

RELACIÓN ESTRUCTURA-INMUNOGENICIDAD DE PROTEÍNAS NATURALES

Adela Rodríguez-Romero y Deyanira Fuentes-Silva

Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México.

Circuito Exterior, CU. Coyoacán 04510, México, D.F.

adela@servidor.unam.mx

RESUMEN

La alergia al látex del árbol de *Hevea brasiliensis* ha sido muy estudiada en las últimas décadas y, por lo tanto, se han realizado numerosos intentos para explicar el aumento en la incidencia de esta enfermedad. Recientemente se han logrado avances muy importantes en la expresión, purificación y caracterización molecular de varios alérgenos de hule natural; no obstante, la información estructural es aún muy limitada. El conocimiento de la estructura tridimensional, usando técnicas experimentales, facilita la identificación e incrementa la posibilidad de modificar epítomos conformacionales, que son importantes para el diseño de herramientas de diagnóstico y de agentes inmunoterapéuticos. Nuestro grupo de trabajo ha determinado dos epítomos conformacionales del alérgeno Hev b 2 (heveína) y un glicoepítomo del alérgeno Hev b 2 (β -1,3-glucanasa).

Palabras Clave: Alergia al látex, epítomos conformacionales, proteínas alergénicas.

ABSTRACT

Latex allergy has received worldwide attention during the last decade; therefore, there have been many attempts to explain the increase in the incidence of allergy caused by latex proteins. Recently, substantial progress has been made in the expression, purification and molecular characterization of several rubber latex allergens; nevertheless, information on their tertiary structure is limited. The knowledge of their three-dimensional structure, from experimental methods, will simplify their identification and enhance the possibility to modify conformational epitopes, thus making them important tools in diagnosis of latex allergy as well as potential immunotherapy agents. We have determined two conformational epitopes in Hev b 6.02 and a glycoepitope in Hev b 2.

Key Words: Latex allergy, conformational epitopes, allergenic proteins.

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades alérgicas o reacciones de hipersensibilidad mediadas por inmunoglobulinas tipo E (IgEs)^[1] son un importante problema de salud pública, tanto en países industrializados como en países en desarrollo, por lo que se les considera como las epidemias del siglo XXI. Las enfermedades alérgicas tales como el asma, la dermatitis atópica, la rinitis y la conjuntivitis están asociadas a factores ambientales y a la predisposición genética de cada individuo, manifestándose como una respuesta exagerada a sustancias normalmente inocuas denominadas alérgenos. Los alérgenos proteicos son una clase especial de antígenos, los

cuales se clasifican de acuerdo a la fuente de donde provienen y el orden en el cual fueron descubiertos siendo relevantes si al menos un 50% de los pacientes sensibilizados reaccionan a ellos. Estos alérgenos desencadenan la liberación de mediadores celulares, los cuales producen la manifestación de los síntomas de la alergia.

Las reacciones alérgicas consisten en una serie de eventos que inician con el reconocimiento de la estructura del alérgeno nativo por las células presentadoras del antígeno, como las células dendríticas, y finalizan con la producción de las IgEs y la sensibilización de mastocitos y basófilos.

Dependiendo del mecanismo de acción que provoca daño al

organismo se han descrito cuatro tipos de hipersensibilidad (I-IV)^[2]. En el caso de la hipersensibilidad de tipo I o inmediata, ésta se encuentra mediada por IgEs, las cuales están acopladas a los receptores de alta afinidad tipo I (FcεRI) localizados en la membrana de los mastocitos o basófilos^[3]. La activación de estos receptores provoca la degranulación y liberación de mediadores de la inflamación, como la histamina, leucotrienos y prostaglandinas, desencadenando las reacciones alérgicas. La hipersensibilidad de tipo II se caracteriza por la activación de células mediada por anticuerpos tipo IgG o IgM. Éstos se unen a antígenos fijados en la superficie de células blanco y activan el sistema del complemento. La hipersensibilidad de tipo III está mediada por inmunocomplejos antígeno-anticuerpo circulantes, que inducen la activación del sistema del complemento. Finalmente, la hipersensibilidad de tipo IV o tardía es una respuesta mediada por linfocitos T, macrófagos y monocitos.

La respuesta de las IgEs contra una proteína alergénica es la suma de las respuestas específicas contra cada uno de los determinantes antigénicos o epítomos, las cuales varían en intensidad. En la actualidad es un tema controversial el tratar de definir la capacidad que tienen ciertas proteínas para inducir una respuesta alérgica en individuos con una predisposición genética. Debido a que este tipo de respuestas requieren de interacciones complejas entre la proteína alergénica y el sistema inmune, son difíciles de predecir. No obstante, es bien conocido que algunas proteínas producen reacciones de hipersensibilidad, en menor o mayor grado, mientras que otras no. Hipotéticamente, un alérgeno debe contener epítomos de células B para unirse a las IgEs y epítomos de linfocitos T capaces de inducir una respuesta tipo II en linfocitos T y estas características por sí solas no son suficientes para dotar a una proteína con un potencial alergénico. Los epítomos son sitios discretos en una macromolécula que son reconocidos por anticuerpos específicos o bien por receptores de células T; los de tipo B son lineales o conformacionales y se encuentran expuestos en la superficie de las proteínas.

Las proteínas alergénicas cumplen funciones biológicas específicas en los organismos que las originan. En plantas, algunas de ellas son producidas en respuesta al ataque de insectos, hongos, virus o bacterias. Recientemente se ha establecido que los carbohidratos presentes en algunas proteínas son fuente de reactividad cruzada inmunológica importante, aunque su papel en la alergia es todavía controversial. Las estructuras oligosacarídicas unidas a residuos de asparagina de glicoproteínas de plantas e insectos son los determinantes ambientales más abundantes y constituyen la base estructural de lo que se conoce como determinantes glicosídicos de reactividad cruzada (CCDs, por su siglas en inglés, cross-reactive carbohydrate determinants). Existen dos motivos principales que forman parte esencial de epítomos independientes que son la xilosa y un módulo central unido en posición 3 a fucosa (Figura 1). Estos N-glicanos, así como varios determinantes

fucosilados, también se encuentran en parásitos como los helmintos ejerciendo efectos inmunomoduladores importantes. Las proteínas de plantas contienen ambos epítomos y las glicoproteínas de insectos sólo contienen fucosa. Es importante mencionar que recientemente se le ha dado mayor importancia a este tipo de determinantes, ya que muchos pacientes alérgicos desarrollan IgEs contra glicanos unidos covalentemente a proteínas. Algunos de los más importantes son aquéllos que contienen trisacáridos de tipo Lewis-x que consisten de GalFucGlcNAc. En el caso particular de glicoalérgenos, para que exista degranulación y liberación de mediadores de la inflamación de mastocitos y basófilos se requiere que las moléculas de IgEs unidas a los receptores FcεRI se entrecrucen, por lo que los glicoalérgenos deben ser al menos divalentes; esto es, deben contener un epítomo glicosídico y uno peptídico^[4].

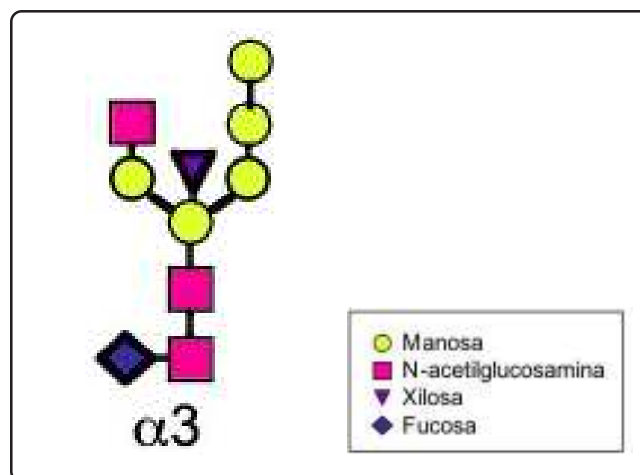


Figura 1. Epítomo glicosídico. Oligosacárido determinado en nuestro grupo de trabajo para Hev b 2.

El látex del árbol de hule (NRL), *Hevea brasiliensis*, contiene varias proteínas involucradas en hipersensibilidad de tipo I. En general, estas proteínas están implicadas en mecanismos de defensa de la planta y también en reacciones de reactividad cruzada con frutas, polen y venenos de insectos. Existe muy poca información estructural acerca de estas proteínas y, por lo tanto, de los determinantes antigénicos que dan lugar a los síntomas de la alergia. Entre los alérgenos presentes en el hule natural existen β-1,3-glucanasas (Hev b 2), lectinas (Hev b 6.02), quitinasas de clase I (Hev b 11) y profilinas (Hev b 8). Recientemente nuestro grupo de trabajo determinó la estructura tridimensional de dos cristales polimórficos de una isoforma glicosilada natural de Hev b 2^[5] a 2.5 Å y 2.8 Å de resolución, respectivamente. La estructura muestra tres sitios de modificación postraduccional, dos de glicosilación y la ciclización del ácido glutámico para formar un anillo de lactama conocido como ácido piroglutámico. La isoforma I presenta un contenido de carbohidratos cercano al 20%, con azúcares unidos a residuos de asparagina del tipo N-acetil-glucosamina, N-acetil-

galactosamina, fucosa y galactosa, mientras que la isoforma II presenta un contenido de carbohidratos del 6% consistiendo de N-acetil-glucosamina, fucosa, manosa y xilosa cuya estructura correspondió al decaesacárido $\text{GlcNAcMan}_5\text{XylFucGlcNAc}_2^{[5]}$ (Figura 1). Es interesante mencionar que a la fecha no existen reportes sobre la cristalización de β -1,3-glucanasas nativas glicosiladas. Las autoras de esta nota hemos demostrado que los patrones de glicosilación son importantes en el reconocimiento por las IgEs de sueros de pacientes.

Por otra parte, también hemos determinado la estructura tridimensional de dos isoformas naturales de Hev b 6.02 (heveína)^[6], la cual es una lectina que une oligosacáridos de N-acetil-glucosamina presentes en quitina y tenemos avances en los estudios estructurales del alérgeno recombinante Hev b 11. Además hemos obtenido dos anticuerpos monoclonales murinos y varios fragmentos variables de cadena sencilla (scFv), a partir de una librería humana de despliegue en fagos contra Hev b 6.02, que nos han ayudado a identificar epítopos conformacionales en la superficie de este alérgeno^[7] (Figura 2). Los residuos involucrados están ubicados en dos zonas del Hev b 6.02, que comprenden el sitio de reconocimiento a carbohidratos y residuos cercanos a las regiones amino y carboxilo terminal. Esta información contribuye de manera importante, no sólo para elucidar la etiología del problema, sino también para desarrollar estrategias de diagnóstico. La información obtenida acerca de los CCDs en la forma de glicanos unidos covalentemente a residuos de asparagina de proteínas de plantas e insectos ayudará también en la elaboración de herramientas de diagnóstico más precisas.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el apoyo económico de la DGAPA-UNAM (IN209506-3) y CONACyT 82947.

REFERENCIAS

1. Ring, J., Kramer, U., Schafer, T. & Behrendt, H. Why are allergies increasing? *Curr. Opin. Immunol.* **13**, 701-708 (2001).
2. Abbas, A.K., Lichtman A.H. & Pillai, S. Immediate hypersensitivity. In *Celular and Molecular immunology*. (Schmitt, W. ed.) 6th

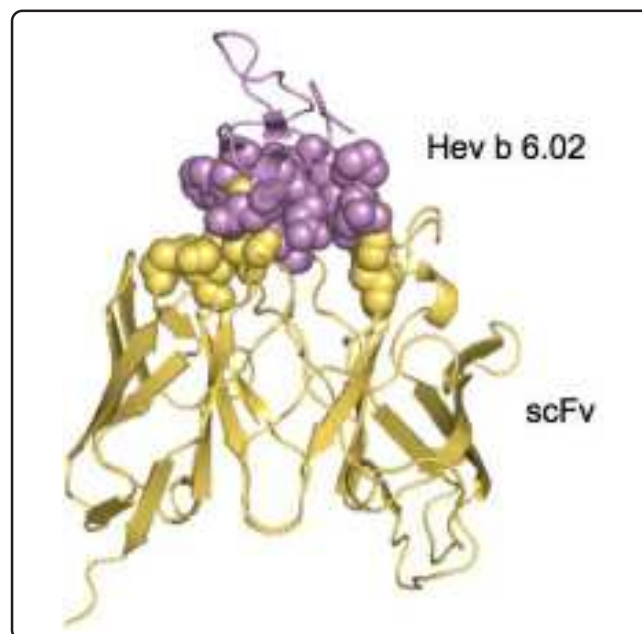


Figura 2. Modelo de acoplamiento molecular entre el alérgeno heveína (Hev b 6.02) y un fragmento variable de cadena sencilla anti-heveína.

Edition (Saunders, Elsevier, 2007).

3. Garman, S.C., Wurzburg, B.A., Tarchevska, S.S., Kinet, J.P. & Jardetzky, T.S. Structure of the Fc fragment of human IgE bound to its high-affinity receptor FcεRIα. *Nature* **406**, 259-266, (2000).
4. Altmann, F. The role of protein glycosylation in allergy. *Int. Arch. of Allergy and Immunol.* **142**, 99-115 (2007).
5. Fuentes-Silva, D. *et al.* Crystallization and identification of the glycosylated moieties of two isoforms of the main allergen Hev b 2 and preliminary X-ray analysis of two polymorphs of isoform II. *Acta Cryst.* **F63**, 787-791 (2007).
6. Reyes-López, C.A. *et al.* Insights into a conformational epitope of Hev b 6.02 (hevein). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **314**, 123-130 (2004).
7. Pedraza-Escalona, M. *et al.* Analysis of B-cell epitopes from the allergen Hev b 6.02 revealed by using blocking antibodies. *Mol. Immunol.* **46**, 668-676 (2009).