

# OBTENCION Y CARACTERIZACION DE UN NOVEL ALERGENO MEDIANTE LA TECNOLOGIA DEL DNA RECOMBINANTE

por

Leonardo Puerta\*

## Resumen

**Puerta, L.:** Obtención y caracterización de un novel alergeno mediante la tecnología del DNA recombinante. Rev. Acad. Colomb. Cienc. **25** (94): 77-87, 2001. ISSN 0370-3908.

Los alergenicos como agentes inductores de las alergias han motivado su obtención y caracterización como vía para el conocimiento de sus propiedades y de un mejor manejo de las alergias. Mediante la tecnología del DNA recombinante un nuevo alergeno, (Blot 13) fue identificado y agregado a la lista de los alergenicos caracterizados de la Organización Mundial de la Salud. Este trabajo muestra la vía de obtención de dicho alergeno recombinante, sus características estructurales y la determinación de su actividad de unión a ácidos grasos. El alergeno fue producido en dos sistemas de expresión; la bacteria *Escherichia coli* y la levadura *Pichia pastoris*. Se analizan las propiedades alérgicas y la actividad biológica de la proteína recombinante obtenida en los dos sistemas.

**Palabras clave:** Alergeno recombinante, alergia, proteínas de unión a ácidos grasos, IgE, ácaros.

## Abstract

Production and characterization of allergens are important to study their properties and improve the handling of allergic diseases. By using DNA recombinant technology a novel allergen, Blot 13, was identified and added to the list of characterized allergens from the World Health Organization. The production, structural features and fatty acid binding activity of this allergen are described. The allergen recombinant was expressed in *Escherichia coli* and the yeast *Pichia pastoris*. The allergenic properties and biological activity of the recombinant protein obtained in the bacteria and in the yeast are analyzed.

**Key words:** recombinant allergens, allergy, fatty acid binding proteins, IgE, mites.

\* Instituto de Investigaciones Inmunológicas. Universidad de Cartagena, Apartado Aéreo 4610 Cartagena, Colombia. Fax:6698491, E-mail: lpuerta@cartagena.cetcol.net.co

## Introducción

Los alérgenos se originan en diversas fuentes como insectos, polenes, mamíferos y alimentos. Tienen en común la propiedad de inducir una respuesta inmunológica mediada por anticuerpos tipo IgE y producir alergia. Sin embargo, esta peculiar propiedad no parece estar dada por alguna característica estructural especial común entre ellos.

La caracterización de un alérgeno implica inicialmente establecer su presencia en el medio ambiente y confirmar su alergenidad hasta llegar a definir su estructura molecular y probable función biológica. Lo anterior demanda la obtención de cantidades apreciables de la fuente original del alérgeno. Ante las dificultades de extraer el componente activo de la fuente natural o el agotamiento de ésta, la aplicación de la tecnología del DNA recombinante ha promovido el auge de la purificación y caracterización de alérgenos en los últimos años. La utilización de alérgenos recombinantes como reactivos para diagnóstico, prevención y tratamiento de las enfermedades alérgicas es considerada actualmente una estrategia avanzada para ayudar a controlar estas enfermedades (Valenta R, et al. 1999). En consecuencia, en los últimos años se ha observado un auge en la aplicación de la biotecnología en la producción de alérgenos.

Para producir los recombinantes en cantidades apreciables es importante contar con sistemas de alta eficiencia de expresión. La expresión de alérgenos en *Escherichia coli*, utilizando vectores de la serie pGEX (Pharmacia) ha sido eficiente y práctica para la producción de alérgenos de ácaros (Lynch NR, et al. 1997). Por otro lado, la expresión de los recombinantes en levadura o en otros sistemas eucariotes permite un mayor procesamiento de la proteína obteniéndola con las modificaciones post-traducción que ocurren en los sistemas eucarióticos y con una conformación más parecida a la nativa. Lo cual es determinante para que la proteína recombinante preserve la actividad biológica demostrada por la proteína nativa.

Los avances en la tecnología del DNA recombinante y la disponibilidad de programas y base de datos para comparar secuencias de aminoácidos y estructuras moleculares han permitido caracterizar y obtener nuevos alérgenos, como también sugerir y asignar funciones biológicas a muchos de ellos. El modelaje molecular también es una herramienta útil para descubrir funciones biológicas y para estudiar la relación estructura molecular/función biológica. El hallazgo de diversas funciones en los alérgenos ha tenido repercusiones importantes sobre: 1) un mejor conocimiento de su potencial alérgico o proinflamato-

torio, 2) el entendimiento de la reactividad cruzada entre alérgenos de orígenes muy diferentes, 3) la valoración del impacto alérgico de los alimentos modificados genéticamente y 4) la identificación y caracterización de nuevos alérgenos.

En una misma fuente de alérgeno se pueden encontrar alérgenos con las más diversas actividades biológicas. Por ejemplo, en los ácaros del género *Dermatophagoides* se han caracterizado más de una docena de alérgenos, la mayoría de ellos con actividad enzimática con diferentes especificidades por sustrato, otros probablemente ejercen una función reguladora como la tropomiosina (Thomas WR & Smith W, et al. 1998). La caracterización bioquímica de los alérgenos y su patrón de expresión en diferentes tejidos y organismos ha contribuido a un mejor diagnóstico de las enfermedades alérgicas; el concepto de pan-alérgeno, inicialmente propuesto por Valenta y su grupo en Austria para describir la reactividad cruzada presentada entre las profilinas presentes en polenes de diferentes especies de plantas, frutas y el humano, se ha planteado más recientemente para alérgenos presentes en distintas fuentes pero que tienen alguna función biológica común como las tropomiosinas y las proteínas que confieren resistencia a enfermedades en las plantas (Salcedo G, et al 1999).

Los alérgenos recombinantes se han usado para estudiar las propiedades alérgicas de las fuentes de origen y para explorar su uso potencial en el tratamiento y diagnóstico de las alergias. Una de las líneas de investigación del Instituto de Investigaciones Inmunológicas de la Universidad de Cartagena es la obtención y caracterización de alérgenos recombinantes. Especialmente se investiga sobre el ácaro *Blomia tropicalis* dada la abundancia de este ácaro y de sus alérgenos en nuestro medio (Fernández-Caldas E, et al. 1993; Puerta L, et al. 1996). Esta especie de ácaro es un importante agente inductor de alergia en el trópico y subtropico (Puerta L, et al. 1993; Tsai J, et al. 1998).

En este artículo se presentan los trabajos de investigación que llevaron a describir por primera vez un alérgeno con propiedades de unión a ácidos grasos en un arácnido. También se presenta la obtención del recombinante en dos sistemas de expresión (bacteria y levadura) y los trabajos en curso tendiente a dilucidar la estructura antigénica de Blo t 13.

## Metodología

**Construcción de la biblioteca de cDNA.** La biblioteca de cDNA se construyó, según se describe en (Caraballo

L, et al. 1996). En resumen; a partir de 1 gm de ácaros de *Blomia tropicalis* congelados se aislaron 1.9 mg de RNA total utilizando RNazol-B, del cual se obtuvieron 10 ug de RNA mensajero mediante adsorción a una columna de poli(dT). El cDNA fue sintetizado a partir de 5 mg de mRNA mediante el método de clonaje direccional. La primera cadena se sintetizó usando el primer Not I-dT18 y después de agregar los adaptadores para Eco R I, el cDNA con extremos Eco R I/Not I se ligó al fago lambda gt11D digerido con Eco R I/Not I. El DNA ligado se empacó en *E. coli* Y1090 y se sembró para producir una biblioteca de  $3.5 \times 10^4$  recombinantes.

**Aislamiento del clon de cDNA.** La selección del clon reactivo se hizo por radioinmunoensayo de placas usando una mezcla de sueros de pacientes asmáticos adsorbidos con *E. coli*/Y1090. Los fagos se sembraron en cajas de petri, las placas de lisis se adherieron a filtros de nitrocelulosa humedecidos en isopropyl-b-D-thiogalactopyranoside (IPTG). Luego los filtros se bloquearon con una solución al 10% de leche en polvo descremada y se lavaron en PBS/0,1%Tween-20 (PBST). Posteriormente se incubaron con la mezcla de sueros por la noche a temperatura ambiente. Luego de varios lavados en PBST e incubación con anti-IgE humana marcada con  $^{125}\text{I}$  y se lavaron con PBST. Finalmente, los filtros se revelaron previa exposición a placa radiográfica durante 24 horas a  $-70^\circ\text{C}$ . Los fagos con placas positivas se amplificaron mediante el método de lisado líquido (Sambrook J, et al. 1989).

**Subclonaje del fago lambda gt11/inserto en un plásmido.** Los insertos resultantes de digerir con las enzimas Eco R I y Not I el DNA del fago lambda correspondiente al clon identificado como Bt6 previamente purificado, se ligaron al vector pBlueScript (Stratagene), con este vector se transformó la *E. coli* XL1-Blue (Stratagene) de acuerdo a (Sambrook J, et al. 1989). Los clones fueron seleccionadas según el color en placas con medio LB (Luria-Bertani) conteniendo ampicilina/tetraciclina/X-gal/IPTG. Los clones recombinantes se confirmaron mediante análisis de restricción.

**Secuenciación y análisis del DNA.** La secuencia del cDNA del clon Bt6 subclonadas en pBlueScript, fue determinada secuenciando las dos cadenas por la metodología de PCR-dideoxy, basado en el método de terminación de cadenas por dideoxinucleótidos de Sanger (Murray V. 1989), con "Primer" internos y los "Primers" universales T3 y T7. La búsqueda de homologías con otras secuencias registradas en bases de datos se realizó usando los programas BLASTX, BLASTP y FASTA (Altschul SF, et

al. 1990), accedando a National Center for Biotechnology Institute, vía internet.

**Expresión en *E. coli*.** Para la expresión en bacteria se usó el vector pGEX-4T3 (Pharmacia) según se describe en (Caraballo L, et al. 1997). En resumen; el inserto resultante de digerir con Eco R I y Not I el DNA del fago lambda correspondiente al clon Bt6 se ligó al vector pGEX-4T-3 y se transformó en *E. coli* BL21. La expresión de Bt6 como una proteína de fusión con la glutation S-transferasa (GST) se indujo con IPTG y la purificación de los lisados bacterianos se hizo en columna de glutation sepharosa siguiendo las indicaciones del Módulo de Purificación GST (Pharmacia Biotech). La digestión con trombina biberó la proteína recombinante Bt6 de 17 KD, la cual se recolectó de la columna después de elución. La producción de la proteína de fusión fue de 0,8 mg/l.

**Reactividad contra IgE.** La unión de la IgE a la proteína de fusión GST-Bt6 y a Bt6 se determinó por "immunoblotting", Radio Allergo Sorbent Test (RAST), radio-inmuno análisis de placa y dot-blot usando sueros de alérgicos. La GST obtenida a partir de la *E. coli* BL21 transformada con pGEX-4T-3 se usó como control negativo. Para el radio-inmuno análisis de placa el fago recombinante lambda gt11/Bt6 se sembró densamente y las placas se pasaron a filtros de nitrocelulosa previamente saturados con IPTG. Posteriormente se cortó el papel en pedacitos y cada uno de ellos se incubó con sueros individuales de 100 pacientes alérgicos a *B. tropicalis*. La IgE unida al alérgeno se detectó con anti-IgE humana marcada con  $^{125}\text{I}$  (Kallestad Diagnostics Inc). El RAST se realizó en placas de microtitulación recubiertas con el recombinante, las cuales se incubaron con 100 ul de suero de alérgicos, con posterior incubación con 100 ul de anti-IgE humana marcada con  $^{125}\text{I}$ . La radioactividad en cada pozo se determino en un contador gamma y los resultados se expresaron como la media del porcentaje de cuentas totales unidas (TCB). El RAST se consideró positivo cuando un suero mostraba más de 1% de las cuentas totales unidas (TCB).

La capacidad de unión a la IgE del recombinante en relación con el extracto nativo de *Blomia tropicalis* se evaluó mediante prueba de inhibición del RAST con *B. tropicalis* en la fase sólida y usando un suero con altos niveles de IgE específica contra *B. tropicalis* y Bt6. Las Placas de microtitulación recubiertas con extracto de *B. tropicalis* se incubaron con el suero previamente adsorbido con diferentes concentraciones de recombinantes, durante la noche. Como control negativo se usó GST en remplazo del recombinante. Después de varios lavados, la presen-

cia de IgE específica se detectó como se señaló arriba para el RAST. El porcentaje de inhibición se calculó así: % inhibición = cpm sin inhibidor - cpm con inhibidor / cpm sin inhibidor.

**Determinación de la estructura secundaria.** Usando concentraciones del recombinante de 1.0 mg/ml, se registró el espectro del Dicroísmo Circular de la proteína recombinante a 20° C en un espectropolarímetro JASCO J-600 en celdas de cuarzo. Para el análisis de la estructura secundaria se utilizó el programa CONTIN (Provencher SW. & Glockner J. 1981), sobre datos registrados en el rango de 240-200 nm.

**Modelaje molecular.** Se realizó una predicción de la estructura secundaria usando el programa Profile Network Prediction HeiDelBerg (PHD basado en el alineamiento de varias secuencias homólogas (Rost B. & Sander C. 1994). La estructura fue modelada generando una composición estructural a partir de estructuras con alto parentesco a la secuencia del clon Bt6 según el alineamiento generado con el programa SWISSMODEL (Guex N, & Peitsch MC. 1997); FABP muscular de la *Schistocerca gregaria* (código PDB: 1FTP), proteína de unión a lípidos del adiposito del ratón (1ACD), FBP muscular del humano (1HMR), la proteína de unión a lípidos del adiocito del ratón (1ABO) y una mutante de ésta (1ADL). El modelo fue analizado usando PROCHECK (Laskowski RA, et al. 1993).

**Análisis de unión a ácidos grasos.** Se realizó mediante espectro-fluorometría de unión a ligandos como se describe en (Puerta L, et al. 1999). Los espectros de emisión de fluorescencia fueron registrados a 20° C en un espectrofluorómetro (SPEX FluorMAX) en celdas de sílica de 2 ml. Como ligandos se usaron: ácido cis-Parinárico, ácido trans- Parinárico y los análogos de ácidos grasos fluorescentes: derivado dimetil amino naftalen sulfónico del ácido undecanoico (DAUDA), el derivado dansilado del ácido amino caprílico (DACA) y el derivado antroxilado del ácido esteárico (12AS). Además de trans-retinol, colesterol, dehidroergosterol y ácido oleico. La estequiometría de unión fue determinada por titulación con diferentes concentraciones de ácido cis-Parinárico o titulación competitiva entre la unión del ácido oleico y del ácido cis-Parinárico por el recombinante.

**Expresión en *Pichia pastoris*.** El clon Bt6, fue modificado mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para eliminar la secuencia 5' no codificadora. El producto de amplificación fue clonado en el vector para expresión en levadura pPIC9 (Invitrogen) y se obtuvo el plásmido pPIC9/Blo t 13. Luego, la cepa *E. coli* JM105

fue transformada con este plásmido. Las colonias transformadas fueron secuenciadas con los "Primers" alfa-factor (5'-TACTATTGCCAGCATTGCTGC-3') y 3' AOX1 (5'-GCAAATGGCATTCTGACATCC-3') usando el estuche de Sequenasa (Amersham Life Sciences).

El plásmido pPIC9/Blo t 13 fue linealizado por digestión con Sac I, el cual fue usado para transformar la cepa GS115 (his 4) de *Pichia pastoris* por el método de esferoplasto (*Pichia* Expression kit Version E). Las levaduras transformadas se analizaron por fenotipo de utilización del metanol en platos de medio mínimo en metanol (MM) y medio mínimo en dextrosa (MD). Varias colonias His<sup>+</sup> Mut<sup>s</sup> y His<sup>+</sup> Mut<sup>t</sup> fueron analizadas por PCR para confirmar la presencia del inserto de Blo t 13 y por electroforesis en poliacrilamida (SDS-PAGE) para la expresión del recombinante.

Para la obtención del recombinante Blo t 13, una colonia con el fenotipo His<sup>+</sup> Mut<sup>s</sup> fue seleccionada para la expresión en cultivo inducidos con metanol a 30° C por seis días en medio BMM según protocolo (*Pichia* expression Kit. Version E). La proteína fue purificada a partir del sobrenadante del cultivo, el cual fue dializado usando bolsa de diálisis de 8000 Da cutt of y separada en columna de Sephadex G-75, C25/100 eluida con PBS. Las fracciones de interés fueron mezcladas y la mezcla dializada y liofilizada. La concentración de proteína se determinó por el método de Bradford usando el estuche de Bio-Rad.

La reactividad contra IgE del recombinante expresado en levadura fue determinada mediante inmunoblotting y RAST como se describió arriba. La unión a ácidos grasos fue determinada mediante espectrofluorometría como se describió arriba usando los siguientes ligandos; DAUDA, ácido cis-Parinárico, ácido oleico y ácido anilinaftalen sulfónico (ANS). Se realizó un ensayo de competición por la unión al alérgeno entre el monoclonal 5G3 específico para Blo t 13 y el ácido cis-Parinárico, para lo cual se realizó incubación del alérgeno con diferentes concentraciones del monoclonal seguida de la determinación de la capacidad de unión al ácido cis-Parinárico y ácido oleico, mediante espectrofluorometría.

**Producción de anticuerpos monoclonales.** Se inmunizaron por vía subcutánea ratones hembras BALB/c con Blo t 13 producido en la levadura *P. pastoris*. Tres días antes de la fusión los ratones con los títulos más altos de anticuerpo se les administró vía intraperitoneal una nueva dosis del alérgeno. Las células del bazo se fusionaron con células de mieloma usando polietilén glicol. Los híbridos productores de anticuerpos se clonaron me-

diante dilución limitante. Los anticuerpos del líquido ascítico se purificaron usando columna de Proteína A. El "screening" de los clones positivos se realizó mediante ELISA, con el recombinante pegado a placas de microtitulación. Los anticuerpos en los sobrenadantes de los híbridos se detectaron usando anti IgG de ratón conjugada a peroxidasa y reacción con OPD (orto-phenilen diamina). Se realizó inmunoblotting con Blo t 13 transferido sobre tiras de nitrocelulosa, las cuales se incubaron con los monoclonales purificados. Las bandas se detectaron usando anti-IgG de ratón conjugada con peroxidasa, el revelado se realizó con Diaminobenzidina (DAB).

Se analizó la unión de los monoclonales a Blo t 13 expresado en *Pichia pastoris* y expresado en *E. coli* mediante ELISA en placas de microtitulación cubiertas con el recombinante y usando anti IgG de ratón conjugada a peroxidasa.

**Mutagénesis dirigida.** Para analizar la estructura antigénica de Blo t 13 se diseñó generar mutantes con sustituciones de bases dirigida a alterar los codones codificadores de residuos de aminoácidos críticos para los perfiles hidropáticos, accesibilidad de residuos y movilidad de la molécula. Se identificaron usando el programa ProtScale a través de ExpASY Molecular Biology Server via Internet, los aminoácidos que al ser reemplazados provocaran cambios drásticos en dichos parámetros de tal manera que existiera una alta probabilidad de modificar potenciales sitios antigénicos (Bordo D, & Argos P. 1991; Jameson BA, & Wolf H. 1988). Para generar las mutantes se siguió el método de Mega Primer (Sarkar G, & Sommer S. 1990). Se diseñaron cinco "Primers" mutagénicos dirigidos a introducir sustituciones en los codones que llevaran a los siguientes cambios en la secuencia de aminoácidos: Mutante 1 (M1), reemplazo de K<sub>6</sub> por I<sub>6</sub> y reemplazo de K<sub>8</sub> por I<sub>8</sub>; M 2, reemplazo de K<sub>77</sub> por M<sub>77</sub>; M 3, reemplazo de K<sub>85</sub> por M<sub>85</sub>; M 4, reemplazo de K<sub>99</sub> por I<sub>99</sub>; y M 5, reemplazo de R<sub>105</sub> por I<sub>105</sub>. El Primer externo 5' fue el alfa-factor y el 3' fue diseñado con sitio de restricción para Not 1. En cada ronda inicial de amplificación se usó un "Primer" externo y un "Primer" mutagénico. En la segunda ronda de amplificación se usó un fragmento amplificado en la primera reacción (Mega "Primer") y un "Primer" externo. En ambos casos el AND plantilla fue pPIC9/Blo t 13.

Los productos de la segunda amplificación fueron digeridos con Eco R 1 y Not 1 y subclonados en pGEX 4T3-1 digerido con Eco R 1 y Not 1, como se describió anteriormente. Este producto se utilizó para transformar la cepa de *E. coli* JM105.

## Resultados y discusión

**Secuencia de un nuevo alergeno.** El análisis de la secuencia del clon Bt6, reveló un fragmento de 934 pb con una secuencia codificadora de 390 pb, un codón de iniciación ATG en la posición 38-40, un codón de terminación TAG en las posición 428-430, y una región no traducida de 505 pb en el extremo 3', con una señal de poliadenilación en los residuos 892 a 897. La proteína inferida de la secuencia codificadora reveló una molécula de 130 aminoácidos con peso molecular estimado de 14,8 KD. Se identificó una señal propia de las proteínas citosólicas que se unen a los ácidos grasos (FABP) en los residuos de aminoácidos 5-22. (Caraballo L, et al. 1996). La proteína codificada mostró una alta similitud con la secuencia de aminoácidos de unas proteínas de la familia de las FABP de diferentes orígenes (Tabla 1).

Este hallazgo constituyó la primera descripción de una proteína perteneciente a la familia de proteínas citosólicas que se unen a los ácidos grasos en arácnidos. Esta secuencia no mostró similitud con ninguna secuencia de alergeno descrita previamente. Fue registrada en la base de datos GeneBank en 1996 con el número de entrada U58106. Las proteínas intracelulares que se unen a ácidos grasos son proteínas con peso molecular de 14 a 16 KD y con una estructura bastante conservada. Participan en el depósito, transporte y metabolismo de los ácidos grasos y muestran un relativo grado de especificidad por tejidos. Dada la importancia biológica de esta familia de proteínas en la fuente de origen, quedó planteado el interrogante

**Tabla 1.** Similitud en la secuencia de aminoácidos entre Blo t 13 y otras proteínas citosólicas que se unen a los ácidos grasos. Según los resultados consultando alineamiento de secuencias con BASTPX.....

Proteína	% a.a	
	idénticos	positivos
FABP <i>Schistosoma mansoni</i>	40	58
FABM <i>Schistocerca gregaria</i>	40	62
FABP <i>Gallus galus</i>	40	61
FABP <i>Mus musculus</i>	42	58
H-FABP <i>Rattus norvegicus</i>	49	60
FABH <i>Bos taurus</i>	38	59
AFABP <i>Homo sapiens</i>	40	57

de la presencia de homólogos a Blo t 13 en otros ácaros y fuentes de alérgenos.

**Alergicidad de la proteína recombinante.** La capacidad de unión a IgE determinada mediante análisis de placa del clon Bt6 con 100 sueros de alérgicos reveló que el 11% de los sueros reaccionaron con el recombinante expresado por el fago. Usando el recombinante expresado en *E. coli* como proteína de fusión a GST o el recombinante expresado en la levadura *Pichia pastoris* mediante RAST en un grupo de 86 alérgicos se obtuvo una frecuencia de 10.4 % con ambos productos. Usando sueros de asmáticos, identificamos previamente unos 25 componentes alérgicos en el extracto natural de *Blomia tropicalis* (Caraballo L, et al. 1994), los identificados en la región de 14-17 KD mostraron frecuencia de unión a IgE de 37-38 %. Aunque todavía no se ha logrado el aislamiento y purificación de alérgeno natural alguno de *B. tropicalis*, el clonaje molecular ha permitido identificar, además de Blo 13, dos alérgenos con un peso molecular en este rango, los cuales han mostrado una mayor frecuencia de unión a IgE que Blo t 13. (Arruda et al. 1996; Caraballo et al. 1998; Puerta L, et al. 1996). El aislamiento y purificación del equivalente nativo de dichos recombinantes ayudaría a clarificar estos resultados.

**Estudios funcionales.** La capacidad de unión a los ácidos grasos se puede determinar experimentalmente mediante análisis espectrofluorométricos de unión a ligandos usando como sondas ácidos grasos con capacidad de fluorescencia. Estas sondas muestran un aumento en la intensidad de fluorescencia y desplazamiento de la longitud de máxima intensidad de fluorescencia al acoplarse a la proteína.

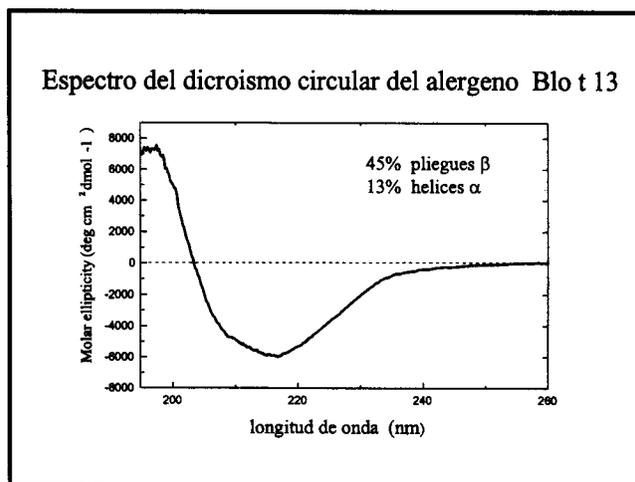
El ácido cis-Parinarico, ácido graso poli-insaturado y fluorescente, experimentó un aumento en la intensidad de fluorescencia al agregarse el alérgeno Blo t 13. Efecto que fue revertido competitivamente por adición del ácido oleico, un ácido graso no fluorescente. Un hallazgo curioso fue que Blo t 13 mostró una especificidad por ácidos grasos un poco restringida dirigida solamente al ácido cis-Parinarico, trans-Parinarico y ácido oleico. El recombinante expresado en *E. coli* no fue capaz de unirse al ácido retinoico, retinol, colesterol, ácido dimetilaminonaptalen sulfónico undecanoico (DAUDA), al derivado dansilado del ácido aminocaprílico (DACA) ni al derivado 12-(9-anthroyloxy) del ácido esteárico (12AS), (Tabla 2). Los experimentos de titulación revelaron que Blo t 13 se une con alta afinidad con el ácido cis-Parinarico y el ácido oleico con constantes de disociación (Kd) de  $1.31 \times 10^{-6}$  y  $4.6 \times 10^{-8}$  M respectivamente. Igualmente, la relación molar proteína/ligando fue de 1:1, como en la mayoría de las FABPs (Banazack et al. 1994).

**Tabla 2.** Especificidad por ácidos grasos del alérgeno Blo t 13, FABP muscular y hepática de ratón (Banazack L, et al 1994) y el alérgeno del *Ascaris suum*, ABA 1 (Kennedy M, et al. 1995).

Especificidad por ácidos grasos del alérgeno Blo t 13				
LIGANDO	Blo t 13	A-FABP	L-FABP	ABA-1
A. Cis- Parinárico	+	+	+	
Acido oleico	+	+	+	+
DAUDA	-	-	-	+
DACA	-	-	-	+
Retinol	-	-	+	+
Dehidroergosterol	-			
Colesterol	-			
A. grasos antroxilados	-	+	+	+
A. retinoico	-	+	+	+

No sabemos si esta especificidad restringida es indicativa de diferencias de especie debido a diferencias en el metabolismo de los lípidos en diferentes tejidos y órganos como resultado de diversidad ecológica. Puede ser también que la cavidad que alberga el ácido graso no sea lo suficientemente abierta para acomodar derivados antroxilados ni dansilados.

**Análisis estructural.** El espectro del DC del recombinante Blo t 13 mostró un mínimo a 217 nm y un máximo a 198 nm, lo cual es consistente con la presencia de componentes en pliegues  $\beta$  y  $\alpha$ -hélices (Figura 1). El



**Figura 1.** La determinación de la estructura secundaria del alérgeno Blo t 13 mediante dicroísmo circular, mostró un espectro característico de una molécula con estructura mayormente beta y algo de composición en alfa hélices

análisis de los resultados experimentales usando el programa CONTIN suministró un estimado de 13 % en alfa-hélices y 45 % en pliegues beta valores similares a los arrojados en la predicción con el programa PHD y común en la familia de proteínas que se unen a los lípidos (Banaszack L, et al. 1994).

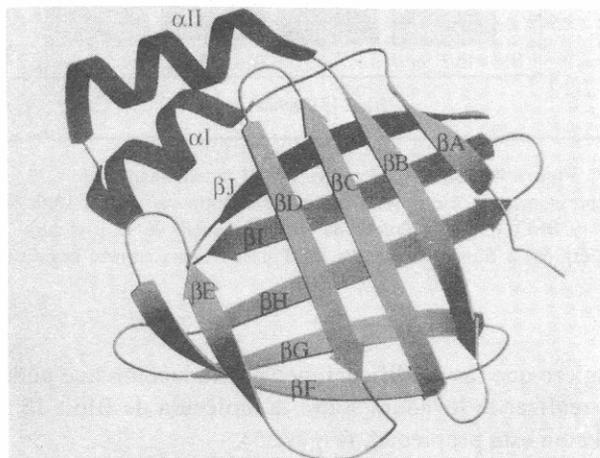
Con base en las coordenadas atómicas obtenidas experimentalmente de las estructuras tridimensionales de FABPs del humano, insecto y ratón similares a Blo t 13, se construyó un modelo de la estructura tridimensional del Blo t 13, el cual se ajusta bastante a la estructura característica de las FABP; 10 cadenas  $\beta$  organizadas en dos pliegues  $\beta$  conformando un barril y dos  $\alpha$  hélices cortas ubicadas en la puerta de entrada a la cavidad (Figura 2). El mejor modelo de la estructura tridimensional de Blo t 13 modelada con SwissModel fue chequeado por PROCHECK, el cual arrojó un 90.5 % de los residuos de aminoácidos en la región más favorecida, 8.6 % en regiones adicionales permitidas y 0.9 en regiones no permitidas, la cual correspondió al aminoácido Asp 120, el cual en el modelo reside en un loops de tal manera que es improbable que afecte la fidelidad de la estructura predicha.

El parentesco estructural de Blo t 13 con otras proteínas citosólicas que transportan lípidos es alto. Sin embargo, la capacidad alergénica de FABP de insectos, humano y ratón no ha sido examinada. Por lo tanto, Blo t 13 es un buen modelo para estudiar la relación estructura molecular/ alergenicidad. En el nemátodo *Ascaris suum* se conoce un alergen que tiene la propiedad de unirse a

los ácidos grasos y al retinol. Este alergen presenta un espectro de especificidad por ligandos lípidos más amplio que el de Blo t 13, no comparte homología en las secuencias con Blo t 13 y estructuralmente no es homólogo a las FABP (Kennedy M W, et al. 1995).

La Organización Mundial de Salud, a través del comité de nomenclatura de alergen, le asignó al alergen expresado por el clon Bt6 la denominación de Blo t 13. Este alergen junto con el alergen Blo t 12 (Puerta L, et al. 1996) también registrado por el grupo del Instituto de Investigaciones Inmunológicas, ampliaron el abanico de nuevos alergen de ácaros caracterizados y disponibles a la comunidad científica. Blo t 12 no tiene función biológica conocida y todavía no se le ha hallado un homólogo en otras especies de ácaros, por lo cual sigue siendo el único representante del grupo 12 de los alergen de los ácaros. De otra parte, la tecnología del DNA recombinante ha permitido encontrar recientemente un alergen homólogo a Blo t 13, en las especies *Acarus siro* y *Lepidoglyphus destructor*. Estos homólogos tienen 65 y 78 % de identidad en la secuencia de aminoácidos con el alergen identificado en *B. tropicalis*, respectivamente. (Eriksson T, et al. 1999; Erikson T, et al. 2000). Resultados preliminares con un monoclonal específico para Blo t 13 indican que un antígeno homólogo a este también está presente en el ácaro *Dermatophagoides siboney* (Alexis Labrada, Biocen-Cuba, comunicación personal), (Tabla 3). Teniendo en cuenta la función que representan las FABPs en la fuente de origen y que tienen una estructura molecular bastante conservada, es de esperar que alergen homólogos a Blo t 13 se encuentren no solo en otras especies de ácaros sino también en otras fuentes animales de alergen. También es probable que las FABP representen una familia de alergen, como las lipocalinas y tropomiosinas. Su identificación y caracterización ayudaría además, a explicar muchos casos de reactividad cruzada.

**Producción en diferentes sistemas de expresión.** Al obtener alergen recombinantes, siempre se plantea el interrogante de qué tan representativo es del alergen nativo desde el punto de vista estructural y funcional. Para alergen con alguna función biológica su conformación espacial y grado de enrollamiento es muy importante. La expresión de recombinantes en eucariotas ofrece la posibilidad de obtener la proteína en una conformación más parecida a la que tendría la equivalente natural, y por lo tanto una mayor posibilidad que refleje realmente la función biológica de la proteína natural. La anterior razón y la búsqueda de sistemas de expresión más eficientes para obtener cantidades apropiadas del alergen para



**Figura 2.** Modelo estructural de Blo t 13. Creado usando SwissModel, basado en una composición generado con cinco estructuras con alta similitud a Blo t 13. Tomado con permiso de Puerta et al 1999.

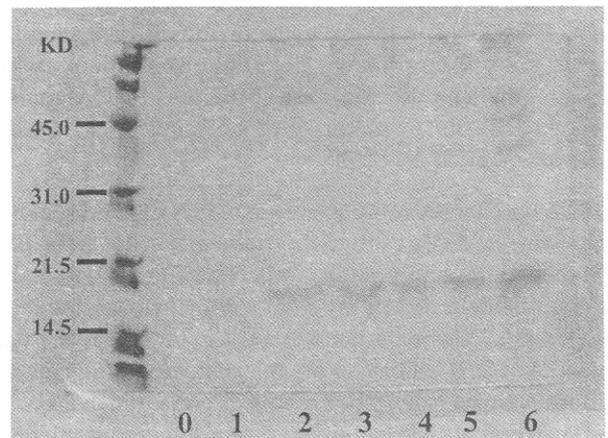
**Tabla 3.** Los alérgenos de los ácaros del grupo 13 pertenecen a la familia de proteínas citosólicas que unen ácidos grasos. Gracias al clonaje molecular, se han podido caracterizar tres de ellos. E del *Dermatophagoides siboney* se ha identificado en inmunoblott mediante el uso de un monoclonal contra Blo t 13.

ALERGENOS HOMOLOGOS CON LAS PROTEINAS QUE UNEN ACIDOS GRASOS				
alergeno	KD	reactividad	unión a ácidos grasos	descrito
Blo t 13	14.8	11 % (10/87)	+	Int Arch Allergy Immunol 1997;112:341-347
Aca s 13	15	23% (3/13)	ND	Int Arch Allergy Immunol 1999;119:275-281
Lep d 13	14.7	ND	ND	J Allergy Clin Immunol 2000;105:S229
<i>D. siboney</i>	16	ND	ND	comunicación personal (CUBA)

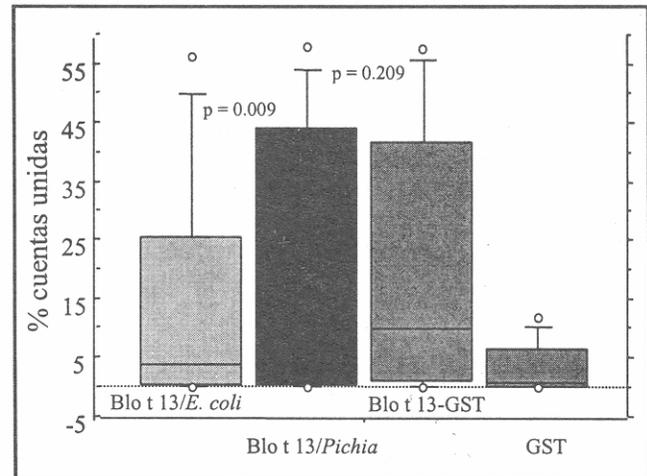
futuras investigaciones nos llevó a clonar Blo t 13 en la levadura *Pichia pastoris* (Puerta L, et al. 1999).

Con el plásmido pPIC9/Blo t 13 se logró una eficiencia de transformación de 40 colonias/ug de DNA. Se obtuvieron varias colonias con el fenotipo His<sup>+</sup> Mut<sup>s</sup> y His<sup>+</sup> Mut<sup>+</sup>. El recombinante fue secretado al medio de cultivo, con pocas proteínas propias de la levadura y se logró la producción más alta al sexto día del cultivo inducido con metanol (Figura 3). El rendimiento en la producción fue de 60 mg de proteína por litro de cultivo. Nosotros hemos encontrado este sistema de expresión también eficiente para producir el alérgeno Blo t 12 (Sanjuan H, et al. 1998). Al comparar el patrón de reactividad del recombinante producido en *E. coli* con el producido en *P. pastoris* usando sueros de pacientes alérgicos a *Blomia tropicalis*, el recombinante expresado en *Pichia* mostró la misma frecuencia de unión a IgE que el recombinante expresado en *E. coli* (10.4 %). Los niveles de IgE del recombinante expresado en *P. pastoris* fueron significativamente mayores a los niveles de IgE con el recombinante expresado en *E. coli* después de la eliminación de la GST (Figura 4). Lo cual sugiere una mayor afinidad del alérgeno obtenido en *Pichia pastoris*.

Análisis de unión a ligandos mostró que Blo t 13 expresado en *P. pastoris* se unió al ácido cis-Parinárico y al ácido oleico, no se unió a DAUDA. Esto indica que el recombinante obtenido en los dos sistemas de expresión tienen las mismas propiedades de unión a ácidos grasos y



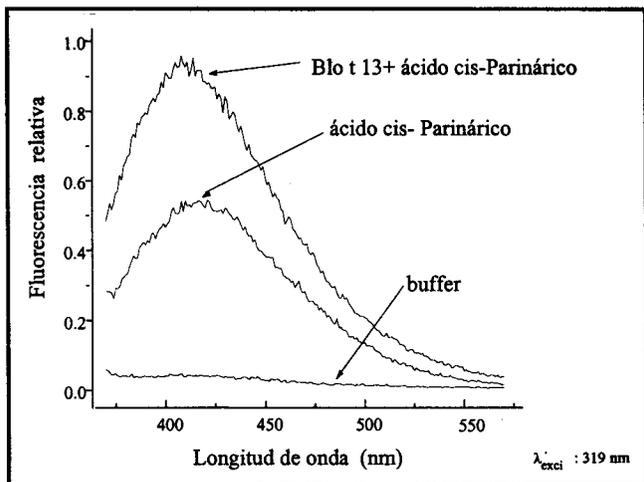
**Figura 3.** Gel de poliacrilamida. Muestras de sobrenadante recogidas antes (0) y al 1, 2, 3, 4, 5 y 6 día de inducción de un cultivo de *Pichia pastoris* Mut<sup>s</sup> transformada con pPIC9/Blo t 13. La mayor producción del alérgeno recombinante (16KD) se logró al sexto día de inducción con metanol.



**Figura 4.** Reactividad contra IgE el recombinante Blo t 13 expresado en *Pichia pastoris* y en *Escherichia coli* (Blo t 13/*E. coli* y Blo t 13-GST). Prueba de RAST en suero de 12 pacientes alérgicos a *Blomia tropicalis*. GST usado como control negativo.

sugiere que las modificaciones postraduccion que pudieran realizar la levadura sobre la molécula de Blo t 13 no afectan esta propiedad. (Figura 5).

El alérgeno Blo t 13 presenta una frecuencia de reactividad del 11 % y Aca s 13 del 23 %. Aunque esta frecuencia es baja, para el caso de Blo t 13 algunos pacientes responden fuertemente a este alérgeno (Caraballo



**Figura 5.** Espectro de fluorometría del experimento de unión a ligando. La unión del alergeno está indicada por el incremento en la intensidad de fluorescencia del ácido cis-Parinámico al mezclarlo con Blo t 13.

L, et al. 1996). La baja frecuencia de reactividad en estos alérgenos merece algunas consideraciones; a) probablemente el equivalente natural del alergeno homólogo a las FABPs no se encuentra en grandes cantidades en el extracto alérgico lo que no ha facilitado su detección y aislamiento en otras especies de ácaros y pudiera explicar en parte, la baja frecuencia de sensibilización hasta ahora conocida; b) el hecho que estas proteínas estén limitadas al espacio intracelular también pudiera estar influyendo en esto, por ejemplo, la ubicación en el espacio extracelular y presencia en los fluidos de secreción de las lipocalinas, otras proteínas que unen ligandos lipídicos, ha sido señalada como uno de los factores contribuyentes a su alta frecuencia de sensibilización en alérgicos a los mamíferos (Arruda LK, et. al. 1995); y c) también hay que considerar el papel que juega la unión al ligando lipídico el cual pudiera estar influenciando en su capacidad atigénica. Por ejemplo, en los alérgenos que se unen al calcio la unión a éste es importante para la actividad alérgica, y la molécula unida al calcio adopta una conformación bastante diferente (Valenta R, et. al. 1998).

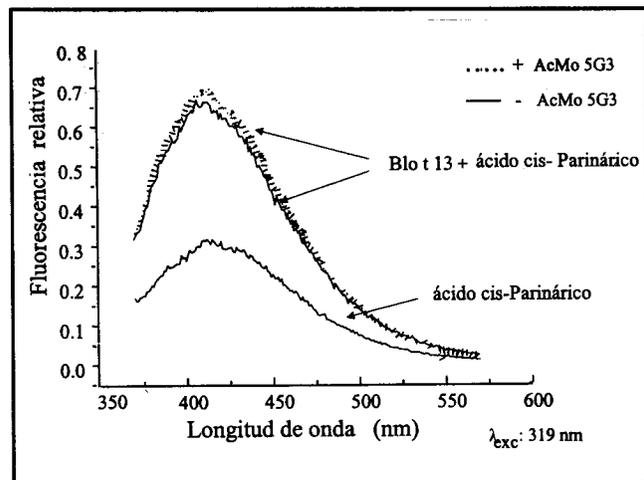
**Estudios con los monoclonales.** Dos anticuerpos monoclonales específicos contra Blo t 13 fueron generados, 5G3 y 3G4, los cuales reconocieron en immunoblotting con el material usado como antígeno, el componente de 16 KD correspondiente al alergeno recombinante. En los ensayos de ELISA el alergeno expresado en *P. pastoris* mostró una gran reactividad. Sin embargo, la reactividad con el recombinante producido

en *E. coli* fue solo ligeramente superior a la obtenida con el control ligativo.

Con el fin de evaluar si el sitio de unión a ligandos lípidos hace parte de los sitios antigénicos, se usó el anticuerpo monoclonal 5G3 específico contra Blo t 13, en un análisis competitivo de unión con el ácido cis-Parinámico. El monoclonal no inhibió la unión del ácido cis-Parinámico ni del ácido oleico al alergeno Blo t 13, lo cual sugiere que los sitios antigénicos no hacen parte ni interfieren con el sitio de unión a ligandos (Figura 6). Hay que realizar estudios de inhibición de unión a ligandos con IgE específica a Blo t 13, lo cual informaría si la unión a los lípidos es incompatible con la unión a la IgE.

La disponibilidad de los dos anticuerpos monoclonales es de gran utilidad para estudios inmunológicos y su relación con otras moléculas de función similar o relacionada. En efecto, datos preliminares indican que el monoclonal 5G3 es capaz de reconocer un componente de 16 Kd en el extracto natural del ácaro *Dermatophagoides siboney*.

**Mutagénesis dirigida.** Mediante la mutagénesis se pueden generar modificaciones en la estructura de los recombinantes y probar la actividad antigénica de los mutantes frente a sueros de pacientes alérgicos, Clonas de Linfocitos T y anticuerpos monoclonales. Por esta vía se puede llegar a establecer, los requisitos estructurales (epitopes T y B) de la molécula de alergeno, para su participación en la respuesta alérgica. Los experimentos de mutagénesis llevan más específicamente a la determina-

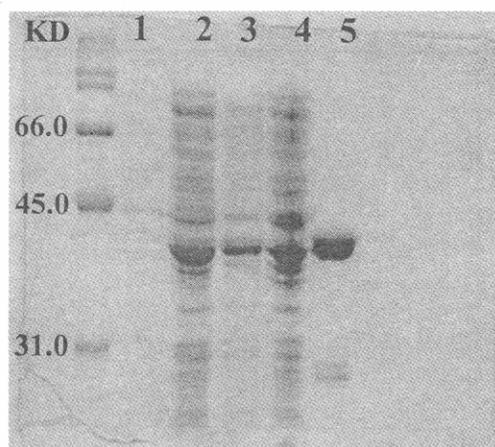


**Figura 6.** Espectro de fluorescencia del análisis competitivo por unión a ligando. El patrón de fluorescencia del alergeno unido al ácido cis-Parinámico no se modifica cuando ha sido incubado previamente con el monoclonal 5G3.

ción de residuos críticos para el reconocimiento de los epítopes y a la obtención de nuevos recombinantes con propiedades inmunogénicas distintas a la molécula original. Siguiendo el método de "Megaprimer", se han obtenido tres clones de Blo t 13 con probables modificaciones en residuos críticos para la conformación y actividad antigénica del alérgeno. Uno de los clones mutantes ha sido expresada en *E. coli* usando el vector pGEX 4T3-1.

En cultivo líquido inducido con IPTG el producto de la mutante M3 se ha obtenido como proteína de fusión unida a GST en rendimiento comparable al clon silvestre (Figura 7). Están en curso análisis de secuenciación para confirmar la modificación introducida, inmunoblotting para confirmar la reactividad contra IgE y pruebas de RAST para estimar su potencia alérgica frente a una batería de sueros de pacientes alérgicos.

En conclusión, Un alérgeno del ácaro *Blomia tropicalis*, Blo t 13, obtenido mediante clonaje del DNA complementario tiene una alta similitud con proteínas que se unen a ácidos grasos (FABP) de diferentes orígenes como rata, ratón, insecto y el humano. El hallazgo de Blo t 13, en *Blomia tropicalis* fue la primera descripción de una proteína de ésta naturaleza en arácnidos y con propiedades alérgicas. Recientemente, alérgenos homólogos a Blo t 13 han sido identificados mediante clonaje molecular, en otras especies de ácaros. La expresión del recombinante en la levadura *P. pastoris* resultó



**Figura 7.** Electroferis en poliacrilamina. Análisis de la expresión de proteína de la mutante M3 de Blo t 13 expresado como proteína de fusión unida a GST. 1. muestra no inducida; 2 y 3. Sobrenadante de primer sonicado de cultivo inducido con IPTG; 3 Sobrenadante de segundo sonicado; 4. Pellet del sonicado del inducido; 5. Blo t 13/GST no mutado.

apropiada para obtener una molécula con sus propiedades biológicas y aumentar el rendimiento de la producción. Los alérgenos con actividad de unión a ácidos grasos probablemente representan una familia de alérgenos con propiedades biológicas bien definidas cuya identificación y caracterización en otras fuentes ayudaría a explicar las bases moleculares de las alergias.

### Agradecimientos

Este trabajo se ha realizado gracias al apoyo y colaboración de: Colciencias, Asthma and Allergy Center (John Hopkins University -USA), Division of Infection and Immunity (University of Glasgoww-Escocia), Centro Nacional de Biopreparados (BIOCEN, Cuba) e Instituto de Investigaciones Inmunológicas de la Universidad de Cartagena, Colombia.

### Referencias

- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, & Lipman DJ. 1990. Basic Local Alignment Search Tool, *Mol. Biol.* 215, 403-410.
- Arruda LK, Vailes LD, Hayden ML, Benjamn DC, & Chapman MD. 1995 Cloning of cockroach allergen, Bla g 4, identifies ligand binding proteins (or calycins) as a cause of IgE Antibody responses. *J Biol Chemistry* 270:31196-31201.
- Arruda LK, Vailes L, Platts-Mills T, Fernández-Caldas E, Montealegre F, Lin K, Chua KY, Rizzo M, Naspitz C & Chapman M. 1997. Sensitization to *Blomia tropicalis* in patients with asthma and identification of allergen Blo t 5. *Am J Resp Crit Care Med* 155:342-350.
- Banaszak L, Winter N, Xu Z, Benlohr DA, Cowan, S, & Jones, TA. 1994. Lipid-Binding proteins: A family of fatty acid and retinoid transport proteins, *Adv. Protein. Chem.* 45, 89-151.
- Bordo D. & Argos P. 1991 Suggestions for "Safe" residue substitutions in site-directed mutagenesis. *J. Mol Biol* 217:721-729.
- Caraballo L, Avjioglu A, Marrugo J, Puerta L, & Marsh D. 1996. Cloning and expression of complementary DNA coding for an allergen with common antibody binding specificities with three allergens of the house dust mite *Blomia tropicalis*. *J Allergy Clin Immunol.* 98:573-579.
- Caraballo L, Mercado D, Jimenez S, Moreno L, Puerta L, & Chua KY. 1998 Analysis of the cross-reactivity between BtM and Der p 5, two group 5 recombinant allergens from *Blomia tropicalis* and *Dermatophagoides pteronyssinus*. *Int Arch Allergy Immunol.* 117:38-45.
- Caraballo L. Puerta L, Jiménez S, Martínez B, Mercado D, Avjoiglu A, & Marsh D. 1997. Cloning and IgE Binding of a Recombinant Allergen from the Mite *Blomia tropicalis*, Homologous with Fatty Acid-Binding Proteins. *Int Arch Allergy Immunol.* 112:341-347.
- Caraballo L, Puerta L, Martínez B, & Moreno L. 1994. Identification of allergens from the mite *Blomia tropicalis*. *Clon Exp Allergy* 24:1056-1060.

- Creg JM, Vedvick TS, & Raschke WC. 1993 Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris*. *Bio/Technology* 1993;11:905-910.
- Eriksson T, Whitley P, Johansson E, van Hage-Hamsten M, & Gafvelin G. 1999. Identificación and Characterization of two allergens from the dust mite *Acarus siro*, homologous with fatty acid-binding proteins. *Int Arch Allergy Immunol* 119:275-281.
- Erikson T, Rasool O, Whitley P, Cramer R, & van Hage-Hamsten M. 2000. Cloning of two allergens from the dust mite *lepidoglyphus destructor* using phage display technology. *J Allergy Clin Immunol* 105: S229
- Fernández-Caldas E, Puerta L, Mercado D, Lockey RF, & Caraballo L. 1993. Mite fauna, Der p 1, Der f 1, and *Blomia tropicalis* allergens levels in a tropical environment. *Clin Exp Allergy* 23:292-297.
- Guex N, & Peitsch MC. 1997. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative modelinling. *Electrophoresis* 18:2714-2723.
- Jameson BA & Wolf H. 1988 The antigenic index: a novel algorithm for predicting antigenic determinants *Cabios* 4:181-186.
- Kennedy M W, Brass A, McCrudden BA., Price NC, Kelly SM, & Cooper A. 1995. The ABA-1 allergen of the parasitic nematode *Ascaris suum*: Fatty acid and retinoid binding function and structures characterization. *Biochemistry*. 34:6700-6710.
- Laskowski RA, MacArthur MW, Moss DS, & Thornton JM. 1993. PROCHECK: A program to check the stereochemical quality of protein structures. *J Appl Cryst*:26:283-291.
- Lynch NR, Thomas WR, Garcia NM, Di Prisco MC, Puccio FA, Lopez R, Hazell L, Shen HD, Lind KL, & Chua KY. 1997. Biological activity of recombinant Der p 2, der p 5 and Der p 7 allergens of the house-dust mite *Dermatophagoides pteronyssinus*. *Int Arch Allergy Immunol* 114:59-67.
- Murray V. 1989. Improved double-stranded DNA sequencing using the linear polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Res.* 17:8889
- Provencher SW, & Glockner J. 1981. Estimation of globular protein secondary structure from circular dichroism, *Biochemistry* 20: 33-37.
- Puerta L, Fernández-Caldas E, Lockey RF, & Caraballo L. 1993. IgE to six mites species in Cartagena Colombia. *J. Invest Allergology Clin Immunol* .3:198-204.
- Puerta L, Fernández-Caldas E, Mercado D, Lockey R, & Caraballo L. 1996. Sequential determinations of *Blomia tropicalis* allergens in mattress and floor dust samples in a tropical city. *J. Allergy Clin Immunol.* 97:689-691.
- Puerta L, Caraballo L, Fernández-Caldas E, Avjioglu A, Marsh D, Lockey R, & Dao M. 1996. Nucleotide sequence analysis of a cDNA coding for a *Blomia tropicalis* allergen. *Allergy Clin Immunol.* 98:932-937.
- Puerta L, Malcolm K, Jimenez S, & Caraballo L. 1999. Structural and Ligand Binding Analysis of Recombinant Blot 13 allergen from *Blomia tropicalis* mites, a Fatty Acid Binding Protein *Int Arch Allergy Immunol*:119:181-184.
- Puerta L, Jimenez S, Lagares A, & Caraballo L, 1999. High-level expression of the *Blomia tropicalis* allergen Blo t 13 in *Pichia pastoris*. *J. Allergy Clin Immunol*;103:S185)
- Rost B, & Sander C. 1994. Combining evolutionary information and natural network to predict protein secondary structure. *Proteins.* 19:55-72
- Sander C, & Schneider R. 1991. Database of homology-derived proteins structure and the structure meaning of sequence alignment, *Proteins.* 9, 56-68.
- Salcedo G, Diaz-Perales A. & Sanchez-Monge R. 1999. Fruit allergy: plant defence proteins as novel potential panallergens. *Clin Exp Allergy.* 29:1158-1160.
- Sambrook J, Fritsch F, & Maniatis T. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory 2:67-98.
- Sanjuan H, Puerta L, & Caraballo L. 1998. Expression of a *Blomia tropicalis* allergen in the yeast *Pichia pastoris*. *J Allergy Clin Immunol* 101:S155.
- Thomas WR, & Smith W. 1998. An update on allergens. House-dust-mite allergens. *Allergy* 1998;53:821-832.
- Tsai J, Wu H, Shen H, Hsu E, & Wang AS. 1998. Sensitization to *Blomia tropicalis* among asthmatic patients in Taiwan. *Int Arch Allergy Immunol* 115:144-149.
- Sakar G, & Sommer S. 1990. The "mega" Primer method of site-directed mutagenesis. *Biotechniques* 8:404-407.
- Valenta R, Hayek B, Seiberler S, Bugajska-Schretter, Niederberger V, Twardosza, Natter S, Vangelista L, Pastore A, Spitzauer S, & Kraft D. 1998. Calcium-Binding Allergens: From Plants to man. *Int Arch Allergy Immunol.* 117:160-166.
- Valenta R, Lidholm J, Niederberger V, Hayek B, Kraft D, & Gronlund H. 1999 The recombinant allergen-based concept of component-resolved diagnostics and immunotherapy (CRD and CRIT) *Clin Exp Allergy* 29:896-904.