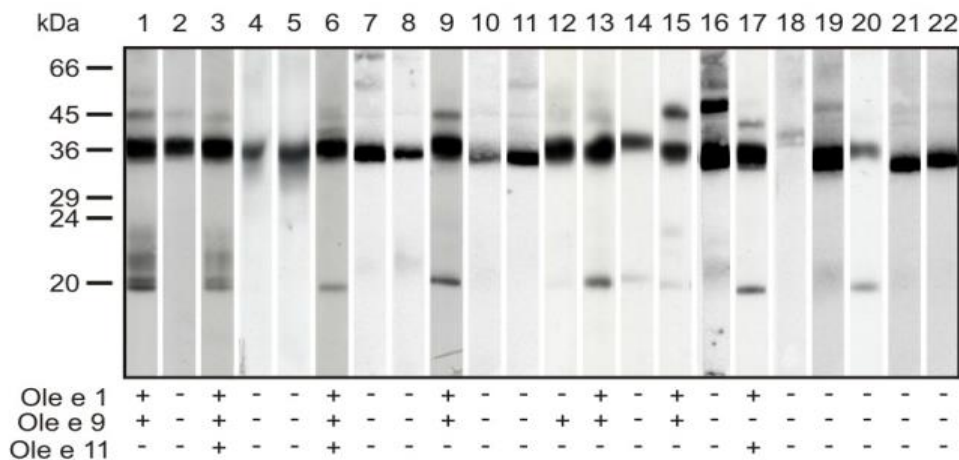


Figura 9: Alergograma del polen de olivo obtenido con sueros de pacientes alérgicos a melocotón y que presentaban polinosis a olivo. En la parte inferior de la figura se presentan con (+) aquellos alérgenos que son reconocidos por las IgE de esos sueros individuales testados mediante ELISA.

Para poder emplear estos sueros como herramientas de identificación de nuevos alérgenos del polen de olivo, se llevó a cabo una primera selección en la cual se descartaron aquellos que reconocían alérgenos de alta masa molecular ya identificados y que pudieran, por tanto, enmascarar la identificación de los nuevos en dicho extracto. Para ello se realizó un ELISA indirecto de los sueros, parte inferior de la Figura 9, empleando como antígenos Ole e 9 y Ole e 11, alérgenos de alta masa molecular, y Ole e 1, alérgeno de 20 kDa pero que presenta además una conformación dimérica a la que corresponde una masa molecular de 40 kDa. Aquellos sueros negativos en ELISA a Ole e

Resultados Familia Isoflavona Reductasa

9, Ole e 11 y Ole e 1, y que reconocían bandas de entre 35 y 40 kDa, fueron utilizados para la detección y seguimiento de los nuevos alérgenos.

La purificación de una proteína minoritaria, enmascarada con otras mayoritarias, mediante métodos cromatográficos estándares, sin tener conocimiento de algunas propiedades o características moleculares de esa proteína, es difícil. Por tanto, el primer objetivo de este trabajo fue obtener datos sobre su secuencia primaria y emplear dicha información, al menos desde un punto de vista teórico, para poder diseñar el método apropiado para su purificación. Un problema adicional es el carácter polimórfico de las cadenas polipeptídicas de muchas de las proteínas alergénicas, lo que origina variaciones en los puntos isoeléctricos, como ocurre en el caso de Ole e 11, una pectin metilesterasa del polen de olivo (37) o, cuando se trata de glicoalérgenos, la heterogeneidad de su componente oligosacárido, lo que da lugar a diferencias en su peso molecular, como ocurre en el caso de Ole e 1 (38).

Con el fin de resolver mejor el patrón alergénico de esta zona del alergograma, se realizó la separación de las proteínas del extracto de olivo con geles bidimensionales que, o bien se tiñeron con azul de Coomassie o nitrato de plata, o se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. Las proteínas transferidas se sometieron a distintas inmunodetecciones:

- con los sueros de pacientes alérgicos de la población objeto de estudio, negativos a las proteínas de alto peso molecular, anteriormente mencionados,
- y con los antisueros policlonales obtenidos frente a Ole e 1, Ole e 9 y Ole e 11 (Figura 10).

Tras la inmunotinción con dichos sueros se han identificado manchas proteicas capaces de unir IgE, que poseen distintas coordenadas, kDa/pI, del resto de alérgenos de parecida masa molecular, Ole e 1, Ole e 9 y Ole e 11. Aparentemente una serie de seis manchas, Figura 10B, parecen indicar la presencia de varios alérgenos distintos o de una serie de isoformas de un único alérgeno, en ambos casos distintos a los ya identificados.

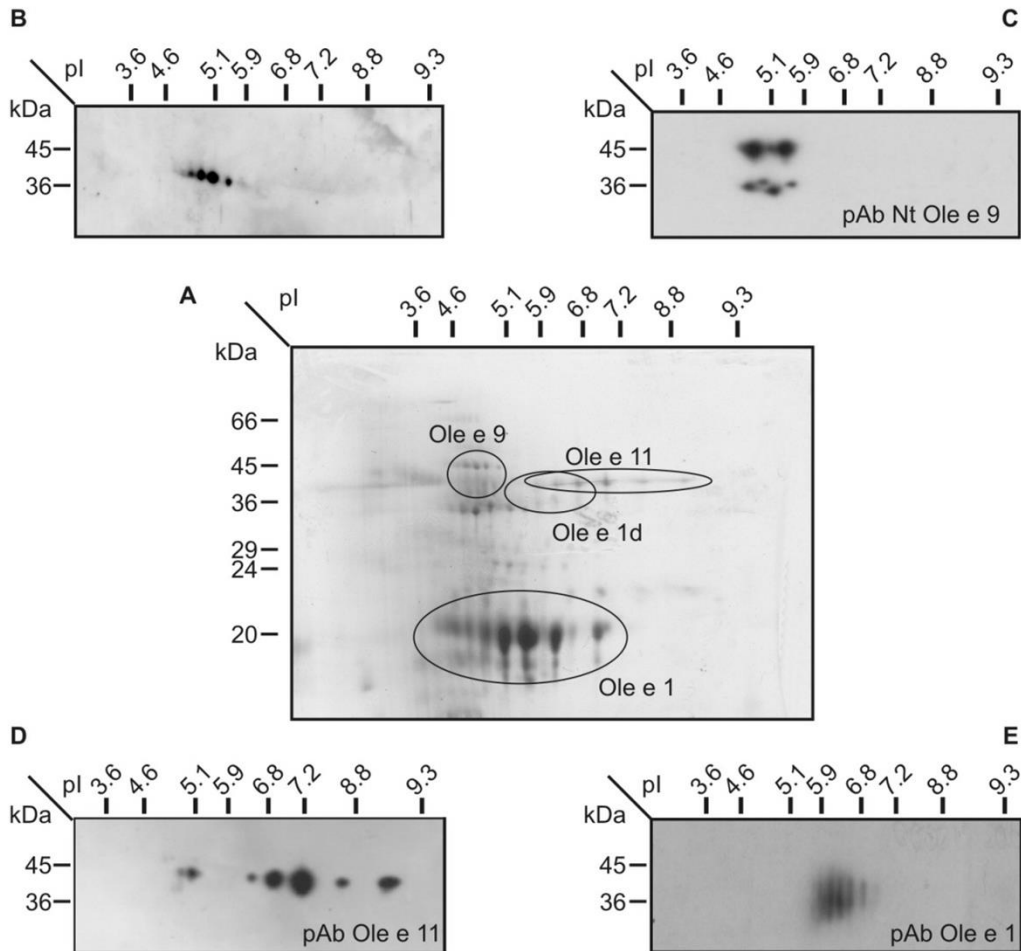


Figura 10: Electroforesis bidimensional del polen de olivo. A, Tinción con azul de Coomassie; B, Inmunodetección con un suero de un paciente alérgico a melocotón; C, Inmunodetección con antisuero anti-NtD-Ole e 9; D, Inmunodetección con antisuero anti-Ole e 11; E, Inmunodetección con antisuero anti-Ole e 1

El siguiente paso fue identificar la identidad bioquímica de las bandas reactivas. Para ello se obtuvieron péptidos de la proteína separada por electroforesis bidimensional, se secuenciaron y se obtuvieron las secuencias aminoacídicas que permitieron diseñar oligonucleótidos que sirvieran de cebadores al clonaje de su DNA codificante. Para ello se extrajo del gel bidimensional el fragmento que contenía la proteína y mediante MS y MS/MS se realizó la huella peptídica de la proteína y la secuenciación *de novo* de algunos de sus péptidos obteniéndose la secuencia de siete péptidos internos (Figura 11).

El alineamiento de las secuencias de los péptidos obtenidos con las proteínas registradas en la base de datos Genbank/EMBL reveló homología con proteínas pertenecientes a la familia de enzimas reductasas (Figura 12).

De estos resultados se concluye que la nueva proteína capaz de unir IgE de sueros de pacientes alérgicos a melocotón en el polen de olivo, pertenece a la familia de las isoflavonas reductasas. Tiene una masa molecular aparente de 35 kDa y un pI que oscila entre 4.6 y 5.9 (Figura 10). La proteína presenta homología con isoflavonas reductasas presentes en otras especies, tanto Oleáceas, como en *Forsythia intermedia* (101), así como en otros pólenes y frutas, entre ellas Bet v 6 (BETVE), del polen de abedul (102) o la proteína tipo isoflavona reductasa 6 (VITVI) de uva (160), ambas ya descritas como alergénicas.

La nueva proteína alergénica se denominó Ole e 12, de acuerdo a las normas del comité de nomenclatura de la IUIS (10).

CLONAJE Y SECUENCIACIÓN DEL CDNA CODIFICANTE DE OLE E 12

Las secuencias obtenidas de los péptidos analizados por espectrometría de masas permitieron diseñar oligonucleótidos para amplificar el cDNA codificante y así secuenciar la proteína tras su inserción en un vector de clonación. Al ser una proteína de un tamaño relativamente grande, la estrategia conllevó una serie de reacciones de PCR en las que se obtuvieron fragmentos correspondientes a secuencias parciales que permitieron diseñar a su vez nuevos cebadores para la amplificación de la secuencia completa. La Figura 13 muestra la estrategia seguida para el clonaje y la secuenciación de este cDNA que codifica para el alérgeno Ole e 12. La Tabla 5, incluida en la sección de Materiales y Métodos muestra las secuencias de los oligonucleótidos sintetizados y las de los aminoácidos correspondientes.

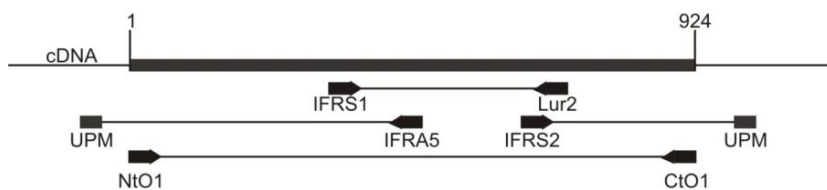


Figura 13: Estrategia de clonaje para Ole e 12. La nomenclatura y la secuencia usada para los oligonucleótidos está reflejada en la Tabla 5.

Resultados Familia Isoflavona Reductasa

En las distintas etapas de PCR se utilizó como molde el cDNA sintetizado a partir de RNA total aislado de polen de olivo. Los fragmentos de DNA obtenidos en cada etapa de PCR se clonaron en el vector pCR2.1 y se secuenciaron. Los dos primeros IFRS1 y Lur2, “sense” y “antisense”, respectivamente, se sintetizaron como oligonucleótidos degenerados a partir de las secuencias peptídicas obtenidas de la huella peptídica y secuenciación de novo de los péptidos resultantes. De esta forma se pudo obtener una secuencia correspondiente a un fragmento interno del cDNA correspondiente a 308 aminoácidos. El extremo 3'-terminal, que incluía la secuencia codificante de la zona Ct y la secuencia 3' no codificante, se amplificó usando el oligonucleótido IFRS2 y un oligonucleótido no específico, UPM, que hibrida con la secuencia del oligonucleótido cebador 3'-CDS utilizado en la síntesis del 3'cDNA. Por otro lado, el extremo 5'-terminal se obtuvo empleando como cebadores los oligonucleótidos IFRA5 y UPM, este último que también hibrida con una secuencia nucleotídica denominada SMART-II que previamente fue incluida en la síntesis del 5'cDNA, según las instrucciones del Kit. Finalmente fueron sintetizados los oligonucleótidos NtO1 y CtO1 incorporando en ellos las secuencias de corte para las enzimas de restricción que posteriormente se utilizarían en el subclonaje del DNA en el vector de expresión bacteriano. Tras esta nueva

amplificación y clonaje del producto obtenido, se obtuvo la secuencia completa de Ole e 12 (Figura 14).

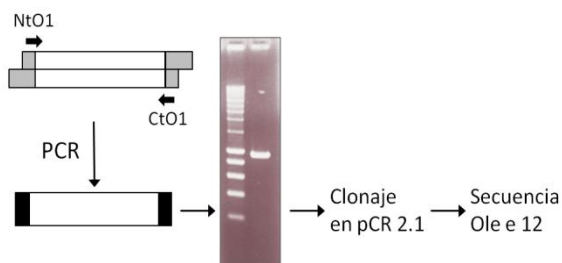


Figura 14: Estrategia de clonaje para la obtención del clon completo de Ole e 12 para secuenciación

De los tres clones secuenciados a partir del cDNA específico de Ole e 12 se obtuvo una única secuencia, Figura 15. La región codificante está constituida por 924 nucleótidos que corresponde a 308 aminoácidos. La secuencia se analizó utilizando un método predictivo para detectar el sitio más probable de procesamiento de la proteína madura (162). Los resultados obtenidos indican que esta proteína no posee péptido señal, y por tanto no sufre ningún tipo de procesamiento del Nt. La cadena polipeptídica presenta una masa molecular calculada de forma teórica de 33.978 Da, mientras que la aparente en geles de PAGE-SDS es de aproximadamente 35 kDa. El pI teórico determinado a partir

de su secuencia de aminoácidos fue de 5.7, el cual está dentro del intervalo de pl determinado experimentalmente para las isoformas detectadas con IgEs (4.6-5.9).

1	atggctgacaaaaccaagat	tttgatcattggaggaac	cggggtacattggcaaattc	ata	
	M A D K T K I L I I	G G T G Y I G	K F I		20
61	gtggaagcaagcgcaaaat	ctctgagcacc	ccacttttgctctggctag	gggagagcacaatt	
	V E A S A K S E H P T F A L A R E S T I				40
121	tctgatcctgttaaagg	aaaaatcattcaggg	gcttcaagaattcaggt	gtcaccatactt	
	S D P V K G K I I Q G F K N S G V T I L				60
181	tcgggcgatttatatgat	catgagggcttgg	tgaaggctataaagcaggt	ggatgtggtt	
	S G D L Y D H E G L V K A I K Q V D V V				80
241	atatcaacagttggtcaact	tcaattagctgatcaggt	taagatcattgctgccatt	aaa	
	I S T V G Q L Q L A D Q V K I I A A I K				100
301	gaagctggaatgtcaag	agattctttccatcgg	tattcgggaactgat	gtatgatgt	
	E A G T G N V K R F F P S D F G T D V D R				120
361	cacgctgtggagccag	ccaagtctctgttcg	agatcaagtcccaaatt	tcgcagggccatc	
	H A V E P A K S S F E I K S Q I R R A I				140
421	gaggcaggaggaattc	cttacaccttgatcag	ctaactactttgcagg	ctattccctt	
	E A G G I P Y T F V S A N Y F A G Y S L				160
481	ccaacactggtgcag	ccagaagtcaactg	ctccaccagagataa	agtcattatcttag	
	P T L V Q P E V T A P P R D K V I I L G				180
541	gatggaaatgccaaag	ctgttttcaacgagg	aaaacgacattggc	acatacaccatcaa	
	D G N A K A V F N E E N D I G T Y T I K				200
601	gccgtggacgaccca	agaacattgaacaaa	atcctctacatcaag	cctcccaaaaacata	
	A V D D P R T L N K I L Y I K P P K N I				220
661	tattcattcaatgaact	tgtgtcttgggaga	agaagattggtaaa	accctagagaaa	
	Y S F N E L V A L W E K K I G K T L E K				240
721	atztatgtaccagag	gaacaagttctcaac	agattcaagaatct	cgcgtttcccatcaat	
	I Y V P E E Q V L K Q I Q E S P F P I N				260
781	attgtaatggcaatc	aaccactcagcatt	tgtgaagggcgat	ctgacaaattttaa	att
	I V M A I N H S A F V K G D L T N F K I				280
841	gaaccatcttttgg	agttgaggtctcg	gagctttatccag	atgttaaatacacc	actgtg
	E P S F G V E A S E L Y P D V K Y T T V				300
901	gaggagtaccttgat	caatttgtttaa			
	E E Y L D Q F V -				308

Figura 15: Secuencia de nucleótidos y de aminoácidos deducida para Ole e 12. En amarillo se indica el sitio de unión de NADPH, en morado el único residuo de cisteína que posee y en marrón la secuencia consenso de N-glicosilación. Se subrayan las posiciones identificadas por masas.

Análisis a partir de la estructura primaria de Ole e 12

Mediante diversos programas informáticos y con la información recopilada en las bases de datos, a partir de la secuencia primaria de una proteína se pueden predecir muchas de sus características estructurales, inmunológicas e incluso funcionales.

Resultados Familia Isoflavona Reductasa

Predicción de estructura secundaria

La predicción de estructura secundaria se llevó a cabo usando la estructura primaria y aplicando el método de Jones (148), incluido en el servidor PSIPRED, Figura 16.



Figura 16: Predicción de estructura secundaria de rOle e 12 mediante el método de Jones, mostrándose la hélice α (h, azul), lámina β (e, rojo), y ordenación aperiódica (c, rosa). Se colorean los residuos que forman parte de la hélice α (azul), o lámina β (rojo) en la estructura tridimensional (Figura 18), empleando como molde la estructura tridimensional de la cadena B de la PCBER PT1 procedente de *Pinus tadea* (163).

Los resultados de la predicción de estructura secundaria fueron 34.7% (107/308) de hélice α , 14.9% (46/308) de lámina β y 50.3% de ordenación aperiódica.

Predicción de hidrofobicidad y antigenicidad

El perfil de hidrofobicidad según el programa descrito por Kyte y Doolittle (149) (Figura 17) indica una clara alternancia en la secuencia entre regiones apolares, que quedarían hacia el interior de la proteína, fuera del alcance del medio fisiológico o del disolvente, e hidrofílicas que quedarían accesibles y expuestas a éste.

La predicción de antigenicidad se llevó a cabo mediante el método de Welling (150). Mediante este método se predicen cinco regiones potencialmente antigénicas, que podrían contribuir a la formación de epítomos B, estas regiones estarían comprendidas entre los residuos 25-35, 63-76, 118-126, 200-208 y 290-298 (Figura 17).

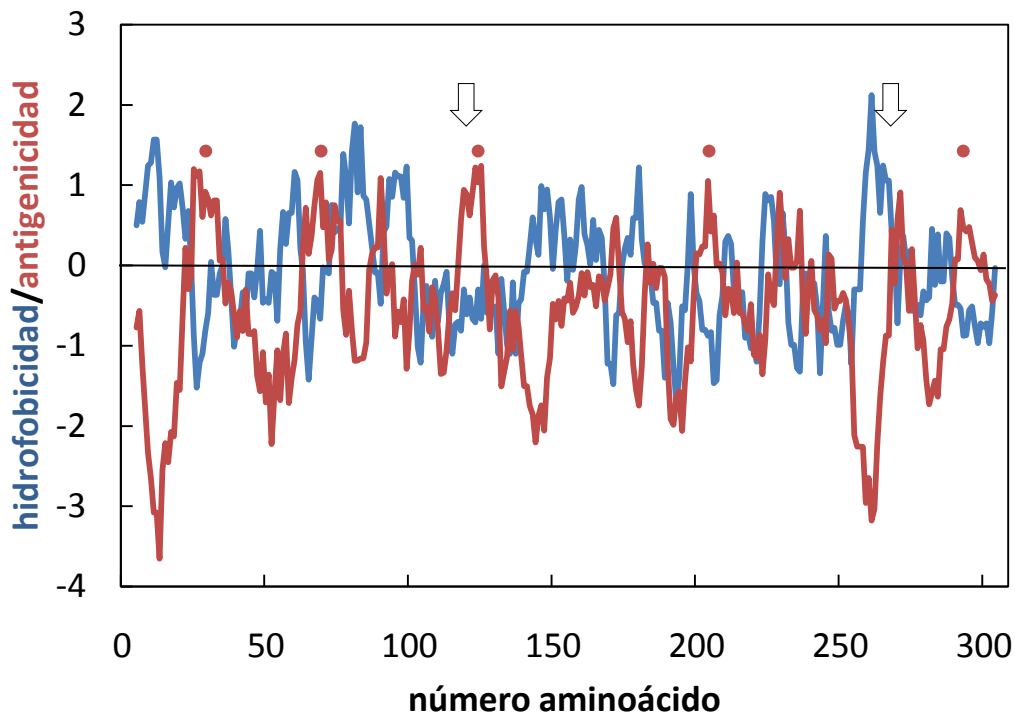


Figura 17: Representación de las predicciones teóricas de hidrofobicidad y antigenicidad sobre la secuencia de Ole e 12. En color azul, se presenta el perfil de hidrofobicidad según Kyte y Doolittle (149), en rojo, el de antigenicidad según Welling (150). Los puntos rojos indican las zonas potencialmente antigénicas. Flecha en posición 120 indica la posición de la cisteína y flecha en posición 266 localiza el potencial sitio de glicosilación.

Predicción de estructura terciaria de Ole e 12

A partir de la secuencia de aminoácidos de Ole e 12 y empleando el programa de modelado 3D Swiss-Model (151) se realizó un análisis teórico de la estructura tridimensional de esta proteína tomando como molde la estructura tridimensional de la cadena B de la PCBER PT1 procedente de *Pinus tadea* (163). La estructura secundaria de esta proteína posee motivos estructurales del tipo beta-alfa-beta, que están constituidos por láminas β paralelas unidas mediante hélices α .

También se observa una alternancia de hélice α y ordenación aperiódica, observándose un alabeo en la lámina β formada, (Figura 18A zona coloreada). Las regiones predichas como antigénicas de la Figura 17 se localizan en la superficie de la molécula, Figura 19.

Resultados Familia Isoflavona Reductasa

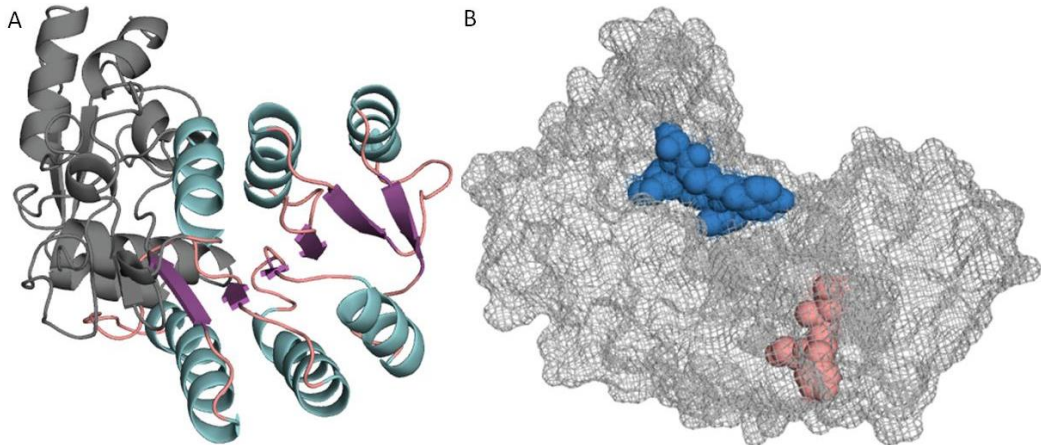


Figura 18: Modelo teórico de la estructura terciaria del alérgeno Ole e 12 Swiss-Model. A, tipos de estructura secundaria presente en el alérgeno. Azul: hélice α , morado: lámina β , rosa: aperiódica. B, superficie de Ole e 12 y sitio de unión para NADPH situado entre residuos 11 y 17 en azul y potencial sitio de glicosilación en rojo.

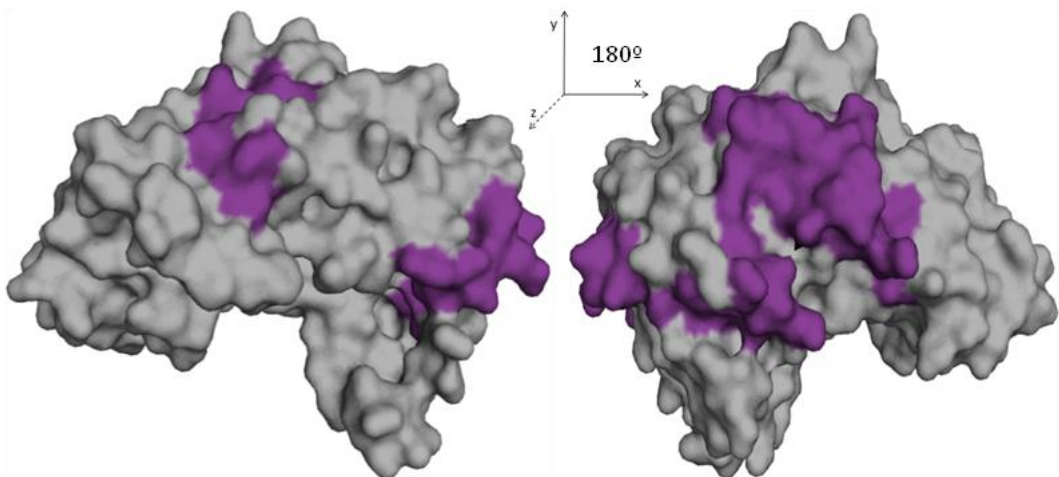
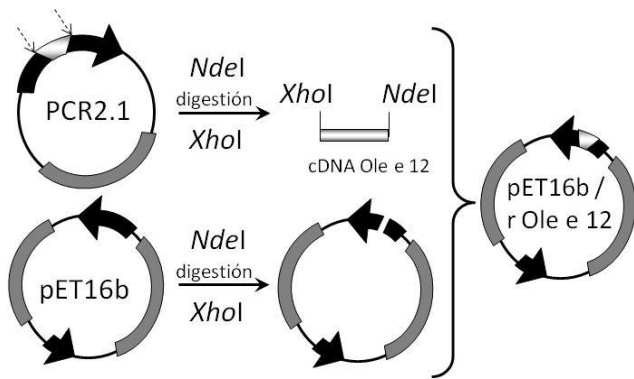


Figura 19: Modelo teórico de la estructura terciaria del alérgeno Ole e 12 donde se muestran las regiones antigénicas predichas teóricamente: 25-35; 63-76; 118-126; 200-208; 290-298

EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE

La expresión de genes en los plásmidos pET se encuentra regulada por el promotor del fago T7. De esta forma, en ausencia de la RNA polimerasa del fago T7, la transcripción debida a la RNA polimerasa de *E. coli* es prácticamente nula. Para la expresión del gen de Ole e 12 se utilizaron cepas de *E. coli* BL21(DE3) que llevan incorporado en su genoma el gen que codifica para la RNA polimerasa del fago T7. Dicho gen está regulado

por el promotor lacUV5 que a su vez es inducible por IPTG. Etapas requeridas para la expresión de rOle e 12.



La ligación se realizó empleando los sitios de corte *NdeI* y *XhoI* del vector, que se encuentran en fase con el promotor T7 inducible por IPTG, (Figura 20).

Figura 20: Etapas requeridas para la expresión de rOle e 12.

Para obtener la proteína, el plásmido recombinante se subclonó en las células BL21 (DE3) de *E. coli*, y tras las pruebas de expresión a partir de una colonia (Figura 21) se seleccionaron 16 h de crecimiento a 25 °C como condiciones óptimas de expresión. En las pruebas de expresión se observó que a temperaturas superiores a 25 °C la proteína se encontraba insoluble mayoritariamente localizada en cuerpos de inclusión. Tras el crecimiento de las células se realizó la posterior inducción con IPTG 0.4 mM durante 8 horas (línea 2, Figura 21). También se utilizaron otras concentraciones de IPTG y se comprobó que por encima de 0.4 mM se producía más proteína insoluble, en cuerpos de inclusión (Figura 21, 1 mM IPTG (T 8h P)).

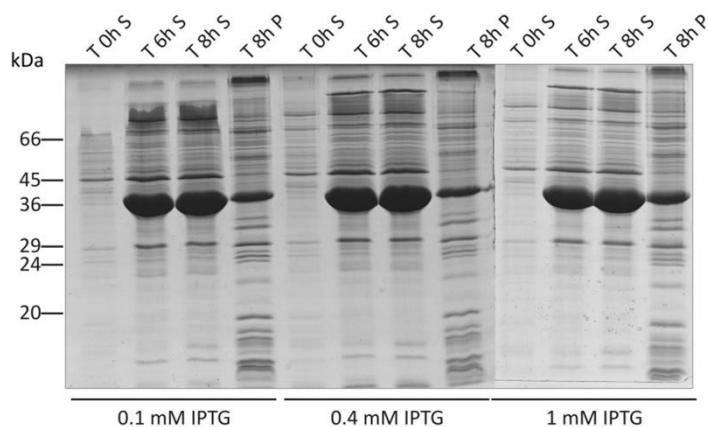


Figura 21: Pruebas de expresión de la colonia seleccionada en células BL21(DE3) transformadas (T, tiempo; S, sobrenadante; P, pellet sedimentado).

Resultados Familia Isoflavona Reductasa

Tras la ruptura de la membrana celular mediante dos ciclos alternativos de frío (en aire líquido) y calor (42 °C) se separó mediante centrifugación el sobrenadante que contenía la proteína recombinante soluble del sedimento del lisado celular. El sobrenadante se dializó frente a Tris-HCl 50 mM, pH 7.4. En este punto la proteína se sometió a un tratamiento con yodoacetamida 120 mM, ya que se observó en experimentos preliminares que la proteína tendía a dimerizar cuando se llevaban a cabo las distintas etapas de purificación sin este tratamiento previo. La proteína volvía a su forma monomérica con el tratamiento con un agente reductor, β ME. La dimerización podría estar provocada por la formación de un puente disulfuro entre dos moléculas de proteína por medio de la única cisteína que posee en la posición 120 y que estaría situada en la superficie de la estructura, según el modelado correspondiente, Figura 22.

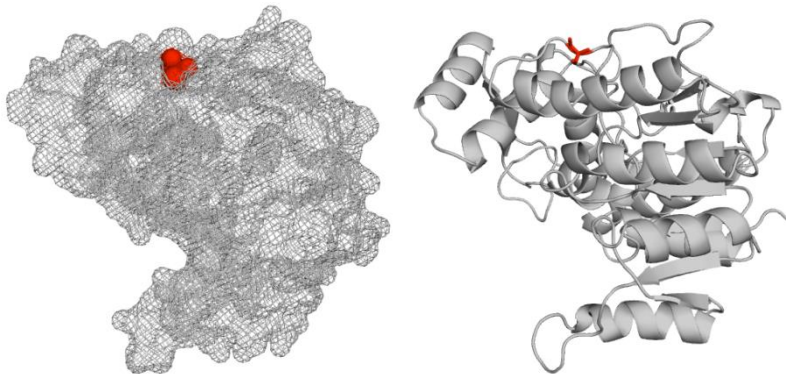
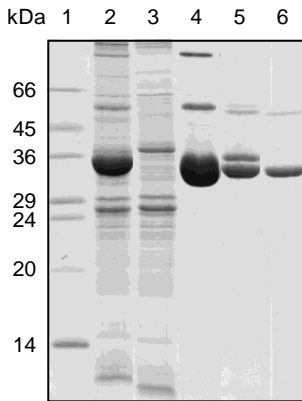


Figura 22: Residuo de cisteína 120 orientado hacia el exterior.

La proteína recombinante se purificó en dos etapas cromatográficas empleando la misma columna de afinidad HisTrap FF crude (FPLC). En una primera etapa mediante un gradiente creciente de imidazol, eluyendo toda la proteína pura a una concentración de 200 mM (carril 4, Figura 23). La secuencia de histidinas fue separada de la proteína mediante hidrólisis con el Factor Xa (carril 5, Figura 23) y éste se eliminó mediante una cromatografía de afinidad con Xarrest™ Agarose. Al no obtenerse una digestión completa mediante esta proteasa, tanto el fragmento del *Tag* de histidinas como la proteína sin digerir, se separaron de la proteína digerida mediante la segunda cromatografía en el sistema anteriormente descrito, obteniéndose así la proteína pura y sin la extensión adicional (carril 6, Figura 23). El rendimiento de la proteína

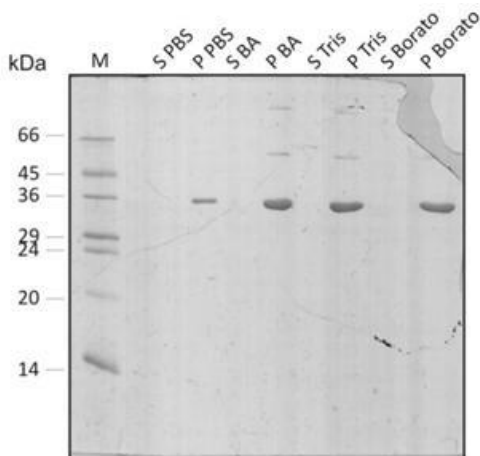


recombinante producida fue 17.6 mg por litro de cultivo con un grado de pureza del 99% (determinado por densitometrado).

Figura 23: Etapas de purificación de rOle e 12: 1, patrones de peso molecular; 2, sobrenadante del lisado celular; 3, volumen eluido en la cromatografía HisTrap FF crude; 4, rOle e 12 eluida con 200 mM de imidazol de la primera cromatografía; 5, rOle e 12 digerido con el Factor Xa; 6, rOle e 12 purificado tras su digestión y purificación posterior.

Estudios de integridad durante el proceso de purificación

Se realizaron estudios de la estabilidad y las condiciones de almacenamiento de esta proteína para lo cual se liofilizaron alícuotas independientes de rOle e 12 (4 µg) y los liofilizados se resuspendieron en 50 µl de estos tampones: PBS / BA 0.2M / Tris-HCl 0.1 M pH 7.4 / Borato sódico 0.15 M pH 8.0.



Tras centrifugar y separar el sobrenadante se analizó por PAGE-SDS tanto el sobrenadante como el sedimento resuspendido en tampón de aplicación, Figura 24.

Figura 24: PAGE-SDS de los sobrenadantes (S) y los precipitados (P) con 5 µl de tampón de aplicación.

En ningún caso se pudo resuspender la proteína. Por tanto el siguiente paso, fue comprobar la estabilidad de la proteína, mantenida a 4 °C, para evitar así la liofilización. A distintos tiempos (0, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas y 4 semanas) se analizó la proteína por electroforesis tiñendo los geles con CBS y analizando la unión de IgG con un anticuerpo policlonal específico tras su inmunotransferencia a membranas. Se comprobó, que durante al menos 30 días a 4 °C la proteína pura se mantenía estable, Figura 25.

Resultados Familia Isoflavona Reductasa

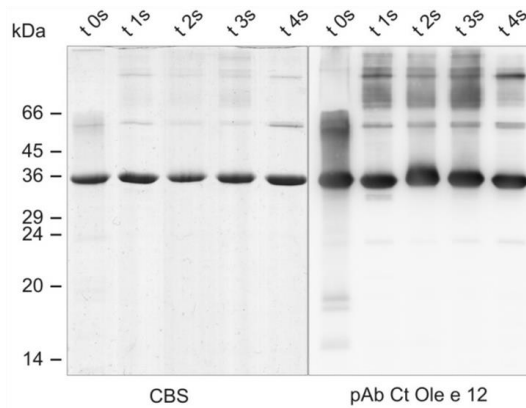


Figura 25: PAGE-SDS 15%, 2 μ g por muestra. Los tiempos corresponden a semanas (s). CBS, tinción con azul Coomassie; e inmunodetección con pAb CtOle e 12.

CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL

Determinación de la masa molecular de rOle e 12

El análisis por espectrometría de masas de la proteína recombinante después de someterla al proceso de digestión para eliminar el *Tag* de histidinas, dio lugar a dos picos, de 34285.8 Da y 34994.7 Da, Figura 26. El primer pico correspondería al peso molecular esperado de la secuencia de la proteína deducida (carboxiamidometilada) a partir del clon seleccionado más un residuo de histidina que queda unido tras la ruptura por el Factor Xa. El segundo, con 709 Da extras, podría corresponder a la proteína con una molécula de NADP (H) unida, ya que la masa molecular de este cofactor es de 744 Da.

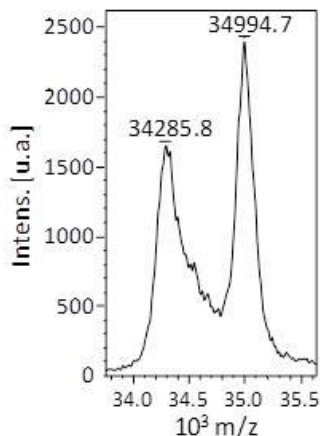


Figura 26: Análisis por espectrometría de masas de rOle e 12; (u.a., unidades arbitrarias).

El análisis de la secuencia NH_2 t del alérgeno recombinante mediante degradación de Edman originó la secuencia HMADK, apreciándose en ella una histidina extra, respecto a

la secuencia de la proteína madura, resultado de la fragmentación producida por el factor X tras eliminar el *Tag* de histidinas.

Análisis de la estructura secundaria

El análisis experimental de la estructura secundaria de rOle e 12 se realizó obteniendo su espectro de dicroísmo circular en el UV lejano, utilizando para su deconvolución el método descrito por Perczel, Figura 27.

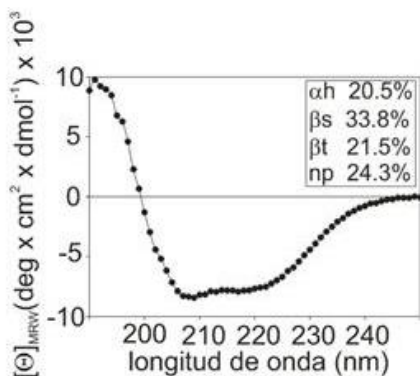


Figura 27: Espectro de DC en el ultravioleta lejano (190-250 nm). Los valores se expresan como elipticidad molar por residuo. αh, hélice α, βs, lámina β, βt, giro β, np, estructura aperiódica.

Emisión de fluorescencia

El análisis de emisión de fluorescencia obtenido para la proteína, tras la excitación a 275 nm y a 295 nm se muestra en la Figura 28. Tras la excitación a 295 nm el espectro mostró un máximo de emisión a 320 nm correspondiente al único triptófano de la proteína. Por otra parte, la excitación a 275 nm presenta, además del máximo, un hombro a 300 nm correspondiente a la contribución de las tirosinas.

El espectro de emisión de fluorescencia de las proteínas está normalmente dominado por la emisión de tirosina y sobre todo por la de los triptófanos. El elevado número de tirosinas (12) en Ole e 12 hace que su contribución sea visible en el espectro de emisión completo y no sólo a través de su determinación tras sustraer el espectro de emisión a 295 nm del obtenido a 275 nm.

Resultados Familia Isoflavona Reductasa

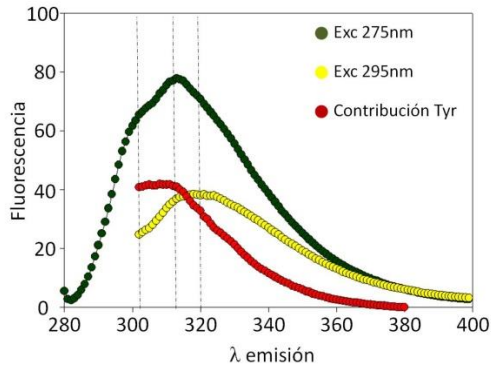


Figura 28: Espectro de emisión de fluorescencia de Ole e 12 tras excitación a 275 nm (verde), 295 nm (amarillo) y espectro de diferencia (rojo) correspondiente a la contribución de Tyr calculada a partir de ambos.

La emisión de fluorescencia del triptófano es muy sensible a desplazamientos hacia el rojo o el azul, estando descritos los máximos entre 315 nm (correspondiente a un entorno muy hidrofóbico) y 350 nm (correspondiente a un entorno muy polar). En este espectro el máximo del Trp²³⁰ se encuentra a 320 nm, lo que indicaría una posición interna de este residuo que se confirma en el modelado de la estructura tridimensional, Figura 29.

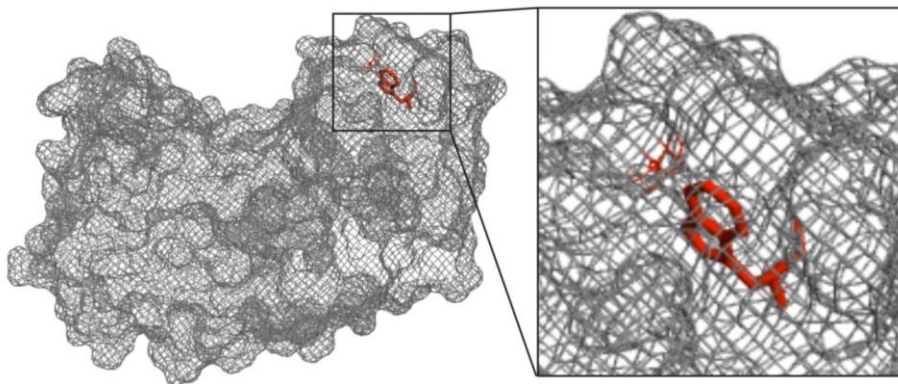


Figura 29: Modelado de la superficie de Ole e 12; Rojo, triptófano en posición 230.

ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD DIAFORASA

Se conoce como actividad diaforasa a la oxidación de β -NADH o β -NADPH en presencia de aceptores artificiales de electrones como el 2,6-diclorofenol-indol-fenol (DCPIP), o el azul de metileno, Figura 30. Esta actividad enzimática, pese a no ser fisiológica, es fácil de medir (152, 164) y proporciona información acerca de la reacción general y la

interacción de la enzima con los nucleótidos de piridina. Mediante esta reacción es posible estimar los parámetros cinéticos del estado estacionario

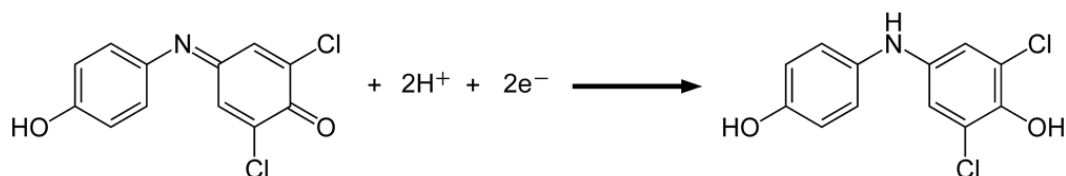


Figura 30: Al reducirse el DCPIP se vuelve incoloro, el aumento resultante en la transmitancia de la luz se puede medir usando un espectrofotómetro

La actividad diaforasa se detectó mediante el descenso de A_{595nm} frente al tiempo. Tras medir la variación de absorbancia con el tiempo se calculó la velocidad de catálisis enzimática teniendo en cuenta que el coeficiente de extinción molar del DCPIP oxidado es $21 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$, mientras que la forma reducida no absorbe. Se representó la velocidad inicial frente a la concentración de sustrato NADPH [V_o (mM/min) vs [NADPH] (μM)], Figura 31.

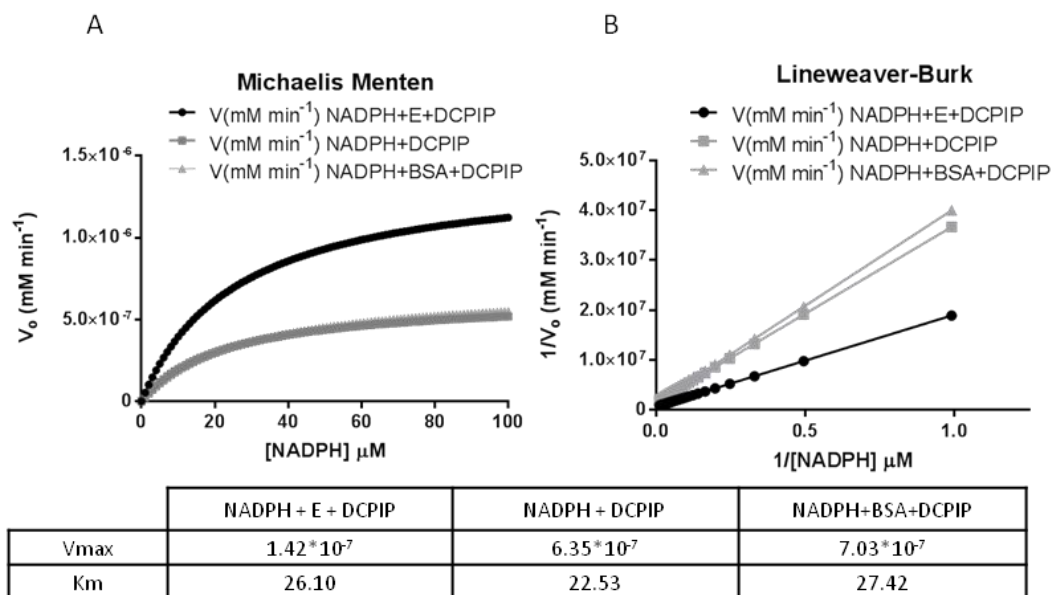


Figura 31: Representación de la velocidad inicial de catálisis frente a la concentración de NADPH: A, ajuste Michaelis Menten, B, Lineweaver-Burk. Tabla, valores del ajuste de la ecuación de Michaelis Menten.

Resultados Familia Isoflavona Reductasa

La reducción inespecífica del DCPIP es la misma en los dos controles usados. Para tener los datos correspondientes a la reducción específica, debida a rOle e 12 se sustrae la actividad inespecífica de la específica restando una curva control, Figura 32.

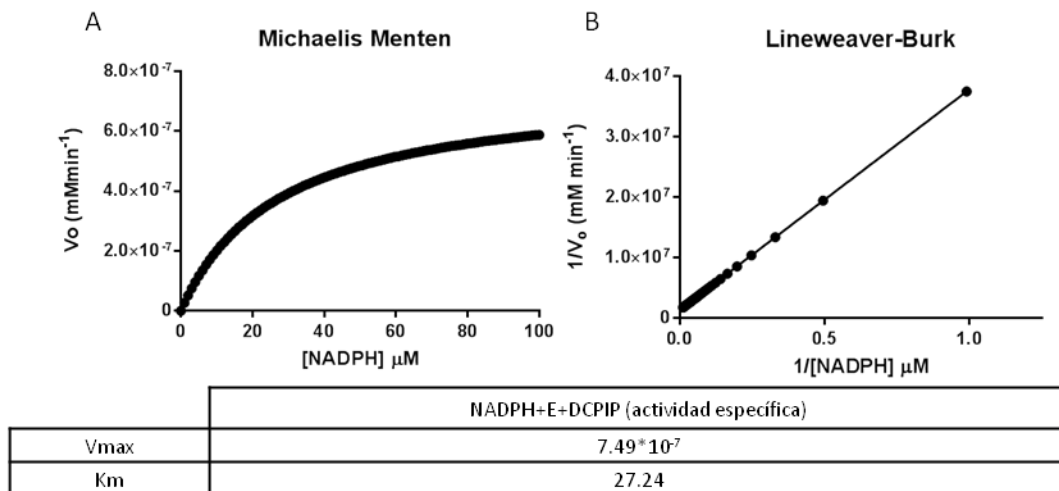


Figura 32: Representación de la velocidad inicial de catálisis frente a la concentración de NADPH, tras la sustracción de la actividad inespecífica: A, ajuste Michaelis Menten, B, Lineweaver-Burk. Tabla, valores del ajuste de la ecuación de Michaelis Menten.

CARACTERIZACIÓN INMUNOLÓGICA

Obtención de un anticuerpo

Observada la antigenicidad de la región Ct de Ole e 12 (Figura 17), y analizada su localización en el modelado de la estructura tridimensional del alérgeno (Figura 33), se optó por obtener un anticuerpo específico frente al péptido PDVKYTTVEEYLDQFV (posiciones 293 a 308 de la secuencia) para tareas de detección inmunológica. La inmunización de un conejo con el péptido sintetizado permitió obtener un primer anticuerpo policlonal que reconociera este alérgeno. La selección de esta zona de la secuencia se apoyó también en el análisis de la comparación de la secuencia del alérgeno de olivo con las de otras proteínas alérgicas homólogas, entre las que se observa una identidad de secuencia muy elevada con la proteína de abedul y con la de pera. Por tanto este antisuero, pAb CtOle e 12, ha permitido no solo la detección de la

proteína durante las etapas de purificación, sino también el estudio de la presencia de proteínas homólogas en otras fuentes biológicas.

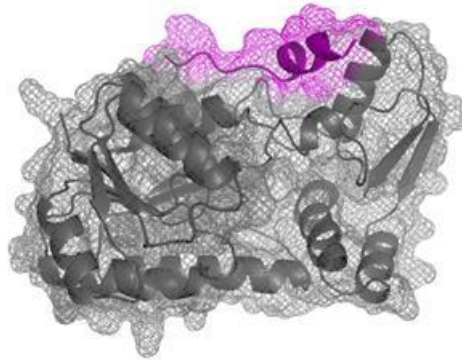


Figura 33: Localización de la región Ct en la estructura tridimensional de rOle e 12.

Para comprobar la especificidad y afinidad de la unión del anticuerpo al péptido, se realizaron ensayos de dot blot en los que se adsorbió el péptido a distintas cantidades (14-0.11 μg) sobre una membrana de nitrocelulosa, para posteriormente realizar una inmunodetección con el antisuero policlonal a distintas diluciones ($1:10^2$ - $1:10^7$), Figura 34.

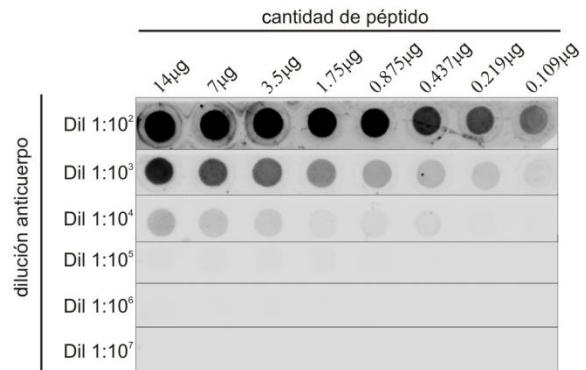


Figura 34: Dot blot del péptido Ct con distintas cantidades de proteína y diluciones del pAb CtOle e 12.

Así mismo se realizaron experimentos de titulación de dicho antisuero en ELISA para rOle e 12 y para el extracto de olivo (Figura 35) siendo el título de IgG para la proteína recombinante pura de 1:300.000 y para el extracto completo de 1:30.000 para lograr una DO de 1.

Resultados Familia Isoflavona Reductasa

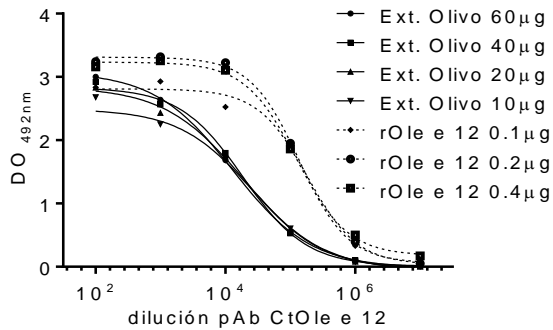


Figura 35: Titulación del pAb CtOle e 12 con distintas concentraciones de rOle e 12 (---) y de extracto de olivo (—).

Este anticuerpo se ha utilizado para el reconocimiento de la proteína durante los procesos de expresión del cDNA de Ole e 12 y de purificación de la proteína natural.

Obtención de un anticuerpo policlonal específico de rOle e 12

También se desarrolló un anticuerpo policlonal, pAb rOle e 12, frente a la proteína recombinante purificada para analizar su equivalencia estructural con la de la forma natural purificada a partir del polen de olivo. Con él se realizaron experimentos de titulación para la proteína completa de rOle e 12 y para el extracto de polen de olivo, en ELISA, Figura 36. Se pudo comprobar la baja concentración de Ole e 12 en el extracto ya que fueron necesarias cantidades de extracto de entre 10 y 60 µg, así como disminuir la dilución del anticuerpo.

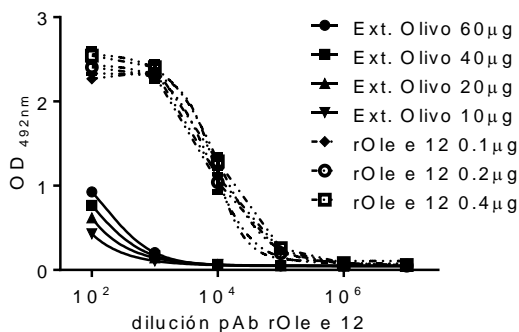


Figura 36: Titulación del pAb rOle e 12 con rOle e 12 (---) y extracto de olivo (—).

Estudio de la capacidad de unión de IgG

Para comprobar que los dos anticuerpos obtenidos eran capaces de reconocer a la proteína natural, se realizó una inmunodetección del alérgeno, tanto en forma recombinante como en el extracto completo, Figura 37A. Además, se realizó una inmunodetección del extracto completo tras una electroforesis bidimensional, Figura 37B, comprobándose que el anticuerpo era capaz de reconocer prácticamente las mismas isoformas de Ole e 12 que se observaban en la tinción con sueros de pacientes alérgicos a melocotón de la Figura 10B.

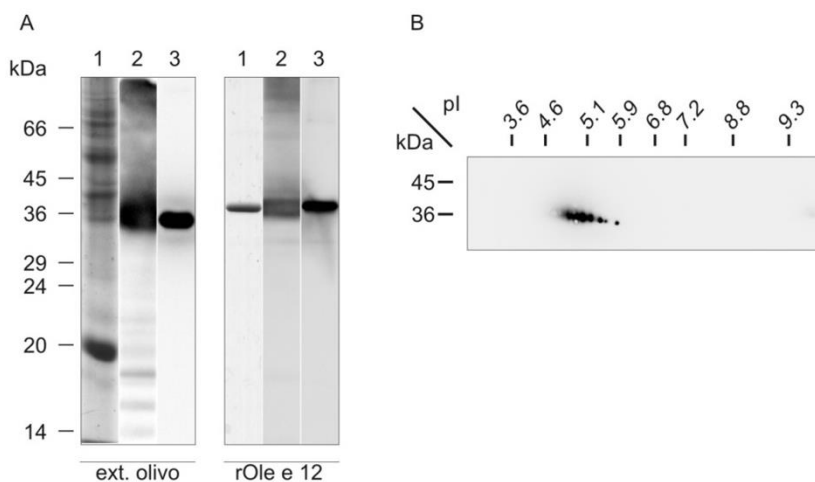


Figura 37: A, PAGE-SDS con geles al 15% del extracto de olivo y de rOle e 12: 1, CBS; 2, inmunotinción con pAb CtOle e 12; 3, inmunotinción con pAb rOle e 12. B, 2D-PAGE de extracto de olivo e inmunotinción con pAb rOle e 12.

Para analizar la similitud inmunológica entre la forma recombinante de Ole e 12 y la proteína presente en el polen, se llevaron a cabo estudios de inhibición utilizando rOle e 12 (0.1 μ g) transferido a partir de PAGE-SDS a membranas de nitrocelulosa. Se incubaron estas membranas con el pAb rOle e 12 tras haber sido adsorbido previamente con cantidades crecientes del extracto de polen. Los resultados muestran como la inhibición de la unión de las IgG a rOle e 12 es casi completa con 1 mg de proteína total del extracto de polen (Figura 38). De forma inversa se realizó también la incubación del extracto de polen de olivo transferido a membranas de nitrocelulosa (20 μ g) con el pAb rOle e 12 preadsorbido con cantidades creciente de rOle e 12, siendo

Resultados Familia Isoflavona Reductasa

inhibida completamente la señal con 5 µg del alérgeno purificado. Estos resultados indican la semejanza entre epítomos IgG de la forma natural y recombinante, Figura 38.

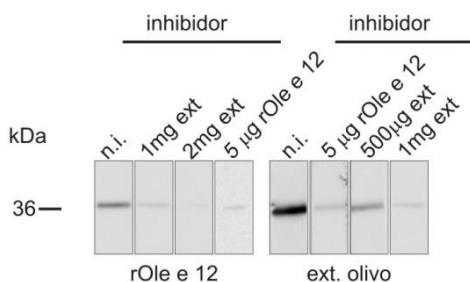
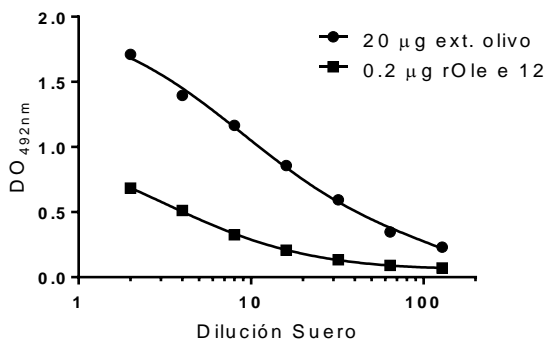


Figura 38: Inhibición de la unión de IgG de pAb Ole e 12 a rOle e 12 (0.1 µg) y a extracto de olivo (20 µg) utilizando rOle e 12 y extracto de olivo como inhibidores. n.i, sin inhibidor.

Estudio de la capacidad de unión de IgE

La capacidad de unión de IgE a rOle e 12 se analizó mediante su titulación en ELISA empleando una mezcla de aquellos sueros de pacientes alérgicos al polen de olivo que habían resultado positivos a rOle e 12. Para la titulación se usó una mezcla equivolúmica (mezcla Ole e 12) de cinco sueros procedentes de Jaén (cuyas densidades ópticas individuales en ELISA directo frente a rOle e 12 fueron 0.246, 0.265, 0.30, 0.395, 0.519) y un suero procedente de Murcia (0.248).



La titulación se realizó empleando diluciones $1/2^n$ de suero sobre extracto de olivo y sobre rOle e 12, Figura 39.

Figura 39: Curva de unión de IgE a rOle e 12 y a extracto de olivo.

Un total de 56 sueros de pacientes alérgicos al polen de olivo procedentes de una población de Jaén se utilizaron para comparar la unión de IgE al alérgeno purificado en ELISA y en inmunotransferencia, Figura 38. Así la presencia de epítomos conformacionales podría detectarse en ese análisis comparativo. Usando ambas técnicas se pudo observar que la proteína recombinante posee epítomos capaces de ser reconocidos por las IgEs de sueros de pacientes alérgicos a olivo: 10 sueros son capaces de reconocer la proteína en ELISA, mientras que en inmunoblotting se pueden

identificar al menos 16 sueros capaces de reconocer intensamente la proteína: 2, 6, 14, 17, 18, 19, 23, 25, 26, 29, 31, 32, 34, 38, 45 y 51, lo que indicaría una respuesta superior para la proteína desplegada. Además, en general, parece que hay concordancia entre el reconocimiento del alérgeno en condiciones nativas, características en ELISA, y en condiciones desnaturalizantes, como las que se dan durante la Inmunotransferencia. Algunos casos como el del suero 9 muestran una reducción en su respuesta en inmunotransferencia en comparación con los valores obtenidos en ELISA, al menos utilizando como referencia sueros con respuestas similares, Figura 40. Por otra parte, en casos como el de los sueros 14, 23 y 38, se observó una reacción positiva en membranas respecto a la respuesta obtenida en ELISA. Todo ello indicaría que Ole e 12 es un alérgeno que presenta tanto epítomos lineales como conformacionales.

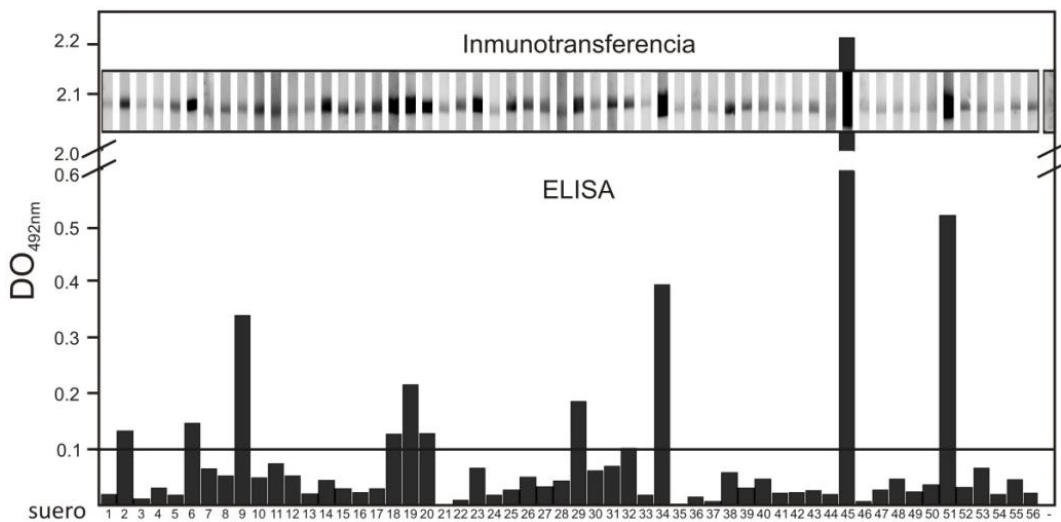


Figura 40: Comparación de la capacidad de unión de sueros de pacientes alérgicos al polen de olivo frente a rOle e 12 mediante ELISA o inmunotransferencia

La correlación inmunológica a nivel de IgE entre las formas natural y recombinante de Ole e 12 se probó mediante experimentos de inhibición en membranas de nitrocelulosa en las que se había transferido rOle e 12 desde geles de poliácridamida. Para ello se incubó la membrana con la mezcla equivolúmetrica de sueros positivos a rOle e 12 (mezcla Ole e 12) tras haber incubado previamente esa mezcla de sueros con extracto de polen de olivo, Figura 41. Los resultados muestran como la proteína natural presente en el extracto de olivo (500 µg) inhibe la unión de IgE a rOle e 12.

Resultados Familia Isoflavona Reductasa

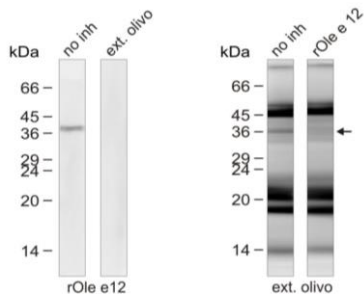


Figura 41: Inhibición de la unión de IgE a rOle e 12 y a extracto de olivo con extracto de polen de olivo (500 μ g) y rOle e 12 (5 μ g), respectivamente.

Cuando se analizó la inhibición sobre extracto de polen de olivo transferido a membranas de nitrocelulosa e incubado con la misma mezcla de sueros preadsorbidos con rOle e 12 (5 μ g), se observó que la proteína recombinante era capaz de inhibir la unión de IgE a Ole e 12 presente en el polen de olivo. Estos resultados indican la semejanza entre epítomos IgE de la forma natural y recombinante.

Prevalencia de rOle e 12

La relevancia clínica de Ole e 12 se ha determinado analizando el reconocimiento por las IgE de 73 sueros de pacientes alérgicos al polen de olivo mediante ELISA. Los sueros empleados corresponden, como ya se ha mencionado, a individuos con síntomas al melocotón y alérgicos al polen de olivo de la comunidad de Madrid. En esta población 24 sueros reconocieron al alérgeno, luego la prevalencia fue de 33%, Figura 42.

Este mismo estudio se realizó con otra dos poblaciones de sueros de individuos alérgicos de Jaén, una compuesta por los sueros de 56 pacientes que acudieron a consulta de forma consecutiva en la primavera de 2004 y que presentaban rinitis estacional – coincidente con la polinización del olivo – y/o asma bronquial, así como pruebas cutáneas positivas al polen de olivo; todos ellos fueron diagnosticados como alérgicos al polen de olivo. En esta población la prevalencia fue de 19.6% (11/56), Figura 40. La otra población procedía de la misma región, con 106 pacientes que acudieron a consulta en 2007. En este caso la frecuencia en el reconocimiento resultó ser del 9.4% (10/106).

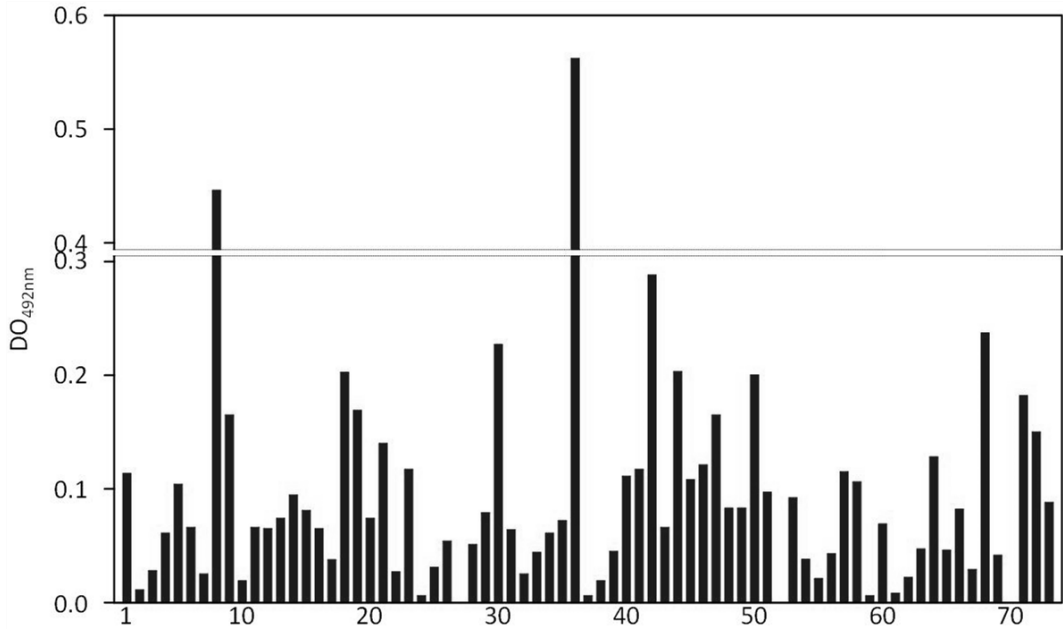


Figura 42: Análisis mediante ELISA de la unión a rOle e 12 de las IgE de una población de individuos con síntomas al melocotón y alérgicos al polen de olivo de la comunidad de Madrid.

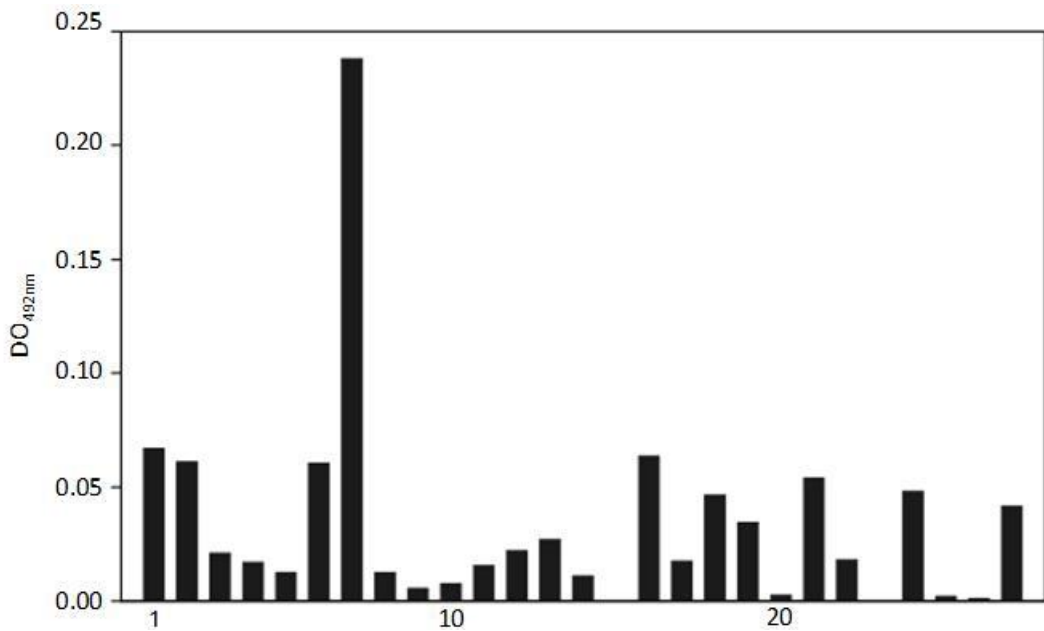


Figura 43: Análisis mediante ELISA de la unión a rOle e 12 de las IgE de una población de individuos alérgicos al polen de olivo en la Comunidad de Murcia (en la que el olivo no es una la fuente alérgica principal de sensibilización).

Resultados Familia Isoflavona Reductasa

De tres poblaciones en las que el olivo no era una la fuente alérgica principal de sensibilización se obtuvieron prevalencias todavía más bajas: En Murcia 3.7% (1/27 sueros), Zaragoza 3.6% (1/28 sueros), Castellón 3.6% (1/28 sueros) (Figura 43, Murcia).

ESTABILIDAD ESTRUCTURAL E INMUNOLÓGICA DE ROLE E 12

Efecto de agentes reductores y tratamiento térmico

Se analizó la capacidad de Ole e 12 para unir IgG e IgE en condiciones reductoras mediante inmunotransferencia de rOle e 12 en ausencia o presencia de agentes reductores junto con tratamiento térmico a 90 °C, Figura 44. La membrana con la proteína se incubó con una mezcla de sueros positivos a Ole e 12 y alternativamente con el anticuerpo policlonal. La señal de la banda aumenta su intensidad debido al cambio de movilidad de la proteína agregada provocado por la ruptura del puente disulfuro que se establece en el dímero sin yodoacetamida.

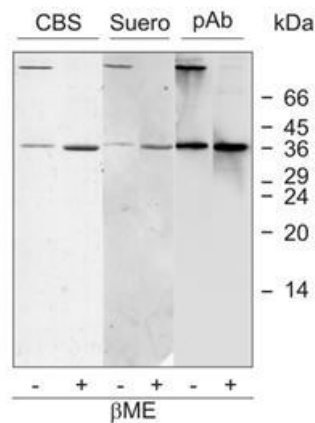


Figura 44: PAGE-SDS de rOle e 12 (0.5 µg) sin βME (-) o con βME (+). CBS, tinción con azul de Coomassie, así como con una mezcla de sueros de pacientes alérgicos a olivo y pAb rOle e 12.

Estabilidad enzimática

En principio no tendría sentido hacer ensayos de estabilidad frente a tratamientos digestivos sobre rOle e 12, puesto que es una proteína de polen y su vía de acceso en el organismo es inhalada. En el caso de las proteínas alérgicas que penetran en el organismo por vía nasal, éstas suelen presentar una estabilidad relativamente baja,

siendo hidrolizadas rápidamente por las proteasas presentes en las células que infiltran los tejidos nasales (sobre todo mastocitos). Sin embargo se han descrito alérgenos homólogos en alimentos, y por tanto resulta interesante realizar estos ensayos, puesto que la vía de acceso sería también ingerida en el caso de alérgenos presentes en alimentos.

Digestión en SGF (“Simulated Gastric Fluid”)

Dentro de los ensayos descritos para mimetizar la resistencia de proteínas de la dieta a la degradación proteolítica que ocurre durante la digestión gastrointestinal, se seleccionó el protocolo diseñado por Astwood (147). Para este experimento se empleó como control positivo Sin a 1, un alérgeno de mostaza con alta estabilidad enzimática, y BSA, una proteína cuya baja estabilidad ha sido demostrada, como control negativo. En cada tiempo analizado se empleó proteína pura para poder visualizar la degradación en el gel teñido con CBS y en inmunotransferencia, Figura 45.

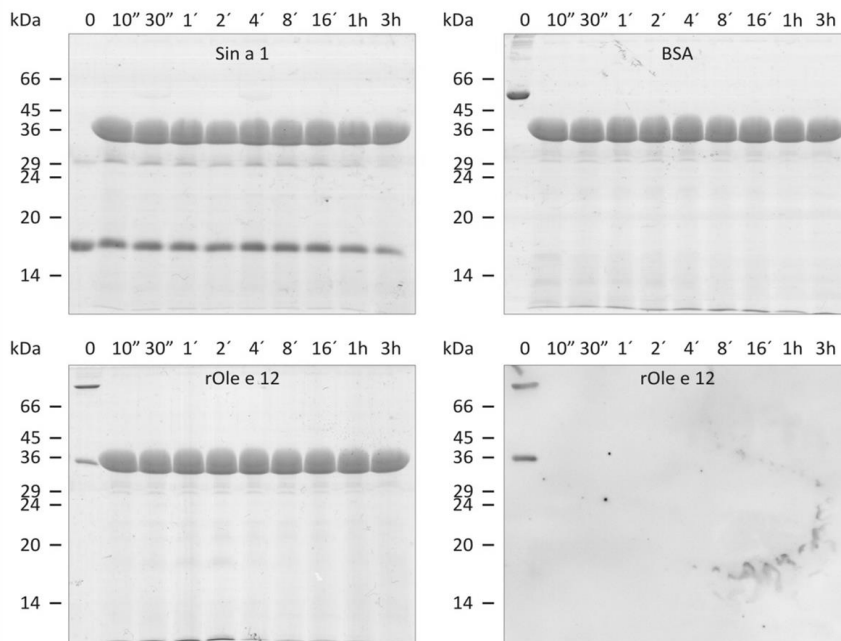


Figura 45: PAGE-SDS del producto de reacción de digestión con SGF (pepsina, 35 kDa). Sin a 1 y BSA, proteínas controles de la reacción. rOle e 12, teñido con azul de Coomassie y con pAb rOle e 12.

Resultados Familia Isoflavona Reductasa

rOle e 12 es un ejemplo de alérgeno que no resiste a la degradación por pepsina. Como se observa, Sin a 1 permaneció intacta durante el tratamiento con SGF, mientras que rOle e 12 fue degradado instantáneamente al añadir la pepsina.

Digestión proteolítica con tripsina

Para completar los estudios de estabilidad de rOle e 12, se realizó un experimento de proteólisis limitada del alérgeno con tripsina que pretendía mimetizar la digestión intestinal de proteínas. Los productos obtenidos tras 3 horas de digestión trípica en condiciones de baja temperatura y baja relación enzima/sustrato se separaron en PAGE-SDS y se visualizaron mediante tinción con azul de Coomassie, y tras transferencia a membrana de nitrocelulosa se estudió la unión de IgE y de IgG a los fragmentos obtenidos, Figura 46.

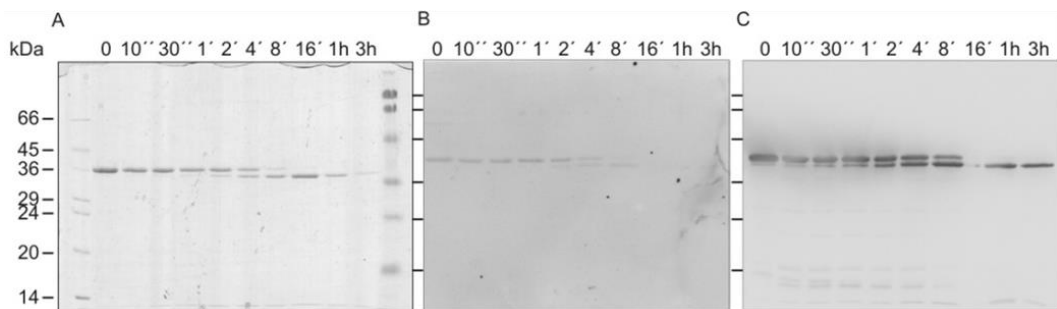


Figura 46: Producto de reacción de digestión con tripsina. A, PAGE-SDS teñido con azul de Coomassie. B, Inmunotransferencia y tinción con sueros de pacientes alérgicos y C, Inmunotransferencia y tinción con pAb rOle e 12.

Como se observa, rOle e 12 es susceptible de degradación proteolítica ya que empieza a degradarse tras el primer minuto de incubación con la tripsina. Tras la tinción con pAb CtOle e 12 se deduce que la proteína se degrada perdiendo principalmente el fragmento Nt de la molécula, puesto que el producto de degradación sigue siendo reconocido a través del Ct. La degradación proteolítica continúa, observándose una disminución de la intensidad del producto de degradación en CBS tras una hora de incubación con la tripsina.

También se realizó el densitometrado de las bandas obtenidas en CBS para ver la relación entre proteína completa y degradada. Al aumentar el tiempo de incubación de

la proteína con tripsina aparece una banda del producto de degradación en detrimento de la banda inicial, Figura 47.

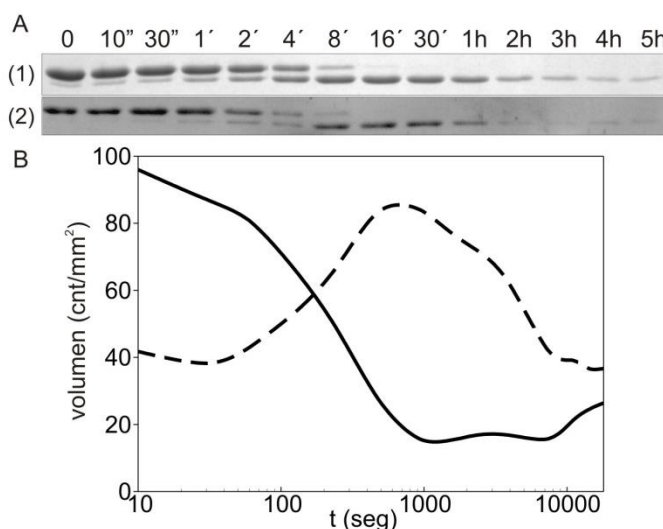


Figura 47: Proteólisis limitada de rOle e 12 con tripsina. A, Alícuotas de rOle e 12 sin digerir y digerido con tripsina a distintos tiempos. (1) CBS; tinción con azul de Coomassie, (2) pAb CtOle e 12; tinción con antisuero policlonal. B, Densitometrado; densidad de la banda (cnt/mm²) frente al tiempo de incubación (seg), (—) proteína inicial, (---) producto de degradación.

Estabilidad térmica

Para evaluar la estabilidad de rOle e 12 se analizaron sus cambios conformacionales en respuesta a variaciones de temperatura. Para ello se monitorizaron los cambios de elipticidad molar a 220 nm durante el calentamiento de la muestra desde 10 °C hasta 80 °C con un incremento de 0.5 °C por minuto, Figura 48. De la forma sigmoidea obtenida tras el calentamiento se puede deducir que la desnaturalización es un proceso cooperativo. Parece una curva con comportamiento bifásico con dos T_m a 25 °C y 40 °C., lo que podría indicar la presencia de un intermediario cinético en la ruta de desplegamiento.

Por último, cuando se volvió a alcanzar los valores iniciales de temperatura (10 °C) se pudo comprobar que rOle e 12 presenta el comportamiento más general de las proteínas, en el que la desnaturalización térmica no es un proceso reversible ya que la proteína no recupera la elipticidad ni la forma inicial del espectro, manteniendo la forma del espectro de la proteína a 80 °C, Figura 48C.

Resultados Familia Isoflavona Reductasa

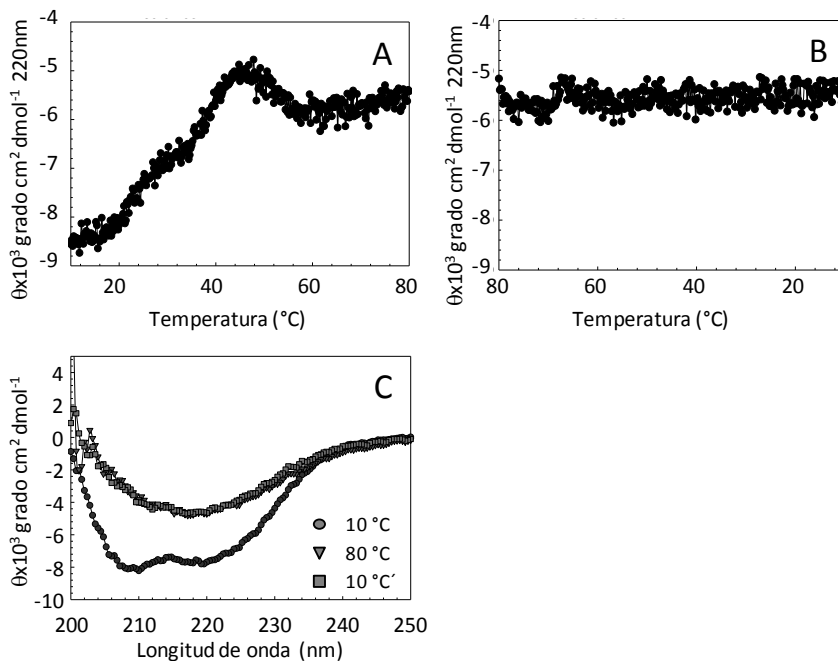


Figura 48: A, Curva de desnaturalización térmica de rOle e 12 desde 10 °C a 80 °C. B, Curva de renaturalización térmica de rOle e 12 desde 80 °C a 10 °C. C, Espectros de dicroísmo circular de rOle e 12 a 10 °C (●), tras calentamiento a 80 °C (▲) y nuevamente después de enfriar a 10 °C (■).

Además de los estudios de estabilidad estructural, se analizó la posible agregación de la proteína por efecto de la temperatura. Para ello se sometió a ésta a tratamientos durante 20 min utilizando distintas temperaturas. Tras la incubación y posterior centrifugación, se registró el espectro de absorción del sobrenadante. Se observó que la absorción disminuía al aumentar la temperatura, Figura 49. El hecho de que la proteína precipite tras tratamientos superiores a 30 °C, podría explicar aparición de la proteína recombinante de forma no soluble al inducir la expresión de la proteína a 37 °C.

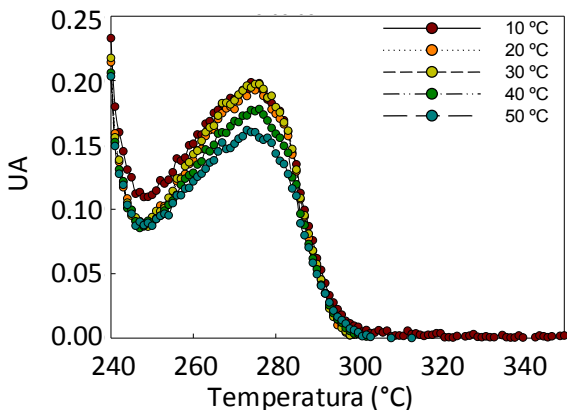


Figura 49: Espectros de absorción del sobrenadante de una disolución de rOle e 12 tras tratamientos térmicos de 20 min.

OLE E 12 COMO RESPONSABLE DE REACTIVIDAD CRUZADA

Identificación de proteínas homólogas en extractos de pólenes y alimentos

Se analizó la presencia de proteínas homólogas y, por tanto, con posibles determinantes antigénicos comunes a los de Ole e 12 en extractos de pólenes de diversas especies de plantas relacionadas y no relacionadas filogenéticamente con el olivo. Además, ya que se han descrito proteínas homólogas a Ole e 12 en otras fuentes alérgicas distintas al polen, como por ejemplo en la pera, también se han incluido en este análisis extractos de alimentos vegetales.

Los extractos de pólenes ensayados fueron: fresno, aligustre, lila, ciprés, quenopodio, salsola, abedul, pino, plátano de sombra, robinia, artemisia y parietaria.

Los alimentos ensayados fueron: soja, pistacho, almendra, avellana, garbanzo, melón, pera, melocotón y aguacate. Estos extractos fueron sometidos a PAGE-SDS y transferidos a membranas de nitrocelulosa sobre las que se realizó la inmunotinción con el suero pAb rOle e 12.

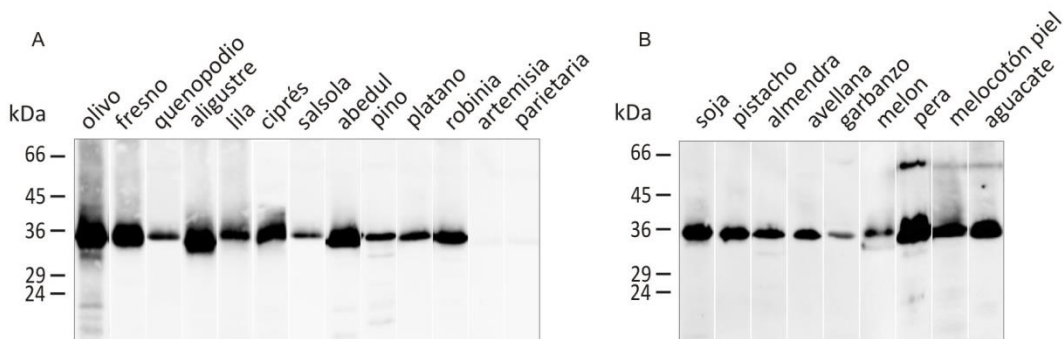


Figura 50 Inmunotinción de distintos extractos con pAb rOle e 12.

Se detectaron proteínas con reactividad significativa en todos los pólenes testados excepto en los de artemisia y parietaria, Figura 50. Las diferencias en cuanto a la intensidad de la señal pueden explicarse sobre la base del grado de similitud de

Resultados Familia Isoflavona Reductasa

secuencia con Ole e 12 (la mayor intensidad de señal aparece en Oleáceas), o, una vez que son reconocidas, debido a diferencias en la abundancia de estas proteínas en cada fuente biológica. En todos los alimentos testados hay reconocimiento por parte de las IgGs, como por ejemplo en pera, donde ya está descrito un alérgeno perteneciente a la familia de las IFR. En la Tabla 6 se muestran datos de porcentajes de identidad de la secuencia de Ole e 12 con otras proteínas de la familia de secuencia conocida.

Tabla 6: % de identidad y/o similitud entre homologas de los pólenes y alimentos utilizados en este experimento. Datos tomados de Tabla 8.

	fresno	quenopodio	abedul	pera
I %	95	75	80	74
S %	97	87	91	88

Estudio de las proteínas homólogas a Ole e 12 en melocotón

Debido a que los pacientes que originaron el objetivo de este estudio se caracterizaban por ser alérgicos a melocotón se analizó la presencia de este alérgeno en el melocotón. La detección se llevó a cabo mediante una inmunotinción de extracto proteico de pulpa de melocotón separada por electroforesis bidimensional y transferido a membrana, e inmunoteñido con pAb rOle e 12. Se observó un patrón de bandas similar al obtenido sobre extracto de polen de olivo, Figura 51.



Figura 51: Electroforesis bidimensional de extracto de melocotón, transferencia a membrana y posterior inmunotinción con pAb Ole e 12.

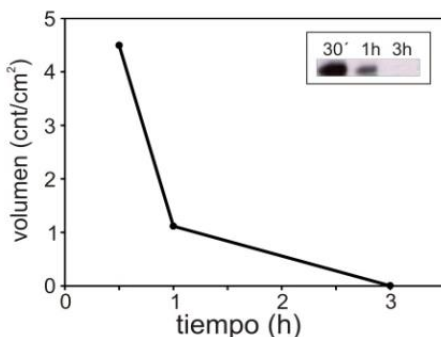
OLE E 12 EN LA FUENTE NATURAL

Purificación de nOle e 12

Paralelamente a la producción de alérgenos recombinantes derivados de proteínas escasas en la fuente biológica, hay que llevar a cabo la purificación y caracterización de la proteína natural con el fin de realizar un estudio comparativo sobre sus propiedades estructurales e inmunológicas y validar así el producto expresado.

En la purificación del alérgeno natural - y más en este caso en el que tenemos una proteína minoritaria - es esencial seleccionar las condiciones óptimas de extracción que permitan asegurar un rendimiento alto para la proteína junto con unas condiciones óptimas para propiciar su estabilidad.

Para determinar el tiempo óptimo se realizó una extracción con agitación a temperatura ambiente (100 mg polen + 2 ml de tampón de extracción con PMSF 1 mM) en la que tras los tiempos de incubación (30 min, 1 h y 3 h) se retiraba el sobrenadante y se añadía de nuevo el mismo volumen de tampón de extracción. El extracto recogido a distintos



tiempos fue sometido a PAGE-SDS, transferencia a membranas y tinción con sueros de pacientes alérgicos a olivo (no reactivos a proteínas de peso molecular parecido: Ole e 9 y/o Ole e 11), Figura 52.

Figura 52: Liberación de Ole e 12 a distintos tiempos de extracción 30 min, 1h y 3h. Tras la inmunotinción se densitometraron las bandas.

Los resultados expuestos en la Figura 52 demuestran que a los 30 min de extracción se libera 4 veces más Ole e 12 que durante la siguiente media hora de extracción posterior, además durante las dos últimas horas de extracción ya no se aprecia liberación de Ole e 12. Por tanto, el aislamiento del nuevo alérgeno de su fuente natural se llevó a cabo a partir del extracto proteico de polen de olivo obtenido tras 1 hora de extracción salina para poder recuperar así el 100% de alérgeno presente en el polen y susceptible de ser extraído en estas condiciones.

Resultados Familia Isoflavona Reductasa

La purificación de la nueva proteína se llevó a cabo empleando como primera etapa una precipitación fraccionada con sulfato amónico en cuatro pasos (1.5 h / 4°C / con agitación magnética en cada paso): 0 % → 20% / 20 % → 50% / 50 % → 70% / 70 % → 100%.

Los precipitados se resuspendieron en 10 ml de BA 20 mM hasta su completa disolución, se dializaron frente al mismo tampón y se sometieron a PAGE-SDS, tiñéndose con Coomassie y con anticuerpo pAb CtOle e 12, cuyos resultados se muestran en la Figura 53.

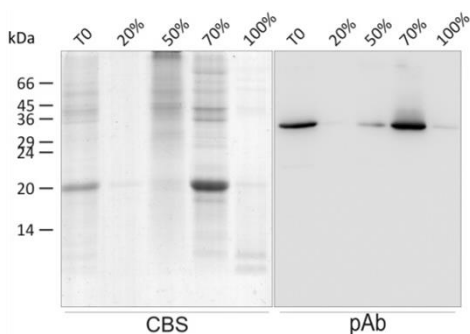


Figura 53: Precipitación fraccionada de extracto de olivo con sulfato amónico. CBS, tinción con azul de Coomassie. pAb, tinción con pAb CtOle e 12, donde TO corresponde al extracto inicial y a continuación los precipitados correspondientes a la saturación son sulfato amónico al 20%, 50%, 70% y 100% (0.1 % de cada lote).

La fracción correspondiente a la precipitación con sulfato amónico al 70% se aplicó en una columna de penetrabilidad de Sephadex G-75, Figura 54. El seguimiento de la proteína se realizó con el antisuero policlonal pAb CtOle e 12.

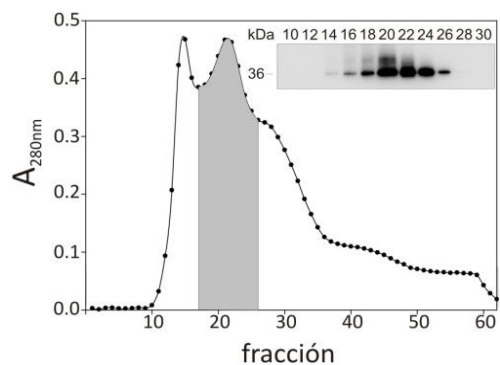


Figura 54: Perfil de elución en Sephadex G-75. El área sombreada corresponde a las fracciones (5 ml) que contenían Ole e 12. Se incluye el análisis mediante PAGE-SDS y tinción con pAb CtOle e 12.

Aquellas fracciones que contenían Ole e 12 se reunieron, se liofilizaron, se resuspendieron en Tris-HCl 50 mM, pH 7.4, NaCl 4 M y se aplicaron en una columna de hidrofobicidad de fenil-sefarosa acoplada a un sistema de FPLC (ÄKTA™purifier) - equilibrada en tampón Tris-HCl 50 mM, pH 7.4, NaCl 4 M - con un gradiente de

concentración de NaCl decreciente comprendido entre 4 y 0 M. El alérgeno Ole e 1, proteína mayoritaria en el polen de olivo, eluye a lo largo de todo el gradiente decreciente de NaCl. Ole e 12 eluyó en Tris-HCl 50 mM, pH 7.4 NaCl 0 M, Figura 55A. La identificación de las fracciones se realizó mediante inmunotinción con pAb rOle e 12, Figura 55B.

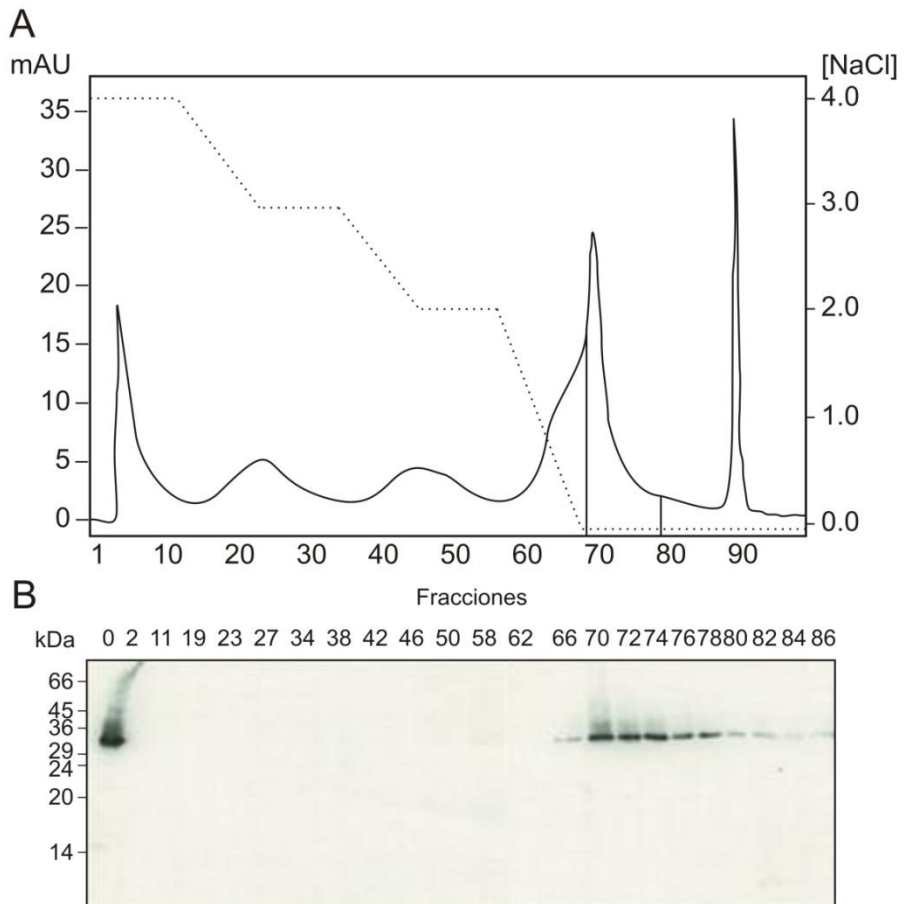


Figura 55: Perfil de elución en fenil-sefariosa obtenido en FPLC. A, el área sombreada corresponde a las fracciones que contienen Ole e 12, como se observa en la inmunotinción con pAb Ole e 12 de las mismas fracciones (B).

La pureza de la proteína purificada se confirmó por medio de electroforesis bidimensional y tinción con plata, Figura 56.

Resultados Familia Isoflavona Reductasa

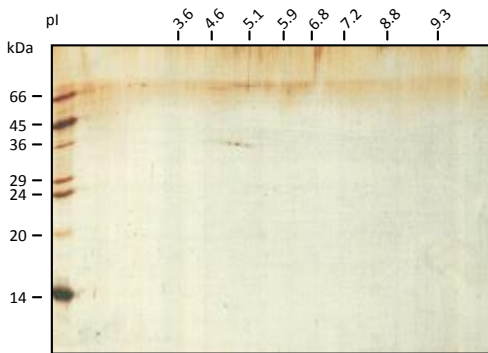
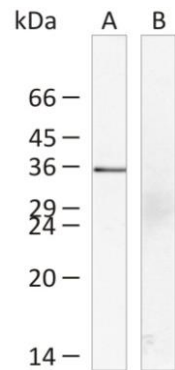


Figura 56: Electroforesis bidimensional de la proteína purificada a partir del polen de olivo.

Se comparó la equivalencia inmunológica de la proteína natural con la recombinante mediante un ensayo de inhibición en membranas, tiñendo con pAb rOle e 12 y empleando como inhibidor rOle e 12, Figura 57.

Figura 57: Inhibición en inmunotransferencia de la unión de pAb rOle e 12 a nOle e 12 transferido a membrana de nitrocelulosa. A, sin inhibidor. B, en presencia de rOle e 12.



Inmunolocalización de Ole e 12 en grano de polen germinado

El estudio de inmunolocalización de Ole e 12 mediante TEM se llevó a cabo en granos de polen de olivo maduro y germinado durante 8 h *in vitro*, Figura 58. Para ello se empleó pAb CtOle e 12 como anticuerpo primario y como anticuerpo secundario anti-IgG de conejo conjugado con oro coloidal de 30 nm.

La Figura 58A corresponde a la visualización al microscopio óptico de un grano de polen germinado donde se aprecia la emergencia del tubo polínico (PT). Las micrografías electrónicas de la Figura 58B-E corresponden a secciones ultrafinas del grano de polen germinado sobre el que se ha realizado la inmunolocalización de Ole e 12 (partículas electrón-densas). El estudio mediante TEM mostró que Ole e 12 se encuentra preferentemente en vesículas de tamaño heterogéneo (200-600 nm de diámetro) en el citoplasma de la célula vegetativa, aunque también se observa marcaje en la zona próxima a la membrana plasmática y en la capa interna (intina) y externa (exina) de la pared celular (Figura 58B y C). De igual forma, se pudo apreciar una acumulación de partículas de oro en la zona de la apertura, correspondiente a la zona de emergencia del tubo polínico, tanto en la pared celular (Figura 58D) como en el citoplasma (Figura 58E). No se detectó marcaje para Ole e 12 en otros compartimentos internos como plastidios

o mitocondrias. En el control negativo, donde se omitió la incubación con el anticuerpo primario, no se detectó marcaje con partículas de oro unidas de forma inespecífica (Figura 58F).

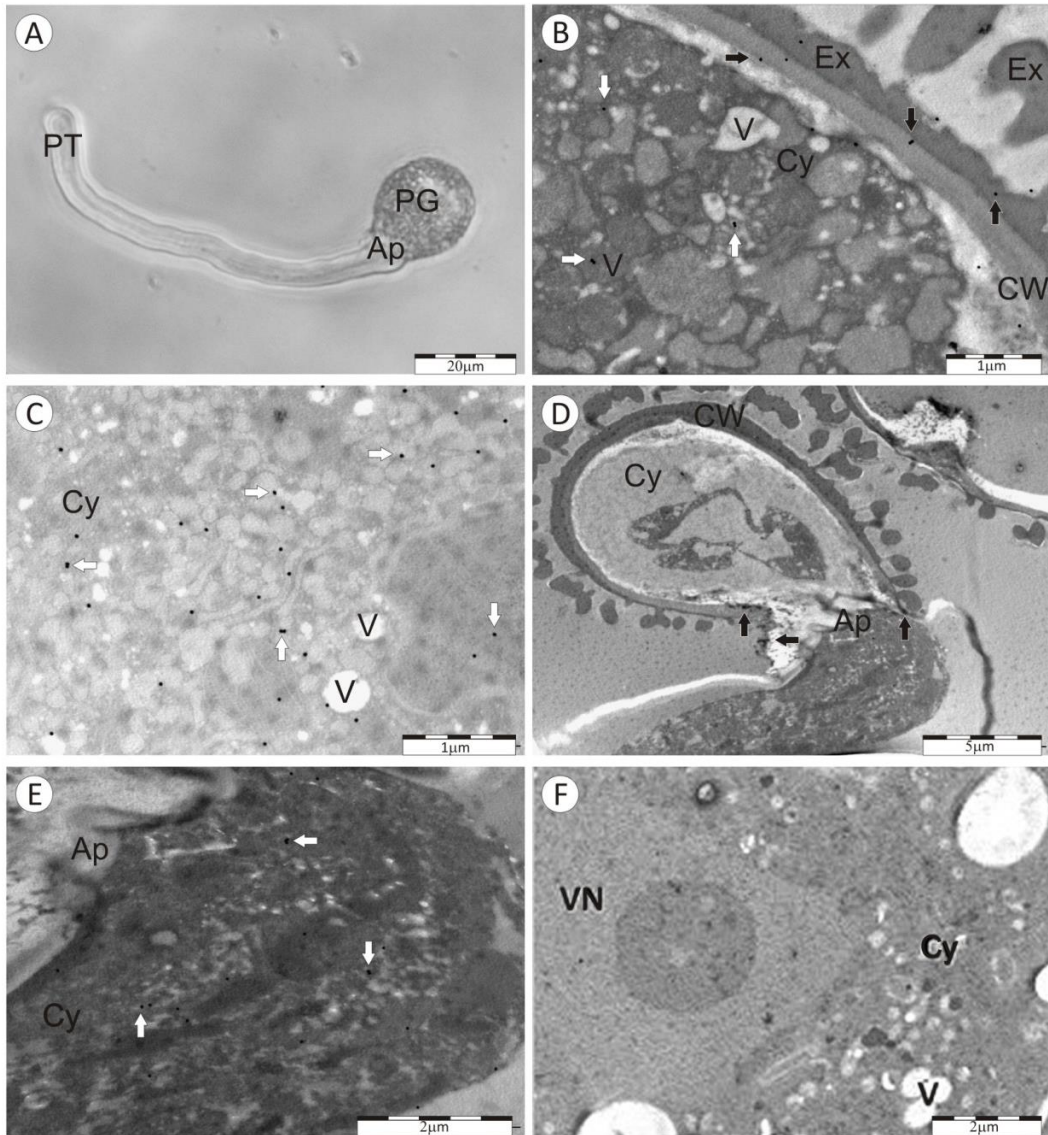


Figura 58: Inmunolocalización de Ole e 12 mediante TEM en secciones ultrafinas de grano de polen maduro y germinado. (A) Micrografía óptica del grano de polen tomada tras 8 h de germinación *in vitro*. (B-E) Micrografías electrónicas del grano de polen de olivo germinado. Las flechas indican la localización de Ole e 12 (partículas de oro). (F) Control negativo realizado en ausencia de anticuerpo primario. Ap, apertura; Cy, citoplasma, CW, pared celular; Ex, exina; PG, grano de polen; PT, tubo polínico; V, vesícula y VN, núcleo vegetativo.

Resultados Familia Isoflavona Reductasa

FRA E 12, PROTEÍNA HOMÓLOGA EN POLEN DE FRESNO

Como se mencionaba en la introducción, la isoflavona reductasa es una proteína muy ubicua que se encuentra en pólenes y alimentos vegetales. Por tanto, puede ser responsable de reactividad cruzada entre distintos pólenes y alimentos. Tal y como se observa en la Figura 50, tras el reconocimiento con un anticuerpo específico para Ole e 12, se observa la presencia de proteínas homólogas en distintos extractos. Queriendo analizar la posible existencia de alérgenos de la familia de proteínas de las IFRs, elegimos pólenes de dos plantas para su estudio, una relacionada filogenéticamente con el olivo –el fresno-, y otra no relacionada, el quenopodio.

DETECCIÓN DE LA PROTEÍNA HOMÓLOGA A OLE E 12 EN FRESNO

Dado que el polen de fresno muestra una alta reactividad cruzada con otros miembros de la familia *Oleaceae* (148-151), y que es un árbol muy común en Europa, podía ser un excelente objeto de estudio de alérgenos homólogos de Ole e 12. En efecto, el fresno se distribuye por el centro de Europa a una altitud de 1500 m, siendo su presencia menor en los países mediterráneos. Su polen, anemófilo, no genera altos niveles atmosféricos, pero en ocasiones puede llegar a concentraciones de 1.000 granos/m³ en algunas áreas tales como Estrasburgo (Francia). En estas zonas puede ser una fuente importante de polinosis, pero sólo recientemente se le ha dado importancia que merece, ya que antes su alergenicidad pasaba desapercibida debido a la coincidencia de la época de polinización con las de gramíneas y abedul, principales causas de la alergia en los países del centro y norte de Europa. Por tanto, presenta un importante interés por su implicación en la reactividad cruzada (165).

La inmunotinción del extracto proteico de polen de fresno con el antisuero policlonal obtenido frente a rOle e 12 originaba una banda que correspondía con el tamaño observado para Ole e 12, Figura 50. La misma inmunotinción, sobre una separación del extracto mediante electroforesis bidimensional da lugar a un patrón de bandas similar al que presentaba Ole e 12 en el polen de olivo, Figura 59.

Resultados Familia Isoflavona Reductasa

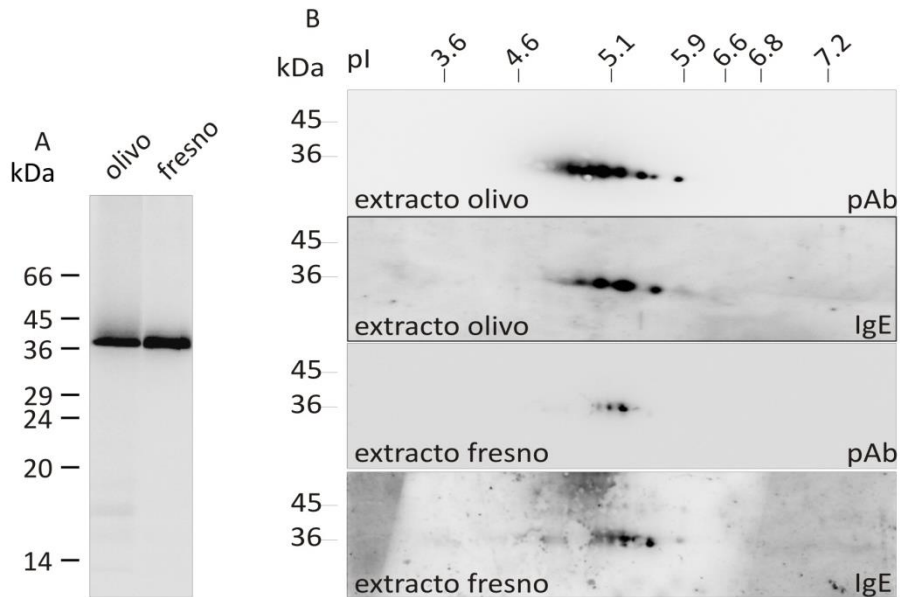


Figura 59: A, Inmunotinción con pAb Ole e 12 de extractos de polen de olivo y fresno aplicados en electroforesis en PAGE-SDS. B, Electroforesis bidimensional de los extractos de polen de olivo y fresno, e inmunotinción con pAb Ole e 12 y con sueros de pacientes alérgicos a Ole e 12.

Ambos extractos presentan respuestas al anticuerpo específico muy parecidas, con un patrón polimórfico, que indicaba la presencia de isoformas de masas moleculares similares, así como puntos isoeléctricos comprendidos en un intervalo entre 4.7 y 5.9. La unión de IgG parece ser más intensa, cualitativa y cuantitativamente, en el extracto de polen de olivo que en el polen de fresno lo que puede indicar una mayor concentración en el polen de olivo y quizás un mayor número de isoformas.

Para establecer la capacidad alergénica de esta proteína se realizó una inmunotinción con sueros de pacientes alérgicos a olivo, confirmándose su capacidad de unión de IgE, Figura 59B. El patrón de reconocimiento de las IgE sobre ambos extractos presenta una estrecha correlación en contenido y en número de manchas, mayor que el que presenta la unión por el anticuerpo policlonal específico de rOle e 12, reconociéndose un mayor número de isoformas en el polen de fresno. Dada esta reactividad a IgE de sueros de pacientes alérgicos, podemos hablar de un alérgeno, al que se ha denominado Fra e 12, presente en polen de fresno.

CLONAJE Y SECUENCIACIÓN DE FRA E 12

El cDNA específico de fresno se obtuvo tras la síntesis de cDNA a partir de RNA total aislado de polen de fresno y posterior amplificación por PCR. La estrategia seguida para el clonaje y la secuenciación de Fra e 12 fue equivalente a la seguida para el Ole e 12, Figura 60, utilizándose en el primer paso los mismos oligonucleótidos empleados para Ole e 12. Todos los oligonucleótidos cebadores empleados en el proceso de PCR se encuentran recogidos en la Tabla 5.

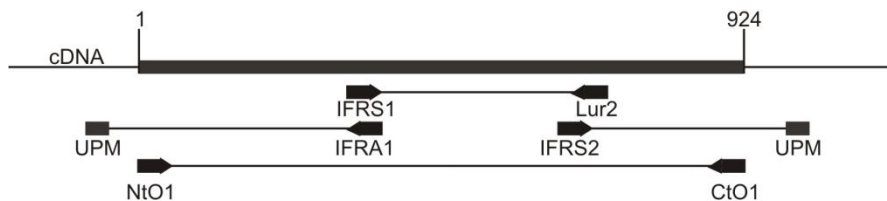


Figura 60: Estrategia de clonaje seguida para Fra e 12.

La Figura 60 muestra la estrategia seguida para el clonaje y la secuenciación del cDNA que codifica Fra e 12. Todos los fragmentos de DNA obtenidos en cada etapa de PCR se clonaron en el vector pCR2.1 utilizando una DNA polimerasa con actividad correctora de pruebas y se secuenciaron. Los dos primeros IFRS1 y Lur2, “sense” y “antisense” respectivamente se utilizaron para obtener una secuencia interna del gen. Aunque estos oligonucleotidos degenerados se obtuvieron a partir de secuencias de olivo, se utilizaron para obtener un primer fragmento de Fra e 12. A partir de ese momento los oligonucleótidos se sintetizaron de acuerdo a las secuencias obtenidas del cDNA de fresno. El extremo 3’ del gen que codifica Fra e 12 se amplificó usando el oligonucleótido IFRS2 y un oligonucleótido no específico, UPM, que hibrida con la región 3’-CDS incluida en la síntesis del 3’cDNA. Por otro lado, el extremo 5’ se obtuvo empleando como cebadores los oligonucleótidos IFRA1 y UPM, que también hibrida con la región del SMART-II previamente incluida en la síntesis del 5’cDNA. La secuencia completa de Fra e 12 se obtuvo con los oligonucleótidos NtD1 y CtD1 y se presenta en la Figura 61. Una vez conocida la secuencia completa de Fra e 12 se diseñaron los oligonucleótidos NtF1 y CtF1 que hibridaban con los extremos 5’ y 3’ de la secuencia codificante respectivamente. Estos oligonucleótidos también contenían los sitios de

Resultados Familia Isoflavona Reductasa

corresponden a una proteína de 308 aminoácidos. Al igual que en el caso de olivo, Fra e 12 no presenta péptido señal, posee un sitio de unión para NADPH, en la misma posición que en Ole e 12 y totalmente conservado en su secuencia de aminoácidos, y tiene un sitio de glicosilación, también en idéntico lugar que en Ole e 12 (posición 266). Además contiene una única cisteína en posición 120, igual que Ole e 12. La masa molecular deducida de la secuencia de aminoácidos resultó ser 33.942 Da y el pI 5.93.

La zona codificante de la proteína en fresno está compuesta de 924 nucleótidos que corresponden a una proteína de 308 aminoácidos. Al igual que en el caso de olivo, Fra e 12 no presenta péptido señal, posee un sitio de unión para NADPH, en la misma posición que en Ole e 12 y totalmente conservado en su secuencia de aminoácidos, y tiene un sitio de glicosilación, también en idéntico lugar que en Ole e 12 (posición 266). Además contiene una única cisteína en posición 120, igual que Ole e 12. La masa molecular deducida de la secuencia de aminoácidos resultó ser 33.942 Da y el pI 5.93.

```

1   atggetgagaaaaccaagatcttggatcgcttggaggaactgggtacattggcaaatccata
   M A E K T K I L I V G G T G Y I G K F I 20
61  gtggaagccagtgcaaaatctggacaccccacttttgctctggctagggagagcacaatt
   V E A S A K S G H P T F A L A R E S T I 40
121 tctgatcctgttaaaggaaaaatcattcagggcttcaagaactcaggtgtcaccatactt
   S D P V K G K I I Q G F K N S G V T I L 60
181 acggcgatatttatatgatcatgagagcttggtgaaagctataaagcaggtggatgtgggt
   T G D L Y D H E S L V K A I K Q V D V V 80
241 atctcaacagttgggtcaacttcaattaactgatcaagttaagatcattgctgccattaaa
   I S T V G Q L Q L L T D Q V K I I A A I K 100
301 gaagctggaaatgttaagagattcttccatcggagtttggaactgacgtagatcgatgt
   E A G N V K R F F P S E F G T D V D R C 120
361 cacgctgtggagccagccaagtcttctgagatcaagtcccaaatcgagggccatc
   H A V E P A K S S F E I K S Q I R R A I 140
421 gaggcagaaggaattccttacaccttggatcagctaactactttgcaggctattccctt
   E A E G I P Y T F V S A N Y F A G Y S L 160
481 ccgacgctggtgcagccagaagtcaactgctccacccagagataaagtcattatcttaggc
   P T L V Q P E V T A P P R D K V I I L G 180
541 gatggaaatgccaaagctgttttcaatgaggaaagcgacattggcacgtacaccatcaaa
   D G N A K A V F N E E S D I G T Y T I K 200
601 gctgtggatgacccaagaacattgaacaaaatcctctacatcaagcctcctaaaaacata
   A V D D P R T L N K I L Y I K P P K N I 220
661 tattcattcaatgaacttggtgctttgtgggagaagaagattggtaaaaccctagagaaa
   Y S F N E L V A L W E K K I G K T L E K 240
721 atttatgtaccagaggaacaagtctcaaacagattcaagaaatccttttcccatcaat
   I Y V P E E Q V L K Q I Q E S P F P I N 260
781 attgtaatggcaatcaaccacacagcattttgtgaagggtgatctgactaatattaaaatc
   I V M A I N H T A F V K G D L T N I K I 280
841 gaaccatcttttggagttgaggcttcagagctttatccagatgttaatacaccactgtg
   E P S F G V E A S E L Y P D V K Y T T V 300
901 gaggagtcccttaataatattgttttaa
   E E S L N Q F V - 308

```

Figura 61: Secuencia de nucleótidos y de aminoácidos de Fra e 12. En naranja se encuentra el motivo de unión de NADPH G¹¹-X-X-G¹⁴-X-X-G¹⁷. En morado aparece la única cisteína y en azul el sitio potencial de Nglicosilación.

La secuencia obtenida es muy similar a la de olivo con porcentajes de identidad y de similitud de secuencia de 95% y 98% respectivamente. En el polen de fresno fue posible detectar dos clones con secuencias distintas de aminoácidos para Fra e 12 que se diferenciaban únicamente en el residuo 217, siendo en un clon prolina y en otro arginina. Este cambio podría justificar la presencia de alguna isoforma con distinto pl en las separaciones bidimensionales del extracto proteico del polen. De hecho al obtener los parámetros físico-químicos de ambas secuencias en el programa ProtParam, se observa que poseen distintos pl teóricos, 6.17 para el clon 6, y 5.93 para el clon 5. Ambos clones presentan una masa molecular teórica de 33.9 kDa. Fue el clon 5 con prolina en la posición 217 el que se utilizó para la expresión.

ANÁLISIS A PARTIR DE LA ESTRUCTURA PRIMARIA DE FRA E 12

Predicción de estructura secundaria

Al igual que para Ole e 12, la predicción de estructura secundaria de Fra e 12 se llevó a cabo en base a la estructura primaria y aplicando el método de Jones (129), incluido en el servidor PSIPRED, Figura 62.

Los valores obtenidos fueron: 34% de hélice α (105 residuos/308), 15% de lámina β (47/308) y 51% de ordenación aperiódica (156/308).



Figura 62: Predicción de estructura secundaria de Fra e 12 según el modelado de Jones, mostrándose la hélice α (h, azul), lámina β (e, rojo), y ordenación aperiódica (c, rosa). Se colorean los residuos que forman parte de la hélice α (azul), o lámina β (rojo) en la estructura tridimensional (Figura 64), empleando como molde la estructura tridimensional de la cadena B de la PCBER PT1 procedente de *Pinus tadea* (163).

Predicción de hidrofobicidad y antigenicidad

A partir de la secuencia de aminoácidos de Fra e 12 se ha obtenido su perfil de hidrofobicidad según el programa descrito por Kyte (149), Figura 63.

La predicción de antigenicidad se llevó a cabo mediante el método de Welling (150). Se determinan 5 regiones potencialmente antigénicas que coinciden exactamente con las predichas para Ole e 12, entre las posiciones de la secuencia: 25-35, 63-76, 118-126, 200-208 y 290-298, Figura 63.

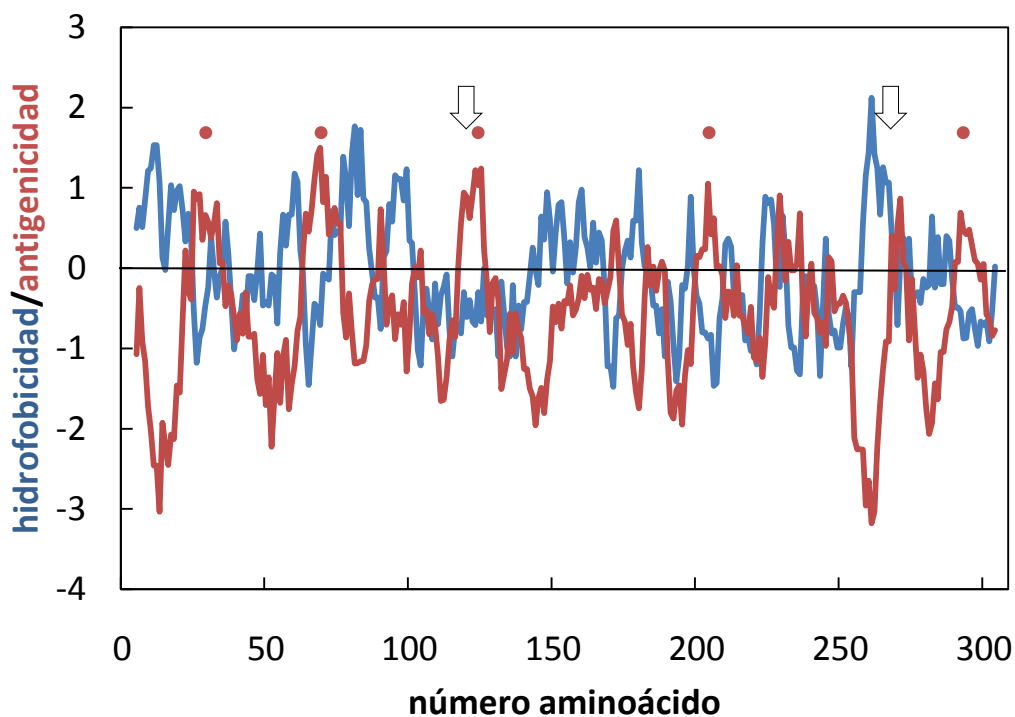


Figura 63: Representación de las predicciones teóricas de hidrofobicidad y antigenicidad sobre la secuencia de Fra e 12. En color azul, se presenta el perfil de hidrofobicidad según Kyte y Doolittle (149), en rojo, el de antigenicidad según Welling (150). Los puntos rojos indican las zonas potencialmente más antigénicas. Flecha en posición 120 indica la posición de la cisteína y flecha en posición 266 localiza el potencial sitio de glicosilación.

Predicción de estructura terciaria de Fra e 12

El análisis teórico de la estructura tridimensional de esta proteína se realizó tomando como molde la estructura tridimensional de la cadena B de la PCBER PT1 de *Pinus tadea* (163), Figura 64. Una vez obtenida la estructura terciaria de Fra e 12, se seleccionaron

los residuos dados por la predicción de antigenicidad, Figura 63. Estos se encuentran situados en zonas exteriores de la molécula siendo así más accesibles a las IgG que los reconocen.

A la vista de esta estructura se deduce que la identidad de secuencia observada entre Ole e 12 y Fra e 12 se traduce también en una estructura terciaria muy similar, presentando motivo estructural del tipo beta-alfa-beta - láminas β paralelas unidas mediante una hélice α - y la misma disposición del motivo de unión de NADPH, Figura 64, de tal forma que las zonas potencialmente antigénicas obtenidas mediante el método de Welling (Figura 63) se sitúan de la misma forma en la estructura, Figura 65.

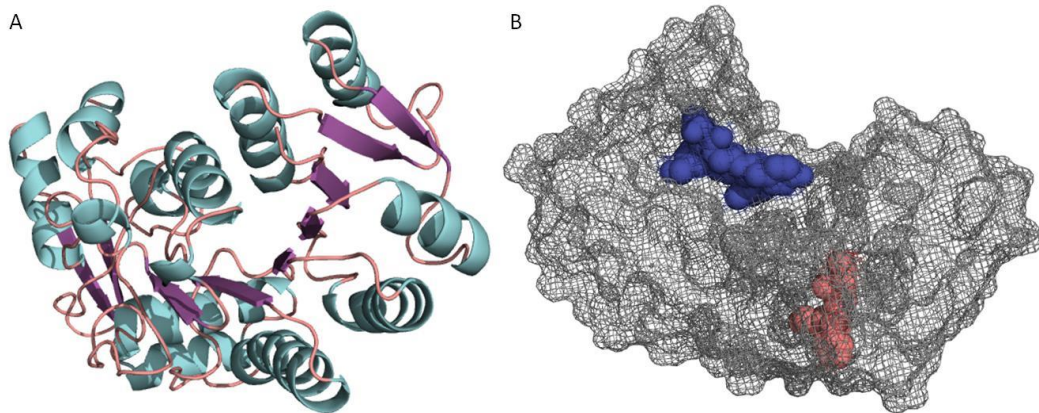


Figura 64: Modelo teórico de la estructura terciaria del alérgeno Fra e 12 Swiss-Model. A, tipos de estructura secundaria presente en el alérgeno. Azul: hélice α , morado: lámina β , rosa: aperiódica. B, superficie de Fra e 12 con sitio de unión para NADPH situado entre residuos 11 y 17 en azul, y potencial sitio de glicosilación en rojo.

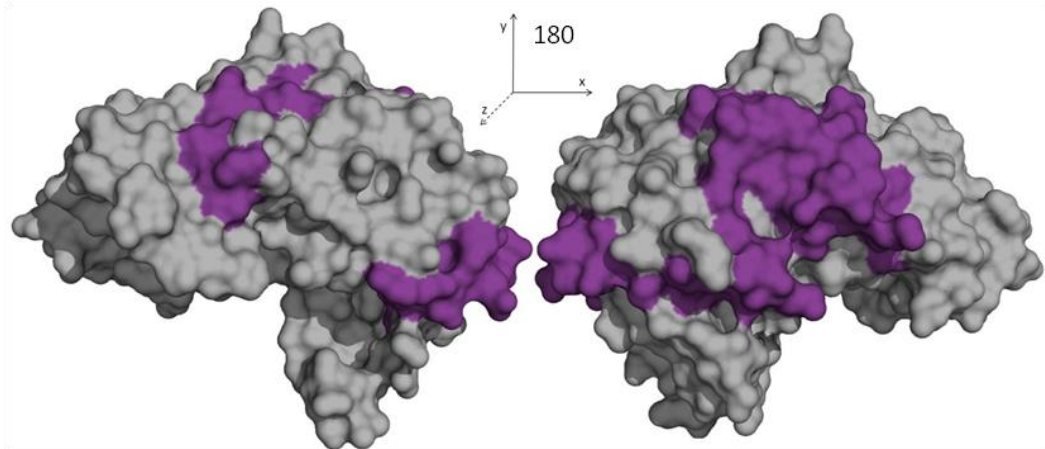
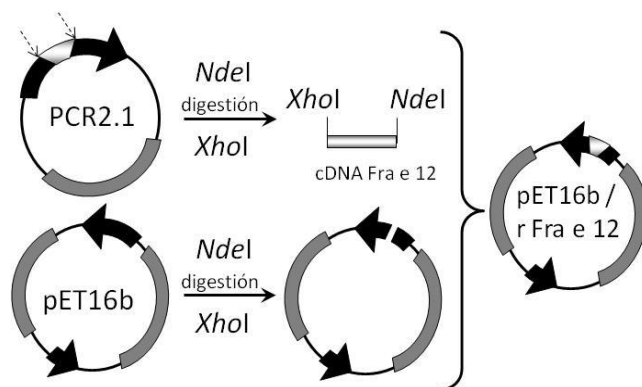


Figura 65: Modelo teórico de la estructura terciaria del alérgeno Fra e 12 por Swiss-Model, con las predicciones teóricas de las regiones antigénicas en la Figura 63: 25-35; 63-76; 118-126; 200-208; 290-298.

EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE

Para la expresión de la proteína se siguió la misma estrategia empleada en el caso de Ole e 12 ya que se trata de dos proteínas con unos parámetros moleculares muy parecidos. Además, se utilizó el mismo vector de expresión, pET16b, que permite la purificación de la proteína mediante cromatografía de afinidad en columnas de Niquel-sefarosa ya que añade en el extremo Nt una secuencia de 10 histidinas. La ligación se



realizó empleando los sitios de corte *NdeI* y *XhoI* que están contenidos en la conexión del vector y que se encuentran en fase con el promotor T7 inducible por IPTG, Figura 66.

Figura 66: Etapas requeridas para la expresión de rFra e 12 en el vector pET16b.

El plásmido recombinante se subclonó en células DH5 α que tras su crecimiento y posterior purificación del plásmido recombinante, se subclonó en células BL21(DE3) de *E. coli*. Tras la obtención de la colonia que producía la proteína en condiciones óptimas y las pruebas de expresión, Figura 67A, se escogieron como condiciones de expresión 8h de crecimiento a 25 °C, y posterior inducción con IPTG 0.4 mM durante 8h.

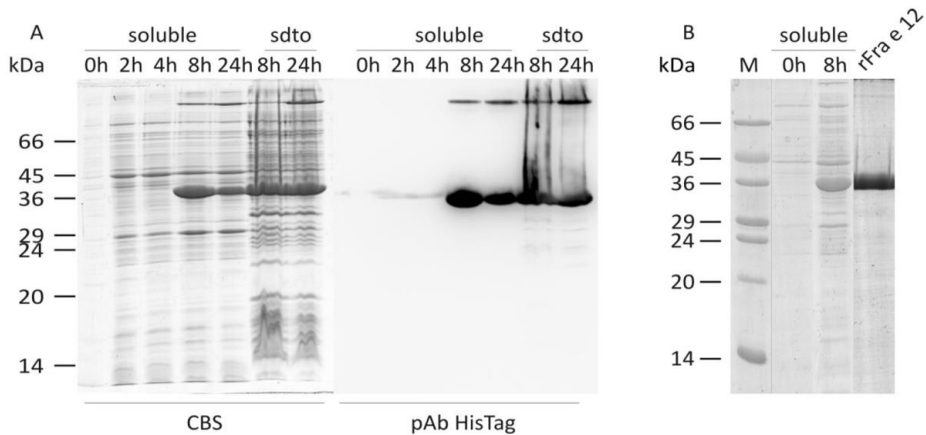
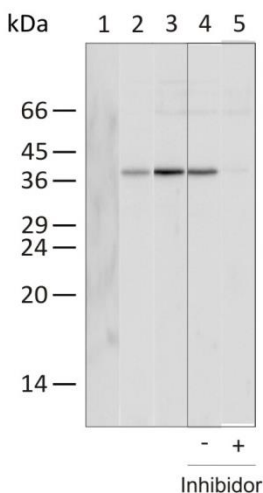


Figura 67: A, Pruebas de expresión de Fra e 12 en células BL21 (DE3). Tinción con CBS y con policlonal pAb His-Tag. B, CBS tanto de los extractos bacterianos como de la purificación de rFra e 12

Tras la ruptura de la membrana celular mediante dos ciclos de tratamiento de frío a -80°C y de calor a 42°C , se separó el sobrenadante que contenía la proteína recombinante soluble del lisado celular. El sobrenadante se dializó frente Tris-HCl 50 mM, pH 7.4 y, ante la tendencia de la proteína a agregar al igual que le ocurría a rOle e 12, se sometió a la proteína a un tratamiento con yodoacetamida 120 mM con el fin de bloquear el residuo de cisteína y evitar así la formación del dímero y agregados. La proteína recombinante se purificó en una única etapa cromatográfica empleando una columna HisTrap FF crude, en un sistema Äkta Purifier (FPLC) en la que la proteína pura eluía a una concentración de 200 mM de imidazol, Figura 67B.

EQUIVALENCIA INMUNOLÓGICA CON OLE E 12

El reconocimiento de la proteína por IgE y su equivalencia inmunológica con rOle e 12 se llevó a cabo con sueros de pacientes alérgicos a fresno procedentes de Estrasburgo, donde el fresno es el mayor representante alergénico de la familia de las Oleáceas y el segundo agente polínico sensibilizante después del abedul. Para llevar a cabo los ensayos de inhibición se empleó una mezcla de los sueros, Figura 68.



Resultados Familia Isoflavona Reductasa

Figura 68: Inhibición de la unión a rFra e 12 (0.5 µg) de IgE de sueros de pacientes alérgicos a fresno. 1, suero de individuo no atópico; 2, suero de paciente A; 3, suero de paciente B; 4, mezcla de sueros de pacientes A y B (mezcla A+B); 5, mezcla A+B incubado previamente con rOle e 12 (5 µg).

La reactividad cruzada entre rOle e 12 y rFra e 12 queda confirmada por un bloqueo prácticamente total de la señal cuando rOle e 12 se usa como inhibidor.

PROTEÍNA HOMÓLOGA EN POLEN DE CENIZO (*CHENOPODIUM ALBUM*)

DETECCIÓN DE LA PROTEÍNA HOMÓLOGA A OLE E 12 EN *CHENOPODIUM ALBUM*

A partir de los resultados mostrados en la Figura 50 se analizó la posible existencia de una isoflavona reductasa alergénica en el polen de miembros de la familia de las quenopodiáceas.

Mediante el uso de este anticuerpo policlonal se detectó una banda, en ambos extractos de quenopodiáceas analizados (quenopodio y Salsola), capaz de unir IgG y que corresponden con el tamaño observado en el extracto proteico del polen de olivo.

CLONAJE Y SECUENCIACIÓN DE CHE A 12

El cDNA específico se obtuvo tras la síntesis de cDNA a partir de RNA total aislado de polen de *Chenopodium album* y amplificación por PCR. Todos los oligonucleótidos cebadores empleados en el proceso de PCR se encuentran recogidos en la Tabla 5.

La Figura 69 muestra la estrategia seguida para el clonaje y la secuenciación del cDNA que codifica Che a 12. Todos los fragmentos de DNA obtenidos en cada etapa de PCR se clonaron en el vector pCR2.1 y se secuenciaron.

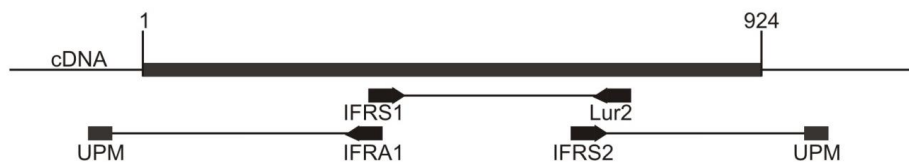


Figura 69: Estrategia de clonaje seguida para Che a 12

La estrategia de clonaje fue igual a la seguida para Fra e 12. La secuencia codificante está compuesta por 924 nucleótidos que corresponden a una proteína de 308 aminoácidos. Al igual que en el caso de la Oleáceas, Che a 12 no presenta péptido señal, y posee el sitio de unión de NADPH en la misma posición que en Ole e 12 y Fra e 12,

totalmente conservado en su secuencia. La principal diferencia que presenta con respecto a Ole e 12 y Fra e 12, es la ausencia del único residuo de cisteína en la posición 120, aunque en uno de los clones apareció una cisteína en posición 65.

A diferencia de lo que ocurría en el polen de olivo, en el de cenizo fue posible detectar hasta tres secuencias distintas de aminoácidos para Che a 12 que se diferenciaban hasta en cuatro residuos, Figura 70.

	20	40	60	
LC1	MAEKSILVIGGTGYIGKFFVVEASAKEGHPTFALVRNETLSNPAKASIIDNFKSLGVNLVSGDVYDHESLVKAIKQV	77		
LC3	77		
LC2L...C.....	77		
	80	100	120	140
LC1	DVVISTVGYLLADQVKIIDAIKEAGNIKRFFPSEFGVDVDRTSAVEPAKSTFAIKSQIRRSVEAAGIPYTYVSSNN	154		
LC3	154		
LC2	154		
	160	180	200	220
LC1	FAGYFLPSFSQPGATAPPRDKVVILGDGNAKAVYNKEDDIGTYTIRAVDDPRTLKILYIKPAGNILSFNELVSLWE	231		
LC3	231		
LC2A.....	231		
	240	260	280	300
LC1	KKTGKTLEKEYVPEEQVLKNIQDSDPPVNVILAIGHAVFVRGDQTNFEIEPSFGVEASELYPDVKYTSVDEYLNQFV	308		
LC3	..I.....	308		
LC2	..I.....	308		

Figura 70: Secuencias de aminoácidos deducidas de los distintos clones de la isoflavona reductasa de cenizo.

Al obtener los parámetros físico-químicos teóricos de las tres secuencias en el programa ProtParam se observan diferencias en la masa molecular deducida (33700.3, 33664.4 y 33712.4) pero no en el pI (5.3), puesto que no hay ninguna variación que suponga cambios en la carga de los residuos.

Predicción de estructura secundaria

Al igual que para Ole e 12, la predicción de estructura secundaria de Che a 12 se llevó a cabo en base a la estructura primaria del clon LC1 y aplicando el método de Jones (148), incluido en el servidor PSIPRED, Figura 71.

Resultados Familia Isoflavona Reductasa

```

      *           *           *           *           *           *
MAEKSKILVIGGTGYIGKFVVEASAKEGHPTFALVRNETLSNPAKASIIDNFKSLGVNLVSGDVYDHE 68
Cccccccccccccchhhhhhhhhccccccccccccccccchhhhhhhhhccccccccccccchh

      *           *           *           *           *           *
SIVKAIKQVDVVISITVGYLLADQVKIIDAIKEAGNIKRFPSEFGVDVDRITSAVEPAKSTFAIKSQI 136
Hhhhhhccccccccccccchhhhhhhhhhhhhhhccccccccccccccccccccccccchhhhhhhhh

      *           *           *           *           *           *
RRSVEAAGIPYTYVSSNNFAGYFLPSFSQPGATAPPRDKVVILGDGNAKAVYNKEDDIGTYTIRAVDD 204
Hhhhhhccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccchhhhhhhhhhhccc

      *           *           *           *           *           *
PRTLNKILYIKPAGNILSFNELVSLWEKKTGKTLEKEYVPPEQVLKNIQDSPPVNVILAIGHAVFVR 272
Cccccccccccccchhhhhhhhhhhhhhhccccccccccccccccccccccccccccchhhhhhhhhhhhhhhc

      *           *           *
GDQTNFEIEPSFGVEASELYPDVKYTSVDEYLNQFV 308
ccccccccccccccccccccccccccccccccchhhhhhhhhc

```

Figura 71: Predicción de estructura secundaria de Che a 12, mostrándose la hélice α (h, azul), lámina β (e, rojo), y ordenación aperiódica (c, rosa). Se colorean los residuos que forman parte de la hélice α (azul), o lámina β (rojo) en la estructura tridimensional.

Los valores obtenidos a partir de la predicción de estructura secundaria fueron 36% de hélice α (112/308), 14% de lámina β (42/308) y 50% de ordenación aperiódica (154/308).

Predicción de hidrofobicidad y antigenicidad

A partir de la secuencia de aminoácidos de Che a 12 se ha obtenido su perfil de hidrofobicidad según el programa descrito por Kyte (149), Figura 72.

La predicción de antigenicidad se llevó a cabo mediante el método de Welling (150). Se predicen 5 regiones potencialmente antigénicas que coinciden aproximadamente con las predichas para Ole e 12/Fra e 12: 22-30, 63-76, 118-127, 229-240 y 290-300, Figura 72.

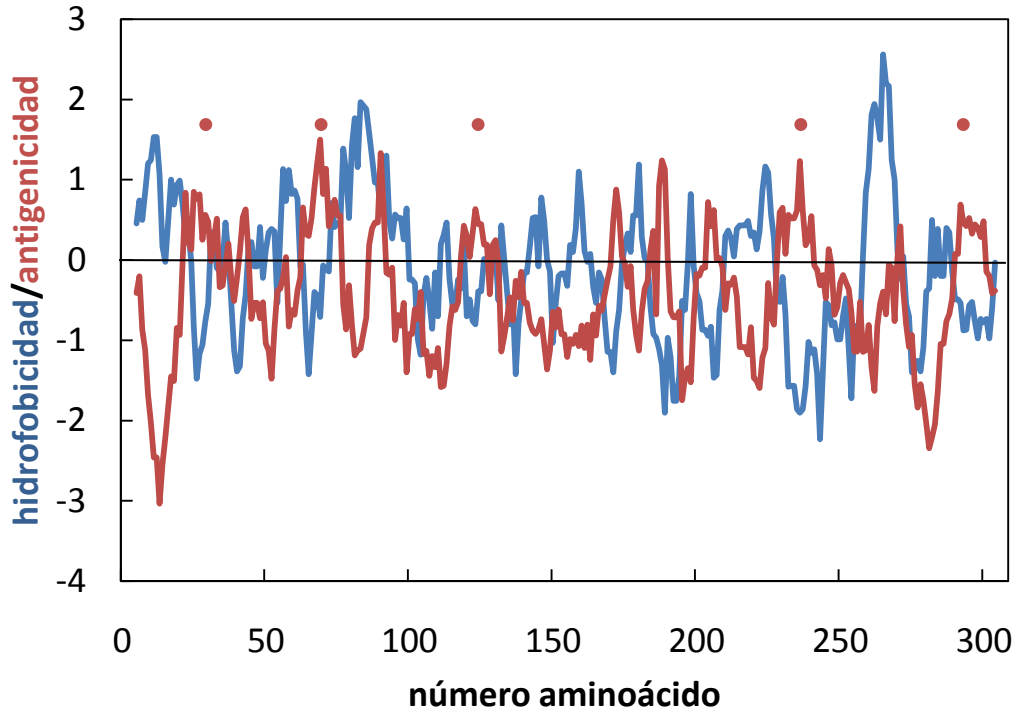


Figura 72: Representación de las predicciones teóricas de hidrofobicidad y antigenicidad sobre la secuencia de Che a 12. En color azul, se presenta el perfil de hidrofobicidad según Kyte y Doolittle (149), en rojo, el de antigenicidad según Welling (150). Los puntos rojos indican las zonas potencialmente antigénicas.

Predicción de estructura terciaria de Che a 12

El análisis teórico de la estructura tridimensional de esta proteína se realizó de nuevo tomando como molde la estructura tridimensional de la cadena B de la PCBER PT1 de *Pinus tadea* (163), Figura 73. A la vista de esta estructura se deduce que la identidad de secuencia observada entre Ole e 12 y Che a 12 se traduce también en una estructura terciaria muy similar, presentando el motivo estructural del tipo beta-alfa-beta.

Una vez obtenida la estructura terciaria de Che a 12, se seleccionaron los residuos dados por la predicción de antigenicidad (Figura 72). Estos se encuentran situados en zonas exteriores de la molécula siendo así más accesibles a las IgG que los reconocen, Figura 74.

Resultados Familia Isoflavona Reductasa

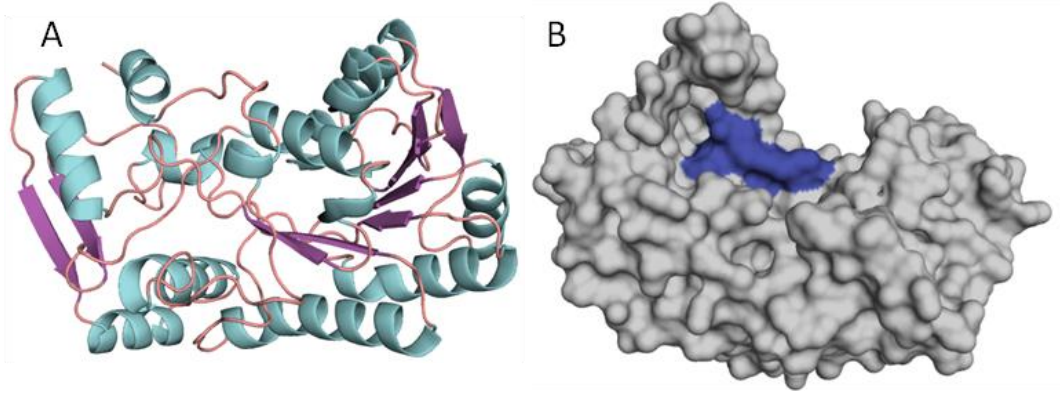


Figura 73: Modelo teórico de la estructura terciaria de la IFR de quenopodio, Che a 12, por Swiss-Model. A, tipos de estructura secundaria presente en el alérgeno: azul, hélice α ; morado, lámina β ; rosa, aperiódica. B, superficie de Che a 12 y sitio de unión de NADPH situado entre residuos 11 y 17.

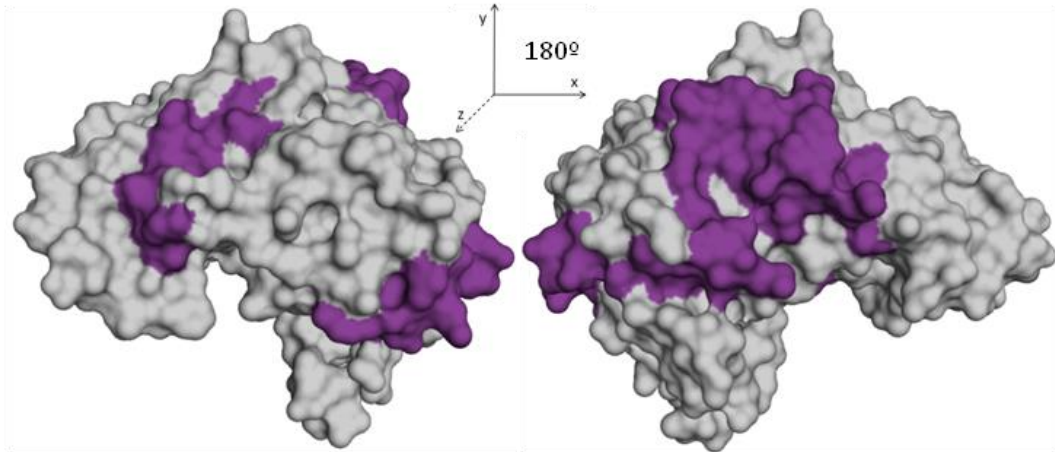


Figura 74: Asignación de las regiones antigénicas predichas en la Figura 63 sobre el modelo teórico de la estructura terciaria de la IFR de quenopodio, Che a 12, Swiss-Model, con las predicciones teóricas de las regiones antigénicas: 22-30, 63-76, 118-127, 229-240 y 290-300.

IDENTIFICATION OF A NEW POLLEN ALLERGEN IN OLIVE POLLEN

The higher and higher incidence of allergic diseases for some decades now -30% of the population in industrialized countries (166), makes the detection, isolation and characterization of allergens a key goal in this field of study. The diagnosis and the immunotherapy require a complete and thorough knowledge, of the molecules responsible for the allergic processes. So it is necessary to understand the whole panel (allergogram) of olive pollen allergens from the most relevant, i.e. those that are recognized by over 50% of patients allergic to olive (major allergens), to the minor ones, not less important for being recognized by a small number of patients, because they can cause very severe symptoms.

The olive pollen allergogram is very complex, since it presents a large number of protein bands recognized by the IgE of allergic patients, as observed in immunoblotting experiments, Figura 4. There is great heterogeneity in the recognition of proteins by the IgE on the entire range of molecular sizes. Until the beginning of these studies a total of eleven olive pollen allergens have been identified, isolated and characterized, and they can be classified into three groups according to their MM:

- Low MM (5-10 kDa): Ole e 3, Ole e 6, Ole e 7 y Ole e 10
- Intermediate MM (16-20 kDa): Ole e 1, Ole e 2, Ole e 5 y Ole e 8
- High MM: Ole e 9 (46 kDa) y Ole e 11 (42 kDa)

plus an allergen in olive fruit , a thaumatin-like protein (Ole e 13) (25, 69).

The allergogram varies greatly depending on the populations studied. Areas such as Madrid, other regions of the plateau and of northern Spain have already been analyzed and determined that although their olive pollen levels counts are relatively low, the major allergen, Ole e 1, is the main inducer involved in the sensitization of these patients. Notwithstanding, in areas of high incidence of olive pollen such as Córdoba and Jaen, where pollen counts can reach values over 4000 grains/m³, the prevalence of certain allergens, regarded as minor allergens in areas of low pollen counts -such as Ole e 7, Ole e 9 and Ole e 11-, increases (20). In addition, other allergens which are minor in

these areas can increase their prevalence to be involved in certain associations with other allergen sources. Despite the very high number of allergenic molecules that have already been characterized in the olive pollen, there are still proteins (as seen in the allergogram panels) recognized by the IgEs of patients which are not identified, among which we can stand out some of high molecular mass.

However, immunoblot experiments with individual sera of allergic patients demonstrate the existence of new allergenic bands, some of them with high molecular mass. They may not have been detected yet, probably because its presence is masked by other major allergens as Ole e 1 (20 kDa) and its dimer form (40 kDa), Ole e 9 (46.4 kDa) and Ole e 11 (39.4 kDa).

In general, the allergen profile of patients, primarily sensitized to olive pollen, exhibits a complex pattern of protein bands recognized by the IgE in the whole range of molecular masses depending on the pollen levels in contact with the patient, Figura 4. While bands corresponding to Ole e 1 -an *Oleaceae* sensitization marker (110)- are the most frequent in olive allergic patients, the profile of patients who have reported allergic symptoms to peach but they are also pollinic, presents a different pattern, Figura 9. It is mainly recognized high molecular weight bands and many of them do not have specific IgE against Ole e 1. This suggests that these patients were not sensitized to olive as the primary source, but to a peach allergen, and therefore the olive protein recognition is due to cross-reactivity between common epitopes from homologous proteins present in both sources, being possible a consequence of food intake.

In recent years the application of different proteomic techniques, Figura 75, has been recognized as an excellent approach to identify novel allergens (37, 167, 168). In this work, the study of a new allergen in olive pollen has been approached using techniques that improve both sensitivity and specificity, for example by using 2D-EF and specific antibodies, both IgG and IgE antisera, enabling a more comprehensive analysis of protein profiles.

Discusión Familia Isoflavona Reductasa

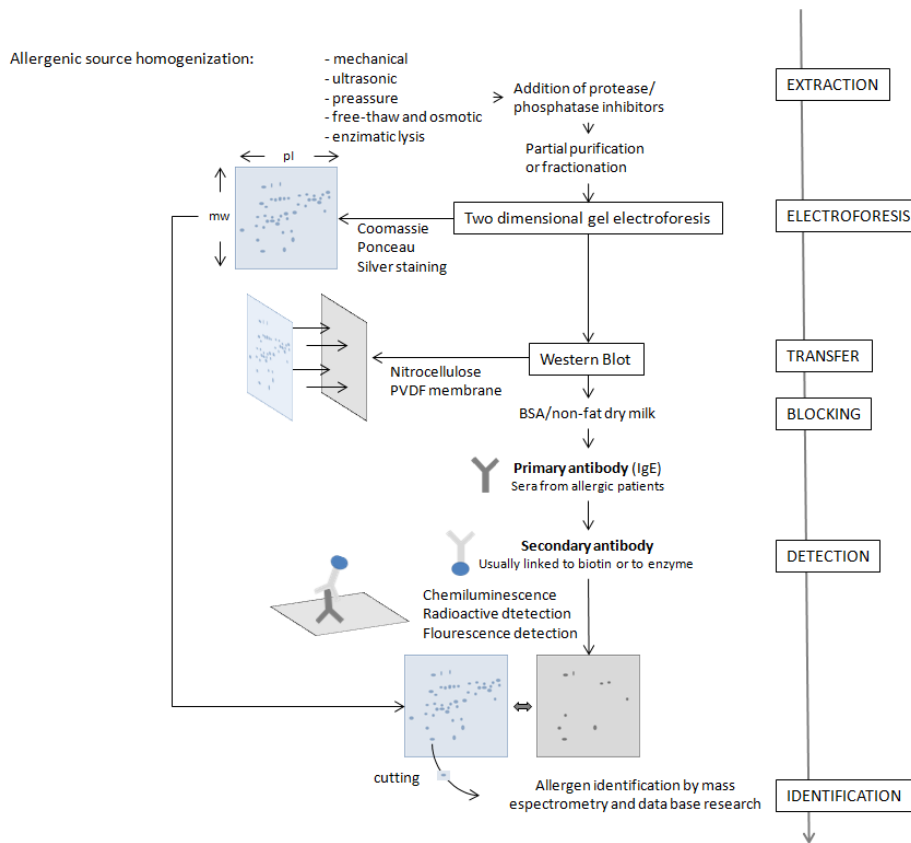


Figura 75: Flowchart of proteomic study

Following scheme shown in Figura 75, after detection with selected sera there were identified spots of protein capable of binding IgE, which had different kDa / pI coordinates, compared to similar molecular mass allergens already described: Ole e 1, Ole e 9 and Ole e 11. Apparently a series of six spots, Figura 10B, suggest the presence of several different allergens or serie of isoforms from a single allergen. In both cases other than those already identified, Figura 10 C, D and E. In 2D-EF these high molecular mass bands result in IgE-binding spots showing a molecular mass of 35 kDa and pI ranged in 4.6-5.9.

MS also allowed confirming that these high molecular weight bands did not correspond to olive pollen allergens with molecular masses located in that area of 2D-EF, previously identified, but it was also able to identify these bands as a protein homologous to other

allergens not yet described in the olive pollen. This is the case of Ole e 12, the new allergen presented here.

Ole e 12 shows homology with the protein family of IFR-like, a highly conserved protein family that presents 84% degree of sequence identity among their members (101). The isoflavone reductases members constitute a large family of proteins involved in the biosynthesis of many metabolites of phenyl propanoid route, with key roles in defense and health, such as isoflavones and lignans in vascular plants. In this large family two subgroups homologous to the IFR can be found: pinoresinol-lariciresinol (PLR) and phenylcoumarin benzylic ether reductases (PCBER) (169). Several proteins from these groups named IFR-like have been described as allergens: Bet v 6, in birch pollen (102) and Pyr c 5, pear (103). It has been observed high sequence identity between all these species. It could explain the observed cross-reactivity processes.

CLONING AND SEQUENCING OF IFR HOMOLOGOUS ALLERGENS

The difficulties encountered during the purification of Ole e 12 from its natural source, raised the prior objective to know its amino acid sequence. This approach would firstly allow obtaining an accurate knowledge of its sequence and physicochemical characteristics. This fact might contribute:

- a. to indicate the procedure for its purification from the natural source, and
- b. to obtain the recombinant protein, in order to have it as a single species that retains the antigenic and allergenic properties of the natural counterpart.

The possibility to obtain a large number of allergens as recombinant molecules with homogeneous and high performance has been achieved by recombinant DNA technology. This makes it easier to perform molecular and immunological characterization. Moreover, the availability of a well-defined allergen opens up new ways to design highly specific diagnosis as well as an immunotherapy customized for the patient, besides presenting multiple applications at the level of basic research (8, 113, 170-172).

The determination of the amino acid sequence of Ole e 12 was approached by PCR cloning. Specific cDNA for Ole e 12 was obtained after the synthesis of cDNA from total

Discusión Familia Isoflavona Reductasa

RNA isolated from olive pollen. Although the process of cloning and protein sequencing was initiated with degenerate oligonucleotides, that would permit less specific selection of sequences, it was only possible to identify one amino acid sequence from the cDNA obtained. That made it impossible to hypothesize about whether the polymorphism observed in experiments of 2D-EF is due to differences in coding sequences.

In the light of these results, we have detected a new protein able to bind IgE of sera from patients allergic to peach in the olive pollen. It presents a theoretical molecular mass of 33978 Da and a theoretical pI of 5.7, having an apparent molecular mass of 35 kDa and a pI ranging from 4.6 to 5.9. The new allergen was named Ole e 12, following the nomenclature of the IUIS (10).

The sequence was analyzed by using a predictive method for detecting the processing site of the mature protein (162). According to this method the protein has no signal peptide, and therefore does not suffer any processing of the N-terminus. Proteins without signal peptides are unlikely to be exposed to the machinery needed to produce a post-translational modification. N-glycosylation, therefore, despite having potential glycosylation sites, will not occur, at least *in vivo*.

The allergen Ole e 12 shows in its primary sequence the binding site of the cofactor NADPH $G^{11}-X-X-G-X-X-G^{17}$, described in all proteins of this family (101). This primary structure for the NADPH binding site is highly conserved, as it is observed in the multiple alignment.

The cloning and the sequencing of two other allergenic IFR homologous proteins from ash (*Fraxinus excelsior*) and *Chenopodium album* pollens have been solved in this thesis.

Common ash is a major European tree. It is distributed throughout central Europe at an altitude of 1500m. It plays a smaller role in the Mediterranean countries, where the most representative of the *Oleaceae* family is the olive tree. Its pollen, anemophilous, does not generally present high atmospheric levels, but it may occasionally reach concentrations of 1000 grains/m³ in some areas such as Strasbourg (L'Alsace).

In these areas ash trees can be an important source of pollinosis, although its relevance has only recently been taken into account due to the coincidence of their pollination

with grass and birch, which are major causes of allergy in central and northern countries of Europe. Ash pollen shows high cross reactivity with other *Oleaceae*, as well as with phylogenetically unrelated plants such as birch and grasses (173-176).

On the other hand, soil desertification in Mediterranean regions and the use of some species to repopulate these areas for its high resistance to drought and soils with high salt content, are increasing the presence of certain weeds like *Amaranthaceae*, such as salsola (*S. kali*) and chenopod (*C. album*). Both are the most relevant and until recently they were responsible for hay fever in desert areas like/such as Kuwait (177, 178).

From these two sources several sequences were obtained: two from ash pollen and three from chenopod pollen. Within the sequenced clones for both chenopod and ash, molecular weights do not vary significantly, which is in agreement with the experimental observation in 2D-EF.

Tabla 7: physicochemical parameters of different sequences obtained

Source	Olive	Ash		Chenopod		
Isoform	Ole e 12	Fra e 12.1	Fra e 12.2	Che a 12.1	Che a 12.2	Che a 12.3
mw	33975	33927	33986	33700	33664	33712
pl	5.72	5.93	6.17	5.3	5.3	5.3

Although in 2D-EF pl range is observed from 4.6-5.9, sequences obtained from olive and ash do not cover such a wide range. This suggests that oligonucleotides used for PCR amplification were too specific, which would increase PCR success at the expense of decreasing the amplification of different isoforms. These two allergen were named Fra e 12 and Che a 12, following the nomenclature of the IUIS (10). The polymorphism of these proteins has been confirmed by the results obtained in two-dimensional separations of extracts of olive and ash presented here, as well as the results obtained after sequencing two and three clones of ash and chenopod respectively. Sequenced Fra e 12 isoforms have pl values of 5.93 and 6.17. From the standpoint of allergy, the presence of isoforms with different pl is very interesting because of the impact this may have on certain physico-chemical and immunogenic properties of the protein such as its solubility, so that the release through an isoform may be higher than another one and cause a greater prevalence of allergic individuals. Likewise, substitutions in the amino

Discusión Familia Isoflavona Reductasa

acid sequence may lead to disturbances of the allergenic epitopes and decrease its ability to induce IgE.

In recent years the polymorphism of allergens has been determined through the techniques of cloning and sequencing of cDNA and isoforms have been found in many of them. Their availability has made possible to establish differences in the IgE-binding capabilities of different isoforms (97, 107). An example is the major allergen of birch pollen, Bet v 1, for which up to 20 isoforms have been described, some of them with low ability to bind IgE, but high capability to stimulate T cells (179, 180). Another example of an olive pollen allergen is Ole e 1. Up to 10 different isoforms have been described for it (42).

The determination of isoforms of an allergen is not only a valuable datum at a scientific level that completes the characterization of a protein, but it may also have clinical relevance, since the situation of some amino acids in the primary structure can significantly change the structure of the different antigenic and allergenic epitopes thus modifying its antigenicity. These data point to a potential use of hypoallergenic isoforms for immunotherapy (113, 181).

From other allergenic sources, like birch and pear, no other isoforms of IFR proteins have been identified. There is another isoform in data bases for Bet v 6, but it corresponds to a truncated fragment missing the last 8 amino acids (UniProt code O65002).

The characterization and comparison of homologous allergens belonging to the same family of proteins is of great interest because it will allow drawing certain conclusions about the allergenicity of these molecules.

These proteins are homologous to isoflavone reductases (IFR) present in other species from *Oleaceae* family such as *Forsythia intermedia* (101), as well as in other pollens and fruits, including Bet v 6 (BETVE), birch pollen (102) or isoflavone-like protein reductase 5 (VITVI) in grape (160), both described as allergenic.

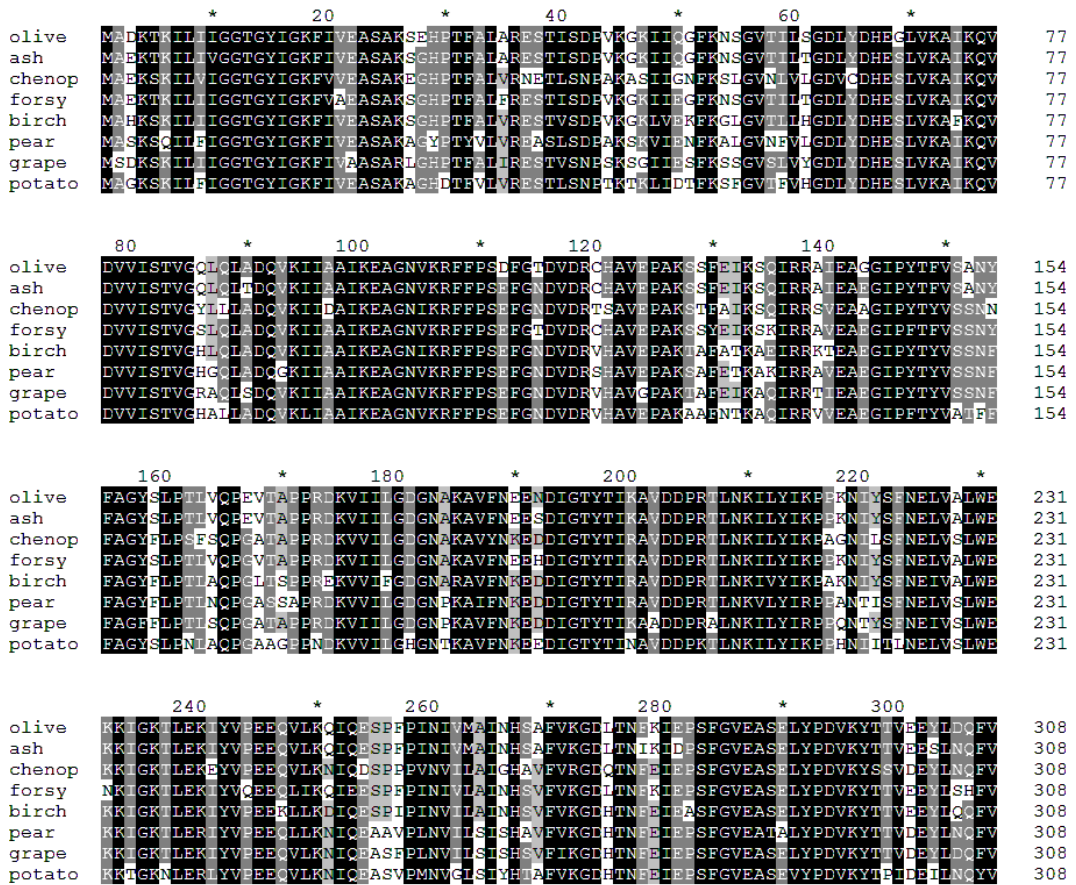


Figura 76: Sequence alignment of proteins identified during this thesis (olive, ash and chenopod) together with homologues described in literature: forsy (young steam from *Forsythia intermedia*, Q9M528 (101)), birch (*Betula verrucosa* pollen, Q9FUW6 (103)), pear (pear fruit, O81355 (103)), grape (grape berries, Q3KN67 (160)), potato (pistils of growing plants of *Solanum tuberosum*, P52578 (161))

As expected, Tabla 8 shows a higher sequence similarity and identity of proteins from phylogenetically related allergenic sources such as olive and ash (*Oleaceae*). Ole e 12 and Fra e 12 present higher identity degree to the protein described in *Forsythia intermedia*, also belonging to the family of *Oleaceae*. This high similarity is also observed when overlapping the 3D models of the three new proteins, Figura 77. There are more differences when comparing either of these two sequences with Che a 12 (from *Chenopodiaceae* family - phylogenetically unrelated family-) but it is not reflected on the 3D models.

Discusión Familia Isoflavona Reductasa

Tabla 8: Identity and similarity percentages between aligned sequences.

	Ole e 12	Fra e 12	Che a 12	Forsythia	Bet v 6	Pyr c 5	grape	potato	% Identity
Ole e 12		95	75	91	80	74	79	72	
Fra e 12	97		76	91	80	74	78	73	
Che a 12	87	87		75	78	78	77	74	
Forsythia	96	96	87		81	75	77	71	
Bet v 6	91	91	89	91		79	80	75	
Pyr c 5	88	88	90	88	90		81	78	
Grape	90	91	89	90	91	92		76	
Potato	84	85	85	85	87	89	88		
% Similarity									

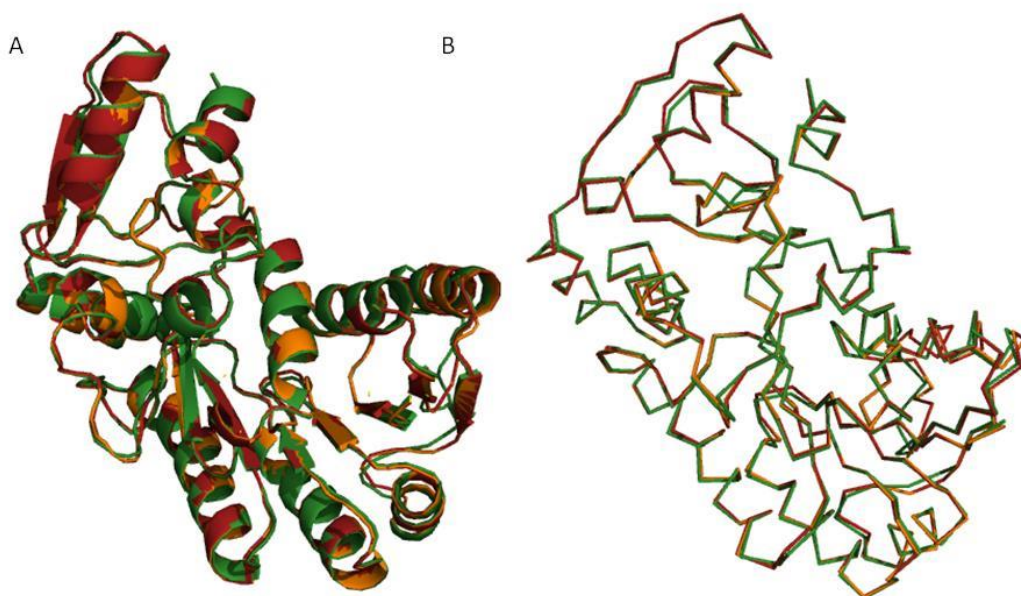


Figura 77: Overlap of theoretical models of IFR from olive (green), ash (red) and chenopod (yellow). A Secondary structure showing α and β motifs, B, chain alignment.

IFRs are enzymes involved in the generation of phytoalexins synthesizing chiral isoflavones from achiral precursors through a step of NADPH-dependent reduction. Furthermore there is a high sequence identity across species, which may justify cross-reactivity processes.

Some of these proteins have been described as both pollens (Bet v 6) and food allergens (Pyr c 5) (103).

The presence of allergenic proteins homologous to IFR in the three species studied the close structural relationships between them and the very different geographic distributions can explain cross-reactivity phenomena in areas with diverse bioclimatic characteristics. As it has been reported by Asero describing olive pollen-sensitized subjects in the absence of olive and ash trees, asserting that exposure to privet pollen might represent the source of this kind of sensitization (182).

RECOMBINANT TECHNOLOGY: ROLE E 12 AND RFRA E 12

The availability of a purified allergen is of huge importance to study its physicochemical and immunological properties. Two strategies can be considered at this point, to isolate the allergenic molecule from the natural source or to produce it in its recombinant form in a heterologous expression system.

The decision is usually made after having taken into account the advantages and disadvantages of both approaches, depending on each case. If the allergen shows post-translational modifications or disulfide bridges affecting the IgE binding capability or there is more than one isoform contributing to the overall allergenicity activity, the purification from natural sources would be appropriate. On the other hand, if allergens are exposed to active proteases during the extraction and purification procedures, and they can be degraded upon extraction or they are very low expressed in natural sources, expression in heterologous systems is a good alternative. In this case, comparison with the natural counterparts is required (183). Due to the difficulties in purifying Ole e 12 from its natural source, it was decided to start with its recombinant expression.

Two different systems have been extensively used for the recombinant expression of pollen allergens: The bacteria *Escherichia coli* as a prokaryotic host and the yeast *Pichia pastoris* as an eukaryotic host.

In addition, examples of recombinant expression in insect cells and Arabidopsis plants have also been reported (130). All of these systems have been used for olive pollen allergens.

Methodological procedures for the recombinant expression in *E. coli* are simpler than those performed for the expression in *P. pastoris*. However, *P. pastoris* is a system able to introduce the correct disulfide bonds in the protein fold and might be necessary when glycoproteins are expressed. This is why, *P. pastoris* has been the most widely employed organism in recombinant production of olive allergens, although some examples in *E. coli* have been also described in proteins which do not contain carbohydrate components or disulfide bridges, like Ole e 2 (115), Ole e 3 (30), and Ole e 8 (122).

Expression and purification of rOle e 12

Molecular characteristics of Ole e 12, deduced from the amino acid sequence, only one cysteine (no disulfide bridges), no glycosylation motives, and also previous approaches of recombinant expression of proteins involved in this family in *E. coli* (102), conditioned the choice of this expression system. Therefore *E. coli* heterologous system and expression vector pEt16b were chosen.

The expression of genes in plasmids pET is regulated by the promoter of T7 phage. Thus, in the absence of phage T7 RNA polymerase, there is not transcription due to the *E. coli* RNA polymerase. *E. coli* BL21 (DE3) strains used for DNA expression incorporate in their genome the gene encoding the phage T7 RNA polymerase, which is regulated by the lacUV5 promoter inducible by IPTG. pEt16b also encodes for a HisTag located in the Nt of the recombinant protein.

IPTG induction was conducted at 25 °C, instead of 37 °C which is the temperature most frequently used. It was observed that at 25 °C soluble protein was obtained, while at 37 °C after IPTG induction most Ole e 12 was not soluble and refolding steps were necessary. The same conditions of expressions have also been described for Bet v 6 (102).

Non fusion protein was obtained by cleavage with Factor Xa Cleavage Capture Kit, avoiding the cyanogen bromide cleavage used for Bet v 6. The presence of an internal Met in the sequence of Ole e 12 leads us to discard this proteolytic treatment.

The construction designed solved two problems that may arise during the production of any recombinant protein: expression in high yield and solubility of the product. In order to perform the comparison with its natural counterpart, the functional aspects should also be resolved satisfactorily in the recombinant product: rOle e 12 should maintain its catalytic activity and allergenicity, and therefore same immunological characteristics as its natural counterpart.

NATURAL OLE E 12

Different extraction timing has been required for the twelve allergens isolated from the olive pollen; whilst several very soluble proteins were extracted using a short time (15 min) such as Ole e 6 and Ole e 7, others such as Ole e 3 and Ole e 10 need longer hydration time (3 h) (184). A previous defatting step with diethyl ether was performed, and then ammonium bicarbonate at a slightly basic pH was employed for the solubilization of allergens, together with PMSF as a protease inhibitor.

Ole e 12 is a high soluble allergen, almost released in the first 30 min extraction time, Figura 52. These conditions of short periods of time and mild ionic strength and pH support the idea that physical properties of aeroallergens (low molecular mass and fast solubilization in aqueous solution) are factors that influence the development of IgE mediated allergic response, as allergenic properties of proteins are rather linked to the amount and speed of solubility from airborne particles than to intrinsic properties (185). Hydration of the pollen upon contact with the respiratory mucosa can be considered one of the critical events in the induction of allergy, since it makes possible the release of allergens and therefore their contacting the immune system cells.

Another relevant step during isolation of nOle e 12 is the last step of purification that consists of a phenyl sepharose matrix coupled in a FPLC system. The elution of proteins bound to a hydrophobic matrix is performed by using a profile of decreasing ionic strength, which increases the interactions of the molecule with the elution solvent. In our Ole e 12 purification, the protein matrix hydrophobic interactions break when reaching a low ionic strength (50 mM TrisHCl, pH 7.4, NaCl 0 M). In some proteins, these hydrophobic regions may be related to their function as in the case of calcium-binding proteins with regulatory activity (34) which exhibit at the surface a hydrophobic area

Discusión Familia Isoflavona Reductasa

involved in the binding of calcium. Regarding Ole e 12, the NADPH-binding region (residues 11-17) is presented as a hydrophobic region (Figura 78) according to the hydrophobicity profile obtained from the primary structure of Ole e 12, Figura 17, where hydrophobic values for residues 5-14 and 16-23 were predicted.

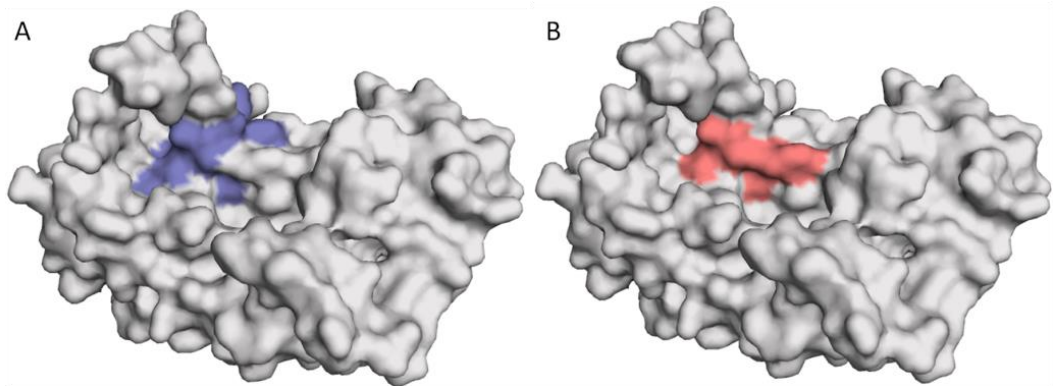


Figura 78: Theoretical model of the tertiary structure of the allergen Ole e 12 (Swiss-Model). A with the theoretical predictions of hydrophobic regions: 5-14 and 16-23 in blue. B with the binding site for NADPH in red.

From another point of view, the rapid release of Ole e 12 from the pollen grain, Figura 52, must also be taken into account when postulating the biological role of this protein. In this sense, the proposed role for this family of proteins is their role in defense mechanisms and has to be accessible when the hydration and the pollen tube growth take place. These different functions of the pistil require the presence of gene products that promote pollen tube growth, which will be produced during pistil development before pollination or after pollination by the interactions between pistil and pollen tubes. These gene products may promote pollen tube growth directly, or indirectly as catalysts in biosynthetic pathways, producing pollen tube growth and promoting compounds.

Immunolocalization of Ole e 12 by TEM showed that the allergen is frequently found in the cell wall of pollen grain, both Figura 58B and C, both as well as in the exine/intine. This result is consistent with studies in the laboratory of immunolocalization of Ole e 12 by confocal laser microscopy (CLSM), where it was observed that the allergen is mainly localized in the cell wall of pollen grains and pollen tube. This localization suggests its potential release to the extracellular medium. If so, after the pollen grain contacts the surface of the mucous membranes of susceptible individuals the allergen would be

released, enabling allergic processes. It has been suggested that the release of allergenic proteins in the culture medium is carried through microchannels of the pollen grain surface and having in account that the pollen grain is exposed to long periods of germination, the release would be effective across regions aperturales (186). This latter observation is consistent with the micrographs, where a large accumulation of gold particles in the opening through which the pollen tube emerged has been noticed, Figura 58D and E. The mechanisms for release of allergens to the extracellular medium appear to be dependent on various secretory pathways. Thus it has been observed that the conventional or classical endoplasmic reticulum / Golgi / Trans-Golgi network seems to be involved in secretion and storage of Ole e 1 (155) and PME (187, 188).

However, in the case of Ole e 12, a protein without leader sequence, it has been seen that the allergen was localized within vesicles distributed throughout the cytoplasm, with a diameter size between 200-600 nm (Figura 58B and C). Considering the size, these vesicles could correspond to multivesicular bodies (MVBs) or EXPOs (*Exocyst-Positive Organelles*). The MVBs have defined ultrastructural characteristics resembling membranous sacs with a size between 200-800 nm (189). The EXPOs are double membrane organelles, specific of plants and with a size comparable to the MVBs (190). Both MVBs and EXPOs represent alternative secretory pathways in plants, but it cannot be determined which one of these compartments are involved in the secretion of Ole e 12, so it would have to be confirmed by using specific markers for these compartments.

Immunolocalization studies of Ole e 12 by confocal laser scanning microscopy (CLSM) have also determined that the allergen is preferentially located in the apical and subapical region of the pollen tube, where growth takes place. Overall, Ole e 12 is located in the exine and intine of the pollen grain, in the region of the opening and in the apical / subapical pollen tube, which is consistent with the one described for Ole e 1 (155). It could be suggested that this location provides evidence that the allergen may play a role in pollen germination hydration. Then, Ole e 12, as well as playing a role as defense molecule or related to stress, may be involved in the processes of germination and / or hydration. This hypothesis would be consistent with observations in the pistils in potato (*Solanum tuberosum*), where the increased expression of the gene cp100 (a protein homologous to IFR) was observed. It had been caused by pollen tube growth after pollination (161). Protection against pathogens is crucial because the pistil is

wounded by the penetration of non-aseptic pollen tubes. The production of defense molecules is expected during the interactions of the pistil with the growing pollen tubes, but such molecules would be more effective if present before pollination.

In short, these results indicate that Ole e 12 is frequently located in the cell wall of pollen grains and of pollen tube, in the opening - suggesting its excretion to the extracellular medium, as well as in the cytoplasm - inside vesicles that could correspond to MVBs or EXPOS. These data suggest that the allergen may be involved in the mechanisms of hydration and/or pollen germination. Furthermore, the idea that the allergen is released from pollen grain, along with their soluble nature, could facilitate the development of sensitization and elicitation processes in susceptible individuals.

In any case the data provided here should be considered in relative terms, since the extraction conditions employed do not reproduce the conditions of the mucosa, or the conditions of germination on the stigma of the flower.

MOLECULAR CHARACTERIZATION

Ole e 12 presents a molecular mass of 35 kDa in SDS-PAGE. This value fits well with the data obtained from mass spectrometry, two maximum values of 34285 Da and 34994 Da, Figura 26. The first maximum could correspond to the expected molecular mass of the sequenced protein, whilst second one with 709 Da more could correspond to the protein plus NADP (H) cofactor bound. The molecular mass also corresponds to one described for another IRL.

Ole e 12 presents a cysteine that is orientated to the outside of the molecules, Figura 22. This free cysteine could take part in an intermolecular disulphide bridge being this formation facilitated when Ole e 12 is concentrated along the purification procedure and after the Ni-affinity column, it dimerizes. However the previous treatment of the soluble fraction, after the induction, with iodoacetamide prevents this dimerization.

CD studies showed that recombinant Ole e 12 has a defined tridimensional structure, which contains both α -helix and β -sheet elements, Figura 27. These data is in agreement with the theoretical 3D model deduced from its primary sequence, in which the main structure observed consists of a secondary superstructure of the motif beta-

alpha-beta (Rossmann-fold motif). It consists of six parallel β -sheets, forming a central sheet, surrounded by six α -helix. In studies performed by Min et al. (163), it was obtained the crystal structure of PCBER from *Pinus tadea* and of PLR from *Thuja plicata*. It is observed the same overall basic structure for the three reductases studied, containing a Rossmann fold domain. The Rossmann fold is a protein structural motif found in proteins that bind nucleotides. This domain is found in numerous dehydrogenases of metabolic pathways such as glycolysis, and many other redox enzymes. The binding site for the cofactor NADPH and the substrates are located in a large cleft between the Nt and Ct domains. That cleft exhibits a consensus binding pattern similar to GXXGXXG, present in the deduced sequence.

Studies for thermal stability in CD showed that rOle e 12 does not follow a reversible process of thermal denaturation, following the general behavior of proteins, since rOle e 12 is not able to recover ellipticity values when temperature decreases, and even more, final spectrum shape at 10 °C is the same as the one obtained at 80 °C, Figura 47C. Regarding to the three spectra, the shape is similar in all of them, but ellipticity is higher before the thermal experiment. This seems more a precipitation of the protein and therefore a lower concentration of soluble protein at the end of the experiment. This descent of solubility at higher temperature correlates with the experimental observation of the differences of soluble recombinant protein after expressing at 37 °C instead of at 25 °C, Figura 49.

The effect of reducing agents has been studied, Figura 44. The knowledge of the primary structure of an allergen -which are the amino acids responsible for antigenicity and allergenicity of the molecule- is of the utmost importance. The fact that both the polyclonal serum and the serum of allergic patients recognize the recombinant form under reducing conditions, shows that both antigenic and allergenic epitopes are resistant to these treatments, thus confirming the presence of linear epitopes.

ELISA assays with rOle e 12 and sera from patients allergic to olive pollen, Figura 40, show that the recombinant allergen presents epitopes capable of being recognized by IgE from allergic patients in non-denaturing conditions. When these same sera were tested in immunoblotting tests most of them remained reactive, confirming the

presence of linear epitopes. If an increase in binding in the presence of SDS was observed, it could suggest the presence of internal sequential epitopes.

Studies for enzymatic stability are carried out with trypsin (cleaves after lysine and arginine), Figura 46. While proteolysis is in progress, the degradation product recognized by the antibody specific for the Ct peptide, appears. It seems, therefore, that the protein begins to degrade by the Nt, as there is still recognition by the antibody pAb CtOle e 12. The released fragment corresponds to around 2600Da. Bearing this in mind (110Da/aa), it would be 24aa in length, freeing the entire histidine *Tag* and 4 amino acid of the N terminal.

ENZYMATIC ACTIVITY

It has been previously explained that recombinant allergens must keep functional characteristics from their natural counterpart, including among others the enzymatic activity.

Lignans and isoflavonoids play important roles in plant defense. For example, their constitutive deposition significantly helps confer durability, longevity, and resistance to the heartwoods of many tree species against wood-rotting fungi. In this regard, western red cedar (*T. plicata*) heartwood formation results via deposition of 20% of 8–89-linked lignans, such as plicatic acid (191), which help this species to grow well over 60 meters tall and live for longer than 3000 years. The heartwoods of many *Pinaceae* species, such as loblolly pine (*Pinus taeda*), also contain significant levels of dihydrodehydrodiconiferyl alcohol, and related metabolites. These and their higher molecular weight (non-lignin) derivatives are laid down in the heartwood as protective postlignification infusions (101). Therefore, Pinoresinol-lariciresinol reductase (PLR) and phenylcoumaran benzylic ether reductase (PCBER) (two lignan biosynthetic pathway enzymes) are soluble enzymes which catalyze analogous benzylic ether reductions of 8-8' and 8-5' linked lignans, respectively - 'secondary' metabolites, whose roles are to protect and preserve the vascular (lignified) tissues.

(+)-Pinoresinol (+)-lariciresinol reductase was purified from *Forsythia intermedia* stem tissue (192); this soluble, 35 kDa, NADPH dependent catalyzes the sequential enantiospecific conversions of (+)-Pinoresinol into (+)-Lariciresinol, and (+)-Lariciresinol

into (-)-Secoisolariciresinol. The IFRs catalyze analogous reductions of α , β unsaturated ketones during isoflavonoid phytoalexin formation and appear to be evolutionary related to the PLRs in plant defense (193). The PLR/IFR homologs, however, appear to be mainly involved in phenylcoumaran benzylic ether reductions in lignan (8-5'-linked) biosynthesis (101).

A non physiological enzymatic reaction has also been demonstrated for Pyr c 5 and Bet v 6. Their ability to catalyse the NADPH-dependent reduction of lignans, such as dehydrodiconiferyl alcohol to give isodihydrodehydrodiconiferyl alcohol showed their PCBER activity. (103).

The oxidation of β -NADH or β -NADPH in the presence of artificial electron acceptors such as 2, 6-dichlorophenol-idofenol (generally referred to as DCPIP) is known as "Diaphorase activity". Although not physiological, it is easy to be measured (152, 164) and gives us important information about the interaction of the enzyme with pyridine nucleotides. Thus, we evaluated the DCPIP reduction directly with corresponding colour development resulting from oxidation of NADPH in the presence of rOle e 12. The results of this experiment showed that rOle e 12 is an active enzyme presenting diaphorase activity.

Cristal structures of PLR from *Thuja plicata* and PCBER from *Pinus Tadea* have been previously determined, and furthermore, IFR from *Medicago sativa* has been modeled according to its high identity degree with these two, resulting in similar structures (163). On the basis of these three sequences, relevant positions for the enzymatic activity of Ole e 12 have been compared, Tabla 9.

As in other NAD(P)H dependent reductases the positions for the amino acids described for the cofactor binding site are kept constant for Ole e 12. NADPH cofactor-binding sites in PCBER, PLR and IFR have been identified in a way that the nicotine amide ring is directed toward the cleft between the two domains, which is in agreement with the predicted location for the NADPH cofactor binding site in Ole e 12. In this position, the nicotine amide ring is also stabilized by a stacking interaction with the side chain of the conserved Phe (residues 160, 156, and 166 in PLR, PCBER, and IFR, respectively) (163), and Phe¹⁵⁵ could play same role in Ole e 12.

Discusión Familia Isoflavona Reductasa

Tabla 9: Amino acids involved in the catalytic mechanism.

	PCBER	PLR	IFR	Ole e 12
Cofactor binding				
Cofactor binding site	G ¹¹ -X-X-G-X-X-G ¹⁷	G ¹¹ -X-X-G-X-X-G ¹⁷	G ¹¹ -X-X-G-X-X-G ¹⁷	G ¹¹ -X-X-G-X-X-G ¹⁷
Nicotinamide ring	Phe ¹⁵⁶	Phe ¹⁶⁰	Phe ¹⁶⁶	Phe ¹⁵⁵
Pyrophosphate groups	Tyr ¹⁵ Ile ¹⁶	Tyr ¹⁵ Ile ¹⁶	Ala ¹⁵ Ile ¹⁶	Tyr ¹⁵ Ile ¹⁶
O-3' adenosine	Ser ⁴²	Ser ⁴¹	Asn ⁴¹	Ser ⁴¹
O-3'D-ribose	Arg ¹³⁸	Arg ¹⁴²	Arg ¹⁴²	Arg ¹³⁸
NADP ⁺ 2'-phosphate	Thr ¹³ Lys ⁴⁶	Thr ¹³ Lys ⁴⁵	Thr ¹³ Lys ⁵⁶	Thr ¹³ Lys ⁴⁵
Substrate binding				
Catalysis	Lys ¹³⁴	Lys ¹³⁸	Lys ¹⁴⁴	Lys ¹³³

The amino acid side chains involved in cofactor binding are well conserved among PLR, PCBER, such as the residues interacting with pyrophosphate groups, Tyr¹⁵ and Ile¹⁶; with O-3' of adenosine, Ser⁴¹ (Ser⁴² in PCBER); and with o -3' of D-ribose; Arg¹⁴² (Arg¹³⁸ in PCBER). On the other hand, IFR shows only two conserved residues among these four amino acids, which are Ala instead of Tyr¹⁵ and Asn instead of Ser⁴¹. In Ole e 12 these amino acids involved in pyrophosphate groups and o - 3' adenosine binding are as conserved as in PCBER and PLR.

In PLR, PCBER, and IFR, the NADP⁺ - unique 2 - phosphate group is stabilized by a salt bridge to the side chains of conserved Lys⁴⁵ (Lys⁴⁶ for PCBER and Lys⁵⁶ for IFR) and by a hydrogen bond to the side chain hydroxyl group of the conserved Thr¹³, as for the other NADP(H)-dependent reductase. These two amino acids are completely conserved among PLRs, PCBERs, and IFRs. In Ole e 12 there are three Lys residues close to the cofactor binding: Lys^{45, 47, 53}, that can play this role. Attending to the theoretical 3D model of Ole e 12, Figura 79, it is Lys⁴⁵ the one orientated to the cleft between the two domains, and therefore more probably to participate in the stabilization of the NADP⁺ 2'-phosphate.

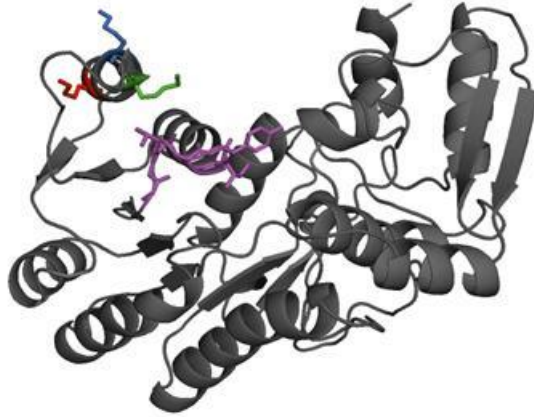


Figura 79: 3D model of Ole e 12 with marked positions of Lys: Lys⁴⁵ (green), Lys⁴⁷ (blue) and Lys⁵³ (red).

Apart from the cofactor binding site there are some more residues taking part in cofactor binding. Lys¹³⁸. Site-directed mutagenesis showed that K138A mutant did not incorporate ³H into either lariciresinol or secoisolariciresinol, in contrast to wild type PLR (163), providing good evidence that the conserved Lys residue is involved in general base catalysis. In olive this residue is located in Lys¹³³ and maintains similar orientation.

It looks that relevant positions in Ole e 12, for the enzymatic activity, are closer to the ones present in PCBER enzymes, which would be in agreement with the findings in other allergenic enzymes such as Pyr c 5 and Bet v 6 (103), and with theoretical studies performed in Ole e 12 (194) where the clustering analysis indicated that ole e 12 may share close-relationship to PCBER and IFR in comparison to PLR.

IMMUNOLOGICAL CHARACTERIZATION

Recombinant DNA technology has contributed to overcome the problems of polymorphism of allergens or low yields in purification processes starting from natural sources, since it allows obtaining homogeneous and pure recombinant proteins in large quantities. The essential condition imposed on recombinant proteins is to be equivalent of those found in the natural form. In the case of allergy, the recombinant allergen should maintain antigenic and allergenic properties of the natural allergen and therefore the comparison of the two forms -native and recombinant - has to be carried out with both IgG and IgE antibodies.

Discusión Familia Isoflavona Reductasa

Starting difficulties to obtain the protein from its natural source, as well as to determine its complete amino acid sequence, made it necessary another approach and the first step was to obtain an IgG antibody. This antibody was obtained by immunization of a rabbit with a synthetic peptide designed based on its spatial arrangement, in an environment outside of the molecule and outward looking, and on the antigenicity predicted by theoretical methods, Figura 33. This antibody was able to recognize Ole e 12, both recombinant and natural form, in immunoblotting assays after electrophoresis and transference to membranes and in ELISA. Furthermore, this antibody was used for testing the Immunolocalization of Ole e 12 in germinated pollen grains.

Despite the multitude of applications that this antibody had, this is not useful for demonstrating the immunological similarity between natural and recombinant forms because it recognizes only a small unstructural region of the molecule at the C-terminal end and it is not able to recognize all the IgG epitopes in the molecule. Therefore, we can not establish the immunologic relationships between both variants.

Therefore, once the protein was available in a recombinant form, a polyclonal antiserum was obtained by immunizing a rabbit with this protein. This antibody raised against the complete protein demonstrated its ability to recognize, as the anti-peptide antibody, the recombinant as well as the natural form, both in immunoblotting assays and ELISA experiments, Figura 36 and Figura 37. In the titration of both antibodies by ELISA with the recombinant and the natural form of the allergen the responses observed are proportional to the concentration of antibody used, Figura 35 and Figura 36. While it is observed that both antibodies show lower affinity for the natural protein, this effect is much more dramatic in the case of the pAb rOle e 12. The higher specificity of pAb rOle e 12 for the recombinant protein compared to the natural, may be due to the use of an isoform poorly represented in the extract for immunization of the rabbit, whereas pAb CtOle e 12 recognizes a sequence highly conserved in all the homologous proteins herein.

The olive pollen extract, pre-incubated with pAb rOle e 12, is capable of inhibiting the binding of the IgG from pAb rOle e 12 to rOle e 12 transferred to membrane, and viceversa, Figura 38. This suggests the presence of an antigenic protein in the pollen of olive with similar characteristics to those of recombinant allergen. This point of fact was

confirmed by inhibition of the IgG binding to the native protein after preincubation of the antibody with the recombinant form.

The fact that the pAb rOle e 12 recognizes in 2D panels the natural form present in the olive pollen extract, Figura 37B, shows that at least a part of these antigenic epitopes is resistant to the different treatments - alkylation and reduction - that are subjected to the proteins. In fact reducing aggressive treatments, such as treatment with β ME or high temperature do not affect the binding of IgG or IgE, Figura 37A.

A recombinant allergen should maintain the allergenic capacity of the natural protein, so it must retain the ability to bind IgE antibodies from sera of allergic patients. In the titration of the sera by ELISA, with both forms of the allergen, Figura 39, responses were proportional to the concentration of serum used. IgE binding is more efficient on olive extract because it contains other major allergens to which patients are also sensitized, but the binding to rOle e 12 demonstrates that the recombinant allergen presents epitopes capable of being recognized by IgEs from allergic patients.

Fifty six sera from allergic patients were used to compare IgE binding under different conditions: native (ELISA) and denaturing conditions (Western blot), Figura 40. In general it seems that there is agreement between the recognition in both cases, but in some cases IgE binding is decreased or increased in the immunoblot assay. The former indicates a conformational character of some epitopes of the protein, since SDS is a denaturing agent and therefore these epitopes may be altered. The latter implies the presence of internal sequential epitopes recognized by IgE. This would indicate that Ole e 12 is an allergen that contains both linear and conformational epitopes.

Immunological correlation at IgE level between natural and recombinant forms of Ole e 12 was tested by inhibition experiments in nitrocellulose membranes in which had been transferred rOle e 12 from polyacrylamide gels. The fact that there is no IgE-binding to the recombinant or natural allergen after pre-incubation with natural or recombinant allergen, respectively, shows the existence of similar IgE epitopes in both allergens, Figura 41.

In summary it could be concluded that the recombinant allergen exhibits allergenic and antigenic epitopes from the natural form. Therefore, it is available a recombinant

allergen that retains the immunological properties of the natural protein, so that could be used clinically for diagnosis and therapy's purposes.

Ole e 12 relevance in the analyzed population

There are different patterns of IgE recognition depending on the geographical area where the patient is sensitized. So, in regions like Madrid and Valencia, where patients are exposed to low levels of olive pollen, predominant recognition corresponds to major allergen Ole e 1. However in provinces such as Jaén, in which the population is exposed to high olive pollen levels, many sera recognize high molecular mass bands between 40 and 60 kDa, and low molecular mass, around 9 or 10 kDa as well as Ole e 1.

During this study it has been used three different populations:

- a. Patients with food allergy: patients allergic to olive and with symptoms to peach. The selected population from Madrid accomplished these characteristics.
- b. Patients from a region with high incidence of olive: olive-allergic patients from areas where olive tree is the predominant species. In Jaen the main sensitization source is olive pollen.
- c. Patients for whom the main source of sensitization is not the olive: olive-allergic patients from areas where the olive tree is not the predominant species, as for example Murcia, Zaragoza or Castellón.

Tabla 10: Summary of the results obtained in prevalence studies.

Region	Madrid	Jaén 2004	Jaén 2007	Murcia	Zaragoza	Castellón
Prevalence	33 %	20 %	9.4 %	3.7 %	3.6 %	3.6 %

Patients with food allergy, from Madrid, show the higher prevalence studied (33 %). As described in results, allergogram of olive pollen allergic patients exhibit a complex pattern of proteins in the whole range of molecular weights, Figura 4, while peach allergic patients have an unusual pattern, recognizing mainly high molecular weight bands and many of them do not recognize Ole e 1, the marker of sensitization to *Oleaceae* (110), Figura 9. This could indicate that these patients have no primary

sensitization to olive, but the recognition of IFR proteins in olive is due to cross-reactivity between homologous proteins present in both sources. The prevalence of sensitization to Ole e 12 in this population, wouldn't be defined by the levels of pollen in the region, but because of the prior sensitization of these patients to peach. A similar population bias was studied by Ballmer-Weber et al, 2012 (195): carrot allergic and carrot-tolerant but pollen sensitized patients. Similar results in prevalence were found: the rDau c IFR 1 and rDau c IFR 2 were recognized by 6% and 20% of the carrot allergics, but among pollen allergic controls, only 8 % and 7 %, had IgE to rDau c IFR 1 and 7 % to rDau c IFR 2, respectively.

To explain the results of prevalences in pollen allergic patients, Tabla 10, we analyzed the levels of pollen in the atmosphere of the region concerned and sensitization to other allergenic sources. In pollen allergic patients the prevalence obtained are lower. From these data, it can be drawn that sensitization to Ole e 12 in patients from Jaen is due to the high atmospheric levels of olive pollen, since only there, it would be reached the allergen dose required to induce respiratory allergy. Furthermore, different prevalence rates correlate with olive pollen count in Jaen in those two years (2004: 36.500grain/m³; 2007: 12.000 grains/m³ (Aerobiology Committee of the SEAIC)). Meanwhile, in regions such as Murcia, Zaragoza or Castellón, *Oleaceae* levels are lower than in Jaen, and this together with the fact that Ole e 12 is a minor protein could justify the lower prevalence of Ole e 12 in those areas.

In the light of these results we can say that Ole e 12 is a minor allergen, being recognized by less than 50% of patients.

SAL K 5, UN ALÉRGENO PERTENECIENTE A LA FAMILIA OLE E 1-LIKE

IDENTIFICACIÓN DE UNA PROTEÍNA DE 19 KDA COMO UNA PROTEÍNA ALERGÉNICA RELEVANTE

Veintiocho pacientes alérgicos al polen de *S. kali* procedentes de Murcia y veintinueve de Zaragoza fueron seleccionados para estudiar el perfil alergénico del extracto proteico de *S. kali*, Figura 80.

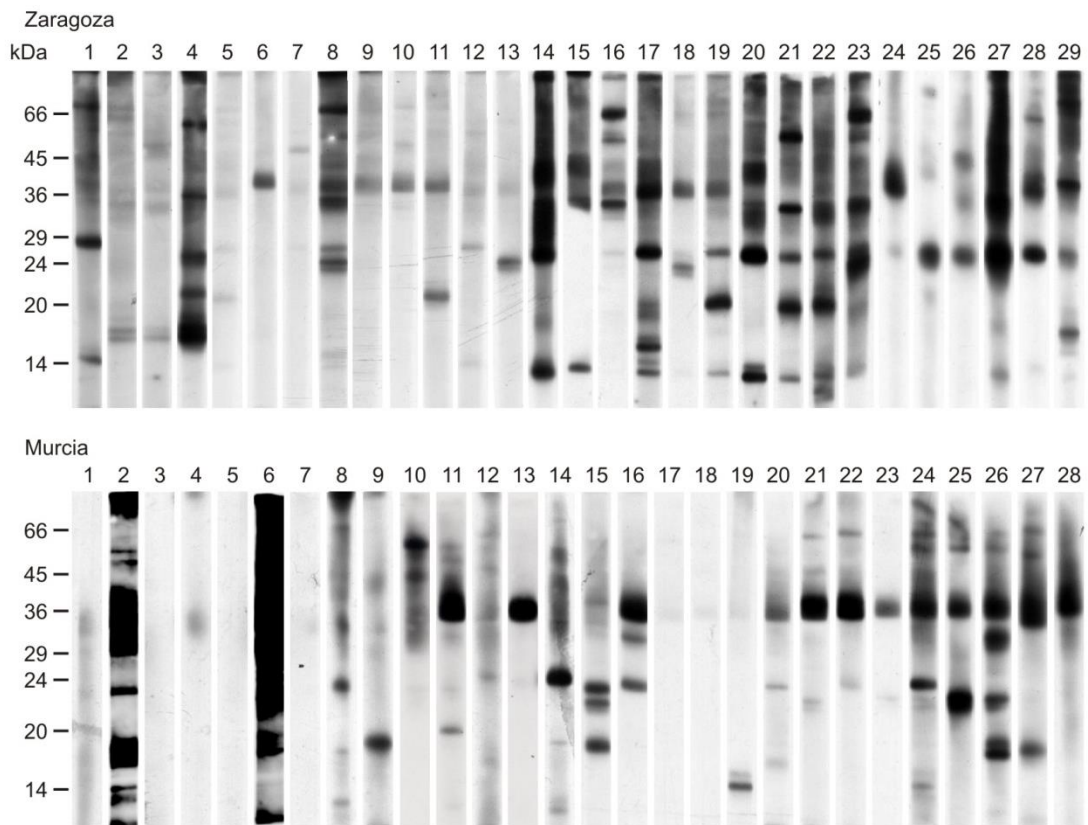


Figura 80: Análisis de la unión de IgE de sueros de pacientes (de dos poblaciones (Zaragoza y Murcia)) alérgicos a *S. kali* frente al extracto de polen.

En las inmunotinciones realizadas con sueros individuales se reconocían bandas que comprendían todo el intervalo de pesos moleculares (66-10 kDa). Un gran número de sueros reconocen una banda con una masa molecular de alrededor de 40 kDa, que

corresponde probablemente al alérgeno mayoritario de *S. kali*, la pectín metilesterasa Sal k 1, pero también se observaba reconocimiento de bandas de distintos tamaños correspondientes a 27, 19, 15 y 10 kDa.

Se observó una banda de 19 kDa que era reconocida por 12 sueros (4, 11, 17, 19, 21, 22 en el panel superior y 2, 6, 9, 15, 26, 27 en el panel inferior), cuya masa molecular correspondía a la de Che a 1, el alérgeno Ole e 1-like identificado en el polen de *C. album*, cuya prevalencia es relativamente alta para los pacientes alérgicos a esta fuente. La presencia de esta proteína se analizó por inmunotinción del extracto proteico de *S. kali* en bidimensional con un anticuerpo obtenido frente a Ole e 1, Figura 81. Un conjunto de puntos a los que se une las IgG confirman esta proteína presente en el extracto de polen de *S. kali* como perteneciente a la familia de las Ole e 1-like, mostrando además el carácter polimórfico que define a esta familia de proteínas.

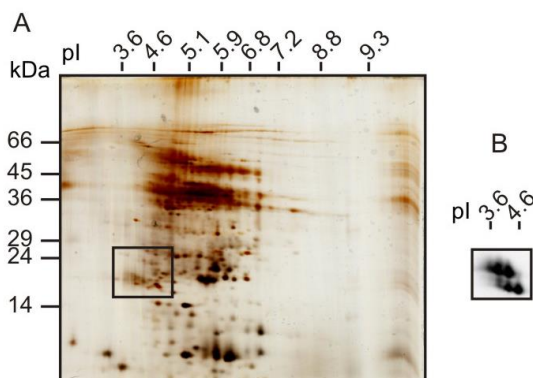


Figura 81: Tinción con plata (A) e inmunotinción (B) con IgG específica de Ole e 1 sobre una electroforesis bidimensional de extracto proteico del polen de *S. kali* (100 µg).

Finalmente, para determinar si esta proteína es también alérgica, se realizó un ensayo de inhibición de la unión de IgE de una mezcla de 10 sueros incluidos en el estudio, al extracto de *S. kali* utilizando Che a 1, la proteína Ole e 1-like de *C. album*, como inhibidor. Tras la inhibición de la unión de IgE al extracto de *S. kali* se observó, por análisis densitométrico de las bandas, la supresión del 80% de la señal de unión de IgE al utilizar Che a 1 como inhibidor, confirmando la presencia de una proteína capaz de unirse a las IgE de los pacientes alérgicos en el polen de *S. kali*, Figura 82. Sin embargo, no se observa inhibición cuando el alérgeno del polen de olivo, Ole e 1, se utiliza como inhibidor.

Resultados Familia Ole e 1-like

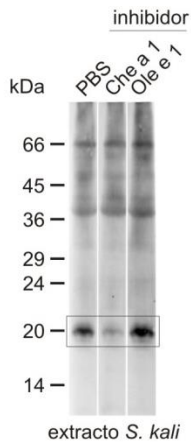


Figura 82: Inhibición de la unión de un pAb específico para Ole e 1 a una proteína del polen de *S. kali* de 19 kDa usando como inhibidores Che a 1 y Ole e 1, alérgenos de la familia de las Ole e 1-like de *C. album* y *O. europaea* respectivamente. PBS, corresponde al suero preincubado sin inhibidor.

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DEL ALÉRGENO SAL K 5

Tras tres etapas cromatográficas: una columna de penetrabilidad Sephacryl S-100, una columna de hidrofobicidad de fenil-sefarosa y un HPLC en fase reversa, se llevó a cabo la purificación de la proteína a homogeneidad. Después del análisis en PAGE-SDS esta proteína migra como una única banda de 19 kDa, Figura 83A y B.

El análisis de MS rindió un pico heterogéneo con un valor principal de 17627,6 Da, Figura 83C. Este perfil y la discrepancia en las masas moleculares entre la movilidad electroforética y la MS sugerían la presencia de carbohidratos unidos covalentemente a la proteína como se ha observado para los demás miembros de esta familia de proteínas. Este carácter glicosídico fue confirmado por tinción con la lectina Con A, Figura 83B.

La capacidad de unión de Sal k 5 a IgG de un antisuero policlonal específico de Ole e 1 a Sal k 5, un anticuerpo monoclonal obtenido contra Ole e 1 y un conjunto de sueros de pacientes sensibilizados a Ole e 1 se testaron por inmunotransferencia, Figura 84.

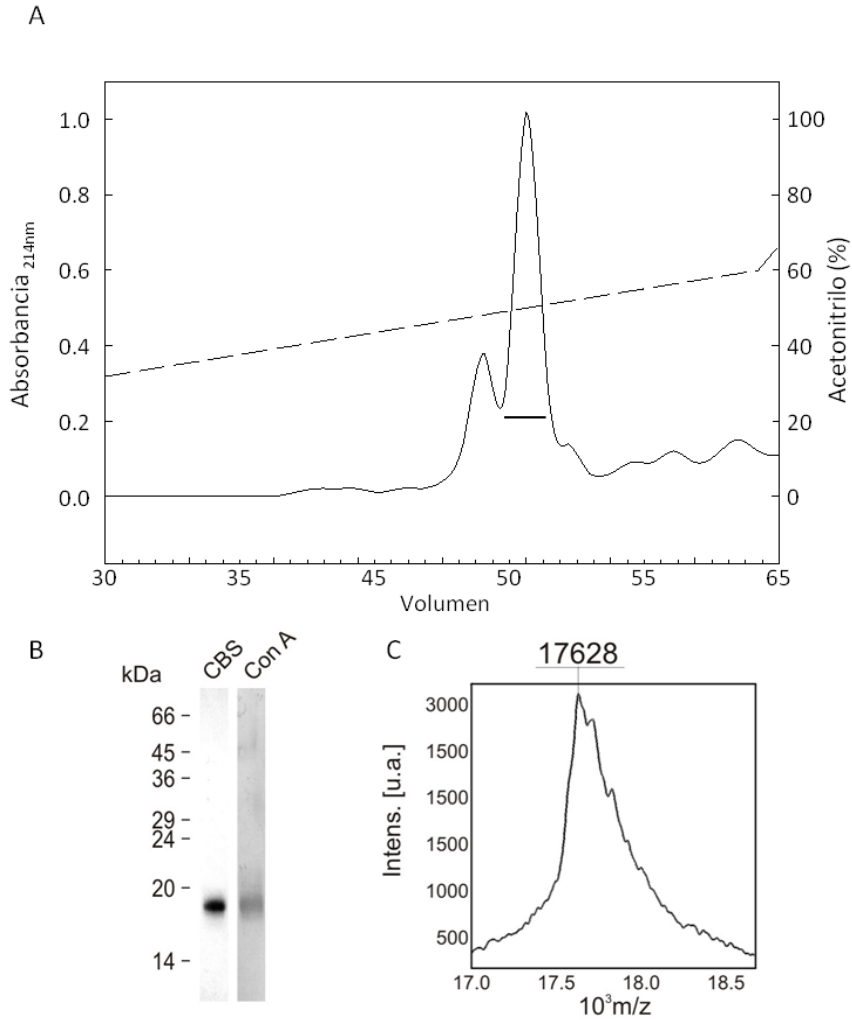


Figura 83: Purificación y caracterización del alérgeno natural Sal k 5 de su fuente natural *S. kali*. (A) Perfil de elución de la cromatografía en HPLC. (B) CBS y detección con Concanavalina A. (C) Espectrometría de masas de la proteína

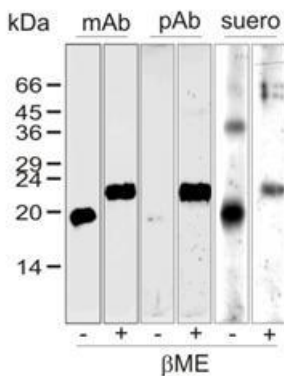


Figura 84: Inmunotinción bajo condiciones reductoras y no reductoras empleando IgG tanto de anticuerpos monoclonales (mAb) como policlonales (pAb) obtenidos frente a Ole e 1, e IgE procedente de una mezcla de sueros de pacientes alérgicos a *S. kali* (suero).

Resultados Familia Ole e 1-like

Por otro lado, la degradación de Edman de la proteína nSal k 5 purificada rinde una sola secuencia Nt: KGN. La huella peptídica obtenida tras el análisis proteómico por MS MALDI-TOF de la misma muestra alquilada y digerida con tripsina, conducen a secuencias VYCDTCR, TMMEGATVSIKCR, VDGHDHDLCKLVLVK y ANALGFLK. La alineación de estas secuencias con las proteínas incluidas en la base de datos GenBank™ / EMBL reveló homología con los miembros de la familia de proteínas Ole e 1-like y, específicamente, con Che a 1, alérgeno homólogo en el polen de *C. album*, Figura 85. La nomenclatura utilizada para este alérgeno, Sal k 5, sigue los criterios del comité de nomenclatura de la IUIS (10).

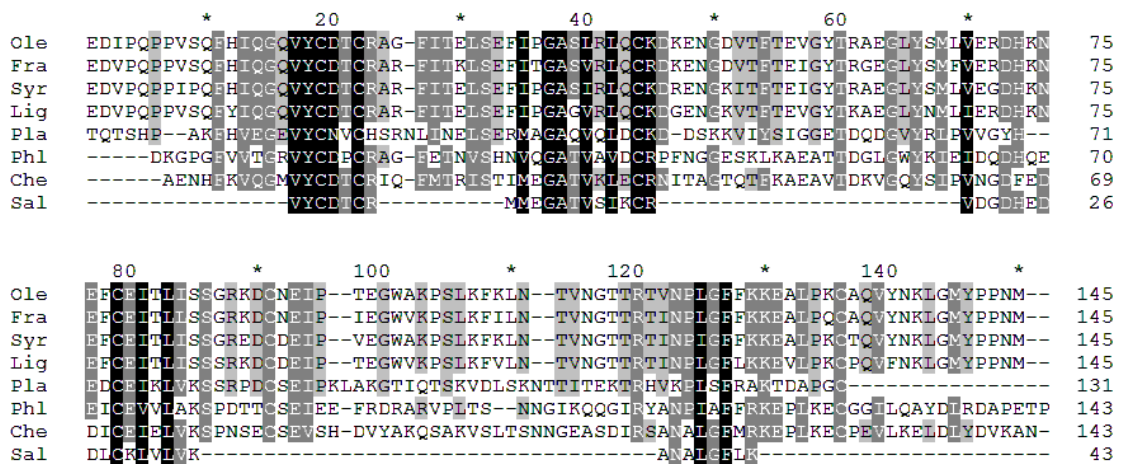


Figura 85: Alineamiento de los fragmentos obtenidos por espectrometría de masas con proteínas pertenecientes a la familia de las Ole e 1-like. Secuencias incluidas en el alineamiento: Ole e 1 (P19963) (26), Fra e 1 (Q7XAV4) (85), Syr v 1 (475247) (84), Lig v 1 (O82015) (83), Pla l 1 (P82242) (196), Phl p 11 (Q8H6L7) (197), Che a 1 (Q8LGR0) (198).

CLONACIÓN POR PCR Y ANÁLISIS DE LA SECUENCIA PRIMARIA

El cDNA se sintetizó a partir de RNA total del polen de *S. kali* y ha sido utilizado como molde para la amplificación de Sal k 5 por PCR, utilizando oligonucleótidos diseñados a partir de secuencias de péptidos internos obtenidos tras análisis de la huella peptídica del alérgeno natural (Tabla 5, materiales y métodos).



Figura 86: Estrategia de clonaje para Sal k 5.

Dos fragmentos solapantes correspondientes a los extremos 5' y 3' se utilizaron para obtener la secuencia de nucleótidos de Sal k 5 incluyendo el péptido señal en dos ciclos de PCR, Figura 86.

```

1  atgggaaagtctcaagcaatcttgcctcttcattggggctcctctgcctcctctccttgagc
   M G K S Q A I L L F I G A L C L L S L S 20
61  gacgttgctttcgccaagggcaacggtggtcacaacctctaccatgtcaagggcatgggtg
   D V A F A ▲K G N G G H N L Y H V K G M V 40
121 tattgtgacacttgccgtatccaattcatcacccgtgtagcaccatgatggagggtgca
   Y C D T C R I Q F I T R V S T M M E G A 60
181 actgtgagcttgacagtcaggaaccttactgcagggactgaaaccttcaaagccgaagca
   T V S L Q C R N L T A G T E T F K A E A 80
241 gtgacagacaagctagggatgtacacgattaaagtcgacggcgatcacgaagatgatatc
   V T D K L G M Y T I K V D G D H E D D I 100
301 tgtcaaattgtggttggtcaagagccctgaccaagaatgttccgagattcctaattgatgtc
   C Q I V L V K S P D Q E C S E I P N D V 120
361 tactctgagcaagctgctaaggtcaccttgacatccaacaatggtgaagcttccgacggt
   Y S E Q A A K V T L T S N N G E A S D V 140
421 cgcaacgccgacgctctcggtcttctgaaaaagggcgccacttctctgagtgccctgaagtt
   R N A D A L G F L K K A P L P E C P E V 160
481 cttaggagttggatgatgatgatggtcctgggagtggttactcaaaactga
   L K E L D M Y D V P G S V T Q N - 176
    
```

Figura 87: Secuencia de nucleótidos y secuencia de aminoácidos deducida del cDNA codificante. Los péptidos que corresponden a los identificados en espectroscopía de masas se encuentran resaltados en gris. La secuencia de aminoácidos en cursiva corresponde al péptido señal, indicándose con un triángulo el sitio de procesamiento.

Finalmente, una PCR realizada con dos cebadores diseñados a partir de los extremos Nt y Ct de la proteína madura confirmó la secuencia codificante completa del alérgeno. El marco de lectura de esta proteína contiene 176 residuos de aminoácidos, incluyendo un

Resultados Familia Ole e 1-like

péptido señal de 25 aminoácidos, que se dedujo por predicción teórica del sitio de procesamiento y posteriormente se confirmó de acuerdo con el péptido obtenido por degradación de Edman de la proteína natural, Figura 87.

La cadena polipeptídica, en su forma madura, presenta 151 aminoácidos, una masa molecular calculada de forma teórica de 16448.6 Da, y un *pI* teórico determinado a partir de su secuencia de aminoácidos fue de 5.02. También presenta una secuencia consenso de N-glicosilación en Asn43 (posición 68 de la secuencia completa).

Análisis a partir de la estructura primaria de Sal k 5

La predicción de estructura secundaria de Sal k 5 se llevó a cabo en base a la estructura primaria y aplicando el método de Jones (129), incluido en el servidor PSIPRED, Figura 88.

```
      *           *           *           *           *           *
KGNNGHNL*YHVKGMVYCDTCRIQ*FITRVSTMMEGATVSLQCRNLTAGTETFKAEAVTDKLGMYTIKVD 68
cccccccceeeeeeeeccccccccccccccccccccceeeeecccccccceeeeeeeeeecccceeeeeeec

      *           *           *           *           *           *
GDHEDDICQIVLVKSPDQECSEIPNDVYSEQA*AKVTLT*SNNGEASDVRNADALGFLKKA*PLPECPEVL 136
cccccccceeeeccccccccccccccccccccceeeeecccccccceeeeeeccccecccccccchhhh

      *           *
KELDMYDVPGSVTQN 151
hhcccccccccccc
```

Figura 88: Predicción de estructura secundaria de Sal k 5 mediante el método de Jones, mostrándose la hélice α (h, azul), lámina β (e, rojo), y ordenación aperiódica (c, rosa).

Los resultados de la predicción de estructura secundaria fueron: 4% de hélice α (6 residuos/151), 30% de lámina β (45 residuos/151) y 66% de ordenación aperiódica.

Predicción de hidrofobicidad y antigenicidad

A partir de la secuencia de aminoácidos de Sal k 5 se ha obtenido su perfil de hidrofobicidad según el programa descrito por Kyte (149). La predicción de antigenicidad se llevó a cabo mediante el método de Welling (150), Figura 89.

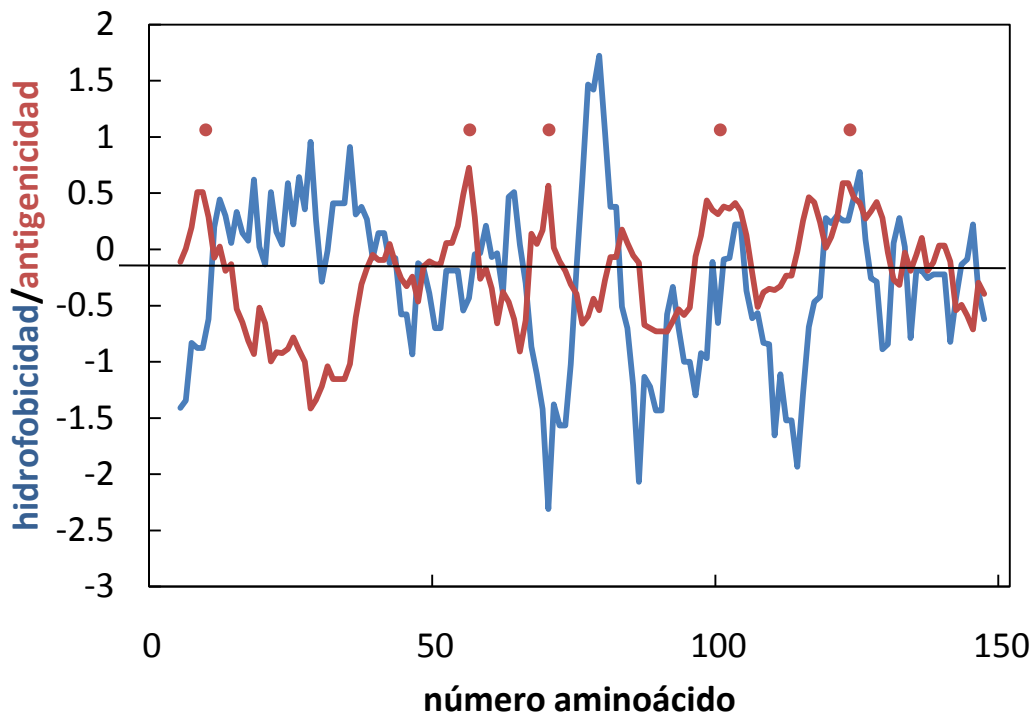


Figura 89: Representación de los perfiles de hidrofobicidad y antigenicidad obtenidos mediante predicciones teóricas de sobre la secuencia de Sal k 5. Azul, perfil de hidrofobicidad según Kyte y Doolittle. Rojo, perfil de antigenicidad según Welling y col. Los puntos rojos indican la zonas potencialmente más antigénicas.

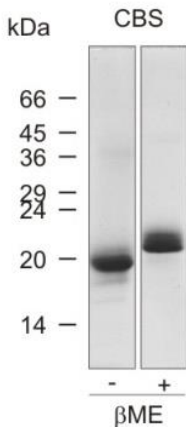
Se determinan 5 regiones potencialmente antigénicas, entre las secuencias: 6-12, 52-57, 67-71, 97-105 y 115-129. De esta proteína no se ha realizado el estudio comparativo de estructura terciaria, ya que en la base de datos no había proteínas con identidad suficiente cuya estructura tridimensional ya estuviera descrita. Por tanto no ha sido posible analizar la posición de estas secuencias y saber si están situadas en zonas externas de la superficie o si son secuencias que pese a su pequeño tamaño pudieran formar epítopos conformacionales.

EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE CDNA RSAL K 5

El cDNA que codifica la secuencia madura de Sal k 5 fue subclonado en el vector de expresión pPICZ α A, en los sitios de restricción *Xho*I y *Not*I. La construcción pPICZ α A/Salk5 se utilizó para transformar células KM71 de *P. pastoris* para producir, por medio de la inducción del promotor de AOX1, el alérgeno secretado al medio

Resultados Familia Ole e 1-like

extracelular, con un rendimiento de 40 mg por litro de cultivo. Después de 72 h, considerado como el tiempo óptimo de inducción en términos de rendimiento e integridad del producto, se visualizó una banda mayoritaria de 20.5 kDa en PAGE-SDS



tras la tinción con CBS. Después de la diálisis del medio de cultivo, se llevó a cabo la purificación tras un procedimiento en tres etapas cromatográficas, un intercambio iónico (DEAE-celulosa), una columna de penetrabilidad (Sephadex G-75), y una cromatografía en HPLC en fase reversa para obtener la proteína recombinante purificada, Figura 90.

Figura 90: CBS tras PAGE-SDS en condiciones reductoras y no reductoras

VALIDACIÓN DE rSAL K 5 CON SU FORMA NATURAL nSAL K 5

Se llevó a cabo una comparación estructural e inmunológica entre nSal k 5 y rSal k 5. El análisis por dicroísmo circular de ambas formas, natural y recombinante, realizadas en el UV lejano, Figura 91A, permitió comprobar la integridad de la forma recombinante, mostrando la equivalencia de esta forma con el alérgeno natural purificado a partir de polen.

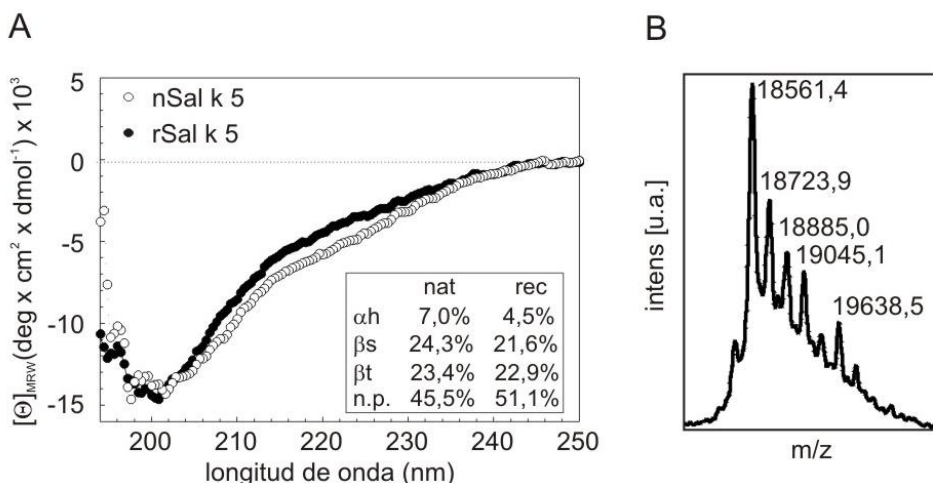
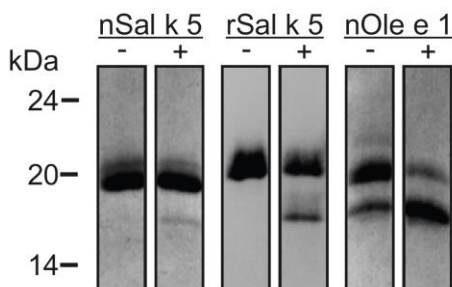


Figura 91: (A) Espectro de dicroísmo circular en el UV-lejano. αh: hélice alfa; βs: lamina beta; βt: giro beta; np: conformación no periódica. (B) Espectrometría de masas de rSal k 5, u.a.: unidades arbitrarias.

La comparación de la elipticidad de nSal k 5 con rSal k 5 era casi equivalente, con ligeras diferencias en los valores de elementos de estructura secundaria, Figura 91A.

El análisis por espectrometría de masas de rSal k 5 rindió un pico principal de 18561,4 Da, Figura 91B, y varios picos de menor intensidad con diferencias de 160-163 Da que corresponderían a diferentes contenidos de manosa.

Para confirmar la N-glicosilación de rSal k 5 y nSal k 5, ambas proteínas se trataron con endoglicosidasa PNGasa F (Figura 92) y las muestras glicosiladas y no glicosiladas se sometieron a SDS-PAGE y se tiñeron con azul de Coomassie.



sometieron a SDS-PAGE y se tiñeron con azul de Coomassie.

Figura 92: Desglicosilación tanto de la forma natural como de la recombinante comparada con la desglicosilación de Ole e 1 con la endoglicosidasa PNGasa F.

Mediante experimentos de inmunotransferencia y ELISA se realizó un análisis comparativo de la unión de IgG e IgE a rSal k 5 y nSal k 5. La unión de IgG procedente de mAb y pAb fue similar para ambas proteínas y no hubo diferencias significativas que pudieran atribuirse al polimorfismo de la proteína natural (datos no mostrados).

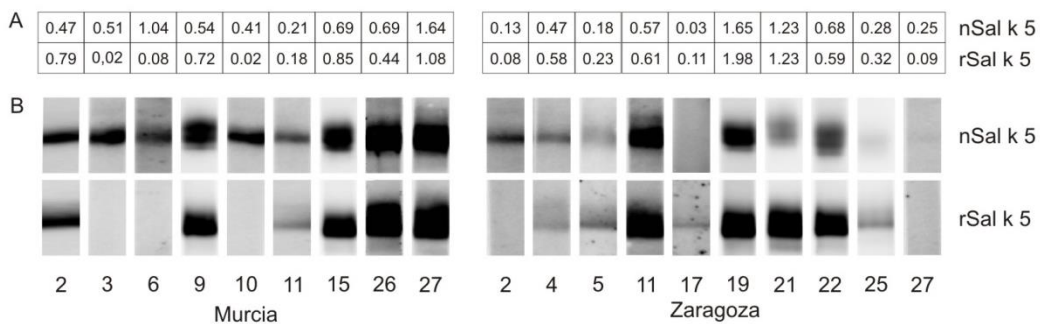
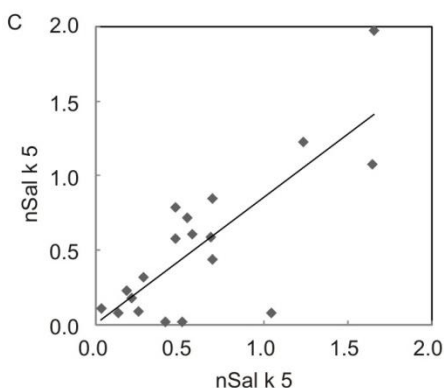


Figura 93: Estudios de unión de IgE. A, Unión de IgE específica medida por ELISA. B, inmunotinción. C, correlación entre forma natural y recombinante.

Diecinueve sueros positivos a nSal k 5 se utilizaron para determinar la unión de IgE a



Resultados Familia Ole e 1-like

ambas formas, natural y recombinante, en ELISA (Figura 93A) y en inmunotransferencia (Figura 93B), mostrando una estrecha correlación entre ambas formas ($r = 0,78$) (Figura 93C).

En ELISA, nueve sueros reconocieron mejor rSal k 5 y nueve nSal k 5. En inmunotransferencia, las IgE de cuatro sueros (3, 6, 10 de Murcia y 2 de Zaragoza) se unen exclusivamente nSal k 5, mientras que los sueros 5, 17, 19, 21, 22 y 25 de Murcia reconocen mejor la forma recombinante. La unión de IgE también fue analizada por medio de ELISA de inhibición con una mezcla equivolúmica de 5 sueros. Se tapizaron placas ELISA con nSal k 5 y rSal k 5 y 3 μg de ambas variantes alérgicas fueron utilizados como inhibidores (Figura 94).

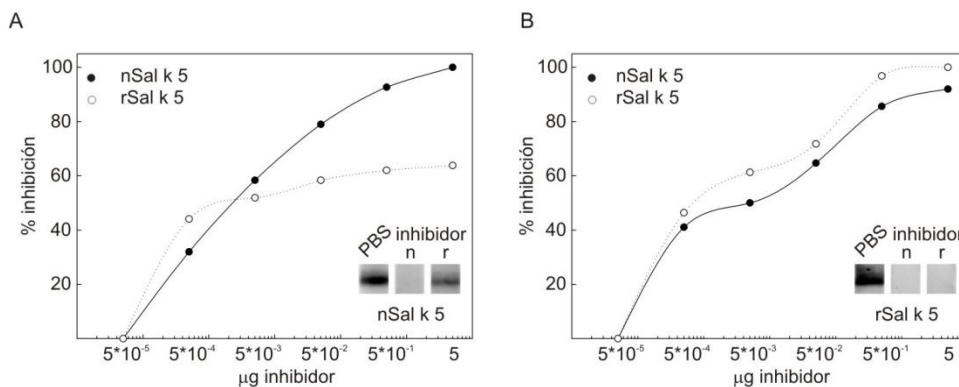


Figura 94: Ensayo de inhibición en ELISA, con nSal k 5 (A) y con rSal k 5 (B), tapizando las placas, usando una mezcla de sueros y las mismas proteínas como inhibidores. Las figuras interiores muestran el mismo experimento realizado en inmunotransferencia.

La forma de las dos curvas de inhibición fue similar cuando los pocillos eran tapizados con rSal k 5, mientras que rSal k 5 no fue capaz de alcanzar una inhibición total de la unión de las IgE a nSal k 5, lo que indica la contribución del grupo glicosídico de nSal 5 k a la unión de IgE y/o la ausencia diferentes isoformas en la forma recombinante.

PROPIEDADES INMUNOLÓGICAS DE SAL K 5 EN COMPARACIÓN CON HOMÓLOGOS OLE E 1-LIKE

Para evaluar la reactividad cruzada con alérgenos Ole e 1-like perteneciente tanto a familias filogenéticamente relacionados como no relacionadas, se llevó a cabo una

inhibición de la unión de IgE de una mezcla de sueros de pacientes alérgicos a nSal k 5, utilizando como inhibidores dos proteínas pertenecientes a la familia Ole e 1-like, Che a 1 de la familia *Chenopodiaceae* y Ole e 1 de la familia *Oleaceae*, además del propio nSal k 5, Figura 95.

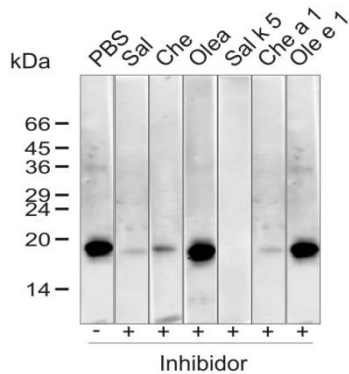


Figura 95: Inhibición de la unión de IgE a nSal k 5 con extractos de pólenes de salsola, cenizo y olivo (500 μ g) y con proteínas purificadas (5 μ g).

Se observa una inhibición casi completa al usar tanto alérgenos como extractos de pólenes de la familia *Chenopodiaceae*, mientras que ni el extracto de olivo ni Ole e 1 fueron capaces de inhibir la unión de IgE a nSal k 5.

Cuando se probaron los sueros de pacientes sensibilizados a polen de *S. kali* no se observó correlación significativa entre Sal k 5 y Ole e 1, sin embargo, entre la respuesta a Sal k 5 y Che a 1 se observó una correlación de 0,85, lo que indica la alta reactividad cruzada entre alérgenos Ole e 1-like de la familia *Chenopodiaceae*, Figura 96.

Resultados Familia Ole e 1-like

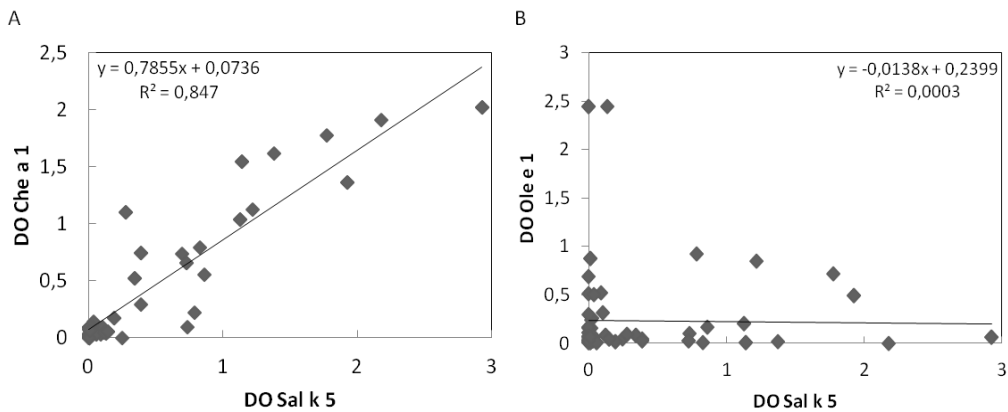


Figura 96: Valores de IgE específica de pacientes sensibilizados medido por ELISA para nSal k 5 en comparación con los valores obtenidos para Che a 1 (A) u Ole e 1 (B). Correlación calculada (R^2) observado para nSal k 5 vs Ole e 1 y nSal k 5 vs Che a 1

DISCUSSION OF SAL K 5, OLE E 1-LIKE FAMILY

IDENTIFICATION OF SAL K 5, A MEMBER OF THE OLE E 1-LIKE FAMILY

The geographic distribution of pollen from different species is strongly influenced by geoclimatic conditions and thus contributes to the sensitization profile of the allergenic patients in a particular area (199). In spite of the numerous species that clustered the Chenopodiaceae family, several ones such as *Chenopodium album* (Lambs' quarter) and *Salsola kali* (Russian thistle) have been identified as important causes of respiratory symptoms in allergic patients from warm regions of the Mediterranean area, some Arabic countries and central states of North America (200), and cross-reactivity between them has been demonstrated (201). These weeds, especially those of *Salsola* genera, from which several species have been described as allergenic, *S. pestifer*, *S. oppositifolia*, *S. vermiculata*, and particularly *S. kali*, are very abundant plants in salty and dried soils and often roll on the floor as shrubs pushed by the wind when reaches the maturity (202). In the semi desert south-eastern areas, *Salsola* is the first cause of seasonal allergy in parallel to olive or grass pollinosis. In areas, such as Central Spain, where extensive irrigation is turning a previous grass area into a semi desert one, a significant increase in *Salsola* allergy in parallel to a decline in grass allergy is obvious (203).

Although these weeds have been generally considered to be minor sources of allergens because a reduced number of pollen grains were registered, in several regions of Spain, mainly those mentioned above, up to 30 to 40% of the sensitized individuals are allergic to these aggressive pollens exhibiting symptoms mainly at the end of summer. Nowadays, *Salsola* pollen is after olive and grasses the third more relevant pollinosis (204) in Spain, either in regions where allergy to these pollens is one of the major sensitization causes, as for instance Zaragoza and Murcia, or in those regions where the wild growth of this weed is concomitant to the olive tree cultivars (205).

Three key points should be mentioned to show the relevance of the *S. kali* pollinosis:

- i) their resistance to drought, especially in the warm countries of the south of Europe,

Discusión Familia Ole e 1-like

- ii) the qualitative and quantitative differences in the allergenic potencies among the *Chenopodiaceae* species extracts, *S. kali* and *C. album*, although they have indistinctly been included in the diagnosis tests for many years (20, 206),
- iii) and the overlap of the pollen season of these species with those of numerous allergenic pollens (207) that play a significant role in the sensitization of patients from these regions.

Chenopodiaceae IgE-binding profiles are complex. The immunoblotting of *S. kali* protein extracts with individual sera from patients allergic to *Chenopodiaceae* pollens rendered many IgE-reactive bands, whose identities and biochemical functions have not been completely elucidated. From individual blots of both populations (Murcia and Zaragoza) very different IgE-binding profiles were detected, Figura 80. Patients from Zaragoza recognized a higher number of IgE-reactive bands than those of patients from Murcia in an interval of molecular masses between 66 kDa and 10 kDa, being the bands of 40, 28 and 20 kDa the most represented in the profiles. Sal k 1, the pectin methylesterase of 40 kDa, has been considered to be a specific marker to the primary sensitization to *S. kali* since it has not been detected in other plants of the *Chenopodiaceae* family as *C. album* (131). Significant inter and intra-species cross-reactivity has been attributed to different allergens already described such like profilins -Che a 2 and Sal k 4-, or polcacins -Che a 3 (198, 207-209).

Ole e 1-like family contains numerous allergenic protein members which belong to very different pollens from weeds, grasses and trees. The high number of members from this protein family pointed out to a relevant biological function in the pollen grain biology (43). The knowledge that most of them have been described as allergens, allows us to suggest that there is an intrinsic allergenicity associated to common 3D-structural motives which defines these proteins. However, the recent characterization of a new member from birch pollen without allergenic properties seems to weaken this theory (113). In this work, a new allergen from *Salsola kali* pollen belonging to the ubiquitous Ole e 1-like family has been identified, which can explain the cross-reactivity with other *Chenopodiaceae* members.

In spite of the high number of allergens from this family that has been identified, the cross-reactivity between Ole e 1-like members has always been associated to those ones phylogenetic related (85, 210, 211). The reasons for these IgE-binding differences are based on the amino acid similarity in the primary structure of these proteins which are determinant for the IgE immunoglobulin and allergen interaction. Thus, whereas the identities among Oleaceae members such as Ole e 1, Lig v1, Syr v 1, and Fra e 1 are around 85% and the similarities higher than 90% - and among *Chenopodiaceae* allergens, Che a 1 and Sal k 5 the identity is 68% and the similarity 84% - there exists a high sequence variability between Sal k 5 and Ole e 1, Pla l 1 and Phl p 11 (197), being 32%, 26%, and 42%, respectively. The decrease in the identity degree notably reduces the possibility of IgE cross-reactivity across these allergens and thus restricting their immunologic relationships to members of the same family (212).

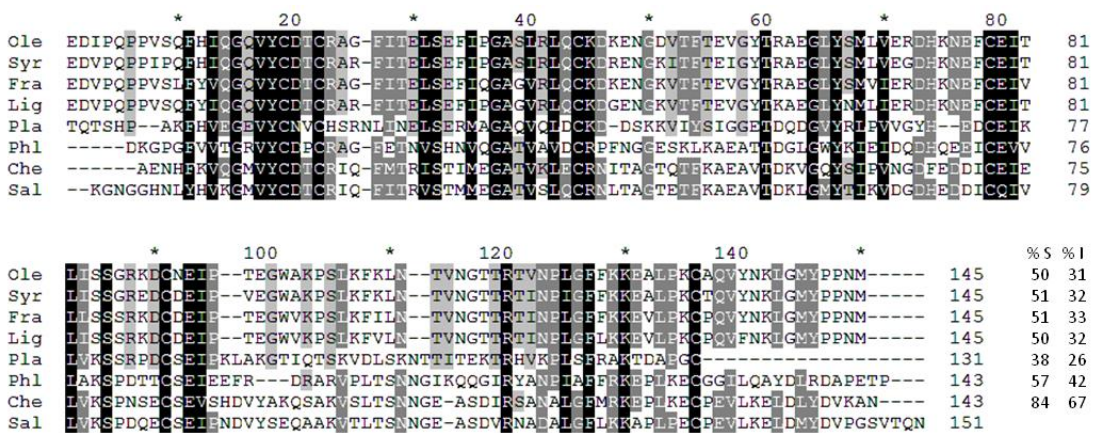


Figura 97: Amino acid sequence alignment of Sal k 5 and other members of the Ole e 1-like family: Ole e 1 (P19963) (26), Fra e 1 (Q7XAV4) (85), Syr v 1 (475247) (84), Lig v 1 (O82015) (83), Pla l 1 (P82242) (196), Phl p 11 (Q8H6L7) (197), Che a 1 (Q8LGR0) (198) and Sal k 5 (GQ427676).

The important primary structure differences detected between Ole e 1 and Sal k 5 could explain the low IgG- and IgE-reactivities between these two allergens. The IgE binding to Sal k 5 using a pool of sera selected in this study, rendered a complete inhibition when Sal k 5 or *S. kali* extract were used as inhibitors and nearly complete values were obtained with Che a 1 or *C. album* extract. Neither Ole e 1 nor *O. europaea* extract were able to inhibit the signal, Figura 95.

Discusión Familia Ole e 1-like

Ole e 1-specific polyclonal antiserum was able to render a measurable signal in immunoblotting assays only when the unfolding of the molecule is produced, Figura 84. Furthermore, only the monoclonal antibody raised against a continuous epitope of Ole e 1 (107), was able to detect Sal k 5. It was also evaluated the IgE binding to Sal k 5 compared to Che a 1 and Ole e 1, Figura 96, obtaining high correlation in IgE binding between Sal k 5/Che a 1 (both *Chenopodiaceae* members), while no correlation was observed between Sal k 5/Ole e 1 (*Oleaceae* member). These results are supported by the reported data for *Oleaceae* allergens, indicating that the cross reactivity is restricted to the members of the same family. These results were also observed when Ole e 1 and Che a 1 were immunologically compared (210). Similar findings were observed here, pointing out the high cross-reactivity between phylogenetically related allergens and opposite situation for phylogenetically non-related allergens.

Finally, a prevalence of more than 30% for natural Sal k 5 purified from pollen was reached in the two populations of sera herein analyzed from patients allergic to *S. kali* indicating the importance of Sal k 5.

RECOMBINANT EXPRESSION AND COMPARISON WITH NATURAL COUNTERPART

The *P. pastoris* yeast has been selected as the expression system to produce the recombinant Sal k 5. The glycosylation and the complex folding are structural features to consider when choosing the expression system to produce a protein. *P. pastoris* is a system able to form disulfide bonds and necessary when glycoproteins are expressed. This is why heterologous expression system has been the most widely employed organism in recombinant production of olive allergens. The success of this selection is herein simplified by the fact that all members of this Ole e 1-like family have been efficiently produced in this eukaryotic system (172). Sal k 5 was synthesized and secreted to the extracellular medium of the yeast cells, together with a few other contaminants.

a. Structural comparison

An essential requisite to include a recombinant allergen in a diagnosis protocol is its accurate validation of structural and immunologic parameters. The recombinant protein displayed a correct folding as it has been proven by spectroscopic analysis where the values obtained after DC are pretty similar to the ones obtained for the natural form as well as to those obtained theoretically.

b. Glycan content comparison

The results of mass spectroscopy showed differences with the value obtained according to theoretical predictions, Figura 91B, indicating the presence of a glycan inserted into the consensus sequence. Glycosylation of recombinant protein and the natural allergen is confirmed with the lectin Con A. But no deglycosylation of the natural protein by the endoglycosidase F that probably indicates the presence of fucose monosaccharides in the glycan structure, while the recombinant allergen with a rich-mannose glycan component is partially deglycosylated by the enzyme, Figura 92. The molecular mass difference between the natural and the recombinant protein is assumed by a bigger size of the oligosaccharide incorporated by yeast *P. pastoris* in the N-glycosylation consensus site of Sal k 5. The one incorporated in rSal k 5 should be composed of a core of GlcNAc and a group of 10 manose residues for the higher intensity peak and 1 extra manose of 160 Da for each additional peak for rSal k 5. In contrast to nSal k 5, where fucose monosaccharides were present in the glycan structure as it also occurs in Ole e 1 glycosylated molecules.

Regarding the glycosylation consensus site in these proteins, it seems to be coincident in all members from the same botanical family. Thus, a common N-glycosylation site at Asn⁴³/Asn³⁹ for Sal k 5 and Che a 1, respectively, was observed as a result of a post-translational processing. However, a different site for the *Oleaceae* proteins (Asn¹¹⁰ in Ole e 1, Syr v 1, Fra e 1 and Lig v 1) or *Gramineae* (Asn²⁴ in Lol p 11 or Phl p 11) has been identified. Interestingly, the birch member of this family, which neither is glycosylated nor contains a consensus site in its sequence, is the only Ole e 1-like member described so far which lacks the IgE-binding ability (113). Other structural feature that defines this family of allergens is the polymorphism, which visible by means of the 2D-PAGE pattern. It is lower in Sal k 5 than in Che a 1 or Ole e 1, from which more than 10 different isoforms sequences were identified.

Discusión Familia Ole e 1-like

c. Immunological comparison

When a recombinant protein is produced it is required an accurate validation of immunological parameters such as its IgE-binding capacity taking as reference its natural counterpart. However, in most cases this comparison is exclusively made using the pollen extract where the natural form is expressed in such low amounts that its isolation is a hard task. Thus, the absence of an accurate quantification of the natural forms keeps getting good conclusions from these analyses. Herein, the availability of both natural and recombinant forms allowed us to accurately perform this analysis

Immunologic analysis showed a high correlation between recombinant and natural forms, Figura 93, as well as the inhibition assays confirmed the integrity of the recombinant protein and the presence of most of the B cell epitopes, Figura 94. The contribution to the IgE binding of the glycosydic group of nSal k 5 has also been shown. The lack of a total inhibition of the IgE binding to nSal k 5 using rSal k 5 as inhibitor, Figura 94, suggests a possible involvement of the glycan moiety in the IgE reactivity since a different carbohydrate component is incorporated in the N-glycosylation site by the yeast. Other possibility could be the absence of critical residues within the B epitopes in the recombinant isoform, which would be present in the natural form due to the polymorphic character.

In short, according to previous and here presented results, *S. kali* pollen extract seems to be enough for the diagnosis and treatment of most representative Chenopodiaceae pollen allergies, since it contains a specific and major allergen (Sal k 1) and is able to inhibit the IgE binding of all the other already known allergens from *C. album* pollen. Moreover, the availability of Sal k 5, together with Sal k 1, and panallergens Sal k 4 and polcalcin as molecular tools to establish a diagnostic algorithm, could be a good tool to stratify patients depending on their sensitization: Sal k 1 as marker of allergy to *S. kali* pollen, Sal k 5 as marker of *Chenopodiaceae* sensitization, and finally Sal k 4 and polcalcin as markers of polysensitization. Furthermore, the correlation between the increase of this pollinosis and the desertization of the soil as well as the relevance of this new member of Ole e 1-like allergen from *S. kali* makes Sal k 5, and the other allergens of *S. kali* pollen suitable candidates to optimize diagnosis protocols.

CONCLUSIONES FINALES

Las principales conclusiones derivadas de este trabajo son:

- 1) Se ha detectado la existencia de un nuevo alérgeno en el polen de olivo, Ole e 12, mediante la utilización de técnicas proteómicas.
- 2) Se ha clonado el cDNA de Ole e 12, sintetizado a partir de RNA total del polen de olivo, mediante amplificación por PCR utilizando, como cebadores, oligonucleótidos específicos que codifican regiones de esta proteína. La comparación de la secuencia obtenida con las recogidas en las bases de datos permiten describir a Ole e 12 como una proteína perteneciente a la familia de las isoflavona reductasas, exhibiendo gran elevada identidad de secuencia con Bet v 6, alérgeno del polen de *Betula verrucosa*, o Pyr c 5, alérgeno presente en la pera.
- 3) Se ha llevado a cabo el diseño de un protocolo para la expresión recombinante de Ole e 12. El alérgeno ha sido expresando en la bacteria *E. coli*, como una proteína soluble. La caracterización molecular e inmunológica de la proteína recombinante validó su semejanza con la forma natural presente en el polen de olivo.
- 4) Se han obtenido dos anticuerpos específicos de Ole e 12: un anticuerpo monoclonal específico para el fragmento Cterminal de Ole e 12 y un anticuerpo policlonal frente a rOle e 12.
- 5) Se ha evaluado la capacidad de Ole e 12 para unir anticuerpos IgE, lo que ha permitido clasificar este alérgeno como un alérgeno minoritario del polen de olivo con una prevalencia de 4-33 % entre los pacientes con síntomas polínicos y los pacientes que además de polínicos presentaban sensibilización a melocotón.
- 6) Se ha identificado la presencia de proteínas homólogas Ole e 12 en pólenes de diversas especies relacionadas y no no relacionadas filogenéticamente, así como en distintos alimentos, que podrían estar implicadas en procesos de reactividad cruzada.

Conclusiones Finales

- 7) Se han clonado y secuenciado los cDNAs codificantes de las IFR alergénicas: Fra e 12 y Che a 12 tomando como moldes los cDNAs sintetizados a partir de los RNAs totales de los pólenes de fresno y quenopodio. La obtención de la estructura primaria de estos dos alérgenos ha permitido su comparación con la secuencia de aminoácidos obtenida para Ole e 12. Además se ha llevado la expresión recombinante de Fra e 12.
- 8) Se ha identificado un nuevo alérgeno del polen de *Salsola kali*, Sal k 5, perteneciente a la familia de proteínas homólogas a Ole e 1.
- 9) Se ha clonado el cDNA de Sal k 5, sintetizado a partir de RNA total del polen de *Salsola kali*.
- 10) El alérgeno Sal k 5 se ha producido de forma recombinante en la levadura *Pichia pastoris*.
- 11) Se alcanzó una prevalencia de más del 30% para nSal k 5, en poblaciones de pacientes alérgicos a *S. kali*.
- 12) El extracto del polen de *S. kali* parece ser suficiente para el diagnóstico y tratamiento de la mayoría de las alergias al polen de la familia de las *Chenopodiaceae*.

FINAL REMARKS

The main conclusions derived from this work are:

- 1) It has been detected a new allergen from olive tree pollen, Ole e 12, by using proteomic techniques.
- 2) Ole e 12 was cloned from cDNA, synthesized from olive pollen total RNA, by PCR amplification using, as primers, oligonucleotides encoding specific regions of this protein. Comparison of the sequence obtained with those contained in the databases, allows description of Ole e 12 as a protein belonging to the family of isoflavone reductases, exhibiting high sequence identity with Bet v 6, pollen allergen from *Betula verrucosa*, or Pyr c 5, allergen present in *Pyrus communis* fruit.
- 3) It has been conducted a protocol for the recombinant production of Ole e 12. The allergen-specific cDNA was expressed in *E. coli* as a soluble protein. The molecular and immunological characterization of the recombinant protein validated its equivalence to the one naturally present in olive pollen.
- 4) We have obtained two specific antibodies for Ole e 12: a monoclonal antiserum specific for the Ct fragment of Ole e 12 and a polyclonal antiserum rose against rOle e 12.
- 5) It has been evaluated the ability of Ole e 12 to bind IgE antibodies, allowing the classification of this protein as a minor allergen from olive pollen, with a prevalence of 4-33% among patients with either pollen symptoms and showing also sensitization to peach.
- 6) It has been identified the presence of homologous proteins to Ole e 12 in phylogenetically related and unrelated pollen from various species, but also in several foods, which could be involved in processes of cross-reactivity.
- 7) It has been cloned and sequenced the cDNAs encoding the allergenic IFR: Fra e 12 and Che a 12, taking as templates the cDNAs synthesized from total RNAs from ash and chenopodium pollens. Obtaining the primary structure of these two allergens

Conclusiones Finales

has allowed comparison with the amino acid sequence obtained for Ole e 12. Furthermore has been carried on the recombinant expression of Fra e 12.

- 8) It has been identified a new allergen in *Salsola kali* pollen, Sal k 5, belonging to the family of proteins homologous to Ole e 1.
- 9) It has been cloned Sal k 5-specific cDNA, synthesized from total RNA from *Salsola kali* pollen.
- 10) The allergen Sal k 5 has been recombinantly produced in *Pichia pastoris* yeast.
- 11) A prevalence of more than 30% for natural Sal k 5 purified from pollen was reached in populations from patients allergic to *S. kali* indicating the importance of Sal k 5.
- 12) *S. kali* pollen extract seems to be enough for the diagnosis and treatment of most representative *Chenopodiaceae* pollen allergies.

REFERENCIAS

1. Kay, A. B. (2001) Allergy and allergic diseases. First of two parts, *N Engl J Med* 344(1), 30-37.
2. Bousquet, J., Burney, P. G., Zuberbier, T., Cauwenberge, P. V., Akdis, C. A., Bindslev-Jensen, C., Bonini, S., Fokkens, W. J., Kauffmann, F., Kowalski, M. L., Lodrup-Carlsen, K., Mullol, J., Nizankowska-Mogilnicka, E., Papadopoulos, N., Toskala, E., Wickman, M., Anto, J., Auvergne, N., Bachert, C., Bousquet, P. J., Brunekreef, B., Canonica, G. W., Carlsen, K. H., Gjomarkaj, M., Haahtela, T., Howarth, P., Lenzen, G., Lotvall, J., Radon, K., Ring, J., Salapatas, M., Schunemann, H. J., Szczeklik, A., Todo-Bom, A., Valovirta, E., von Mutius, E., and Zock, J. P. (2009) GA2LEN (Global Allergy and Asthma European Network) addresses the allergy and asthma 'epidemic', *Allergy* 64(7), 969-977.
3. Galli, S. J., Tsai, M., and Piliponsky, A. M. (2008) The development of allergic inflammation, *Nature* 454(7203), 445-454.
4. Mygind, N., and Dahl, R. (1996) Epidemiology of allergic rhinitis, *Pediatr Allergy Immunol* 7(9 Suppl), 57-62.
5. Larche, M., Akdis, C. A., and Valenta, R. (2006) Immunological mechanisms of allergen-specific immunotherapy, *Nat Rev Immunol* 6(10), 761-771.
6. Canonica, G. W., Ansotegui, I. J., Pawankar, R., Schmid-Grendelmeier, P., van Hage, M., Baena-Cagnani, C. E., Melioli, G., Nunes, C., Passalacqua, G., Rosenwasser, L., Sampson, H., Sastre, J., Bousquet, J., and Zuberbier, T. (2013) A WAO - ARIA - GA(2)LEN consensus document on molecular-based allergy diagnostics, *World Allergy Organ Journ* 6(1), 1-17.
7. Harwanegg, C., Laffer, S., Hiller, R., Mueller, M. W., Kraft, D., Spitzauer, S., and Valenta, R. (2003) Microarrayed recombinant allergens for diagnosis of allergy, *Clin Exp Allergy* 33(1), 7-13.
8. Valenta, R., and Niederberger, V. (2007) Recombinant allergens for immunotherapy, *J Allergy Clin Immunol* 119(4), 826-830.
9. Holgate, S. T., and Polosa, R. (2008) Treatment strategies for allergy and asthma, *Nat Rev Immunol* 8(3), 218-230.
10. King, T. P., Hoffman, D., Lowenstein, H., Marsh, D. G., Platts-Mills, T. A., and Thomas, W. (1994) Allergen nomenclature. WHO/IUIS Allergen Nomenclature Subcommittee, *Int Arch Allergy Immunol* 105(3), 224-233.
11. Commins, S. P. (2015) Carbohydrates as allergens, *Curr Allergy Asthma Rep* 15(1), 492.

Bibliografía

12. Herbert, C. A., Holgate, S. T., Robinson, C., Thompson, P. J., and Stewart, G. A. (1990) Effect of mite allergen on permeability of bronchial mucosa, *Lancet* 336(8723), 1132.
13. Wan, H., Winton, H. L., Soeller, C., Tovey, E. R., Gruenert, D. C., Thompson, P. J., Stewart, G. A., Taylor, G. W., Garrod, D. R., Cannell, M. B., and Robinson, C. (1999) Der p 1 facilitates transepithelial allergen delivery by disruption of tight junctions, *J Clin Invest* 104(1), 123-133.
14. Gough, L., Schulz, O., Sewell, H. F., and Shakib, F. (1999) The cysteine protease activity of the major dust mite allergen Der p 1 selectively enhances the immunoglobulin E antibody response, *J Exp Med* 190(12), 1897-1902.
15. Ghaemmaghami, A. M., Gough, L., Sewell, H. F., and Shakib, F. (2002) The proteolytic activity of the major dust mite allergen Der p 1 conditions dendritic cells to produce less interleukin-12: allergen-induced Th2 bias determined at the dendritic cell level, *Clin Exp Allergy* 32(10), 1468-1475.
16. Pomés, A., Chapman, M. D., Vailes, L. D., Blundell, T. L., and Dhanaraj, V. (2002) Cockroach allergen Bla g 2: structure, function, and implications for allergic sensitization, *Am J Respir Crit Care Med* 165(3), 391-397.
17. Emberlin, J., Savage, M., and Jones, S. (1993) Annual variations in grass pollen seasons in London 1961-1990: trends and forecast models, *Clin Exp Allergy* 23(11), 911-918.
18. Tobías, A., Galán, I., Banegas, J. R., and Aránguez, E. (2003) Short term effects of airborne pollen concentrations on asthma epidemic, *Thorax* 58(8), 708-710.
19. Garrido-Lestache, J. S. (2004) Pólenes alergénicos en España, *Allergol Immunopathol* 32(3), 121-124.
20. Barber, D., de la Torre, F., Feo, F., Florido, F., Guardia, P., Moreno, C., Quiralte, J., Lombardero, M., Villalba, M., Salcedo, G., and Rodríguez, R. (2008) Understanding patient sensitization profiles in complex pollen areas: a molecular epidemiological study, *Allergy* 63(11), 1550-1558.
21. Macchia, L., Aliani, M., Caiaffa, M. F., Carbonara, A. M., Gatti, E., Iacobelli, A., Strada, S., Casella, G., and Tursi, A. (1987) Monitoring of atmospheric conditions and forecast of olive pollen season, *Experientia Suppl* 5195-99.
22. Domínguez-Vilches, E., Infante García-Pantaleón, F., Galán Soldevilla, C., Guerra Pasadas, F., and Villamandos de la Torre, F. (1993) Variations in the concentrations of airborne Olea pollen and associated pollinosis in Cordoba (Spain): a study of the 10-year period 1982-1991, *J Investig Allergol Clin Immunol* 3(3), 121-129.
23. Villalba, M., Rodríguez, R., and Batanero, E. (2013) The spectrum of olive pollen allergens. From structures to diagnosis and treatment, *Methods* 66(1), 44-54.

24. Rodríguez, R., Villalba, M., Monsalve, R. I., and Batanero, E. (2001) The spectrum of olive pollen allergens, *Int Arch Allergy Immunol* 125(3), 185-195.
25. Torres, M., Alvarez-Garcia, E., Bartra, J., Alcantara, M., Palomares, O., Villalba, M., and Rodríguez, R. (2014) The allergenic structure of the thaumatin-like protein Ole e 13 is degraded by processing of raw olive fruits, *J Investig Allergol Clin Immunol* 24(3), 162-168.
26. Villalba, M., Batanero, E., López-Otín, C., Sánchez, L. M., Monsalve, R. I., González de la Peña, M. A., Lahoz, C., and Rodríguez, R. (1993) The amino acid sequence of Ole e I, the major allergen from olive tree (*Olea europaea*) pollen, *Eur J Biochem* 216(3), 863-869.
27. Villalba, M., López-Otín, C., Martín-Orozco, E., Monsalve, R. I., Palomino, P., Lahoz, C., and Rodríguez, R. (1990) Isolation of three allergenic fractions of the major allergen from *Olea europaea* pollen and N-terminal amino acid sequence, *Biochem Biophys Res Commun* 172(2), 523-528.
28. Ledesma, A., Rodríguez, R., and Villalba, M. (1998) Olive-pollen profilin. Molecular and immunologic properties, *Allergy* 53(5), 520-526.
29. Batanero, E., Villalba, M., Ledesma, A., Puente, X. S., and Rodríguez, R. (1996) Ole e 3, an olive-tree allergen, belongs to a widespread family of pollen proteins, *Eur J Biochem* 241(3), 772-778.
30. Ledesma, A., Villalba, M., Batanero, E., and Rodríguez, R. (1998) Molecular cloning and expression of active Ole e 3, a major allergen from olive-tree pollen and member of a novel family of Ca²⁺-binding proteins (polcalcins) involved in allergy, *Eur J Biochem* 258(2), 454-459.
31. Boluda, L., Alonso, C., and Fernández-Caldas, E. (1998) Purification, characterization, and partial sequencing of two new allergens of *Olea europaea*, *J Allergy Clin Immunol* 101(2 Pt 1), 210-216.
32. Batanero, E., Ledesma, A., Villalba, M., and Rodríguez, R. (1997) Purification, amino acid sequence and immunological characterization of Ole e 6, a cysteine-enriched allergen from olive tree pollen, *FEBS Lett* 410(2-3), 293-296.
33. Tejera, M. L., Villalba, M., Batanero, E., and Rodríguez, R. (1999) Identification, isolation, and characterization of Ole e 7, a new allergen of olive tree pollen, *J Allergy Clin Immunol* 104(4 Pt 1), 797-802.
34. Ledesma, A., Villalba, M., and Rodríguez, R. (2000) Cloning, expression and characterization of a novel four EF-hand Ca²⁺-binding protein from olive pollen with allergenic activity, *FEBS Lett* 466(1), 192-196.
35. Huecas, S., Villalba, M., and Rodríguez, R. (2001) Ole e 9, a major olive pollen allergen is a 1,3-beta-glucanase. Isolation, characterization, amino acid sequence, and tissue specificity, *J Biol Chem* 276(30), 27959-27966.
36. Barral, P., Batanero, E., Palomares, O., Quiralte, J., Villalba, M., and Rodríguez, R. (2004) A major allergen from pollen defines a novel family of

Bibliografía

- plant proteins and shows intra- and interspecies [correction of interspecies] cross-reactivity, *J Immunol* 172(6), 3644-3651.
37. Salamanca, G., Rodríguez, R., Quiralte, J., Moreno, C., Pascual, C. Y., Barber, D., and Villalba, M. (2010) Pectin methylesterases of pollen tissue, a major allergen in olive tree, *FEBS J* 277(13), 2729-2739.
 38. Batanero, E., Villalba, M., and Rodríguez, R. (1994) Glycosylation site of the major allergen from olive tree pollen. Allergenic implications of the carbohydrate moiety, *Mol Immunol* 31(1), 31-37.
 39. Batanero, E., Villalba, M., Monsalve, R. I., and Rodríguez, R. (1996) Cross-reactivity between the major allergen from olive pollen and unrelated glycoproteins: evidence of an epitope in the glycan moiety of the allergen, *J Allergy Clin Immunol* 97(6), 1264-1271.
 40. Batanero, E., Crespo, J. F., Monsalve, R. I., Martín-Esteban, M., Villalba, M., and Rodríguez, R. (1999) IgE-binding and histamine-release capabilities of the main carbohydrate component isolated from the major allergen of olive tree pollen, *Ole e 1*, *J Allergy Clin Immunol* 103(1 Pt 1), 147-153.
 41. van Ree, R., Cabanes-Macheteau, M., Akkerdaas, J., Milazzo, J. P., Loutelier-Bourhis, C., Rayon, C., Villalba, M., Koppelman, S., Aalberse, R., Rodriguez, R., Faye, L., and Lerouge, P. (2000) Beta(1,2)-xylose and alpha(1,3)-fucose residues have a strong contribution in IgE binding to plant glycoallergens, *J Biol Chem* 275(15), 11451-11458.
 42. Villalba, M., Batanero, E., Monsalve, R. I., González de la Peña, M. A., Lahoz, C., and Rodríguez, R. (1994) Cloning and expression of Ole e I, the major allergen from olive tree pollen. Polymorphism analysis and tissue specificity, *J Biol Chem* 269(21), 15217-15222.
 43. Johnson, M. A., and Preuss, D. (2003) On your mark, get set, GROW! LePRK2-LAT52 interactions regulate pollen tube growth, *Trends Plant Sci* 8(3), 97-99.
 44. Jockusch, B. M., Murk, K., and Rothkegel, M. (2007) The profile of profilins, *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 159:131-149.
 45. Valenta, R., Hayek, B., Seiberler, S., Bugajska-Schretter, A., Niederberger, V., Twardosz, A., Natter, S., Vangelista, L., Pastore, A., Spitzauer, S., and Kraft, D. (1998) Calcium-binding allergens: from plants to man, *Int Arch Allergy Immunol* 117(3), 160-166.
 46. Barral, P., Tejera, M. L., Treviño, M. A., Batanero, E., Villalba, M., Bruix, M., and Rodríguez, R. (2004) Recombinant expression of Ole e 6, a Cys-enriched pollen allergen, in *Pichia pastoris* yeast: detection of partial oxidation of methionine by NMR, *Protein Expr Purif* 37(2), 336-343.
 47. Treviño, M. A., García-Mayoral, M. F., Barral, P., Villalba, M., Santoro, J., Rico, M., Rodríguez, R., and Bruix, M. (2004) NMR solution structure of Ole e 6, a major allergen from olive tree pollen, *J Biol Chem* 279(37), 39035-39041.

48. García-Olmedo, F., Molina, A., Segura, A., and Moreno, M. (1995) The defensive role of nonspecific lipid-transfer proteins in plants, *Trends Microbiol* 3(2), 72-74.
49. Pastorello, E. A., Pravettoni, V., Farioli, L., Rivolta, F., Conti, A., Ispano, M., Fortunato, D., Bengtsson, A., and Bianchi, M. (2002) Hypersensitivity to mugwort (*Artemisia vulgaris*) in patients with peach allergy is due to a common lipid transfer protein allergen and is often without clinical expression, *J Allergy Clin Immunol* 110(2), 310-317.
50. Vallverdú, A., García-Ortega, P., Martínez, J., Martínez, A., Esteban, M. I., de Molina, M., Fernández-Távora, L., Fernández, J., Bartolomé, B., and Palacios, R. (1997) *Mercurialis annua*: characterization of main allergens and cross-reactivity with other species, *Int Arch Allergy Immunol* 112(4), 356-364.
51. Pastorello, E. A., Ortolani, C., Baroglio, C., Pravettoni, V., Ispano, M., Giuffrida, M. G., Fortunato, D., Farioli, L., Monza, M., Napolitano, L., Sacco, M., Scibola, E., and Conti, A. (1999) Complete amino acid sequence determination of the major allergen of peach (*Prunus persica*) Pru p 1, *Biol Chem* 380(11), 1315-1320.
52. Sánchez-Monge, R., Lombardero, M., García-Sellés, F. J., Barber, D., and Salcedo, G. (1999) Lipid-transfer proteins are relevant allergens in fruit allergy, *J Allergy Clin Immunol* 103(3 Pt 1), 514-519.
53. Pastorello, E. A., Farioli, L., Pravettoni, V., Ortolani, C., Fortunato, D., Giuffrida, M. G., Perono Garoffo, L., Calamari, A. M., Brenna, O., and Conti, A. (2003) Identification of grape and wine allergens as an endochitinase 4, a lipid-transfer protein, and a thaumatin, *J Allergy Clin Immunol* 111(2), 350-359.
54. Díaz-Perales, A., Tabar, A. I., Sánchez-Monge, R., García, B. E., Gómez, B., Barber, D., and Salcedo, G. (2002) Characterization of asparagus allergens: a relevant role of lipid transfer proteins, *J Allergy Clin Immunol* 110(5), 790-796.
55. Pastorello, E. A., Vieths, S., Pravettoni, V., Farioli, L., Trambaioli, C., Fortunato, D., Luttkopf, D., Calamari, M., Ansaloni, R., Scibilia, J., Ballmer-Weber, B. K., Poulsen, L. K., Wutrich, B., Hansen, K. S., Robino, A. M., Ortolani, C., and Conti, A. (2002) Identification of hazelnut major allergens in sensitive patients with positive double-blind, placebo-controlled food challenge results, *J Allergy Clin Immunol* 109(3), 563-570.
56. Palomares, O., Villalba, M., Quiralte, J., Polo, F., and Rodríguez, R. (2005) 1,3-beta-glucanases as candidates in latex-pollen-vegetable food cross-reactivity, *Clin Exp Allergy* 35(3), 345-351.
57. Simmons, C. R. (1994) The Physiology and Molecular Biology of Plant 1,3-β-D-Glucanases and 1,3;1,4-β-D-Glucanases, *Crit Rev Plant Sci* 13(4), 325-387.

Bibliografía

58. Wessels, J. G. H., and Sietsma, J. H. (1981) Fungal Cell Walls: A Survey, In *Plant Carbohydrates II* (Tanner, W., and Loewus, F., Eds.), pp 352-394, Springer Berlin Heidelberg.
59. Adams, D. J. (2004) Fungal cell wall chitinases and glucanases, *Microbiology* 150(Pt 7), 2029-2035.
60. Masuda, Y., and Yamamoto, R. (1970) Effect of auxin on beta-1, 3-glucanase activity in Avena coleoptile, *Dev Growth Differ* 11(4), 287-296.
61. Heyn, A. N. (1969) Glucanase activity in coleoptiles of Avena, *Arch Biochem Biophys* 132(2), 442-449.
62. Roggen, H. P. J. R., and Stanley, R. G. (1969) Cell-wall-hydrolysing enzymes in wall formation as measured by pollen-tube extension, *Planta* 84(4), 295-303.
63. Meikle, P. J., Bonig, I., Hoogenraad, N. J., Clarke, A. E., and Stone, B. A. (1991) The location of (1-->3)-beta-glucans in the walls of pollen tubes of *Nicotiana glauca* using a (1-->3)-beta-glucan-specific monoclonal antibody, *Planta* 185(1), 1-8.
64. Ori, N., Sessa, G., Lotan, T., Himmelhoch, S., and Fluhr, R. (1990) A major stylar matrix polypeptide (sp41) is a member of the pathogenesis-related proteins superclass, *EMBO J* 9(11), 3429-3436.
65. Morohashi, Y., and Matsushima, H. (2000) Development of β -1,3-glucanase activity in germinated tomato seeds, *J Exp Bot* 51(349), 1381-1387.
66. Buchner, P., Rochat, C., Wuillème, S., and Boutin, J.-P. (2002) Characterization of a tissue-specific and developmentally regulated β -1, 3-glucanase gene in pea (*Pisum sativum*), *Plant Mol Biol* 49(2), 171-186.
67. Neale, A. D., Wahleithner, J. A., Lund, M., Bonnett, H. T., Kelly, A., Meeks-Wagner, D. R., Peacock, W. J., and Dennis, E. S. (1990) Chitinase, beta-1, 3-glucanase, osmotin, and extensin are expressed in tobacco explants during flower formation, *Plant Cell* 2(7), 673-684.
68. Akiyama, T., Pillai, M. A., and Sentoku, N. (2004) Cloning, characterization and expression of OsGLN2, a rice endo-1,3-beta-glucanase gene regulated developmentally in flowers and hormonally in germinating seeds, *Planta* 220(1), 129-139.
69. Palomares, O., Alcántara, M., Quiralte, J., Villalba, M., Garzón, F., and Rodríguez, R. (2008) Airway disease and thaumatin-like protein in an olive-oil mill worker, *N Engl J Med* 358(12), 1306-1308.
70. González Minero, F. J., Morales, J., Candau, P., Tomás, M. C., and Pérez Tello, A. M. (1998) Aerobiological study of *Chenopodiaceae* and *Amaranthaceae* in the Mediterranean area of southwestern Spain, *J Investig Allergol Clin Immunol* 8(6), 370-375.
71. Ezeamuzie, C. I., Thomson, M. S., Al-Ali, S., Dowaisan, A., Khan, M., and Hijazi, Z. (2000) Asthma in the desert: spectrum of the sensitizing aeroallergens, *Allergy* 55(2), 157-162.

72. Asero, R. (2002) Birch and ragweed pollinosis north of Milan: a model to investigate the effects of exposure to "new" airborne allergens, *Allergy* 57(11), 1063-1066.
73. Pola Pola, J., Zapata Jiménez, C., and Sanz Turón, E. (1998) Polinosis en el área de Zaragoza, *Rev Esp Alergol Inmunol Clin* 13(2), 135-139.
74. Bohle, B., and Vieths, S. (2004) Improving diagnostic tests for food allergy with recombinant allergens, *Methods* 32(3), 292-299.
75. Cuesta-Herranz, J., Barber, D., Blanco, C., Cisteró-Bahima, A., Crespo, J. F., Fernández-Rivas, M., Fernández-Sánchez, J., Florido, J. F., Ibañez, M. D., Rodríguez, R., Salcedo, G., García, B. E., Lombardero, M., Quiralte, J., Rodríguez, J., Sánchez-Monge, R., Vereda, A., Villalba, M., Alonso Díaz de Durana, M. D., Basagana, M., Carrillo, T., Fernández-Nieto, M., and Tabar, A. I. (2010) Differences among pollen-allergic patients with and without plant food allergy, *Int Arch Allergy Immunol* 153(2), 182-192.
76. Fernández Rivas, M. (2009) Food allergy in Alergologica-2005, *J Investig Alergol Clin Immunol* 19 Suppl 237-44.
77. Hauser, M., Roulias, A., Ferreira, F., and Egger, M. (2010) Panallergens and their impact on the allergic patient, *Allergy Asthma Clin Immunol* 6(1), 1.
78. Burastero, S. E. (2006) Pollen-cross allergenicity mediated by panallergens: a clue to the patho-genesis of multiple sensitizations, *Inflamm Allergy Drug Targets* 5(4), 203-209.
79. Mittag, D., Akkerdaas, J., Ballmer-Weber, B. K., Vogel, L., Wensing, M., Becker, W. M., Koppelman, S. J., Knulst, A. C., Helbling, A., Hefle, S. L., Van Ree, R., and Vieths, S. (2004) Ara h 8, a Bet v 1-homologous allergen from peanut, is a major allergen in patients with combined birch pollen and peanut allergy, *J Allergy Clin Immunol* 114(6), 1410-1417.
80. Bousquet, J., Guerin, B., Hewitt, B., Lim, S., and Michel, F. B. (1985) Allergy in the Mediterranean area. III: Cross reactivity among *Oleaceae* pollens, *Clin Allergy* 15(5), 439-448.
81. Obispo, T. M., Melero, J. A., Carpizo, J. A., Carreira, J., and Lombardero, M. (1993) The main allergen of *Olea europaea* (Ole e I) is also present in other species of the *Oleaceae* family, *Clin Exp Allergy* 23(4), 311-316.
82. Martín-Orozco, E., Cárdbaba, B., del Pozo, V., de Andrés, B., Villalba, M., Gallardo, S., Rodríguez-García, M. I., Fernández, M. C., Alché, J. D., and Rodríguez, R. (1994) Ole e I: epitope mapping, cross-reactivity with other *Oleaceae* pollens and ultrastructural localization, *Int Arch Allergy Immunol* 104(2), 160-170.
83. Batanero, E., González De La Peña, M. A., Villalba, M., Monsalve, R. I., Martín-Esteban, M., and Rodríguez, R. (1996) Isolation, cDNA cloning and expression of Lig v 1, the major allergen from privet pollen, *Clin Exp Allergy* 26(12), 1401-1410.

Bibliografia

84. Batanero, E., Villalba, M., Lopez-Otín, C., and Rodríguez, R. (1994) Isolation and characterization of an olive allergen-like protein from lilac pollen. Sequence analysis of three cDNA encoding protein isoforms, *Eur J Biochem* 221(1), 187-193.
85. Barderas, R., Purohit, A., Papanikolaou, I., Rodríguez, R., Pauli, G., and Villalba, M. (2005) Cloning, expression, and clinical significance of the major allergen from ash pollen, Fra e 1, *J Allergy Clin Immunol* 115(2), 351-357.
86. van Ree, R., Hoffman, D. R., van Dijk, W., Brodard, V., Mahieu, K., Koeleman, C. A., Grande, M., van Leeuwen, W. A., and Aalberse, R. C. (1995) Lol p XI, a new major grass pollen allergen, is a member of a family of soybean trypsin inhibitor-related proteins, *J Allergy Clin Immunol* 95(5 Pt 1), 970-978.
87. Mills, E. N., Jenkins, J. A., Alcocer, M. J., and Shewry, P. R. (2004) Structural, biological, and evolutionary relationships of plant food allergens sensitizing via the gastrointestinal tract, *Crit Rev Food Sci Nutr* 44(5), 379-407.
88. Breiteneder, H., Hoffmann-Sommergruber, K., O'Riordain, G., Susani, M., Ahorn, H., Ebner, C., Kraft, D., and Scheiner, O. (1995) Molecular characterization of Api g 1, the major allergen of celery (*Apium graveolens*), and its immunological and structural relationships to a group of 17-kDa tree pollen allergens, *Eur J Biochem* 233(2), 484-489.
89. Jensen-Jarolim, E., Leitner, A., Hirschwehr, R., Kraft, D., Wuthrich, B., Scheiner, O., Graf, J., and Ebner, C. (1997) Characterization of allergens in *Apiaceae* spices: anise, fennel, coriander and cumin, *Clin Exp Allergy* 27(11), 1299-1306.
90. Hoffmann-Sommergruber, K., Demoly, P., Cramer, R., Breiteneder, H., Ebner, C., Laimer Da Camara Machado, M., Blaser, K., Ismail, C., Scheiner, O., Bousquet, J., and Menz, G. (1999) IgE reactivity to Api g 1, a major celery allergen, in a Central European population is based on primary sensitization by Bet v 1, *J Allergy Clin Immunol* 104(2 Pt 1), 478-484.
91. Vieths, S., Scheurer, S., and Ballmer-Weber, B. (2002) Current understanding of cross-reactivity of food allergens and pollen, *Ann N Y Acad Sci* 964:47-68.
92. Valenta, R., Duchene, M., Ebner, C., Valent, P., Sillaber, C., Deviller, P., Ferreira, F., Tejkl, M., Edelman, H., Kraft, D., and et al. (1992) Profilins constitute a novel family of functional plant pan-allergens, *J Exp Med* 175(2), 377-385.
93. Asero, R., Mistrello, G., Roncarolo, D., and Amato, S. (2004) Parietaria profilin shows only limited cross-reactivity with birch and grass profilins, *Int Arch Allergy Immunol* 133(2), 121-124.
94. Scheurer, S., Pastorello, E. A., Wangorsch, A., Kastner, M., Haustein, D., and Vieths, S. (2001) Recombinant allergens Pru av 1 and Pru av 4 and a newly identified lipid transfer protein in the in vitro diagnosis of cherry allergy, *J Allergy Clin Immunol* 107(4), 724-731.

95. Pastorello, E. A., D'Ambrosio, F. P., Pravettoni, V., Farioli, L., Giuffrida, G., Monza, M., Ansaloni, R., Fortunato, D., Scibola, E., Rivolta, F., Incorvaia, C., Bengtsson, A., Conti, A., and Ortolani, C. (2000) Evidence for a lipid transfer protein as the major allergen of apricot, *J Allergy Clin Immunol* 105(2 Pt 1), 371-377.
96. Fernández-Rivas, M., González-Mancebo, E., Rodríguez-Perez, R., Benito, C., Sánchez-Monge, R., Salcedo, G., Alonso, M. D., Rosado, A., Tejedor, M. A., Vila, C., and Casas, M. L. (2003) Clinically relevant peach allergy is related to peach lipid transfer protein, Pru p 3, in the Spanish population, *J Allergy Clin Immunol* 112(4), 789-795.
97. Fernández-Rivas, M., Bolhaar, S., González-Mancebo, E., Asero, R., van Leeuwen, A., Bohle, B., Ma, Y., Ebner, C., Rigby, N., Sancho, A. I., Miles, S., Zuidmeer, L., Knulst, A., Breiteneder, H., Mills, C., Hoffmann-Sommergruber, K., and van Ree, R. (2006) Apple allergy across Europe: how allergen sensitization profiles determine the clinical expression of allergies to plant foods, *J Allergy Clin Immunol* 118(2), 481-488.
98. Leonart, R., Cisteró, A., Carreira, J., Batista, A., and Moscoso del Prado, J. (1992) Food allergy: identification of the major IgE-binding component of peach (*Prunus persica*), *Ann Allergy* 69(2), 128-130.
99. Pastorello, E. A., Farioli, L., Pravettoni, V., Ortolani, C., Ispano, M., Monza, M., Baroglio, C., Scibola, E., Ansaloni, R., Incorvaia, C., and Conti, A. (1999) The major allergen of peach (*Prunus persica*) is a lipid transfer protein, *J Allergy Clin Immunol* 103(3 Pt 1), 520-526.
100. Pastorello, E. A., Pravettoni, V., Farioli, L., Ispano, M., Fortunato, D., Monza, M., Giuffrida, M. G., Rivolta, F., Scibola, E., Ansaloni, R., Incorvaia, C., Conti, A., and Ortolani, C. (1999) Clinical role of a lipid transfer protein that acts as a new apple-specific allergen, *J Allergy Clin Immunol* 104(5), 1099-1106.
101. Gang, D. R., Kasahara, H., Xia, Z. Q., Vander Mijnsbrugge, K., Bauw, G., Boerjan, W., Van Montagu, M., Davin, L. B., and Lewis, N. G. (1999) Evolution of plant defense mechanisms. Relationships of phenylcoumaran benzylic ether reductases to pinoresinol-lariciresinol and isoflavone reductases, *J Biol Chem* 274(11), 7516-7527.
102. Karamloo, F., Schmitz, N., Scheurer, S., Foetisch, K., Hoffmann, A., Haustein, D., and Vieths, S. (1999) Molecular cloning and characterization of a birch pollen minor allergen, Bet v 5, belonging to a family of isoflavone reductase-related proteins, *J Allergy Clin Immunol* 104(5), 991-999.
103. Karamloo, F., Wangorsch, A., Kasahara, H., Davin, L. B., Haustein, D., Lewis, N. G., and Vieths, S. (2001) Phenylcoumaran benzylic ether and isoflavonoid reductases are a new class of cross-reactive allergens in birch pollen, fruits and vegetables, *Eur J Biochem* 268(20), 5310-5320.

Bibliografía

104. Petersen, A., Grobe, K., Lindner, B., Schlaak, M., and Becker, W. M. (1997) Comparison of natural and recombinant isoforms of grass pollen allergens, *Electrophoresis* 18(5), 819-825.
105. Ferreira, F. D., Hoffmann-Sommergruber, K., Breiteneder, H., Pettenburger, K., Ebner, C., Sommergruber, W., Steiner, R., Bohle, B., Sperr, W. R., Valent, P., and et al. (1993) Purification and characterization of recombinant Bet v I, the major birch pollen allergen. Immunological equivalence to natural Bet v I, *J Biol Chem* 268(26), 19574-19580.
106. Díaz-Perales, A., Sanz, M. L., García-Casado, G., Sánchez-Monge, R., García-Sellés, F. J., Lombardero, M., Polo, F., Gamboa, P. M., Barber, D., and Salcedo, G. (2003) Recombinant Pru p 3 and natural Pru p 3, a major peach allergen, show equivalent immunologic reactivity: a new tool for the diagnosis of fruit allergy, *J Allergy Clin Immunol* 111(3), 628-633.
107. González, E. M., Villalba, M., Lombardero, M., Aalbers, M., van Ree, R., and Rodríguez, R. (2002) Influence of the 3D-conformation, glycan component and microheterogeneity on the epitope structure of Ole e 1, the major olive allergen. Use of recombinant isoforms and specific monoclonal antibodies as immunological tools, *Mol Immunol* 39(1-2), 93-101.
108. Huecas, S., Villalba, M., Gonzalez, E., Martínez-Ruiz, A., and Rodríguez, R. (1999) Production and detailed characterization of biologically active olive pollen allergen Ole e 1 secreted by the yeast *Pichia pastoris*, *Eur J Biochem* 261(2), 539-546.
109. González, E., Monsalve, R. I., Puente, X. S., Villalba, M., and Rodríguez, R. (2000) Assignment of the disulfide bonds of Ole e 1, a major allergen of olive tree pollen involved in fertilization, *J Pept Res* 55(1), 18-23.
110. Palomares, O., Swoboda, I., Villalba, M., Balic, N., Spitzauer, S., Rodríguez, R., and Valenta, R. (2006) The major allergen of olive pollen Ole e 1 is a diagnostic marker for sensitization to *Oleaceae*, *Int Arch Allergy Immunol* 141(2), 110-118.
111. van Ree, R., Chapman, M. D., Ferreira, F., Vieths, S., Bryan, D., Cromwell, O., Villalba, M., Durham, S. R., Becker, W. M., Aalbers, M., Andre, C., Barber, D., Cistero Bahima, A., Custovic, A., Didierlaurent, A., Dolman, C., Dorpema, J. W., Di Felice, G., Eberhardt, F., Fernandez Caldas, E., Fernandez Rivas, M., Fiebig, H., Focke, M., Fotisch, K., Gadermaier, G., Das, R. G., Gonzalez Mancebo, E., Himly, M., Kinaciyan, T., Knulst, A. C., Kroon, A. M., Lepp, U., Marco, F. M., Mari, A., Moingeon, P., Monsalve, R., Neubauer, A., Notten, S., Ooievaar-de Heer, P., Pauli, G., Pini, C., Purohit, A., Quiralte, J., Rak, S., Raulf-Heimsoth, M., San Miguel Moncin, M. M., Simpson, B., Tsay, A., Vailes, L., Wallner, M., and Weber, B. (2008) The CREATE project: development of certified reference materials for allergenic products and validation of methods for their quantification, *Allergy* 63(3), 310-326.

112. Quiralte, J., González, E., Arias De Saavedra, J. M., Villalba, M., Florido, J. F., Sáenz De San Pedro, B., and Rodríguez, R. (2000) Immunological activity of recombinant Ole e 1 in patients with *Olea europaea* pollinosis, *Int Arch Allergy Immunol* 122(2), 101-107.
113. Marazuela, E. G., Hajek, R., Villalba, M., Barber, D., Breiteneder, H., Rodríguez, R., and Batanero, E. (2012) A non-allergenic Ole e 1-like protein from birch pollen as a tool to design hypoallergenic vaccine candidates, *Mol Immunol* 50(1-2), 83-90.
114. Marazuela, E. G., Rodríguez, R., Barber, D., Villalba, M., and Batanero, E. (2007) Hypoallergenic mutants of Ole e 1, the major olive pollen allergen, as candidates for allergy vaccines, *Clin Exp Allergy* 37(2), 251-260.
115. Asturias, J. A., Arilla, M. C., Gómez-Bayon, N., Martínez, J., Martínez, A., and Palacios, R. (1997) Cloning and expression of the panallergen profilin and the major allergen (Ole e 1) from olive tree pollen, *J Allergy Clin Immunol* 100(3), 365-372.
116. Barderas, R., Villalba, M., and Rodríguez, R. (2004) Recombinant expression, purification and cross-reactivity of chenopod profilin: rChe a 2 as a good marker for profilin sensitization, *Biol Chem* 385(8), 731-737.
117. Sirvent, S., Tordesillas, L., Villalba, M., Díaz-Perales, A., Cuesta-Herranz, J., Salcedo, G., and Rodríguez, R. (2011) Pollen and plant food profilin allergens show equivalent IgE reactivity, *Ann Allergy Asthma Immunol* 106(5), 429-435.
118. Ledesma, A., Barderas, R., Westritschnig, K., Quiralte, J., Pascual, C. Y., Valenta, R., Villalba, M., and Rodríguez, R. (2006) A comparative analysis of the cross-reactivity in the polcalcin family including Syr v 3, a new member from lilac pollen, *Allergy* 61(4), 477-484.
119. Ledesma, A., González, E., Pascual, C. Y., Quiralte, J., Villalba, M., and Rodríguez, R. (2002) Are Ca²⁺-binding motifs involved in the immunoglobulin E-binding of allergens? Olive pollen allergens as model of study, *Clin Exp Allergy* 32(10), 1476-1483.
120. Ledesma, A., Moral, V., Villalba, M., Salinas, J., and Rodríguez, R. (2006) Ca²⁺-binding allergens from olive pollen exhibit biochemical and immunological activity when expressed in stable transgenic *Arabidopsis*, *FEBS J* 273(19), 4425-4434.
121. Butteroni, C., Afferni, C., Barletta, B., Iacovacci, P., Corinti, S., Brunetto, B., Tinghino, R., Ariano, R., Panzani, R. C., Pini, C., and Di Felice, G. (2005) Cloning and expression of the *Olea europaea* allergen Ole e 5, the pollen Cu/Zn superoxide dismutase, *Int Arch Allergy Immunol* 137(1), 9-17.
122. Ledesma, A., Villalba, M., Vivanco, F., and Rodríguez, R. (2002) Olive pollen allergen Ole e 8: identification in mature pollen and presence of Ole e 8-like proteins in different pollens, *Allergy* 57(1), 40-43.

Bibliografía

123. Tinghino, R., Barletta, B., Palumbo, S., Afferni, C., Iacovacci, P., Mari, A., Di Felice, G., and Pini, C. (1998) Molecular characterization of a cross-reactive *Juniperus oxycedrus* pollen allergen, Jun o 2: a novel calcium-binding allergen, *J Allergy Clin Immunol* 101(6 Pt 1), 772-777.
124. Palomares, O., Fernández-Nieto, M., Villalba, M., Rodríguez, R., and Cuesta-Herranz, J. (2008) Occupational allergy in a researcher due to Ole e 9, an allergenic 1,3-beta-glucanase from olive pollen, *Allergy* 63(6), 784-785.
125. Palomares, O., Villalba, M., Quiralte, J., and Rodríguez, R. (2006) Allergenic contribution of the IgE-reactive domains of the 1,3-beta-glucanase Ole e 9: diagnostic value in olive pollen allergy, *Ann Allergy Asthma Immunol* 97(1), 61-65.
126. Palomares, O., Villalba, M., and Rodríguez, R. (2003) The C-terminal segment of the 1,3-beta-glucanase Ole e 9 from olive (*Olea europaea*) pollen is an independent domain with allergenic activity: expression in *Pichia pastoris* and characterization, *Biochem J* 369(Pt 3), 593-601.
127. Rodríguez, R., Villalba, M., Batanero, E., Palomares, O., and Salamanca, G. (2007) Emerging pollen allergens, *Biomed Pharmacother* 61(1), 1-7.
128. Treviño, M. A., Palomares, O., Castrillo, I., Villalba, M., Rodríguez, R., Rico, M., Santoro, J., and Bruix, M. (2008) Solution structure of the C-terminal domain of Ole e 9, a major allergen of olive pollen, *Protein Sci* 17(2), 371-376.
129. Barral, P., Batanero, E., Villalba, M., and Rodríguez, R. (2005) Expression of the major olive pollen allergen Ole e 10 in the yeast *Pichia pastoris*: evidence of post-translational modifications, *Protein Expr Purif* 44(2), 147-154.
130. Barral, P., Serrano, A. G., Batanero, E., Pérez-Gil, J., Villalba, M., and Rodríguez, R. (2006) A recombinant functional variant of the olive pollen allergen Ole e 10 expressed in baculovirus system, *J Biotechnol* 121(3), 402-409.
131. Barderas, R., García-Sellés, J., Salamanca, G., Colás, C., Barber, D., Rodríguez, R., and Villalba, M. (2007) A pectin methylesterase as an allergenic marker for the sensitization to Russian thistle (*Salsola kali*) pollen, *Clin Exp Allergy* 37(7), 1111-1119.
132. Barber, D., Moreno, C., Ledesma, A., Serrano, P., Galán, A., Villalba, M., Guerra, F., Lombardero, M., and Rodríguez, R. (2007) Degree of olive pollen exposure and sensitization patterns. Clinical implications, *J Investig Allergol Clin Immunol* 17 Suppl 111-16.
133. Monsalve, R. I., Vega, A., Marqués, L., Miranda, A., Fernández, J., Soriano, V., Cruz, S., Domínguez-Noche, C., Sánchez-Morillas, L., Armisen-Gil, M., Guspí, R., and Barber, D. (2012) Component-resolved diagnosis of vespoid venom-allergic individuals: phospholipases and antigen 5s are necessary to identify *Vespula* or *Polistes* sensitization, *Allergy* 67(4), 528-536.

134. Luengo, O., and Cardona, V. (2014) Component resolved diagnosis: when should it be used?, *Clin Transl Allergy* 428.
135. Lidholm, J., Ballmer-Weber, B. K., Mari, A., and Vieths, S. (2006) Component-resolved diagnostics in food allergy, *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 6(3), 234-240.
136. Becker, W. M., Vogel, L., and Vieths, S. (2006) Standardization of allergen extracts for immunotherapy: where do we stand?, *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 6(6), 470-475.
137. Seppala, U., Dauly, C., Robinson, S., Hornshaw, M., Larsen, J. N., and Ipsen, H. (2011) Absolute quantification of allergens from complex mixtures: a new sensitive tool for standardization of allergen extracts for specific immunotherapy, *J Proteome Res* 10(4), 2113-2122.
138. Fiebig, H., Kahlert, H., Weber, B., Suck, R., Nandy, A., and Cromwell, O. (2009) Antibody-based methods for standardization of allergoids and recombinant hypoallergens, *Arb Paul Ehrlich Inst Bundesinstitut Impfstoffe Biomed Arzneimittel Langen Hess* 9671-82; discussion 82-73.
139. Díaz-Perales, A., Lombardero, M., Sánchez-Monge, R., García-Selles, F. J., Pernas, M., Fernández-Rivas, M., Barber, D., and Salcedo, G. (2000) Lipid-transfer proteins as potential plant panallergens: cross-reactivity among proteins of *Artemisia* pollen, *Castanea* nut and *Rosaceae* fruits, with different IgE-binding capacities, *Clin Exp Allergy* 30(10), 1403-1410.
140. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J Biol Chem* 193(1), 265-275.
141. Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227(5259), 680-685.
142. Fairbanks, G., Steck, T. L., and Wallach, D. F. (1971) Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane, *Biochemistry* 10(13), 2606-2617.
143. Weber, K., and Osborn, M. (1969) The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, *J Biol Chem* 244(16), 4406-4412.
144. Chelliah, J., and Jones, D. (1990) Biochemical and immunological studies of proteins from polydnavirus *Chelonus* sp. near *curvimaculatus*, *J Gen Virol* 71 (Pt 10)2353-2359.
145. Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications, *Proc Natl Acad Sci U S A* 76(9), 4350-4354.
146. Schott, K.-J., Neuhoﬀ, V., Nessel, B., Pötter, U., and Schröter, J. (1984) Staining of Concanavalin A-reactive glycoproteins on polyacrylamide gels with horseradish peroxidase — a critical evaluation, *Electrophoresis* 5(2), 77-83.

Bibliografia

147. Astwood, J. D., Leach, J. N., and Fuchs, R. L. (1996) Stability of food allergens to digestion *in vitro*, *Nat Biotechnol* 14(10), 1269-1273.
148. Jones, D. T. (1999) Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices, *J Mol Biol* 292(2), 195-202.
149. Kyte, J., and Doolittle, R. F. (1982) A simple method for displaying the hydropathic character of a protein, *J Mol Biol* 157(1), 105-132.
150. Welling, G. W., Weijer, W. J., van der Zee, R., and Welling-Wester, S. (1985) Prediction of sequential antigenic regions in proteins, *FEBS Lett* 188(2), 215-218.
151. Arnold, K., Bordoli, L., Kopp, J., and Schwede, T. (2006) The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling, *Bioinformatics* 22(2), 195-201.
152. Zanetti, G., and Arosio, P. (1980) Solubilization from spinach thylakoids of a higher molecular weight form of ferredoxin-NADP⁺ reductase, *FEBS Lett* 111(2), 373-376.
153. Gill, S. C., and von Hippel, P. H. (1989) Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data, *Anal Biochem* 182(2), 319-326.
154. Perczel, A., Park, K., and Fasman, G. D. (1992) Analysis of the circular dichroism spectrum of proteins using the convex constraint algorithm: a practical guide, *Anal Biochem* 203(1), 83-93.
155. Alché, J. D., M'Rani-Alaoui, M., Castro, A. J., and Rodríguez-García, M. I. (2004) Ole e 1, the major allergen from olive (*Olea europaea* L.) pollen, increases its expression and is released to the culture medium during *in vitro* germination, *Plant Cell Physiol* 45(9), 1149-1157.
156. Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory.
157. Sharp, P. A., Cohen, S. N., and Davidson, N. (1973) Electron microscope heteroduplex studies of sequence relations among plasmids of *Escherichia coli*. II. Structure of drug resistance (R) factors and F factors, *J Mol Biol* 75(2), 235-255.
158. Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A. R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors, *Proc Natl Acad Sci U S A* 74(12), 5463-5467.
159. Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids, *J Mol Biol* 166(4), 557-580.
160. Bogs, J., Downey, M. O., Harvey, J. S., Ashton, A. R., Tanner, G. J., and Robinson, S. P. (2005) Proanthocyanidin synthesis and expression of genes encoding leucoanthocyanidin reductase and anthocyanidin reductase in developing grape berries and grapevine leaves, *Plant Physiol* 139(2), 652-663.
161. van Eldik, G. J., Ruiters, R. K., Colla, P. H., van Herpen, M. M., Schrauwen, J. A., and Wullems, G. J. (1997) Expression of an isoflavone reductase-like gene

- enhanced by pollen tube growth in pistils of *Solanum tuberosum*, *Plant Mol Biol* 33(5), 923-929.
162. Petersen, T. N., Brunak, S., von Heijne, G., and Nielsen, H. (2011) SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions, *Nat Methods* 8(10), 785-786.
163. Min, T., Kasahara, H., Bedgar, D. L., Youn, B., Lawrence, P. K., Gang, D. R., Halls, S. C., Park, H., Hilsenbeck, J. L., Davin, L. B., Lewis, N. G., and Kang, C. (2003) Crystal structures of pinoretinol-lariciresinol and phenylcoumaran benzylic ether reductases and their relationship to isoflavone reductases, *J Biol Chem* 278(50), 50714-50723.
164. Avron, M., and Jagendorf, A. T. (1956) A TPNH diaphorase from chloroplasts, *Arch Biochem Biophys* 65(2), 475-490.
165. Poncet, P., Senechal, H., Clement, G., Purohit, A., Sutra, J. P., Desvaux, F. X., Wal, J. M., Pauli, G., Peltre, G., and Gougeon, M. L. (2010) Evaluation of ash pollen sensitization pattern using proteomic approach with individual sera from allergic patients, *Allergy* 65(5), 571-580.
166. Wills-Karp, M., Santeliz, J., and Karp, C. L. (2001) The germless theory of allergic disease: revisiting the hygiene hypothesis, *Nat Rev Immunol* 1(1), 69-75.
167. Shahali, Y., Sutra, J. P., Haddad, I., Vinh, J., Guilloux, L., Peltre, G., Senechal, H., and Poncet, P. (2012) Proteomics of cypress pollen allergens using double and triple one-dimensional electrophoresis, *Electrophoresis* 33(3), 462-469.
168. Monaci, L., and Visconti, A. (2009) Mass spectrometry-based proteomics methods for analysis of food allergens, *Trends in Analytical Chemistry* 28(5), 581-591.
169. Wang, X., He, X., Lin, J., Shao, H., Chang, Z., and Dixon, R. A. (2006) Crystal structure of isoflavone reductase from alfalfa (*Medicago sativa* L.), *J Mol Biol* 358(5), 1341-1352.
170. Bonura, A., Corinti, S., Artale, A., Di Felice, G., Amoroso, S., Melis, M., Geraci, D., and Colombo, P. (2007) A hybrid expressing genetically engineered major allergens of the *Parietaria* pollen as a tool for specific allergy vaccination, *Int Arch Allergy Immunol* 142(4), 274-284.
171. Katelaris, C. H. (2010) Food allergy and oral allergy or pollen-food syndrome, *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 10(3), 246-251.
172. Rodríguez, R., Villalba, M., Batanero, E., Palomares, O., Quiralte, J., Salamanca, G., Sirvent, S., Castro, L., and Prado, N. (2007) Olive pollen recombinant allergens: value in diagnosis and immunotherapy, *J Investig Allergol Clin Immunol* 17 Suppl 14-10.
173. Liccardi, G., D'Amato, M., and D'Amato, G. (1996) *Oleaceae* pollinosis: a review, *Int Arch Allergy Immunol* 111(3), 210-217.

Bibliografía

174. D'Amato, G., Mullins, J., Nolard, N., Spieksma, F. T., and Wachter, R. (1988) City spore concentrations in the European Economic Community (EEC). VII. *Oleaceae* (*Fraxinus*, *Ligustrum*, *Olea*), *Clin Allergy* 18(6), 541-547.
175. D'Amato, G., Cecchi, L., Bonini, S., Nunes, C., Annesi-Maesano, I., Behrendt, H., Liccardi, G., Popov, T., and van Cauwenberge, P. (2007) Allergenic pollen and pollen allergy in Europe, *Allergy* 62(9), 976-990.
176. García, B. E., Lizaso, M. T., Moreno, C., Rodríguez, R., Villalba, M. T., Ledesma, A., and Tabar, A. (2011) *Oleaceae*-induced pollinosis in an area with exposure to olive and ash trees, *J Investig Allergol Clin Immunol* 21(1), 34-37.
177. Al-Dowaisan, A., Fakim, N., Khan, M. R., Arifhodzic, N., Panicker, R., Hanoon, A., and Khan, I. (2004) *Salsola* pollen as a predominant cause of respiratory allergies in Kuwait, *Ann Allergy Asthma Immunol* 92(2), 262-267.
178. Nouri, H. R., Sankian, M., Vahedi, F., Afsharzadeh, D., Rouzbeh, L., Moghadam, M., and Varasteh, A. (2012) Diagnosis of *Chenopodium album* allergy with a cocktail of recombinant allergens as a tool for component-resolved diagnosis, *Mol Biol Rep* 39(3), 3169-3178.
179. Swoboda, I., Jilek, A., Ferreira, F., Engel, E., Hoffmann-Sommergruber, K., Scheiner, O., Kraft, D., Breiteneder, H., Pittenauer, E., and Schmid, E. (1995) Isoforms of Bet v 1, the major birch pollen allergen, analyzed by liquid chromatography, mass spectrometry, and cDNA cloning, *J Biol Chem* 270(6), 2607-2613.
180. Ferreira, F., Hirtenlehner, K., Jilek, A., Godnik-Cvar, J., Breiteneder, H., Grimm, R., Hoffmann-Sommergruber, K., Scheiner, O., Kraft, D., Breitenbach, M., Rheinberger, H. J., and Ebner, C. (1996) Dissection of immunoglobulin E and T lymphocyte reactivity of isoforms of the major birch pollen allergen Bet v 1: potential use of hypoallergenic isoforms for immunotherapy, *J Exp Med* 183(2), 599-609.
181. Ferreira, F., Ebner, C., Kramer, B., Casari, G., Briza, P., Kungl, A. J., Grimm, R., Jahn-Schmid, B., Breiteneder, H., Kraft, D., Breitenbach, M., Rheinberger, H. J., and Scheiner, O. (1998) Modulation of IgE reactivity of allergens by site-directed mutagenesis: potential use of hypoallergenic variants for immunotherapy, *FASEB J* 12(2), 231-242.
182. Asero, R. (2011) Analysis of hypersensitivity to oleaceae pollen in an olive-free and ash-free area by commercial pollen extracts and recombinant allergens, *Eur Ann Allergy Clin Immunol* 43(3), 77-80.
183. Hoffmann-Sommergruber, K., Mills, E. N., and Vieths, S. (2008) Coordinated and standardized production, purification and characterization of natural and recombinant food allergens to establish a food allergen library, *Mol Nutr Food Res* 52 Suppl 2S159-165.
184. Esteve, C., Montealegre, C., Marina, M. L., and García, M. C. (2012) Analysis of olive allergens, *Talanta* 921-14.

185. Vrtala, S., Grote, M., Duchêne, M., vanRee, R., Kraft, D., Scheiner, O., and Valenta, R. (1993) Properties of Tree and Grass Pollen Allergens: Reinvestigation of the Linkage between Solubility and Allergenicity, *Int Allergy Clin Immunol* 102(2), 160-169.
186. Grote, M., Vrtala, S., and Valenta, R. (1993) Monitoring of two allergens, Bet v I and profilin, in dry and rehydrated birch pollen by immunogold electron microscopy and immunoblotting, *J Histochem Cytochem* 41(5), 745-750.
187. Li, Y.-Q., Mareck, A., Faleri, C., Moscatelli, A., Liu, Q., and Cresti, M. (2002) Detection and localization of pectin methylesterase isoforms in pollen tubes of *Nicotiana tabacum* L, *Planta* 214(5), 734-740.
188. Bosch, M., Cheung, A. Y., and Hepler, P. K. (2005) Pectin methylesterase, a regulator of pollen tube growth, *Plant Physiol* 138(3), 1334-1346.
189. Hanson, P. I., and Cashikar, A. (2012) Multivesicular body morphogenesis, *Annu Rev Cell Dev Biol* 28337-362.
190. Wang, J., Ding, Y., Wang, J., Hillmer, S., Miao, Y., Lo, S. W., Wang, X., Robinson, D. G., and Jiang, L. (2010) EXPO, an Exocyst-Positive Organelle distinct from multivesicular endosomes and autophagosomes, mediates cytosol to cell wall exocytosis in *Arabidopsis* and tobacco cells, *Plant Cell* 22(12), 4009-4030.
191. Swan, E., Jiang, K., and Gardner, J. (1969) The lignans of Thuja plicata and the sapwood-heartwood transformation, *Phytochemistry* 8(2), 345-351.
192. Dinkova-Kostova, A. T., Gang, D. R., Davin, L. B., Bedgar, D. L., Chu, A., and Lewis, N. G. (1996) (+)-Pinoresinol/(+)-lariciresinol reductase from *Forsythia intermedia*. Protein purification, cDNA cloning, heterologous expression and comparison to isoflavone reductase, *J Biol Chem* 271(46), 29473-29482.
193. Gang, D., Dinkova-Kostova, A., Davin, L., and Lewis, N. (1997) Phytochemical Pest Control Agents, ed Hedin P, *Am. Chem. Soc. Washington, DC* 58-89.
194. Jimenez-López, J. C., Kotchoni, S. O., Hernández-Soriano, M. C., Gachomo, E. W., and Alché, J. D. (2013) Structural functionality, catalytic mechanism modeling and molecular allergenicity of phenylcoumaran benzylic ether reductase, an olive pollen (Ole e 12) allergen, *J Comput Aided Mol Des* 27(10), 873-895.
195. Ballmer-Weber, B. K., Skamstrup Hansen, K., Sastre, J., Andersson, K., Batscher, I., Ostling, J., Dahl, L., Hanschmann, K. M., Holzhauser, T., Poulsen, L. K., Lidholm, J., and Vieths, S. (2012) Component-resolved in vitro diagnosis of carrot allergy in three different regions of Europe, *Allergy* 67(6), 758-766.
196. Calabozo, B., Díaz-Perales, A., Salcedo, G., Barber, D., and Polo, F. (2003) Cloning and expression of biologically active *Plantago lanceolata* pollen allergen Pla l 1 in the yeast *Pichia pastoris*, *Biochem J* 372(Pt 3), 889-896.
197. Marknell DeWitt, A., Niederberger, V., Lehtonen, P., Spitzauer, S., Sperr, W. R., Valent, P., Valenta, R., and Lidholm, J. (2002) Molecular and

Bibliografía

- immunological characterization of a novel timothy grass (*Phleum pratense*) pollen allergen, *Phl p 11*, *Clin Exp Allergy* 32(9), 1329-1340.
198. Barderas, R., Villalba, M., Lombardero, M., and Rodríguez, R. (2002) Identification and characterization of Che a 1 allergen from *Chenopodium album* pollen, *Int Arch Allergy Immunol* 127(1), 47-54.
199. Bousquet, P. J., Chinn, S., Janson, C., Kogevinas, M., Burney, P., and Jarvis, D. (2007) Geographical variation in the prevalence of positive skin tests to environmental aeroallergens in the European Community Respiratory Health Survey I, *Allergy* 62(3), 301-309.
200. Colás, C., Monzón, S., Venturini, M., and Lezaun, A. (2006) Double-blind, placebo-controlled study with a modified therapeutic vaccine of *Salsola kali* (Russian thistle) administered through use of a cluster schedule, *J Allergy Clin Immunol* 117(4), 810-816.
201. Ferrer, L., Carnés, J., Rojas-Hijazo, B., Lopez-Matas, M. A., Sobrevía, M. T., and Colás, C. (2012) Assessing degree of flowering implicates multiple *Chenopodiaceae/Amaranthaceae* species in allergy, *Int Arch Allergy Immunol* 158(1), 54-62.
202. Cariñanos, P., Galán, C., Alcázar, P., and Domínguez, E. (2000) Allergenic pollen in the subdesert areas of the Iberian peninsula, *J Investig Allergol Clin Immunol* 10(4), 242-247.
203. Villalba, M., Barderas, R., Mas, S., Colás, C., Batanero, E., and Rodríguez, R. (2014) *Amaranthaceae* pollens: review of an emerging allergy in the mediterranean area, *J Investig Allergol Clin Immunol* 24(6), 371-381.
204. Lombardero, M., Duffort, O., Sellés, J. G., Hernández, J., and Carreira, J. (1985) Cross-reactivity among *Chenopodiaceae* and *Amaranthaceae*, *Ann Allergy* 54(5), 430-436.
205. Pérez-Badia, R., Rapp, A., Morales, C., Sardinero, S., Galán, C., and García-Mozo, H. (2010) Pollen spectrum and risk of pollen allergy in central Spain, *Ann Agric Environ Med* 17(1), 139-151.
206. Asero, R., Monsalve, R., and Barber, D. (2008) Profilin sensitization detected in the office by skin prick test: a study of prevalence and clinical relevance of profilin as a plant food allergen, *Clin Exp Allergy* 38(6), 1033-1037.
207. Lombardero, M., Obispo, T., Calabozo, B., Lezaun, A., Polo, F., and Barber, D. (2002) Cross-reactivity between olive and other species. Role of Ole e 1-related proteins, *Allergy* 57 Suppl 7129-34.
208. Barderas, R., Villalba, M., Batanero, E., Pascual, C. Y., and Rodríguez, R. (2003) Role of profilin and polcalcin in chenopod pollen allergy, *J Allergy Clin Immunol* 111(5), 1132-1133.
209. Mas, S., Barderas, R., Colás, C., Quiralte, J., Rodríguez, R., and Villalba, M. (2012) The natural profilin from Russian thistle (*Salsola kali*) contains a low

- IgE-binding ability isoform--molecular and immunological characterization, *FEBS J* 279(23), 4338-4349.
210. Barderas, R., Villalba, M., and Rodríguez, R. (2004) Che a 1: recombinant expression, purification and correspondence to the natural form, *Int Arch Allergy Immunol* 135(4), 284-292.
211. González, E., Villalba, M., and Rodríguez, R. (2001) Immunological and molecular characterization of the major allergens from lilac and privet pollens overproduced in *Pichia pastoris*, *Clin Exp Allergy* 31(2), 313-321.
212. Niederberger, V., Purohit, A., Oster, J. P., Spitzauer, S., Valenta, R., and Pauli, G. (2002) The allergen profile of ash (*Fraxinus excelsior*) pollen: cross-reactivity with allergens from various plant species, *Clin Exp Allergy* 32(6), 933-941.