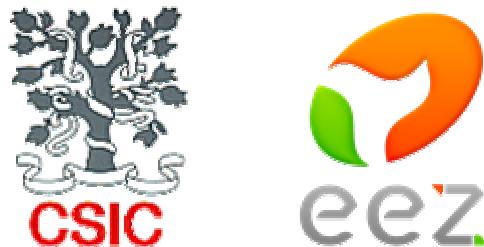


Universidad de Granada



Estación Experimental del Zaidín (CSIC)

Departamento de Bioquímica, Biología Celular y Molecular de Plantas



*Caracterización molecular del polimorfismo de las profilinas
en el polen de olivo y otras especies alergogénicas*

Tesis doctoral

José Carlos Jiménez López

Granada, 2008

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: José Carlos Jiménez López
D.L.: Gr. 894-2008
ISBN: 978-84-691-4573-9

*Caracterización molecular del polimorfismo de las profilinas
en el polen del olivo y otras especies alergogénicas*

*Memoria presentada por el Licenciado en Ciencias Biológicas
D. José Carlos Jiménez López para optar al grado de Doctor*

Fdo.: José Carlos Jiménez López

$\mathcal{V}^o \mathcal{B}^o$

Los directores de la tesis doctoral

*Fdo.: Dr. J.D Alché Ramírez
Científico titular del CSIC*

*Fdo.: Dra. M.I. Rodríguez García
Profesor de investigación del CSIC*



Este trabajo ha sido realizado en la Estación Experimental del Zaidín (CSIC), en el grupo de investigación BIOLOGÍA REPRODUCTIVA DE PLANTAS (grupo PAIDI BIO-283), gracias a la concesión de una beca predoctoral I3P-BPD-2002 del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC). El trabajo ha sido financiado a través de los proyectos de investigación BMC2000-1484 (Ministerio de Ciencia y Tecnología), BFV2004-00601/BFI y AGL2003-00179 (Ministerio de Educación y Ciencia) y HA2004-0094 (programa de acciones integradas, Ministerio de Educación y Ciencia)



*A mis padres y a mi hermana
A Mary Carmen
Por todo su cariño y apoyo*

*“La ciencia es respeto al alma lo que es la luz
respecto a los ojos, y si las raíces son amargas,
los frutos son muy dulces”*

*Aristóteles
(384 A.C.-322 A.C.) Filósofo griego*

Resumen



Las profilinas son proteínas multifuncionales y ubicuas, que están presentes en numerosos polenes. Desempeñan papeles clave en la regulación del citoesqueleto de actina y en los procesos de señalización celular. En plantas, son codificadas por familias multigénicas y presentan gran número de isoformas o variantes. Las profilinas, tienen además gran interés como alérgenos.

*La presente Tesis Doctoral analiza el polimorfismo de las profilinas en el polen del olivo (alérgeno Ole e 2) y otras cuatro especies con potencial alergogénico (*Betula pendula*, *Corylus avellana*, *Phleum pratense* y *Zea mays*). Este análisis se ha llevado a cabo mediante técnicas moleculares y celulares. Se han comparado entre sí las secuencias de profilinas obtenidas a partir del polen de una amplia representación del germoplasma del olivo (24 variedades), y de las otras 4 especies. Dichas secuencias han constituido la base de un amplio estudio in silico que incluye un análisis de la conservación de dichas secuencias, así como de la estabilidad estructural, la presencia de modificaciones postraduccionales, las características físico-químicas y la estructura 3-D de las proteínas resultantes. También se ha analizado el polimorfismo en relación con diversos parámetros implicados en el carácter alergénico, como son la presencia de modificaciones en la antigenicidad de la molécula, o de sustituciones aminoacídicas en epitopos inmunodominantes de reconocimientos por células T y B del sistema inmune humano. La presencia del polimorfismo ha sido documentada experimentalmente, constatándose la reactividad diferencial de las diferentes formas de profilinas a diversos anticuerpos.*

Finalmente, se realizó una localización de las profilinas a nivel celular mediante inmunocitoquímica a microscopía electrónica de transmisión. Algunos de los antisueros utilizados mostraron localización diferencial de estas proteínas.

En conclusión, el presente estudio constituye una amplia exploración de las características moleculares de las profilinas en el polen del olivo y su comparación con las de otras especies, que permite predecir numerosas implicaciones biológicas y clínicas. La determinación analítica de dichas implicaciones puede verse claramente facilitada por este estudio.



- β-ME** (β -mercaptoethanol): β -mercaptoetanol
- A_m** (absorbance at "m" nm): absorbancia a "m" nm
- ABPs** (Actin Binding Proteins): proteínas de unión a actina
- ADF** (Actin depolymerization factor): factor de despolimerización de actina
- ADN** (desoxyribonucleic acid): ácido desoxiribonucleico
- ADNc** (Complementary DNA): ADN complementario
- AFLPs** (Amplified fragment length polymorphism PCR): polimorfismo de la longitud de los fragmentos amplificados por PCR
- cAMP** (Cyclic adenosine monophosphate): adenosín monofosfato cíclico
- APC** (antigen-presenting cell): células presentadoras de antígenos
- APS** (ammonium persulfate): persulfato amónico
- BCIP** (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate): 5-Bromo-4-Cloro-3'-Indolfosfato
- BGMO** (Banco Mundial de Germoplasma de Olivo): Olive world germplasm bank
- BSA** (Bovine serum albumin): albúmina de suero bovino
- CaM-II** (Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinases): proteína quinasa Ca2+/calmodulina dependiente
- Cdc2 ó cdk2** (Cyclin-dependent kinases 2): quinasas dependientes de ciclinas 2
- CHAPS** (3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate): 3-(cloroamidopropil)-dimetilamonio-1-propanosulfato
- CKII/I** (Caseine kinase II/I): (Caseina quinasa II/I)
- COI** (Consejo Oleícola Internacional): The International Olive Oil Council
- CTAB** (Cetyl trimethylammonium bromide): bromuro de cetil-trimetilamonio
- Cu/Zn-SOD** (Superoxide Dismutase (Cu/Zn): cupro/cinc superóxido dismutasa
- DAB** (3,3'-Diaminobenzidine): 3,3'-diaminobencidina
- DEPC** (Diethylpyrocarbonate): dietilpirocarbonato
- DMSO** (Dimetilsulfoxide): dimetilsulfóxido

DNA (desoxyribonucleic acid): ácido desoxirribonucleico

Dnasa (desoxyribonuclease): desoxiribonucleasa

DNAPK (nuclear DNA-dependent serine/threonine protein kinase): proteína quinasa ADN nuclear dependiente

dNTP's (deoxynucleosides): desoxinucleotidos trifosfato

DPD (N,N,N',N'-tetramethyl-p-phenyldiamine): N,N,N',N'-tetrametil-p-fenildiamina

DTT (ditiotreithol): ditiotreitol

EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid): ácido etilendiaminotetracético

EELM: Estación Experimental La Mayora

EEZ: Estación Experimental del Zaidín

EGFR (epidermal growth factor receptor): receptor del factor de crecimiento epidérmico

EGTA (ethylene glycol tetraacetic acid): ácido etilen-glicol tetraacético

EMBL (European Molecular Biology Laboratorios): laboratorios de biología molecular europeos

FD (Dilution factor): factor de dilución

cGMP (Cyclic guanosine monophosphate): Guanosín monofosfato cíclico

HLA-II (Human Leucocitary Antigen-II): Antígeno leucocitario humano clase II

HPLC (High-performance liquid chromatography): Cromatografía líquida de alta resolución

IgE/G (Immunoglobulin E/G): Inmunoglobulina E/G

IL: interleucina o interleukina

INSR (insulin receptor): receptor tirosina quinasa insulina dependiente

IPTG (Isopropyl -D-1-thiogalactopyranoside): Isopropil β -D-1-tiogalactopiranósido

ISSRs (Inter-Simple Sequences Repeat): inter-secuencias simples repetidas

LB: Luria-Bertani

LTP (Lipid transfer protein): proteínas de transferencia de lípidos

MAPK (Mitogen-activated protein (MAP) kinases): Proteína quinasa activada por mitogeno

MCO (museo de la cultura del olivo): Olive Oil Museum

MHC-II (The Major Histocompatibility Complex-Class II): complejo principal de histocompatibilidad II

M-MLV RT (mouse-Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase): transcriptasa reversa del virus de la leucemia murina de Moloney

Nap1 (nck-associated protein 1): Proteína asociada a nck 1

NBT (Nitroblue tetrazolium): cloruro de nitroazul tetrazolio

Oligo dT (oligo-deoxythymidine): oligo desoxitimidina

ORF (open reading frame): marco de lectura abierto

p38MAPK (Mitogen-activated protein kinases p38): Proteína quinasa activada por mitogeno p38

PBS (Phosphate Buffered Saline Buffer): tampón fosfato salino

PCR (polymerase chain reaction): reacción en cadena de la polimerasa

pI (isoelectric point): punto isoeléctrico

PIP/PIP₂ (polyphosphoinositides phosphate/biphosphate): polifosfoinosítidos fosfato/bifosfato

PIPER (piperazine-*N,N'*-bis(2-ethanesulfonic acid)): ácido piperazin-N,N2-bis(2-etanosulfónico)

PKC/A/B (Protein kinase C/A/B): proteína quinasa C/A/B

PLP (poli-L-proline): poli-L-prolina

PMSF (phenylmethanesulphonylfluoride): fluoruro de fenilmetilsulfonilo

pre-RNAm (pre-RNA messenger): pre-ARN mensajero

PRF (profilin): profilina

PVDF (Polyvinylidene Fluoride): fluoruro de polivinilidina

PVP (polyvinyl pyrrolidone): polivinilpirrolidona

RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNA): Polimorfismo de la amplificación aleatoria de ADN

rApi g 4 (recombinant form of the Api g 4 allergen): forma recombinante del alérgeno Api g 4

rBet v 2 (recombinant form of the Bet v 2): forma recombinante del alérgeno Bet v 2

rGly m 3 (recombinant form of the rGly m 3): forma recombinante del alérgeno Glym3
RE (endoplasmic reticulum): retículo endoplasmático

RFLP (restriction fragment length polymorphism): Polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción)

RNA (ribonucleic acid): ácido ribonucleico

RNAm (RNA messenger): ARN mensajero

RNasa A (Ribonuclease A): ribonucleasa A

RT (reverse transcription): reversotranscripción

SCARs (Sequence Characterized Amplified Regions): regiones amplificadas de secuencias caracterizadas

SDS (Sodium lauryl sulfate): dodecil sulfato sódico

SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis): electroforesis en gel de poliacrilamida- dodecilsulfato sódico

SLS (Lauryl Sarcosine): N-laurilsarcosina sódica

SNP: (Single Nucleotide Polymorphisms): polimorfismo de un solo nucleótido polimorfismo en un simple nucleótido

SSAPs (Sequencence Specific Amplification Polymorphism): polimorfismo de la amplificación de secuencias específicas

SSR (single sequence repeats): repeticiones simples de secuencia

STSs (Sequence-Tagged Sites PCR): PCR de sitios marcados de la secuencia

TAE (Tris-Acetate-EDTA buffer): tris-EDTA-ácido acético glacial

TBP (tributyl phosphine): tributilfosfina

TBST (tris-buffered saline-tween): tampón tris salino tween-20

TCA (trichloroacetic acid): ácido tricloroacético

TE (tris-EDTA buffer): tampón tris-EDTA

TEM (Transmission electron microscopy): microscopía electrónica de transmisión

TEMED (N,N,N,N'-tetramethylethylenediamine): N,N,N,N'-tetra-metil-etilendiamina

TESPA (3-aminopropiltetrioxi-silane): 3-aminopropiltetrioxi-silano

Tricina (N-(Tri(hydroxymethyl)methyl)glycine): N-tri (hidroximetil) metil glicina

Tris-base (Tris(Hydroxymethyl)aminomethane): Tris (hidroximetil)-aminometano

PEG (polyethylene glycol p-(1,1,3,3-tetramethylbutyl)-phenyl ether): polietilen glicol p-(1,1,3,3-tetrametilbutil)-fenil eter ó Tritón X-100

Tween-20 (Polysorbate 20): polisorbato 20

UV (ultraviolet): ultravioleta

VNTR (variable number tandem repeats): número variable de repeticiones consecutivas

VCP (valosine-containing protein): proteína conteniendo valosina

VASP (Vasodilator-stimulated phosphoprotein): Ena/vasodilatador estimulado por fosfoproteína

X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside): 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranósido



Apéndices

Agradecimientos

Resumen

Lista de abreviaturas

Índice

1. Introducción

- 1.1. Profilinas. Generalidades
- 1.2. Características moleculares que definen a las profilinas
- 1.3. Co-evolución molecular de actina, profilinas y otras ABPs
- 1.4. Diversidad de isoformas. Procesamiento postrascripcional y postraduccional de profilinas
- 1.5. Estructura 3D de las profilinas
- 1.6. Dominios funcionales de las profilinas
- 1.7. La interacción de profilinas con sus ligandos rige sus funciones
- 1.8. Localización celular de profilinas
- 1.9. Profilinas y alergia
- 1.10. Motivos estructurales de las profilinas implicados en la alergia
- 1.11. El olivo como material de estudio
- 1.12. Proteínas alergénicas en el polen de *Olea europaea*
- 1.13. Profilinas en el polen de *Olea europaea*

2. Tesis a Plantear y Objetivos

3. Materiales y Métodos

- 3.1. Material vegetal

Polen

Hojas jóvenes de olivo

Semillas de olivo

3.2. Métodos

3.2.1. Análisis de ácidos nucleicos

- A. Extracción de ARN total
- B. Extracción de ADN genómico a partir de hojas
- C. RT-PCR de secuencias de profilinas
- D. Análisis de los productos de amplificación mediante electroforesis en geles de agarosa
- E. Clonación y secuenciación de productos de PCR

3.2.2 Herramientas bioinformáticas

- A. Análisis de la identidad de las secuencias de profilinas
- B. Análisis de la variabilidad de las secuencias de las profilinas
- C. Análisis de las características físico-químicas de profilinas
- D. Análisis de los motivos para posibles modificaciones postraduccionales
- E. Predicción de la estructura bidimensional de las profilinas
- F. Predicción de la estructura tridimensional de las profilinas
- G. Predicción de la formación de puentes disulfuro en las profilinas
- H. Análisis de los picos de antigenicidad elevada de las profilinas
- I. Predicción y análisis de los residuos de anclaje para los alelos del complejo principal de histocompatibilidad clase II. Receptores de células T
- J. Construcción y análisis de epitopos conformacionales
- K. Predicción de la localización celular de profilinas

3.2.3 Análisis estadísticos

3.2.4 Análisis de proteínas

- A. Extracción de proteínas totales para SDS-PAGE
- B. Extracción de proteínas totales de polen maduro para electroforesis bidimensional (2D)
- C. Valoración de la concentración de proteínas por el método de Bradford

- D. Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)
- E. Electroforesis bidimensional o 2D en geles de poliacrilamida
- F. Transferencia de geles SDS-PAGE a membranas de PVDF
- G. Detección de proteínas mediante Inmunoblot
- H. Revelado de la actividad fosfatasa alcalina mediante NBT/BCIP
- I. Detección de glicoproteínas con concanavalina A sobre membranas
- J. Germinación de polen del olivo
- K. Expresión y purificación de proteínas recombinantes

3.2.5 Estudios celulares

- A. Preparación de muestras para microscopía electrónica de transmisión
- B. Obtención de secciones
- C. Inmunocitoquímica para microscopía electrónica de transmisión

4. Resultados

- 4.1 Obtención de un número significativo de secuencias de profilinas a partir de polen maduro de *Olea europaea* L. de una amplia muestra del germoplasma de esta planta, así como de otras especies vegetales con extensa distribución y con relevancia alergogénica.
- 4.2 Caracterización estructural de las secuencias obtenidas mediante su análisis bioinformático, determinando la extensión del polimorfismo
 - 4.2.1. Análisis de la estructural primaria
 - 4.2.2. Análisis de la conservación nucleotídica y aminoacídica de las secuencias obtenidas
 - A) Determinación del porcentaje de identidad y número de sustituciones
 - B) Análisis de diagramas de entropía y variabilidad
 - 4.2.3. Predicción y análisis de la estructura 2D de profilinas
 - 4.2.4. Análisis de la conservación nucleotídica y aminoacídica
 - 4.2.5. Predicción y análisis de la estructura 3D de profilinas
 - 4.2.6. Análisis teórico de las propiedades físico-químicas de las profilinas

4.2.7. Análisis filogenético de las profilinas

4.3 Predicción de la influencia del polimorfismo sobre la estructura 3D, la función biológica y la interacción con diversos ligandos

4.3.1. Residuos implicados en el mantenimiento de la estructura 3D

4.3.2. Predicción y análisis de la estructura primaria de las profilinas. Divergencia en el número de cisteínas

4.3.3. Residuos implicados en la interacción de las profilinas con actina

4.3.4. Residuos implicados en la interacción de las profilinas con proteínas ricas en motivos de prolina

4.3.5. Residuos implicados en la interacción de las profilinas con polifosfoinosítidos

4.3.6. Residuos con un papel potencial en la función-regulación

4.3.7. Predicción de la localización celular de las profilinas

4.4 Análisis in silico la influencia del polimorfismo intraespecífico de las profilinas del olivo sobre su carácter alergénico y sobre la presencia de reacciones cruzadas con diferentes especies

4.4.1. Predicción de los perfiles de antigenicidad

4.4.2. Análisis de las regiones epitópicas inmunodominantes de reconocimiento por IgG e IgE (epitopos de células B)

4.4.3. Análisis de las regiones de anclaje para los alelos de MHC clase II (complejo principal de histocompatibilidad, clase II). Receptores de células T que median en la alergenicidad cruzada

4.4.4. Predicción de la localización epitópica en los modelos 3D y construcción de epitopos conformacionales de profilinas

4.5 Caracterización preliminar de la expresión y la reactividad diferencial de las profilinas de polen de *Olea europaea* y de otras especies, frente a sueros anti-profilinas, y establecimiento de su localización celular

- 4.5.1. Expresión de profilina (Ole e 2) en polen maduro de distintas variedades de olivo
- 4.5.2. Expresión de las profilinas Bet v 2 (*Betula pendula*), Cor a 2 (*Corylus avellana*), Phl p 12 (*Phleum pratense*) y Zm 12 (*Zea mays*)
- 4.5.3. Caracterización del número de isoformas de profilina (Ole e 2) mediante electroforesis 2D en polen de olivo
- 4.5.4. Caracterización del estado de glicosilación de isoformas de profilina (Ole e 2) mediante electroforesis 2D en polen de olivo
- 4.5.5. Estudio preliminar de la expresión de profilinas de *Olea europaea* durante la germinación del polen
- 4.5.6. Análisis de la reactividad cruzada entre profilinas vegetativas y reproductivas
- 4.5.7. Localización celular de profilinas
- 4.5.8. Expresión y purificación de proteínas recombinantes

5. Discusión

6. Conclusiones

7. Bibliografía

9. Summary

10. Thesis approach & Objectives

11. Results and discussion summary

12. Conclusions

INTRODUCCIÓN

1.1. Profilinas. Generalidades

Las profilinas son proteínas pequeñas (11-18 kDa) y ubicuas, que se encuentran en células animales, vegetales, levaduras, protozoos e incluso en virus (Witke *et al.* 2001).

Son proteínas solubles y multifuncionales (Haarer *et al.* 1990), implicadas en el comportamiento y dinámica del citoesqueleto celular (Staiger & Blanchoin 2006).

Aunque la estructura primaria de estas proteínas presenta diversas modificaciones, en general su estructura terciaria está altamente conservada, incluso entre diferentes reinos (Schutt *et al.* 1993; Vinson *et al.* 1993; Federov *et al.* 1994, 1997).

Las profilinas fueron descritas por primera vez como proteínas de unión a actina en bazo de ternera (Carlsson *et al.* 1977). En plantas fueron identificados por primera vez en polen de abedul (*Betula pendula*), descubriendose su carácter alergénico en humanos (Valenta *et al.* 1991). Su existencia en plantas ha sido establecida tanto en monocotiledóneas como *Zea mays* (Staiger *et al.* 1993), *Triticum aestivum* (Rihs *et al.* 1994) y *Lilium longiflorum* (Vidali & Hepler 1997), y en dicotiledóneas como *Arabidopsis thaliana* (Christensen *et al.* 1996; Huang *et al.* 1996), *Nicotiana tabacum* (Mittermann *et al.* 1995; Swoboda *et al.* 2001), *Lycopersicum esculentum* (Yu *et al.* 1998), *Phaseolus vulgaris* (Vidali *et al.* 1995; Guillen *et al.* 1999) y *Ricinus communis* (Schobert *et al.* 2000).

Las profilinas forman parte de familias multigénicas en plantas superiores con diferentes patrones de expresión dependiendo del tipo de tejido y del estado de desarrollo (Staiger *et al.* 1993; Kandasamy *et al.* 2002). En *Arabidopsis*, la familia de profilinas comprende hasta 10 miembros (Ren & Xiang 2007), y en maíz se estima que existen 6 isoformas, de las cuales al menos 3 se expresan en polen (Staiger *et al.* 1993).

Se han descrito numerosas isoformas de profilinas (Lambrechts *et al.* 2000), que regulan el crecimiento celular y morfogénesis en plantas, mediante la organización del citoesqueleto de actina (Ramachandran 2000; Staiger 2000). La fosforilación de residuos de treonina, tirosina o serina incrementa la diversidad de estas proteínas, constituyendo además una de las formas en que son reguladas (Singh *et al.* 1996; Guillen *et al.* 1999; Limmongkon *et al.* 2004).

Su función depende del tipo celular en que se encuentren, describiéndose numerosos patrones diferenciales de expresión en los diferentes órganos y tejidos vegetales, así como de expresión temporal a lo largo del desarrollo de éstos (Huang *et al.* 1998; Kandasamy *et al.* 2002).

Las profilinas de plantas pueden clasificarse inicialmente en profilinas vegetativas o esporofíticas y profilinas reproductivas o gametofíticas. Ambas son reguladas de forma diferencial (Kandasamy *et al.* 2002), llegando a encontrarse hasta un 27% de diferencias en la secuencia de aminoácidos (Huang *et al.*, 1996).

Las profilinas son proteínas que juegan un papel relevante en la organización del citoesqueleto de actina en células eucariotas (Baluska & Volkmann 2002). Constituyen uno de los tipos principales de proteínas de unión a actina ("Actin Binding Proteins" o ABPs) (Itoh & Takenawa 2001).

Pueden tener un efecto activador o inhibidor sobre la polimerización de dicha actina (Theriot & Mitchison 1993; Yarmola *et al.* 2006), contribuyendo a la dinámica de la arquitectura del citoesqueleto de las células vegetales. Así, las profilinas pueden promover o inhibir el ensamblaje de filamentos de actina, dependiendo de la relación profilina/G-actina (actina monomérica), de las condiciones iónicas y de la presencia y actividad de otras proteínas de tipo ABPs (Pantaloni & Carlier 1993; Staiger *et al.* 1997; Gibbon & Staiger 2000, Gibbon 2001). Su capacidad de unión a actina ha sido demostrada *in vitro* (Valenta *et al.* 1993; Staiger *et al.* 1997), así como mediante experimentos de microinyección *in vivo* (Cao *et al.* 1992; Staiger *et al.* 1994; Gibbon *et al.* 1997; Valster *et al.* 1997). Además, las profilinas pueden actuar como reguladores de las rutas de transmisión de señales dependientes de AMPc, debido a su capacidad de interacción tanto con fosfatidilinositol 4, 5 bifosfato como con secuencias ricas en poli L-prolina (PLP), presentes en la secuencia aminoacídica de numerosos ligandos naturales (Metzler *et al.* 1994; Gibbon *et al.* 1998; Kovar *et al.* 2001). Por ello, se considera un posible nexo de unión entre el exterior celular y el citoesqueleto de actina (Volkmann & Baluska 1999, Baluska *et al.* 2001), mediante la transmisión de la señales

a través de la membrana plasmática (Gibbon & Staiger 2000). Las profilinas también parecen estar implicadas en el tráfico de vesículas entre el retículo endoplasmático (RE) y las cisternas trans del aparato de Golgi, así como en los procesos de endocitosis y exocitosis (Witke *et al.* 2004).

1.2. Caracterización molecular que define a las profilinas

La distribución taxonómica de profilinas es muy amplia, ya que de las 227 secuencias de profilinas que se recogen en la base de datos PIR (Protein Information Resource): recursos para la información de proteínas, <http://pir.georgetown.edu/>, se distribuyen en: 207 están presentes en eucariotas (3 *Acanthamoebidae*, 1 *Alveolata*, 21 *Entamoebidae*, 53 *Metazoa*, 1 *Heterolobosea*, 8 *Mycetozoa*, 118 *Viridiplantae*) y 19 en virus (*Poxviridae*). No se han descrito profilinas en bacterias.

Tamaño de profilinas: existe una variedad de tamaños de profilinas, que pueden ir desde 124 aminoácidos (isoforma 2 de *Dictyostelium discoideum*, P26200) hasta 168 aminoácidos (*Arabidopsis thaliana*, Q8H123), siendo el tamaño más frecuente de 132 aminoácidos.

La identidad de las secuencias de las profilinas procedentes de organismos de distintos reinos, desde virus hasta mamíferos, es relativamente baja (en torno al 20% si se comparan por ejemplo profilinas de virus y humanas). La secuencia aminoacídica consenso que define a una profilina, se basa en los residuos relativamente bien conservados de la región N-terminal, involucrados en la interacción con la actina (Haarer *et al.* 1990; Sohn & Goldschmidt-Clermont 1994):



siendo x cualquier aminoácido. Entre corchetes se indican los residuos aceptables para una posición concreta. Los números 0 y 1 indican la frecuencia absoluta del residuo X (0: ausente, 1: presente).

1.3. Co-evolución molecular de actina, profilinas y otras ABPs

La macroevolución de las estructuras de plantas está ligada a la evolución molecular de los genes de actina. La actina está codificada por una familia de genes relativamente antigua y diversa, cuya filogenia fue iniciada con la aparición de las primeras plantas vasculares (Meagher *et al.* 1994, 1995). La temprana divergencia en esta familia de genes dio como resultado dos clases separadas de actinas: vegetativas y reproductivas, según sea su expresión predominante (McDowell *et al.* 1996). Estas clases han evolucionado y se han diversificado en dos grupos separados, como se muestra en la Fig. 1 (Meagher *et al.* 1999).

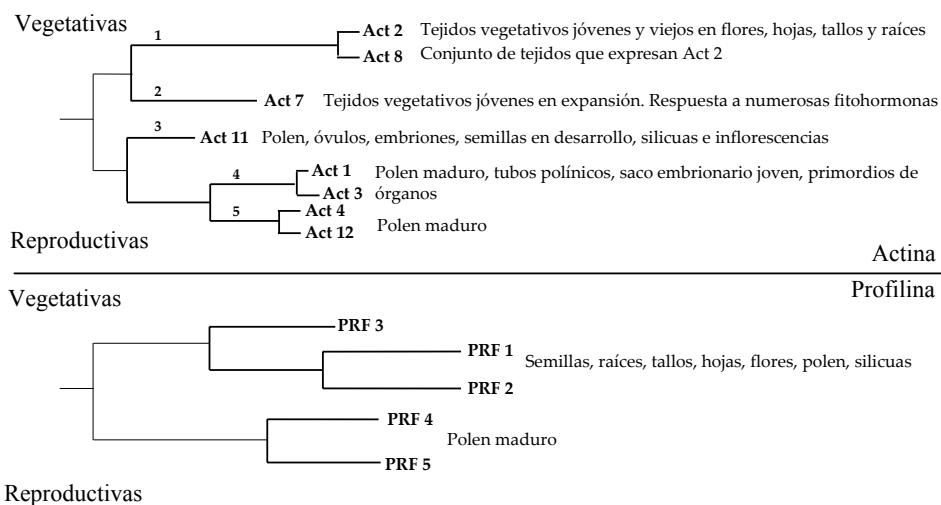


Figura 1. Esquema de la divergencia de los miembros de la familia de actina y profilina en dos antiguas clases de proteínas, basado en el esquema de Meagher *et al.* (1999)

En *Arabidopsis*, ocho de los diez genes identificados se expresan diferencialmente (Huang *et al.* 1996, 1997). Cada gen de actina muestra una variabilidad significativa, dependiente del tejido y del estadio de desarrollo. Las actinas vegetativas y reproductivas (las cuales difieren entre un 4 a un 7 % de su secuencia de aminoácidos) poseen diferentes propiedades bioquímicas (Meagher *et al.* 2003), y ello multiplica las posibles interacciones con las más de 70 proteínas ABPs descritas hasta ahora (Pollard *et al.* 2001). La razón de la existencia de ese elevado número de ABPs es que la

adecuada función del citoesqueleto a lo largo de la escala evolutiva ha requerido que las ABPs sigan una co-evolución y adaptación paralela a la de la actina, incrementando igualmente su variabilidad estructural y funcional. Algunos ejemplos de proteínas que regulan la dinámica del citoesqueleto celular se pueden observar en la Tabla 1.

Tabla 1. Ejemplos de proteínas ABPs codificadas por clases de genes vegetativos y reproductivos, basado en el esquema de Meagher *et al.* (1999). factor de despolimerización de actina (Actin Despolymerization Factor o ADF).

Proteínas del citoesqueleto codificadas por genes vegetativos y reproductivos				
Proteína	Organismo	Vegetativas	Reproductivas	Referencias
Actina	Arabidopsis	Act 2, 7 y 8	ACT 1, 3, 4, 11 y 12	An Y.Q. et al. (1996), Huang, S. et al. (1996, 1997), McDowell J.M. et al. (1996)
Profilina	Arabidopsis	PRF1, PRF2 y PRF3	PRF4 y 5	Christensen H.E.M. et al. (1996)
Profilina	Maíz	PRF4	PRF 1, 2 y 3	Gibbon B.C. et al. (1997), Staiger C.J. et al. (1993, 1997)
ADF	Arabidopsis	ADF3	ADF1 y 2	Jiang C.J. et al. (1997), Lopez I. et al. (1996)

1.4. Diversidad de isoformas. Procesamiento postrascripcional y postraduccional de profilinas

La evolución de los genes que integran y controlan el citoesqueleto (especialmente actina y ABPs) puede explicarse por la generación y fijación en el genoma de los distintos organismos de mutaciones acumuladas, incluyendo duplicaciones génicas, delecciones, sustituciones, etc... Es conocido que las duplicaciones juegan un papel central en la evolución (Nei 1987). En *Phaseolus vulgaris* y en *Arabidopsis thaliana* (McDowell 1996, McKinney 1998) se ha demostrado que un incremento relativamente reciente en la ploidía, probablemente generó diversos genes de actina relacionados entre sí (Hightower 1985, 1986). En *Petunia hybrida*, las duplicaciones en tandem dieron lugar a docenas de genes de actina (McLean 1990; Baird 1987).

Además de la generación de mutaciones que explicarían la evolución molecular, existen diversos mecanismos que permiten explicar la generación de diversidad funcional adicional en las profilinas. Algunos de esos mecanismos incluyen el *splicing*

alternativo de los ARNm mediante el que se eliminan intrones y la generación de modificaciones postraduccionales (esencialmente fosforilaciones).

1.4.1. Procesamiento de profilinas a nivel postranscripcional

Los ARNm transcritos de profilina pueden sufrir *splicing alternativo*, lo que conduce a la formación de múltiples productos. Existen muchos ejemplos de este tipo de procesamiento postranscripcional. Uno de ellos es el del transcripto del gen correspondiente a la isoforma 2 de la profilina de ratón, que puede generar tanto la isoforma 2 como la 2B. Este fenómeno se produce mediante *splicing alternativo* finamente regulado en tejidos específicos (Lambrechts *et al.* 2000). La isoforma 2B es una “versión” de profilina con 32 aminoácidos menos en la región C-terminal, y posee un patrón de expresión diferencial, así como propiedades bioquímicas diferentes que la isoforma 2 (igual capacidad de unir actina, pero menor capacidad de unión a poli-L-prolina, fosfoinosítidos y otros ligandos) (Di Nardo *et al.* 2000; Lambrechts *et al.* 2000).

1.4.2. Procesamiento de profilinas a nivel postraduccional

La forma más relevante de procesamiento postraduccional descrita en la literatura en relación a profilinas es la fosforilación de residuos de treonina, tirosina y serina por varias proteínas quinasas:

A) Las profilinas puede ser fosforiladas por la proteína pp60^{c-srs} (De Corte *et al.* 1997), que es una proteína tirosina quinasa, no receptora unida a membrana (Superti-Furga & Courtneidge 1995), que juega un papel importante en el control de la división celular (Taylor & Shalloway 1996), expansión y diferenciación celular (Cooper & Howell 1993). También puede ser un regulador adicional del citoesqueleto de actina, a través de la fosforilación de tirosinas mediante fosfoinositol 4, 5 bifosfato (PI_{4,5}P₂) (Goldschmidt-Clermont *et al.* 1990).

B) La proteína quinasa C (PKC), cuya actividad es estimulada por fosfatidilinositol bifosfato (PIP₂) (Singh *et al.* 1996), lleva a cabo la fosforilación de las profilinas en la serina 137 del carboxilo terminal (Vemuri 2001). Dicha fosforilación sólo fue observada

en presencia de fosfoinosítidos como fosfatidilserina y diacilglicerol, cuya activación mostraba una preferencia por distintas formas de este lípido, PI₄P > PI_{4,5}P₂> PI (Esta forma no produce activación).

C) Las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK) fosforilan específicamente residuos de Ser/Thr durante la división celular, conocidas como proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK). Estas proteínas son unas de las principales reguladoras de la ruta de proliferación y diferenciación celular, así como lo son los efectores de los procesos de estrés en la célula (Bögre *et al.* 1999, 2000, Limmongkon *et al.* 2004). Las MAPKs p45Ntf4 y SIPK se expresan en granos de polen de tabaco durante su rehidratación (Wilson *et al.* 1997; Voronin *et al.* 2004). Una vez que el polen llega al estigma y entra en contacto con él, se hidrata y tiene lugar una reorganización del citoesqueleto de actina, que implica a una serie de proteínas ABPs tales como las profilinas (Pollard *et al.* 2001). La mayoría de las profilinas de plantas muestran el motivo P-X-T-P, que es reconocido por MAPKs para llevar a cabo su fosforilación (Pearson *et al.* 2001). Este motivo no está presente en profilinas de mamíferos o levaduras. Además las plantas contienen otro motivo de interacción con quinasas denominado KIM (*Kinase Interaction motive*), cuya secuencia es IQGEAGAVIRGKKGSIGIITIK, y que también interacciona con un gran número de MAPKs (Sharrocks *et al.* 2000).

1.5. Estructura 3D de las profilinas

En la base de datos Uniprot (<http://www.ebi.uniprot.org/>), se encuentran depositadas las estructuras 3D de diversas profilinas, determinadas mediante cristalografía de rayos X. Si analizamos la estructura comparando los carbonos alfa (C_α), se observa que es muy similar en todos los casos, con algunas pequeñas diferencias. Estas profilinas provienen de animales tales como el *Homo sapiens* (Metzler *et al.* 1995; Mahoney *et al.* 1997, 1998), *Bos taurus* (Cedergren-Zeppezauer *et al.* 1994), y de plantas tales como *Arabidopsis thaliana* (Thorn *et al.* 1997), *Hevea brasiliensis* (Fedorov *et al.* 2000) y *Betula*

pendula (Fedorov *et al.* 1997). En levaduras se han encontrado entre otras, en la especie *Saccharomyces cerevisiae* (Eads *et al.* 1998), así como en protozoos tal como *Acanthamoeba castellanii* (Fedorov *et al.* 1994, Vinson *et al.* 1993).

La estructura 3D de las profilinas consta de un núcleo central formado por 7 láminas β (S1–S7), flanqueadas en una cara por dos α -hélices (H1 que comprende el extremo N-terminal y H4 el extremo C-terminal), y por otras dos α -hélices cortas (H2 y H3) en la otra cara de su estructura, así como pequeños giros β . El dominio hidrofóbico principal de las profilinas se encuentra en una cara de la lámina β central, y está compuesto por las α -hélices H2 y H3, y las láminas β S3 y S4 en el interior (Fig. 2).

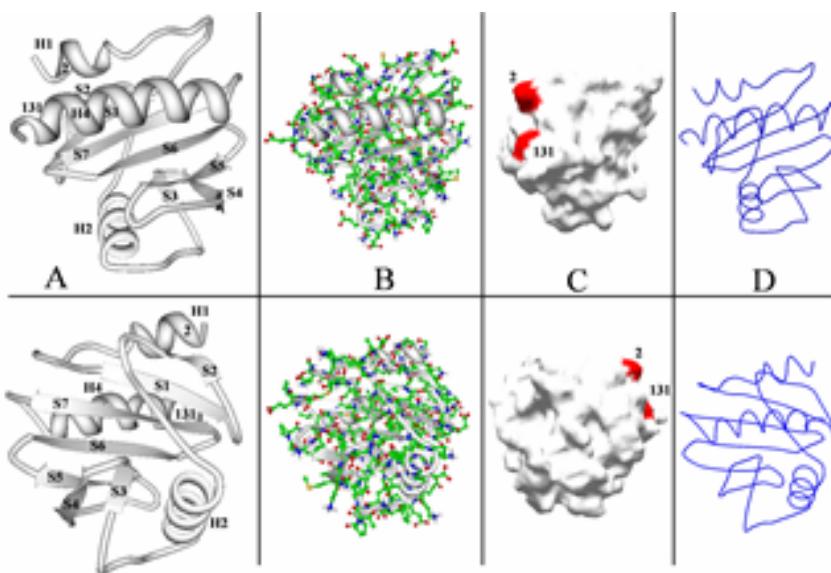


Figura 2. Estructura de profilina de *Arabidopsis thaliana* (modelo 1A0K). A) Diagrama de cintas de la estructura de la profilina I de *Arabidopsis*. Los elementos de la estructura secundaria están clasificados en α hélices (H1, H2 y H4) y láminas β (S1–S7). B) Representación de los enlaces peptídicos y los radicales aminoacídicos sobre el modelo de cintas. C) Representación de la superficie de la profilina. En rojo se muestran los aminoácidos 2 y 131 de la secuencia. D) Modelos de líneas para representar el esqueleto carbonado de la profilinas. Las estructuras fueron generadas mediante el uso de los programas DeepView/ Swiss-Pdb Viewer v3.7 y PDB proteinWorkshop v1.5

Esta estructura particular de las profilinas depende esencialmente de la distribución de residuos aromáticos, que difiere de la observada normalmente en otras proteínas solubles. En el caso de las profilinas, la mayoría de ellos están accesibles al solvente,

contribuyendo a la alta proporción de superficie no polar de estas proteínas (59% calculada según Lee & Richards 1971). El corazón principal está compuesto por los residuos A20, V22, V30, A33, F39, I42, V47, L63, L65, L77, M85, L87, I100, V102, L109, L111 y M 113. Un segundo motivo hidrofóbico pequeño está presente en la cara asociada con las α -hélices amino y carboxilo terminal.

1.6. Dominios funcionales de las profilinas

La unión de la profilina con sus ligandos es un proceso dinámico, regulado por interacciones competitivas y por interacciones alostéricas, que unen/liberan a los ligandos bajo condiciones fisiológicas. A pesar de la gran heterogeneidad de los ligandos que interactúan con las profilinas, bien directamente o como parte de grandes complejos, los sitios o aminoácidos que intervienen en dichas uniones parecen estar bien conservados.

1.6.1. Interacción con actina

El dominio de profilinas que interacciona con actina fue determinado inicialmente en la profilina de *Bos taurus* (Schutt *et al.* 1994). Este dominio es el menos conservado estructuralmente entre profilinas de distintos reinos. Está formado por las caras de las láminas β S4, S5 y S6 y por la α -hélice situada en el extremo C-terminal (H4). Estudios realizados en la estructura cristalina de la isoforma I de profilina de *Arabidopsis thaliana* (Thorn *et al.* 1997), han permitido determinar exactamente los residuos aminoacídicos que intervienen en la interacción entre la profilina y la β -actina. Aunque numerosos residuos están implicados en la interacción, los más significativos se muestran representados en la Fig. 3.

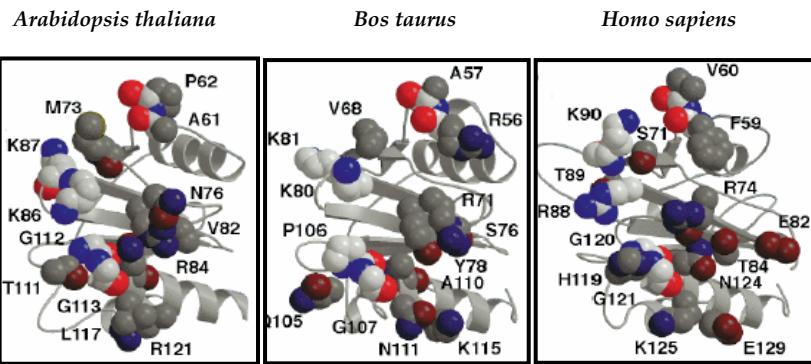
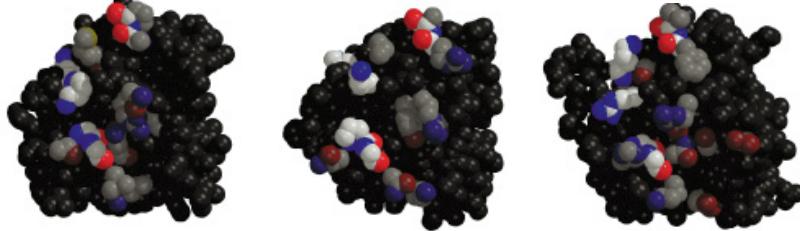
A**B**

Figura 3. Modelos 3D de diversas profilinas, donde se representan A) con modelo de cintas, donde se han resaltado los residuos implicados en la interacción con actina y B) superficies de van der Waals, donde los residuos más conservados (A61, P62, Y86, L87, G113, G119, en *Arabidopsis*) implicados en dicha interacción con actina. En ambos casos, los residuos implicados en dicho contacto se han resaltado mediante el modelo CPK (Schafmeister 1990), donde los átomos se representan con un color determinado: C es gris, O es rojo, N es azul y H es blanco. Modelos generados mediante los programas MOLSCRIPT y RASTER 3D (Thorn *et al.* 1997).

1.6.2. Interacción con fosfoinosítidos

La interacción entre las moléculas de profilina y fosfoinosítidos ha sido analizada por diversos autores (Lassing & Lindberg en 1985; Bjorkegren *et al.* 1993, Schutt *et al.* 1993, Archer *et al.* 1994 y Metzler *et al.* 1994). Se ha determinado que existen dos regiones en profilinas de mamíferos que median las interacciones electrostáticas con lípidos derivados del fosfatidilinositol. Una de ellas se localiza cerca del sitio de unión con poli-L-prolina (Schluter *et al.* 1997) y está formada por los aminoácidos W3, D8, K124, R134, R135. El resto del dominio de interacción se encuentra situado en uno de los giros β característicos de profilinas de plantas, solapando parcialmente con la superficie de interacción con la β -actina y está formada por los aminoácidos K70, R75, R89, K91 (Skare & Karlsson 2002) (Fig. 4). Los fosfoinosítidos que interaccionaban con las

profilinas son el PI_{4,5}P₂, PI_{3,5}P₂, PI_{3,4,5}P₃ y PI₃P, siendo los tres últimos los de mayor afinidad por ellas.

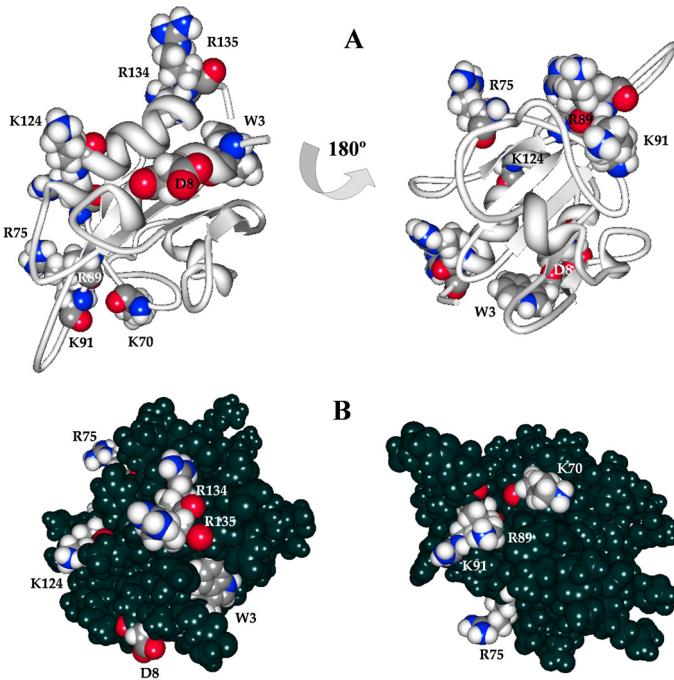


Figura 4. Modelo 3D de la profilina humana I (1PFL) (Metzler *et al.* 1995). A) Modelo de cintas en el que se han resaltado los residuos implicados en la interacción con PIP, y B) superficies de van der Waals. En ambos casos los residuos implicados en dicho contacto se han resaltado mediante el modelo CPK (Schafmeister 1990), donde los átomos se representan con un color determinado: C es gris, O es rojo, N es azul y H es blanco. Modelos generados mediante el programa MBT ProteinWorkshop .

1.6.3. Interacción con poli-L-prolina

Las propiedades de la interacción de profilinas con PLP fueron documentadas inicialmente por Kaiser *et al.* 1989 y Metzler *et al.* 1994, 1995 en la profilina I humana. Es un dominio dominio presente en todas las profilinas y que además, está altamente conservado. La presencia de este dominio fue posteriormente confirmada en otras especies, con la excepción de profilinas de virus (Machesky *et al.* 1994).

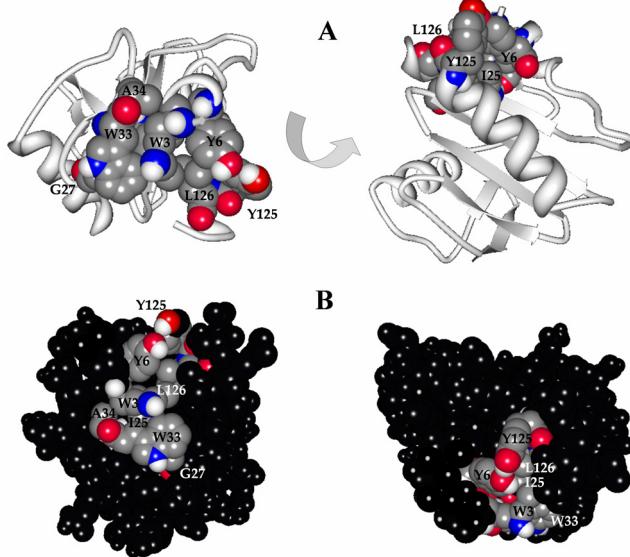


Figura 5. Modelo 3D de la profilina de *Arabidopsis thaliana* (1A0K). A) En el modelo de cintas, se han resaltado los residuos implicados en la interacción con PLP y B) superficies de van der Waals. En ambos casos los residuos implicados en dicho contacto se han resaltado mediante el modelo CPK (Schafmeister 1990), donde los átomos se representan con un color determinado: C es gris, O es rojo, N es azul y H es blanco. Modelos generados mediante el programa MBT ProteinWorkshop.

Este dominio se localiza en las hélices α (H1 y H4) de los extremos N y C terminal. En la región N terminal intervienen una serie de residuos como son W3, Y6, I25, G27, W33 y A34. Por otro lado, en la región C terminal intervienen los aminoácidos, Y125 y I126 (Fig. 5) (Thorn *et al.* 1997). Estos dominios consisten en un motivo definido por residuos aromáticos espaciados, que proporcionan también la capacidad de interaccionar con otras proteínas que poseen motivos de poliprolina (entre 5 y 10 prolinas consecutivas) (Lindberg *et al.* 1988; Metzler *et al.* 1994; Lambrechts *et al.* 1995), o de tipo YPPX, donde Y puede ser prolina, glicina ó alanina, y X cualquier aminoácido hidrofóbico (Witke *et al.* 1998).

1.7. La interacción de profilinas con sus ligandos rige sus funciones

Las profilinas desarrollan diversas funciones, que en la mayor parte de los casos depende de su capacidad de unión e interacción con sus numerosos ligandos naturales. Muchos de los estudios realizados han sido llevados a cabo en mamíferos,

especialmente en tejidos neuronales (revisión de Witke 2004), pero es previsible una funcionalidad común en la mayoría de los casos. Las funciones esenciales realizadas por las profilinas se engloban en los siguientes apartados:

1.7.1. Modulación del citoesqueleto de actina

El citoesqueleto de actina es un componente vital para muchos procesos celulares en eucariotas, incluyendo la expansión y movilidad celular (Stossel 1993), endo y exocitosis (Perrin *et al.* 1992), citocinesis (Sanger *et al.* 1989) y determinación de la forma celular (Small 1988). La actina puede presentarse en dos formas: la actina globular (G-actina) o monomérica, que puede ensamblarse, dando lugar a la actina filamentosa (F-actina) (Fig.6).

Sobre la base del patrón morfológico en forma de puntas de flecha creado cuando la miosina se une a la F-actina, el extremo de crecimiento rápido de los filamentos se denomina “extremo en lengüeta”, mientras que el extremo de crecimiento lento se denomina “extremo en punta”. Los filamentos de actina se extienden cuando se añaden monómeros de ATP-actina al “extremo en lengüeta” (Fig.6A). Cuando el filamento envejece, el ATP es hidrolizado, liberándose fosfato, y los filamentos (formados por ADP-actina) son desensamblados a través del “extremo en punta”, del que se liberan monómeros ADP-actina. Estos monómeros ADP-actina pueden sufrir un cambio de nucleótido.

Las profilinas forman parte de las diversas proteínas capaces de interaccionar con los monómeros de actina (Fig. 6B). Las profilinas tienen una mayor afinidad para unirse a ATP-G-actina ($K_d = 0.1 \mu M$) que a ADP-G-actina ($K_d = 0.5 \mu M$). Por esta razón las profilinas pueden causar la despolimerización de los filamentos de actina (Pollard & Cooper 1984; Pantaloni & Carlier 1993) en presencia de complejos ATP-actina, catalizando el cambio de nucleótido (Becker 2006; Romero *et al.* 2007). Cuando la profilina se encuentra unida a monómeros de actina, se inhibe la nucleación espontánea de los filamentos y, en ausencia de extremos “en lengüeta” de actina libres (Fig. 6C), funciona como una proteína secuestradora de monómeros. Sin embargo, cuando existen

extremos “en lengüeta” de actina libres (Fig. 6D), las profilinas promueven el ensamblaje de filamentos de actina, aunque algunos trabajos cuestionan la existencia de esta última actividad en plantas (Kovar et al., 2000). Estas dos actividades juntas sugieren que el papel de la profilina en las células es recargar los monómeros ADP-actina con ATP y dirigirlos hacia su ensamblaje en los extremos “en lengüeta” de actina libres (Paavilainen *et al.* 2004). De esta forma, contribuyen a la dinámica del citoesqueleto y a los procesos celulares dependientes de actina.

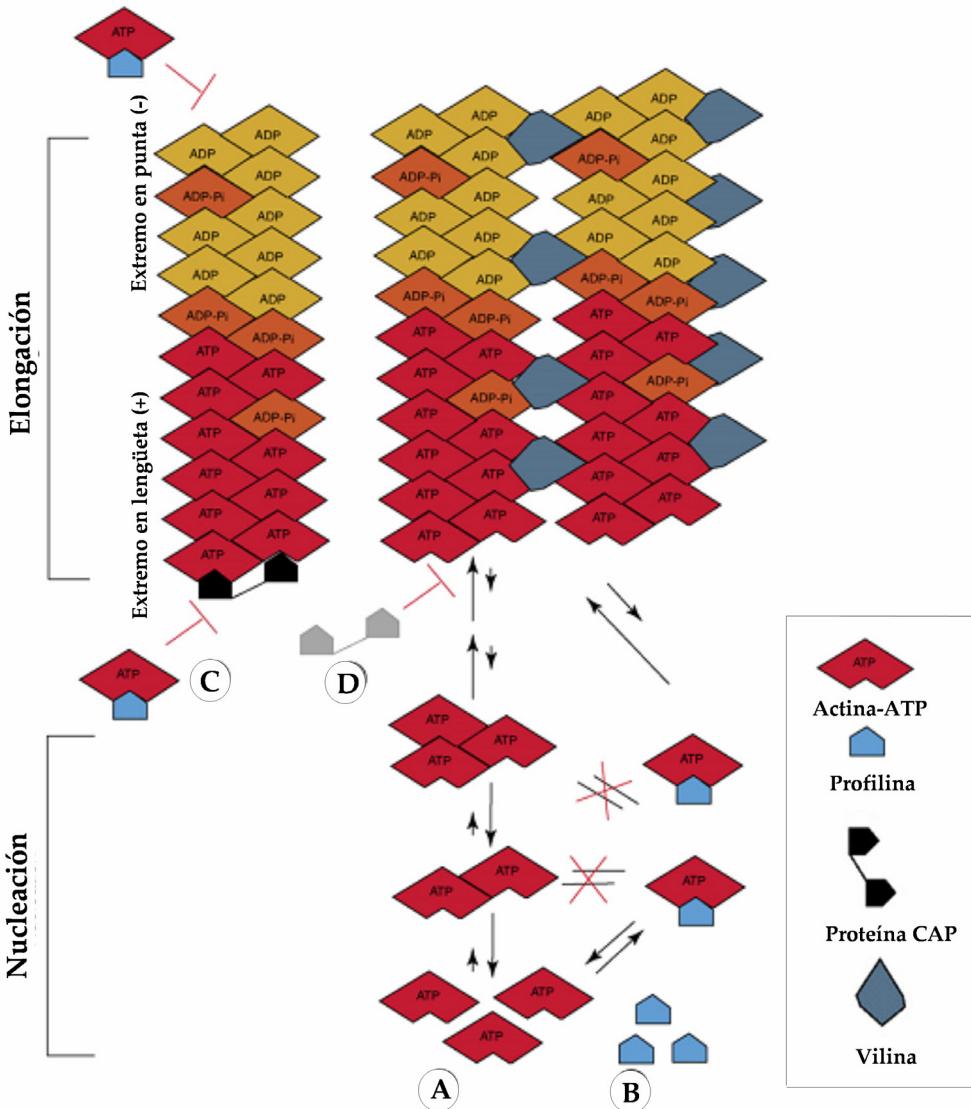


Figura 6. Control de la dinámica de actina en plantas. Esquema basado en Staiger & Blanchoin 2006

1.7.2. Señalización celular

En las células eucariotas existe una compleja red de vías de transducción de señales, cuya función es transmitir las señales de los receptores de la superficie celular al interior de la célula (Volkmann & Baluska 1999). Las profilinas constituyen el nexo de unión de estas vías de señalización con el citoesqueleto de actina, ya que son capaces de interactuar tanto con fosfoinosítidos como con proteínas con dominios ricos en prolina, y ambos tipos de moléculas están presentes en diversas cascadas de transducción de señales (Verheyen & Cooley, 1994; Witke *et al.* 1993). Una posible vía de esa interacción es a través de la disociación de complejos actina-profilina, causada por la unión de fosfoinosítidos como el PI_{4,5}P₂ con profilinas, que libera moléculas de actina, haciéndolas disponibles para el proceso de polimerización. Este fenómeno se vería facilitado por una inhibición de la hidrólisis de PI_{4,5}P₂ por la fosfolipasa C, debido a la mayor afinidad de este fosfoinosítido por las profilinas (Sonh *et al.* 1995).

1.7.3. Tráfico de vesículas

Las profilinas juegan un papel importante en el tráfico de vesículas y en la endocitosis (Qualmann & Kessel 2001), macropinocitosis y fagocitosis (Jannssen & Schleicher 2001). Las profilinas interaccionan con los fosfoinosítidos D3 y la PI-3 quinasa, que desempeñan papeles esenciales en el tráfico de membrana a través de la ruta de endocitosis (Cullen *et al.* 2001; Simonsen *et al.* 2001; Vieira *et al.* 2001). En plantas, se ha demostrado que están involucradas en el tráfico de proteínas entre las cisternas del trans-Golgi y las vacuolas (Finger 1997). Las profilinas son capaces de unirse a PI-3 quinasa y aumentar su actividad quinasa *in vitro* (Singh *et al.* 1996; Bhargavi *et al.* 1998). Por otra parte, varios trabajos describen el aislamiento de complejos de profilina 1 humana con clatrina y proteína VCP, así como la interacción de profilina 2 humana con dinamina 1, sinapsina y Nap1 (Witke 2004). En la Fig. 7 se muestra como estas proteínas están implicadas en la endocitosis y reciclado de vesículas.

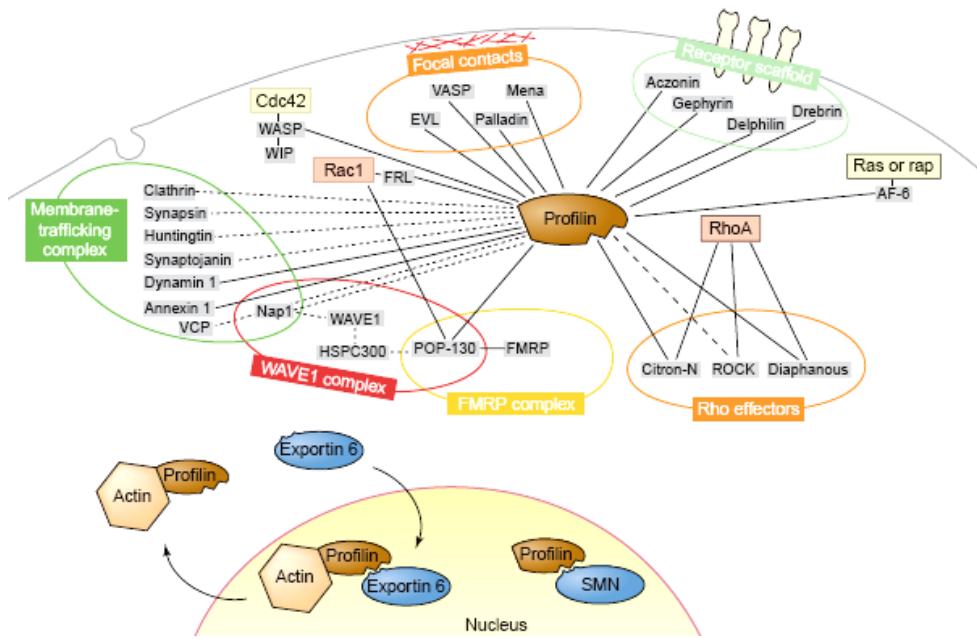


Figura 7. Representación de la red de interacciones moleculares de profilina, según Witke *et al.* (2004)

1.8. Localización celular de las profilinas

Existen numerosos trabajos sobre la localización de las profilinas en diferentes células y tejidos vegetales. En el caso de las microsporas, los granos de polen y tubos polínicos, los resultados muestran una localización eminentemente citoplásica para estas proteínas (Grote *et al.* 1993, 1995; Hess *et al.* 1995; Fischer *et al.* 1996; Vidali & Hepler 1997; Kandasamy 2002). Sin embargo, se han descrito algunas excepciones, habiéndose encontrado profilinas en amiloplastos (Fischer *et al.* 1996) y en núcleos generativos y vegetativos de polen (Hess & Valenta 1997). También se ha observado una localización preferencial asociada a la membrana plasmática y una expresión diferencial de varias isoformas de profilinas en microsporas y polen de maíz (von Witsch *et al.* 1998).

1.9. Profilinas y alergia

Se denomina alergia a una respuesta de defensa exagerada del organismo cuando entra en contacto con determinadas sustancias provenientes del exterior y que el organismo identifica como "agresivas". Estas sustancias se conocen como sustancias alergénicas o alérgenos. La predisposición alérgica se denomina atopía, y se refleja en un aumento de la síntesis masiva de anticuerpos IgE específicos contra el alérgeno o agente causante de dicha reacción alérgica.

Los alérgenos se denominan de acuerdo con las directrices de la Comisión de Nomenclatura Alergénica de la IUIS (International Union of Immunological Societies, Allergen Nomenclature Sub-Committee. www.allergen.org). Básicamente, se designan a partir del nombre científico del organismo productor del alérgeno, utilizando las tres primeras letras correspondientes al género, seguidas de la primera letra de la especie, y un número que indica el orden cronológico en el que identificó el alérgeno en dicha fuente, separados por espacios (ejemplo: Ole e 1, primer alérgeno aislado de *Olea europaea*) (King *et al.* 1994)

1.9.1. La reacción alérgica

Dicha hipersensibilidad cursa en dos etapas bien caracterizadas (Fig. 8). La primera se denomina **sensibilización**, y ocurre durante la primera exposición del organismo a las moléculas alergénicas. Estas moléculas son captadas y procesadas por las células presentadoras de antígeno, que procesan el antígeno en pequeños fragmentos peptídicos y los exponen en su superficie. Estos fragmentos son reconocidos por los linfocitos T, que se diferencian a células colaboradoras que secretan interleuquinas y contribuyen a la diferenciación de los linfocitos B a células plasmáticas productoras de IgE.

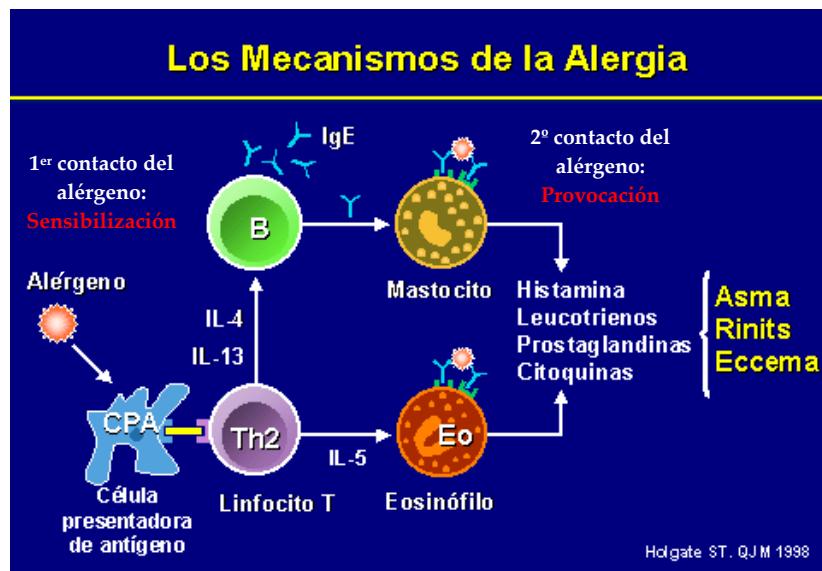


Figura 8. Esquema de los mecanismos que desencadenan la alergia según Holgate 1998

La segunda etapa se denomina *provocación*, y ocurre cuando en una segunda exposición al alérgeno se produce la activación de mastocitos y basófilos por las IgEs ya existentes. Este proceso da lugar a la liberación de mediadores químicos (enzimas, histamina, etc.), y a la síntesis de mediadores lipídicos (prostaglandinas, leucotrienos, etc.) y citoquinas. Como resultado de todo ello, se produce en los tejidos diana la sintomatología típica asociada a la alergia, que incluye rinitis, urticaria o conjuntivitis, u otros más graves como asma o trastornos gastrointestinales, pudiendo llegar a provocar incluso un shock anafiláctico.

1.9.2. El polen como vector alérgico

Existen diferentes tipos de alergia dependiendo del agente causante. Entre los alérgenos más comunes están: agentes de contacto (químicos y plantas...), picaduras de insectos (abejas, avispas...), medicamentos (antibióticos y sueros...), alimentos (leche, huevos, semillas, frutos secos, marisco, chocolate, etc.), agentes infecciosos (bacterias, parásitos...), inhalantes (ácaros, polen...) y agentes físicos (calor, luz...).

Prácticamente cualquier sustancia imaginable es capaz de producir alergia en individuos predisuestos o atópicos.

El polen es una de las principales causas de alergia respiratoria, denominada en este caso polinosis. Tiene lugar cuando los granos de polen se ponen en contacto con las vías respiratorias. Como consecuencia el polen se hidrata y libera proteínas a las mucosas en cantidades elevadas, produciéndose una reacción alérgica. La gravedad de los síntomas producidos varía en función de parámetros como la existencia de pólenes de diferentes especies, la concentración de polen en el aire o la duración de la exposición del individuo al polen (Helander 1997; Ahlholm 1998).

Las características para que un polen sea capaz de causar alergia fueron definidas por Thommen *et al.* (1931), y son las siguientes: a) contener un componente antigénico capaz de inducir sensibilidad, b) producirse en gran cantidad, c) ser transportado por el aire (polen anemófilo), d) ser lo suficientemente ligero para poder ser desplazado largas distancias, y e) pertenecer a una especie ampliamente representada en un área geográfica.

Entre las muchas especies que producen polen potencialmente alergogénico, son más de 100 las que se consideran relevantes (Tsukanova & Laaidi 2004). Las principales especies con polen alergogénico en España son las gramíneas, seguidas de *Olea europaea* (olivo) y *Parietaria judaica* (Corbi *et al.* 1985; Dreborg *et al.* 1986, Subiza *et al.* 1986, 1989) y, más recientemente, el ciprés (D'Amato *et al.* 2007). Pólenes alergogénicos de otras especies, como *Betula alba*, *Platanus hybrida*, *Plantago lanceolada* o *Artemisia* sp., son causa importante de polinosis en otros países del centro de Europa, pero no en España debido a su escasa presencia.

1.9.3. Profilinas y alergia

La primera identificación de profilinas en plantas se realizó en granos de polen de abedul (*Betula pendula*), y al mismo tiempo se determinó su carácter alergénico (Valenta *et al.* 1991). Desde entonces se ha confirmado tanto la presencia como la

alergenicidad de estas proteínas en el polen de numerosas especies de plantas de mayor o menor relevancia en la etiología de la alergia (Tabla 2A). También, se ha documentado la presencia de profilinas en un gran número de alimentos de origen vegetal (Tabla 2B). Por todo ello, las profilinas se consideran “panalérgenos” (pan-: prefijo griego que significa todo, totalidad), término acuñado por primera vez para esta molécula por Valenta *et al.* (1992) para subrayar su ubicuidad como proteína alergénica.

Los anticuerpos IgE anti-profilinas son capaces en muchos casos de generar reacciones cruzadas entre profilinas de pólenes y de alimentos (van Ree *et al.* 1992; Ebner *et al.* 1995). Afortunadamente, las profilinas son bastante sensibles a la desnaturalización por calor y a la digestión gástrica, por lo que la alergia alimentaria causada por profilinas está confinada al denominado “Síndrome alérgico oral” (OAS) elicitedo por alimentos no elaborados (Jankiewicz *et al.* 1997a; Jankiewicz *et al.* 1997b). Las inmunoglobulinas IgEs específicas para profilinas son detectadas en un 10%-30% de los pacientes que sufren la denominada “alergia alimentaria relacionada con polen”. Se trata de pacientes que sufren la mencionada asociación entre alergia a ciertos pólenes y a determinados alimentos, generalmente frutos o frutos secos. La causa de este síndrome en algunos casos es el reconocimiento cruzado de profilinas, aunque también están implicados otros alérgenos. Algunas de estas asociaciones están bien establecidas, como las que existen entre la profilina de polen de abedul (Bet v 2) y profilinas de pera (Pyr c 4), cereza (Pru av 4), melocotón (Pru p 4) y avellana (Cor a 2), y entre profilinas similares presentes en el polen de abedul y diversas malas hierbas, como las profilinas de apio (Api g 4), banana (Mus xp 1) y melón (Cuc m 2). La asociación entre alergia al polen de gramíneas y el OAS a cacahuete y tomate también ha sido atribuido parcialmente a la presencia de IgEs anti-profilina (ver revisiones de Rodríguez *et al.* 2000 y Breiteneder & Radauer 2004).

Tabla 2. Profilinas de polen (A) y alimentos de origen vegetal (B).

Nombre común	Especie	Alérgeno	Cita bibliográfica	Nombre común	Especie	Alérgeno	Cita bibliográfica
Alico	<i>Alnus glutinosa</i>	Aln g	Pandjaitan et al. 1999	Cebolla	<i>Allium cepa</i>	All c	Chapman et al. 2006
Ambrosia	<i>Ambrosia artemisiifolia</i>	Amb a 8	Fischer et al. 1996	Piña	<i>Ananas comosus</i>	Ana c 1	Tao et al. 2004
Altamisa	<i>Artemisia vulgaris</i>	Art v 4	Hirschwehr et al. 1998	Apio	<i>Apium graveolens</i>	Api g 4	Scheurer et al. 2000
Abedul	<i>Betula pendula</i>	Bet v 2	Valenta et al. 1991	Cacahuete	<i>Arachis hypogaea</i>	Ara h 5	Kleber-Janke et al. 1999
Colza	<i>Brassica napus</i>	Bra n	Focke et al. 1998	Sandía	<i>Citrullus lanatus</i>	Cit la	Sankian et al. 2005
Castaño	<i>Castanea sativa</i>	Cas s 1	Hirschwehr et al. 1993	Naranja	<i>Citrus sinensis</i>	Cit s 2	López-Torrejón et al. 2005
Cenizo	<i>Chenopodium album</i>	Cho a 2	Barderas et al. 2004	Avellano	<i>Corylus avellana</i>	Cor a 2	Lüttkopf et al. (sin publicar)
Avellano	<i>Corylus avellana</i>	Cor a 2	Presente tesis doctoral	Melón	<i>Cucumis melo</i>	Cuc m 2	López-Torrejón et al. 2005
Azafrán	<i>Crocus sativus</i>	Cro S 2	Feo et al. 1997	Calabacín	<i>Cucurbita pepo</i>	Cup p	Reindl et al. 2000
Grama común	<i>Cynodon dactylon</i>	Cyn d 12	Asturias et al. 1997	Zanahoria	<i>Daucus carota</i>	Dau c 4	Ballmer-Weber et al. 2005
Dáctilo	<i>Dactylis glomerata</i>	Dac g 12	Barderas et al. 2004	Fresa	<i>Fragaria ananassa</i>	Fra a 4	Zuidmeer et al. 2006
Fresno	<i>Fraxinus excelsior</i>	Fra e 2	Niederberger et al. 2002	Soja	<i>Glycine max</i>	Gly m 3	Mittag et al. 2004
Girasol	<i>Helianthus annuus</i>	Hel a 2	Asturias et al. 1998	Manzana	<i>Malus domestica</i>	Mal d 4	Gao et al. 2005
Cebada	<i>Hordeum sativum</i>	Hor v 12	Van Ree et al. 1992	Mango	<i>Mangifera indica</i>	Man i 3	Song et al. 2007
Lirio	<i>Lilium longiflorum</i>	Lil l	Vidali and Hepler 1997	Banana	<i>Musa x paradisiaca</i>	Mus xp1	Grob et al. 2002
Ballito	<i>Lolium perenne</i>	Lol p 12	Mohapatra et al. 2005	Aguacate	<i>Persea americana</i>	Pers a	Grob et al. 2002
Mercurial	<i>Mercurialis annua</i>	Mer a 1	Vallverdú et al. 1998	Guisante	<i>Pisum sativum</i>	Pis s	Ruhlandt et al. 2004
Tabaco	<i>Nicotiana tabacum</i>	Nic t	Mittermann et al. 1995	Cereza	<i>Prunus avium</i>	Pru av 4	Ballmer-Weber et al. 2002
Olivo	<i>Olea europaea</i>	Ole e 2	Asturias et al. 1997	Ciruelo	<i>Prunus domestica</i>	Pru d	Rodríguez-Pérez et al. 2003
Arroz	<i>Oryza sativa</i>	Ory s 12	Ye et al. 2001	Almendro	<i>Prunus dulcis</i>	Pru du 4	Tavðs et al. 2006
Parietaria	<i>Parietaria judica</i>	Par j 3	Asturias et al. 2004	Nectarina	<i>Prunus persica</i>	Pru p 4	Rodríguez-Pérez et al. 2003
Hierba Timoteo	<i>Phleum pratense</i>	Phl p 12	Valenta et al. 1994	Pera	<i>Pyrus communis</i>	Pyr c 4	Scheurer 2001a
Plátano de sombra	<i>Platanus acerifolia</i>	Pla a	Asturias et al. 2002	Patata	<i>Solanum tuberosum</i>	Sola t	Wagner & Breiteneder 2002
Palmera datilera	<i>Phoenix dactylifera</i>	Pho d 2	Asturias et al. 2005	Espinaca	<i>Spinacia oleracea</i>	Spi o	Schuller 2005
Trigo	<i>Triticum aestivum</i>	Tri a 12	Rihs et al. 1994	Vid	<i>Vitis vinifera</i>	Vit v	Sbornik et al. 2007
Maíz	<i>Zea mays</i>	Zea m 12	Staiger et al. 1993				

A

B

En la Tabla 2 se recoge una representación de profilinas de polen y alimentos de origen vegetal causantes de reacciones alérgicas. Otras profilinas igualmente estudiadas se pueden encontrar en la base de datos Allergome (<http://www.allergome.org/>).

1.9.4. Motivos estructurales de las profilinas implicados en la alergia

Uno de los mayores retos de la Alergología Molecular es predecir el potencial alergogénico de una proteína, particularmente en el caso de nuevos alérgenos. La identificación de motivos alergénicos y la caracterización de las interacciones entre éstos y los diversos anticuerpos y células del sistema inmunitario se consideran información muy valiosa y de gran aplicación en la Alergología Molecular.

Hasta el momento sólo se han caracterizado los epitopos alergénicos reconocidos por células T y B en un número limitado de alérgenos. Los métodos utilizados para estas determinaciones son en muchos casos predictivos, y se basan en la utilización de alineamientos de secuencias, modelos 3-D y algoritmos o programas específicos. En otros casos, las pruebas se obtienen de forma experimental con la utilización de métodos de inmunoensayo. En el caso de las profilinas, son varios los estudios que han analizado estos epitopos. Vallverdú *et al.* (1997) comprobaron la existencia de epitopos para células B comunes en las profilinas de *Mercurialis annua* (Mer a 1) y *Helianthus*

annus (Hel a 2), que además poseen dos regiones correspondientes a epitopos secuenciales para IgE en común. Asturias *et al.* (2002) determinaron la presencia de 5 epitopos de células B continuos en profilinas. Para ello utilizaron un panel de anticuerpos monoclonales y una serie de péptidos sintéticos solapantes que cubrían la secuencia de una profilina de girasol. Los epitopos están formados por fragmentos de entre 6-10 aa. La mayor reactividad fue localizada en los extremos C y N terminal de la proteína (dos en α -hélices y otros dos en giros) y en la región central (corazón hidrofóbico). En un trabajo posterior se ha realizado una serie de predicciones de epitopos T en diversas profilinas analizando la alergenicidad cruzada entre especies mediada por receptores de células T (Burastero *et al.* 2004). Finalmente, en un estudio de Radauer *et al.* (2006) se compararon las conformaciones estructurales de 6 profilinas y se determinaron 11 epitopos conformacionales variables con capacidad de unión teórica a IgEs. Todos estos trabajos muestran la importancia que tiene el estudio de los epitopos en la caracterización de los mecanismos de la alergia.

1.10. El olivo como material de estudio

El polen de olivo es una de las causas principales de alergia en Andalucía. Por otro lado, el cultivo del olivo es de enorme interés económico-social en España, que es el primer país productor de aceite del mundo, de ahí el creciente interés que despierta el estudio de esta especie.

1.10.1. Diversidad de variedades de olivo e identificación

La difusión del cultivo de Oriente a Occidente se realizó a través de las dos orillas del Mediterráneo. En este proceso, parece ser que los primeros olivicultores seleccionaron en bosques de acebuche u olivo silvestre (*Olea europaea* var. *sylvestris*) los individuos más interesantes respecto a alguna de sus características, tales como la producción, tamaño del fruto, contenido de aceite y adaptación al medio. Por medio de la propagación vegetativa capaz de mantener los caracteres de los individuos seleccionados, se establecieron las primeras variedades. Posteriormente, al difundirse

el cultivo a lo largo del Mediterráneo, y dada la capacidad de cruzamiento entre las formas silvestres y cultivadas, los individuos inicialmente seleccionados y propagados, se hibridaron con material silvestre existente en las zonas, y nuevamente de los individuos resultantes se debieron seleccionar y propagar aquellos más sobresalientes y mejor adaptados en las respectivas zonas. La reiteración de este procedimiento, ha originado una gran diversidad de cultivares en los diferentes países del Mediterráneo. En este sentido, se ha estimado que pueden existir en torno a 2.000 variedades diferentes en el mundo. En España se han catalogado hasta un total de 272 variedades diferentes (Rallo *et al.* 2005), que incluyen los diferentes nombres con los que se conoce una variedad (sinonimias) así como distintas variedades conocidas con el mismo nombre (homonimias).

Tradicionalmente la discriminación entre variedades se ha realizado sobre la base de caracteres morfológicos (Barranco *et al.* 2001), preferentemente controlados por un gen y que mantienen un fenotipo constante en diferentes ambientes. En la última década se han desarrollado diversos marcadores moleculares. Cabe destacar entre ellos los marcadores bioquímicos (polimorfismo de proteínas/enzimas) (Trujillo *et al.* 1995) y los marcadores de ADN. Estos últimos permiten la identificación rápida e inequívoca de las variedades, facilitando los programas de mejora y obtención de otras variedades por cruzamientos. Otras ventajas adicionales las constituyen el hecho de no ser influenciables por el ambiente y el no presentar interacciones intergénicas. Entre ellos se incluyen: a) RFLPs, b) RAPD, c) AFLPs, d) VNTR , f) SSR , g) SNPs , h) SCARs , i) STSs , j) SSAPs (Dorado *et al.* 2005).

El estudio de la variabilidad genética e identificación de variedades en el olivo es un aspecto de gran actualidad y por ello se ha incluido un elevado número de variedades de olivo en este estudio sobre profilinas de polen.

1.11. Proteínas alergénicas en el polen del olivo

Gran parte de los trabajos de caracterización de los alérgenos del polen del olivo han sido llevados a cabo por el grupo de la Profesora Rosalía Rodríguez (Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Facultad de Química. Universidad Complutense de Madrid). El polen de olivo posee un perfil alergénico complejo, y hasta la fecha se han identificado y caracterizado más de 10 alérgenos. (Rodríguez y col., 2001, 2002, 2007a, b).

Algunos de ellos pertenecen a familias de proteínas bien conocidas y otros no corresponden a ninguno de los tipos bioquímicos descritos. El alérgeno más prevalente es Ole e 1, aunque otros como Ole e 2, Ole e 8 y Ole e 9 también se consideran alérgenos mayoritarios. Es interesante destacar que Ole e 9 es el único alérgeno caracterizado con alto valor de masa molecular. Ole e 3 y Ole e 8 tienen capacidad de unión a Ca^{2+} (actuando como reguladoras de sus niveles en polen), formando parte de una familia de proteínas para las que se ha propuesto la denominación de "polcalcinas". Ole e 7 pertenece a una familia de proteínas LTPs de transferencia de lípidos (Lipid Transfer Proteins); Ole e 9 es una beta-1,3-glucanasa perteneciente a la familia 4 de proteínas relacionadas con patogénesis (PR-2). La Tabla 3 resume las características más relevantes de cada una de estas proteínas alergénicas. Los diversos estudios realizados muestran que la mayor parte de los alérgenos aislados y caracterizados hasta la fecha son altamente polimórficos (ver revisión de Alché *et al.* 2007). Los cultivares de olivo muestran amplias diferencias en los niveles de expresión de muchos alérgenos, así como en el número y características moleculares de las isoformas alergénicas expresadas (Castro *et al.* 2003). Estas diferencias se mantienen a lo largo de años, y son intrínsecas a la genética de cada cultivar (Fernández-Caldas *et al.* 2007; Hamman-Khalifa *et al.* 2008). Este amplio polimorfismo podría estar implicado en la fisiología del sistema reproductivo del olivo en relación con la adaptación de la planta a diferentes condiciones ambientales, el establecimiento de un sistema de compatibilidad, y el dinamismo del polen.

Tabla 3. Propiedades de los alérgenos caracterizados en el polen de olivo (a) las masas moleculares (PM) se han determinado mediante espectroscopía de masas (*) o SDS-PAGE (**)

Alérgeno	PM (kDa) (*)	pI	Expresión recombinante	Homología	Prevalencia (%)	Características	Referencias
Ole e 1	18.5*	5-5.6	E. coli P. Pastoris A. italiana	Ole e 1, Sry v 1, Lig v 1, Ota 1, Che a 1, LAT52, Lol p 11, Zinc 13	55-90	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Alto grado de polimorfismo en su secuencia. ✓ Variabilidad intervarietal mayor que la intravarietal. ✓ Origen varietal del polen del olivo es el principal factor que determina la diversidad de las variantes de Ole e 1. ✓ 3 regiones de reconocimiento por oídas T y un motivo extra de N-glicosilación. ✓ Sustitución de una cisteína implicada en la formación de uno de los 3 puentes disulfuro. ✓ Incremento de los niveles tras emerger el tubo polínico. ✓ Principal alérgeno para el diagnóstico, terapia segura y eficaz de la alergia tipo I en Olmosa (olivo y fresno). 	Hannan-Khalifa et al. 2003a, 2007 Alché et al. 2007 Batanero et al. 2005 González et al. 2000 Alché et al. 1999, 2002 y 2008 Palomares et al. 2006 Rodríguez et al. 2007
Ole e 2	14-16**	-	E. coli	Profilinas	26	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Panalérgeno presente en el polen del olivo, perteneciente a la familia de las profilinas. Familias multigénicas. Presencia de varias isoformas, tanto en células vegetativas como reproductivas de plantas ✓ Secuencia aminoacídica variable. Estructura 3D conservada entre especies de distintos reinos ✓ Funciones dependientes de la interacción con sus ligandos naturales: actina (proteína AIP), poli-L-prolina (PLP), fosfoserinolitos (PLT) y proteínas ricas en motivos de proline. ✓ Regulación y aumento de la diversidad de variantes de profilina por fosforilación en residuos de Y, S y T 	Valentí 1991, 1992 Amarillas et al. 1997 Federov et al. 1997 Sathish et al. 2004 Jimesongkran et al. 2004 Staiger & Blanchon 2006 Ren & Xiang 2007
Ole e 3	9.2*	4.2-4.3	E. Coli A. italiana	Polecalcinas	20	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Dos sitios de unión a calcio ✓ Expresión tardía durante el desarrollo del polen ✓ La proteína está ausente en otros tejidos (ramas y hojas) 	Batanero et al. 1996b Ledesma et al. 2000 Alché et al. 2003
Ole e 4	32**	4.6-5.1	-	-	80	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Alérgeno mayoritario. Alta capacidad de unión a IgE ✓ Presenta al menos dos isoformas ✓ No pose homología con ninguna proteína conocida de la base de datos de SWISS-PROT 	Batádua et al. 1998 Carnés y Fernández-Cádiz 2002
Ole e 5	16**	5.1-6.5	E. coli	Superisodio dismutases	35	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Primera Cu/Zn SOD identificada como alérgeno en polen ✓ Elevada identidad de secuencia proteica intraespecífica ✓ Presenta al menos cinco isoformas 	Batádua et al. 1998 Alché et al. 1998 Battanori et al. 2005
Ole e 6	5.8*	4.2	P. pastoris	-	10-35	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Homología con Nt1-CyR8 de tabaco ✓ Considerado alto en cisteína ✓ Determinación de la estructura 3D 	Batanero et al. 1997 Trenzado et al. 2004
Ole e 7	9.9-10.3*	-	-	LTPs	47	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Presencia de dos isoformas ✓ Asociación con alergia alimentaria 	Tejera et al. 1999 Florido et al. 2002
Ole e 8	18.8*	-	E. Coli A. italiana	Polecalcinas	3-4	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Presencia de Ole e 8-like proteinas en otras Olmosas ✓ Expresión Araliápolis italiana manteniendo la estabilidad e integridad alergénica estable 	Ledesma et al. 2000, 2002, 2006
Ole e 9	46.4*	4.8-5.4	P. pastoris	1,3-β-Glucanasa	65	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Alto grado de polimorfismo ✓ Síndrome polen-Látex-fruta 	Ibañez et al. 2001; Palomares et al. 2003, 2006 Barral et al. 2006 Dufourt et al. 2006
Ole e 10	10.4*	5.8	P. Pastorís células de insectos (S. frugiperda)	Homología con Ole e 9	55	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Define una nueva familia de proteínas de unión a carbohidratos. ✓ Nuevo paralérgeno que muestra reacciones cruzadas intra e interespecífica. Síndrome polen-Látex-fruta 	Barral et al. 2004
Ole e 11	40-45	-	P. Pastorís	Pectin metil esterasa	-	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Proteína glicosilada. Forma puentes disulfuro. 	Rodríguez et al. 2007

Las diferencias en la composición alergénica de los cultivares, particularmente en cuanto al alérgeno Ole e 1, son responsables de importantes diferencias en la capacidad alergénica de los extractos (Carnés Sánchez *et al.* 2002. Castro *et al.* 2003). Estos hallazgos pueden tener numerosas implicaciones en la diagnosis y terapia de la alergia al polen del olivo, y también pueden afectar a la eficacia y seguridad del diagnóstico y la terapia, así como al desarrollo de nuevas vacunas basadas en el uso de alérgenos recombinantes (Alché *et al.* 2007).

1.12. Profilinas en el polen de *Olea europaea*

Las profilinas del polen del olivo han sido denominadas alérgeno Ole e 2, ya que fue la segunda proteína alergénica aislada y caracterizada en el polen del olivo (Ledesma *et al.* 1998). Se trata de un alérgeno mayoritario junto con Ole e 1, ya que entre el 24 y el 27% de la población alérgica al polen del olivo reconoce la proteína Ole e 2 (Martínez *et al.* 1999). Tiene una masa molecular media de 14.4 kDa y un punto isoeléctrico medio de 5.1 (Martínez *et al.* 2002). Los cDNAs de Ole e 2 fueron aislados, clonados y secuenciados anteriormente al aislamiento de la proteína, obteniéndose las tres primeras secuencias de profilinas depositadas en la base de datos GeneBankTM/EMBL (Y12425, Y12429, Y12430). La mayoría de ellas presenta un ORF de 405 pb y codifica un polipéptido de 134 aminoácidos, con una alta identidad de secuencia entre ellos ($\geq 95\%$) (Asturias *et al.* 1997). La expresión de las profilinas como proteína de fusión en *E. coli* mostró un alto grado de polimorfismo en su secuencia nucleotídica, apareciendo microheterogeneidades en cuatro posiciones en la estructura primaria. Se ha descrito la presencia de tres isoformas de profilina en este material, sobre la base de las secuencias aminoacídicas resultantes de predicciones teóricas (Rodríguez *et al.* 2002). Mediante SDS-PAGE se obtuvo un patrón de bandas de profilinas con masas moleculares aparentes de 17.8, 17.0, 16.0 y 15.2 kDa (Martínez *et al.* 2002). También se han caracterizado experimentalmente los principales epitopos de reconocimiento por células B de estas proteínas (Asturias *et al.* 2002), así como los epitopos de reconocimiento por células T para los alelos más frecuentes HLA-clase II de la población caucásica, mediante la predicción de dichos epitopos con el programa T-EPIPOPE (Burastero *et al.* 2004).

A pesar de los datos obtenidos sobre las profilinas del olivo, existen todavía numerosas incógnitas en cuanto a las características estructurales de estas proteínas en el olivo, la posible presencia de isoformas adicionales, su probable procesamiento postraduccional, la extensión de su polimorfismo, etc... Algunas de estas cuestiones son abordadas en el presente trabajo.

TESIS A PLANTEAR Y OBJETIVOS

2. Tesis a plantear y objetivos

Según se acaba de exponer a lo largo de la introducción, las profilinas de plantas forman parte de familias multigénicas en plantas, presentando numerosas isoformas y estando presentes en muy diferentes tejidos y órganos vegetales. Poseen dominios de interacción con numerosos ligandos, y pueden ser consideradas multifuncionales, ya que están implicadas en el control y regulación del citoesqueleto de actina y en la señalización celular. Además, las profilinas poseen características alergénicas en el polen de muchas especies de plantas. A pesar de esta amplia funcionalidad y de sus numerosas e interesantes peculiaridades, estas proteínas sólo han empezado a ser estudiadas y caracterizadas en *Olea europaea* L. a finales de los 90 y principalmente en relación con su carácter alergénico. El presente trabajo pretende caracterizar la variabilidad genética de las profilinas del polen en una amplia representación del germoplasma de *Olea europaea* L., y en otras especies como *Betula pendula*, *Corylus avellana*, *Phleum pratense* y *Zea mays*.

El principal objetivo es analizar *in silico* las características de las distintas isoformas y clones obtenidos y establecer de forma teórica las implicaciones de dicho polimorfismo en muy diferentes aspectos de la funcionalidad de la proteína, incluyendo además sus características alergogénicas.

Para tal finalidad, se proponen los siguientes objetivos específicos:

1. Obtener un número significativo de secuencias de profilinas a partir de polen maduro de *Olea europaea* L. de una amplia muestra del germoplasma de esta planta, así como de otras especies vegetales con extensa distribución y con relevancia alergogénica.
2. Caracterizar estructuralmente las secuencias obtenidas mediante su análisis bioinformático, determinando la extensión del polimorfismo.

3. Predecir la influencia del polimorfismo sobre la estructura 3D, la función biológica y la interacción con diversos ligandos.
4. Analizar *in silico* la influencia del polimorfismo intraespecífico de las profilinas del olivo sobre su carácter alergénico y sobre la presencia de reacciones cruzadas con diferentes especies.
5. Caracterizar de forma preliminar la expresión y la reactividad diferencial de las profilinas de polen de *Olea europaea* L. y de otras especies, frente a sueros anti-profilinas, y establecer su localización celular. Mediante este objetivo se trata de mostrar la existencia real de diferencias entre las profilinas analizadas sobre la base de las predicciones realizadas.

MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. MATERIAL VEGETAL

El material vegetal utilizado procede de árboles de olivo (*Olea europaea* L.) de diferentes cultivares, bien caracterizados según los caracteres pomológicos definidos por Barranco y Rallo (1984). La tabla 4 recoge los cultivares de olivo estudiados con los datos referentes a su difusión e importancia según la FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) (2005) <http://www.fao.org/>.

Tabla 4. Variedades de olivo estudiadas. Colección de la que procede cada variedad: BGMO (Banco mundial de germoplasma de olivo del CIFA "Alameda del Obispo". Junta de Andalucía, Córdoba; EEZ (Estación Experimental del Zaidín. CSIC. Granada); EELM (Estación Experimental La Mayora. CSIC. Málaga); MCO (Museo de la cultura del olivo, Baeza, Jaén); GUE (Guéjar Sierra, Granada). La denominación de "principal", "secundaria", "difundida" y "local" sigue la clasificación realizada por Barranco et al. (2005). Las variedades no indicadas en estas categorías se muestran con un guion. El árbol concreto utilizado para la obtención del material está definido por una clave denominada "Specimen-Voucher".

Cultivar	Colección	Denominación	Difusión e importancia	Specimen-Voucher
Acebuchе	BGMO	var. silvestre	-	J.D. Alché 1400 CMVO
Arbequina	MCO	Principal	España y Argentina	J.D. Alché 2000 UBE
Bella de España	BGMO	-	Italia, Francia, Albania, China y Australia	J.D. Alché 3300 CMVO
Blanqueta	BGMO	Principal	España	J.D. Alché 1900 CMVO
Cornicabra	BGMO	Principal	España, Portugal, Argentina y Argelia	J.D. Alché 2800 CMVO
Empeltre	BGMO	Principal	España y Argentina	J.D. Alché 3100 CMVO
Farga	MCO	Principal	España y Argentina	J.D. Alché 3000 UBE
Frantoio	MCO	-	Europa, América, Asia, África y Australia	J.D. Alché 4000 UBE
Galega	MCO	Difundida	Portugal y España	J.D. Alché 5000 UBE
Hojiblanca	EEZ	Principal	España, Argentina, Australia y Turquía	J.D. Alché 3000 EEZ
Leccino	MCO	-	Europa, América, Asia, África	J.D. Alché 6000 UBE
Lechín de Granada	BGMO	Principal	España	J.D. Alché 1600 CMVO
Lechín de Sevilla	MCO	Principal	España y Argentina	J.D. Alché 1000 UBE
Loaime	GUE	Secundaria	España	J.D. Alché 3000 GUE
Lucio	BGMO	Secundaria	España	J.D. Alché 3000 CMVO
Manzanilla de Sevilla	BGMO	Principal	Europa, América, Australia y Asia	J.D. Alché 0100 CMVO
Morrut	BGMO	Principal	España	J.D. Alché 3200 CMVO
Picual	GUE	Principal	Europa, América, Australia y Asia	J.D. Alché 2000 GUE
Picudo	BGMO	Principal	España, Portugal y Argentina	J.D. Alché 2900 CMVO
Sevillenca	BGMO	Principal	España	J.D. Alché 2400 CMVO
Sourani	MCO	-	Siria, Turquía e Iraq	J.D. Alché 7000 UBE
Verdial de Huévar	BGMO	Principal	España	J.D. Alché 2500 CMVO
Verdial de Vélez-Málaga	EELM	Principal	España	J.D. Alché 1000 MAY
Villalonga	BGMO	Principal	España y Argentina	J.D. Alché 1500 CMVO

Además se utilizaron pólenes de las especies *Betula pendula* (abedul), *Corylus avellana* (avellano), *Phleum pratense* (hierba Timotea) y *Zea mays* (maíz) (Tabla 5).

Tabla 5. Otras especies estudiadas, cuya procedencia es: Jardín Botánico de la Universidad de Bonn (Alemania) (BGB, Botanical Garden Bonn), y polen comercial de la empresa Allergon AB, Ängelholm (Suecia), <http://www.allergon.com> (ALL). La planta o muestra concreta utilizada en el estudio se identifica con una referencia denominada "Specimen-Voucher".

Especie	Origen y referencia	Difusión e importancia	Cultivar	Specimen-Voucher
<i>Betula pendula</i>	BGB	Europa, Asia y África	Indeterminado	M.I. Rodriguez-Garcia 1000 BGB
<i>Corylus avellana</i>	BGB	Europa, Asia y USA	Indeterminado	M.I. Rodriguez-Garcia 2000 BGB
<i>Phleum pratense</i>	ALL Ref. 01139890	Europa, Asia y África	Pratense	M.I. Rodriguez-Garcia 011398901 Allergon
<i>Zea mays</i>	ALL Ref. 012096901	Generalizado	Birko	M.I. Rodriguez-Garcia 012096901 Allergon

Polen maduro

El polen de olivo de los cultivares seleccionados fue recolectado durante los meses de Abril y Mayo del periodo comprendido entre los años 2003-2005. El polen de las especies *Betula pendula* y *Corylus avellana* fue recolectado durante los meses de abril a Junio del año 2003. El método de recolección consistió en introducir ramas que contienen inflorescencias dentro de bolsas de papel. Después de 3 a 5 días, las ramas se agitaron dentro de las bolsas y estas fueron retiradas del árbol. El contenido de las bolsas fue filtrado a través de tamices de 150 µm y de 50 µm con objeto de separar el polen de los restos florales (anteras, sépalos, pétalos., etc...). Posteriormente el polen tamizado fue procesado para microscopía o bien congelado en N₂-líquido y guardado a -80 °C para su uso en la extracción de proteínas y ácidos nucleicos.

Hojas jóvenes

Se recolectaron hojas jóvenes para la realización de extracciones de ADN genómico de las colecciones anteriormente mencionadas.

Semillas maduras de olivo

Por otro lado se recolectaron frutos de olivo de los cultivares Picual y Acebuche, con el fin de obtener las semillas de las que se aislaron el endospermo y el embrión para realizar una extracción de proteínas totales de ambos de tejidos.

3.2. METODOS

3.2.1. Análisis de ácidos nucleicos

A) Extracción de ARN total

En un mortero preenfriado con N₂ líquido, esterilizado mediante autoclavado y tratado con una solución de NaOH 5M durante 30 min para eliminar las RNAsas, se molieron 0.1 g de polen, endospermo o cotiledón hasta obtener un polvillo fino. Este fue transferido a un tubo eppendorf de 1.5 ml, al que se le añadió 0.7 ml de tampón de extracción (a), y 7 µl de β-mercaptoetanol. La mezcla se agitó bien con un vórtex hasta obtener una solución homogénea. Dicha solución se incubó a 56 °C en un baño termostatizado durante 1 min. La solución fue clarificada mediante centrifugación a 10.000 x g durante 10 min, obteniéndose un sobrenadante que fue transferido a un nuevo tubo eppendorf de 1.5 ml al que se le añadió 0.7 ml de fenol (b). Después de mezclar bien con el vórtex se volvió a centrifugar a 10.000 x g durante 15 min, obteniéndose dos fases separadas por una interfase mayoritariamente de proteínas. Se separó la fase superior hidrofílica y se pasó a un nuevo tubo eppendorf, al que se añadió el mismo volumen de una mezcla de fenol/cloroformo (1:1). La solución resultante también se mezcló bien mediante vórtex y se centrifugó a 10.000 x g durante 10 min. A la fase superior se le añadió el mismo volumen de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1), y después de mezclar bien solución y de centrifugar a 10.000 x g durante 5 min se volvió a recuperar la fase superior, a la que se le añadió el mismo volumen de isopropanol preenfriado a -20 °C, para la precipitación de los ácidos nucleicos. En este caso se llevó a cabo una agitación suave invirtiendo el tubo y se incubó a -20 °C durante 30 min. A continuación la solución se centrifugó a 10.000 x g durante 15 min a 4 °C, para posteriormente eliminar el sobrenadante con mucho cuidado. El precipitado se lavó con 1 ml de etanol al 70% preenfriado a -20 °C seguido de centrifugación a 10.000 x g a 4 °C durante 2 min. El precipitado se dejó secar a 37 °C durante 10 min y se resuspendió en un volumen de 50 µl de H₂O-DEPC.

La cantidad y la pureza del ARN obtenido fueron determinados mediante la medida de la relación A₂₆₀/A₂₈₀, en un sistema NANODROP ND-1000 (NanoDrop Technology), para posteriormente guardarlo a -80 °C hasta su posterior uso. En algunos casos se realizó un procedimiento de “Clean up” suplementario usando el *kit* RNeasy (Quiagen).

Reactivos

(a) Tampón de extracción: Tris-base 100 mM pH 9.0, ácido etilendiaminotetracético (EDTA) 10 mM, LiCl 100 mM y SLS 1 % (Lauril sarcosina Sódica)

Notas

1. La incubación de la muestra a 56 °C favorece la extracción del ARN.
2. El fenol permite la extracción de la fracción proteica del tejido.
3. El cloruro de litio (LiCl) es una sal que permite la precipitación específica de ácidos nucleicos de cadena simple como el ARN.
4. Dietilpirocarbonato (DEPC): el tratamiento con DEPC del agua que posteriormente se va a utilizar para resuspender el ARN obtenido, evita su posterior degradación ya que el DEPC inhibe las RNAsas. La preparación de H₂O libre de RNAsas consiste en añadir 500 µl de este reactivo en 500 ml de H₂O en agitación durante toda la noche. Al día siguiente dicha solución es autoclavada para inactivar el DEPC.
Otra forma de preservar la degradación del ARN es hornear los morteros, los tubos y las puntas a 140 °C durante 2 horas.

B) Extracción de ADN genómico a partir de hojas

Se ponen 0.5 gr de hojas de olivo desnervadas y un poco de arena de cuarzo estéril y preenfriado en un mortero, añadiendo frecuentemente N₂ líquido. Se molió la muestra hasta conseguir un polvo muy fino, el cual fue transferido a un tubo de 10 ml de capacidad y al que se le añadieron 5 ml del tampón de extracción Bromuro de cetil-trimetilamonio (CTAB) (a), precalentado a 60 °C. La mezcla se incubó a 60 °C en un baño termostatizado durante 30 min y se agitó ocasionalmente. Se agregaron 5 ml de fenol, mezclando bien la solución y centrifugándola a 2.000 x g durante 15 min a temperatura ambiente en un rotor SS-34 (RC5C, Sorvall). El sobrenadante se recogió en un nuevo tubo y se le añadió el mismo volumen de fenol/cloroformo (1:1). La solución

se mezcló bien nuevamente y se centrifugó a 2.000 x g durante 10 min a T^a ambiente. A continuación se recogió la fase superior en un nuevo tubo al que se le añadió el mismo volumen de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1) y seguidamente se centrifugó a 2.000 x g durante 5 min a T^a ambiente. De nuevo la fase superior resultante se volvió a recuperar en otro tubo al que se le añadieron 2 volúmenes de isopropanol. El contenido del tubo se mezcló mediante inversión y se incubó a -20 °C durante 2h.

Para recuperar el ADN genómico, se eligió el procedimiento más adecuado en función de la concentración:

1- Cuando la concentración del ADN es importante, se aprecia un material blanquecino, el cual se puede recoger mediante una espátula, y se le añaden 10 ml de un tampón de lavado (**b**).

2 - Cuando la concentración del ADN es inferior, se observa un material difuso. En este caso el tubo se centrifuga a 1.000 x g durante 2 min, añadiéndole posteriormente 10 ml de un tampón de lavado (**b**).

3 - Cuando la concentración del ADN es baja, no se distingue ningún material en la solución. La muestra es centrifugada a 10.000 x g durante 2 min. Posteriormente se le añaden 10 ml de un tampón de lavado (**b**).

Tras cualquiera de estas opciones, el material resultante se incubó durante 20 min a T^a ambiente y se centrifugó posteriormente a 2.000 x g durante 10 min.

El sobrenadante fue eliminado con cuidado y se dejó secar bien el precipitado a T^a ambiente.

La eliminación del ARN del ADN resuspendido en 1 ml de tampón TE (**c**) se realizó añadiéndole RNAsa A a una concentración final de 10 µg/ml, incubando dicha solución a 37 °C durante 30 min.

El ADN resultante se cuantificó y se midió su pureza en un sistema NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technology) para posteriormente almacenarlo a -20 °C hasta su posterior uso.

Reactivos

- (a) Tampón de extracción CTAB: CTAB 2 % (p/v), NaCl 1.4 M, EDTA 20 mM, Tris-base 100 mM pH 8.0 y β -mercaptoetanol 0.2 %
- (b) Tampón de lavado: acetato amónico 10 mM y etanol 76 %
- (c) Tampón TE: Tris-base 10 mM pH 7.5 y EDTA 1 mM.

Notas

1. Bromuro de cetil-trimetilamonio (CTAB): es una sal de amonio cuaternario, con actividad detergente. Es un surfactante catiónico. Uno de sus usos incluye la utilización como solución tamponante para la extracción de ADN.
2. Acetato amónico: Sal que ayuda a la precipitación de ácidos nucleicos de doble cadena.
3. EDTA: quelante de iones, que inhibe enzimas como las DNAsas, impidiéndoles degradar el ADN.

C) RT-PCR de secuencias de profilinas

Transcripción inversa (RT)

Las reacciones se llevaron a cabo en tubos eppendorf de 0.2 ml a los que se añadieron entre 2 a 5 μ g de ARN total y 50 ng de un oligo dT: 5'- (T)₁₇-3', completando hasta 12 μ l con agua de calidad miliQ. Esta mezcla se incubó durante 5 min a 70 °C, para enfriarla inmediatamente en hielo durante 1 min, permitiendo así que el oligo dT quede unido a la cola de poliA del ARNm. A continuación se añadieron los componentes siguientes: 4 μ l de tampón de transcriptasa inversa 5x, 1 μ l de transcriptasa inversa (a), 1 μ l de dNTPs 10 mM, 2 μ l de DTT 100 mM y completar hasta 20 μ l de volumen final con H₂O-DEPC (b). Esta mezcla se incubó durante 1 hora a 42 °C y finalmente la reacción tiene lugar durante la incubación a 65 °C durante 10 min

REACTIVOS

- (a) Transcriptasa reversa M-MLV (200 U/ μ l) (Promega, USA)
- (b) H₂O-DEPC: DEPC .1 % (v/v) en H₂O destilada en agitación constante durante toda la noche. Autoclavar para eliminar el DEPC.

Notas

1. Añadir 10 pmol de oligo dT (5'- (T)₁₇ - 3') por cada μ gr de ARN total.
2. El tratamiento a 70 °C elimina las posibles estructuras secundarias en el ARNm.
3. Añadir 100 unidades (U) del enzima transcriptasa reversa por cada μ gr de ARN total.

Amplificación de secuencias de profilinas mediante PCR

Las reacciones de amplificación (50 µl de volumen total) se realizaron en tubos de 0.2 ml a los que se le añadieron los siguientes componentes:

1 µl de Tampón EcoTaq (**a**), 4 µl de dNTPs (**b**), 2 µl de cada cebador (**c**), 5-10 ng de ADN complementario (ADNc) (**f**) y H₂O miliQ hasta 49.5 µl.

Las etapas de la amplificación se realizaron en un termociclador T-Gradient (Biometra), en el que se programaron las siguientes etapas:

1. Desnaturalización del ADNc a 95 °C durante 3 min
2. Etapa *Hot Start* de adición de la ADN polimerasa (**d**) (0.5 µl de Ecotaq ADN polimerasa) a 80 °C durante 1min.
3. Desnaturalización a 95 °C durante 1min.
4. *Hibridación* de los cebadores: 56 °C durante 1 min
5. Extensión a 72 °C durante 1 min
6. Polimerización final a 72 °C durante 10 min

Las etapas 3, 4 y 5 se repitieron entre 25 a 35 ciclos antes de llevarse a cabo la etapa final de polimerización.

REACTIVOS

(a) Tampón de la ADN polimerasa (10x): Tris- base 100 mM pH= 8.3, Kcl 500 mM, MgCl₂ 15 mM, gelatina 1.1 %

(b) Mezcla de desoxirribonucleótidos (dNTPs) 10 mM

(c) Oligonucleótidos específicos 20 pmol.

El oligo Ole e 2 *sense* (5'-AGAGAATTCCATATGTCGTGGCA(A/G)(A/G)CGTACGT-3') y *antisense* (5'-AGAAAGCTT(C/T)TACA(G/T)GCC(C/T)TGTTCA(G/T/C)(G/A/C)AGGTA-3'), fueron diseñados en base a la secuencia de (Asturias y col. 1994), así como en base a alineamientos de secuencias de profilinas de polen de las especies *Olea europaea*, *Betula pendula*, *Phleum pratense*, *Corylus avellana* y *Zea mays*.

(d) EcoTaq ADN polimerasa (C. Viral) (5U/µl)

(e) ADN complementario (ADNc) obtenido de la etapa anterior de transcripción inversa del ARNm

Notas

1. El protocolo de amplificación usado para esta polimerasa fue concretamente el "Hot Start", que consiste en añadir la polimerasa cuando la temperatura de la mezcla de reacción es de 80 °C.
2. Para los controles negativos, se omite la etapa de transcripción inversa.

D) Análisis de los productos de amplificación mediante electroforesis en geles de agarosa.

Las muestras obtenidas de la amplificación mediante PCR se separaron en un gel de agarosa al 1 % en tampón TAE (a), en un equipo de electroforesis (Minisub DNA Cell, BioRad). El gel se incubó en una solución con bromuro de etidio (c) y posteriormente se obtuvo la imagen del gel, que fue capturada y analizada en un equipo GelDoc 1000/2000 (Bio-Rad), mediante el software Quantity One (Bio-Rad).

Reactivos

- (a) TAE: Tris-base 50 mM pH 8.2, EDTA 2.5 mM y ácido acético glacial 20 mM
- (b) Tampón de muestras 6x: glicerol o Ficoll 18 % (v/v), verde de bromofenol 0.15 % (p/v), xilenocianol 0.25 % (p/v), EDTA 6 mM y NaOH 300 mM
- (c) Solución de bromuro de etidio 10 g/l (p/v)

La(s) banda(s) de interés, se cortaron del gel con ayuda de un escalpelo. Para llevar a cabo el proceso de extracción de ADN de las bandas de agarosa se usó un kit de extracción QIAEX II Gel Extraction Kit (Qiagen)

E) Clonación y secuenciación de productos de PCR

Los productos de PCR se clonaron en un vector de clonación pGEM-T easy (Promega), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Las construcciones resultantes fueron utilizadas para transformar células competentes DH₅α, mediante un protocolo de transformación por choque térmico descrito por Sambrook et al. (1989). Las células transformadas obtenidas se sembraron en placas Petri que contenían LB-agar (b), ampicilina, IPTG y X-gal. Estas se incubaron toda la noche a 37 °C.

Reactivos

- (a) Placas con LB-agar (ampicilina/IPTG/X-Gal): bactotriptona (Gibco) 10 g/l, extracto de levadura (Gibco) 5 g/l, NaCl 10 g/l. Ajustar el pH a 7.0 con 1M NaOH. Añadir agar 15 g/l y autoclavar. Enfriar hasta 50 °C y

añadir ampicilina, IPTG y X-Gal a una concentración final de 100 μ g/ml, 20mM y 80 μ g/ml respectivamente. Agitar y repartir en placas Petri. Guardar las placas a 4 °C hasta su posterior uso.

Notas

1. IPTG es un inductor del gen de la β -galactosidasa.
2. X-Gal es un substrato de β -galactosidasa, que una vez metabolizado genera una coloración azul.
3. La selección de colonias que contienen el inserto se realiza visualmente por el color, ya que aquellas de color blanco contienen el plásmido con el inserto y las azules contienen el plásmido vacío, sin el inserto. La base de la diferencia de color de las colonias con o sin el inserto o gen de interés, radica en que el plásmido utilizado en la clonación (pGEM-T easy) contiene el gen de la β -lactamasa que rompe el anillo lactámico de la estructura del X-gal dando como resultado un producto de color azul, que se acumula en las células.

A partir de las colonias transformadas, se procedió a la obtención de ADN plasmídico utilizando un kit Wizard plus SV miniprep (Promega) siguiendo las recomendaciones del fabricante.

El ADN plasmídico obtenido se resuspendió en 25 μ l de H₂O miliQ. Se midió la concentración y pureza del ADN y se almacenó a -20 °C hasta su posterior uso. La presencia de los insertos adecuados en las preparaciones de ADN plasmídico fue analizada mediante digestión enzimática de 0.5 μ g de ADN plasmídico con el enzima de restricción EcoRI (Fermentas), siguiendo las instrucciones del fabricante para dicha reacción. Posteriormente, se analizaron los fragmentos de restricción resultantes mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%. Los clones considerados positivos por la presencia de insertos de las características adecuadas fueron secuenciados. Para ello se utilizó una cantidad entre 0.4-1 μ g del ADN plasmídico y 6.4 pmol de los cebadores específicos SP₆ y T₇.

Notas

Los cebadores usados como molde para la secuenciación fueron:

SP₆: 5'- TATTTAGGTGACACTATAG -3'

T₇: 5'- TAATACGAGTCACTATAGGG -3'

La secuenciación fue realizada por el Servicio de Secuenciación del Instituto de Parasitología y Biomedicina López Neyra (CSIC, Granada), utilizando para ello un equipo ABI 373 XL Stretch acoplado a un termociclador PE 9600 (PE Biosystems), y el kit de secuenciación "ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction" (PE Biosystems).

3.2.2 Herramientas bioinformáticas

A) Análisis de la identidad de las secuencias de las profilinas

Para llevar a cabo el cálculo de la identidad de las secuencias, tanto nucleotídicas como aminoacídicas, se realizó el alineamiento de ambos tipos de secuencias mediante el programa Clustal W (Thompson et al. 1994; Labarga et al. 2005, Pillai et al. 2005), <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw/index.html/>. Dichos alineamientos se llevaron a cabo entre secuencias de la misma especie y entre diferentes especies. Para ello se calcularon las matrices de sustitución/identidad de dichos alineamientos en base a las matrices tipo BLOSUM (BLOck SUbstitution Matrix) (Henikoff & Henikoff 1992), mediante el software Bioedit (Sequence Alignment Editor) v 7.0.5.3 (Hall T.A. 1999).

B) Análisis de la variabilidad de las secuencias de las profilinas

En el caso de las secuencias nucleotídicas, el examen de la variabilidad se llevó a cabo mediante un diagrama de entropía, como una medida de la perdida de información (perdida de bits de información) o pérdida de previsibilidad de encontrar un nucleótido determinado en una posición (Pierce J.R 1980, Schneider & Stephens 1990). Dicho diagrama y sus valores de entropía se obtuvieron mediante el software Bioedit (Sequence Alignment Editor) v7.0.5.3 (Hall 1999). Estas medidas dan una idea de la variabilidad dentro de cada posición del alineamiento múltiple.

En el caso de las secuencias aminoacídicas, calculamos la variabilidad de cada posición de la secuencia (%) como el resultado de dividir el número de aminoácidos distintos entre el número del más común en cada posición descrito en Radauer et al. (2006).

C) Análisis de las características físico-químicas de las profilinas

Todos los parámetros físico-químicos de las profilinas de polen obtenidas en esta tesis, así como las previamente secuenciadas, se han obtenido mediante las herramientas ProtParam y ProtScale (Gasteiger et al. 2005), del servicio de proteómica del Instituto Suizo de Bioinformática (SIB), “The ExPASy” (expert protein analysis system) <http://ca.expasy.org/tools/>.

D) Análisis de los motivos para posibles modificaciones postraduccionales

El análisis de las regiones de profilinas en las que puede existir modificaciones postraduccionales se realizó mediante el uso de la herramientas como ScanProsite <http://www.expasy.org/tools/scanprosite/>, del servicio de proteómica ExPASy, <http://www.expasy.org> (de Castro et al. 2006).

El análisis de las posibles fosforilaciones en residuos de serina, treonina o tirosina de proteínas de organismos eucariotas, se ha realizado mediante el programa NETPhos 1.0, <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos> (University of Denmark) (Blom 2004).

Las posibles proteínas quinasas que actuarían en estos y otros residuos se han predicho mediante el programa NETPhosK v1.0 (Blom 2004) (fosforilación de proteínas eucariotas) del mismo servidor. NetPhosK se basa en redes neuronales de sitios de fosforilación de proteínas quinasa eucariotas, donde actualmente están consideradas las siguientes: PKA, PKC, PKG, CKII, Cdc2, CaM-II, ATM, DNA PK, Cdk5, p38 MAPK, GSK3, CKI, PKB, RSK, INSR, EGFR y Src.

E) Predicción de la estructura bidimensional de las profilinas

La predicción de la estructura 2D de profilinas de cada especie, obtenida a partir de la secuencia de aminoácidos deducida de cada clón, se llevó a cabo mediante el programa SSpro 4.0, <http://www.igb.uci.edu/servers/psss.html>. Se trata de un programa que utiliza redes neuronales de datos de otras proteínas para esta aproximación (Pollastry et al. 2002, Cheng et al. 2005).

F) Predicción de la estructura tridimensional de las profilinas

La predicción de la estructura 3D de cada una de las secuencias de aminoácidos deducidas de los clones obtenidos de las secuencias profilinas, se llevó a cabo mediante la herramienta Workspace del servicio de modelización automática de la estructura de proteínas de SWISS-MODEL, accesible mediante el servidor de ExPASy (Schwede et al. 2003).

http://swissmodel.expasy.org/workspace/index.php?func=modelling_simple1/

<http://swissmodel.expasy.org/SWISS-MODEL.html/>

Dicha predicción es posible gracias a la estructura 3D ya conocida de otras proteínas cristalizadas y de las que existe su archivo PDB (Protein Data Bank), <http://www.pdb.org>. Una de las condiciones para llevar a cabo esto es que la proteína a analizar en cuestión posea una similitud de secuencia mayor del 50% con las homólogas que ya existen en la base de datos, condición que cumplen todas las secuencias de profilinas descritas en este trabajo.

De este modo obtuvimos el modelo tridimensional proteico (PDB) que mejor se ajustaba en cada caso, al comparar con todas las secuencias de profilinas de la base de datos GenBankTM/EMBL.

G) Predicción de la formación de puentes disulfuro

La posible formación de puentes disulfuro, su número y el estado de cada cisteína en relación a los pares que están unidas, fue analizada con la ayuda del programa DIpro (Baldi et al. 2005, Cheng et al. 2006), <http://scratch.proteomics.ics.uci.edu/>

H) Análisis de los picos de antigenicidad elevada de las profilinas

Se ha llevado a cabo un análisis de distintos parámetros que caracterizan las regiones epitópicas de las proteínas, con el uso de la herramienta peptideselectTM design tool (Invitrogen), <http://www.invitrogen.com/content.cfm?pageid=11037>

I) Predicción y análisis de los residuos de anclaje para los alelos del complejo principal de histocompatibilidad clase II. Receptores de células T

La predicción de las regiones de unión a los alelos mas comunes del HLA-DR (el sistema de antígeno leucocitario humano, nombre referido al complejo principal de histocompatibilidad en humanos o MHC) de una secuencia antigénica (primer residuo de cada nonapéptido), se llevó a cabo mediante el uso del programa T-EPIPOPE, <http://www.imtech.res.in/raghava/propred/index.html>, basado en matrices cuantitativas y redes neuronales, que cubren una gran proporción de los péptidos que

unen al HLA humano de clase II (Singh & Raghava 2001). El nivel umbral de predicción utilizado fue del 5 %. Para identificar ligandos HLA-DR dentro de las secuencias de profilinas de las cinco especies, se seleccionaron péptidos que unen al menos 2 halotipos diferentes en la mayoría de las secuencias analizadas.

J) Construcción y análisis de epitopos conformacionales

La predicción de epitopos conformacionales potenciales en la superficie de las profilinas, se realizó utilizando como modelos las tres proteínas denominadas Hev b 8, Bet v 2 y Ara t 8, <http://www.pdb.org>, las cuales fueron las que mayor homología poseían dentro de las profilinas de las especies analizadas.

El procedimiento para determinar dichos epitopos se llevó a cabo de la siguiente forma: Las áreas de superficie accesible al solvente (ASAS) de cada residuo se calcularon usando el programa GETAREA v1.1 (Surface Area and Solvation Energy of Macromolecules, SASA) (Fraczkiewicz & Braun 1996, 1998), http://pauli.utmb.edu/cgi-bin/get_a_form.tcl, donde los valores relativos se calcularon en relación a una media de ASAS de cada residuo en el péptido GXG, siendo X cada aminoácido de la secuencia de profilinas. Las distancias entre residuos se calcularon usando el programa SWISS-PDB viewer v 3.7 (Guex & Peitsch 1997), <http://www.expasy.org/spdbv>.

Los residuos que contribuyen a los epitopos conformacionales fueron predichos por un algoritmo basado en la estructura 3D de proteínas y modificado respecto al ya publicado (Kolaskar & Kulkarni-Kale 1999):

1. Se eligieron los residuos sobresalientes de la estructura 3D con un ASAS relativo mayor del 75% como centro del epitopo. Si dos residuos que cumplieran esta condición se encontraban a una distancia menor o igual a 0.5 nm, se combinarían para formar un epitopo único.
2. Se seleccionaron también para formar parte del epitopo, todos aquellos residuos en un radio de 1 nm con un ASAS mayor del 20%. Esta distancia se eligió porque es el

tamaño típico de la superficie de contacto entre un antígeno y un anticuerpo (Laver 1990).

3. Finalmente, los aminoácidos individuales que se encuentren entre otros dos residuos o fragmentos peptídicos que cumplan el punto 2 y aunque ellos mismo no lo hicieran, se incluyen en el epitopo, debido a que se asume que los residuos de este tipo afectan la conformación de los aminoácidos inmediatamente cercanos a ellos.

K) Predicción de la localización celular de profilinas

Se realizó una predicción de la localización celular de profilinas, dependiendo de la secuencia primaria de estas proteínas. Esta se realizó mediante los programas TargetP v1.1 server (Universidad de Dinamarca) (Emanuelsson et al. 2007), <http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP>, y PSORT v2.0 (Nakai & Kanehisa 1991), <http://psort.org>. El programa PSORT es capaz de llevar a cabo una predicción de la localización de las proteínas analizadas dentro de determinados regiones subcelulares: citoplasma, mitocondrias, cloroplastos, membrana plasmática (parte citoplasmática o extracelular) y espacio extracelular, etc...

En segundo lugar se llevó a cabo dicha predicción en función de la posesión de un péptido señal por parte de la proteína, que le hiciera seguir o no una vía de secreción dentro de orgánulos celulares. Para ello se utilizó el programa SignalP V1.1 (Emanuelsson et al. 2007), <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>.

La predicción de localización nuclear de las profilinas se llevó a cabo mediante el programa Nucleo v1.0 (Hawkins et al. 2007), <http://pprowler.itee.uq.edu.au/Nucleo-Release-1.0/index.jsp/>.

3.2.3. Análisis estadísticos

El análisis de la varianza de una vía (*One-way* ANOVA) está basado en el Test de distribución de la F de Fisher-Snedecor (Fisher 1928, Mehta & Patel 1997), el cual sólo

indica que uno de los grupos establecidos por la variable independiente difiere significativamente de los demás. Por ello, para establecer que grupos difieren entre si, es necesario realizar pruebas de rango *post hoc* (*a posteriori*) y comparaciones múltiples por parejas.

El estadístico F del ANOVA de un factor se basa en el cumplimiento de dos supuestos fundamentales: normalidad y homocedasticidad.

Normalidad significa que la variable dependiente se distribuye normalmente en los grupos definidos por la variable independiente. Si para las variables dependientes (polimorfismo de ambos tipos de secuencias y reactividad a diferentes antisueros) se está trabajando con grupos grandes, es posible asumir que el estadístico F se comporta razonablemente bien incluso para estas distribuciones alejadas de la normalidad. Para evaluar la normalidad de las poblaciones de datos se utilizó el test de Shapiro-Wilk (Shapiro & Wilk 1965).

Homocedasticidad o igualdad de varianzas significa que los grupos definidos por la variable independiente poseen la misma varianza. Para contrastar esta homogeneidad se utiliza el test de Levene (Levene H. 1960). Si las varianzas difieren significativamente, para realizar las comparaciones múltiples es necesario seleccionar un test que no asuma la igualdad de varianzas.

En este punto surgen dos posibilidades: emplear test paramétricos que asuman la no homogeneidad de las varianzas, o recurrir a los test no paramétricos, especialmente indicados para poblaciones de datos pequeñas y/o grupos desiguales en número de datos.

El Test de Games-Howell (Games & Howell 1976), es un test paramétrico, similar al test de Tukey (Tukey 1953), que permite determinar la existencia de diferencias significativas en base al establecimiento de rangos de datos dentro de los grupos (especies), asumiendo la no homogeneidad entre las varianzas. Además, de entre las posibles pruebas de comparaciones múltiples que no suponen igualdad de varianzas,

es el que presenta mayor potencia estadística (menor posibilidad de cometer un error al afirmar que no hay diferencias significativas).

En todos los casos se seleccionó un nivel de confianza del 95%.

A) Determinación de las diferencias entre las especies analizadas en función del polimorfismo de sus secuencias nucleotídicas y aminoacídicas.

Con el objetivo de establecer si existen diferencias estadísticamente significativas entre las cinco especies estudiadas en función del polimorfismo de sus secuencias, se llevaron a cabo análisis de la varianza de una vía (One-way ANOVA) de los resultados correspondientes a dichas variables.

Las comparaciones múltiples de las cinco especies en función del polimorfismo de ambos tipos de secuencias o de las reactividades de los diferentes antisueros, se llevaron a cabo mediante el Test de Games-Howell.

B) Determinación de las diferencias entre las especie/cultivares y antisueros.

Los datos obtenidos de las medidas de reactividad de los diferentes sueros frente a extractos proteicos de 24 cultivares de olivo (Fig. 42 A-E) y frente a extractos proteicos de las cinco especies analizadas (Fig. 44 A-E), se sometieron al análisis de la varianza de una vía para determinar en primer lugar si existen diferencias estadísticamente significativas entre las especies estudiadas o entre los diferentes cultivares analizados para determinar si existen diferencias estadísticamente significativas para los cinco antisueros utilizados.

Las comparaciones múltiples se llevaron a cabo mediante el Test de Games-Howell en función de las premisas descritas en el apartado anterior.

3.2.4. Análisis de proteínas

A) Extracción de proteínas totales para SDS-PAGE

Polen maduro

Se realizaron dos extracciones consecutivas, en las que en primer lugar se añadió 0.5 g de polen maduro a 5 ml de una solución de extracción (a). Posteriormente se añadió a dicha mezcla 100 µl de fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) (b) y una mezcla de inhibidores de proteasas específicos para plantas (Sigma), ambos en una proporción de 1:200 (v/v). Las muestras se incubaron durante 4 h a 4 °C en agitación constante.

Para la clarificación del sobrenadante las muestras se centrifugaron a 12.000 x g durante 30 min a 4 °C.

El clarificado se separó y se guardó a -20 °C hasta su posterior uso, repitiendo el mismo proceso de extracción con el precipitado, pero manteniéndolo en agitación constante durante toda la noche a 4 °C, obteniéndose un clarificado de la misma forma y mezclándolo con el obtenido el día anterior, para posteriormente filtrarlos a través de una membrana de 0.2 µm y almacenarlos en alícuotas a -20 °C hasta su posterior uso.

Reactivos

(a) Solución de extracción: tampón fosfato salino (PBS) a pH 7.4 (NaCl 140 mM, KCl 2.7 mM, Na₂HPO₄ 8.15 mM y KH₂PO₄ 1.8 mM).

(b) PMSF 100 mM: preparar en isopropanol y almacenar a -20 °C. Agente inhibidor de proteasas. Antes de usar, calentar con el fin de disolver los cristales que se forman durante su almacenamiento prolongado a bajas temperaturas.

Semillas (endospermo y cotiledón)

Tanto el cotiledón como el endospermo de semillas maduras fueron molidos separadamente, 0.5 g de cada material, en un mortero con la adición frecuente de N₂ líquido, hasta obtener un polvo muy fino, al cual posteriormente se le añadieron 5 ml de un tampón de extracción (a).

Tras la agitación vigorosa con vórtex hasta obtener una solución homogénea, la resuspensión fue centrifugada a 10.000 x g durante 15 min a 4 °C.

El sobrenadante clarificado obtenido fue filtrado a través de un filtro de 0,2 µm, almacenándolo en alícuotas a -20 °C hasta su posterior uso

Reactivos

(a) Tampón de extracción: Tris (hidroximetil)-aminometano (Tris-base) 1M pH 7.0, dodecilsulfato sódico (SDS) 7.7% y β -mercaptoetanol (β -ME) 10 %.

Notas

1. β -ME: agente reductor que rompe puentes disulfuro intra o intercatenarios.

2. SDS: detergente iónico que posee carga negativa y un fuerte carácter desnaturalizante de proteínas.

B) Extracción de proteínas totales de polen maduro para electroforesis bidimensional (2D)

En un mortero previamente enfriado con nitrógeno líquido, se homogeneizó 0.1 g de polen hasta obtener un polvillo muy fino, que fue resuspendido en 1.5 ml de tampón de lisis (a). Posteriormente y con el fin de eliminar el exceso de compuestos fenólicos, se le añadió a la muestra PVP (b). Por último, las proteínas fueron precipitadas en 10 volúmenes de una solución de precipitación (c) preenfriada a - 20 °C durante 1 hora. El precipitado fue resuspendido en 0.5 ml de tampón de solubilización (d) y ultra centrífugado durante 1 hora a 45000 x g a 4 °C para eliminar las partículas insolubles.

Las muestras fueron almacenadas a -80 °C hasta su posterior uso.

Reactivos

(a) Tampón de lisis: urea 7 M, tiourea 2 M, CHAPS 4% (p/v), SDS 3% (p/v), DTT 60 mM, anfolitos (pH 3–10) (Amersham Biosciences) 0.5% (v/v) y azul de bromofenol 0.01% (p/v).

(b) Polivinilpirrolidona (PVP) 5 % (p/v)

(c) Solución de precipitación: ácido tricloroacético (TCA) 20% (p/v) y DTT 0.2% (p/v)

(d) Tampón de solubilización: urea 7 M, tiourea 2 M, CHAPS 4% (p/v), DTT 60 mM, anfolitos (pH 3–10) (Amersham Biosciences) 0.5% (v/v) y azul de bromofenol 0.01% (p/v).

Notas

1. 3-(cloroamidopropil)-dimetilamonio-1-propanosulfato (CHAPS): es un detergente anfótero, débilmente desnaturalizante que no afecta a la carga de las proteínas. El CHAPS solubiliza muy bien las proteínas de membrana. Es compatible con la utilización de urea y su uso es frecuente como alternativa a los detergentes no iónicos.

2. Anfolitos: moléculas polares eléctricamente neutras que facilitan la formación de un gradiente estable de pH, esencial para el isoelectroenfoque (IEE). Son compuestos anfóteros de bajo peso molecular (anfolitos

portadores), que son pequeñas poliaminas (alrededor de 750 kDa) con abundantes grupos ácidos y básicos, con un pI que abarca desde 2.5 hasta 11.0, con gran capacidad tamponante cerca de su pI y con una gran solubilidad y conductividad.

3. Urea y tiourea: agentes desnaturalizantes de proteínas. La urea interfiere con las reacciones hidrofóbicas de las proteínas y debe incluirse en el tampón de la muestra y en todos los que se empleen para la preparación de los geles.

4. Ditiotreitol (DTT) y β -mercaptoetanol (β -ME): En algunas proteínas hay puentes disulfuro entre los residuos de cisteína (para formar cistinas) de una misma cadena polipeptídica (puentes intracatenarios) o de diferentes cadenas (puentes intercatenarios) de algunas proteínas con estructura cuaternaria. Estos puentes se pueden romper mediante tratamiento con determinados agentes reductores, como por ejemplo, el β -ME o el DTT.

5. Dodecilsulfato sódico o lauril sulfato sódico (SDS): Detergentes iónicos que poseen carga negativa y un fuerte carácter desnaturalizante de proteínas. La molécula de SDS proporciona una carga negativa, por lo que los complejos SDS-proteína están cargados negativamente de forma uniforme y la separación de los complejos SDS-proteína se realizarán estrictamente según su tamaño molecular.

C) Valoración de la concentración de proteínas por el método de Bradford

El procedimiento de cuantificación espectrofotométrica de proteínas está basado en el método diseñado por Bradford (1976) siguiendo las instrucciones del fabricante Bio-Rad protein assay (Bio-Rad, USA), y utilizando BSA para la elaboración de la curva patrón.

D) Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Esta técnica se llevó a cabo según el método clásico descrito por Laemmli (1970), con geles preparados al 12% (gel separador) y al 4 % (gel concentrador) utilizando un equipo de electroforesis Mini-Protean III (BioRad)

Para la preparación de las muestras, se mezclaron entre 25-50 μ g de proteína total con un tampón de carga 5x (a) en relación 5:1. Las muestras se sometieron a hervido para su desnaturalización durante 5 min a 95 °C en un baño termostatizado.

Los geles con las muestras se sometieron a una corriente inicial de 30 v, hasta que las muestras estuvieran dentro del gel separador, para posteriormente someterlas a un voltaje de 200 v hasta el final de la carrera electroforética.

Reactivos

- (a) Tampón de carga 5x: Tris-base 0.5 M pH= 6.8, SDS 10 %, glicerina 50 %, DTT 7.7 % y azul de bromofenol 0.05 %.
- (b) Tampones de electroforesis y tampón de gel:
- (c) Acrilamida (49.5% T, 3% C) (BioRad, USA): disolver 48 g de acrilamida y 1.5 g de bisacrilamida en 100 ml agua.

E) Electroforesis bidimensional o 2D en geles de poliacrilamida.

Para llevar a cabo esta técnica, se utilizó un equipo IPGPhor (Amersham-Pharmacia Biotech) para la primera etapa (hidratación en gel e isolectroenfoque), y un equipo de electroforesis PROTEAN II xi Cell (BioRad) para la segunda dimensión. Este equipo se acopló a un baño termostatizado de recirculación de agua para el mantenimiento constante de la temperatura de los geles. Las muestras a analizar fueron aplicadas a una tira de gel deshidratado de poliacrilamida (Immobiline DryStrip -pH 3-10- NL, Amersham-Pharmacia Biotech) durante 12 horas a 30 V. Para la etapa de isolectroenfoque, que fue llevada a cabo a 20 °C en el mismo sistema IPGPhor, se aplicó a las tiras de gel una corriente de 300 V (1h) y 1000 V (1h), seguido de un incremento lineal desde 1000 a 8000 V, voltaje que llegaba hasta un total de 85 kWh.

Una vez focalizado el gel, la tira se colocó en la parte superior de un gel de poliacrilamida (12% T, 2.67% C).

La migración a lo largo de la segunda dimensión fue llevada a cabo usando tampón de separación (a) a 20 mA/gel durante 1 h y 40 mA/gel durante otras 4 h.

Después de haber finalizado la segunda dimensión, el gel fue fijado y teñido con la técnica de tinción de plata (Rabilloud et al. 1992). Posteriormente se obtuvo la imagen del gel digitalizada a 87.4 μm de resolución usando un escáner PowerLook III (UMAX

Systems GmbH, Germany) y se procesó la imagen mediante el software MagicScan (UMAX Systems GmbH, Germany).

Reactivos

(a) Tampón de separación: 0.192 M Glicina, 0.025 M Tris-base y 0.01 % SDS

Notas

1. La reproducibilidad del sistema 2D fue confirmada mediante la realización de al menos dos experimentos independientes.
2. La masa molecular experimental de cada spot fue calibrada usando un *standard* comercial (Precision Plus Protein Standards, BioRad).

Tinción de plata para geles de poliacrilamida

La tinción con plata se realizó según el método de Rabilloud 1992:

1. Fijación: 1h a temperatura ambiente en solución de fijación (a).
2. Sensibilización: 6h a temperatura ambiente en solución de sensibilización (b). La bandeja conteniendo el gel se cubrió con papel de aluminio para proteger la solución de la luz.
3. Lavados: 6 lavados de 20 min cada uno con agua miliQ
4. Tinción: 1h a temperatura ambiente en solución de tinción (c).
5. Lavados: un lavado de 10 min con agua miliQ
6. Revelado: 5 min a temperatura ambiente en solución de desarrollo (d).
7. Parada de la reacción: el gel se puede dejar en solución de parada de reacción hasta 3 días a temperatura ambiente, en una solución de parada (e).

Después del proceso, se escanearon los geles y se guardaron después de secar.

Reactivos

(a) Solución de fijación: Etanol 50 % (v/v), ácido acético glacial 16,67%

(b) Solución de sensibilización: Etanol 20 % (v/v), acetato potásico 125 mM, tetratiónato potásico 2.5 mM, glutaraldehido 0.5 % (w/v)

(c) Solución de tinción: nitrato de plata 3.65 mM, formaldehído al 0.026% (w/v)

(d) Solución de revelado: carbonato potásico 54.3 mM, formaldehído 0.0185 % (w/v), tiosulfato sódico pentahidratado 0.05 mM

(e) Solución de parada: Tris-base 0.41 M, ácido acético glacial 40%

Notas

Es conveniente el uso de reactivos puros (grado analítico) para realizar esta técnica, así como agua de calidad miliQ. Los recipientes en que se preparen las soluciones han de estar muy limpios y libres de polvo, así como usar guantes siempre para el manejo de los geles.

Secado de geles

Con objeto de conservar los geles durante largo tiempo, estos fueron lavados con H₂O destilada durante 5 min dejándolos en agitación durante una noche en una solución de glicerol al 3 % (v/v). Posteriormente, se colocaron entre 2 piezas de plástico poroso (papel celofán) empapado en la misma solución de glicerina al 3% en H₂O y se dejaron secar a T^a ambiente en un marco de metacrilato.

F) Transferencia de geles SDS-PAGE a membranas de PVDF

El sistema de transferencia sumergido se utilizó para geles de poliacrilamida obtenidos mediante el sistema miniProteanIII (BioRad). La transferencia fue llevada a cabo mediante el sistema Mini Trans-Blot (BioRad) según las instrucciones del fabricante.

Para realizar la transferencia de geles 2D se utilizó el sistema semiseco (BioRad).

En ambos casos y de forma previa a la transferencia, se procedió a equilibrar el gel de poliacrilamida en tampón de transferencia **(a)** ó **(b)** durante 30 min. Para la transferencia se usó en ambos casos membrana de fluoruro de polivinil pirrolidona (PVDF) (BiotraceTM 0.45 mm, PALL)

En el primer caso, se aplicó un voltaje constante de 120 V durante 90 min a T^a ambiente.

En el segundo caso, la transferencia se realizó a una intensidad de corriente de 1.9 -2.5 mA por cm² de área del gel durante 60 min.

Reactivos

(a) tampón de transferencia sistema sumergido: Tris-base 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20 %. El pH debe de estar próximo a 8.3

(b) tampón de transferencia sistema semiseco: Tris-base 48 mM pH 9.2, glicina 39 mM, Metanol 20%

Notas

La membrana de PVDF es muy hidrófoba y es necesario hidratarla con metanol y posteriormente con agua. Usar siempre guantes y evitar tocar la membrana con los dedos.

G) Detección de proteínas mediante Inmunoblot

Después de la transferencia, las membranas se equilibraron en tampón TBST (**a**) durante 5 min, y posteriormente fueron bloqueadas durante 2h a temperatura ambiente con una solución de bloqueo (**b**). Todas las etapas del proceso se realizaron en agitación suave. A continuación se añadió el anticuerpo primario correspondiente (ver tabla 4) diluido en la misma solución de bloqueo. Tras incubar durante 4 h a temperatura ambiente, las membranas se lavaron dos veces durante 15 min con una solución de TBST. Posteriormente, las membranas se incubaron durante 1h a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario correspondiente, en una dilución 1:5000 en tampón TBST. Se usó indistintamente un anticuerpo secundario de ratón anti-IgG de conejo, conjugado con fosfatasa alcalina (Sigma). Las membranas fueron lavadas cuatro veces durante 15 min con TBST, para ser reveladas posteriormente.

Reactivos

(a) Solución de TBST: Tris-base 50 mM y NaCl 0.2M. Ajustar el pH a 7.5 y añadir Tween-20 al 0.05 %

(b) Solución de bloqueo: BSA 10 % en TBST.

Notas

1. Tween-20: detergente que se utiliza para evitar las uniones inespecíficas entre los anticuerpos.

2. Anticuerpos primarios utilizados:

Anti-Ole e 2: antisuero (ac.) policlonal fabricado en conejo frente al fragmento aminoacídico AQSATFPQFKPEEM de la proteína Ole e 2 de olivo (Morales et al. 2007) (dilución 1:20000)

Anti-ZmPRA: ac policlonal desarrollado en conejo frente a las profilinas nativas de maíz (dilución 1:500)

Anti-ZmI5: ac policlonal desarrollado en conejo frente a la isoforma 5 de profilina de maíz (dilución 1:500)

Anti-ZmI4: ac policlonal desarrollado en conejo frente a la isoforma 4 de profilina de maíz (dilución 1:500)

Anti-ZmI3: ac policlonal desarrollado en conejo frente a la isoforma 3 de profilina de maíz (dilución 1:500)

H) Revelado de la actividad fosfatasa alcalina mediante NBT/BCIP

Tras incubar con el anticuerpo secundario y lavar la membrana con tampón de lavado (a) dos veces durante 15 min a T^a ambiente la membrana se equilibró en tampón de activación (b) durante 2-5 min.

Para revelar la actividad fosfatasa alcalina, se adicionó a la membrana 1 ml de solución de NBT-BCIP (Amresco) a temperatura ambiente durante 5 a 10 min o hasta que apareció la señal.

La reacción de la fosfatasa alcalina fue detenida mediante un corto lavado con TBST

Reactivos

(a) Tampón de lavado: ácido maleico 0.1 M, cloruro sódico 0.15 M y Tween-20 al 0.3 % (v/v), pH 7.5.

(b) Tampón de activación de la fosfatasa alcalina: cloruro sódico 100 mM, cloruro de magnesio 5 mM y Tris-base 100 mM, pH 9.5.

Notas

La base de la reacción colorimétrica se encuentra en que la desfosforilación del substrato BCIP por el enzima fosfatasa alcalina origina la aparición del producto BCI que se une al NBT y forma un compuesto insoluble de color violáceo.

I) Detección de glicoproteínas con concanavalina A sobre membranas

La membrana se equilibró con tampón TBST (a) durante 5 min y se bloqueó a continuación con una solución de bloqueo (b) durante 1 h a temperatura ambiente.

La lectina concanavalina A conjugada con peroxidasa (Sigma) se diluyó hasta una concentración final de 20 mg/ml en tampón TBST. Con ella se incubó la membrana durante 4 h a temperatura ambiente.

Tras este paso, la membrana se lavó dos veces durante 15 min con TBST y se incubó con 5 ml diaminobenzidina (DAB) (Sigma) a T^a ambiente hasta que apareció la señal.

La reacción de revelado fue detenida mediante un corto lavado con TBST.

Reactivos

(a) TBST: Tris-base 0.01M, cloruro sódico 0.15M, Tween-20 al 0.05%

(b) Solución de bloqueo: BSA 3 % en TBST.

Notas

La lectina concanavalina A se une específicamente a los azúcares (manosa) de las glicoproteínas

J) Germinación del polen de olivo

El polen de la variedad Picual (0.05 g/placa), se puso en cámara de humedad durante 30 min a 30 °C, para posteriormente pasarlo a una caja Petri conteniendo 10 ml de medio de germinación (a) (M'rani-Alaoui 2000). Las caja Petri se mantuvieron a 25 °C en oscuridad y se tomaron muestras de polen a diferentes tiempos de germinación (5 min, 1, 4, 7 y 18 h); Finalmente el polen fue separado por centrifugación (1000xg, 20 sec).

Reactivos

(a) medio de germinación: sacarosa 10% (p/v), Ca(NO₃)₂ 0.03% (p/v), KNO₃ 0.01% (p/v), MgSO₄ 0.02% (p/v), HBO₃ 0.03% (p/v)

K) Expresión y purificación de proteínas recombinantes

Las proteínas clonadas, expresar y purificar fueron las isoformas 2 y 4 de profilinas de *Arabidopsis thaliana*, la isoforma I de profilina humana, y la vilina humana. Con excepción de la vilina humana, que fue clonada en el vector de expresión pGEX-KG (Pharmacia). El resto de secuencias fueron clonadas en el vector de expresión pET-23d (Novagen). En el primero de los casos (pGEX-KG), el producto de expresión resultante se encuentra unido a Glutatión S-transferasa (GST), mientras que el sistema pET-23d genera productos de fusión conjugados con una cola de poli-Proline.

Los vectores de expresión utilizados y las estrategias de clonación llevada a cabo para las diferentes proteínas se resumen a continuación:

En primer lugar se obtuvieron los plásmidos con los genes de interés clonados en ellos (isoforma II y IV de profilina de *Arabidopsis thaliana*) mediante su solicitud a TAIR (The Arabidopsis Information Resource), <http://www.arabidopsis.org/index.jsp> (The Ohio State University, Columbus). La construcción génica de la isoforma I de la profilina humana fue suplementado por el Dr. S.Almo (Albert Einstein College of Medicine, The Bronx, NY, U.S.A.), y el de la vilina humana por el Dr S. Huang (Purdue University,

IN USA). En el caso de las 3 isoformas de profilinas, se amplificaron mediante PCR con cebadores adecuados en cada uno de los casos, con una secuencia *in frame* con la de los vectores de expresión en los que posteriormente fueran a ser clonadas (Fig. 9).

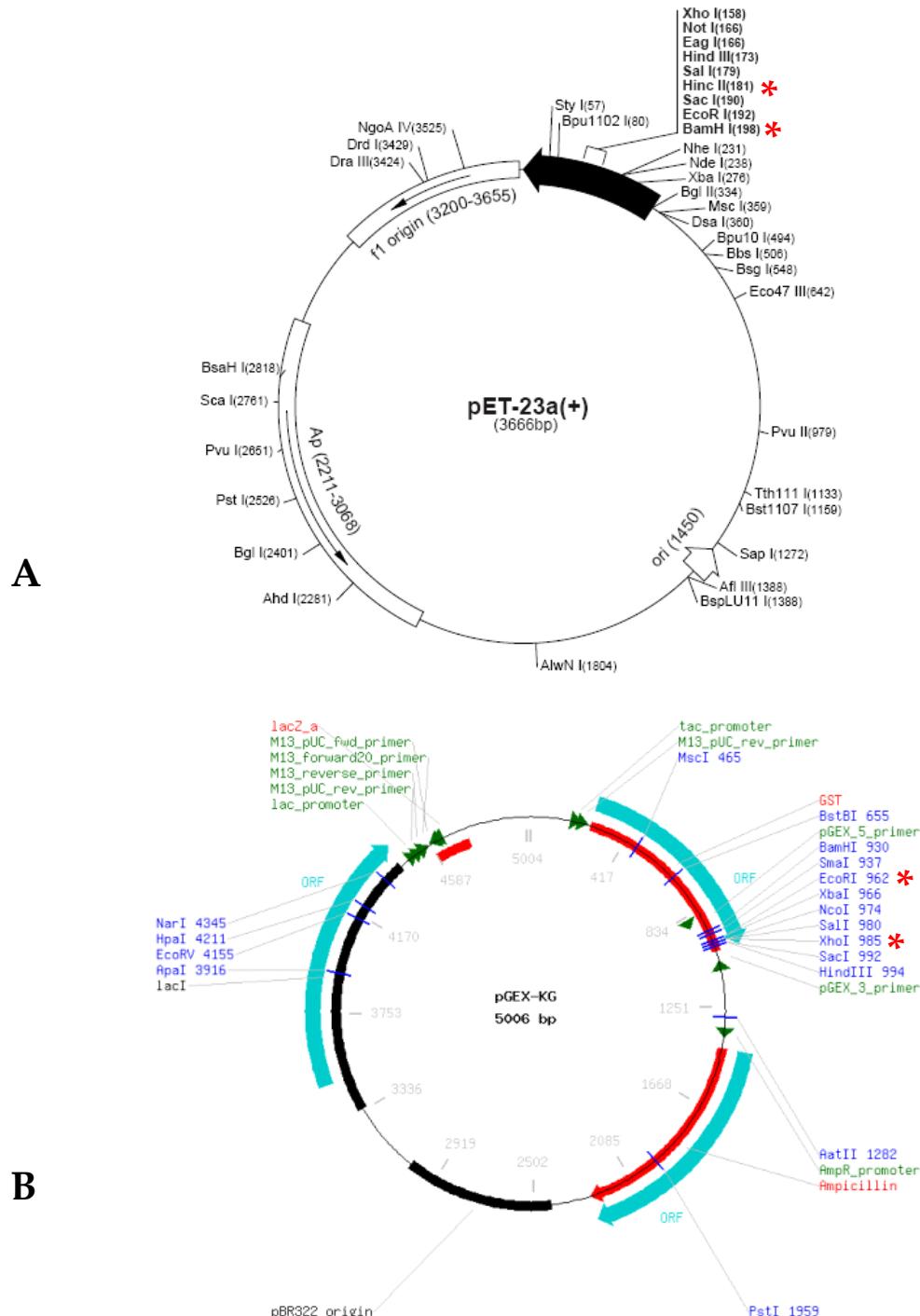


Figura 9. Vectores utilizados para clonar los diferentes genes, que posteriormente se expresaran. En el caso de las 3 isoformas de profilinas se utilizó el vector pET-23d, una

variante del que se muestra en la figura (A), en el que se ha sustituido una diana NdeI (posición 238) por NcoI en el T7-Tag; para la vilina humana se utilizó el vector pGEX-KG (B)

Los cebadores que servía de *sense* en la reacción de PCR poseían una diana para la enzima de restricción BamHI y los cebadores que servían como *antisense* en la reacción de PCR contenían una diana para el enzima de restricción HindIII. En el caso de la vilina humana, las dianas de restricción fueron EcoRI y XhoI para los cebadores *sense* y *antisense* respectivamente.

En todos los casos, tras la purificación de los productos de PCR, éstos fueron clonados en un vector linearizado pCR2.1 (Invitrogen). Las diferentes construcciones se utilizaron para transformar células competentes XL-1Blue (Stratagene). Tras la selección visual en placa (sistema LacZ-colonias blancas/azules) de las células transformadas con dichas construcciones, se picaron algunas de ellas para su posterior crecimiento en un medio selectivo con los antibióticos adecuados. De estos cultivos se obtuvo el ADN plasmídico con el gen de interés en cada caso, mediante un sistema Midiprep (promega), para posteriormente separar los genes mediante digestión enzimática adecuadas, dependiendo de cada construcción génica (BamHI-HindIII en el caso de las 3 isoformas de profilinas; EcoRI-XhoI en el caso de la vilina humana). Tras la purificación de estos fragmentos de los geles de agarosa, éstos se utilizaron para la subclonación en los respectivos vectores de expresión pET-2d (isoformas II y IV de *Arabidopsis thaliana* e isoforma I humana) y pGEX-KG (vilina humana) y posterior transformación de células competentes BL21 (DE3) (Novagen) y crecimiento de estas en un medio suplementado con ampicilina (100 µg/ml).

Una vez obtenidas las construcciones génicas de esta forma, en las que se comprobó mediante secuenciación que el marco de lectura abierto de los genes de interés se encontraba ubicados correctamente, se llevó a cabo la siguiente etapa que consistió en la expresión de dichas proteínas. Para ello se utilizaron los procedimientos descritos y los reactivos presentes en los correspondientes *kits* comerciales de expresión. Brevemente: se preparó un cultivo de 50 ml de medio LB y ampicilina 100 µg/ml, en el

que se creció toda la noche en agitación constante de 240 r.p.m. y 37°C de temperatura, uno de los clones de interés. A la mañana siguiente se inocularon 4 litros de medio LB con ampicilina 100 µg/ml, repartidos en frascos Erlenmeyer de 500 ml con el cultivo crecido toda la noche en una dilución 1:50. Dichos cultivos se pusieron a crecer durante 2 h a 37 °C en agitación constante de 240 r.p.m. y 37 °C de temperatura. Posteriormente se indujo la expresión de dicho gen añadiendo IPTG en una concentración final de 0.5 mM, continuando la agitación constante y la misma temperatura que en la etapa de incubación anterior.

Tras este periodo de inducción se recolectaron las células del cultivo mediante centrifugación a 6000 x g en una centrifuga con rotor SS-34 (RC5C, Sorvall) y dichas células se guardaron a -80 °C hasta su posterior uso.

Por último y para llevar a cabo la etapa de purificación de profilinas, se siguió el siguiente protocolo:

1. Se resuspendió el precipitado de bacterias en 25 ml de tampón I (**a**), al que se le agregó 25 µl de un cocktail de inhibidor de proteasas (**c**) y 250 µl de PMSF (**b**).
2. Posteriormente se sonicaron las muestras 5 veces durante 20 segundos en hielo.
3. Las muestras se centrifugaron a 15000 r.p.m. durante 25 min a 4 °C, y se recogió el sobrenadante.
4. Nuevamente se centrifugó el sobrenadante durante 25 min a 19000 rpm a 4°C.
5. Una vez clarificadas las muestras, fueron aplicadas a una columna de PLP-sefarosa preequilibrada con tampón I. De esta forma las profilinas se quedarán unidas al PLP.
6. A continuación se equilibró la columna aplicando 3 volúmenes de cama de columna de tampón I.
7. Se repitió nuevamente la operación con urea 2M en tampón I. Esta operación se utiliza para limpiar la columna de proteínas unidas débilmente.
8. Posteriormente se aplicó el mismo volumen de urea 3M en tampón I.

9. Por último y para separar las profilinas de la columna, se aplicó a ésta urea 7M en tampón I, para recoger posteriormente el eluido en distintas fracciones.
10. A dichas fracciones se les midió la concentración de proteína mediante un ensayo de Bradford, para posteriormente juntar todas aquellas en que la concentración de proteína era elevada.
11. Se dializaron estas fracciones que contenían la proteína durante 2 noches en tampón I, en tubos de diálisis con un corte de peso molecular de entre 5-7 kDa.
12. Se hicieron alícuotas de dicha fracción, congelándolas en N₂-líquido y se guardaron a -80 °C hasta su posterior uso. También se corrió un gel SDS-PAGE con parte de las distintas fracciones del proceso de purificación.

En el caso de la vilina humana, el proceso de inducción de la expresión de proteínas se realizó de forma similar al caso anterior. Brevemente:

1. Tras recoger el precipitado de bacterias, éstas se resuspendieron en 50 ml de PBS (d).
2. Las células resuspendidas se sometieron a sonicación 5 veces durante 20 segundos en hielo.
3. Tras clarificar mediante centrifugación como se describe anteriormente, se mezcló el sobrenadante con una resina de afinidad conjugada con glutatión. Ésta mezcla se incubó durante 30 min a temperatura ambiente.
4. La mezcla se dispensó en una columna, a través de la cual se dejó pasar el sobrenadante.
5. Se equilibró la columna con 3 volúmenes de cama de PBS. Esta etapa se repitió dos veces.
6. Por último y para separar las proteínas de la columna, se aplicó a ésta un volumen de cama de tampón de elución contenido Glutatión (e). Se recogieron diferentes fracciones.

7. A dichas fracciones se les midió la concentración de proteína mediante un ensayo de Bradford, para posteriormente juntar todas aquellas en que la concentración de proteína era elevada.
8. Por último se hicieron alícuotas que fueron almacenadas a -80 °C.

Reactivos

- (a) Tampón I: Tris-HCl 20 nM, pH 7.5; KCl 150 mM y DTT 0.2 mM
- (b) PMSF 100 mM (dilución 200:1): preparar en isopropanol y almacenar a -20 °C. Agente inhibidor de proteasas. Antes de usar, calentar con el fin de disolver los cristales que se forman durante su almacenamiento prolongado a bajas temperaturas.
- (c) Cocktail inhibidor de proteasas específicas de plantas (Sigma).
- (d) PBS: NaCl 140 mM, KCL 2.7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 1.8 mM, pH 7.4. Preparar una solución 10 X para su conservación.
- (e) Tampón de elución: glutatión reducido 10mM en Tris-HCL 50 mM, pH 8.

3.2.5. Estudios celulares

A) Preparación de muestras para microscopía electrónica de transmisión

Fijación de las muestras:

El material vegetal se sumergió en una solución de fijación (a), aplicándole vacío durante 10 min. Tras incubar a 4 °C durante 4 h, se eliminó la solución de fijación y se añadió solución de fijación fresca, incubando toda la noche las muestras a 4 °C. Posteriormente, se retiró el fijador a las muestras, y se lavaron tres veces durante 30 min. a 4 °C con tampón de lavado (b).

Deshidratación de las muestras

Las muestras se sometieron a deshidratación, en una serie de diluciones de etanol:

Etanol 30 % a 4 °C durante 1 h.

Etanol 50 % a 4 °C durante 1 h.

Etanol 70 % a -20 °C durante un día.

Etanol 90 % a -20 °C durante 6 h.

Etanol 100% a -20 °C durante 2 días (2 veces).

Infiltración de las muestras en resina Unicryl

El proceso de infiltración en resina Unicryl se llevó a cabo mediante la adición de una mezcla de etanol 100 % y Unicryl (BioCell International) (1:1) a -20 °C durante dos días. Posteriormente se cambió la solución de infiltración por Unicryl puro durante una semana a -20 °C. Posteriormente, las muestras se introdujeron individualmente en cápsulas de gelatina con Unicryl, que polimerizaron con luz UV a -20 °C durante tres días.

Reactivos

- (a) fijador: paraformaldehido 4 % (p/v) y glutaraldehido 0.2 % (v/v) pH 7.2 en tampón cacodilato sódico 0.2 M.
- (b) tampón de lavado: cacodilato sódico 0.2M pH 7.2
- (c) formvar 0.3 % (p/v) en cloroformo.

B) Obtención de secciones

Se obtuvieron secciones ultrafinas (70-90nm) para microscopía electrónica de transmisión (MET), con un microtomo Ultracut E (Reichert-Jung).

Las secciones se recogieron con rejillas de níquel (200 agujeros) recubiertas con una película de formvar (a) y se dejaron secar.

Reactivos

- (a) formvar 0.3 % (p/v) en cloroformo.

C). Inmunocitoquímica para microscopía electrónica de transmisión (MET)

Las secciones ultrafinas fueron tratadas con una solución de bloqueo (a) durante 1 h a temperatura ambiente.

Posteriormente se incubaron con el anticuerpo primario correspondiente, diluido en tampón de bloqueo a temperatura ambiente entre 1 h y 2 h a una dilución 1:1000 en todos los casos. Posteriormente, las muestras se lavaron tres veces con PBS (b), durante 10 min cada una, y fueron tratadas con un anticuerpo secundario anti IgG de conejo conjugado con oro 10 nm (BioCell International), diluido 1:100 en PBS durante 45 min.

a T^a ambiente. Transcurrido este tiempo, las muestras se lavaron tres veces con PBS durante 10 min cada una y otras tres veces con H₂O miliQ durante 5 min. Para los controles se omitió la incubación con anticuerpo primario. Las rejillas fueron contrastadas con una solución de acetato de uranilo al 5% durante 20 min

Las muestras fueron observadas en un microscopio electrónico de transmisión JEM 1011 (JEOL).

Reactivos

(a) Solución de bloqueo: BSA 5 %en PBS

(b) Solución de PBS: NaCl 81.82 g/l, KCl 2.013 g/l, Na₂HPO₄ 14.20 g/l y KH₂PO₄ 2.45 g/l. Ajustar el pH a 7.4

RESULTADOS

4.1. Obtención de un número significativo de secuencias de profilinas a partir de polen maduro de *Olea europaea* de una amplia muestra del germoplasma de *Olea europaea*, así como de otras especies vegetales con relevancia alergogénica.

A partir de cDNAs obtenidos de RNA total de polen de cada una de las distintas variedades de *Olea europaea*, así como de polen de *Betula pendula*, *Corylus avellana*, *Phleum pratense* y *Zea mays*, se amplificaron secuencias de profilinas, tal y como se describe en la página 40 del capítulo de material y métodos. Se observa que en todas las variedades de *Olea europaea*, aparece una sola banda, con un tamaño de 405 pb aproximadamente (Fig. 10A). En las restantes especies, se observa también una sola banda en la amplificación, de tamaño ligeramente inferior a la descrita para *Olea europaea* (Fig. 10C).

De igual modo, fueron analizadas secuencias de profilinas amplificadas a partir de ADN genómico. En todos los casos se obtuvo una banda de un tamaño aproximadamente 405 pb (Fig. 10B).

Estas bandas fueron escindidas, y los productos de PCR fueron clonados en el vector pGEMT-easy (Promega) para su secuenciación.

Se secuenciaron entre 1 y 5 clones de profilina de polen maduro de la especie *Olea europaea* (alérgeno Ole e 2) de cada una de las 24 variedades objeto de estudio en esta tesis doctoral. De la misma forma, se obtuvieron 5 clones de profilina de polen maduro de la especie *Betula pendula* (alérgeno Bet v 2) (abedul), de los cuales sólo una secuencia (DQ650633) fue remitida a la base de datos, dado que las cinco secuencias obtenidas fueron idénticas. Igualmente se obtuvieron 10 clones de profilinas de *Corylus avellana* (alérgeno Cor a 2) (avellano), 8 clones de *Phleum pratense* (alérgeno Phl p 12) (hierba Timotea) y 7 clones de *Zea mays* (alérgeno Zea m 12) (maíz).

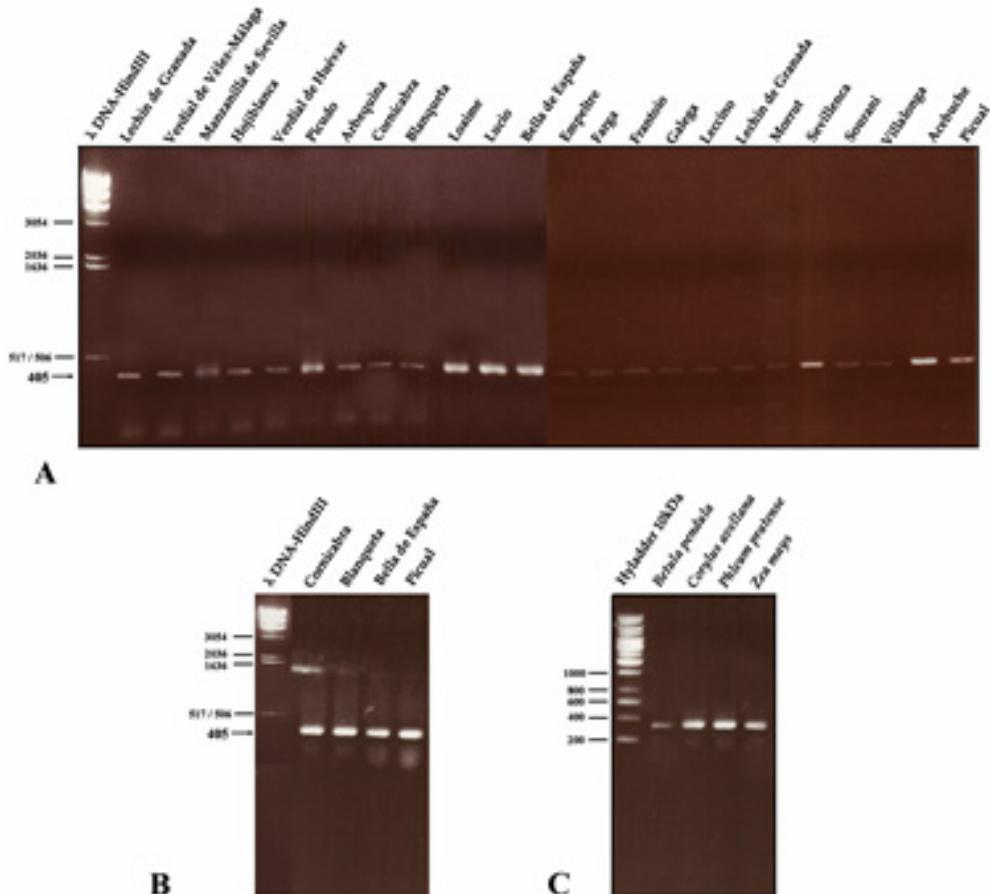


Figura 10. Análisis de la amplificación mediante RT-PCR de *Ole e 2* en 24 variedades de olivo (A) o ADN genómico (B), así como en *Betula pendula*, *Corylus avellana*, *Phleum pratense* y *Zea mays* (C).

Por último, se llevó a cabo un examen exhaustivo de todas las secuencias obtenidas (Tabla 7), además de los distintos clones ya existentes en la base de datos GenBankTM/EMBL, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, obtenidos en trabajos previos realizados en las especies que se enumeran a continuación:

1. *Olea europaea*: tres secuencias con números de acceso a la base de datos GenBankTM/EMBL Y12425, Y12429 y Y12430 (Asturias *et al.* 1997).
2. *Betula pendula*: una secuencia con número de acceso a GenBankTM/EMBL M65179 (Valenta *et al.* 1991).

3. *Phleum pratense*: cuatro secuencias con números de acceso a GenBank™/EMBL Y09456, Y09457, Y09458 (Asturias *et al.* 1997) y X77583 (Valenta *et al.* 1994).
4. *Zea mays*: tres secuencias con números de acceso a GenBank™/EMBL X73279, X73280 y X73281 (Staiger *et al.* 1993).
5. *Corylus avellana*: hasta la fecha, las primeras secuencias de profilinas reproductivas (polen) en avellano corresponden a las obtenidas en la presente tesis doctoral.

Cada una de las secuencias obtenidas fue analizada individualmente mediante el programa BLASTn (The Basic Local Alignment Search Tool) (Altschul *et al.* 1990). La Tabla 6 muestra un ejemplo de los resultados obtenidos tras una búsqueda BLASTn a partir de una de las secuencias de Ole e 2 obtenidas.

Tabla 6. Ejemplo de resultados obtenidos tras una búsqueda BLASTn en la base de datos mundial GenBank™/EMBL, analizado a partir de la secuencia número 12 de Ole e 2 de *Olea europaea* según el programa BLASTn 2.1.1

Número de acceso	Descripción	Puntuación Máxima	Puntuación total	Tamaño de secuencia comparada (%)	valor E	Identidad (%)
Y12423, Y12429, Y12430	<i>Olea europaea</i>	581 - 237	581 - 237	100	3e-154 - 3e-59	100 - 73
AF327622, AF327623	<i>Corylus avellana</i>	372 - 235	372 - 235	100	5e-500 - 5e-59	80 - 73
AF129623	<i>Apium graveolens</i>	345	345	99	7e-92	78
M68179	<i>Betula pendula</i>	342 - 331	342 - 331	100	8e-91 - 2e-87	78
AY900012	<i>Prunus dulcis</i>	325	325	100	6e-86	77
NM_119079	<i>Arabidopsis thaliana</i>	316	316	100	3e-86	78
AF436482	<i>Daucus carota</i>	307	307	100	2e-80	76
X88120	<i>Nicotiana tabacum</i>	297	297	98	3e-77	76
AF310250	<i>Oryza sativa</i>	297	297	100	3e-77	76
Y09456, Y09456, Y09457, Y09458, X77583	<i>Phlomis pratense</i>	289	289	100	5e-75 - 2e-72	75
Y13271	<i>Mercurialis annua</i>	289	289	99	5e-75	75
X73279, X73280, X73281	<i>Zea mays</i>	286 - 201	286 - 201	99 - 98	6e-74	75 - 70
US0175	<i>Solanum lycopersicum</i>	279	279	98	8e-72	75
DQ033829	<i>Cinnamomum camphora</i>	275	275	100	3e-70	74
AY268425	<i>Ambrosia artemisiifolia</i>	273	273	98	4e-70	75
DQ400579	<i>Mangifera indica</i>	269	269	100	4e-69	74
Y13042	<i>Hirtella brasiliensis</i>	268	268	99	3e-68	74
AF129624	<i>Pyrus communis</i>	264	264	99	3e-67	74
AF367487	<i>Malus x domestica</i>	264	264	99	2e-67	74
AF315326	<i>Brassica napus</i>	262	262	100	6e-67	74
AF377949	<i>Ananas comosus</i>	259	259	100	8e-66	74
Y13210	<i>Jolanius annulus</i>	257	257	99	3e-65	74
AJ421030	<i>Artemisia vulgaris</i>	255	255	100	3e-64	74
AY189970	<i>Gossypium hirsutum</i>	253	253	100	3e-64	73
AF092547	<i>Ricinus communis</i>	250	250	99	4e-63	73
AF200184	<i>Lilium longiflorum</i>	248	248	100	3e-62	73
AJ417566	<i>Phoenix dactylifera</i>	248	248	99	3e-62	73
AJ491882	<i>Prunus persica</i>	242	242	100	6e-61	73
AK248462	<i>Mordvilkia rugare</i>	239	239	98	7e-60	73
AJ223982	<i>Glycine max</i>	235	235	98	9e-59	73
Y08090	<i>Cynodon dactylon</i>	223	223	99	6e-58	72
AY082307	<i>Chenopodium album</i>	223	223	99	6e-55	72
Y13208	<i>Parthenocissus</i>	219	219	100	7e-54	72
X88182	<i>Phaseolus vulgaris</i>	214	214	99	3e-52	71
AY726606	<i>Arachis hypogaea</i>	199	199	99	6e-48	70

Una vez confirmado que cada una de las secuencias pertenecía a la familia de las profilinas, debido a su identidad con profilinas de otras especies previamente caracterizadas, se depositaron en la base de datos GenBank™/EMBL para su libre acceso, como se resume en la Tabla 7. Las secuencias obtenidas a partir de ADN genómico se encuentran actualmente en proceso de registro en GenBank™/EMBL.

Tabla 7. Secuencias de profilinas depositadas en al base de datos GenBank™/EMBL. Las secuencias pertenecen a las especies *Olea europaea*, *Betula pendula*, *Corylus avellana*, *Phleum pratense* y *Zea mays*. “Specimen-Voucher” indica el código de localización del árbol de donde se recogió el polen utilizado para obtener las secuencias

Secuencia número	Nº de Acceso GenBank	Specimen-Voucher	Olea europaea Cultivar	Clas	Secuencia número	Nº de Acceso GenBank	Specimen-Voucher	Olea europaea Cultivar	Clas
1	OG136355	J.D. Alche 3000 CMVO	Aerboche	1	63	OG263594	M.I. Rodriguez-Garcia 2000 C.L.S	Pisnol	6
2	OG136356	J.D. Alche 3000 CMVO	Aerboche	2	64	OG263593	M.I. Rodriguez-Garcia 2000 C.L.S	Pisnol	7
3	OG136357	J.D. Alche 3000 CMVO	Aerboche	3	65	OG263594	M.I. Rodriguez-Garcia 2000 C.L.S	Pisnol	8
4	OG136357	J.D. Alche 2000 L.88	Arboquiza	1	66	OG263593	M.I. Rodriguez-Garcia 2000 C.L.S	Pisnol	9
5	OG136328	J.D. Alche 2000 L.88	Arboquiza	2	67	OG263594	M.I. Rodriguez-Garcia 2000 C.L.S	Pisnol	10
6	OG136329	J.D. Alche 2000 L.88	Arboquiza	3	68	OG263593	M.I. Rodriguez-Garcia 2000 C.L.S	Pisnol	11
7	OG136330	J.D. Alche 2000 L.88	Arboquiza	4	69	OG263594	M.I. Rodriguez-Garcia 2000 C.L.S	Pisnol	12
8	OG137945	J.D. Alche 3000 CMVO	Bella de España	1	70	OG217967	J.D. Alche 2000 CMVO	Pisnol	1
9	OG137946	J.D. Alche 3000 CMVO	Bella de España	2	71	OG217968	J.D. Alche 2000 CMVO	Pisnol	2
10	OG263595	J.D. Alche 3000 CMVO	Bella de España	3	72	OG217969	J.D. Alche 2000 CMVO	Pisnol	3
11	OG263595	J.D. Alche 3000 CMVO	Bella de España	4	73	OG217970	J.D. Alche 2000 CMVO	Pisnol	4
12	OG136335	J.D. Alche 1900 CMVO	Blanqueta	1	74	OG263594	J.D. Alche 2000 CMVO	Sevillense	1
13	OG136336	J.D. Alche 1900 CMVO	Blanqueta	2	75	OG263594	J.D. Alche 2000 CMVO	Sevillense	2
14	OG136337	J.D. Alche 1900 CMVO	Blanqueta	3	76	OG263594	J.D. Alche 2000 CMVO	Sevillense	3
15	OG136338	J.D. Alche 1900 CMVO	Blanqueta	4	77	OG217977	J.D. Alche 7000 L.88	Sourani	1
16	OG136339	J.D. Alche 2000 CMVO	Cornicabera	1	78	OG217978	J.D. Alche 7000 L.88	Sourani	2
17	OG136332	J.D. Alche 2000 CMVO	Cornicabera	2	79	OG217979	J.D. Alche 7000 L.88	Sourani	3
18	OG136333	J.D. Alche 2000 CMVO	Cornicabera	3	80	OG263593	J.D. Alche 7000 L.88	Sourani	4
19	OG136334	J.D. Alche 2000 CMVO	Cornicabera	4	81	OG217982	J.D. Alche 2000 CMVO	Vendid Huívar	1
20	OG136342	J.D. Alche 3000 CMVO	Empollé	1	82	OG217983	J.D. Alche 2000 CMVO	Vendid Huívar	2
21	OG136343	J.D. Alche 3000 CMVO	Empollé	2	83	OG217984	J.D. Alche 2000 CMVO	Vendid Huívar	3
22	OG136344	J.D. Alche 3000 CMVO	Empollé	3	84	OG217985	J.D. Alche 2000 CMVO	Vendid Huívar	4
23	OG137945	J.D. Alche 3000 L.88	Farga	1	85	OG217986	J.D. Alche 2000 CMVO	Vendid Huívar	5
24	OG137946	J.D. Alche 3000 L.88	Farga	2	86	OG263598	J.D. Alche 1900 MAY	Vendid Vélez-Málaga	1
25	OG137947	J.D. Alche 3000 L.88	Farga	3	87	OG263599	J.D. Alche 1900 MAY	Vendid Vélez-Málaga	2
26	OG137948	J.D. Alche 3000 L.88	Frasina	1	88	OG263600	J.D. Alche 1900 MAY	Vendid Vélez-Málaga	3
27	OG137949	J.D. Alche 3000 L.88	Frasina	2	89	OG263601	J.D. Alche 1900 MAY	Vendid Vélez-Málaga	4
28	OG137950	J.D. Alche 5000 L.88	Gallega	1	90	OG263601	J.D. Alche 1900 CMVO	Villalenga	1
29	OG263599	J.D. Alche 3000 L.87	Hojiblanca	1	91	OG263602	J.D. Alche 1900 CMVO	Villalenga	2
30	OG263600	J.D. Alche 3000 L.87	Hojiblanca	2	92	OG263603	J.D. Alche 1900 CMVO	Villalenga	3
31	OG263601	J.D. Alche 3000 L.87	Hojiblanca	3	93	OG263604	J.D. Alche 1900 CMVO	Villalenga	4
32	OG263602	J.D. Alche 3000 L.87	Hojiblanca	4	94	OG263605	J.D. Alche 1900 CMVO	Villalenga	5
33	OG136345	J.D. Alche 4000 L.88	Lecino	1	95	-	-	Bella de España (genómico)	1
34	OG136346	J.D. Alche 4000 L.88	Lecino	2	96	-	-	Bella de España (genómico)	2
35	OG136347	J.D. Alche 4000 L.88	Lecino	3	97	-	-	Blanqueta (genómico)	1
36	OG137971	J.D. Alche 1900 CMVO	Lachón de Granada	1	98	-	-	Blanqueta (genómico)	2
37	OG137972	J.D. Alche 1900 CMVO	Lachón de Granada	2	99	-	-	Cornicabera (genómico)	1
38	OG263606	J.D. Alche 1900 CMVO	Lachón de Granada	3	100	-	-	Cornicabera (genómico)	2
39	OG263794	J.D. Alche 1000 L.88	Lachón de Sevilla	1	101	-	-	Pisnol (genómico)	1
40	OG263795	J.D. Alche 1000 L.88	Lachón de Sevilla	2	102	OG263603	M.I. Rodriguez-Garcia 1900 Sc.-B	Betula pendula	1
41	OG263777	J.D. Alche 1000 L.88	Lachón de Sevilla	3	103	OG263543	M.I. Rodriguez-Garcia 2000 Sc.-B	Corylus avellana	1
42	OG263796	J.D. Alche 1000 L.88	Lachón de Sevilla	4	104	OG263544	M.I. Rodriguez-Garcia 2000 Sc.-B	Corylus avellana	1
43	OG136339	J.D. Alche 3000 GL.E	Lásimo	1	105	OG263543	M.I. Rodriguez-Garcia 2000 Sc.-B	Corylus avellana	3
44	OG136348	J.D. Alche 3000 GL.E	Lásimo	2	106	OG263544	M.I. Rodriguez-Garcia 2000 Sc.-B	Corylus avellana	4
45	OG136343	J.D. Alche 3000 GL.E	Lásimo	3	107	OG263547	M.I. Rodriguez-Garcia 2000 Sc.-B	Corylus avellana	5
46	OG263603	J.D. Alche 3000 GL.E	Lásimo	4	108	OG263548	M.I. Rodriguez-Garcia 2000 Sc.-B	Corylus avellana	6
47	OG136362	J.D. Alche 3000 CMVO	Lásimo	1	109	OG263549	M.I. Rodriguez-Garcia 2000 Sc.-B	Corylus avellana	7
48	OG136363	J.D. Alche 3000 CMVO	Lásimo	2	110	OG263550	M.I. Rodriguez-Garcia 2000 Sc.-B	Corylus avellana	8
49	OG136365	J.D. Alche 3000 CMVO	Lásimo	3	111	OG263551	M.I. Rodriguez-Garcia 2000 Sc.-B	Corylus avellana	9
50	OG136366	J.D. Alche 3000 CMVO	Lásimo	4	112	OG263552	M.I. Rodriguez-Garcia 2000 Sc.-B	Corylus avellana	10
51	OG263606	J.D. Alche 3000 CMVO	Lásimo	5	113	OG263553	M.I. Rodriguez-Garcia 2000 Sc.-B	Corylus avellana	1
52	OG217911	J.D. Alche 2000 CMVO	Mascancilla Sevilla	1	114	OG263556	M.I. Rodriguez-Garcia 2000 Sc.-B	Corylus avellana	2
53	OG136324	J.D. Alche 2000 CMVO	Mascancilla Sevilla	2	115	OG263557	M.I. Rodriguez-Garcia 2000 Sc.-B	Corylus avellana	3
54	OG217915	J.D. Alche 2000 CMVO	Mascancilla Sevilla	3	116	OG263558	M.I. Rodriguez-Garcia 2000 Sc.-B	Corylus avellana	4
55	OG136326	J.D. Alche 2000 CMVO	Mascancilla Sevilla	4	117	OG263559	M.I. Rodriguez-Garcia 2000 Sc.-B	Corylus avellana	5
56	OG137979	J.D. Alche 3000 CMVO	Morrot	1	118	OG263560	M.I. Rodriguez-Garcia 2000 Sc.-B	Corylus avellana	6
57	OG137976	J.D. Alche 3000 CMVO	Morrot	2	119	OG263543	M.I. Rodriguez-Garcia 2000 Sc.-B	Corylus avellana	7
58	OG137975	J.D. Alche 3000 CMVO	Morrot	3	120	OG263543	M.I. Rodriguez-Garcia 2000 Sc.-B	Corylus pratense	8
59	OG137979	J.D. Alche 3000 CMVO	Morrot	4	121	OG263559	M.I. Rodriguez-Garcia 2000 Sc.-B	Phleum pratense	1
60	OG137980	J.D. Alche 2000 GL.T	Pisnol	1	122	OG263556	M.I. Rodriguez-Garcia 2000 Sc.-B	Zea mays	1
61	OG137981	J.D. Alche 2000 GL.T	Pisnol	2	123	OG263560	M.I. Rodriguez-Garcia 2000 Sc.-B	Zea mays	2
62	OG137982	J.D. Alche 2000 GL.T	Pisnol	3	124	OG263563	M.I. Rodriguez-Garcia 2000 Sc.-B	Zea mays	3
63	OG263606	J.D. Alche 2000 GL.T	Pisnol	4	125	OG263562	M.I. Rodriguez-Garcia 2000 Sc.-B	Zea mays	4
64	OG263553	M.I. Rodriguez-Garcia 2000 C.L.S	Pisnol	5	126	OG263563	M.I. Rodriguez-Garcia 2000 Sc.-B	Zea mays	5
65	OG263554	M.I. Rodriguez-Garcia 2000 C.L.S	Pisnol	6	127	OG263564	M.I. Rodriguez-Garcia 2000 Sc.-B	Zea mays	6
66	OG263555	M.I. Rodriguez-Garcia 2000 C.L.S	Pisnol	7	128	OG263565	M.I. Rodriguez-Garcia 2000 Sc.-B	Zea mays	7

4.2. Caracterización estructural de las secuencias obtenidas mediante su análisis, determinando la extensión del polimorfismo.

4.2.1 Análisis de la estructura primaria

El primer paso de este análisis consistió en la realización de alineamientos con las secuencias nucleotídicas obtenidas para cada uno de los taxones estudiados y con las secuencias aminoacídicas resultantes de la traducción de éstas (Figs. 11 y 12). Además de los clones obtenidos en el presente estudio fueron introducidos como referencia las secuencias de profilinas descritas en el objetivo 1 y que habían sido obtenidas previamente por otros autores, y las secuencias genómicas.

Debido al gran tamaño de la figura generada con la información de los alineamientos nucleotídicos de las secuencias de *Olea europaea*, ésta sólo se ha incluido en el formato electrónico de la presente memoria (Fig. 11).

En las figuras 12 y 13 se muestran los alineamientos correspondientes a las secuencias aminoacídicas obtenidas a partir de ADNc y de ADN genómico de algunas variedades respectivamente, correspondientes a la especie *Olea europaea*.

En primer lugar, el alineamiento de las secuencias de profilina de olivo mostró que existe un único marco de lectura abierto (ORF) en todas las secuencias analizadas. En todos los casos se observó un elevado grado de polimorfismo en la secuencia nucleotídica, de forma que las secuencias aminoacídicas lo muestran también. Se han detectado igualmente delecciones en varias secuencias: 9 y 3 nucleótidos en el clon número 69 (variedad Picual), con una longitud de 130 aminoácidos (aa) en la estructura primaria de la proteína, y donde uno de los aminoácidos deletreados se encuentra en al última posición del extremo C-terminal; y 9 nucleótidos en las secuencias 10, 11, 38, 51, 60, 64-68, 80, 94-96 y 101, con una longitud de 131 aa. Las demás secuencias no poseen delecciones y conservan una longitud de 134 aa en su secuencia aminoacídica.

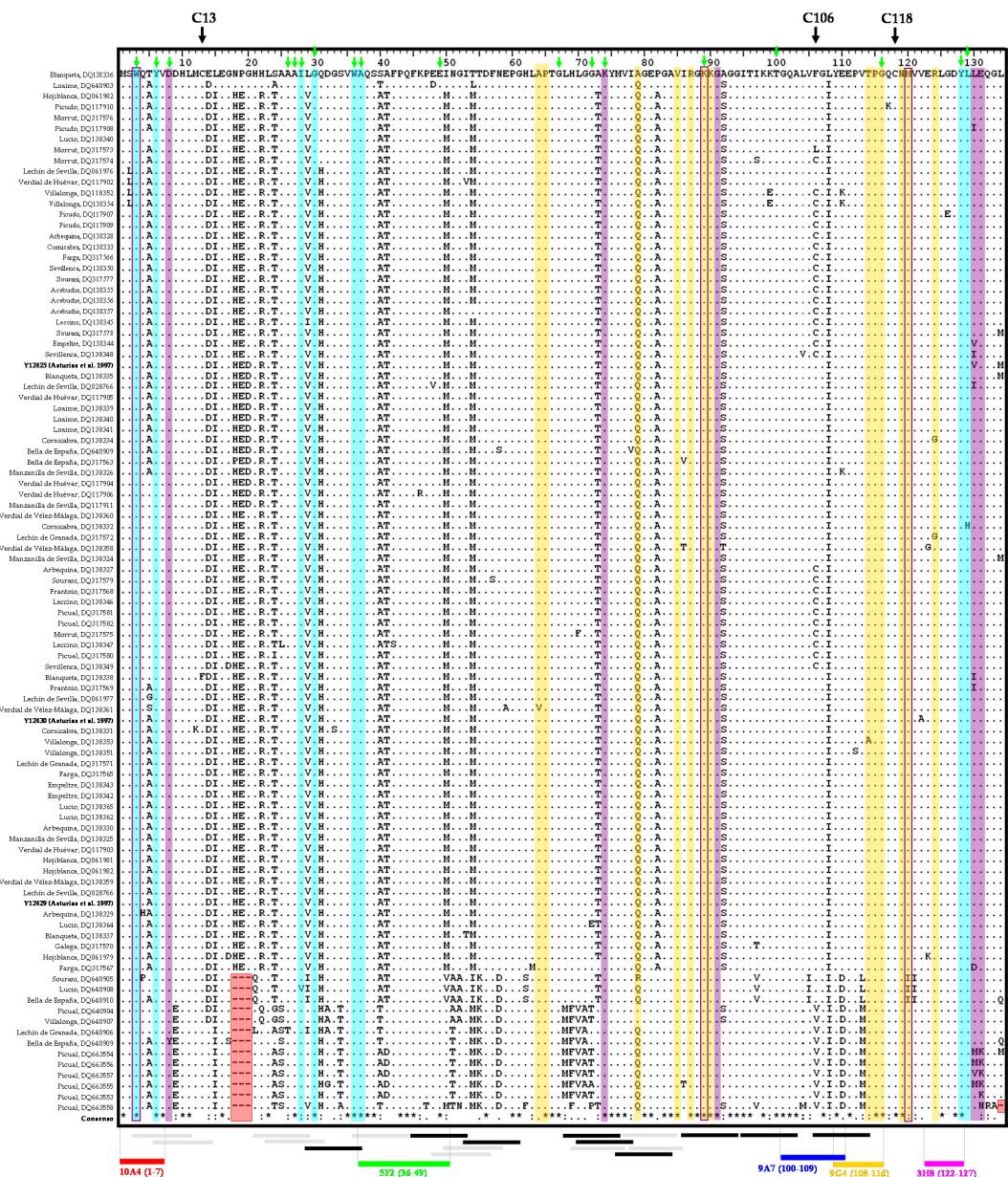


Figura 12. Alineamiento múltiple de las secuencias aminoacídicas de profilinas amplificadas de ARNm de polen de olivo (*Olea europaea*) y un resumen de los residuos y motivos más relevantes. La tabla incluye 94 secuencias de 24 variedades de olivo, además de las secuencias Y12425, Y12429 y Y12430 ya existentes en la base de datos GenBank™/EMBL.

En la parte superior de la tabla se muestran con flechas verdes los residuos aminoacídicos claves para la estructura 3D y el plegamiento de la molécula (Fedorov *et al.* 1997; Thorn *et al.* 1997). Entre ellos se señalan las cisteínas presentes en la secuencia.

En la parte inferior de la tabla se señalan aquellas áreas determinadas experimentalmente, correspondientes a los motivos de Ole e 2 que representan regiones de reconocimiento por IgG e IgE (10A4, 5F2, 9A7, 9G4 y 3H8) (Asturias *et al.* 2002). Con líneas horizontales negras y grises se marcan los motivos de 9 aminoácidos reconocidos por receptores de células T

(Burastero *et al.* 2004). Las de color negro son aquellas comunes al menos al 50 % de las secuencias. En gris se marcan aquellas presentes en menos del 50% de las secuencias.

Las cajas anaranjadas engloban los residuos implicados en la interacción con moléculas de actina, mientras que los residuos implicados en la interacción con PLP y con PIP se engloban en cajas de color azul y violeta respectivamente. Las delecciones encontradas en las secuencias se destacan con una caja en rojo.

➤ *Simbología del alineamiento:* “.” mismo aminoácido en el alineamiento múltiple; “-”deleción.

➤ *Simbología del consenso de las secuencias:* “**” mismo nucleótido o aminoácido; “:” cambio conservativo; “.” cambio semiconservativo; “espacio en blanco” cambio no conservativo.

Existe una gran variabilidad en la secuencia, tanto nucleotídica (figura 11 versión electrónica) como aminoacídica (Fig. 12), particularmente en los 35 primeros aminoácidos del extremo 5' y en los últimos 25 aminoácidos del extremo 3'. Concretamente se detectaron 33 posiciones con cambios no conservativos entre aminoácidos.

Dentro de su secuencia primaria, las profilinas de olivo pueden tener 1 cisteína en la posición 118 (secuencia 15); dos cisteínas en, en las posiciones 18 y 118 (70 de las 94 secuencias analizadas); o tres cisteínas en las posiciones 18, 106 y 118 (27 secuencias de las 94 analizadas). Dicha característica puede tener gran importancia a la hora del plegamiento de la proteína y establecimiento de la estructura 3D o las uniones con otras proteínas o ligandos.

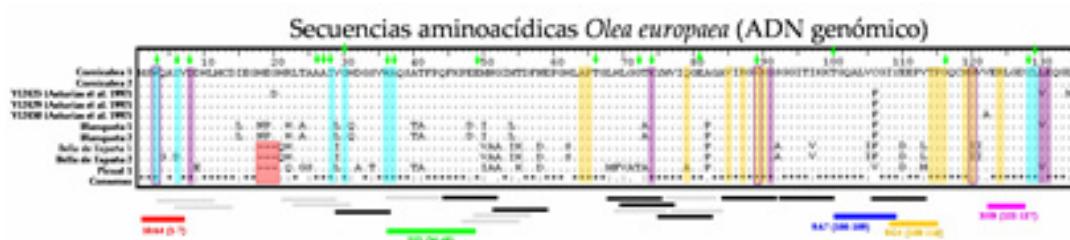


Figura 13. Alineamiento múltiple de las secuencias aminoacídicas de profilinas amplificadas de ADN genómico de polen de olivo (*Olea europaea*) y un resumen de los residuos y motivos más relevantes. La tabla incluye 7 secuencias de 4 variedades de olivo, además de las secuencias Y12425, Y12429 y Y12430 ya existentes en la base de datos GenBank™/EMBL.

En la parte superior de la tabla se muestran con flechas verdes los residuos aminoacídicos claves para la estructura 3D y el plegamiento de la molécula (Fedorov *et al.* 1997; Thorn *et al.* 1997). Entre ellos se señalan las cisteínas presentes en la secuencia.

En la parte inferior de la tabla se señalan aquellas áreas determinadas experimentalmente, correspondientes a los motivos de Ole e 2 que representan regiones de reconocimiento por IgG e IgE (10A4, 5F2, 9A7, 9G4 y 3H8) (Asturias *et al.* 2002). Con líneas horizontales negras y

grises se marcan los motivos de 9 aminoácidos reconocidos por receptores de células T (Burastero *et al.* 2004). Las de color negro son aquellas comunes al menos al 50 % de las secuencias. En gris se marcan aquellas presentes en menos del 50% de las secuencias.

Las cajas anaranjadas engloban los residuos implicados en la interacción con moléculas de actina, mientras que los residuos implicados en la interacción con PLP y con PIP se engloban en cajas de color azul y violeta respectivamente. Las delecciones encontradas en las secuencias se destacan con una caja en rojo.

➤ *Simbología del alineamiento:* “.” mismo aminoácido en el alineamiento múltiple; “-”deleción.

➤ *Simbología del consenso de las secuencias:* “*” mismo nucleótido o aminoácido; “:”cambio conservativo; “.”cambio semiconservativo; “espacio en blanco” cambio no conservativo.

Los alineamientos nucleotídicos y de las secuencias aminoacídicas teóricas correspondientes a profilinas de *Betula pendula*, *Corylus avellana*, *Phleum pratense* y *Zea mays* se muestran respectivamente en las figuras 14, 15, 16 y 17. En dichos alineamientos han sido incluida como referencia las secuencias de estas especies presentes en la base de datos GenBank™/EMBL.

El alineamiento múltiple de secuencias de profilinas reproductivas en los dos miembros de la familia *Betulaceae* (*Betula pendula* y *Corylus avellana*), mostró un único ORF al igual que en el caso del olivo.

En el caso de *Betula pendula*, se ha detectado la delección de un nucleótido en cada una de las secuencias, aunque en distintas posiciones. Dicha delección no afecta al tamaño de la proteína, pero si produce el cambio de una secuencia respecto a la otra en cinco aminoácidos (desde el aminoácido 19 al 23). Este cambio es el único detectado en dicha especie. La variabilidad de las secuencias en esta especie es muy baja, ya que se han encontrado solamente dos posiciones no conservadas.

En el caso del polen de *Corylus avellana*, se ha encontrado una mayor variabilidad de secuencia (7 posiciones no conservadas) en comparación con *Betula pendula*. La mayor parte de los cambios en los aminoácidos se encuentran en los extremos 5' y 3'. En todas las secuencias analizadas en *Betula pendula* y *Corylus avellana*, se han encontrado dos cisteínas distales en las posiciones 13 y 117.

El alineamiento múltiple de secuencias de profilinas de polen en los dos especie de la familia *Poaceae* mostró la existencia de un único ORF en *Phleum pratense* y de dos ORFs

en *Zea mays*. Estos dos ORFs difieren en 18 nucleótidos de longitud. Concretamente, la secuencia X73280 posee 137 aa, mientras que las restantes secuencias tienen 131 aa.

En el caso de *Phleum pratense*, no se ha detectado delección alguna en su secuencia nucleotídica. Su variabilidad de secuencia es muy baja, ya que se han encontrado sólamente tres posiciones no conservadas en su secuencia aminoacídica.

Por el contrario, en *Zea mays* sí se ha observado la delección de tres nucleótidos en una de las secuencias obtenidas (120), la cual afectó a la pérdida del aminoácido final del extremo C-terminal. La variabilidad en maíz es bastante similar a la encontrada en *Phleum pratense*, ya que existen cuatro posiciones no conservadas dentro de la estructura primaria de su proteína.

Ambas especies de *Poaceae*, al igual que las 2 analizadas de *Betulaceae*, poseen dos cisteínas en todas las secuencias analizadas, en las posiciones 13 y 117.

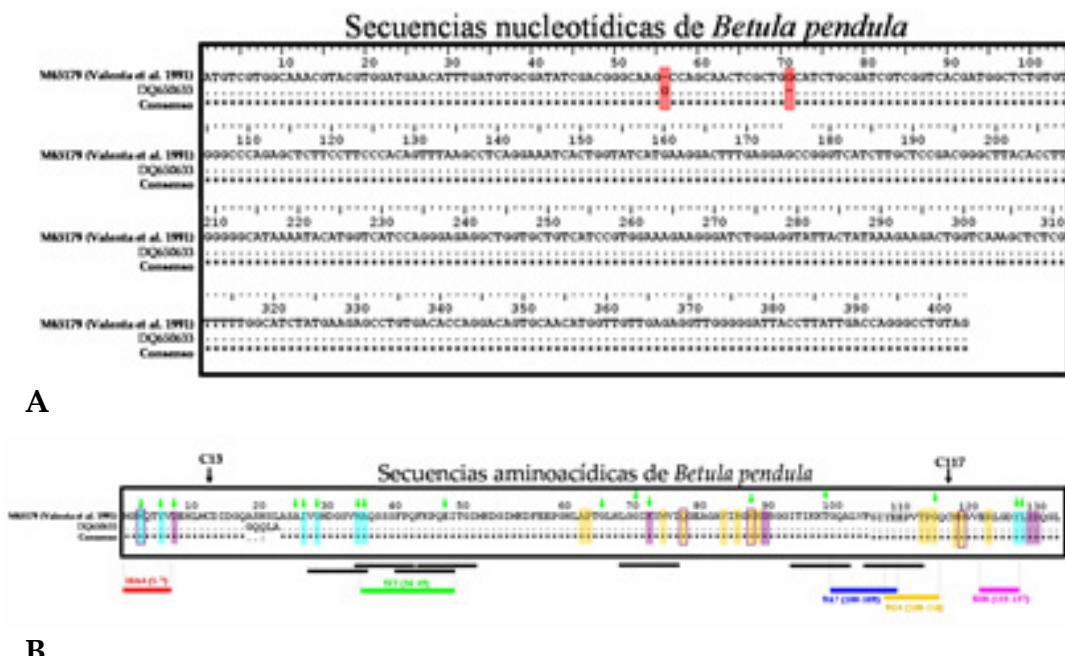
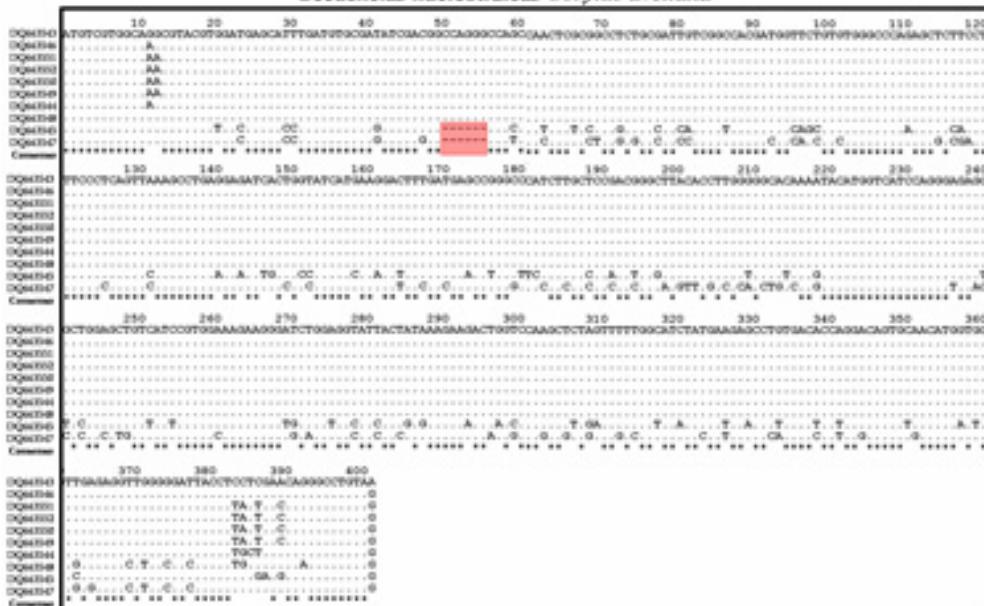
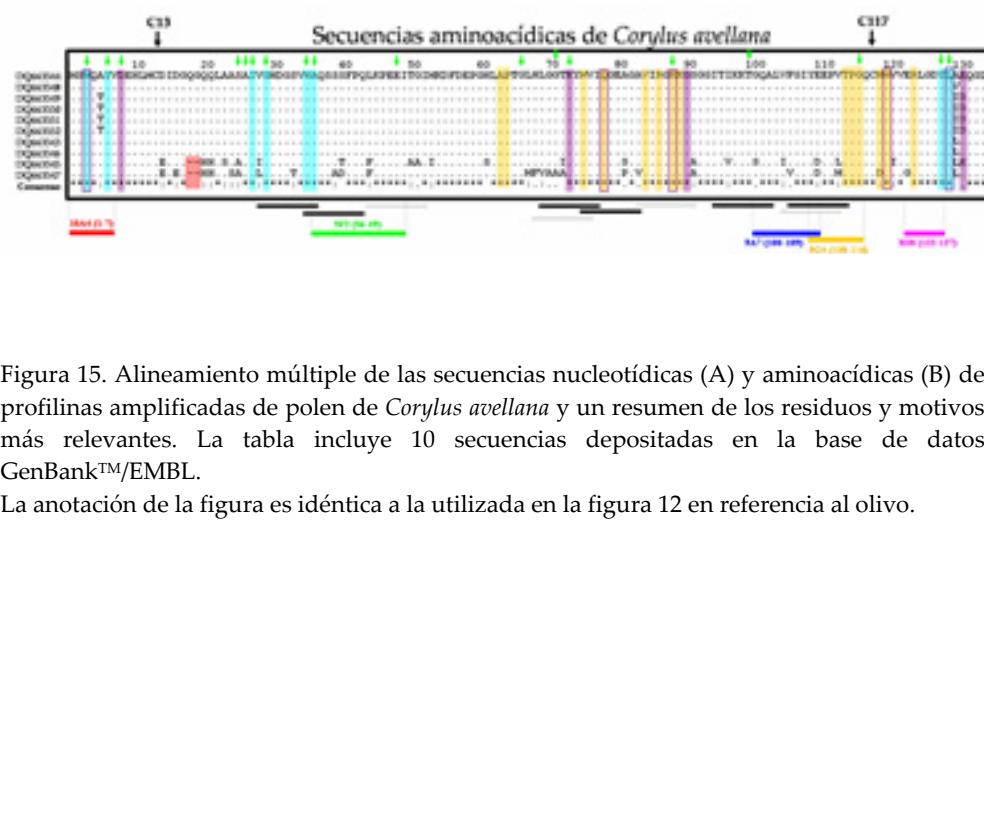


Figura 14. Alineamiento múltiple de las secuencias nucleotídicas (A) y aminoacídicas (B) de profilinas amplificadas de polen de *Betula pendula* y un resumen de los residuos y motivos más relevantes. La tabla incluye una secuencia (DQ650633) además de la secuencia M65179 ya existentes en la base de datos GenBank™/EMBL. La anotación de la figura es idéntica a la utilizada en la figura 12 en referencia al olivo.

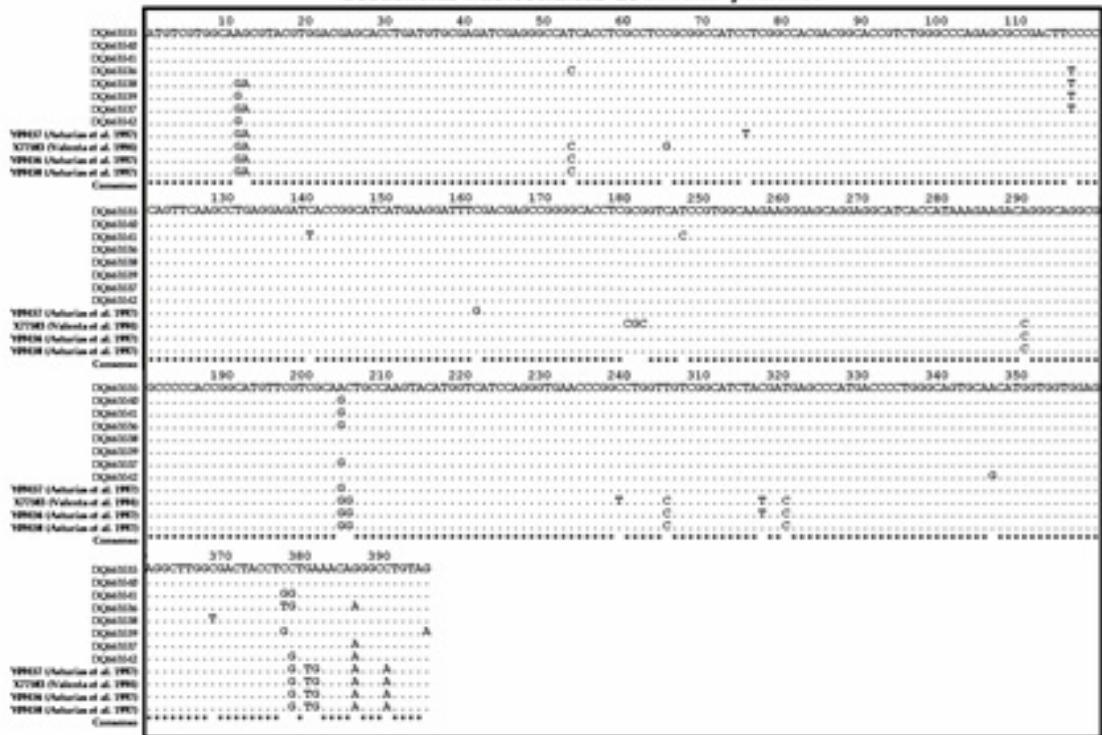
Secuencias nucleotídicas *Corylus avellana*



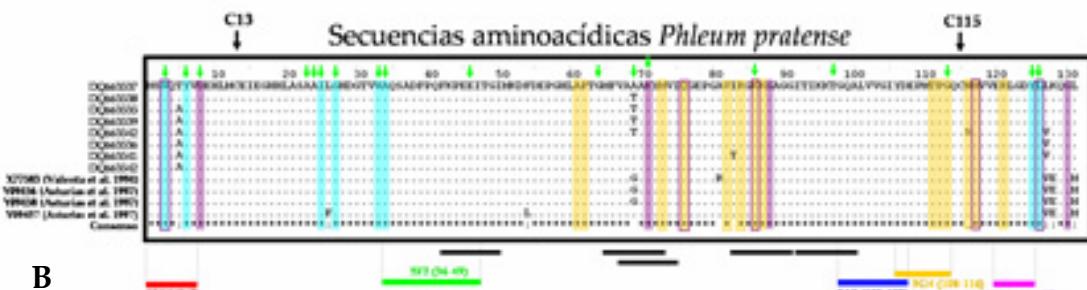
A



Secuencias nucleotídicas de *Phleum pratense*



A



B

Figura 16. Alineamiento múltiple de las secuencias nucleotídicas (A) y aminoacídicas (B) de profilinas amplificadas de polen de *Phleum pratense* y un resumen de los residuos y motivos más relevantes. La tabla incluye 8 secuencias además de las secuencias X77583, Y09456, Y09457 y Y09458 ya existentes en la base de datos GenBank™/EMBL.

La anotación de la figura es idéntica a la utilizada en la figura 12 en referencia al olivo.

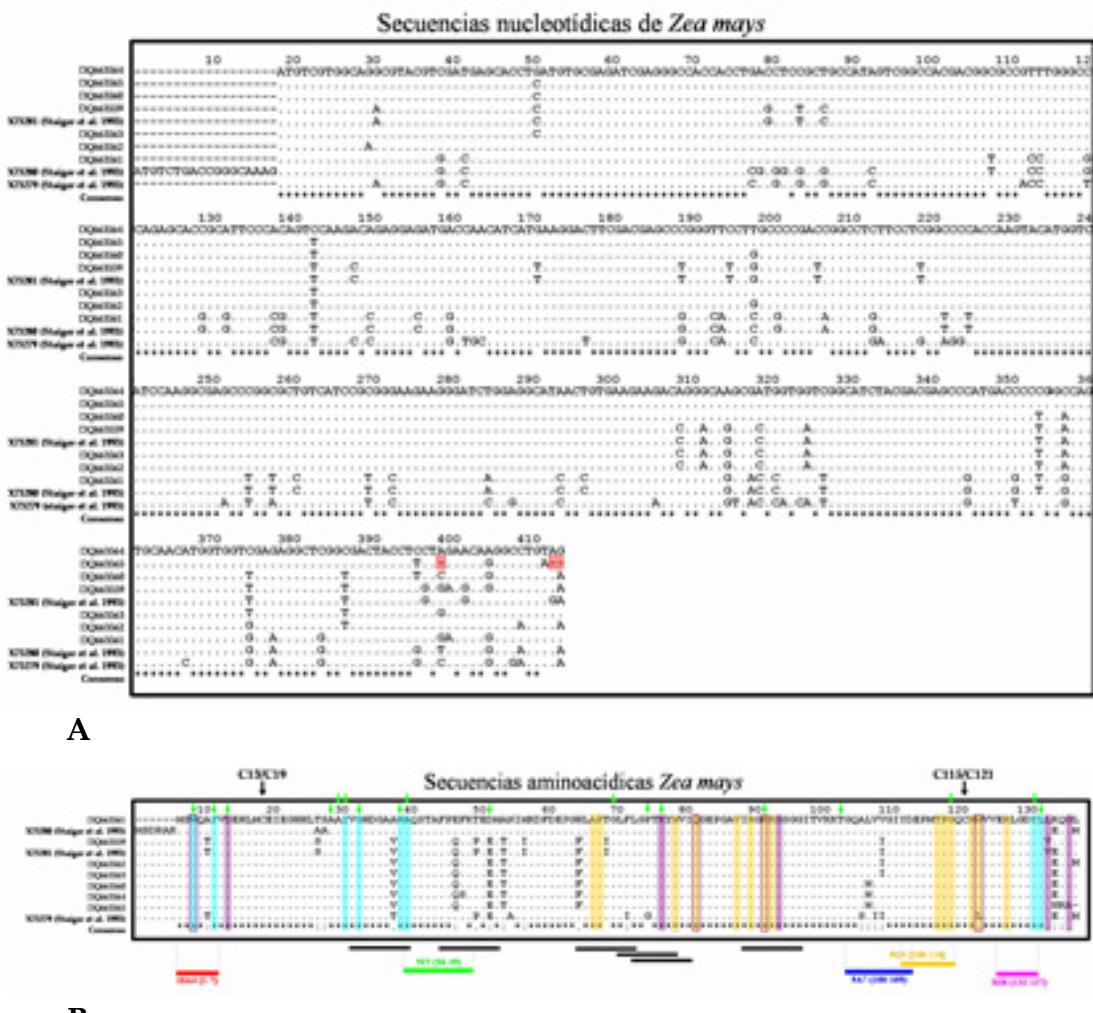


Figura 17. Alineamiento múltiple de las secuencias nucleotídicas (A) y aminoacídicas (B) de profilinas amplificadas de polen de *Zea mays* y un resumen de los residuos y motivos más relevantes. La tabla incluye 7 secuencias además de las secuencias X73279, X73280, X73281 ya existentes en la base de datos GenBank™/EMBL.

La anotación de la figura es idéntica a la utilizada en la figura 12 en referencia al olivo.

4.2.2. Análisis de la conservación nucleotídica y aminoacídica de las secuencias obtenidas

A) Determinación de porcentajes de identidad y número de sustituciones

Sobre la base de los alineamientos anteriormente realizados se han construido matrices de identidad con el programa Bioedit v7.0.5.3 (Hall 1999). Dichas matrices no se

muestran en esta memoria dado su gran tamaño. Como muestra representativa de dichas matrices se ha elaborado una tabla que refleje los intervalos que representan los valores máximos y mínimos de identidad entre secuencias a nivel taxonómico (Tabla 8).

En cuanto a las secuencias nucleotídicas:

A nivel de especie, la variabilidad más alta entre las secuencias de profilinas se ha observado en *Olea europaea* (100-71.8% identidad; variabilidad 28.2%), mientras que la variabilidad menor se distingue en *Phleum pratense* (100-94.9% identidad; variabilidad 5.1%). Las especies más alejadas entre sí en cuanto a conservación de las secuencias son *Phleum pratense* y *Betula pendula* (76.1-74.8% identidad; variabilidad 1.3%), mientras que las especies más cercanas entre sí son *Olea europaea* y *Corylus avellana* (98.2-72.3% identidad; variabilidad 25.9%).

A nivel de familia, la mayor variabilidad aparece de nuevo en *Oleaceae* (100-71.8% identidad; variabilidad 28.2%), seguido de *Betulaceae* (100-74.3% identidad; variabilidad 27.7%) y *Poaceae* (100-82.3% identidad; variabilidad 17.7%). Las familias más cercanas entre sí son *Oleaceae* y *Poaceae* (100-72.3% identidad; variabilidad 27.7%), mientras que las más alejadas entre sí son *Betulaceae* y *Poaceae* (97.9-73.8% identidad; variabilidad 24.1%).

En cuanto a las secuencias aminoacídicas:

A nivel de especie, la variabilidad más alta entre las secuencias de profilinas se ha observado en *Olea europaea* (100-75.4% identidad; variabilidad 24.6%), mientras que la variabilidad menor se distingue en *Betula pendula* (100-96.2% identidad, variabilidad 3.8%). Las especies más alejadas entre sí en cuanto a conservación de las secuencias son *Olea europaea* y *Zea mays* (92.9-70.4% identidad; variabilidad 22.5%), mientras que las especies más cercanas entre sí son *Corylus avellana* y *Phleum pratense* (98.4-71.9% identidad; variabilidad 26.5%), así como *Olea europaea* y *Zea mays* (100-74.2% identidad; variabilidad 25.8%).

A nivel de familia, la mayor variabilidad aparece de nuevo en *Betulaceae* (100-75.1% identidad; variabilidad 24.9%), seguido de *Oleaceae* (100-75.4% identidad; variabilidad 24.6%) y *Poaceae* (100-79.3% identidad; variabilidad 20.7%). Las familias más alejadas entre sí son *Oleaceae* y *Betulaceae* (90.0-74.4% identidad; variabilidad 15.6%), mientras que las más cercanas entre sí son *Oleaceae* y *Poaceae* (100-76.6% identidad; variabilidad 23.4%).

Tabla 8. Número de sustituciones y porcentajes de identidad entre los nucleotídicos y aminoacídicos analizados en función de un origen taxonómico. Los datos se ofrecen en forma de intervalos que representan el valor mínimo y máximo de identidad.

Species	<i>Oleaceae</i> (<i>Olea europaea</i>)	<i>Corylus avellana</i>	<i>Betula pendula</i>	<i>Betulaceae</i> (<i>Corylus avellana</i> + <i>Betula pendula</i>)	<i>Phleum pratense</i>	<i>Zea mays</i>	<i>Poaceae</i> (<i>Phleum pratense</i> + <i>Zea mays</i>)
<i>Oleaceae</i> (<i>Olea europaea</i>)	405-291 100.0-71.8	398-293 98.2-72.3	332-298 81.9-73.6	378-293 98.2-72.3	396-301 97.7-74.4	376-285 92.9-70.4	134-97 100.0-72.3
	134-101 100.0-75.4	129-102 95.4-76.3	116-100 86.5-74.4	120-100 90.0-74.4	134-102 100-76.1	134-99 100-74.2	134-103 100-76.6
	27 20.2	28 20.9	26 19.4	28 20.89	27 20.1	30 22.4	31 23.13
	<i>Corylus avellana</i>	402-304 100-75.7	384-299 95.5-74.3	402-298 100.0-74.3	317-302 78.8-75.0	346-293 86.1-72.8	131-101 98.4-75.6
		133-103 100-77.4	129-100 96.9-75.1	133-100 100.0-75.1	131-95.6 98.4-71.9	113-100 84.7-74.8	129-103 96.9-77.4
		23 17.3	23 17.3	23 17.3	23 17.3	29 21.8	28 21.1
	<i>Betula pendula</i>	402-400 100-99.5	402-298 100.0-74.3	306-301 76.1-74.8	303-289 75.3-71.9	101-98 75.6-73.8	
		133-128 100-96.2	133-100 100.0-75.1	106-102 79.6-76.6	104-96 78.1-71.9	106-99 79.6-74.4	
		1 0.8	23 17.3	18 13.5	25 18.8	28 21.1	
	<i>Betulaceae</i> (<i>Corylus avellana</i> + <i>Betula pendula</i>)	402-299 100-74.3	396-298 98.4-74.1	115-98 86.1-73.4	130-98 97.9-73.8		
		133-100 100-75.1	129-102 96.9-76.6	113-100 84.7-75.1	129-99 96.9-74.4		
		23 17.3	22 16.5	29 21.8	28 21.1		
	<i>Phleum pratense</i>	396-376 100-94.9	340-324 85.8-81.8	402-331 100.0-82.3			
		131-124 100-94.6	113-103 86.2-78.8	133-109 100.0-81.6			
		6 4.6	25 18.7	25 19.1			
	<i>Zea mays</i>	396-316 100-79.9	402-331 100.0-79.3				
		131-111 100-84.6	131-104 100-80.1				
		16 12.2	25 19.1				
	<i>Poaceae</i> (<i>Phleum pratense</i> + <i>Zea mays</i>)	402-331 100.0-82.3					
		131-104 100.0-79.3					
		25 19.1					

Nº nucleótidos idénticos	% identidad absoluta
Nº de cambios absolutos	% identidad
Nº de cambios conservativos	% identidad

Secuencias nucleotídicas

Secuencias aminoacídicas

B) Análisis de diagramas de entropía y variabilidad

Se ha llevado a cabo un análisis de los diagramas de entropía, que representan la variabilidad de cada posición de las secuencias nucleotídicas, calculados mediante el programa Bioedit v7.0.5.3 (Hall 1999) para cada especie. Del mismo modo, se han analizado los índice de variabilidad de cada posición aminoacídica en cada una de las secuencias obtenidas para cada una de las especies estudiadas (Radauer *et al.* 2006) (Fig. 18).

En general, si comparamos ambos diagramas (secuencias nucleotídicas y aminoacídicas) dentro de la misma especie, la variabilidad de las secuencias nucleotídicas es mayor que la de aminoacídicas. También podemos observar que existe una buena correspondencia entre la distribución del polimorfismo entre ambos tipos de secuencias.

- ✓ En las secuencias nucleotídicas de *Olea europaea*, el nivel máximo de entropía es del 0.99, existiendo 74 posiciones que superan el valor de 0.25, umbral que hemos considerado de forma arbitraria como el límite inferior para que una posición nucleotídica sea definida como variable (Fig. 18A).
- ✓ *Betula pendula* solo 2 posiciones de la secuencia poseen un nivel de entropía > 0.25 con un máximo de 0.69 (Fig. 18B).
- ✓ *Corylus avellana* tiene 143 posiciones que superan el valor de 0.25, con un nivel máximo de 1.055 de entropía (Fig. 18C).
- ✓ El nivel de entropía en *Phleum pratense* llega a un máximo de 0.72 y posee 27 posiciones que superan el valor de 0.25 de entropía (Fig. 18D).
- ✓ Finalmente en *Zea mays* el nivel máximo de entropía es de 1.5, siendo 86 posiciones las que superan el valor de 0.25 de entropía (Fig. 18E).

Respecto a la variabilidad de las secuencias aminoacídicas, el número de posiciones que se consideran variables (aquellas que superan el umbral del 3% de variabilidad) (Radauer *et al.* 2006), son las siguientes:

- ✓ En el caso de *Olea europaea* existen 38 posiciones (28.4% de la secuencia), con un nivel de variabilidad de entre el 3 y 5.71% (Fig. 18A').
- ✓ 2. *Betula pendula* posee 5 posiciones (3.76% de la secuencia), con un nivel de variabilidad superior al 3%, alcanzando un máximo del 4% (Fig. 18B').
- ✓ En *Corylus avellana* existen 8 posiciones (6.02% de la secuencia) con un nivel de variabilidad que supera el 3%, siendo el máximo del 10% (Fig. 18C').
- ✓ *Phleum pratense* posee 3 posiciones (2.3% de la secuencia) con un nivel de variabilidad que supera el 3%, siendo el máximo del 7.14% (Fig. 18D').
- ✓ *Zea mays* posee 4 posiciones variables (3.05% de la secuencia), con un nivel máximo de variabilidad del 5% (Fig. 18E').

El nivel de polimorfismo de las secuencias se puede ver más detalladamente en la Tabla 9.

De mayor a menor conservación de la secuencia aminoacídica (mayor número de posiciones conservadas) podemos enumerar las especies con *Betula pendula* > *Phleum pratense* > *Zea mays* > *Corylus avellana* > *Olea europaea*.

Tabla 9. Listado de los residuos aminoacídicos variables y su nivel de variabilidad en las secuencias de profilinas de las diferentes especies.

Posición	4	5	17	18	19	20	21	22	23	24	25	29	32	34	35	40	41	48	50	51	52
<i>Olea europaea</i>	3.06	5.47	3.10	4.62	3.55	4.16	3.13	3.59		5.71	3.38	3.55	3.13	3.35		3.23	3.42	3.06	3.55	3.46	3.2
<i>Betula pendula</i>						4.00	4.00	4.00	4.00	4.00											
<i>Corylus avellana</i>	3.33											3.75						3.75			
<i>Phleum pratense</i>	4.00																				
<i>Zea mays</i>										4.29					4.29						

Posición	53	54	58	62	70	72	73	79	82	86	92	97	104	105	106	110	113	123	130	131	134
<i>Olea europaea</i>	3.06	4.26	3.5	3.13	3.23	5.51		3.13		3.1	3.42	4.26	3.10	3.10	6.64	3.60	3.46	3.06	5.45	3.20	4.36
<i>Betula pendula</i>																					
<i>Corylus avellana</i>							3.75		3.75								3.75		10.00	6.00	
<i>Phleum pratense</i>					7.14													3.43			
<i>Zea mays</i>																		4.29	5.00		

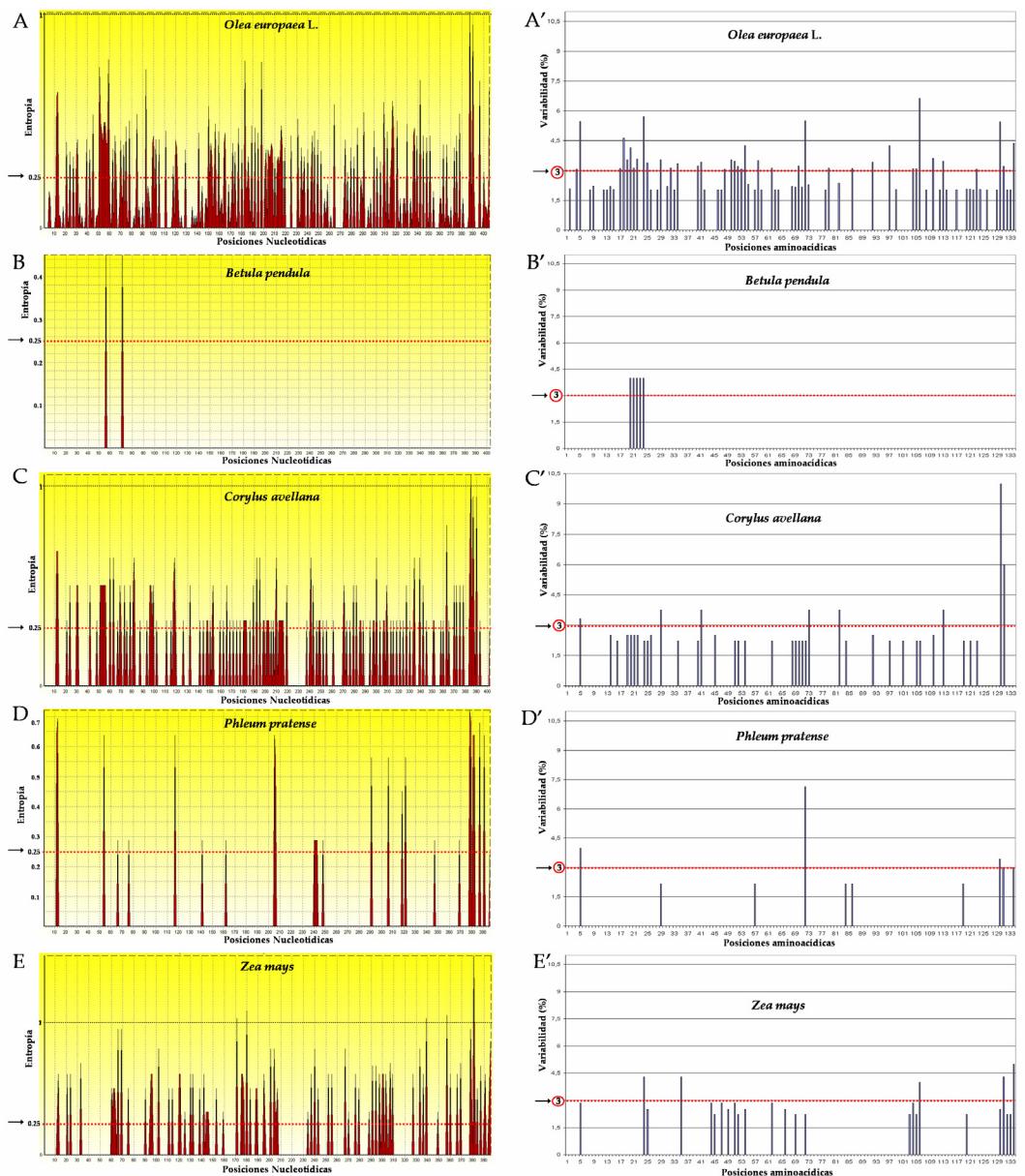


Figura 18. Análisis de la variabilidad de las secuencias nucleotídicas y aminoacídicas de profilinas de A), A') *Olea europaea*, B), B') *Betula pendula*, C), C') *Corylus avellana*, D), D') *Phleum pratense* y E), E') *Zea mays*. El diagrama de entropía define la variabilidad de las secuencias nucleotídicas, de forma que a mayor perdida de información o mayor número de posiciones diferentes en cada columna del alineamiento, mayor será la entropía. La medida de la variabilidad (v) de las secuencias aminoacídicas se ha llevado a cabo de forma que se consideran residuos conservados aquellos en los que la variabilidad es menor del 3 % (línea horizontal roja) y los que superen este umbral se consideran variables (Radauer *et al.* 2006).

El análisis de la varianza de una vía para la determinación de la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre las especies estudiadas en función del

polimorfismo de las secuencias nucleotídicas y aminoacídicas, determinó que en ambos casos existen diferencias significativas entre las cinco especies (secuencias nucleotídicas: F-ratio=55.36, p<<0.05; secuencias aminoacídicas F-ratio=31.69, p<<0.05). Para establecer que especies difieren entre si, es necesario realizar pruebas de rango *post hoc (a posteriori)* y comparaciones múltiples por parejas.

El test de normalidad de Shapiro-Wilk mostró que la distribución de datos de variabilidad no siguen una distribución normal (secuencias nucleotídicas: Shapiro-Wilk=0.53, p<<0.05; secuencias aminoacídicas Shapiro-Wilk=0.56, p<<0.05), y el test de Levene, estableció que las varianzas para las cinco especies difieren significativamente (secuencias nucleotídicas: test de Levene= 229.98, p<<0.05; secuencias aminoacídicas test de Levene= 46.81, p<<0.05). Las comparaciones múltiples de las cinco especies (test de Games-Howell), determinaron entre que parejas de especies existen o no diferencias significativas (Tabla 10).

Tabla 10. Análisis estadístico para la comparación de los valores de variabilidad de las secuencias nucleotídicas (parte superior de la tabla) y aminoacídicas (parte inferior de la tabla) entre las especies analizadas. En la tabla se muestra si existen diferencias estadísticamente significativas en la comparación de cada dos especies, tanto para los valores de las secuencias nucleotídicas como aminoacídicas. En todos los casos se seleccionó un nivel de confianza del 95% (p<0.05).

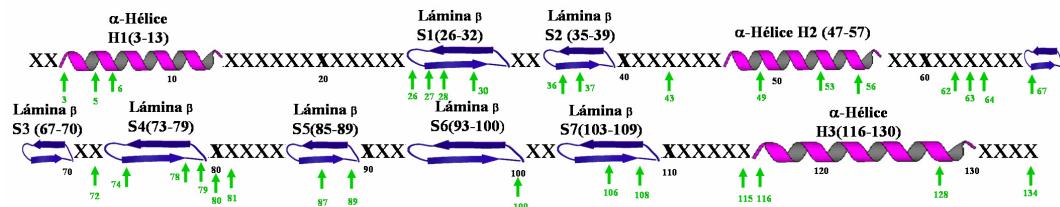
	<i>Olea europaea</i>	<i>Corylus avellana</i>	<i>Betula pendula</i>	<i>Phleum pratense</i>	<i>Zea mays</i>
<i>Olea europaea</i>		No G-H=0.02 P=0.71	Si G-H=0.16 P=0.0	Si G-H=0.12 P=0.0	No G-H=0.03 P=0.39
<i>Corylus avellana</i>	Si G-H=0.83 P=0.0		Si G-H=0.14 P=0.0	Si G-H=0.11 P=0.0	No G-H=0.01 P=0.97
<i>Betula pendula</i>	Si G-H=1.50 P=0.0	Si G-H=0.67 P=0.0		Si G-H=0.32 P=0.0	Si G-H=0.13 P=0.0
<i>Phleum pratense</i>	Si G-H=1.42 P=0.0	Si G-H=0.58 P=0.0	No G-H=0.09 P=0.92		Si G-H=0.09 P=0.0
<i>Zea mays</i>	Si G-H=1.12 P=0.0	No G-H=0.28 P=0.42	Si G-H=0.38 P=0.01	No G-H=0.30 P=0.14	

4.2.3. Predicción y análisis de la estructura 2D de profilinas

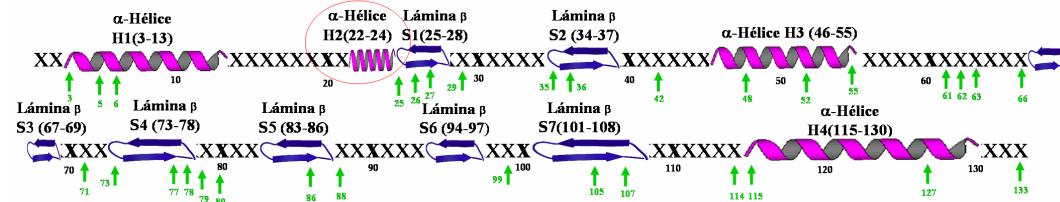
Existe una gran similitud en la estructura 2D de las profilinas en las distintas especies analizadas, así como entre estas predicciones y los modelos considerados generales para profilinas que se describen en la introducción (Fig. 2). En esta figura sólo se muestra un único modelo de estructura 2D por especie, ya que las modificaciones intraespecíficas son mínimas tanto en la posición de los elementos de la estructura secundaria como en su longitud. Algunas de las características diferenciales de esta estructura aparecen en las especies *Corylus avellana* y *Phleum pratense*, en las que se ha sustituido la lámina β S1 por una α -hélice extra si la comparamos con la estructura 2D de *Olea europaea*. En *Betula pendula* y *Zea mays*, dicha sustitución es solamente parcial (Fig. 19).

Respecto a las posiciones de aquellos aminoácidos que son importantes para el plegamiento de la proteína, hay que decir que se mantienen muy conservados en las cinco especies analizadas. Solamente han sido detectados algunos cambios en las posiciones relativas de algunos aminoácidos entre especies. Ello es debido a la existencia de delecciones en algunas profilinas, por lo que el número de aminoácidos no es el mismo.

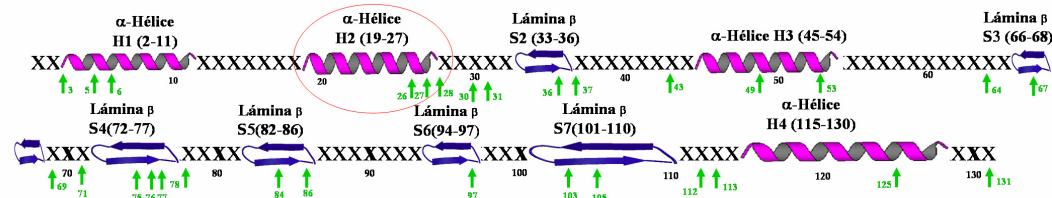
Estructura secundaria de profilinas de *Olea europaea* L.



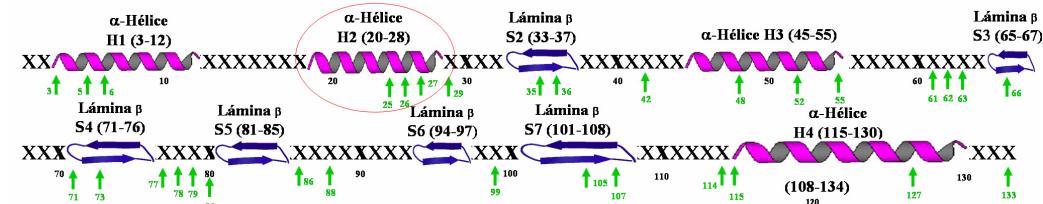
Estructura secundaria de profilinas de *Betula pendula*



Estructura secundaria de profilinas de *Phleum pratense*



Estructura secundaria de profilinas de *Corylus avellana*



Estructura secundaria de profilinas de *Zea mays*

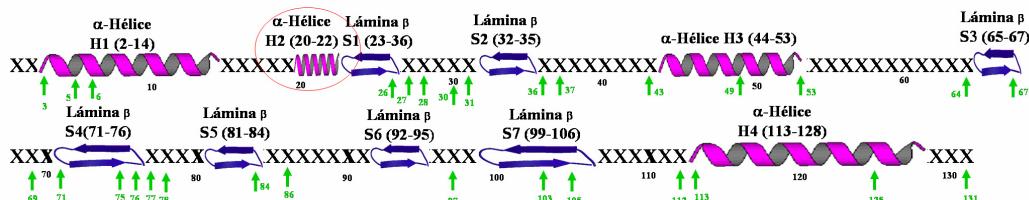


Figura 19. Predicción de la estructura secundaria de profilinas en diferentes especies: A) *Olea europaea*, B) *Betula pendula*, C) *Corylus avellana*, D) *Phleum pratense* y E) *Zea mays*. Cada aminoácido que no forma parte de una α -hélice o una lámina β se indica con una X. Se ha representado en verde, con flechas y el número de posición los aminoácidos que son importantes para la estructura 3D y plegamiento de las proteínas (Fedorov *et al.* 1997; Thorn *et al.* 1997). Los cambios más sustanciales afectan a la lámina β S1 (círculos rojos).

4.2.4. Predicción y análisis de la estructura 3D de profilinas

Hasta la fecha no se encuentra disponibles en el banco de datos de proteínas PDB (Protein Data Bank: <http://www.pdb.org>), modelos generados a partir de las proteínas cristalizadas de las especies *Olea europaea*, *Corylus avellana*, *Phleum pratense* ó *Zea mays*. Por ello, se ha llevado a cabo una primera aproximación, obteniendo el modelo tridimensional proteico que mejor se ajustaba a cada una de las secuencias de aminoácidos de los clones obtenidos a partir de los modelos de profilinas depositados previamente por diversos autores en otras especies de plantas (Tabla 7). La modelización realizada se basa en que secuencia aminoacídica debe poseer una identidad de al menos un 50% con dichas estructuras presentes en PDB. Todas las secuencias obtenidas en este trabajo cumplen este requisito (Fig. 20). Los modelos estructurales de profilinas de plantas empleados correspondieron a *Betula pendula* (Bet v 2), modelo PDB 1cqa (resolución 2.4 Å) (Fedorov *et al.* 1997), y a *Hevea brasiliensis* (Hev b 8), modelo PDB 1g5u (cadena A) (3.10 Å) (Fedorov *et al.* 2000), para la mayoría de las secuencias estudiadas. Por otro lado se encontró una alta identidad con el modelo de la profilina I de *Arabidopsis thaliana* (Ara t 8), modelo PDB 3NUL (1.6 Å) (Thorn *et al.* 1997), en el caso de 19 secuencias (Tabla 11). Posteriormente los tres modelos fueron analizados más exhaustivamente utilizando el programa PDB ProteinWorkshop 1.50 (MBT Java 1.4).

Secuencia	Modelo	Profilina	% identidad	valor E	Secuencia	Modelo	Profilina	% identidad	valor E	
número	PDB	(SDAP)			número	PDB	(SDAP)			
Y1245	Icp4	Her b 8	81	2.7e-56	47	Icp4	Bet v 2	82	3.64e-56	
Y12459	Icp4	Bet v 2	82	3.86e-56	49	Icp4	Bet v 2	82	3.93e-59	
Y12480	Icp4	Her b 8	81	1.09e-55	50	IgSuA	Her b 8	80	5.20e-59	
1					2.36e-59					
2					2.36e-59	51	IgSuA	Her b 8	88	6.12e-44
3	IgSuA	Her b 8	80	1.24e-58	52	Icp4	Bet v 2	83	3.70e-57	
4	IgSuA	Her b 8	81	6.97e-40	53	Icp4	Bet v 2	82	3.66e-56	
5	IgSuA	Her b 8	80	2.34e-59	54	Icp4	Bet v 2	81	3.58e-56	
6	Icp4	Her b 8	81	1.19e-55	55	IgSuA	Her b 8	80	9.81e-40	
7	Icp4	Bet v 2	82	3.86e-56	56	Icp4	Her b 8	89	1.34e-58	
8	Icp4	Her b 8	81	2.44e-56	57	IgSuA	Her b 8	80	6.80e-58	
9	Icp4	Her b 8	81	3.86e-56	58	IgSuA	Her b 8	80	1.29e-59	
10	IgSuA	Her b 8	74	4.93e-57	59	Icp4	Her b 8	83	1.44e-58	
11	IgSuA	Her b 8	88	5.31e-43	60	Icp4	Her b 8	80	2.60e-59	
12	Icp4	Bet v 2	83	2.56e-56	61	IgSuA	Her b 8	81	6.97e-40	
13	Icp4	Her b 8	83	1.24e-56	62	IgSuA	Her b 8	80	6.97e-40	
14	Icp4	Her b 8	77	1.92e-53	63	Icp4	Her b 8	78	3.00e-58	
15	Icp4	Her b 8	80	4.67e-59	64	Icp4	Her b 8	78	8.99e-40	
16	IgSuA	Her b 8	79	2.64e-58	65	Icp4	Her b 8	75	1.76e-53	
17	IgSuA	Her b 8	80	3.49e-59	66	Icp4	Her b 8	76	3.66e-53	
18	Icp4	Her b 8	80	2.36e-59	67	Icp4	Her b 8	73	7.01e-52	
19	Icp4	Her b 8	81	4.30e-53	68	Icp4	Her b 8	75	2.18e-53	
20	Icp4	Bet v 2	82	3.86e-56	69	Icp4	Her b 8	73	1.30e-53	
21	IgSuA	Her b 8	80	6.03e-59	70	IgSuA	Her b 8	80	6.97e-59	
22	IgSuA	Her b 8	80	2.36e-56	71	IgSuA	Her b 8	80	2.36e-59	
23	Icp4	Bet v 2	82	3.86e-56	72	Icp4	Bet v 2	79	3.13e-58	
24	IgSuA	Her b 8	80	2.36e-59	73	Icp4	Bet v 2	82	2.42e-55	
25	Icp4	Bet v 2	81	3.79e-53	74	Icp4	Bet v 2	79	1.13e-58	
26	IgSuA	Her b 8	81	6.97e-40	75	IgSuA	Her b 8	81	4.91e-40	
27	Icp4	Bet v 2	83	2.50e-56	76	Icp4	Her b 8	80	2.36e-59	
28	IgSuA	Her b 8	80	4.02e-59	77	Icp4	Her b 8	80	4.69e-59	
29	Icp4	Her b 8	81	3.58e-56	78	IgSuA	Her b 8	80	1.17e-58	
30	Icp4	Bet v 2	82	3.86e-56	79	Icp4	Her b 8	80	3.93e-63	
31	Icp4	Her b 8	75	4.39e-57	80	Icp4	Her b 8	81	2.93e-59	
32	Icp4	Her b 8	80	1.44e-58	81	IgSuA	Her b 8	81	1.27e-59	
33	IgSuA	Her b 8	81	1.67e-59	82	Icp4	Bet v 2	82	3.86e-56	
34	IgSuA	Her b 8	81	6.97e-40	83	Icp4	Bet v 2	83	3.70e-57	
35	Icp4	Her b 8	80	3.93e-58	84	Icp4	Bet v 2	82	1.27e-56	
36	Icp4	Bet v 2	82	3.86e-56	85	Icp4	Bet v 2	82	5.23e-57	
37	Icp4	Her b 8	80	1.37e-58	86	Icp4	Her b 8	80	9.42e-55	
38	IgSuA	Her b 8	75	4.39e-57	87	Icp4	Bet v 2	82	3.86e-56	
39	Icp4	Bet v 2	82	3.86e-56	88	Icp4	Bet v 2	83	1.11e-56	
40	Icp4	Her b 8	83	2.10e-56	89	Icp4	Bet v 2	80	3.33e-55	
41	IgSuA	Her b 8	80	4.37e-59	90	IgSuA	Her b 8	80	1.57e-58	
42	Icp4	Bet v 2	82	1.27e-56	91	IgSuA	Her b 8	80	1.68e-58	
43	Icp4	Her b 8	93	1.27e-56	92	Icp4	Her b 8	78	1.06e-58	
44	Icp4	Bet v 2	82	1.27e-56	93	Icp4	Bet v 2	81	1.27e-53	
45	Icp4	Her b 8	78	9.42e-54	94	Icp4	Bet v 2	80	1.88e-58	
46	Icp4	Ara 18	81							

A

Secuencia	Modelo	Profilina	% identidad	valor E	Secuencia	Modelo	Profilina	% identidad	valor E
número	PDB	(SDAP)			número	PDB	(SDAP)		
4655179	Icp4	Her b 8	95	1.41e-57	100	Icp4	Bet v 2	93	4.52e-43
4655179	Icp4	Her b 8	96	5.53e-58					
4655179	Icp4	Her b 8	97	1.41e-57					
4655179	Icp4	Her b 8	98	5.53e-58					
4655179	Icp4	Her b 8	99	5.22e-58					

B

Tabla 11. Parámetros de ajuste de las secuencias analizadas en este trabajo a los modelos 3D de profilinas presentes en la base de datos PDB, según el programa PDB ProteinWorkshop 1.50 (MBT java 1.4).
 A) Secuencias de profilinas de *Olea europaea*, *B*
 Secuencias de *Betula verrucosa*, *Corylus avellana*, *Phleum pratense* y *Zea mays*.

Los modelos de proteínas a los que más se asemeja cada una de las secuencias y las diversas posibilidades de superposición de los esqueletos carbonados se muestran en la Fig. 20 y 21 respectivamente. El análisis de ambas figuras permite determinar que existen diferencias notables en la estructura 3D de los modelos analizados en *Betula pendula*, *Arabidopsis thaliana*, y *Hevea brasiliensis*, a los que más se aproximan las secuencias aminoacídicas de las profilinas secuenciadas.

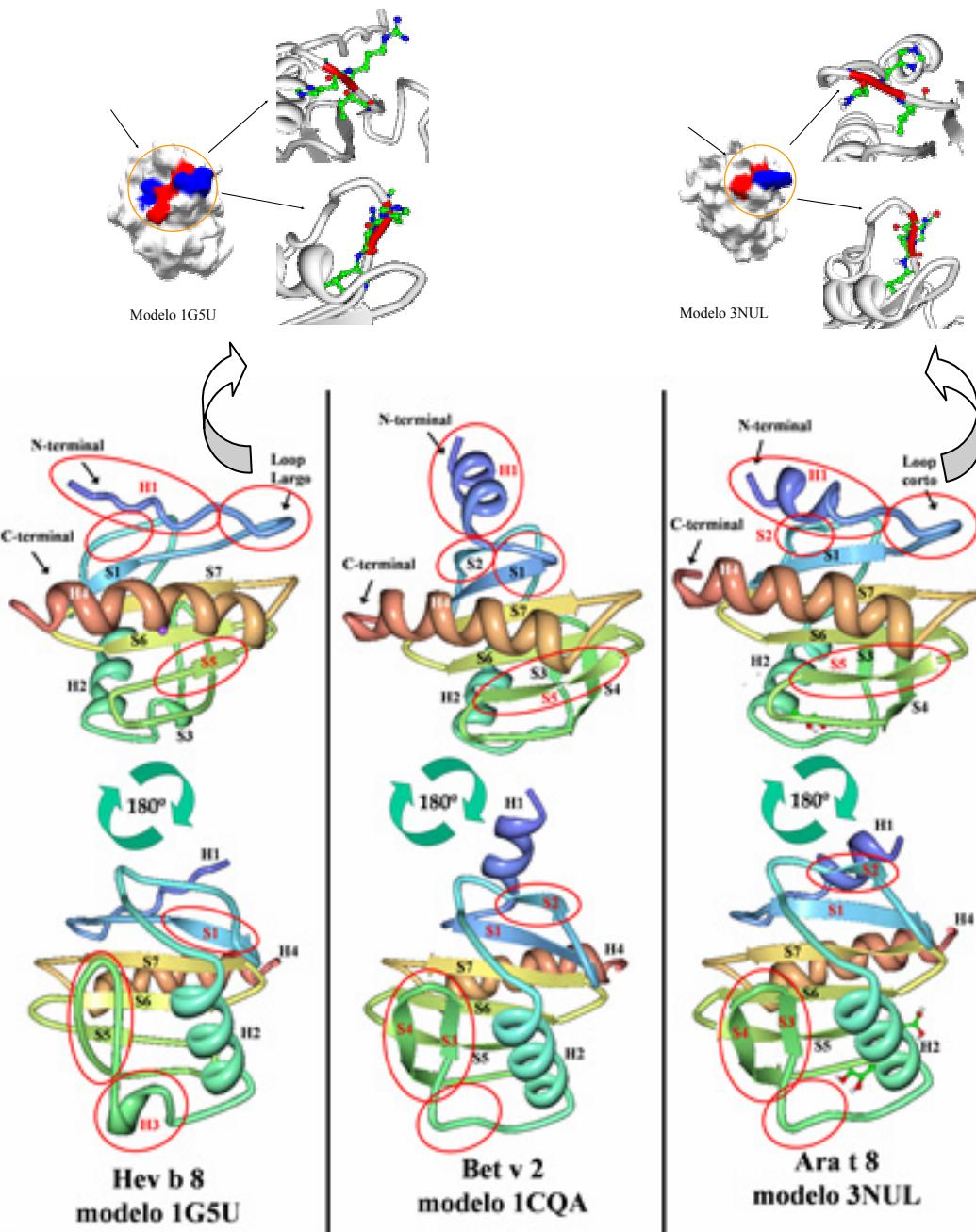


Figura 20. Estructura 3D de tres profilinas de plantas tomadas como referencia para construir los modelos estructurales. Los modelos corresponden a profilinas de las especies *Hevea brasiliensis* (Hev b 8), *Betula pendula* (Bet v 2) y *Arabidopsis thaliana* (Ara t 8). Las diferencias entre los tres modelos se remarcán con círculos rojos. Se muestra una ampliación del *loop* característico de profilinas de plantas en los modelos 1G5U y 3NUL (Los datos cristalográficos de esa región no están disponibles en el modelo 1CQA). En la parte superior de la figura se muestra un detalle de este *loop*, donde los aminoácidos que sufren delección se muestran en rojo, y en azul el resto de los aminoácidos que componen el *loop*.

En primer lugar, la α -hélice H1 es más larga en Bet v 2, que en los otros dos modelos.

En Hev b 8, desaparecen las láminas β S2, S3 y S4, que son sustituidas por un *loop*.

Además, en Hev b 8 existe una pequeña α -hélice H3, que no aparece en los otros dos modelos. Por último la lámina β S5 es también más corta en este modelo.

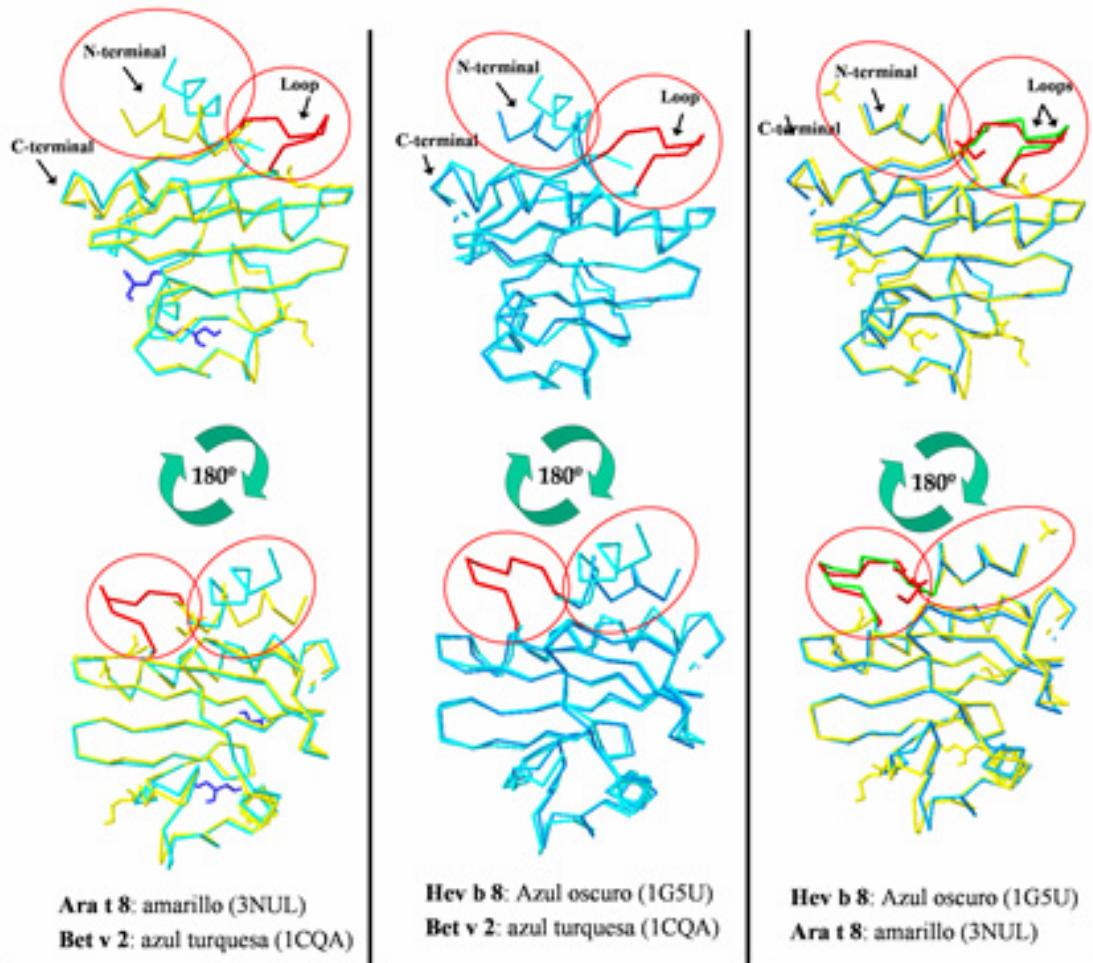


Figura 21. Superposición sobre la base de los carbonos α , de los tres modelos 3D de profilinas de plantas tomadas como referencia en la Figura 19. Las desviaciones RMS (Root

Mean Square) calculadas para la superimporsición entre cada dos modelos son los siguientes: 3NUL-1CQA = 0.79 Å, 3NUL-1G5U = 0.79 Å y 1G5U-1CQA = 0.87 Å.

Finalmente, en Ara t 8 y Hev b 8 existe un *loop* exterior (aminoácidos 17-20) que no aparece en el modelo Bet v 2 (Fig. 20), ya que su estructura no ha sido caracterizada completamente (Fedorov *et al.* 1997). Aunque existen diferencias notables en los elementos de estructura secundaria dentro de los modelos 3D, como se puede apreciar en la Fig. 20, no se encuentran cambios notables en la superimposición del esqueleto carbonado al comparar los tres modelos: sólo existe una desviación en el ángulo de torsión de la α -hélice H1 (N-terminal) al comparar el modelo 1CQA de *Betula pendula* con los otros dos modelos.

Existe una cierta correlación entre la asignación del modelo 3D más probable a cada una de las secuencias analizadas, y la presencia de delecciones significativas en éstas. Dicha delección en las secuencias que la poseen recae en la parte de la secuencia correspondiente a un *loop* externo de la proteína en su estructura 3D.

En las secuencias de *Olea europaea* se ha observado que todos aquellos clones que poseen una delección de los aminoácidos 18-20 poseen mayor homología con los modelos 3D de *Hevea brasiliensis* (1G5U) y *Arabidopsis thaliana* (3NUL).

Las profilinas de *Betula pendula* poseen una delección parcial de 1 aminoácido en la posición 18, como ocurre con casi todas las secuencias de *Corylus avellana*. Las secuencias 99 y 101 de *Corylus avellana* que poseen una delección, en este caso de 3 aminoácidos (posiciones 18-20), presentan homología estructural con Hev b 8 y Ara t 8 respectivamente. Por el contrario los restantes clones de *Corylus avellana* poseen mayor homología estructural con Bet v 2.

Las especies *Phleum pratense* y *Zea mays* poseen delecciones de 3 aminoácidos en las mismas posiciones (18 a 20). La mayoría de las secuencias de la primera especie están representadas por el modelo Ara t 8, mientras que todas las de *Zea mays* se asemejan al modelo Hev b 8.

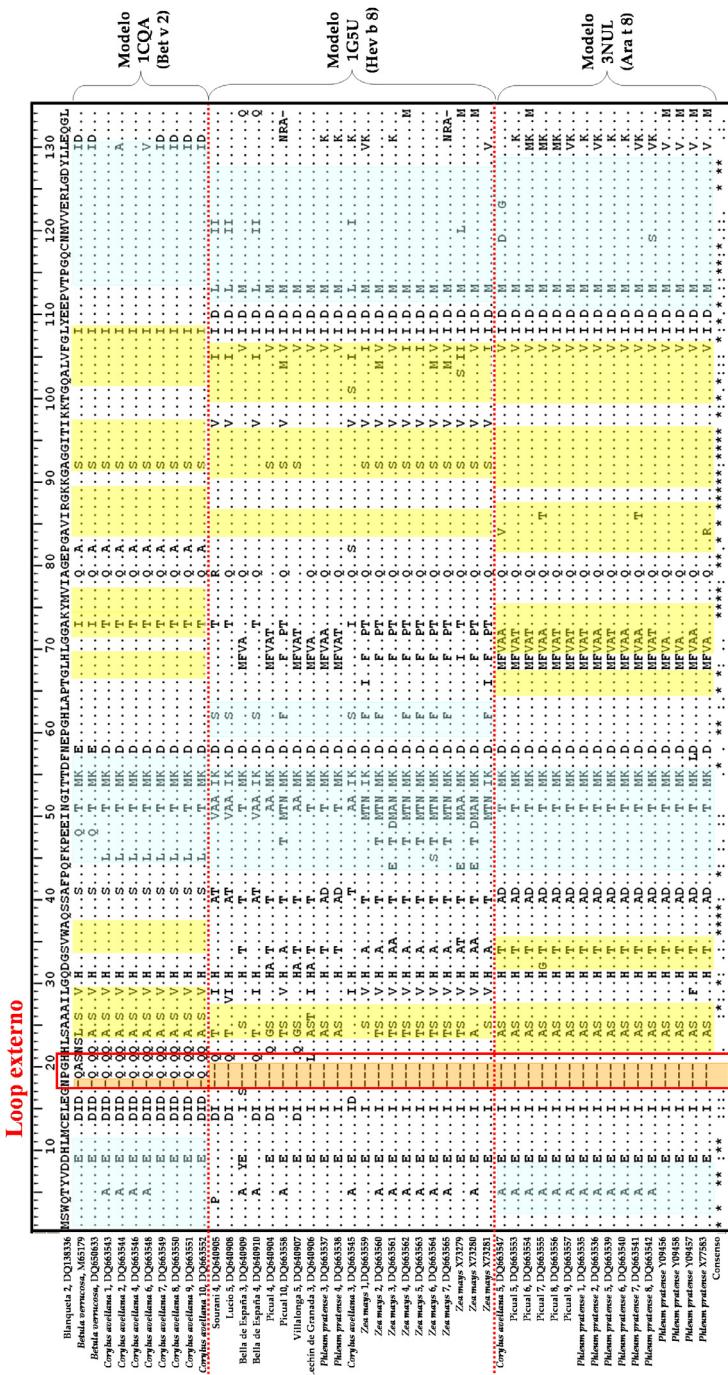


Figura 22. Alineamiento de las secuencias de profilinas con una delección total o parcial de los aminoácidos 18-20, correspondientes a un *loop* externo en su estructura 3D, típico de profilinas de plantas. La delección se muestra en una caja de color rojo. Se indican los modelos tridimensionales a los que más se aproxima cada una de las secuencias, así como los elementos de estructura secundaria (azul las α -hélices y en color naranja las láminas β).

Hemos detectado un cierto nivel de microheterogeneidad en los tres aminoácidos que componen parte de dicho *loop* externo. En *Olea europaea* el 70% de las secuencias de profilinas conservan una secuencia $^{18}\text{HEG}_{20}$ y el 14.5 % la secuencia $^{18}\text{HED}_{20}$. En esta última, cambia un residuo neutro como es la glicina (G) por otro residuo ácido con carga negativa y radical voluminoso como es el ácido aspártico (D). En *Betula pendula*, la delección sólo afecta al aminoácido 18, aunque los dos siguientes también cambian ($^{19}\text{QA}_{20}$ y $^{19}\text{QG}_{20}$) con respecto a *Olea europaea*. En las secuencias que se ajustan al modelo 3NUL correspondiente a *Arabidopsis thaliana* la secuencia de estos aminoácidos es $^{18}\text{NHL}_{20}$, mientras que las secuencias que se ajustan al modelo 1G5U de *Hevea brasiliensis* poseen la secuencia $^{18}\text{HRL}_{20}$.

4.2.5. Análisis teórico de las propiedades físico-químicas de las profilinas

Las secuencias nucleotídicas obtenidas en este trabajo han sido utilizadas para realizar un análisis exhaustivo de las propiedades físico-químicas teóricas de las proteínas previamente deducidas a partir de su traducción, mediante la codificación estándar. Los parámetros analizados son el peso molecular teórico (Pm), punto isoeléctrico teórico (pI), coeficiente de extinción molar (C.E.M.), índice de inestabilidad de la proteína, el índice medio de hidrofobicidad de Grand (GRAVY) e índice alifático (Tabla 12).

Tabla 12. Características físicas-químicas teóricas de las secuencias aminoacídicas de profilinas distintos cultivares de la especie *Olea europaea* (A) y *Corylus avellana*, *Betula pendula*, *Phleum pratense* y *Zea mays* (B). Sombreado en gris se indican el resto de las secuencias de profilinas previamente registradas en la base de datos GenBank™/EMBL.

Secuencia número	Pm Teórico (Da)	pI Teórico	Nº C. E. M. 280 nm (24 °C/m²)	Índice de instabilidad	GRAVY	Índice alifático	Secuencia número	Pm Teórico (Da)	pI Teórico	Nº C. E. M. 280 nm (24 °C/m²)	Índice de instabilidad	GRAVY	Índice alifático		
Y12429	14489.44	5.06	134	078035986	27.96	-0.207	75.67	47	14427.39	5.21	134	078035986	26.92	-0.172	79.35
Y12429	14427.39	5.21	134	078035986	26.92	-0.172	79.33	48	14448.41	5.06	134	078035986	27.96	-0.193	79.36
Y12430	14399.34	5.21	134	078035986	26.92	-0.190	79.31	49	14427.39	5.21	134	078035986	26.92	-0.172	79.33
1	14383.36	5.21	134	078035986	26.92	-0.179	79.33	50	14499.44	5.07	134	078035986	25.67	-0.196	79.35
2	14383.36	5.21	134	078035986	26.92	-0.179	79.33	51	14510.99	4.87	131	078035986	33.93	-0.032	91.60
3	14383.27	5.21	134	078035986	26.73	-0.194	79.33	52	14513.44	5.06	134	078035986	27.96	-0.214	79.36
6	14413.36	5.21	134	078035986	26.92	-0.193	79.52	53	14475.45	5.21	134	078035986	26.92	-0.205	79.67
8	14383.36	5.21	134	078035986	26.92	-0.179	79.33	54	14427.39	5.21	134	078035986	26.92	-0.172	79.33
6	14356.40	5.36	134	078035986	28.29	-0.170	79.33	55	14484.49	5.39	134	078035986	26.29	-0.189	79.35
7	14427.39	5.21	134	078035986	26.92	-0.172	79.33	56	14386.37	5.06	134	078035986	27.96	-0.167	82.38
8	14370.36	4.92	134	078035986	29.25	-0.186	78.58	57	14386.26	5.06	134	078035986	28.59	-0.256	76.42
9	14444.38	5.06	134	078035986	28.39	-0.178	78.58	58	14447.40	5.21	134	078035986	25.74	-0.201	79.67
10	14713.30	5.23	130	160701068	30.07	-0.103	78.83	59	14418.38	5.06	134	078035986	27.96	-0.179	79.35
11	14409.96	4.87	131	078035986	33.53	-0.066	90.15	60	14425.44	5.21	134	078035986	26.92	-0.154	80.49
12	14383.46	5.06	134	078035986	27.96	-0.210	76.42	61	14413.38	5.21	134	078035986	26.92	-0.193	79.36
13	14369.17	5.04	134	078035986	28.79	-0.134	63.73	62	14413.38	5.21	134	078035986	26.92	-0.193	79.36
14	14415.36	5.21	134	078035986	26.42	-0.211	76.42	63	14598.37	5.06	131	078035986	36.73	0.015	83.44
15	14381.46	5.21	134	078035986	29.28	-0.184	78.58	64	14398.31	5.22	131	078035986	27.15	-0.068	82.47
16	14454.40	5.49	134	078035986	28.76	-0.219	79.33	65	14495.37	5.22	131	078035986	27.90	-0.097	76.72
17	14486.40	5.36	134	078035986	27.44	-0.243	75.67	66	14677.31	5.43	131	078035986	27.40	-0.079	77.48
18	14383.36	5.21	134	078035986	26.92	-0.178	79.33	67	14377.34	5.22	131	078035986	27.90	-0.082	79.69
19	14386.30	4.91	134	078035986	27.96	-0.165	79.33	68	14143.38	5.22	131	078035986	27.98	-0.063	80.91
20	14427.39	5.21	134	078035986	26.92	-0.172	79.33	69	14484.37	5.34	130	078035986	26.30	-0.126	79.00
21	14427.39	5.21	134	078035986	26.92	-0.172	79.33	70	14455.42	5.07	131	078035986	27.96	-0.198	79.35
22	14369.33	5.21	134	078035986	26.92	-0.172	78.58	71	14418.38	5.06	134	078035986	31.23	-0.169	79.35
23	14427.39	5.21	134	078035986	26.92	-0.172	79.33	72	14369.34	5.21	134	078035986	26.52	-0.175	79.35
24	14383.36	5.21	134	078035986	26.92	-0.179	79.33	73	14418.43	5.21	134	078035986	27.88	-0.178	79.35
25	14417.33	5.06	134	078035986	27.44	-0.223	74.25	74	14369.33	5.21	134	078035986	29.80	-0.168	78.38
26	14413.36	5.21	134	078035986	26.92	-0.193	78.58	75	14471.42	5.06	134	078035986	27.96	-0.216	79.38
27	14427.39	5.21	134	078035986	29.80	-0.167	79.33	76	14385.36	5.21	134	078035986	26.52	-0.175	79.35
28	14415.34	5.21	134	078035986	27.15	-0.201	76.42	77	14385.36	5.21	134	078035986	26.92	-0.179	79.35
29	14484.49	5.39	134	078035986	30.17	-0.199	79.33	78	14401.39	5.21	134	078035986	26.52	-0.189	76.42
30	14427.39	5.21	134	078035986	26.92	-0.172	79.33	79	14355.28	5.21	134	078035986	28.52	-0.220	78.38
31	14427.39	5.21	134	078035986	26.92	-0.172	79.33	80	14522.06	5.06	131	078035986	32.88	-0.023	92.37
32	14418.38	5.06	134	078035986	27.96	-0.175	79.33	81	14439.43	5.21	134	078035986	25.64	-0.140	80.49
33	14397.36	5.21	134	078035986	27.79	-0.172	80.07	82	14427.39	5.21	134	078035986	26.52	-0.172	79.35
34	14413.36	5.21	134	078035986	26.92	-0.193	78.58	83	14313.44	5.06	134	078035986	27.96	-0.214	79.38
35	14399.36	5.21	134	078035986	27.44	-0.209	80.75	84	14485.43	5.06	134	078035986	27.96	-0.196	78.38
36	14427.39	5.21	134	078035986	26.92	-0.172	79.33	85	14343.47	5.06	134	078035986	31.09	-0.219	78.38
37	14358.28	5.04	134	078035986	28.32	-0.160	78.58	86	14387.33	5.38	130	078035986	23.98	-0.206	78.47
38	14394.27	5.06	134	078035986	26.67	-0.036	84.89	87	14427.39	5.21	134	078035986	26.82	-0.172	79.35
39	14427.39	5.21	134	078035986	26.92	-0.172	79.33	88	14457.42	5.21	134	078035986	26.52	-0.191	78.38
40	14453.48	5.21	134	078035986	29.05	-0.138	82.24	89	14413.41	5.38	134	078035986	29.80	-0.134	80.75
41	14413.37	5.21	134	078035986	25.88	-0.189	78.58	90	14417.36	5.21	134	078035986	25.08	-0.166	79.35
42	14459.45	5.20	134	078035986	28.94	-0.123	81.49	91	14409.44	5.21	134	078035986	25.14	-0.140	82.38
43	14488.43	5.06	134	078035986	27.96	-0.196	79.33	92	14397.37	5.21	134	078035986	28.58	-0.154	80.07
44	14488.43	5.06	134	078035986	27.96	-0.196	79.33	93	14409.44	5.21	134	078035986	23.14	-0.140	82.38
45	14488.43	5.06	134	078035986	27.96	-0.196	79.33	94	14356.37	5.06	131	078035986	30.73	0.015	83.44
46	14279.22	5.00	134	078035986	29.85	-0.156	86.64								

B

Nº de Acceso GenBank	Pm Teórico (Da)	pI Teórico	Nº C. E. M. 280 nm (24 °C/m²)	Índice de instabilidad	GRAVY	Índice alifático	
M65179	14253.23	5.82	133	078035986	26.80	-0.106	84.29
95	14278.26	5.82	133	078035986	27.85	-0.123	84.29
96	14203.15	4.89	133	078035986	30.33	-0.141	85.04
97	14165.07	4.89	133	078035986	30.33	-0.156	82.86
98	14083.16	5.41	131	078035986	30.35	-0.007	93.13
99	14203.15	4.89	133	078035986	30.33	-0.141	85.04
100	14087.20	4.90	131	078035986	29.03	-0.004	84.89
101	14189.12	4.89	133	078035986	30.33	-0.138	84.29
102	14219.15	4.87	133	078035986	28.48	-0.158	84.29
103	14219.15	4.87	133	078035986	28.48	-0.158	84.29
104	14219.15	4.87	133	078035986	28.48	-0.158	84.29
105	14219.15	4.87	133	078035986	28.48	-0.158	84.29
106	14139.30	5.22	131	078035986	27.25	-0.068	82.67
107	14151.25	5.22	131	078035986	27.68	-0.066	82.67
108	14159.35	5.22	131	078035986	27.25	-0.068	82.67
109	14189.33	5.22	131	078035986	27.25	-0.067	81.93
110	14159.35	5.22	131	078035986	27.25	-0.068	82.67
111	14129.28	5.22	131	078035986	27.25	-0.049	83.44
112	14103.20	5.22	131	078035986	27.03	-0.085	79.69
113	14118.25	5.22	131	078035986	27.68	-0.044	81.93
X73279	14547.20	4.94	131	078035986	32.95	-0.127	81.95
X73280	14810.97	5.89	137	078035986	38.45	-0.166	74.82
X73281	14237.36	4.91					

Todas las profilinas teóricas analizadas son proteínas ácidas, con pI medio es de 5.14 ± 0.14 , y con valor medio de PM de 14334.44 ± 144.01 Da, sin tener en cuenta modificaciones postraduccionales. El número de aminoácidos que más abunda en las secuencias de profilinas es de 134 en el caso de *Olea europaea*, 133 en *Betula pendula* y *Corylus avellana* y 131 en *Phleum pratense* y *Zea mays*.

También se observa que la mayoría de las profilinas son hidrofílicas como muestra el valor negativo del índice de Grand (GRAVY) (Kyte & Doolittle 1982), que indica el grado de solubilidad de las proteínas. El valor medio de estos parámetros es: -0.15 ± 0.06 . Otro factor que define a una proteína es su estabilidad. Dicha propiedad se puede cuantificar mediante el índice alifático, cuyo valor medio es de 80.03 ± 3.62 . Este parámetro nos indica el volumen relativo ocupado por residuos alifáticos (A, V, I y L) y puede ser considerado como un factor positivo en el incremento de la estabilidad térmica en proteínas globulares (Kyte & Doolittle 1982). Otra forma de definir la estabilidad de una proteína, es calculando el índice de estabilidad definido por Guruprasad *et al.* (1990). Si el valor es menor de 40, la proteína se considera estable y si es mayor inestable. En el caso de las profilinas, el valor medio es de 27.95 ± 2.07 , por lo que se trata de proteínas de gran estabilidad.

Otro parámetro que caracteriza a una proteína en función de su secuencia aminoacídica es el coeficiente de extinción molar, cuyo valor nos indica cuanta luz es absorbida por una proteína a determinada longitud de onda (λ). Los aminoácidos que influyen en dicha absorción son concretamente la tirosina, triptófano y cisteína a una λ dada. La cisteína no absorbe apreciablemente a valores mayores de $\lambda > 260$ nm, aunque las cisteínas que forman los puentes disulfuro sí la absorben. El primer valor de absorbancia se ha calculado asumiendo que todos los residuos de cisteína de la proteína están en forma de reducida (-SH), mientras que el segundo valor que aparece en la Tabla 12, corresponde a la situación teórica en la que todas las cisteínas están en forma oxidada (-S-S-) (Gill & von Piel 1989). Estos valores teóricos ($17085 / 16960 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) se mantienen constantes en todas las secuencias analizadas.

Se ha realizado una representación gráfica de dos de los parámetros más relevantes (Pm versus pI). Como muestra la Fig. 23, se puede establecer de forma arbitraria al menos ocho grupos en la especie *Olea europaea*, 1 grupo en *Betula pendula*, 4 grupos en *Corylus avellana*, tres grupos en *Phleum pratense* y 3 grupos en *Zea mays*. De todos ellos, y dentro de cada especie, al menos se pueden destacar dos grupos principales de secuencias de profilinas en base a su frecuencia relativa, con la excepción de *Betula pendula*, en la que las secuencias obtenidas poseen una alta identidad (Tabla 13).

Representación gráfica PM /pI

PM (Da)

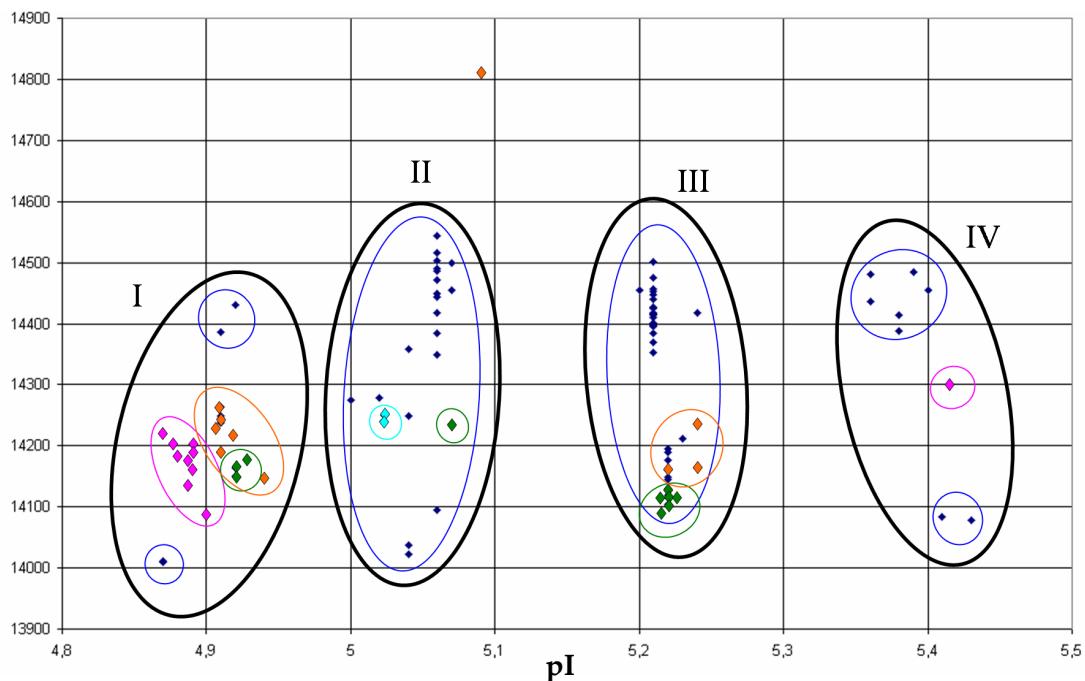


Figura 23. Representación gráfica de los parámetros teóricos PM /pI en las profilinas de las cinco especies estudiadas. Los puntos de la gráfica representan cada una de la profilinas obtenidas en este trabajo. Cada grupo en los que se ha dividido los grupos de profilinas se destaca con círculos del mismo color que los puntos correspondientes a las profilinas de cada especie. De color azul oscuro las profilinas correspondientes a *Olea europaea*; de color azul turquesa las profilinas de *Betula pendula*; de color violeta las correspondientes a *Corylus avellana*; las verdes a *Phleum pratense* y las anaranjadas corresponden a *Zea mays*. Los círculos negros destacan cada uno de los grupos de profilinas en función de sus propiedades

Tabla 13. Establecimiento de grupos de profilinas en función de los parámetros teóricos PM (Da) y pI. La frecuencia relativa se ha calculado para cada especie individualmente.

Especie	pI	Pm (Da)	Frecuencia (%)	
<i>Olea europaea L.</i>	4.89±0.03	14010.48±0.73	2.06	Grupo I
		14408.84±31.88	2.06	
	5.05±0.01	14048.17±31.66	4.12	Grupo II
		14261.70±17.71	2.06	
		14456.74±52.87	21.65	
	5.21±0.01	14175.31±24.51	6.20	Grupo III
		14414.13±28.49	53.60	
	5.39±0.02	14402.39±136.10	8.25	Grupo IV
<i>Betula pendula</i>	5.02±0	14265.74±17.71	100.00	Grupo II
<i>Corylus avellana</i>	4.90±0	14087.20±0	10.00	Grupo I
		14175.10±19.83	20.00	
		14213.82±8.26	60.00	
	5.41±0	14191.14±0	10.00	Grupo IV
<i>Phleum pratense</i>	4.92±0	14154.91±8.10	25.00	Grupo I
	5.07±0	14235.34±0	8.33	Grupo II
	5.22±0	14141.66±29.48	66.67	Grupo III
<i>Zea mays</i>	4.92±0.01	14221.99±44.52	60.00	Grupo I
	5.09±0	14810.97±0	10.00	Grupo II
	5.23±0.01	14182.97±46.82	30.00	Grupo III

4.2.6. Análisis filogenético de las secuencias

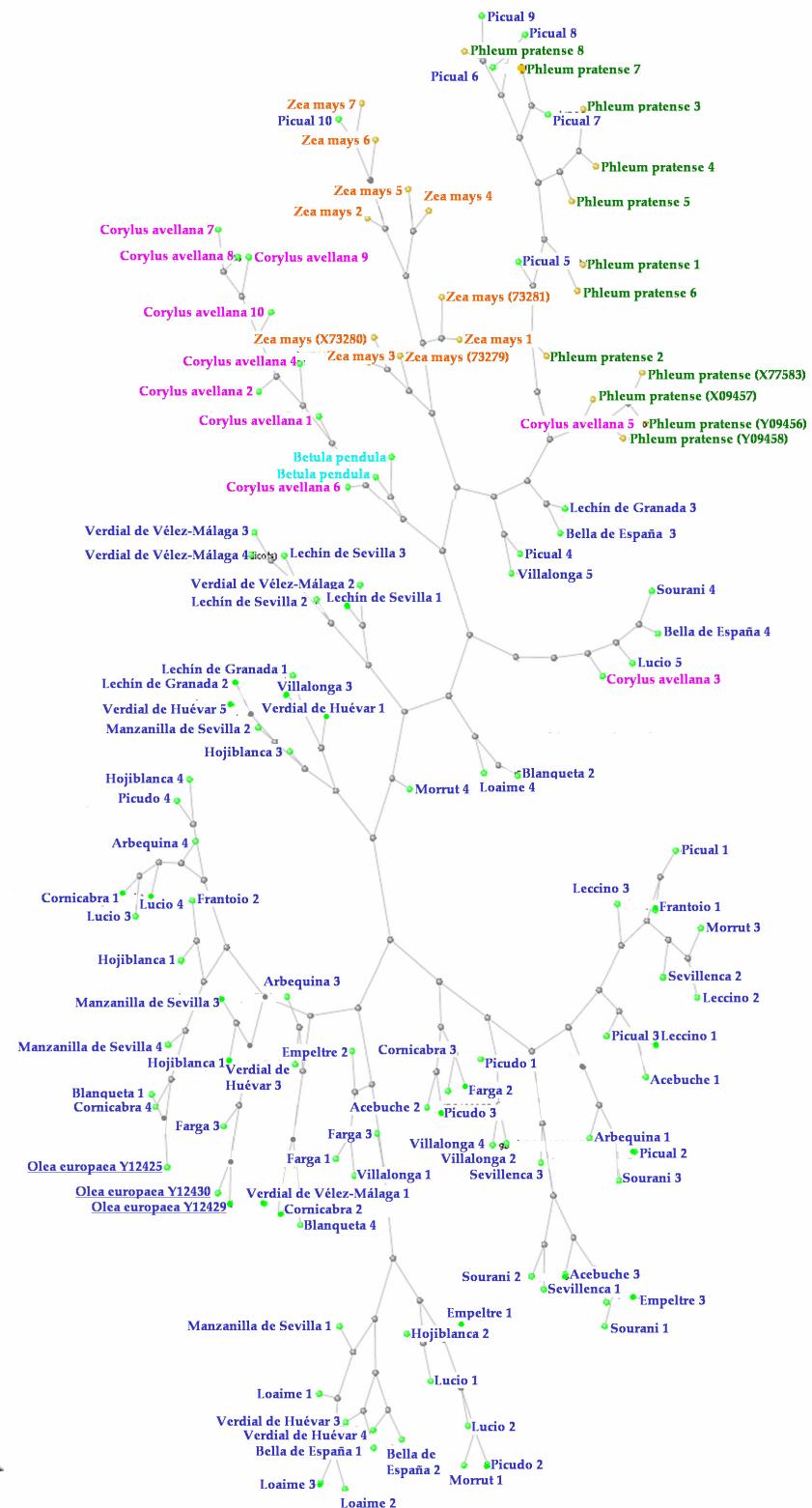
Los alineamientos de las secuencias nucleotídicas y aminoacídicas realizadas mediante el programa ClustalW, fueron utilizados para la generación de árboles filogenéticos. Con objeto de facilitar el establecimiento de posibles correlaciones, los análisis filogenéticos fueron realizados según diversos criterios que incluyeron: a) análisis global (todas las secuencias con excepción de las genómicas), b) por especie y c) según criterios físico-químicos y estructurales.

Los árboles filogenéticos se constituyeron siguiendo el método NJ (Neighbour Joining) de Saitou y Nei (1986), basados en matrices tipo BLOSUM (BLOck SUbsitution Matrix), desarrolladas por Henikoff & Henikoff (1992).

En el caso de las secuencias nucleotídicas, los archivos NJ se generaron y visualizaron con la aplicación NCBI BLAST (Altschul *et al.* 1990). Los árboles filogenéticos fueron generados en un formato “de fuerzas”, siendo de 0.75 la distancia entre cada par de puntos consecutivos, permitiéndonos calcular la distancia entre cada dos secuencias cualquiera en el árbol.

En el caso de las secuencias aminoacídicas, los archivos NJ se generaron tras alineamiento múltiple con el programa Clustal X v1.81 (Thompson *et al.* 1997). Posteriormente, los archivos NJ se visualizaron en el programa TreeView version 0.5.0 (Roderic D.M., University of Glasgow, UK; <http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html>). En este caso, se generaron cladogramas “inclinados”.

El análisis global de todas las secuencias nucleotídicas y aminoacídicas se muestran respectivamente en las Figs. 24A y B. En ambas figuras se puede apreciar una clara diferenciación taxonómica, de forma que con limitadas excepciones, las secuencias de cada especie aparecen en *clusters* bien diferenciados.



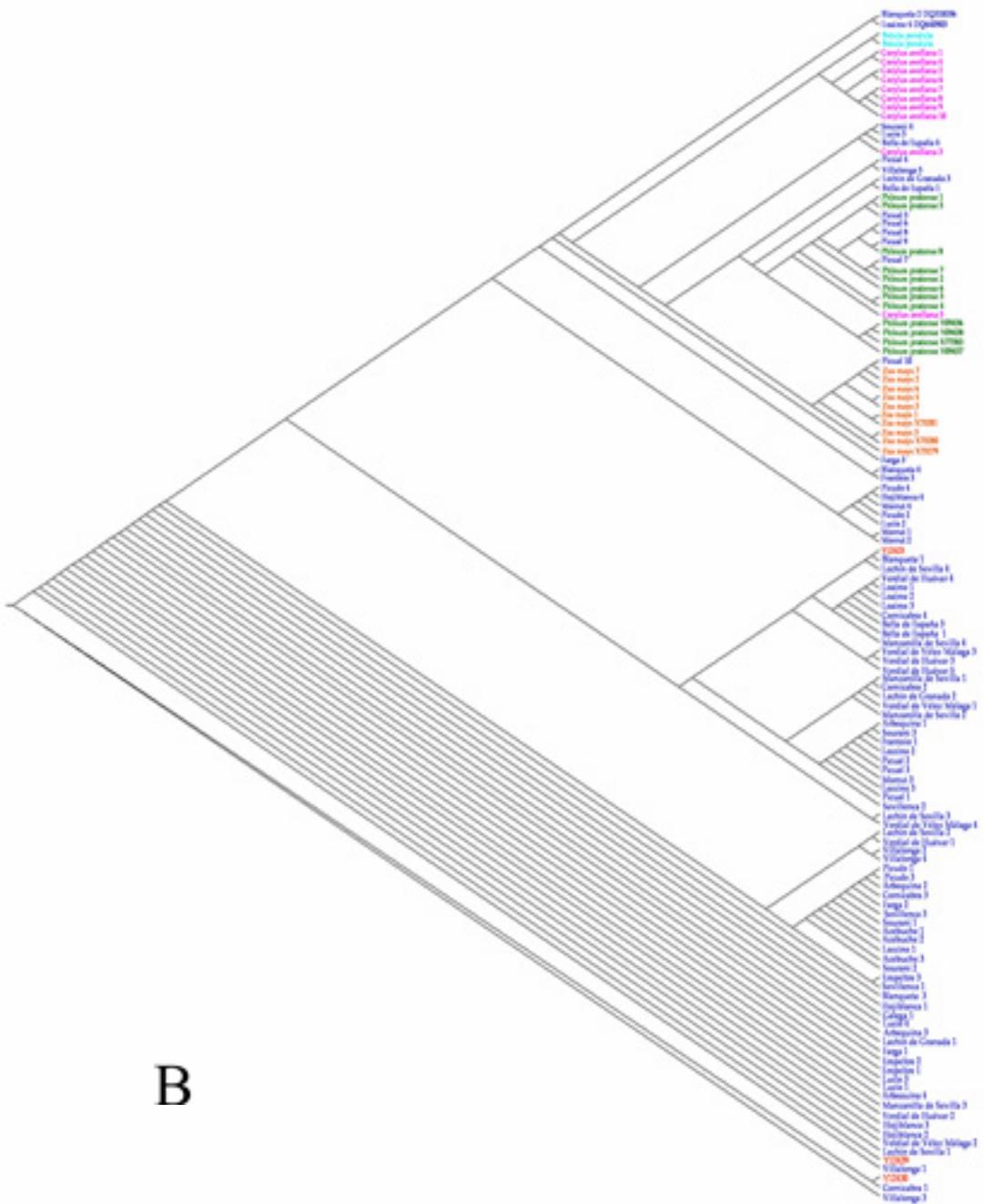
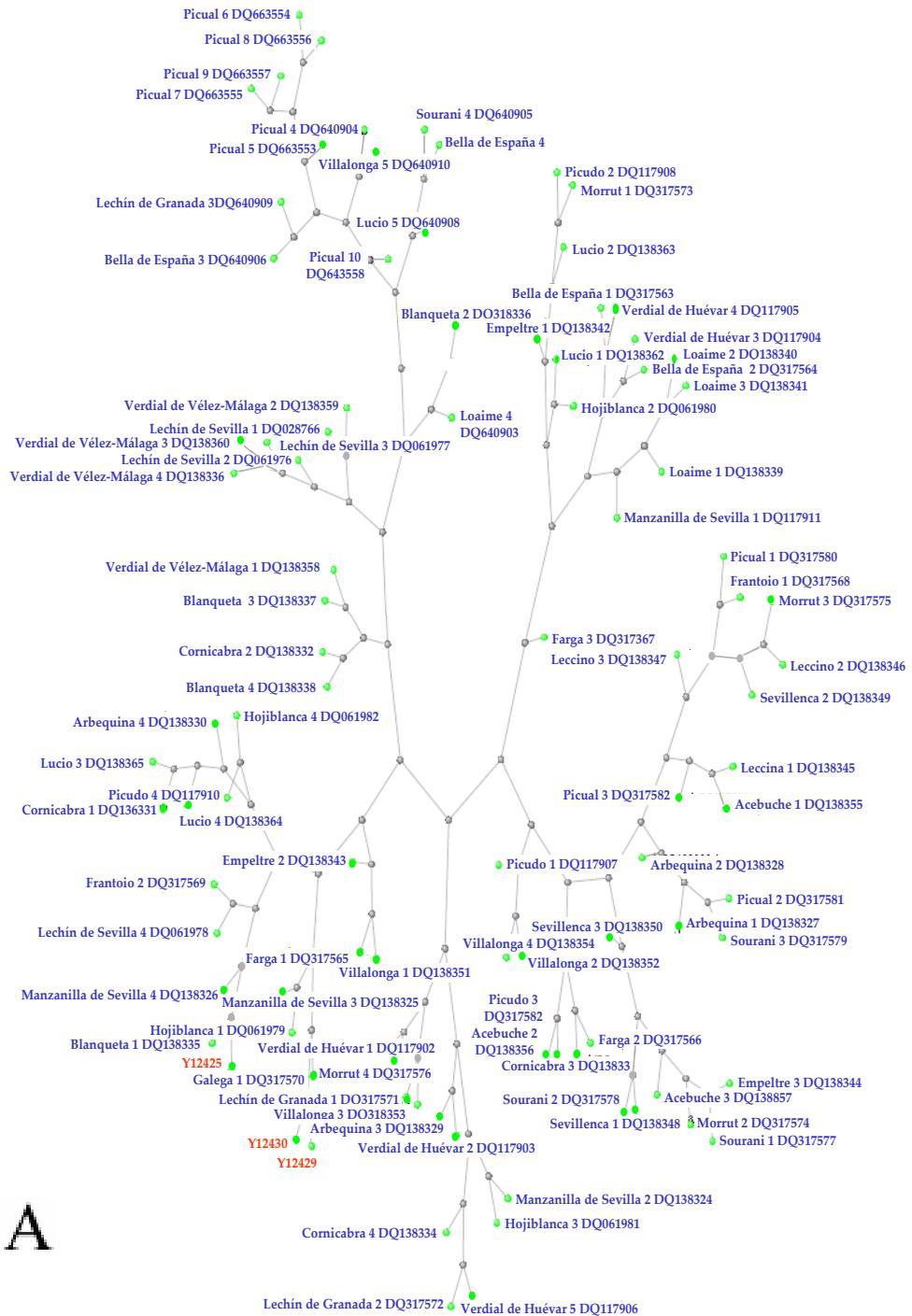
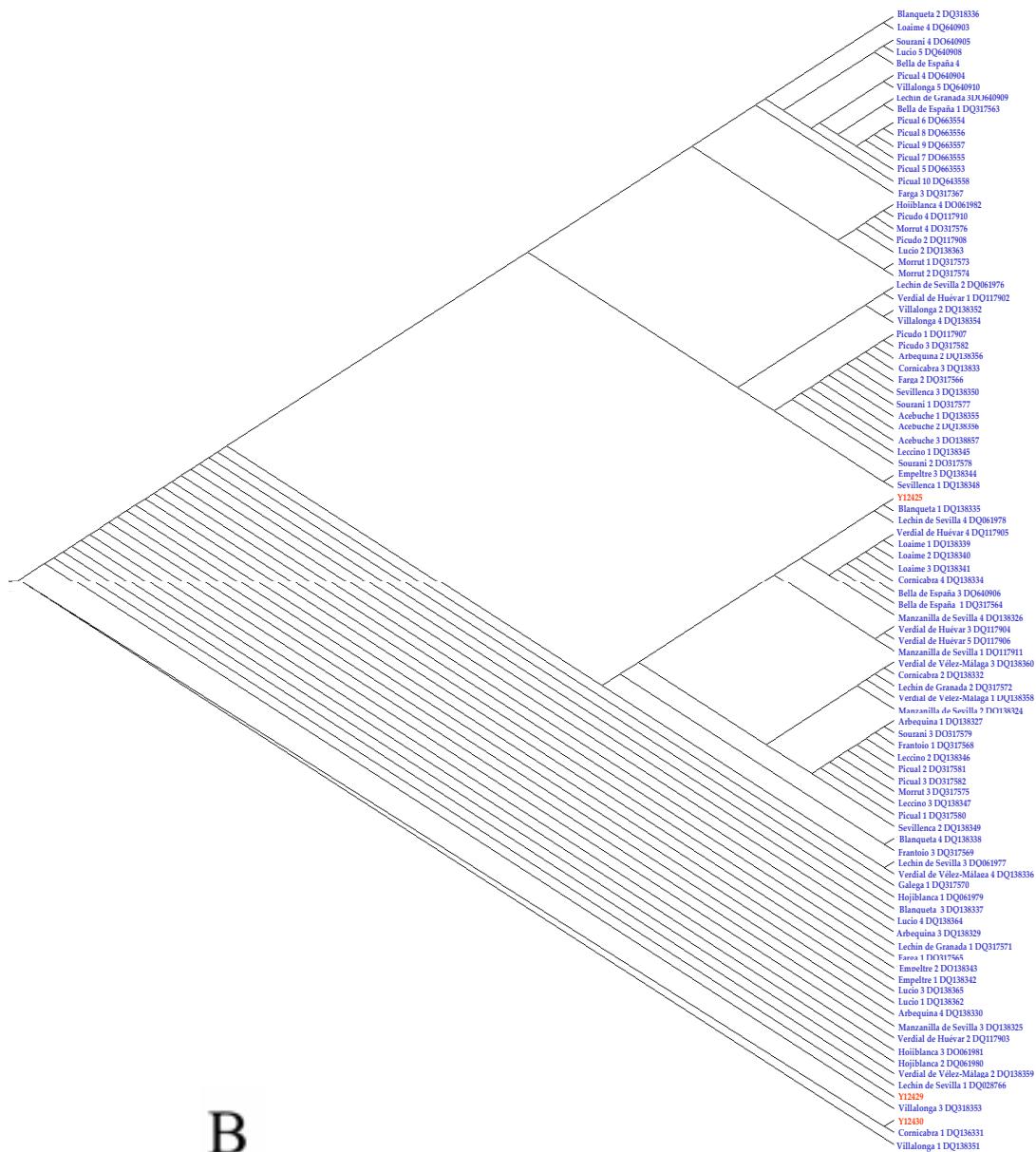


Figura 24. Análisis filogenético o clustering de las secuencias de profilinas de las cinco especies analizadas. A) Secuencias nucleotídicas, B) secuencias aminoacídicas. Junto al nombre de la especie, aparece el número de clon y el número de acceso a GenBank™/EMBL.

Cuando se analizaron las relaciones filogenéticas dentro de cada especie, no se observaron relaciones filogenéticas claras, por ejemplo en relación al origen varietal en el caso de *Olea europaea* (Figs. 25A y B).





B

Figura 25. Análisis filogenético o clustering de las secuencias de profilinas de *Olea europaea*
A) Secuencia nucleotídicas, B) secuencias aminoacídicas. Junto al nombre del cultivar,
aparece el número de clon y el número de acceso, así como de color rojo, aquellos clones
previamente depositados en la base de datos GenBankTM/EMBL.

No se realizó análisis de clusters en el caso de *Betula pendula*, al existir únicamente dos secuencias.

Las figuras 26, 27 y 28 muestran el análisis cladístico realizado individualmente con las secuencias de *Corylus avellana*, *Phleum pratense* y *Zea mays*, respectivamente. En los tres casos se incluyó además la información correspondiente al grupo descriptivo de su propiedades físico-químicas de Peso molecular versus Punto isoeléctrico (ver Fig. 23 y Tabla 13) y el modelo 3-D al que mejor se ajusta cada una de las secuencias (ver Tabla 11).

En las tres especies es posible identificar claramente que las relaciones filogenéticas detectadas están estrechamente relacionadas con dichos parámetros físico-químicos y estructurales.

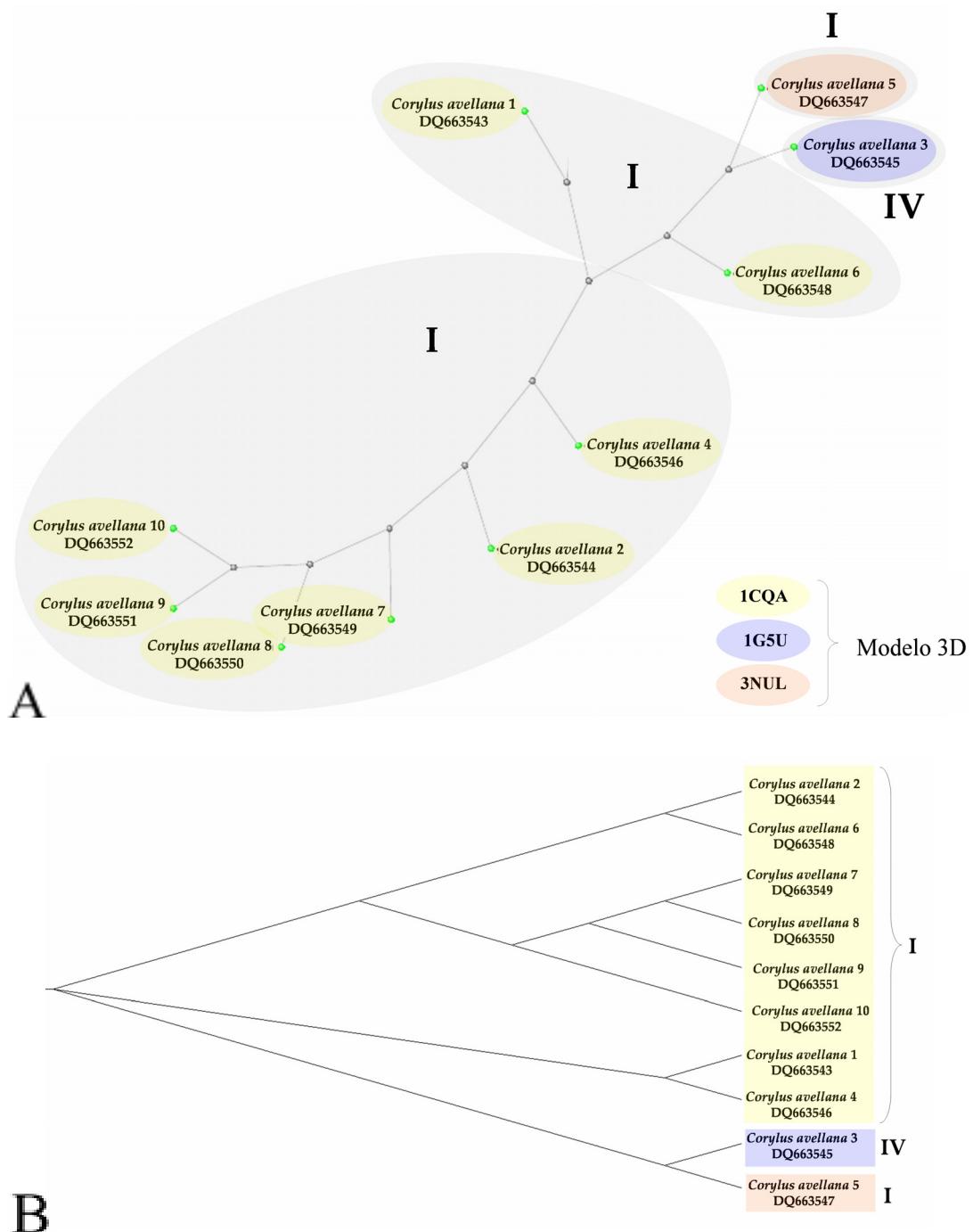


Figura 26. Análisis filogenético o clustering de las secuencias de profilinas de *Corylus avellana*. A) Secuencias nucleotídicas, B) secuencias aminoacídicas. Junto al nombre de la especie, aparece el número de clon y el número de acceso, así como de color rojo, aquellos clones previamente depositados en la base de datos GenBank™/EMBL. En amarillo se destacan aquellos clones cuya estructura 3D se asemeja al modelo 1CQA, en azul para el modelo 1G5U y de color anaranjado los del modelo 3NUL. Los números I-IV indican el grupo asignado según sus propiedades físico-químicas

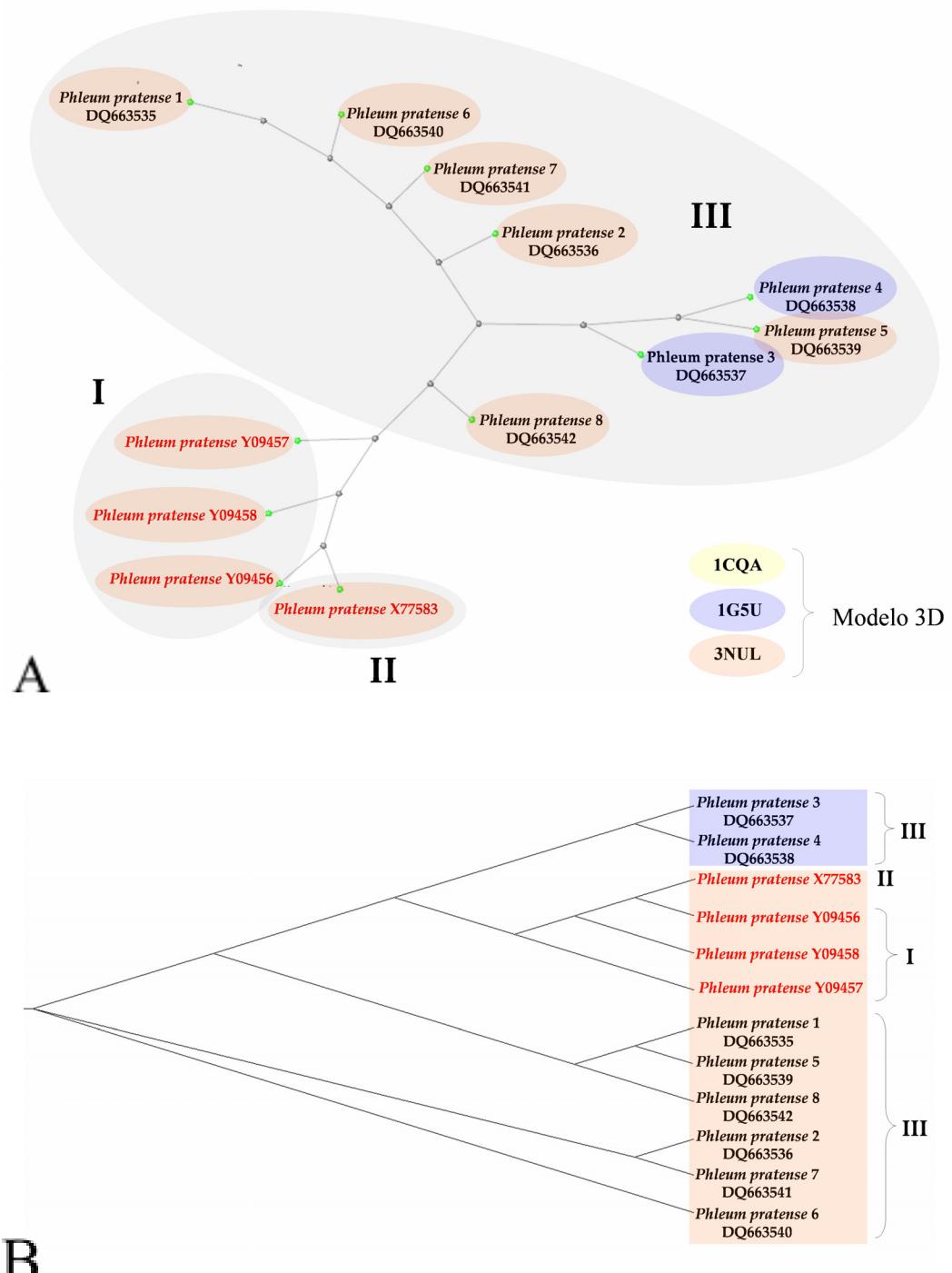


Figura 27. Análisis filogenético o clustering de las secuencias de profilinas de *Phleum pratense*. A) Secuencias nucleotídicas, B) secuencias aminoacídicas. Junto al nombre de la especie, aparece el número de clon y el número de acceso, así como de color rojo aquellos clones previamente depositados en la base de datos Bank™/EMBL. En amarillo se destacan aquellos clones cuya estructura 3D se asemeja al modelo 1CQA, en azul para el modelo

1G5U y de color anaranjado los del modelo 3NUL. Los números I-III indican el grupo asignado según sus propiedades físicas-químicas

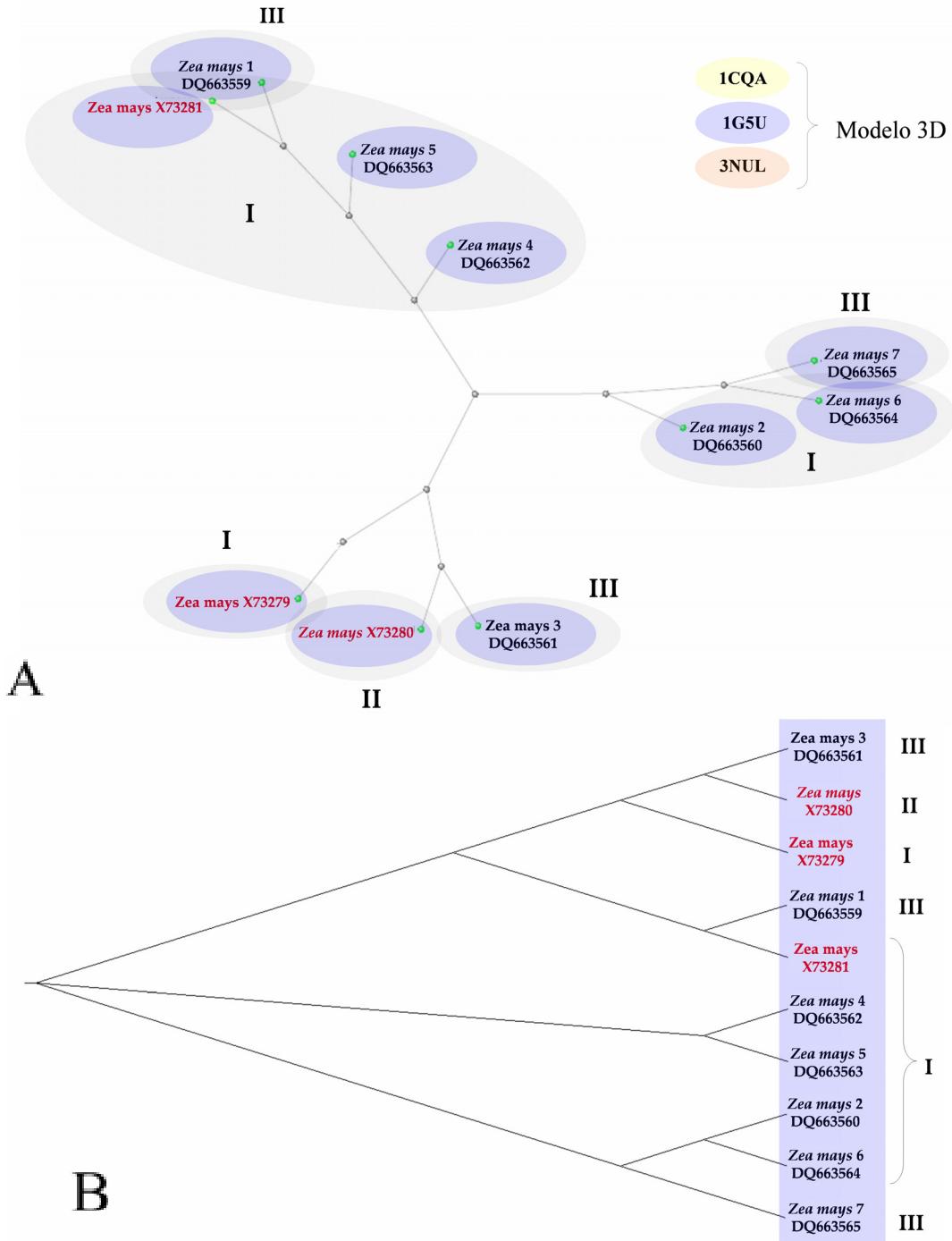


Figura 28. Análisis filogenético o clustering de las secuencias de profilinas de *Zea mays*. A) Secuencias nucleotídicas, B) secuencias aminoacídicas. Junto al nombre de la especie, aparece el número de clon y el número de acceso, así como de color rojo aquellos clones previamente depositados en la base de datos GenBank™/EMBL. En amarillo se destacan aquellos clones cuya estructura 3D se asemeja al modelo 1CQA, en azul para el modelo

1G5U y de color anaranjado los del modelo 3NUL. Los números I-III indican el grupo asignado según sus propiedades físico-químicas

En el caso del olivo, y con objeto de establecer algún tipo de correlación adicional, se ensayó un análisis filogenético según criterios físico-químicos y estructurales como carácter primario de clasificación de las secuencias. En este caso se realizó un análisis de clusters para el conjunto de secuencias que poseían unas características similares de punto isoeléctrico, peso molecular y modelo de estructura 3D más probable. De esta forma se establecieron 3 agrupaciones de secuencias (dos mayoritarias y una con un limitado número de secuencias), donde las propiedades físico-químicas (PM y pI) (Tabla 14) se solapan entre agrupaciones, ya que el grupo II de PM y pI es el mayoritario entre profilinas.

Tabla 14. Grupos de secuencias establecidos para un posterior análisis de *clusters* según criterios físico-químicos y estructurales.

Características	Agrupación 1	Agrupación 2	Agrupación 3
pI y PM	Grupo I-IV Mayoritariamente II	Grupo I-IV Mayoritariamente II y III	Grupo II y III
Modelo 3D	1G5U	1CQA	3NUL

El análisis cladístico de las agrupaciones 1, 2 y 3 se representa respectivamente en las figuras 29, 30 y 31. Tras este tipo de representación sí se pueden establecer algunas correlaciones entre el origen varietal y la proximidad filogenética, como se muestra en diversos ejemplos a lo largo de dichas figuras.

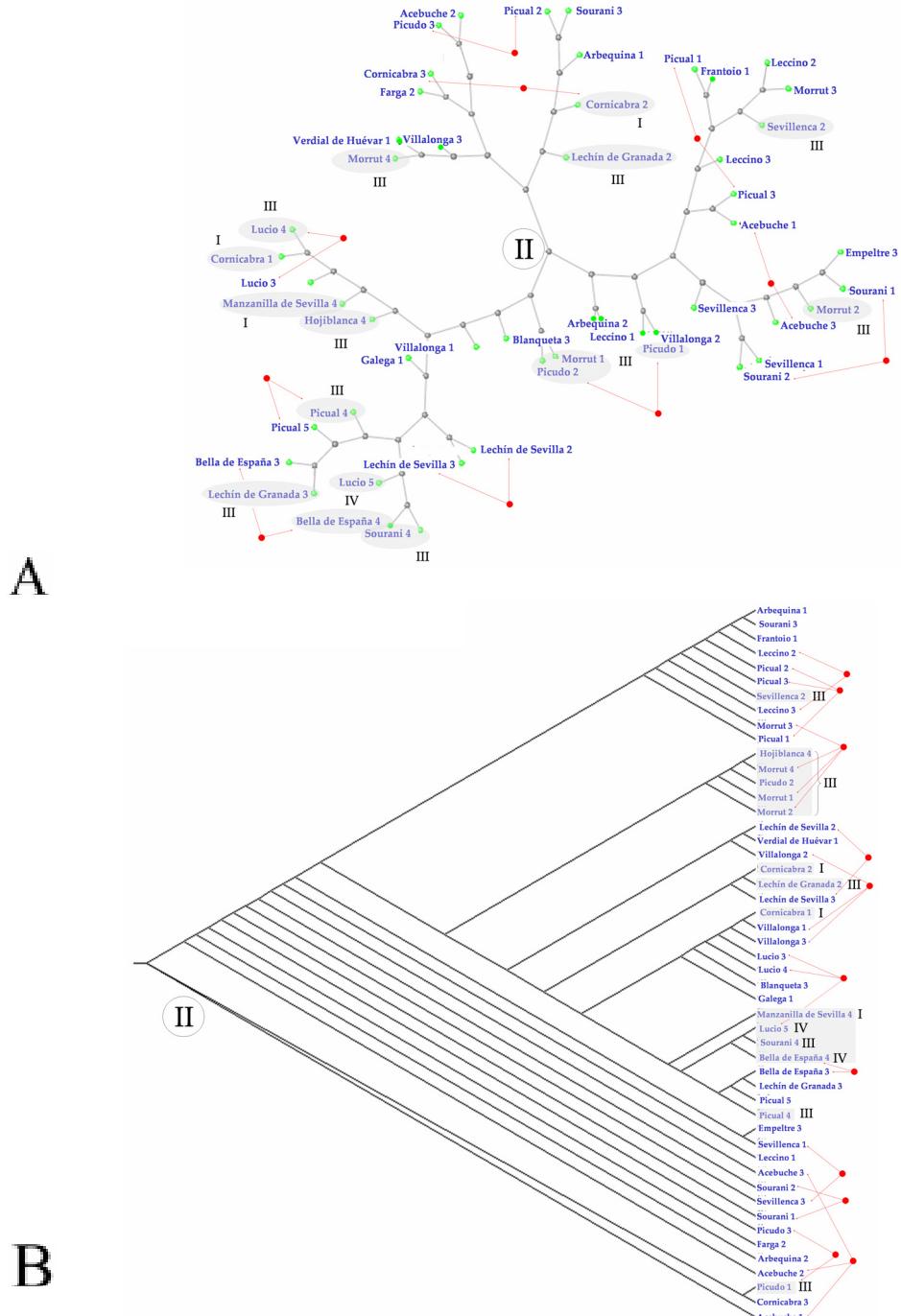


Figura 29. Análisis filogenético o clustering de las secuencias de profilinas de olivo agrupadas según el criterio primario de sus características físico-químicas y estructurales. En este caso se representa la agrupación 1 (ver Tabla 14). A) Secuencias nucleotídicas, B) secuencias aminoacídicas. Con excepción de las secuencias sombreadas, las demás pertenecen al grupo II de propiedades físico-químicas. Se señalan algunos ejemplos de secuencias de la misma variedad que se encuentran relativamente cercanas en el árbol filogenético (●).

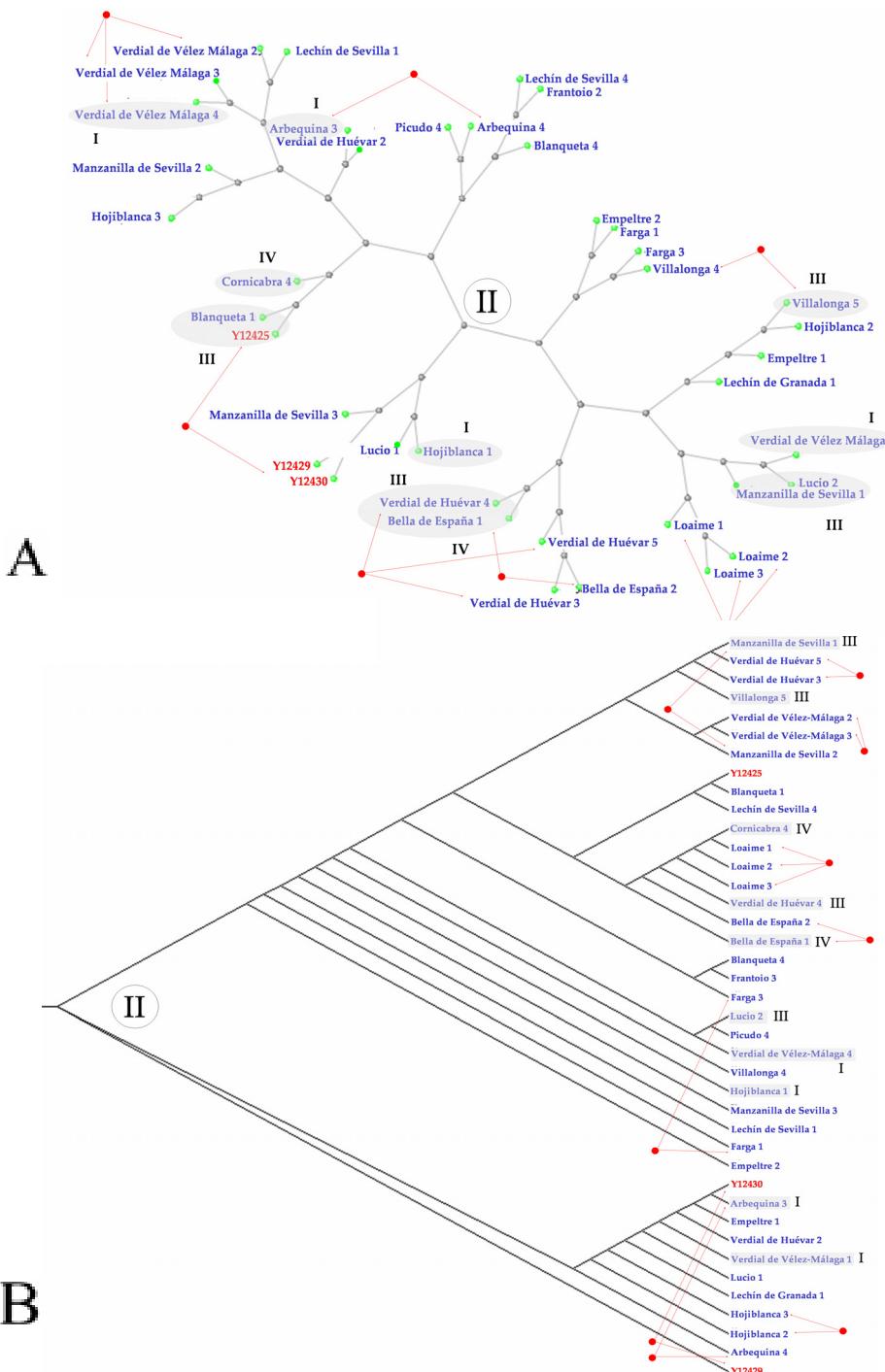


Figura 30. Análisis filogenético o *clustering* de las secuencias de profilinas de olivo agrupadas según el criterio primario de sus características físico-químicas y estructurales. En este caso se representa la agrupación 2 (ver Tabla 14). A) Secuencias nucleotídicas, B) secuencias aminoacídicas. Con excepción de las secuencias sombreadas, las demás pertenecen al grupo II de propiedades físico-químicas. Se señalan algunos ejemplos de secuencias de la misma variedad que se encuentran relativamente cercanas en el árbol filogenético (●).

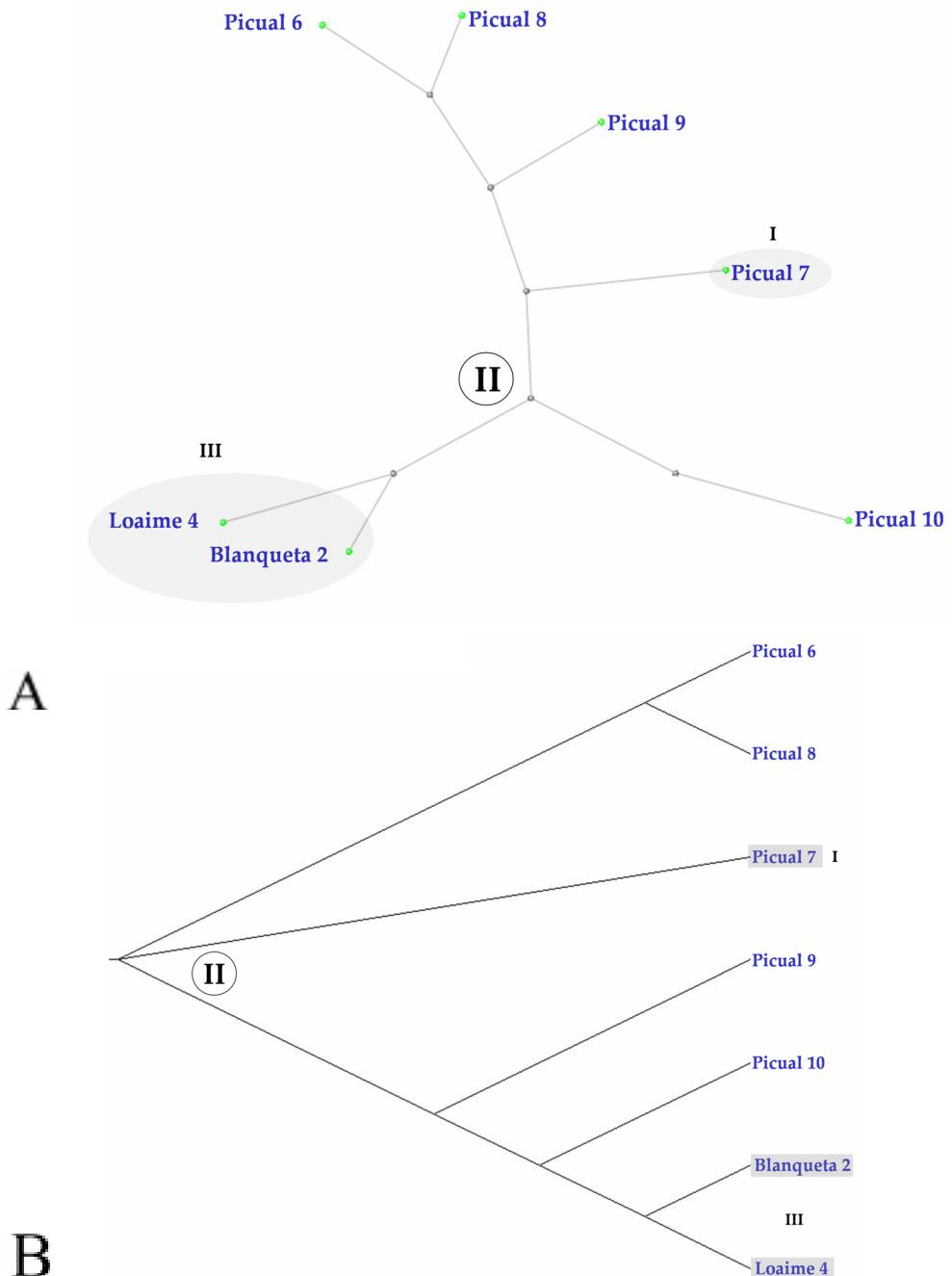


Figura 31. Análisis filogenético o *clustering* de las secuencias de profilinas de olivo agrupadas según el criterio primario de sus características físico-químicas y estructurales. En este caso se representa la agrupación 3 (ver Tabla 14). A) Secuencias nucleotídicas, B) secuencias aminoacídicas. Con excepción de las secuencias sombreadas, las demás pertenecen al grupo II de propiedades físico-químicas. Se señalan algunos ejemplos de secuencias de la misma variedad que se encuentran relativamente cercanas en el árbol filogenético (●).

4.3. Predicción de la influencia del polimorfismo sobre la estructura, la función biológica y la interacción con diversos ligandos

Se ha llevado a cabo un análisis de la variabilidad de los aminoácidos definidos como claves para el mantenimiento de la estructura 3D de las profilinas, y por tanto responsables del mantenimiento de la funcionalidad de la proteína. Del mismo modo se ha analizado el polimorfismo de los residuos a través de los cuales tiene lugar la interacción y reconocimiento de las profilinas y sus distintos ligandos naturales. Dicho análisis tiene como base un trabajo (Thorn *et al.* 1997) en el que se analiza un alineamiento de las secuencias de diversas profilinas representantes de diferentes residuos. En dicho trabajo se define como residuo conservado aquel que está presente en al menos el 80% de las secuencias analizadas de los distintos reinos. Bajo este concepto, hemos analizado los siguientes tipos de residuos relevantes.

4.3.1. Residuos implicados en el mantenimiento de la estructura 3D

A pesar del amplio polimorfismo detectado a lo largo de todas las secuencias aminoacídicas de las profilinas de las diferentes especies, existe una variabilidad muy baja en las posiciones aminoacídicas que han sido definidas como relevantes para el mantenimiento de la estructura 3D de profilinas (Fedorov *et al.* 1997; Thorn *et al.* 1997). El porcentaje de conservación en los aminoácidos representados en la tabla es muy elevado (entre 99 y 100%). Sin embargo, Algunas de estas posiciones muestran un grado relativamente bajo de conservación en alguna de las especies. En concreto, el residuo A25 en *Corylus avellana* solo está conservado en un 20% de las secuencias. En las especies de la familia Poaceae (*Phleum pratense* y *Zea mays*), el residuo G69 está conservado solamente entre un 10 y un 30% (Tabla 15).

Tabla 15. Porcentaje de conservación de los aminoácidos caracterizados como de gran importancia en el plegamiento y estructura 3D de profilinas (Thorn *et al.* 1997) en cada una de las especies estudiadas. Se han sombreado los porcentajes relativamente bajos en comparación al resto.

	<i>Olea europaea</i>	<i>Betula verrucosa</i>	<i>Corylus avellana</i>	<i>Phleum pratense</i>	<i>Zea mays</i>
W₃	100	100	100	100	100
Y₆	100	100	100	100	100
D₈	100	100	100	100	100
A_{23,25,26}	99	100	20	100	100
A_{24,26,27}	100	-	100	100	100
I_{25,27,28}	99	100	100	100	100
G_{27,29,30}	100	100	100	100	100
W_{33,35,36}	100	100	100	100	100
A_{34,36,37}	100	100	100	100	100
E_{46,48,49}	100	100	100	100	100
G_{64,66,67}	100	100	100	100	100
G_{69,71,72}	90	100	90	30	10
K_{71,73,74}	100	100	100	100	100
K_{86,88,89}	100	100	100	100	100
T_{97,99,100}	100	100	100	100	100
G_{113,115,116}	100	100	100	100	100
Y_{125,127,128}	100	100	100	100	100
L_{126,128,129}	100	100	100	100	100

4.3.2 Predicción y análisis de la estructura primaria de las profilinas. Divergencia en el número de cisteínas

Se han realizado una serie de predicciones que intentan diseccionar la posible implicación de las cisteínas presentes en las secuencias analizadas en el establecimiento de puentes disulfuro intramoleculares, y si dichos puentes pueden afectar a la estructura 3D de las profilinas resultantes. Las profilinas analizadas en el presente trabajo incluyen un número variable de residuos de cisteína, entre los que puede haber uno, dos o tres.

En *Olea europaea* la frecuencia de profilinas con una cisteína es de 1.03 % (posición 118), 71.14 %. La frecuencia de dos cisteínas es de 57.74% (para las posiciones 13 y 118) y del 13.40% (para las posiciones 13 y 115). La frecuencia de tres cisteínas es del 27.83

% (posiciones 13, 106 y 118). En el caso de las cuatro restantes especies analizadas, se han encontrado solamente 2 cisteínas, con una frecuencia del 29.4 % (posiciones 13 y 115) y 70.6 % (posiciones 13 y 117) (Fig. 12).

En primer lugar se hizo una predicción de la posible formación de puentes disulfuro, estimando el número de ellos y el estado de cada cisteína del par que podría formar el puente disulfuro. La predicción se realizó con la ayuda del software DIpro (Baldi *et al.* 2005, Cheng *et al.* 2005, 2006), <http://scratch.proteomics.ics.uci.edu/>. Esta primera aproximación indica que no existen puentes disulfuro dentro de la estructura de las profilinas, sea cual sea su posición en la secuencia e independientemente de la especie que analizamos.

En una segunda aproximación se ha llevado a cabo la medida teórica de las distancias entre los carbonos alfa ($C\alpha$) de las diferentes cisteínas que componen la secuencia de profilinas (Tabla 16). Las medidas se han realizado para todas las posibles combinaciones de uniones entre cisteínas intracatenarias, así como para los tres modelos 3D presentes en la base de datos PDB (nº PDB 1G5U, 1CQA y 3NUL) (Fig. 20). Gracias a este análisis y sobre la base a los tres modelos 3D propuestos para las secuencias de profilinas de las diferentes especies, si se demuestra la posibilidad de que dichos enlaces puedan existir. Para que se establezca un puente disulfuro, debe de cumplirse que la distancia entre los $C\alpha$ de dos residuos de cisteína implicados en dicho enlace se encuentre entre 4.2 - 7.5 Å (Czaplewski *et al.* 2004).

Teniendo en cuenta la resolución con la que cada modelo 3D se ha obtenido mediante cristalografía, se observa que al medir la distancia entre los distintos $C\alpha$ de las cisteínas el único par de cisteínas intracadenarias que podrían estar implicadas en un puente disulfuro sería C₁₃-C₁₁₈.

Para ver si las cisteínas podrían formar enlaces disulfuro intercatenarios, en el caso de que se produjese un dímero entre dos moléculas de profilina, se han medido las distancias interatómicas entre los $C\alpha$ que se encuentran en ambas moléculas del dímero (Tabla 17). El modelo usado para estas medidas es el correspondiente al

alérgeno Hev b 8 de *Hevea brasiliensis* 1G5U, cuya resolución es de 1.60 Å, y es el único de los tres propuestos en que se encuentra cristalizado un dímero de profilinas. Se puede ver que los contactos entre profilinas que forman dímeros se establecen en la superficie de las α -hélices H1 y H4, de manera similar a lo que ocurre en las proteínas con motivos ricos en prolina (Fig. 32).

Tabla 16. Distancia (Å) entre los carbonos alfa ($C\alpha$) de los posibles pares de cisteínas que componen la secuencia de las profilinas, calculadas mediante el programa DeepView/Swiss PDB viewer v3.7 (Guex & Peitsch 1997). En negrita y de mayor tamaño se encuentran señaladas aquellas cisteínas con mayor probabilidad de formar puentes disulfuro. La resolución de cada modelo se muestra entre paréntesis.

Modelo	<i>Olea europaea</i> L.					<i>Betula pendula</i>	<i>Corylus avellana</i>	<i>Phleum pratense</i>	<i>Zea mays</i>				
	Dos cisteínas		Tres cisteínas										
	$C^{13}\alpha-C^{113}\alpha$	$C^{13}\alpha-C^{118}\alpha$	$C^{13}\alpha-C^{10}\alpha$	$C^{13}\alpha-C^{13}\alpha$	$C^{10}\alpha-C^{13}\alpha$								
1G5U (1.60 Å)	10.41	8.64	12.45	8.64	11.19	11.28	10.41	11.28	10.41	10.41			
3NUL (1.60 Å)	10.46	8.09	12.23	8.09	10.89	11.19	10.46	11.19	10.46	10.46			
1A0K (2.2 Å)	10.62	8.10	12.46	8.10	10.89	11.20	10.62	11.20	10.62	10.62			

Tabla 17. Distancia (Å) entre los $C\alpha$ de las cisteínas intercatenarias de las moléculas de profilina que forman el dímero. Aquellas cisteínas con mayor probabilidad de formar puentes disulfuro aparecen en negrita y de mayor tamaño.

Modelo 1G5U (resolución 1.60 Å)	Distancia (Å) entre $C\alpha$ de cisteínas intercadernarias	
	$C^{13}\alpha \rightarrow C^{13}\alpha$	10.28
	$C^{13}\alpha \rightarrow C^{10}\alpha$	21.96
	$C^{13}\alpha \rightarrow C^{115}\alpha$	17.65
	$C^{13}\alpha \rightarrow C^{117}\alpha$	15.83
	$C^{13}\alpha \rightarrow C^{118}\alpha$	13.29
	$C^{10}\alpha \rightarrow C^{10}\alpha$	31.90
	$C^{10}\alpha \rightarrow C^{115}\alpha$	25.99
	$C^{10}\alpha \rightarrow C^{117}\alpha$	21.36
	$C^{10}\alpha \rightarrow C^{118}\alpha$	21.14
	$C^{115}\alpha \rightarrow C^{115}\alpha$	19.80
	$C^{115}\alpha \rightarrow C^{117}\alpha$	20.52
	$C^{115}\alpha \rightarrow C^{118}\alpha$	14.89
	$C^{117}\alpha \rightarrow C^{117}\alpha$	10.20
	$C^{117}\alpha \rightarrow C^{118}\alpha$	10.17
	$C^{118}\alpha \rightarrow C^{118}\alpha$	10.22

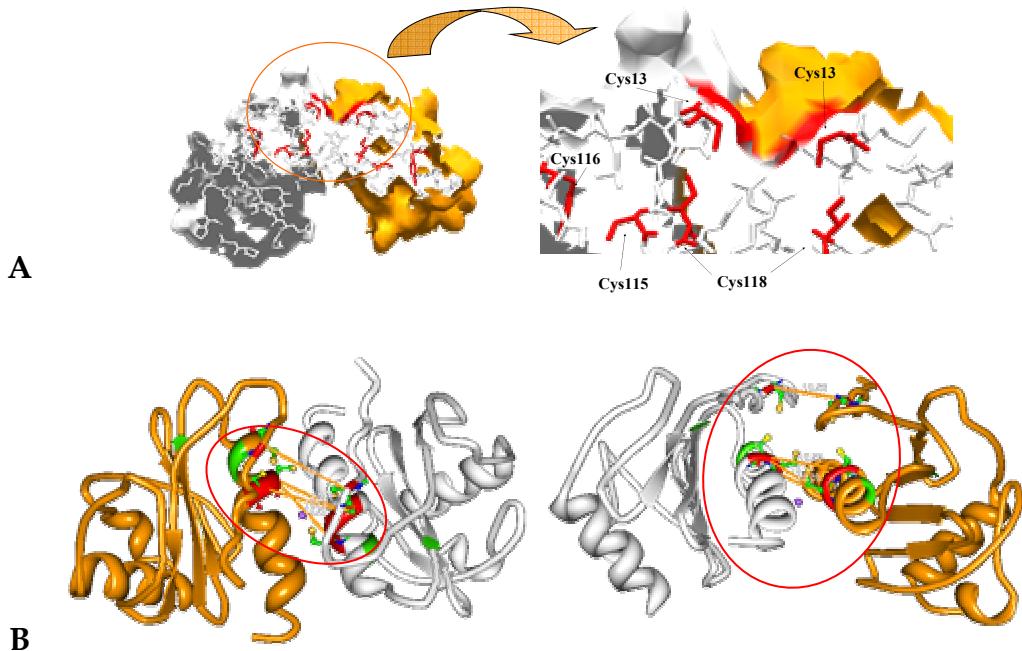


Figura 32. Superficie de contacto entre dos moléculas de profilina (modelo 1G5U). A) situación espacial de las cisteínas en la superficie de contacto entre las secuencias de profilinas. B) posibles puentes disulfuro que se podrían establecer en un dímero de profilinas (resaltados mediante círculos de color rojo). Los modelos fueron generados mediante el programa DeepView/Swiss PDB viewer v3.7 (Guex & Peitsch 1997).

4.3.3 Residuos implicados en la interacción de las profilinas con actina

Se ha estudiado la variabilidad de la secuencias de profilinas, en aquellas posiciones implicadas en el reconocimiento de la molécula de actina (Schutt *et al.* 1993), una de las proteínas principales implicadas en el citoesqueleto celular. Cuando se comparan dentro de cada especie los alineamientos de las secuencias aminoacídicas, se puede observar que dichas posiciones se mantienen invariables en todos los casos (Fig. 12, 13, 14b, 15b, 16b, 17b y Tabla 18). También sucede así cuando dichas posiciones se comparan con especies más alejadas filogenéticamente, como pueden ser protozoos o animales (Thorn *et al.* 1997).

Tabla 18. Porcentaje de conservación de los aminoácidos descritos como responsables de la interacción con la molécula de actina (Schutt *et al.* 1993; Thorn *et al.* 1997).

	<i>Olea europaea</i>	<i>Betula pendula</i>	<i>Corylus avellana</i>	<i>Phleum pratense</i>	<i>Zea mays</i>
A_{61,63}	100	100	100	100	100
P_{62,64}	100	100	100	100	100
M_{73,76}	100	100	100	100	100
Q_{76,79}	100	100	100	100	100
V_{82,85}	100	100	100	100	100
R_{84,87}	100	100	100	100	100
K_{86,89}	100	100	100	100	100
K_{87,90}	100	100	100	100	100
T_{113,114}	100	100	100	100	100
P₁₁₂	100	100	100	100	100
G_{113,116}	100	100	100	100	100
N_{116,119}	100	100	100	100	100
M₁₁₇	100	100	100	100	100
R_{121,124}	100	100	100	100	100

4.3.4. Residuos implicados en la interacción de las profilinas con proteínas ricas en motivos de prolina

El análisis de la variabilidad de los residuos implicados en la interacción con poli-L-prolina (PLP) (Metzler *et al.* 1994), muestra que no existen cambios en estos aminoácidos en las especies analizadas (Fig. 12, 13, 14b, 15b, 16b, 17b y Tabla 19).

El nivel de conservación también se mantiene al 100% cuando se comparan dichas posiciones entre organismos de distintos reinos que están más alejados filogenéticamente, como son plantas y animales (Thorn *et al.* 1997)

Tabla 19. Porcentaje de conservación de los aminoácidos descritos como responsables de la interacción con PLP en cada una de las especies estudiadas (Metzler *et al.* 1994; Thorn *et al.* 1997).

	<i>Olea europaea</i>	<i>Betula pendula</i>	<i>Corylus avellana</i>	<i>Phleum pratense</i>	<i>Zea mays</i>
W₃	100	100	100	100	100
Y₆	100	100	100	100	100
I₂₅	100	100	100	100	100
G₂₇	100	100	100	100	100
W₃₃	100	100	100	100	100
A₃₄	100	100	100	100	100
Y₁₂₅	100	100	100	100	100
L₁₂₆	100	100	100	100	100

4.3.5. Residuos implicados en la interacción de profilinas con polifosfoinosítidos

El análisis de los residuos implicados en la interacción de las profilinas con polifosfoinosítidos (PIP), ha revelado que existe mayor variabilidad en los residuos implicados en dicha interacción que en las anteriores interacciones descritas. En este caso, dichos aminoácidos pueden ser clasificados en aminoácidos clave para la interacción: K71, Q76, K86, G88, L117, I/L127 y E 130, y los otros aminoácidos con menor implicación en dicha interacción (W3 y D8) (Tabla 20) (Schluter *et al.* 1997; Skare & Karlsson 2002). La Tabla 20 muestra los porcentajes de conservación de dichos residuos para cada una de las especies analizadas.

Aunque en muchos casos el nivel de conservación es muy alto (100%), se observan algunos residuos con porcentajes de conservación reducidos, entre los que cabe destacar los residuos L_{127, 130*} y E_{128, 131*} en todas las especies analizadas con excepción de *Olea europaea*.

En la Tabla 21, se detallan las sustituciones puntuales que tienen lugar en los residuos descritos. El mayor número de cambios puntuales se ha encontrado en las secuencias de profilinas de diferentes variedades de olivo, seguido de *Phleum pratense*, *Corylus avellana* y *Zea mays*. En *Betula pendula* no se han observado sustituciones que afectan a estos residuos.

Tabla 20. Porcentaje de conservación de los aminoácidos implicados en la interacción con PIP en cada una de las especies estudiadas. Se han sombreado las celdillas correspondientes a % de conservación relativamente inferiores al resto.

	<i>Olea europaea</i>	<i>Betula pendula</i>	<i>Corylus avellana</i>	<i>Phleum pratense</i>	<i>Zea mays</i>
W ₃	100	100	100	100	100
D ₈ *	98.97	100	100	100	100
K _{71,74}	100	100	100	100	100
Q _{76,79} *	95.88	100	100	100	100
K _{86,89}	100	100	100	100	100
G _{88,91}	100	100	100	100	100
M _{117,120} *	96.91	100	100	100	90
L _{127,130} *	87.83	0	40	33.33	80
E _{128,131} *	93.81	0	50	33.33	70

* Posiciones diferentes del aminoácido en determinadas secuencias de profilinas dependiente de la especie analizada

Tabla 21. Detalle de los cambios puntuales de aminoácidos que interaccionan con PIP en las secuencias de profilinas. Para cada especie se indican los números de referencia observados de las secuencias en las que se ha determinado la presencia de la sustitución.

Aminoácidos y posición	<i>Olea europaea</i>	<i>Betula pendula</i>	<i>Corylus avellana</i>	<i>Phleum pratense</i>	<i>Zea mays</i>
	Número de secuencia				
D ₈ → Y	10	-	-	-	-
	13	-	-	-	-
Q ₇₉ → A	63	-	-	-	-
	94	-	-	-	-
Q ₇₉ → R	80	-	-	-	-
M ₁₁₇ → L	-	-	-	-	X73279
M ₁₂₀ → I	9,51,77	-	-	-	-
I/L ₁₂₀ → D	25	-	-	-	-
L ₁₂₀ → I	15,27,49,71,74	-	-	-	-
I/L ₁₂₀ → M	65,66,67	-	-	-	-
I/L ₁₂₀ → V	Y12425,22,68	-	-	-	-
L ₁₂₇ → A	-	-	104	-	-
L ₁₂₇ → V	-	-	108	X77583, Y09456,114,119, 120,124,125	X73281,121
E ₁₂₈ → D	-	-	108,109,110	-	-
E _{128,131} → K	64-68	-	105	-	-
G ₁₂₈ → A	-	-	-	-	127
E ₁₃₁ → N	69	-	-	-	-

4.3.6 Residuos con un papel potencial en la función-regulación

Se ha analizado el polimorfismo en los posibles motivos diana de modificaciones postraduccionales, con un papel potencial en la función-regulación de las profilinas y que incluyen:

1. *N-miristilación.* Para ello se ha analizado la presencia y modificaciones del motivo **G-[EDRKHPFYW]-x(2)-[STAGCN]-{P}** (Towler *et al.* 1988; Grand 1989).
2. *Amidación.* Para ello se ha analizado la presencia y modificaciones del motivo **x-G-[RK]-[RK]** (Kreil 1984; Bradbury & Smyth 1987).
3. *Fosforilación dependiente de AMPc o GMPc.* Para ello se ha analizado la presencia y modificaciones del motivo **[RK](2)-x-[ST]** (Fremisco *et al.* 1980, Glass & Smith 1983, Glass *et al.* 1986).
4. *Fosforilación por proteína quinasa C.* Para ello se ha analizado la presencia y modificaciones del motivo **[ST]-x-[RK]** (Kishimoto *et al.* 1985, Woodget *et al.* 1986).
5. *Fosforilación por caseína quinasa II.* Para ello se ha analizado la presencia y modificaciones del motivo **[ST]-x(2)-[DE]** (Pinna *et al.* 1990)
6. *Fosforilación por MAP quinasa (MAPK).* Para ello se ha analizado la presencia y modificaciones del motivo **IQGEAGAVIRGKKGSGGITIK/PXTP** (Limmongkon *et al.* 2004).
7. *Glicosilación.* Para ello se ha analizado la presencia y modificaciones del motivo **N-{P}-[ST]-{P}** (Bause *et al.* 1983).
8. *Fosforilación en residuos Ser/Thr y Tyr* (Sheng 2003).
9. *Otros tipos de proteínas quinasas* (Blom *et al.* 2004).

El aminoácido en negrita dentro de la secuencia o motivo característico, es el que sufre la modificación; la x puede ser cualquier aminoácido. Dentro de cada paréntesis o corchete, sólo uno de los aminoácidos incluidos aparecerá en el motivo característico. El paréntesis ([]) representa los aminoácidos que deben de aparecer en la secuencia; las llaves ({ }) son los aminoácidos no permitidos en los motivos y los números

representan la repetición del aminoácido. Los motivos o cambios que aparecen en negrita en la tabla son aquellos menos frecuentes.

Tabla 22. Modificaciones localizadas en los principales motivos que caracterizan la función-regulación de profilinas. Las secuencias existentes en la base de datos GeneBank™/EMBL anteriormente a la realización de este estudio aparecen con formato sombreado. En cursiva y negrita se indican motivos diferentes a los encontrados dentro de la mayoría de las secuencias estudiadas.

Número de secuencia	N-misfiliación	Amidación	Fosforilación dependiente de AMPc y GMPc	Proteína quinasa C	Caséina quinasa II	Fosforilación por MAPK	N-Glicosilación
Y12425	33-38 GSvwAQ	87-90	89-92 KKgS	96-98 TIK	-	-	-
Y12429	67-72 GLnGCG	nGKK					
Y12430							
1	33-38 GSvwAQ	87-90	89-92 KKgS	96-98 TIK	-	-	-
2	67-72 GLnGCG	nGKK					
3							
4					S-8 TyvD		
5	33-38 GSvwAQ	87-90	89-92 KKgS	96-98 TIK	-		
6	67-72 GLnGCG	nGKK					
7							
8	33-38 GSvwAQ					IQGEAGAVVIRGKKKGSGCITIK / -	
9	67-72 GLnGCG					VQGEAGAVVIRGKKKGSGCITIK / -	
10	36-35 GTvwAQ	87-90	89-92 KKgS	96-98 TIK	-	IQGEPGAVVIRGKKKGAGCITIK / -M-	
	64-69 CMIVAG	nGKK					
	77-22 GQMTA						
11	30-35 GSvwAQ			93-95 TIK		IQGEPGAVVIRGKKKGAGCITIK / -L-	
	66-69 GLnGCG						
12	33-38 GSvwAQ						
	67-72 GLnGCG						
	38-35 GQdPSV						
13	33-38 GSvwAQ	87-90	89-92 KKgS	96-98 TIK	S-8 TyvD	IAGEPGAVVIRGKKKGAGCITIK / -	
	67-72 GLnGCG	nGKK					
14	33-38 GSvwAQ				S3-36 TestD		
	67-72 GLnGCG						
15					S-8 TyvD		
16	67-72 GLnGCG						
17	33-38 GSvwAQ	87-90	89-92 KKgS	96-98 TIK	S-8 TyvD		
18	67-72 GLnGCG	nGKK					
19							
20							
21	33-38 GSvwAQ	87-90	89-92 KKgS	96-98 TIK	-		
22	67-72 GLnGCG	nGKK					
23							
24	33-38 GSvwAQ	87-90	89-92 KKgS	96-98 TIK	-		
25	67-72 GLnGCG	nGKK					
26							
27	33-38 GSvwAQ	87-90	89-92 KKgS	96-98 TIK	S-8 TyvD		
	67-72 GLnGCG	nGKK					
28	33-38 GSvwAQ	87-90	89-92 KKgS	96-7-99/TIK&K	-		
	67-72 GLnGCG						
	93-98 GGHTIK						
29							
30	33-38 GSvwAQ						
31	67-72 GLnGCG	87-90	89-92 KKgS	96-98 TIK	-		
		nGKK					
	38-35 GQdPSV						
32	33-38 GSvwAQ						
	67-72 GLnGCG						
33	33-38 GSvwAQ	87-90	89-92 KKgS	96-98 TIK	-		
34	67-72 GLnGCG	nGKK			S-8 TyvD		
35							
36	33-38 GSvwAQ						
37	67-72 GLnGCG	87-90	89-92 KKgS				
		nGKK					
38	33-38 GSvwAQ					S-8 TyvD	
	67-72 GLnGCG						
39							
40	33-38 GSvwAQ	87-90	89-92 KKgS	93-95 TIK	-		
41	67-72 GLnGCG	nGKK					
42							
43	33-38 GSvwAQ						
44	67-72 GLnGCG	87-90	89-92 KKgS				
45		nGKK					
	38-35 GQdPSV						
46	33-38 GSvwAQ						
	67-72 GLnGCG						

Tabla 22 (continuación)

Número de secuencia	N-miristilación	Amidación	Fosforilación dependiente de AMPc y GMPc	Proteína quinasa C	Caséina quinasa II	Fosforilación por MAPK	N-Glicosilación
47	33-38GSvwAQ 67-72GLMGCG 38-39GQdgSV				5-8 TyvD		
48	33-38GSvwAQ 67-72 GLMGCG			96-99 TzK			
49	33-38GSvwAQ 67-72 GLMGCG	87-90 rGKK	89-92 KKgS				
50							
51	17-22 GQMFTA 33-38GSvwAQ 67-72 GLMGCG			93-95 TzK	5-8 TyvD	IQGEPGAVIRGKKKGAGGITVK/-L-	
52							
53	33-38GSvwAQ 67-72 GLMGCG	87-90 rGKK	89-92 KKgS	96-99 TzK	5-8 TyvD		
54							
55							
56	38-39GQdgSV 33-38GSvwAQ 67-72GLMGCG 38-39GQdgSV			96-99 TzK			
57	33-38GSvwAQ 67-72 GLMGCG 93-99 GGdSK	87-90 rGKK	89-92 KKgS	96-98 TzK 97-99 SKK		IQGEAGAVIRGKKKGSGGTzK/-	
58	33-38GSvwAQ 67-72 GLMGCG 38-39GQdgSV			96-98 TzK	5-8 TyvD		
59	33-38GSvwAQ 67-72 GLMGCG						
60							
61	33-38GSvwAQ 67-72 GLMGCG	87-90 rGKK	89-92 KKgS	96-99 TzK	5-8 TyvD		
62							
63				69-71TzK			
64	30-39GTvwAQ 64-69GMtvAT			93-95 TzK		IQGEPGAVIRGKKKGAGGITIK/-M-	
65				93-95 TzK		IQGEPGAVIRGKKKGAGGITIK/-M-	
66				69-71TzK		IQGEPGAVIRGKKKGAGGITIK/-M-	
67				93-95 TzK		IQGEPGAVIRGKKKGAGGITIK/-M-	
68	30-39GTvwAQ			93-95 TzK		IQGEPGAVIRGKKKGSGGTzK/-M-	
69	30-39GTvwAQ 64-69 GMtvAT		86-89 KKgS	69-71TzK 93-95 TzK	5-8 TyvD	IAGEPGAVIRGKKKGSGGTIK/-M-	
70	33-38 GSvwAQ						
71	67-72 GLMGCG						
72	38-35 GQdgSV	87-90 rGKK	89-92 KKgS	96-99 TzK			
73	33-38 GSvwAQ 67-72 GLMGCG						
74	33-38 GSvwAQ	87-90 rGKK	89-92 KKgS	96-99 TzK	5-8 TyvD		
75	67-72 GLMGCG						
76							
77	33-38 GSvwAQ 67-72 GLMGCG	87-90 rGKK	89-92 KKgS	96-99 TzK			
78							
79							
80	17-22 GQMFTA 30-35 GSvwAQ 64-69 GLMGCG	84-87 rGKK		93-95 TzK	5-8 TyvD	IRGEPGAVIRGKKKGAGGITVK/-L-	
81							
82	33-38 GSvwAQ 67-72 GLMGCG	87-90 rGKK	89-92 KKgS	96-99 TzK			
83							
84					5-8 TyvD		
85							
86						IQGEAGAVIRGKKKGSGGTIK/-	
87	33-38 GSvwAQ 67-72 GLMGCG	87-90 rGKK	89-92 KKgS	96-99 TzK			
88					5-8 TyvD		
89							
90						-/- SVTP	
91	33-38 GSvwAQ 67-72 GLMGCG	87-90 rGKK	89-92 KKgS	96-99 TzK		-/-	
92						96-99 TzK	-/- PVAP
93							-/-
94	30-35 GTvwAQ 64-69 GMtvAT	84-87 rGKK	86-89 KKgS	69-71 TzK 93-95 TzK	5-8 TyvD	IAGEPGAVIRGKKKGSGGTIK/-M-	

Tabla 22 (continuación)

Número de secuencia	N-miristilación	amidación	Fosforilación dependiente de AMPc y GMPc	Proteína quinasa C	Caseína quinasa II	Fosforilación por MAPK	N-Glicosilación
M65179	179-24 GQqlAA						-
102	32-37 CSvwAQ 66-71 GLhIGG	86-89 rGKK	88-91 KKgs	95-97 TlK	5-8 TyvD		-
103							
104							
105	19-24 GQqlAA						
106	32-37 CSvwAQ	86-89 rGKK	88-91 KKgs	95-97 TlK			
107	66-71 GLhIGG						
108							
109							
110							
111	30-35 CSvwAQ		95-98 KKls	93-95 TvK		IQQEISGA VIRGKKKGAGGITVK / -L-	
112	64-69 GLhIGG		-			IQGEIPGVVERGKKKGAGGITVK / -M-	
X77583						IQGEIPGRVERGKKKGAGGITVK / -M-	
Y09456	30-35 GTvwAQ	84-87 rGKK		93-95 TlK	5-8 TyvD	IQGEIPGAVIRGKKKGAGGITVK / -M-	
Y09457	64-69 GMlvAG					IQGEIPGAVIRGKKKGAGGITVK / -M-	
Y09458						IQGEIPGAVIRGKKKGAGGITVK / -M-	
113	30-35 GTvwAQ 64-69 GMlvAT			69-71 TaK 93-95 TlK		IQGEIPGAVIRGKKKGAGGITVK / -M-	
114	30-35 GTvwAQ	84-87 rGKK		93-95 TlK		IQGEIPGAVIRGKKKGAGGITVK / -M-	
115	64-69 GMlvAA					IQGEIPGAVIRGKKKGAGGITVK / -M-	
116	30-35 GTvwAQ					IQGEIPGAVIRGKKKGAGGITVK / -M-	
117	64-69 GMlvAT			69-71 TaK 93-95 TlK		IQGEIPGAVIRGKKKGAGGITVK / -M-	
118	30-35 GTvwAQ			93-95 TlK		IQGEIPGAVIRGKKKGAGGITVK / -M-	
119	64-69 GMlvAA					IQGEIPGAVTRGKKKGAGGITVK / -M-	
120	30-35 GTvwAQ 64-69 GMlvAT			69-71 TaK 93-95 TlK		IQGEIPGAVIRGKKKGAGGITVK / -M-	
X73279	30-35 GAlwAQ 64-69 GLhIGG	84-87 rGKK	86-89 KKgs	93-95 TvK	5-8 TyvD	IQGEIPGAVIRGKKKGSGGTVK / -M-	
X73281	30,36-35,41 CAawAQ			2-4 SdR 99-101 TvK		IQGEIPGAVIRGKKKGSGGTVK / -M-	
X73280				93-95 TvK	5-8 TyvD	IQGEIPGAVIRGKKKGSGGTVK / -M-	
121	30-35 GAvwAQ				5-8 TyvD	IQGEIPGAVIRGKKKGSGGTVK / -M-	
122	30-35 GAawAQ	84-87 rGKK	86-89 KKgs			IQGEIPGAVIRGKKKGSGGTVK / -M-	
123	30-35 GAawAQ					IQGEIPGAVIRGKKKGSGGTVK / -M-	
124						IQGEIPGAVIRGKKKGSGGTVK / -M-	
125	30-35 GAvwAQ					IQGEIPGAVIRGKKKGSGGTVK / -M-	
126					42-45 SktE	IQGEIPGAVIRGKKKGSGGTVK / -M-	
127					-	IQGEIPGAVIRGKKKGSGGTVK / -M-	

El número de motivos de miristilación es variable, encontrándose entre 1 y 3 en todas las secuencias analizadas, con algunos cambios en las secuencias correspondientes a determinados cultivares de olivo, así como en las demás especies.

Más constante se mantuvo el motivo de amidación, así como el sitio de fosforilación por quinasas dependientes de AMPc y GMPc, el cual esta ausente en alguna de las secuencias de *Olea europaea* (10, 11, 38, 63-67, 80), *Corylus avellana* (100) y en todas las secuencias de *Phleum pratense*.

Entre todas las secuencias analizadas, se encontraron uno o dos motivos de fosforilación por proteína quinasa C, y en menos de la mitad de dichas secuencias se encontró un motivo de fosforilación por caseína quinasa II. Por otro lado, se ha

analizado la variabilidad en la secuencia aminoacídica de algunas profilinas, referente al dominio de interacción con quinasas (KIM) y el motivo de fosforilación por MAPK. Realmente existen pocos cambios en el motivo P-X-T-P, donde la X es en la mayoría de los casos analizados en *Olea europaea* y *Betula pendula* es valina, así como leucina o metionina en las otras tres especies. La mayor variabilidad observada es algunos cultivares de *Olea europaea* en el motivo de interacción con quinasas (KIM), sobre todo en la variedad Bella de España, donde los cuatro clones secuenciados poseen diferentes cambios cuando se comparan entre ellos. De la misma forma se han encontrado cambios en todos los clones de *Zea mays* y de *Phleum pratense*, aunque el cambio es el mismo en todos los clones dentro de la misma especie.

Se llevó a cabo la predicción de motivos de glicosilación. En este caso, se llegó a un resultado negativo en casi todas las secuencias de profilinas analizadas, con la excepción de uno de los clones de *Olea europaea* de la variedad Blanqueta (secuencia número 14), que mostró un posible sitio de glicosilación (51-54 NGTM).

La predicción y análisis de la variabilidad en los posibles residuos susceptibles de fosforilación por Ser/Thr quinasas y Tyr quinasas (Sheng 2003) se muestra en la Tabla 23. La Tabla muestra que en *Olea europaea*, el número de residuos de serina susceptibles de ser fosforilados es 1 (en la mayoría de los clones), aunque en algunos de ellos puede ser 0 o 2 residuos. Las posiciones de éstos varían de unos cultivares a otros entre las posiciones 5, 42, 58, 89 y 92. En las demás especies analizadas, el número de serinas susceptibles de ser fosforiladas también es el mismo, no encontrándose ninguna en *Betula pendula*, una en *Corylus avellana*, ninguna o una en *Phleum pratense* y una o dos en *Zea mays*. El número de treoninas y tirosinas susceptibles de ser fosforiladas es también mayor en *Olea europaea* que en el resto de las especies.

Tabla 23. Aminoácidos susceptibles de ser fosforilados por Ser/Thr quinasas y Tyr quinasas.

Nº de secuencia	Ser	Thr	Tyr	Nº de secuencia	Ser	Thr	Tyr	Nº de secuencia	Ser	Thr	Tyr
Y12425	-S ^{PO} -	-T ¹⁰⁴ -	-Y ⁴ -J-T-Y ¹⁰⁵ -	47				M63179	-	-T ¹⁰⁴ -J-T ¹⁰⁵ -	-Y ⁴ -
Y12426	-	-T ¹⁰⁴ -J-T ¹⁰⁵ -		48	-S ^{PO} -	-T ¹⁰⁴ -	-	302	-	-T ¹⁰⁴ -J-T ¹⁰⁵ -	-Y ⁴ -
Y12426	-	-T ¹⁰⁴ -J-T ¹⁰⁵ -	-Y ⁴ -J-Y ¹⁰⁵ -J-Y ¹⁰⁶ -	49				303			
1	-S ^{PO} -	-T ¹⁰⁴ -J-T ¹⁰⁵ -J-T ¹⁰⁶ -	-Y ⁴ -J-Y ¹⁰⁵ -J-Y ¹⁰⁶ -	50				304	-S ^{PO} -	-T ¹⁰⁴ -J-T ¹⁰⁵ -	-Y ⁴ -J-Y ¹⁰⁵ -
2	-	-T ¹⁰⁴ -J-T ¹⁰⁵ -J-T ¹⁰⁶ -	-Y ⁴ -J-Y ¹⁰⁵ -	51		-	-T ¹⁰⁴ -J-T ¹⁰⁵ -	305	-	-T ¹⁰⁴ -J-T ¹⁰⁵ -J-T ¹⁰⁶ -	-Y ⁴ -J-Y ¹⁰⁵ -
3	-	-T ¹⁰⁴ -J-T ¹⁰⁵ -	-Y ⁴ -	52			-Y ⁴ -J-Y ¹⁰⁵ -J-Y ¹⁰⁶ -	306			
4	-	-T ¹⁰⁴ -J-T ¹⁰⁵ -	-Y ⁴ -J-Y ¹⁰⁵ -	53	-S ^{PO} -	-T ¹⁰⁴ -	-Y ⁴ -J-Y ¹⁰⁵ -	307	-	-T ¹⁰⁴ -J-T ¹⁰⁵ -J-T ¹⁰⁶ -	
5	-S ^{PO} -	-T ¹⁰⁴ -	-Y ⁴ -J-Y ¹⁰⁵ -J-Y ¹⁰⁶ -	54	-S ^{PO} -	-T ¹⁰⁴ -	-Y ⁴ -J-Y ¹⁰⁵ -	308	-	-T ¹⁰⁴ -J-T ¹⁰⁵ -J-T ¹⁰⁶ -	-Y ⁴ -J-Y ¹⁰⁵ -
6	-S ^{PO} -	-T ¹⁰⁴ -	-Y ⁴ -J-Y ¹⁰⁵ -	55				309	-S ^{PO} -	-T ¹⁰⁴ -J-T ¹⁰⁵ -J-T ¹⁰⁶ -J-T ¹⁰⁷ -	-Y ⁴ -J-Y ¹⁰⁵ -
7	-	-T ¹⁰⁴ -	-Y ⁴ -J-Y ¹⁰⁵ -	56				310	-S ^{PO} -	-T ¹⁰⁴ -J-T ¹⁰⁵ -	-Y ⁴ -J-Y ¹⁰⁵ -
8	-	-T ¹⁰⁴ -	-Y ⁴ -J-Y ¹⁰⁵ -	57	-S ^{PO} -	-T ¹⁰⁴ -	-Y ⁴ -J-Y ¹⁰⁵ -J-Y ¹⁰⁶ -	311		-T ¹⁰⁴ -J-T ¹⁰⁵ -	
9	-S ^{PO} -	-T ¹⁰⁴ -	-Y ⁴ -J-Y ¹⁰⁵ -	58	-S ^{PO} -	-T ¹⁰⁴ -J-T ¹⁰⁵ -	-Y ⁴ -	312			
10	-S ^{PO} -	-T ¹⁰⁴ -J-T ¹⁰⁵ -	-Y ⁴ -J-Y ¹⁰⁵ -J-Y ¹⁰⁶ -	59				X77583	-S ^{PO} -	-T ¹⁰⁴ -J-T ¹⁰⁵ -	-Y ⁴ -
11	-	-T ¹⁰⁴ -J-T ¹⁰⁵ -	-Y ⁴ -J-Y ¹⁰⁵ -	60				Y09456	-S ^{PO} -	-T ¹⁰⁴ -	-Y ⁴ -J-Y ¹⁰⁵ -
12	-	-	-Y ⁴ -	61		-T ¹⁰⁴ -J-T ¹⁰⁵ -	-Y ⁴ -	Y09458	-S ^{PO} -	-T ¹⁰⁴ -J-T ¹⁰⁵ -	-Y ⁴ -
13	-S ^{PO} -	-T ¹⁰⁴ -	-Y ⁴ -J-Y ¹⁰⁵ -	62		-T ¹⁰⁴ -J-T ¹⁰⁵ -	-Y ⁴ -	Y09457	-	-T ¹⁰⁴ -J-T ¹⁰⁵ -	-Y ⁴ -
14	-	-	-Y ⁴ -	63				313		-T ¹⁰⁴ -J-T ¹⁰⁵ -	-Y ⁴ -
15	-	-T ¹⁰⁴ -J-T ¹⁰⁵ -J-T ¹⁰⁶ -	-Y ⁴ -	64				314			
16	-	-T ¹⁰⁴ -J-T ¹⁰⁵ -J-T ¹⁰⁶ -	-Y ⁴ -	65				315		-T ¹⁰⁴ -J-T ¹⁰⁵ -J-T ¹⁰⁶ -	-Y ⁴ -
17	-	-T ¹⁰⁴ -	-Y ⁴ -	66	-S ^{PO} -	-T ¹⁰⁴ -	-Y ⁴ -J-Y ¹⁰⁵ -	316		-T ¹⁰⁴ -J-T ¹⁰⁵ -J-T ¹⁰⁶ -J-T ¹⁰⁷ -	-Y ⁴ -
18	-S ^{PO} -	-T ¹⁰⁴ -	-Y ⁴ -J-Y ¹⁰⁵ -	67	-S ^{PO} -	-T ¹⁰⁴ -	-Y ⁴ -J-Y ¹⁰⁵ -	317			
19	-	-T ¹⁰⁴ -J-T ¹⁰⁵ -	-Y ⁴ -J-Y ¹⁰⁵ -	68				318			
20	-	-T ¹⁰⁴ -J-T ¹⁰⁵ -	-Y ⁴ -J-Y ¹⁰⁵ -	69				319	-S ^{PO} -	-T ¹⁰⁴ -	-Y ⁴ -J-Y ¹⁰⁵ -
21	-S ^{PO} -	-T ¹⁰⁴ -	-Y ⁴ -J-Y ¹⁰⁵ -J-Y ¹⁰⁶ -	70				320		-T ¹⁰⁴ -	-Y ⁴ -J-Y ¹⁰⁵ -
22	-S ^{PO} -J-S ^{PO} -	-T ¹⁰⁴ -J-T ¹⁰⁵ -	-Y ⁴ -J-Y ¹⁰⁵ -J-Y ¹⁰⁶ -	71	-S ^{PO} -	-T ¹⁰⁴ -	-Y ⁴ -J-Y ¹⁰⁵ -	X73286	-S ^{PO} -	-T ¹⁰⁴ -J-Y ¹⁰⁵ -	-Y ⁴ -
23	-S ^{PO} -J-S ^{PO} -	-T ¹⁰⁴ -J-T ¹⁰⁵ -	-Y ⁴ -J-Y ¹⁰⁵ -J-Y ¹⁰⁶ -	72	-S ^{PO} -	-T ¹⁰⁴ -J-T ¹⁰⁵ -	-Y ⁴ -J-Y ¹⁰⁵ -J-Y ¹⁰⁶ -	X73287	-	-T ¹⁰⁴ -J-T ¹⁰⁵ -	-Y ⁴ -
24	-S ^{PO} -	-T ¹⁰⁴ -	-Y ⁴ -J-Y ¹⁰⁵ -	73				321	-S ^{PO} -J-T ¹⁰⁴ -	-T ¹⁰⁴ -J-T ¹⁰⁵ -J-T ¹⁰⁶ -J-T ¹⁰⁷ -	-Y ⁴ -J-Y ¹⁰⁵ -
25	-	-T ¹⁰⁴ -	-Y ⁴ -	74				322	-S ^{PO} -	-T ¹⁰⁴ -J-T ¹⁰⁵ -	
26	-	-T ¹⁰⁴ -J-T ¹⁰⁵ -J-T ¹⁰⁶ -	-Y ⁴ -	75				323		-T ¹⁰⁴ -J-T ¹⁰⁵ -	
27	-S ^{PO} -J-S ^{PO} -	-T ¹⁰⁴ -	-Y ⁴ -J-Y ¹⁰⁵ -	76				324	-S ^{PO} -	-T ¹⁰⁴ -J-T ¹⁰⁵ -J-T ¹⁰⁶ -	-Y ⁴ -
28	-S ^{PO} -	-T ¹⁰⁴ -	-Y ⁴ -J-Y ¹⁰⁵ -	77				325		-T ¹⁰⁴ -J-T ¹⁰⁵ -J-T ¹⁰⁶ -J-T ¹⁰⁷ -	-Y ⁴ -J-Y ¹⁰⁵ -
29	-	-	-Y ⁴ -	78				326			
30	-S ^{PO} -	-T ¹⁰⁴ -	-Y ⁴ -J-Y ¹⁰⁵ -	79	-S ^{PO} -	-T ¹⁰⁴ -J-T ¹⁰⁵ -J-Y ¹⁰⁶ -		327			
31	-S ^{PO} -	-T ¹⁰⁴ -J-T ¹⁰⁵ -	-Y ⁴ -J-Y ¹⁰⁵ -J-Y ¹⁰⁶ -	80				328			
32	-	-T ¹⁰⁴ -	-Y ⁴ -	81				329			
33	-S ^{PO} -J-S ^{PO} -	-T ¹⁰⁴ -	-Y ⁴ -J-Y ¹⁰⁵ -J-Y ¹⁰⁶ -	82				330			
34	-S ^{PO} -	-T ¹⁰⁴ -J-T ¹⁰⁵ -J-Y ¹⁰⁶ -	-Y ⁴ -J-Y ¹⁰⁵ -J-Y ¹⁰⁶ -	83	-S ^{PO} -	-T ¹⁰⁴ -	-Y ⁴ -J-Y ¹⁰⁵ -	331			
35	-S ^{PO} -	-T ¹⁰⁴ -	-Y ⁴ -J-Y ¹⁰⁵ -	84				332			
36	-	-T ¹⁰⁴ -	-Y ⁴ -J-Y ¹⁰⁵ -	85				333			
37	-S ^{PO} -	-T ¹⁰⁴ -	-Y ⁴ -J-Y ¹⁰⁵ -J-Y ¹⁰⁶ -	86				334			
38	-S ^{PO} -J-S ^{PO} -	-T ¹⁰⁴ -J-T ¹⁰⁵ -		87				335			
39	-S ^{PO} -J-S ^{PO} -	-T ¹⁰⁴ -		88	-S ^{PO} -	-T ¹⁰⁴ -J-Y ¹⁰⁵ -		336			
40	-S ^{PO} -	-T ¹⁰⁴ -		89				337			
41	-S ^{PO} -	-		90				338			
42	-	-		91				339			
43	-	-		92	-S ^{PO} -	-T ¹⁰⁴ -J-T ¹⁰⁵ -	-Y ⁴ -J-Y ¹⁰⁵ -J-Y ¹⁰⁶ -	340			
44	-S ^{PO} -	-T ¹⁰⁴ -	-Y ⁴ -J-Y ¹⁰⁵ -	93	-S ^{PO} -	-T ¹⁰⁴ -J-T ¹⁰⁵ -	-Y ⁴ -J-Y ¹⁰⁵ -J-Y ¹⁰⁶ -	341			
45	-	-T ¹⁰⁴ -J-T ¹⁰⁵ -	-Y ⁴ -J-Y ¹⁰⁵ -	94	-	-T ¹⁰⁴ -J-T ¹⁰⁵ -	-Y ⁴ -J-Y ¹⁰⁵ -	342			
46	-	-T ¹⁰⁴ -J-T ¹⁰⁵ -J-T ¹⁰⁶ -	-Y ⁴ -J-Y ¹⁰⁵ -								

Finalmente, las Tablas 24 y 25 muestran una serie de proteínas quinasas que ejercen su función por fosforilación de muchas proteínas en diferentes rutas de señalización celular. En estas Tablas se muestran una serie de posiciones susceptibles de ser fosforiladas dentro de la secuencia de las diferentes profilinas. Como se puede observar, existe una gran variabilidad en dichas posiciones susceptibles de fosforilación, sobre todo para las correspondientes a la proteína quinasa C. La de menor variabilidad corresponde a la proteína quinasa p38MAPK, que sólo es fosforilada en al treonina 114.

Tabla 24. Fosforilación de profilinas por diversas proteínas quinasa en *Olea europaea*. En el encabezamiento de la tabla están las diferentes quinasas, así como los aminoácidos y su posición sobre las que pueden actuar. Sólo se han mostrado aquellos clones que presentan alguna variación con respecto al encabezamiento de la tabla. La línea horizontal nos indica las posiciones de fosforilación que aparecen en el encabezamiento de la tabla. Si no existe fosforilación por parte de alguna proteína quinasa, se muestra con un espacio en blanco.

Nº de secuencia	PKC S34, T41, T73, T96	PKA S92	CKII/I T35/S92	p38MAPK T114	cdc2 S39, T41	cdk5 T114	DNAPK ---	CaM-II S39, T41, T66, T73	INSR Y75	EGFR Y109
3	—	—	T34, —	—	T34, —	—	—	—	—	—
4	T3, —	—	—	—	—	—	—	—	—	—
6	S2, —	—	—	—	—	—	—	—	—	—
9	—	—	—	—	S38, T66, —	—	—	—	SRC (Y73), —	—
10	T31, S36, T93	S22	S17, T48/	—	S17, T43	T113	—	S22, S36	—	—
11	—	—	—	—	S31, —	—	S39	S36, T38	Y125, —	—
13	T3, S34, S39, T96 PKG ET480	S25	T34, T35	—	S34, S39, T34	—	—	S34, S39, T66	—	—
14	—	—	T30, —	—	—	—	—	—	—	—
15	—	—	—	—	—	—	—	—	—	Y125, —
16	—	—	—	—	S34, —	—	—	—	—	—
17	T3, —	—	—	—	—	—	—	—	—	—
23	S34, T41, T96	—	—	—	—	—	—	S39, T41, T66	—	—
26	T3, —	—	—	—	—	—	—	—	—	—
27	—	—	—	—	—	—	—	—	—	Y125, —
28	T96, T97, —	—	—	—	—	—	—	—	—	—
33	—	—	—	—	S34, —	—	—	—	—	—
34	T3, —	—	—	—	—	—	—	—	—	—
35	T3, T24, —	T24, —	S42, —	—	S34, T41	—	—	—	—	—
37	T3, —	—	—	—	—	—	—	—	—	—
38	T3, T31, S36, T93 PKG (137)	—	T48	—	T23, T31, T63	T113	—	T23, S36	—	—
39	T34, T39, T96 PKG ET480	—	—	—	S34, S39	—	—	S34, S39, T66	—	—
48	—	—	—	—	S34, —	—	—	—	—	—
50	—	—	—	—	—	—	—	—	SRC (Y73), —	—
51	T3, —	—	—	—	S31, —	—	—	—	Y125, —	—
52	T3, —	—	—	—	—	—	—	—	—	—
57	PKG ET480, T96, S97, —	—	T33	—	S34, —	—	—	—	—	T3, —
58	T3, T66, —	—	—	—	T66, —	—	—	—	—	—
60	T3, —	—	—	—	—	—	—	—	—	—
61	T3, —	—	—	—	—	—	—	—	—	—
62	T3, —	—	—	—	—	—	—	—	—	—
63	T3, S22, —	—	T3, S89	—	T69	—	—	S22, T31, S36	—	—
64	T39, T61, T93	S22	T48	—	S36, T63	—	—	S22, S36	—	Y125, —
65	T39, T61, T93	S22	T48	—	S36, T63	—	—	S22, S36	—	Y125, —
66	T31, T83, T93	S22	T48	—	S31, T63	—	—	S22, S36	—	Y125, —
67	T31, T69, T93	S22	T48	—	S36, T63	—	—	S22, S36	—	Y125, —
68	T31, T69, T93	S22	T48	—	S36, T63	—	—	S22, S36	—	Y125, —
69	S36, T39, PKC (S99), PKG (137)	S99	T44, T48	—	—	—	—	S22, S36, T63, T70	—	—
74	—	—	—	—	—	—	—	—	—	Y125, —
75	T3, —	—	—	—	—	—	—	—	—	—
79	T3, —	—	—	—	—	—	—	—	—	—
80	—	—	—	—	S31, S36, T38	—	—	S36, T38	Y125, —	—
83	T3, —	—	—	—	—	—	—	—	—	—
85	T3, —	—	—	—	—	—	—	—	—	—
86	T3, T66, T92, —	—	T92, —	—	—	—	—	—	—	—
88	T3, —	—	—	—	—	—	—	—	—	—
89	—	—	—	—	—	—	—	S39, T41, T73	—	—
90	—	—	S112, —	—	S112, —	—	—	—	—	—
91	—	—	T96, —	—	—	—	—	—	—	—
92	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
93	—	—	T96, —	—	—	—	—	—	—	—
94	T3, S22, T31, T69, T93, PKG (137)	S99	T3, —	—	T63	—	—	S22, T31, S36	—	—

Tabla 25. Fosforilación de profilinas por diversas proteínas quinasa en *Betula pendula*, *Corylus avellana*, *Phleum pratense* y *Zea mays*. En el encabezamiento de la tabla se muestran las posiciones aminoacídicas equivalentes a las de *Olea europaea* susceptibles de fosforilación. La línea horizontal nos indica las posiciones de fosforilación que aparecen en el encabezamiento de la tabla. El espacio en blanco muestra que no existe fosforilación por proteínas quinasa en esas posiciones.

Nº de secuencia	PKC S34, T41, T73, T96	PKA S92	CKII/I T38/S92	p38MAPK T114	cdk2 S39, T41	cdk5 T114	DNAPK	CaM-II S39, T41, T66, T73	ENSR Y75	EGFR Y109
S163179	T3, S33, S40, T95	—	T3, —	—	S20, S22, S33, T65, —	—	S22	S20, S23, S40, T65	—	—, Y127
182	T3, S33, S40, T95	—	T3, —	—	S23, S33, T65, —	—	—	S23, S28, S40, T65	—	—, Y127

Nº de secuencia	PKC S33, T40, T72, T95	PKA S91	CKII/I T38/S91	p38MAPK T111/113	cdk2 S39, T41	cdk5 T111/113	DNAPK	CaM-II S38, T40, T65, T72	ENSR Y74	EGFR Y108
183	—	—	—	—	S25, S33	—	—	S25	—	—
184	—	—	—	—	S25, S33	—	—	S25	—	—
185	S31, T38, S89	S98	—	—	S36, Y38, ATM (S21,99)	—	S28, S88	S36, T63	—	Y125
186	—	—	—	—	S25, S33	—	—	S25	—	—
187	T31, T93	S22	T48, —	—	S36, T63	—	—	S22, S36	—	—
188	—	—	—	—	S25, S33	—	—	S25	—	—
189	T5	—	T3,	—	S25, S33	—	—	S25	—	—
190	T5	—	—	—	S25, S33	—	—	S25	—	Y127
191	T5	—	—	—	S25, S33	—	—	S25	—	Y127
192	T5	—	—	—	S25, S33	—	—	S25	—	Y127

Nº de secuencia	PKC S31, T36, T69, T93	PKA S89	CKII/I T38/S92	p38MAPK T111	cdk2 S36, T38	cdk5 T111	DNAPK	CaM-II S36, T38, T63, T70	ENSR Y72	EGFR Y106
X77303	T3, T31, T93	S22	T3, T48, —	—	S36, T63	—	—	S22, S36	—	—
Y99436	T3, T31, T93	S22	T3, T48, —	—	S36, T63	—	—	S22, S36	—	—
Y99437	T3, T22, T31, T93	S22	T3, T48, —	—	S36, T63	—	—	S22, S36	—	—
Y99438	T3, T31, T93	S22	T3, T48, —	—	S36, T63	—	—	S22, S36	—	—
113	T31, T69, T93	S22	T48, —	—	S36, T63	—	—	S22, S36	—	Y125
114	T31, T93	S22	T48, —	—	S36, T63	—	—	S22, S36	—	Y125
115	T3, T31, T93	S22	T48, —	—	S36, T63	—	—	S22, S36	—	Y125
116	T3, T30, T69, T93	S22	T48, —	—	S36, T63	—	—	S22, S36	—	Y125
117	T31, T69, T93	S22	T48, —	—	S36, T63	—	—	S22, S36	—	Y125
118	T31, T93	S22	T48, —	—	S36, T63	—	—	S22, S36	—	Y125
119	T31, T63, T93	S22	T48, —	—	S36, T63	—	—	S22, S36	—	Y125
120	T31, T69, T93	S22	T48, —	—	S36, T63	—	—	S22, S36	—	Y125
X73279	T3, T32, T93	—, S100	T5	—	S100	—	—	S22, S36, T63, T70	—	—
X73280	T99	—, S85	T30	—	S42, T69	—	—	S42, T69, T76	—	Y132
X73281	T3, T36, T93, PKG (T30)	—	T3, T48	—	—	—	—	—	—	—
121	T3, T36, T93, PKG (T30)	—	T3, T48	—	—	—	—	S36, T70	—	Y125
122	T36, T93, PKG (T30)	—	T44, T48	—	—	—	—	S22, S36, T63, T70	—	—
123	T93	—	T44	—	S36, T63	—	—	S22, S36, T63, T70	—	Y125
124	T36, T93, PKG (T30)	—	T44, T48	—	—	—	—	S22, S36, T63, T70	—	—
125	T36, T93, PKG (T30)	—	T44, T48	—	—	—	—	S22, S36, T63, T70	—	—
126	T36, T93	S42, —	T42, T44, T48	—	—	—	—	S22, S36, T63, T70	—	—
127	T36, T93, PKG (T30)	—	T44, T48	—	—	—	—	S22, S36, T63, T70	—	—

4.3.7. Predicción de la localización celular de las profilinas.

Se ha llevado a cabo la predicción de la localización celular de las profilinas sobre la base de su secuencia primaria, así como a la determinación de la posible presencia de péptidos señal que dirijan a estas proteínas hacia determinadas localizaciones celulares.

El cálculo de la probabilidad de localización de profilinas con una determinada secuencia aminoacídica ha sido realizado utilizando las herramientas TargetP (Emanuelsson *et al.* 2007) y PSORT v2.0 (Nakai & Kanehisa 1991). La Tabla 26 muestra

los valores medios de probabilidad de localización de las profilinas de diferentes especies en distintos compartimentos celulares para cada especie. Junto a los valores medios se indican los valores calculados para algunas secuencias específicas, que han sido incluidas por diferir ampliamente de la media. En general, las profilinas presentan una mayor probabilidad de encontrarse en el citoplasma. Sin embargo se observan algunas secuencias con una elevada probabilidad de encontrarse en mitocondrias y cloroplastos, mientras que otras corresponderían a proteínas de secreción. Estos últimos datos referentes a posible secreción han sido confirmados por la predicción mediante otro programa específico: SignalP 3.0 Server (Emanuelsson *et al.* 2007) (resultados numéricos no mostrados).

Tabla 26. Cálculo de la probabilidad de encontrar las profilinas en una determinada localización celular. Con fondo gris se indican los valores medios por especie, así como los valores calculados para ciertas secuencias, que difieren notablemente de los valores medios.

Especie	Número de secuencia	Cloroplasto	Mitocondria	Secrección	Otras (Citoplasma, microsomas, etc...)
<i>Olea europaea L.</i>	-	13.2±1.6	8.2±0.8	9.8±0.5	68.8±0.7
	10	5.9±0.0	4.4±0.0	39.9±0.0	49.8±0.0
	11	7.6±0.0	7.0±0.0	20.0±0.0	65.4±0.0
	38	5.8±0.0	5.3±0.0	32.2±0.0	56.7±0.0
	46	9.7±0.0	7.4±0.0	14.2±0.0	68.7±0.0
	51	7.9±0.0	7.8±0.0	17.0±0.0	67.3±0.0
	60	6.7±0.0	4.8 ±0.0	28.4 ±0.0	60.1±0.0
	63	8.2±0.0	6.8±0.0	15.2±0.0	69.8±0.0
	64	6.7±0.0	4.8±0.0	28.4±0.0	60.1±0.0
	65	6.7±0.0	4.8±0.0	28.5±0.0	60.0±0.0
	66	6.9±0.0	4.4±0.0	28.2±0.0	60.5±0.0
	67	6.7±0.0	4.8±0.0	28.5±0.0	60.0±0.0
	69	8.7±0.0	6.8±0.0	20.0±0.0	64.5±0.0
	80	7.1±0.0	8.4±0.0	16.5±0.0	68.0±0.0
	94	8.2±0.0	6.8±0.0	15.3±0.0	69.7±0.0
<i>Betula pendula</i>	-	14.4±1.1	8.6±0.5	11.7±0.3	65.3±1.0
<i>Corylus avellana</i>	-	14.1±0.1	8.1±0.1	13.2±0.5	64.6±0.4
	98	8.4 ±0.0	6.8 ±0.0	22.3 ±0.0	62.5 ±0.0
<i>Phleum pratense</i>	-	6.6±0.2	5.0±0.3	27.9±0.7	61.5±1.4
<i>Zea mays</i>	-	7.8±0.1	7.2±0.1	19.7±0.4	65.4±0.4
	X73280	2.5 ±0.0	9.9±0.0	27.1±0.0	60.5±0.0

La probabilidad de localización nuclear de las profilinas no puede ser calculada mediante los mencionados programas, por lo que se ha utilizado la herramienta informática Nucleo v1.0 (Hawkins *et al.* 2007), que sí permite calcular esta

probabilidad. En la Tabla 27 se indican las probabilidades medias de localización nuclear de las profilinas en cada una de las especies estudiadas, así como los valores calculados para algunas secuencias específicas, que han sido incluidas por diferir ampliamente de la media tanto en un sentido como en otro.

Espece	Número de Secuencia	Localización nuclear (%)
<i>Olea europaea L.</i>	-	34.8±3.3
	14	19.0±0.0
	54	18.0±0.0
	83	19.0±0.0
<i>Betula pendula</i>	-	25.5±0.7
<i>Corylus avellana</i>	-	29.1±0.8
	98	17.0±0.0
	-	27.8±1.5
<i>Phleum pratense</i>	X77583	33±0.0
	Y09456	32±0.0
	Y09457	31±0.0
	Y09458	32±0.0
	-	26.9±2.0
<i>Zea mays</i>	X73279	32.0±0.0
	X73280	35.0±0.0

Tabla 27. Cálculo de la probabilidad de distribución nuclear para las profilinas analizadas en este trabajo. Se indica con fondo gris la probabilidad media en cada especie. El resto de secuencias listadas en la tabla corresponde a aquellas cuya probabilidad de localización nuclear difiere notablemente de la media destacan por poseer una probabilidad diferente a la media.

Entre todas las especies analizadas, son las profilinas de *Olea europaea L.* las que presentan mayor probabilidad media de localizarse en el núcleo.

La localización nuclear de las profilinas de plantas analizadas poseen un motivo de carácter básico (RGKKGXGG(I/V)T(I/V)KKT) implicado en dirigir estas proteínas al núcleo (Yoneda 1997). La Tabla 28 muestra el polimorfismo detectado en todas las secuencias analizadas para este motivo. En general, las microheterogeneidades detectadas en este motivo son poco abundantes, y se localizan especialmente en las secuencias analizadas en la especie *Phleum pratense* y *Zea mays* con mayor probabilidad de encontrarse en el nucleo poseen cambios en la secuencia aminoacídica que podrían estar implicado en dirigir estas proteínas al nucleo (Tabla 27). El análisis de los cambios producidos en el motivo de localización nuclear (Tabla 28), muestra una serie de cambios que se repiten en muchas de las secuencias.

Secuencia	Motivo nuclear
<i>Olea europaea</i>	10 RGKKG A GGTIKKT
	11 RGKKG A GGITVKKT
	13 RGKKG A GGTIKKT
	38 RGKKG A GGTIKKT
	51 RGKKG A GGITVKKT
	57 RGKKG S GGIT K KT
	64 RGKKG A GGTIKKT
	65 RGKKG A GGTIKKT
	66 RGKKG A GGTIKKT
	67 RGKKG A GGTIKKT
	68 RGKKG A GGTIKKT
	80 RGKKG A GGITVKKT
	86 RGKKG T GGTIKKT
	91 RGKKG S GGIT E T
	93 RGKKG S GGIT E T
<i>Corylus avellana</i>	98 RGKKG A GGITVKKT
	100 RGKKG A GGITVKKT
<i>Phleum pratense</i>	X77583 RGKKG A GGTIKKT
	Y09456 RGKKG A GGTIKKT
	Y09457 RGKKG A GGTIKKT
	Y09458 RGKKG A GGTIKKT
	106 RGKKG A GGTIKKT
	107 RGKKG A GGTIKKT
	108 RGKKG A GGTIKKT
	109 RGKKG A GGTIKKT
	110 RGKKG A GGTIKKT
	111 RGKKG A GGTIKKT
	112 RGKKG A GGTIKKT
	113 RGKKG A GGTIKKT

Tabla 28. Detalle de los cambios en el motivo de localización nuclear característico de plantas (RGKKGXGG(I/V)T(I/V)KKT), donde la X es el aminoácido serina (S) en la mayoría de las secuencias analizadas. El aminoácido que cambia se destaca en negrita y con mayor tamaño.

4.4. Análisis *in silico* de la influencia del polimorfismo intraespecífico de las profilinas del olivo sobre su carácter alergénico y su posible implicación en las reacciones cruzadas con diferentes especies.

Con objeto de estudiar la posible influencia del polimorfismo de las secuencias aminoacídicas sobre las características alergénicas de las diversas profilinas, se llevaron a cabo diversos análisis que incluyen:

4.4.1. Predicción de los perfiles de antigenicidad.

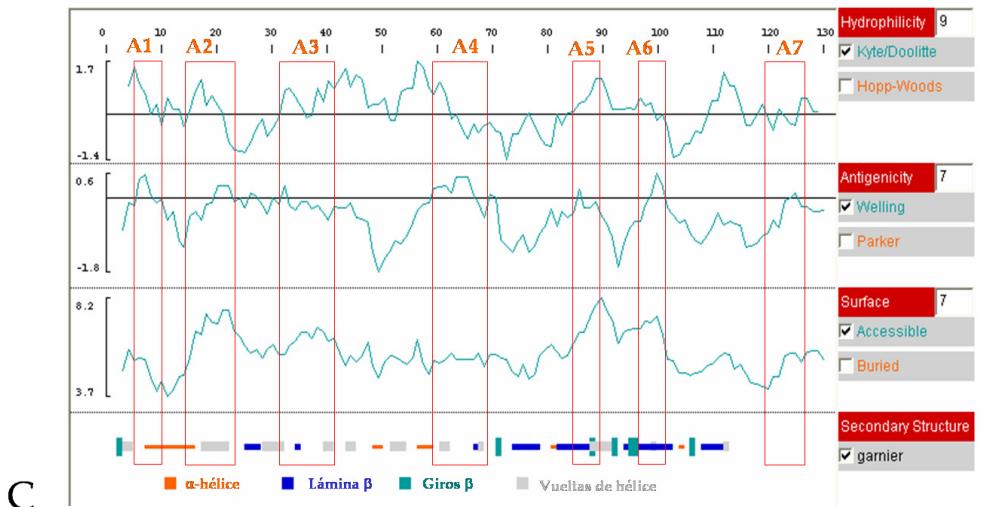
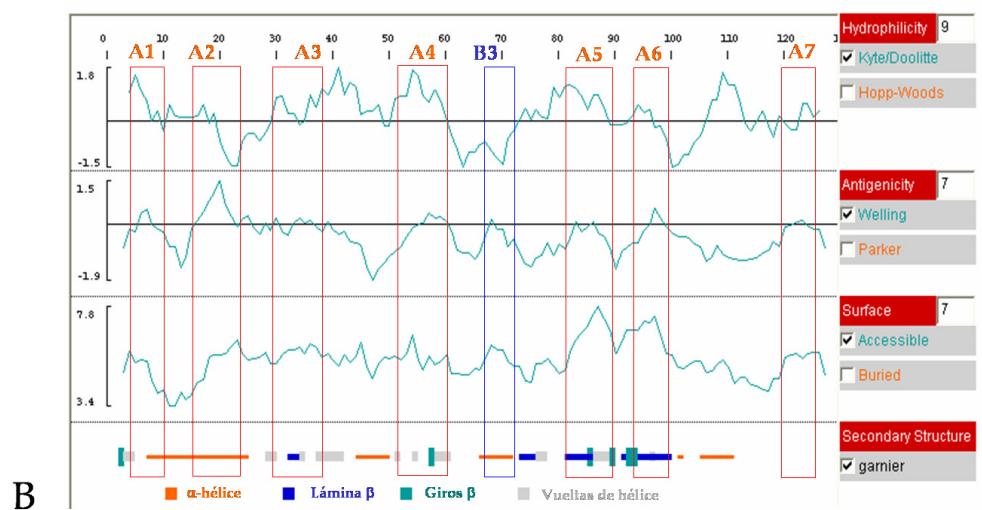
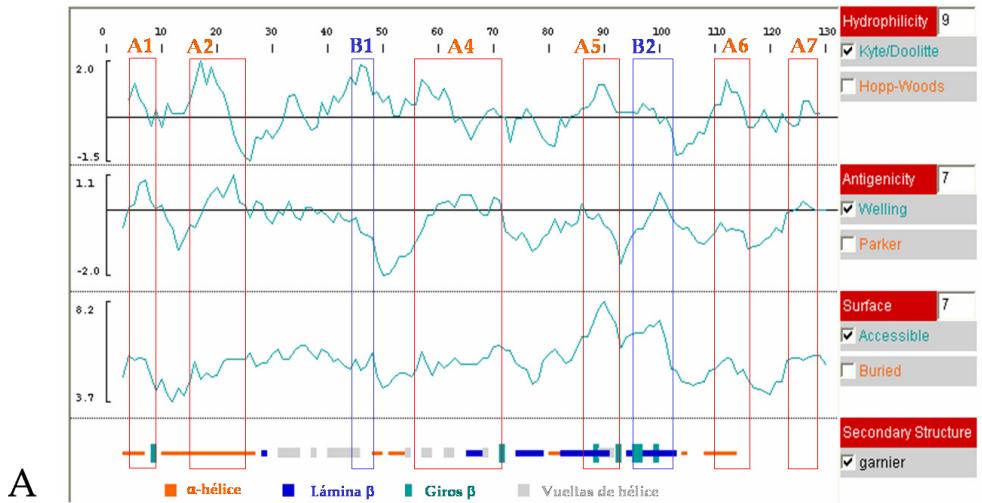
4.4.2. Análisis de las regiones epitópicas inmunodominantes de reconocimiento por IgG e IgE (epitopos de células B).

4.4.3. Análisis de las regiones de anclaje para los alelos de MHC clase II (Complejo Principal de Histocompatibilidad, Clase II). Receptores de células T que median en la alergenicidad cruzada.

4.4.4. Predicción de la localización epitópica en los modelos 3D y construcción de epitopos conformacionales de profilinas.

4.4.1. Predicción de los perfiles de antigenicidad

Se llevó a cabo un análisis de todas las secuencias clonadas en el presente trabajo (Tabla 7), con la herramienta PeptideselectTM design tool (Invitrogen), <https://peptideselect.invitrogen.com/peptide>. Dicha herramienta permite determinar parámetros claves de las proteínas, relacionados con su interacción con el sistema inmune, como son la hidrofobicidad (Kyte-Doolittle *et al.* 1982), antigenicidad (Welling *et al.* 1985), accesibilidad y estructura bidimensional (Garnier *et al* 1996). La Fig. 33 muestra únicamente un perfil representativo para cada una de las especies estudiadas. Como podemos observar en los diagramas, los perfiles son bastante parecidos en las cinco especies analizadas. Se observan 7 picos de antigenicidad elevada (A1-A7) en las 5 especies, así como dos picos extra no comunes al resto de las especies en *Olea europaea* (B1 y B2) y uno en *Phleum pratense* (B3).



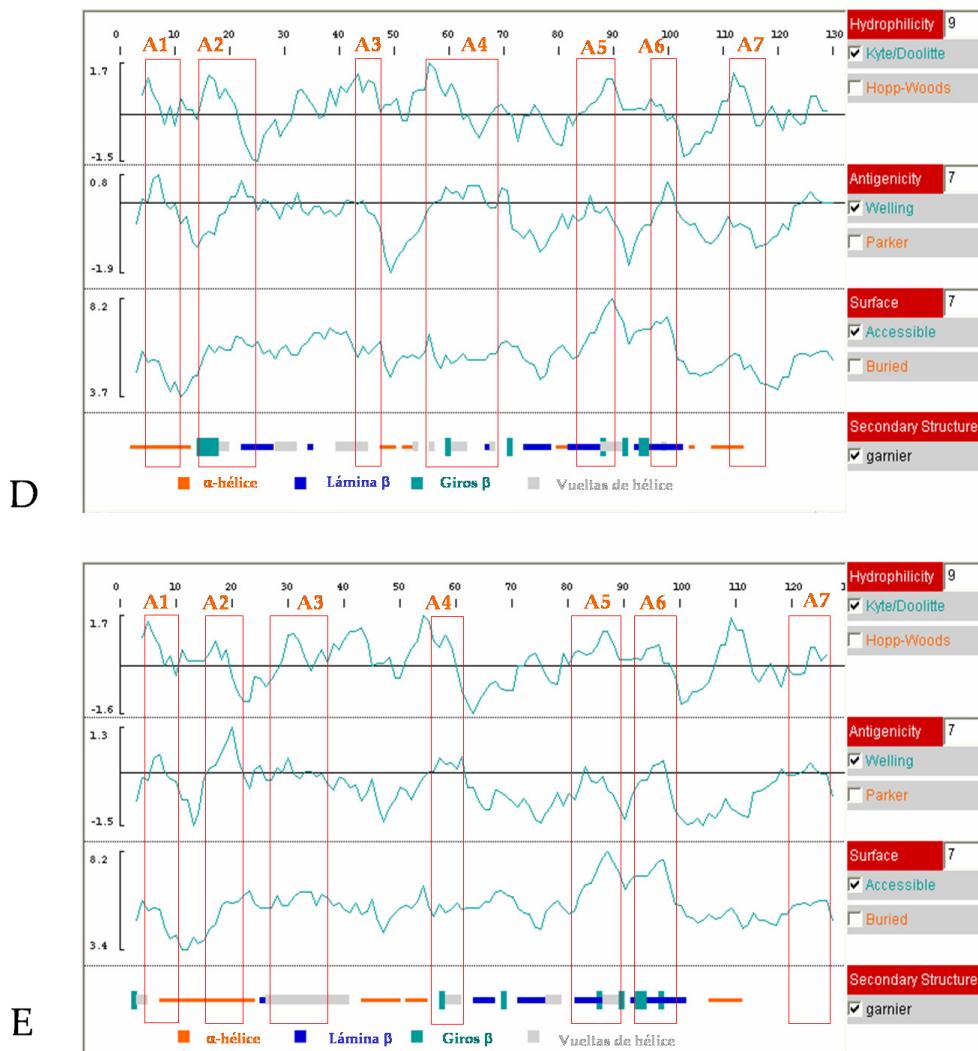


Figura 33. Ejemplos de análisis predictivo de las regiones antigenicas. Se ha analizado una secuencia aminoacídica representativa de profilinas de cada una de las especies objeto de estudio. Dicha secuencia corresponde a la secuencia calculada por el programa Clustal W como referencia para la elaboración de los alineamientos. A) *Olea europaea* (secuencia nº 13), B) *Phleum pratense* (secuencia 113), C) *Betula pendula* (M65179), D) *Corylus avellana* (secuencia 104) y E) *Zea mays* (secuencia 122). Los picos de alergenicidad elevada se representan mediante recuadros rojos (comunes en las cinco especies) o azules (no comunes).

Como se mostraba en los alineamientos aminoacídicos de todas las secuencias analizadas (Figs. 11, 12, 13B-16B y 17A'-17E'), existe una gran variabilidad.

Las Tablas 29 y 30 muestran detalladamente el polimorfismo existente en las regiones con antigenicidad elevada descritas anteriormente para *Olea europaea* y el resto de especies respectivamente. Como se puede observar en dichas tablas, se ha

determinado la existencia de numerosas microheterogeneidades presentes en esas regiones que originan diversas formas antigenicas de dichos picos, cada uno de ellos representados con una frecuencia determinada en cada especie, como se describe en la Tabla 31.

Tabla 29. Análisis de la variabilidad aminoacídica en los picos de antigenicidad predictiva elevada de las profilinas de olivo. Para el análisis de las modificaciones se eligieron como modelo la secuencia nº 13 de *Olea europaea*, calculada como referencia por el programa Clustal W para el alineamiento múltiple. A partir de dicha secuencia, todas las modificaciones aminoacídicas se han señalado en negrita y con mayor tamaño.

Secuencia	Pico A1 (5-10) TYVDDH	Pico A2 (14-20) ELEGNPGBHLAA	Pico B1 (45-49) FPGEE	Pico A4 (56-71) DNNEPGHLAFTGQIHLG	Pico A5 (86-92) ERGKKGAA	Pico B2 (97-101) IKKTG	Pico A6 (111-116) EPVTG	Pico A7 (123-128) ERLGDDY
Y12625		D IEGHED R ITA						
Y12629	Ayvddoh	D IEGH E CH R ITA	FPGEE	D I DEPG S LAP T GQIHLG	ERG K KGS	IKKTG	EPVTG	ERLGDDY
Y12630								
1								
2	Ayvddoh	D IEGH E CH R ITA	FPGEE	D N NEPG H LAFT G QIHLG	ERG K KGS	IKKTG	EPVTG	ERLGDDY
3								
4	TYVDDH							
5								
6	Ayvddoh	D IEGH E CH R ITA	FPGEE	D N NEPG H LAFT G QIHLG	ERG K KGS	IKKTG	EPVTG	ERLGDDY
7								
8	Ayvddoh	D IEGH E D R ITA		D N NEPG H LAFT G QIHLG	V IG K KGS		EPVTG	
9		D IEGH E D R ITA		D E SEPG H LAFT G QIHLG	ERG K KGS		EPVTG	
10	AyyYEH	e SHH L SSAAAI		D E DEPG H LAFT G M FVA	ERG K KGA		EPVTG	
11	Ayvddoh	D IEGH E TA AAAI		D E DEPG S LAP T GQIHLG	ERG K KGA		EPVTG	
12	Ayvddoh	D IEGH E D R ITA			ERG K KGS			
→ 13	TYVDDH	ELEGNPGBHLAA	FPGEE	D N NEPG H LAFT G QIHLG	ERG K KGA	IKKTG	EPVTG	ERLGDDY
14	Ayvddoh	D IEGH E CH R ITA		D N NEPG H LAFT G QIHLG	ERG K KGS		EPVTG	
15	TYVDDH							
16	Ayvddoh							
17	TYVDDH	D IEGH E CH R ITA	FPGEE	D N NEPG H LAFT G QIHLG	ERG K KGS	IKKTG	EPVTG	ERLGDDY
18	Ayvddoh	D IEGH E D R ITA		D N NEPG H LAFT G QIHLG	ERG K KGS		EPVTG	
19								
20								
21	Ayvddoh	D IEGH E CH R ITA	FPGEE	D N NEPG H LAFT G QIHLG	ERG K KGS	IKKTG	EPVTG	ERLGDDY
22								
23								
24	Ayvddoh	D IEGH E CH R ITA	FPGEE	D N NEPG H LAFT G QIHLG	ERG K KGS	IKKTG	EPVTG	ERLGDDY
25								
26	TYVDDH	D IEGH E CH R ITA	FPGEE	D N NEPG H LAFT G QIHLG	ERG K KGS	IKKTG	EPVTG	ERLGDDY
27	Ayvddoh	D IEGH E CH R ITA	FPGEE	D N NEPG H LAFT G QIHLG	ERG K KGS	IKKTG	EPVTG	ERLGDDY
28	Ayvddoh	D IEGH E CH R ITA	FPGEE	D N NEPG H LAFT G QIHLG	ERG K KGS	TKTKG	EPVTG	ERLGDDY
29		D IEGH E CH R ITA						
30	Ayvddoh	D IEGH E CH R ITA	FPGEE	D N NEPG H LAFT G QIHLG	ERG K KGS	IKKTG	EPVTG	ERLGDDY
31								
32								
33	Ayvddoh							
34	TYVDDH	D IEGH E CH R ITA	FPGEE	D N NEPG H LAFT G QIHLG	ERG K KGS	IKKTG	EPVTG	ERLGDDY
35								
36	Ayvddoh	D IEGH E CH R ITA		D N NEPG H LAFT G QIHLG	ERG K KGS		EPVTG	ERLGDDY
37	TYVDDH							
38	TYVDEH	e GH L LASTAI		D E DEPG H LAFT G M FVA	ERG K KGA		EPVTG	ERLGDDY
39	Ayvddoh	D IEGH E CH R ITA	FPGEE	D N NEPG H LAFT G QIHLG				
40								
41	Gyvddoh							
42	Ayvddoh	D IEGH E D R ITA	VPGEE					
43								
44	Ayvddoh	D IEGH E D R ITA	FPGEE	D N NEPG H LAFT G QIHLG	ERG K KGS	IKKTG	EPVTG	ERLGDDY
45								
46	Ayvddoh	D IEGNPG H HLAA	FPGDE	D N NEPG H LAFT G QIHLGG				

	Secuencia	Pico A1 (5-18) TYVDDH	Pico A2 (14-25) ELEGNPGHESAA	Pico B1 (45-49) FPGEE	Pico A4 (56-71) DFNEPGHLEAPTGLIHLG	Pico A5 (86-92) IRGGKGS	Pico B2 (97-101) SKKTG	Pico A6 (111-116) EPVTPG	Pico A7 (123-128) ERLGDF
47	A YVDDH								
48	TYVDDH		D I le G H E g R TA	FPGEE	DFNEPGHLEAPTGLIHLG	IRGG K GS	SKKTG	EPVTPG	
49	A YVDDH								ERLGDF
50									
51	TYVDDH	D le Q HLTAAAV			D E D PG S LAP T GLIHLG	V IG K EG A	SKKTG	EPVTPG	
52	TYVDDH	D I le G H E g R TA							
53		D I le G H E g R TA							
54	A YVDDH	D I le G H E g R TA							
55									
56	A YVDDH		D I le G H E g R TA				SKKTG		
57	TYVDDH		D I le G H E g R TA	FPGEE	DFNEPGHLEAPTGLIHLG	IRGG K GS	SKKTG	EPVTPG	ERLGDF
58	A YVDDH						SKKTG		
59									
60			D I le G H E g R TA						
61	TYVDDH		D I le G H E g R TA		DFNEPGHLEAPTGLIHLG	IRGG K GS		EPVTPG	
62									
63	TYVDEH				D E D PG S LAP T GLIHLG				
64									
65									
66	A YVDEH	D I le G H L Q G S A A		FPGEE	D E DE G HLAP T GM F V A	IRGG K GA	SKKTG	EPVTPG	ERLGDF
67									
68									
69							V IKKTG		
70									ERLGDF
71	A YVDEH	D I le G H E g R TA		FPGEE	DFNEPGHLEAPTGLIHLG	IRGG K GS	SKKTG	EPVTPG	
72									ERLGDF
73									
74	A YVDEH	D I le G H E g R TA		FPGEE	DFNEPGHLEAPTGLIHLG	IRGG K GS	SKKTG	EPVTPG	ERLGDF
75	TYVDEH	D I le G H E g R TA							
76									
77	A YVDEH		D I le G H E g R TA						
78	TYVDEH	D I le G H E g R TA		FPGEE	DFNEPGHLEAPTGLIHLG	IRGG K GS	SKKTG	EPVTPG	ERLGDF
79									
80			D le Q HLTAAAV		D E NE G HLAP T GLIHLG	IRGG K GA	V IKKTG		
81	A YVDEH	D I le G H E g R TA		FPGEE	DFNEPGHLEAPTGLIHLG	IRGG K GS			
82									
83									
84	TYVDEH	D I le G H E g R TA							
85									
86	TYVDEH		D I le G H E g R TA						
87									
88	A YVDEH		D I le G H E g R TA	FPGEE	DFNEPGHLEAPTGLIHLG	IRGG K GS	SKKTG	EPVTPG	
89	SYVDEH								ERLGDF
90									
91	A YVDEH	D I le G H E g R TA		FPGEE	DFNEPGHLEAPTGLIHLG	IRGG K GS	SKKTG	EPVTPG	
92									
93									
94	TYVDEH	D I le G H L Q G S A A			D E DE G HLAP T GM F V A		SKKTG	EPVTPG	

Tabla 30. Análisis de la variabilidad aminoacídica en los picos de antigenicidad predictiva elevada de las profilinas de *Phleum pratense*, *Betula pendula*, *Corylus avellana* y *Zea mays* respectivamente. Para el análisis de las modificaciones se eligieron como modelo las secuencias nº 113 de *Phleum pratense*, M65179 de *Betula pendula*, 104 de *Corylus avellana* y 122 de *Zea mays*, calculadas como referencia por el programa Clustal W para el alineamiento múltiple. A partir de dicha secuencia, todas las modificaciones aminoacídicas se han señalado en negrita y con mayor tamaño.

Tabla 31. Tabla resumen de las formas antigenicas detectadas para cada uno de los picos de antigenicidad predictiva elevada y frecuencia relativa de cada una de ellas por especie. Las distintas formas antigenicas observadas han sido denominadas con un sufijo adicional (i.e. A1-1, A1-2...). El sufijo "0" se refiere a la secuencia tomada como modelo en cada especie (i.e. A1-0).

Espezie	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	B1	B2	B3
<i>Olea europaea</i>	A1-0 (23.71%) TYVDEHL	A2-0 (1.03%) EREGNPGHBLSA	-	A4-0 (78.35%) DFNPECHLAPFGHLHG	A5-0 (11.34%) IRGKRGKA	A6-0 (92.78%) EPVTPG	A7-0 (94.85%) ERLGDY	B1-0 (97.94%) FKPFE	B2-0 (92.79%) BKCTG	-
	A1-1 (63.92%) AYYDDDEI	A2-1 (64.95%) DRIGHIGHBLTA	-	A4-1 (9.28%) DFDIEPGHLLAPFTGMFVA	A5-1 (83.57%) IRGKRGKS	A6-1 (3.09%) EPMTPG	A7-1 (2.06%) EGLGDY	B1-1 (1.03%) VKPFE	B2-1 (3.09%) VKKTG	-
	A1-2 (6.19%) AYYDEHII	A2-2 (34.43%) DRIGHEDHBLTA	-	A4-2 (7.22%) DFDIEPGSLLAPFTGLHUG	A5-2 (1.03%) VRGKRGKA	A6-2 (2.06%) EPLTPG	A7-2 (1.03%) KRLGDY	B1-2 (1.03%) FKPFE	B2-2 (2.06 %) BKCTG	-
	A1-3 (3.09%) TYVDEHL	A2-3 (8.29%) DRIGHQBLAAJ	-	A4-3 (3.09%) DFNPECHLAPFTGLHUG	A5-3 (1.03%) TRGKRGKS	A6-3 (1.03%) ENVTPG	A7-3 (1.03%) ERLEDY	-	B2-3 (1.03 %) SKCTG	-
	A1-4 (1.03%) AYYVDEH	A2-4 (2.06%) DRGQBLTAAJ	-	A4-4 (1.03%) DSNPECHLAPFTGLHUG	A5-4 (1.03%) VRGKRGKS	A6-4 (1.03%) EPVTPG	A7-4 (1.03%) GRLGDY	-	B2-4 (3.03 %) TEKCTG	-
	A1-5 (1.03%) GYVDEHL	A2-5 (1.03%) DRGCPEDHBLTA	-	A4-5 (1.03%) DFNPECHLAPFTGLHUG	-	-	-	-	-	-
	A1-6 (1.03%) SYVDEHL	A2-6 (1.03%) ERHNBLBSAAJ	-	-	-	-	-	-	-	-
	-	A2-7 (1.03%) DRDHEDHBLTA	-	-	-	-	-	-	-	-
	-	A2-8 (1.03%) EREGBLBLASTA	-	-	-	-	-	-	-	-
	-	A2-9 (1.03%) DRBGNPGHBLAA	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Betula pendula</i>	A1-0 (100.00%) TYVDEHL	A2-0 (50.00%) DGQKBNSELA	A3-0 (100.00%) DGTVWIAQNSRF	A4-0 (100.00%) EPGHLAPFTGLHL	A5-0 (100.00%) VIRGK	A6-0 (100.00%) BKCTQ	A7-0 (100.00%) MVVERLGDY	-	-	-
	-	A2-1 (50.00%) DGQQQQLAAJ	-	-	-	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Corylus avellana</i>	A1-0 (70.00%) QAYYDEHL	A2-0 (60.00%) GGQKLAAS	A3-0 (85.00%) DGTVWIAQNSRF	A4-0 (80.00%) EPGHLAPFTGLHL	A5-0 (90.00%) AVRBCGKG	A6-0 (90.00%) BKCTQ	A7-0 (90.00%) VIRLGDY	-	-	-
	A1-1 (30.00%) QYVYDEHL	A2-1 (30.00%) GHBLASA	A3-1 (10.00%) DGTVWIAQNSRF	A4-1 (10.00%) EPGHLAPFTGLHL	A5-1 (10.00%) AVRBCGKG	A6-1 (10.00%) VVKCTQ	A7-1 (10.00%) VGRLGDY	-	-	-
	-	A2-2 (30.00%) GHBLASA	A3-2 (10.00%) DGTVWIAQNSRF	A4-2 (10.00%) EPGHLAPFTGMFV	-	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Phleum pratense</i>	A1-0 (60.00%) TYVDEHL	A2-0 (100.00%) ERGHBLAS	A3-0 (100.00%) DGTVWIAQNSAD	A4-0 (91.67%) KDKDDEPGHL	A5-0 (83.32%) AVRBCGKG	A6-0 (100.00%) BKCTQ	A7-0 (100.00%) VERLGDY	-	-	B3-0 (41.67%) VAAAKY
	A1-1 (60.00%) AYYVDEH	-	-	A4-1 (8.33%) KDKDDEPGHL	A5-1 (8.34%) AVRBCGKG	-	-	-	-	B3-1 (33.33%) VATAKY
	-	-	-	-	A5-2 (8.34%) AVTRGKRGKA	-	-	-	-	B3-2 (25.00%) VAGAKY
<i>Zea mays</i>	A1-0 (70.00%) AYYDEHL	A2-0 (70.00%) ERGBBLTS	A3-0 (90.00%) GHDXGAAWAQS	A4-0 (30.00%) DEPGHLA	A5-0 (100.00%) AVRBCGKG	A6-0 (100.00%) ITVVKCTQ	A7-0 (100.00%) VERLGDY	-	-	-
	A1-1 (30.00%) TYVDEHL	A2-1 (20.00%) ERGBBLTS	A3-1 (10.00%) GHDXGAAWAQS	A4-1 (70.00%) DEPGHLA	-	-	-	-	-	-
	-	A2-2 (20.00%) ERGBBLAA	-	-	-	-	-	-	-	-

En resumen, en *Olea europaea* se han detectado 7 formas antigenicas del pico A1, 11 en A2, 6 en A4, 5 en los picos A5, A6, A7 y B2, así como 4 en B1. En la mayoría de ellos, existen 2 ó 3 formas antigenicas que se encuentran en más del 90% de las secuencias de profilinas analizadas. La forma más extendida del pico A1 es la A1-1, presente en un 63.92% de las secuencias analizadas, mientras que las formas A1-4 hasta A1-6 son las menos frecuentes, al estar presentes en sólo un 1.03% de las secuencias cada una de ellas. La forma más extendida del pico A2 es la A2-1, presente en un 64.95% de las

secuencias analizadas, mientras que las formas A2-5 hasta A2-10 son las menos frecuentes, al estar presentes en sólo un 1.03% de las secuencias cada una de ellas. La forma mayoritaria del pico A4 es la A4-0, con un 78.35% de representación entre las secuencias; en A5 es la A5-1 (85.57%), en A6 es la A6-0 (92.78%), en A7 es la A7-0 (94.85%), en el B1 es la B1-0 (97.94%) y en el pico B2 es la B2-0 (92.78%).

En el resto de las especies, dentro de los picos de antigenicidad predictiva elevada, podemos encontrar entre 1 y 3 formas antigénicas, con una representación entre un 100% y un 10% entre las secuencias analizadas.

4.4.2. Análisis de las regiones epitópicas inmunodominantes de reconocimiento por IgG e IgE (epitopos de células B).

Se llevó a cabo la caracterización en las secuencias analizadas en este trabajo de las posibles regiones epitópicas de reconocimiento por células B del sistema inmunitario humano, responsables del reconocimiento y procesamiento de los alérgenos en la respuesta de hipersensibilidad. Dicho análisis está basado en un trabajo llevado a cabo por Asturias *et al.* (2002), en el que se caracterizaron regiones de la secuencia de profilinas recombinantes de girasol Hel a 2, mediante la utilización de péptidos sintéticos solapantes. En este caso hemos estudiado de forma detallada los cambios presentes en la secuencia aminoacídica de todas las secuencias de profilinas obtenidas en esas cinco regiones epitópicas, denominadas 10A4, 5F2, 9A7, 9G4 y 3H8 (Asturias *et al.* 2002), como se muestra en la Tabla 32.

Tabla 32. Caracterización detallada de la variabilidad aminoacídica en las 5 regiones epitópicas de reconocimiento por células B definidas por Asturias *et al.* (2002) para profilinas en *Olea europaea*. En negrita y con un tamaño mayor, se resaltan aquellos aminoácidos que han cambiado con respecto a las secuencias de referencia previamente determinadas por Asturias *et al.* (2002).

En el olivo, la región 3H8 a penas posee cambios, al contrario de lo que ocurre en las demás regiones, donde 10A4, 5F2 y 9G4 poseen en una mayoría de las secuencias una serie de modificaciones que se repiten. El mayor número de cambios lo encontramos en la región 9A7, lo que también ocurre en casi todas las demás secuencias (Tabla 32 y 34).

En las restantes especies ocurre algo similar al olivo, aunque el número de cambios en la región 5F2 es mucho mayor en todas ellas (Tabla 33 y 34).

Tabla 33. Caracterización detallada de la variabilidad aminoacídica en las 5 regiones epitópicas de reconocimiento por células B definidas por Asturias *et al.* (2002) para profilinas en *Betula pendula*, *Corylus avellana*, *Phleum pratense* y *Zea mays*. En negrita y con un tamaño mayor, se resaltan aquellos aminoácidos que han cambiado con respecto a las secuencias de referencia previamente determinadas por Asturias *et al.* (2002).

	Secuencia	10A4 MSWQAYV	5F2 AQSAKIPQQPKPEEM	9A7 CQAMIMGIYD	9G4 YDEPVAPG	
<i>Betula pendula</i>	M80179	MSWQAYV	AqSSITrqnE <i>Q</i> E <i>I</i>	QQALVF <i>G</i> yE	yE <i>E</i> PvTrg	
	102	MSWQAYV	AqSSITrqnE <i>Q</i> E <i>I</i>	QQALVF <i>G</i> yE	yE <i>E</i> PvTrg	
	103		AqSSITrqn <i>L</i> r <i>E</i> <i>I</i>	QQALVF <i>G</i> yE	yE <i>E</i> PvTrg	
	104		AqSSITrqn <i>L</i> r <i>E</i> <i>I</i>	QQALVF <i>G</i> yE	yE <i>E</i> PvTrg	
	105		AqSSITrqn <i>L</i> r <i>E</i> <i>I</i>	S <i>Q</i> ALVF <i>G</i> yD	y <i>D</i> e <i>P</i> LTrg	
	106		AqSSITrqn <i>L</i> r <i>E</i> <i>I</i>	QQALVF <i>G</i> yE	yE <i>E</i> PvTrg	
	107		AqSSITrqn <i>L</i> r <i>E</i> <i>I</i>	QQALVV <i>G</i> yD	y <i>D</i> e <i>P</i> MTrg	
	108					
	109					
	110					
<i>Corylus avellana</i>	MSWQAYV					
	103	MSWQAYV	AqSSITrqn <i>L</i> r <i>E</i> <i>I</i>	QQALVF <i>G</i> yE	yE <i>E</i> PvTrg	
	104	MSWQAYV	AqSSITrqn <i>L</i> r <i>E</i> <i>I</i>	QQALVF <i>G</i> yE	yE <i>E</i> PvTrg	
	105	MSWQAYV	AqSSITrqn <i>L</i> r <i>E</i> <i>I</i>	QQALVF <i>G</i> yE	yE <i>E</i> PvTrg	
	106	MSWQAYV	AqSSITrqn <i>L</i> r <i>E</i> <i>I</i>	QQALVF <i>G</i> yE	yE <i>E</i> PvTrg	
	107	MSWQAYV	AqSSITrqn <i>L</i> r <i>E</i> <i>I</i>	QQALVF <i>G</i> yE	yE <i>E</i> PvTrg	
	108	MSWQAYV	AqSSITrqn <i>L</i> r <i>E</i> <i>I</i>	QQALVF <i>G</i> yE	yE <i>E</i> PvTrg	
	109	MSWQAYV	AqSSITrqn <i>L</i> r <i>E</i> <i>I</i>	QQALVF <i>G</i> yE	yE <i>E</i> PvTrg	
	110	MSWQAYV	AqSSITrqn <i>L</i> r <i>E</i> <i>I</i>	QQALVF <i>G</i> yE	yE <i>E</i> PvTrg	
	111	MSWQAYV	AqSSITrqn <i>L</i> r <i>E</i> <i>I</i>	QQALVF <i>G</i> yE	yE <i>E</i> PvTrg	
<i>Phleum pratense</i>	MSWQAYV	ADFPQ <i>R</i> KPEEITGI	QQALVV <i>G</i> yD	y <i>D</i> e <i>P</i> MTrg		
	103	MSWQAYV	ADFPQ <i>R</i> KPEEITGI	QQALVV <i>G</i> yD	y <i>D</i> e <i>P</i> MTrg	
	104	MSWQAYV	ADFPQ <i>R</i> KPEEITGI	QQALVV <i>G</i> yD	y <i>D</i> e <i>P</i> MTrg	
	105	MSWQAYV	ADFPQ <i>R</i> KPEEITGI	QQALVV <i>G</i> yD	y <i>D</i> e <i>P</i> MTrg	
	106	MSWQAYV	ADFPQ <i>R</i> KPEEITGI	QQALVV <i>G</i> yD	y <i>D</i> e <i>P</i> MTrg	
	107	MSWQAYV	ADFPQ <i>R</i> KPEEITGI	QQALVV <i>G</i> yD	y <i>D</i> e <i>P</i> MTrg	
	108	MSWQAYV	ADFPQ <i>R</i> KPEEITGI	QQALVV <i>G</i> yD	y <i>D</i> e <i>P</i> MTrg	
	109	MSWQAYV	ADFPQ <i>R</i> KPEEITGI	QQALVV <i>G</i> yD	y <i>D</i> e <i>P</i> MTrg	
	110	MSWQAYV	ADFPQ <i>R</i> KPEEITGI	QQALVV <i>G</i> yD	y <i>D</i> e <i>P</i> MTrg	
	111	MSWQAYV	ADFPQ <i>R</i> KPEEITGI	QQALVV <i>G</i> yD	y <i>D</i> e <i>P</i> MTrg	
<i>Zea mays</i>	MSWQAYV	AqSTArpE <i>N</i> PEEM	QQALV <i>I</i> gyS			
	103	MSWQAYV	AqSTArpE <i>N</i> rk <i>T</i> <i>E</i> <i>M</i>	QQALVV <i>G</i> yD	y <i>D</i> e <i>P</i> MTrg	
	104	MSWQAYV	AqSTArpE <i>N</i> rk <i>T</i> <i>E</i> <i>M</i>	QQALV <i>I</i> gyD		
	105	MSWQAYV	AqSTArpE <i>N</i> rk <i>T</i> <i>E</i> <i>M</i>	QQALV <i>I</i> gyD		
	106	MSWQAYV	AqSTArpE <i>N</i> rk <i>T</i> <i>E</i> <i>M</i>	QQALV <i>I</i> gyD		
	107	MSWQAYV	AqSTArpE <i>N</i> rk <i>T</i> <i>E</i> <i>M</i>	QQAMVV <i>G</i> yD		
	108	MSWQAYV	AqSTArpE <i>N</i> rk <i>T</i> <i>E</i> <i>M</i>	QQALVV <i>G</i> yD		
	109	MSWQAYV	AqSTArpE <i>N</i> rk <i>T</i> <i>E</i> <i>M</i>	QQALV <i>I</i> gyD		
	110	MSWQAYV	AqSTArpE <i>N</i> rk <i>T</i> <i>E</i> <i>M</i>	QQAMVV <i>G</i> yD		
	111	MSWQAYV	AqSTArpE <i>N</i> rk <i>T</i> <i>E</i> <i>M</i>	QQAMVV <i>G</i> yD		

Tabla 34. Tabla resumen de las formas antigenicas detectadas para cada uno de los motivos de reconocimiento por células B y frecuencia relativa de cada una de ellas por especie. Las distintas formas epitópicas observadas han sido denominadas con un sufijo adicional (i.e. 10A4-1, 10A4-2...). El sufijo “0” se refiere a la secuencia tomada como modelo en cada especie (i.e. 10A4-0).

Especie	10A4 MSWQAYV	5F2 AQSAKIPQIKPEEM	9A7 GQAMEMGYD	9G4 YDEPVATPG	3H8 ERLGIDY
<i>Olea europaea</i>	10A4-0 (67.02%) MSWQAYV	-	-	-	3H8-0 (96.91%) ERLGIDY
	10A4-1 (23.77%) MSWQTYV	5F2-1 (12.30%) AQSAKIPQIKPEEM	9A7-1 (56.74%) GQALVFGYD	9G4-1 (82.48%) YDEPVATPG	3H8-1 (1.07%) ERLGIDY
	10A4-2 (13.12%) MSWQAYV	5F2-2 (3.16%) AQSAKIPQIKPEEM	9A7-2 (26.80%) GQALVCGIYE	9G4-2 (10.31%) YDEPMATPG	3H8-2 (1.07%) ERLGIDY
	10A4-3 (1.07%) MSWHEAYV	5F2-3 (1.09%) AQSAKIPQIKPEEM	9A7-3 (9.28%) GQALVVGYD	9G4-3 (2.06%) YDEPLTPG	3H8-3 (1.07%) ERLGIDY
	10A4-4 (1.07%) MSWQGYY	5F2-4 (1.09%) AQSAKIPQIKPEEM	9A7-4 (3.06%) GQALIFGYD	9G4-4 (4.12%) YKEPVTPG	-
	10A4-5 (1.07%) MSWPTYY	5F2-5 (1.09%) AQSAKIPQIKPEEM	9A7-5 (2.06%) GQALVCGHDK	9G4-5 (1.07%) YEEPLTPG	-
	-	5F2-6 (1.07%) AQSAKIPQIKPEEM	9A7-6 (1.07%) GQALVFGHDK	-	-
	-	5F2-7 (1.07%) AQSAKIPQIKPEEM	9A7-7 (1.07%) GQAMIVVGYD	-	-
	-	5F2-8 (1.07%) AQSAKIPQIKPEEM	-	-	-
	-	5F2-9 (1.07%) AQSAKIPQIKPEEM	-	-	-
	-	5F2-10 (1.07%) AQSAKIPQIKPEEM	-	-	-
	-	5F2-11 (1.07%) AQSAKIPQIKPEEM	-	-	-
<i>Betula pendula</i>	10A4-0 (100%) MSWQTYV	5F2-0 (100%) AQSSSIPQFKPQEES	9A7-0 (100%) GQALVFGYD	9G4-0 (100%) YEEPLTPG	3H8-0 (100%) ERLGIDY
<i>Corylus avellana</i>	10A4-0 (60%) MSWQAYV	-	-	-	3H8-0 (100%) ERLGIDY
	10A4-2 (40%) MSWQTYV	5F2-1 (80%) AQSSSIPQFKPQEES	9A7-1 (80%) GQALVFGYD	9G4-1 (80%) YEEPLTPG	-
	-	5F2-2 (10%) AQSSSIPQFKPQEES	9A7-2 (10%) SQALIFGYD	9G4-2 (10%) YDEPLTPG	-
	-	5F2-3 (10%) AQSSSIPQFKPQEES	9A7-3 (10%) GQALVVGYD	9G4-3 (10%) YDEPMATPG	-
<i>Phleum pratense</i>	10A4-0 (58.33%) MSWQAYV	-	-	-	3H8-0 (100%) ERLGIDY
	10A4-1 (41.67%) MSWQTYV	5F2-1 (100%) ADFPQIKPEELTGI	9A7-1 (100%) GQALVVGYD	9G4-1 (100%) YDEPMATPG	-
	-	-	-	-	-
<i>Zea mays</i>	10A4-0 (7%) MSWQAYV	-	-	-	3H8-0 (100%) ERLGIDY
	10A4-1 (30%) MSWQTYV	5F2-1 (60%) AQSAKIPQKTEEM	9A7-1 (60%) GQALVFGHDK	9G4-1 (100%) YDEPMATPG	-
	-	5F2-2 (20%) AQSAKIPFKTEEM	9A7-2 (30%) GQAMIVVGYD	-	-
	-	5F2-3 (20%) AQSAKIPQKPEEM	9A7-3 (20%) GQALVVGYD	-	-
	-	5F2-4 (10%) AQSAKIPFKPEEM	9A7-4 (10%) GQALIFGYS	-	-
	-	5F2-5 (10%) AQSAKIPQKTEEM	-	-	-

En resumen, en *Olea europaea* se han detectado 6 formas antigenicas para el motivo 10A4, 9 para 5F2, 7 en 9A7, 5 en 9G4 y 3 en 3H8. En la mayoría de ellos, existen 2 ó 3 formas antigenicas que se encuentran en más del 90% de las secuencias de profilinas analizadas. La forma más extendida del motivo 10A4 es el 10A4-0, presente en un

67.02% de las secuencias analizadas, mientras que las formas 10A4-3 a 10A4-5 son las menos frecuentes al estar presentes en sólo un 1.03% de las secuencias cada una de ellas. La forma más extendida del motivo 5F2 es el 5F2-1, presente en un 82.50% de las secuencias analizadas, mientras que las formas 5F2-5 hasta 5F2-10 son las menos frecuentes, al estar presentes cada una de ellas en sólo un 1.03% de las secuencias. La forma mayoritaria del motivo 9A7 es la 9A7-1, con un 56.74% de representación entre las secuencias; en 9G4 es la 9G4-1 (82.48%) y en 3H8 es la 3H8-0 (96.91%).

En el resto de las especies, dentro de los motivos de células B podemos encontrar entre 1 y 4 formas antigenicas, con una representación entre un 100% y un 10% entre las secuencias analizadas.

En la figura 34, podemos ver representado un ejemplo de distribución de los diferentes motivos de reconocimiento por células B dentro de la estructura 3D del modelo 1CQA.

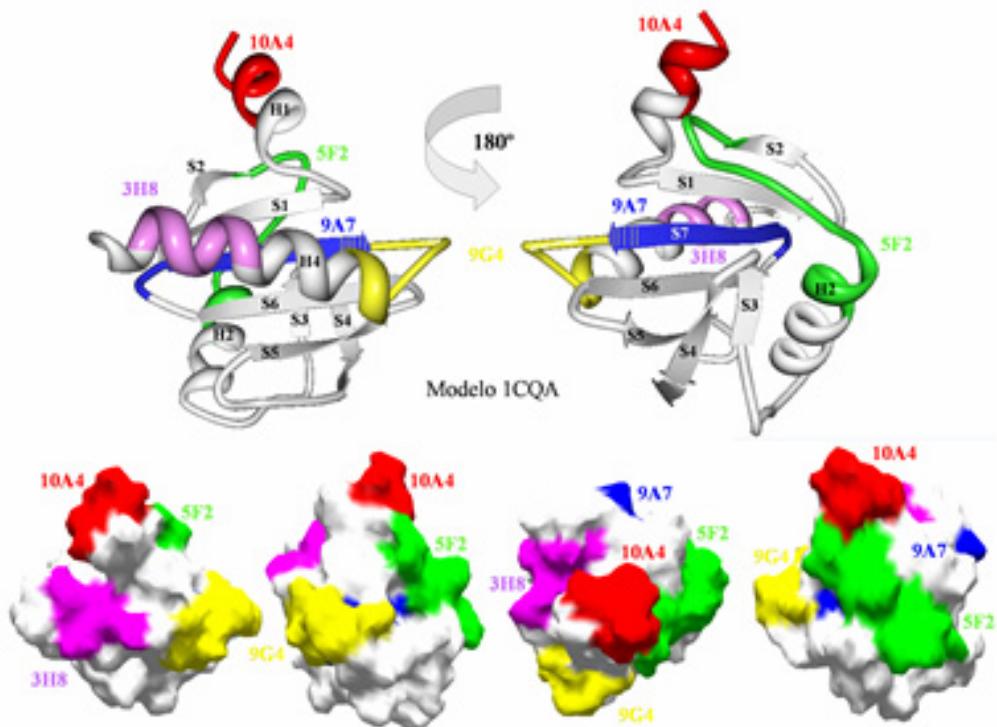


Figura 34. Ejemplo de distribución de los epitopos inmunodominantes de reconocimiento por células B. Estas regiones se resaltan en diferentes colores: 10A4 en rojo, 5F2 en verde, 9A7 en azul, 9G4 en amarillo y 3H8 en violeta. Parte superior: modelo de cintas. Parte inferior: vistas a distintos ángulos del modelo de superficies.

4.4.3. Análisis de las regiones de anclaje para los alelos de MHC clase II (Complejo Principal de Histocompatibilidad, Clase II). Receptores de células T que median en la alergenicidad cruzada.

Se ha demostrado que la alergenicidad cruzada, y la modulación de la respuesta de sensibilización alérgica es altamente dependiente del reconocimiento de epitopos conservados en los alérgenos por parte de células T del sistema inmunitario humano. Por ello es relevante conocer la posible presencia y variabilidad de estos epitopos en las secuencias analizadas en este trabajo. Para determinar esos epitopos se ha seguido un método de trabajo similar al descrito por Burastero *et al.* (2004), utilizando el programa T-EPIPOPE (Singh & Raghava 2001) y llevando a cabo la predicción y análisis de las regiones de unión a los alelos más comunes del HLA-DR (antígeno leucocitario humano, tipo DR) de una secuencia antigénica, que cubren una gran proporción de los péptidos que se unen al HLA humano de clase II. Para este estudio se seleccionaron los alelos HLA-DR más frecuentes en la población caucásica DRB1*0101 (DR1), DRB1*0301(DR3), DRB1*0401 (DR4), DRB1*0701 (DR7), DRB1*0801(DR8), DRB1*1101 (DR5) y DRB1*1501 (DR2). El algoritmo T-EPIPOPE predice nonapéptidos de unión a dichos alelos.

Según se aprecia en la Tabla 35, en la mayoría de las profilinas analizadas se repiten una serie de motivos de reconocimiento de receptores del HLA-DR clase II con una frecuencia mayor del 50%. Algunos de ellos están presentes en todas las especies (L70 y M76), mientras que otros sólo están presentes en 3/4 de las especies analizadas (V29, I86, I95 y F106). Por otro lado, existen otros nonapéptidos que pertenecen específicamente a determinadas especies, como es el caso de F41 en *Betula pendula*, I53 en *Olea europaea*, F59 en *Zea mays* y F66 en *Phleum pratense*. La especie *Corylus avellana* es la única que no tiene un motivo propio, aunque uno de ellos (el W35) es específico, aunque compartido por ambas especies de la familia *Betulaceae*. En *Olea europaea* podemos ver que existen secuencias de profilinas que no poseen todos los motivos de unión a estos receptores, o poseen uno o varios motivos específicos de las secuencias

de profilinas (motivos minoritarios) (Fig. 11). A esto hay que añadir que también existe variabilidad en la secuencia aminoacídica.

Tabla 35. Comparación de los motivos de anclaje a HLA-DR (epitopos de células T) más frecuentes en las secuencias de profilinas de cada especie (frecuencia >50%).

<i>Olea europaea L.</i>	<i>Betula pendula</i>	<i>Corylus avellana</i>	<i>Phleum pratense</i>	<i>Zea mays</i>
V29	V28	V28	-	V26
-	W35	W35	-	-
-	F41	-	-	-
F45	F44	-	F42	F39
I53	-	-	-	-
-	-	-	-	F59
L68	-	-	M65	L65
-	-	-	F66	-
L70	L69	L69	V67	L67
M76	M75	M75	M73	M73
I86	-	-	I83	I83
I95	I94	I94	I92	-

En la Fig. 35 se aprecia la distribución de estos epitopos específicos (I53, F41, F66, F59) en un ejemplo de conformación tridimensional basada en el modelo 1CQA. Los epitopos se localizan en una región de la proteína (α -hélice H2, láminas β S3 y S4) y su accesibilidad al exterior es casi completa.

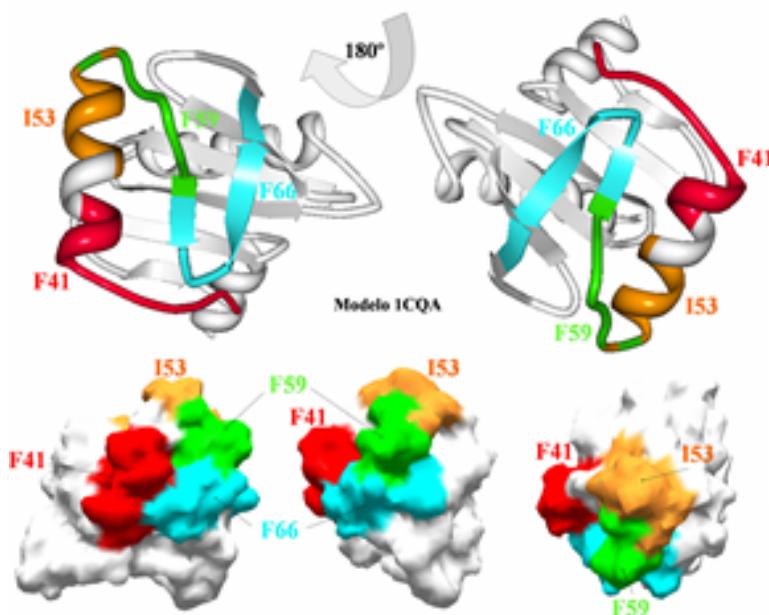


Figura 35. Ejemplo de representación 3D de los epitopos específicos de reconocimiento por células T a partir del modelo 1CQA. Parte superior: diagrama de cintas. Parte inferior: vistas a distintos ángulos del diagrama de superficies.

Una vez analizados y comparados los epítopos de células T entre las diferentes especies analizadas (Tabla 35), viéndose que existen claras diferencias en la presencia y distribución de muchos de los epitopos de células T de profilinas entre dichas especies, se ha procedido a realizar un análisis de éstos de forma comparativa en cada una de las diferentes variedades de olivo, en la cual se han mostrado las diferencias mas claras en los epítopos I53, I86 e I106 (Tabla 36).

Tabla 36.Comparación de los motivos de anclaje a HLA-DR (epitopos de células T) más frecuentes en las secuencias de profilinas de los diferentes cultivares de olivo. Aquellos epítopos que no están presentes en más del 50% de las secuencias de cada una de las variedades se señalan con una X.

Variedades	V29	F45	I53	L68	L70	M76	I86	I95	I106
Acebuché								X	
Arbequina								X	
Bella de España			X						
Blanqueta			X						
Cornicabra									
Empeltre									
Farga									
Frantoio									
Galega									
Hojiblanca									
Leccino									
Lechin de Granada						X			
Lechin de Sevilla							X		
Loaime									
Lucio									
Manzanilla de Sevilla									
Morrut							X		
Picual	X		X					X	
Picudo								X	
Sevillanca								X	
Sourani								X	
Verdial de Huévar									
Verdial de Vélez-Málaga							X		
Villalonga									

La figura 36 muestra un ejemplo en el cual, se han comparado dos variedades (Picual vs. Loaime) que difieren en 3 de los 9 epitopos de reconocimiento por células T (V29, I53 y I106). Esta comparación es una de las que difiere más en el número de epitopos de entre las variedades de olivo analizadas. Con todo esto, además de las diferencias existentes entre variedades que poseen motivos minoritarios (frecuencia < 50%) (Fig. 12) pueden diferenciar aún más algunas moléculas de profilinas de unas variedades con respecto a otras (datos no mostrados).

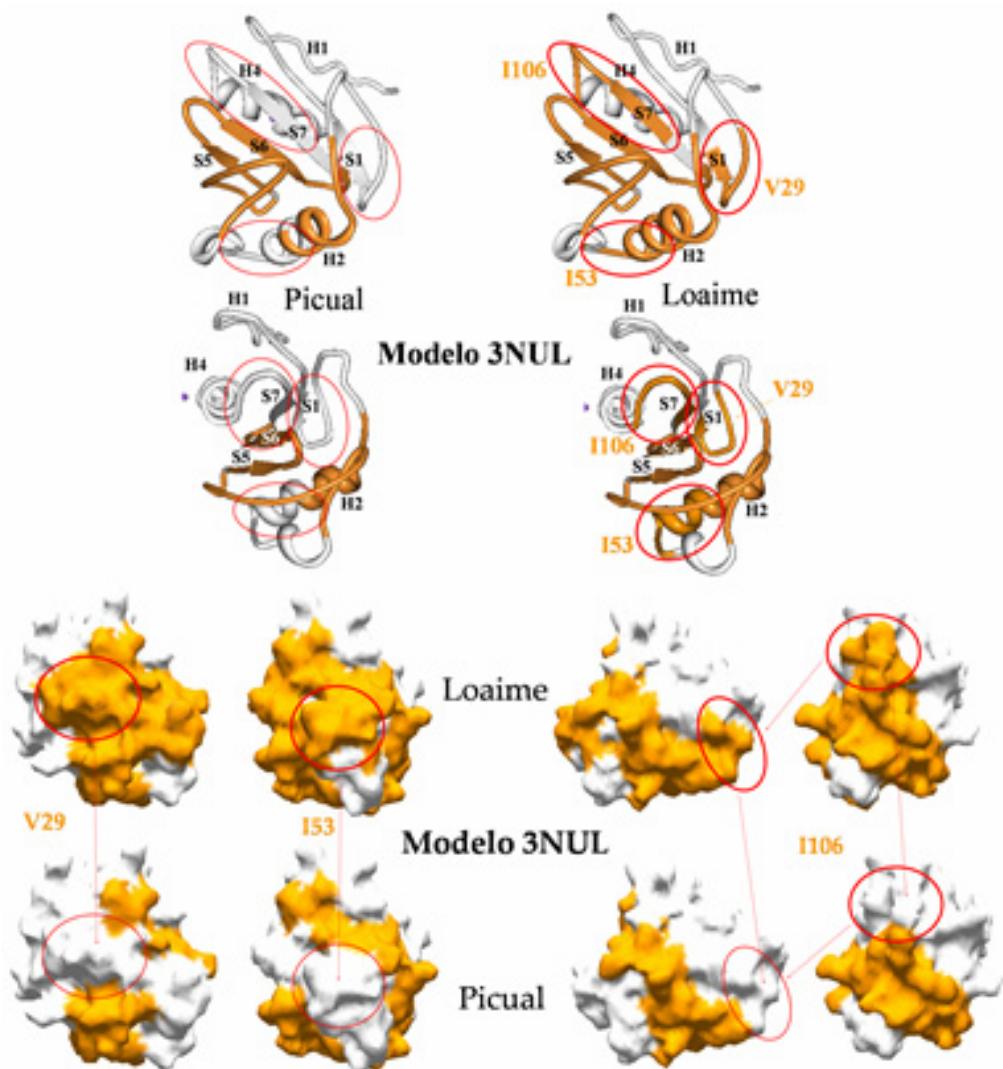


Figura 36. Ejemplo de representación 3D de los epitopos de reconocimiento por células T en las profilinas de dos cultivares de olivo (Picual y Loaime). El modelo usado para la representación corresponde al 3NUL de *Arabidopsis thaliana*. Parte superior: diagrama de cintas. Parte inferior: vistas en distintos ángulos del diagrama de superficies. Tanto los epitopos presentes en Loaime y ausentes en Picual se representan con un círculo rojo.

Puesto que se han detectado claras diferencias en la presencia y distribución de epitopos de células T de profilinas entre especies, se ha procedido a realizar un análisis de la localización 3D de éstos de forma comparativa en cada una de las familias analizadas. Cuando se compara la localización de los epitopos correspondientes en las especies *Betula pendula* y *Phleum pratense*, se observa que aunque la estructura 3D es prácticamente idéntica en estas dos especies, el epitopo F41 está sólo presente en la

primera especie, y no en la segunda. (Fig. 37). Dicho epitopo se encuentra en la α -hélice H2 de la estructura 3D.

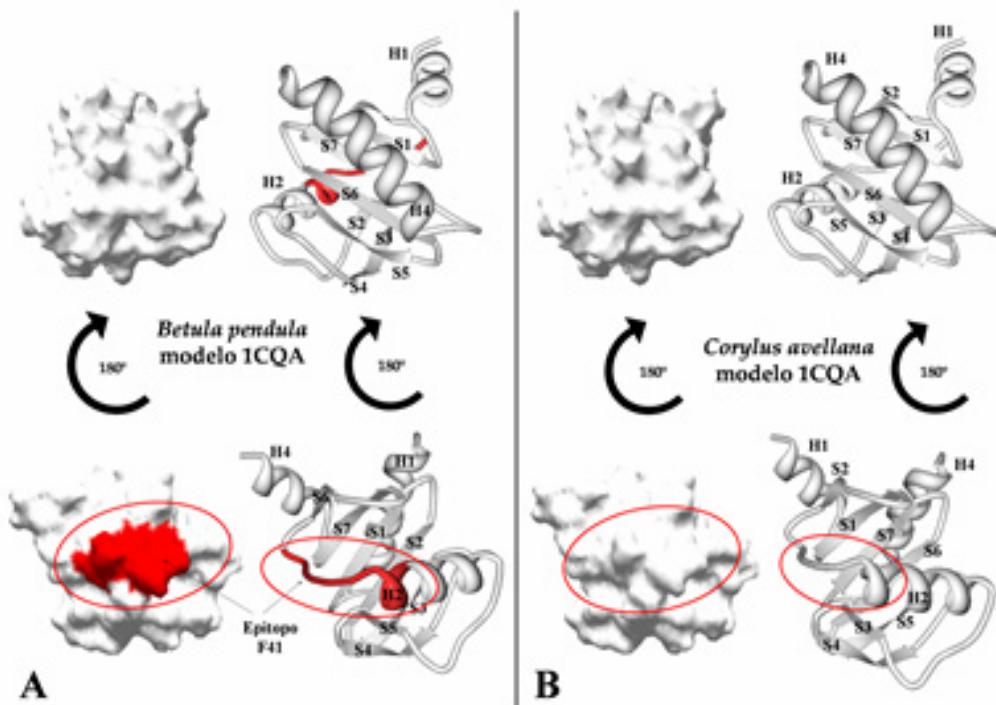


Figura 37. Representación 3D de un epitopo de reconocimiento por células T no compartido entre profilinas de dos de las especies de la familia *Betulaceae* (*Betula pendula* y *Corylus avellana*). El modelo usado para la representación corresponde al alérgeno Bet v 2 de *Betula pendula*. En rojo y rodeado con un círculo se muestra el epítopo F41 presente en *Betula pendula* (A) y no en *Corylus avellana* (B).

Igualmente la comparación de los epitopos de las especies *Phleum pratense* y *Zea mays* ha llevado a la caracterización de dos epitopos específicos para cada una de las especies. Esto quiere decir que en la especie *Phleum pratense*, los epitopos F66 (α -hélice H2) y I92 (lámina β S6) no se encuentran en *Zea mays*, mientras que los epitopos V26 (lámina β S1-giro β) y F59 (solo parcialmente en la α -hélice H2) de *Zea mays* no se encuentran en *Phleum pratense* (Fig. 38).

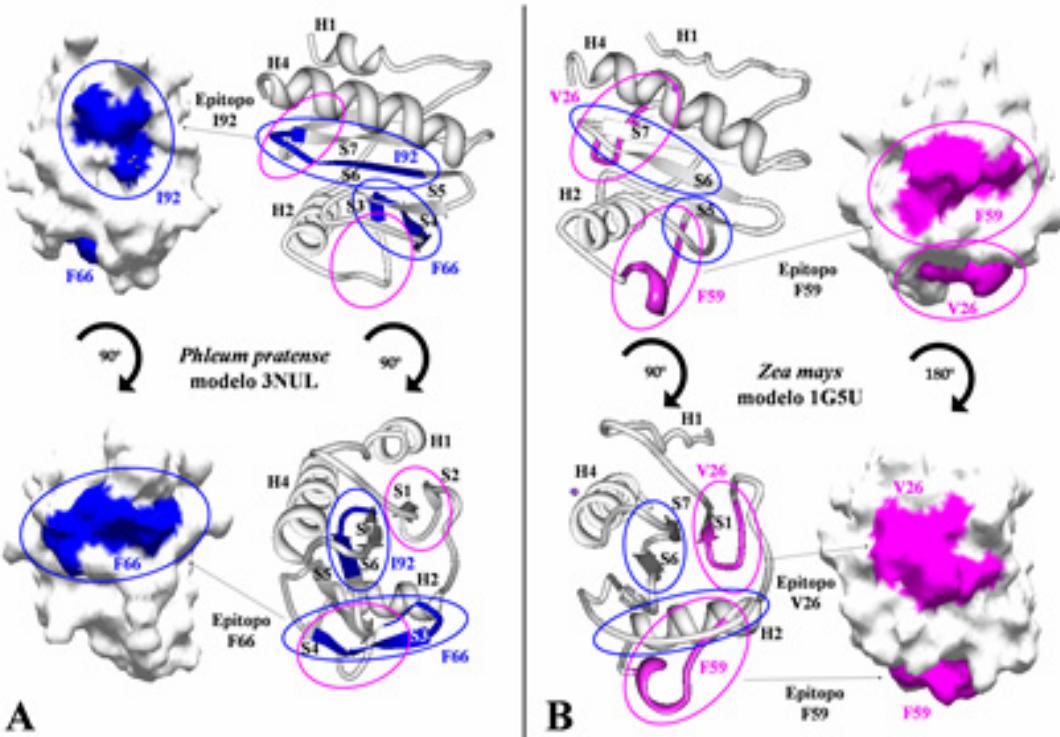


Figura 38. Representación 3D de dos epitopos de reconocimiento por células T no compartido entre entre profilinas de dos de las especies de la familia Poaceae (*Phleum pratense* y *Zea mays*). Representación tridimensional en modelo de cintas y modelo de superficie de la estructura de profilinas, mostrando los distintos epitopos específicos de reconocimiento por células T en ambas especies. En ambos tipos de modelos se muestran en azul, los epitopos específicos de *Phleum pratense* (F66 y I92) (A) que no se encuentran en *Zea mays* (B). En color violeta se muestran los epitopos específicos de *Zea mays* (V26 y F59) (B) que no se encuentran en *Phleum pratense* (A). Los modelos utilizados para representar las profilinas son el de *Arabidopsis thaliana* (3NUL) para *Phleum pratense* y el de *Hevea brasiliensis* (1G5U) para *Zea mays*.

4.4.4. Predicción de la localización epitópica en los modelos 3D y construcción de epitopos conformacionales de profilinas

Los epitopos descritos en los apartados anteriores corresponden a secuencias aminoacídicas lineales. En este apartado se analiza la presencia de epitopos conformacionales en las secuencias, que resultan como consecuencia del plegamiento 3D de las proteínas. Para determinar esos epitopos se ha seguido un método de trabajo similar al descrito por Fraczkiewicz & Braun (1996, 1998), utilizando el programa GETAREA V1.1 http://pauli.utmb.edu/cgi-bin/get_a_form.tcl/ como se describe ampliamente en el apartado correspondiente de material y métodos. La predicción

determina zonas tridimensionales que podrían ser consideradas epitopos. Esos epitopos conformacionales pueden o no coincidir, o coincidir parcial o totalmente con los epitopos lineales de reconocimiento por células B o por células T que se han descrito en los apartados anteriores. El número de epitopos predichos por la herramienta bioinformática es altamente dependiente del modelo 3D utilizado para la predicción, ya que se basa en la estructura cristalográfica de la proteína depositada en la base de datos PDB. De este análisis resultaron 11, 9 y 10 epitopos conformacionales para los modelos 1G5U (*Hevea brasiliensis*), 1CQA (*Betula pendula*) y 3NUL (*Arabidopsis thaliana*) de la base de datos PDB (Tablas 37).

Tabla 37. Predicción de epitopos conformacionales en los tres modelos de profilinas de plantas de la base de datos PDB (<http://www.pdb.org>). En negrita se encuentran los residuos que componen el centro de cada epitopo.

Epitopos conformacionales de Hev b 8 (*Hevea brasiliensis*, 1G5U)

Residuo central	Secuencia	Nº de residuos
1 S2	2 SWQTYVDDH ₁₀ Q ₃₅ Y ₁₂₅ I ₂₉ QGL ₁₃₁	14
2 R19	8 DDH ₃₀ 13 CDIDGHRLT ₂₁ 37 SS ₃₈ 107 DEPLT ₁₁₁	19
3 S37 + S38	Q ₄ D ₈ 19 RLT ₂₁ V ₃₂ 35 QSSSFPQ ₄₁ G ₆₉ D ₁₀₇	15
4 Q41	30 GSV ₃₂ 35 QSSSFPQFKSD ₄₅ H ₆₆ 69 GT ₇₀	17
5 S44 + D45	28 HDGSV ₃₂ 49 PQFKSD ₄₅ 68 AAVMK ₅₂ T ₆₃ H ₆₆ G ₆₉	19
6 T63	D ₄₅ 48 AA ₄₉ K ₅₂ 58 GSLAP T ₆₃ H ₆₆ 69 GTKYMV ₇₄	17
7 Q76	57 PG ₅₈ A ₆₁ 73 MVI Q GE ₆₄ PGA ₆₅ 84 RGK ₆₆ P ₁₁₂ N ₁₁₆ E ₁₂₀	18
8 P79	51 MK ₅₂ 55 DEPGS ₅₉ 74 VIQGE ₆₁ 82 R ₆₄ K ₆₆ E ₁₂₀	18
9 E108	17 GHRLT ₂₁ 86 KKGS ₈₉ 107 DEPLTP ₁₁₂	15
10 M117	H ₁₀ 13 CDIDGH ₁₈ R ₈₄ 111 TPC ₁₁₃ 116 NM ₁₁₇ 120 ER ₁₂₁ 124 DY ₁₂₅	17
11 D128	Y ₆ 9 KTGQ ₉₉ 120 ER ₁₂₁ 124 DYLL D QGL ₁₃₁	15

Epitopos conformacionales de Bet v 2 (*Betula verrucosa*, 1CQA)

Residuo central	Secuencia	Nº de residuos
1 T5	2 SWQTYVDEHLM ₁₂ 37 QSS ₃₉	14
2 S40	Q ₄ 8 DELIM ₁₂ A ₂₃ 37 QSSSFPQ ₄₃ I ₇₂ K ₆₉ E ₁₀₉	16
3 Q43	32 GSV ₃₄ 37 QSSSFPQFKPQ ₄₇ 68 HLGGI ₇₂	19
4 P46	30 HDGSV ₃₄ 42 PQFKPQ ₄₇ T ₅₀ 53 MK ₅₄ 68 HLGG ₇₁	19
5 M75	63 APT ₆₅ H ₆₈ 72 IKYMVIQ ₇₈ 86 RGKKC ₉₀	16
6 Q78	A ₆₃ 75 MVI Q GE ₈₀ 82 GAVIRGK ₈₈ P ₁₁₄ N ₁₁₈	16
7 A81	53 MK ₅₄ 57 EEEGH ₆₃ 77 IQGEAGA ₆₅ R ₆₆ K ₆₈	16
8 G90	72 IKYM ₇₃ I ₇₇ 88 KKGSC ₉₂ 109 EE ₁₁₀ V ₁₁₂ P ₁₁₄	13
9 P111	A ₂₃ S ₉₁ 109 EEPVT ₁₁₆ PGE ₁₁₆	10

Epítitos conformacionales de Ara t 8 (*Arabidopsis thaliana*, 3NUL)

Residuo central	Secuencia	Nº de residuos
1 G17	₁₅ VEGNH ₁₉ DEPMT ₃₁ Q ₃₄	11
2 A37+K38	Q ₃ D ₅ H ₁₉ T ₂₁ V ₃₂ ₃₆ SAKFPQ ₄₁ C ₄₆ F ₄₈ D ₅₀	14
3 Q41	G ₃₀ V ₃₂ ₃₆ SAKFPQLKPQ ₄₅ ₄₆ FLGGE ₇₀	17
4 P44+Q45	₂₈ QDG ₃₀ ₄₅ PQ ₄₁ ₄₅ KPQ ₄₅ D ₄₈ ₅₁ KK ₅₂ F ₅₉ ₆₆ FLGGE ₇₀	17
5 T63	₃₆ GFLAP ₄₁ T ₄₃ F ₄₆ ₄₉ GEK I ₇₅ K ₉₆	12
6 Q76	₃₇ PG ₃₈ A ₆₁ ₇₅ IQGEQ ₇₉ K ₉₆ ₁₁₂ CG ₁₁₃ N ₁₁₆	12
7 Q79	₅₁ KK ₅₂ ₅₃ EEKPGF ₅₉ ₇₉ IQG ₇₇ ₇₉ QGA ₈₁	14
8 G88	₇₉ EK ₈₁ I ₈₅ ₈₆ KK ₈₇ ₈₈ ₁₀₇ DE ₁₀₈ ₁₁₁ TG ₁₁₂	10
9 E108+P109	₃₆ VEGNHLT ₂₃ ₈₆ KKG ₉₈ ₁₀₇ DEPMTGGQ ₁₁₄	18
10 E128+E130	W ₃ Q ₂₈ W ₃₃ ₁₂₉ ER ₁₂₃ ₁₂₄ DYLIESEI ₁₃₁ ₁₃₂ NQ ₉₉	15

Los epititos conformacionales descritos poseen una amplia distribución a lo largo de la superficie de las moléculas de profilinas (Fig. 39)

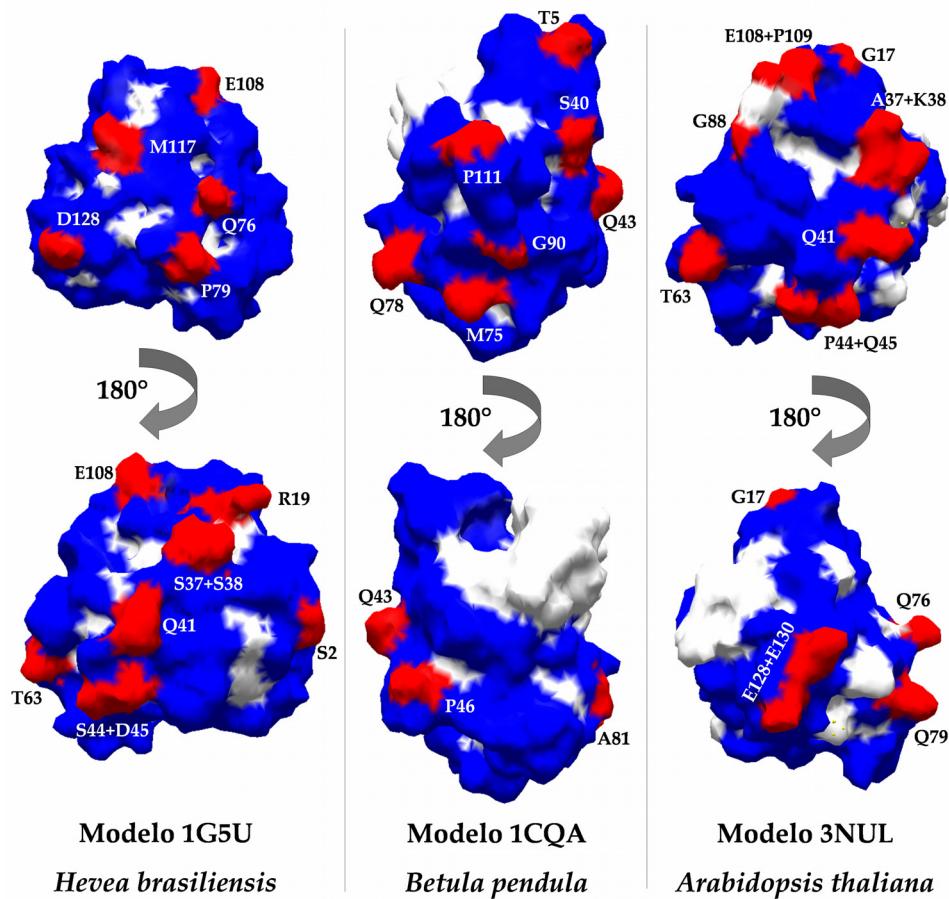


Figura 39. Localización 3D de los epititos conformacionales descritos para cada uno de los tres modelos de profilinas (1G5U, 1CQA y 3NUL). En rojo se presenta el aminoácido central de cada epitopo y en azul los aminoácidos que componen cada uno de los epitopos.

Una vez determinados los posibles epitopos conformacionales para cada modelo 3D de profilinas, se ha realizado un análisis detallado de la microheterogeneidad presente en dichos epitopos conformacionales, así como de su carácter coincidente (parcial o totalmente) con epitopos lineales de reconocimiento por células B y T (Tablas 38).

Tabla 38. Análisis detallado de los epitopos conformacionales en las diferentes especies analizadas: *Olea europaea* (A), *Phleum pratense* (B), *Corylus avellana* (C), *Betula pendula* (D) y *Zea mays* (E). Cada uno de los epitopos conformacionales coincidentes parcial o totalmente con epitopos lineales de reconocimiento por células B (ver Tabla 32 y 33), se representa con el siguiente código de colores: 10A4 rojo, 5F2 verde, 9A7 azul, 9G4 amarilla y 3H8 rosa. Los epitopos conformacionales coincidentes total o parcialmente con epitopos lineales de reconocimiento por células T (ver Tabla 36) se representan por bandas sombreadas sobre el epitopo conformacional.

Especie analizada	Alérgeno comparado	Nº de Epítopo	Residuo central	Secuencia	Nº de residuos conservados	Idénticos o variables
1G5U	1	S2		<u>SWQTYVDDH</u> ₁₀ Q ₃₅ Y ₁₂₅ 129 QGL ₁₃₁	14	13 1
	2	R19		<u>DDH</u> ₁₀ <u>CDIDGHLRT</u> ₂₁ SS ₃₈ 107 DEPLT ₁₁₁	19	13 6
	3	S37 + S38		<u>Q</u> ₄ D ₈ 19 RLT ₂₁ V ₃₂ 35 QSSFPQ ₄₁ G ₆₉ D ₁₀₇	15	11 4
	4	Q41		<u>GSV</u> ₃₂ 35 QSSFPQFKSD ₄₅ H ₆₆ GT ₇₀	17	13 4
	5	S44 + D45		<u>HDGSV</u> ₃₂ 40 PQFKSD ₄₅ 48 AAVMK ₅₂ T ₆₃ H ₆₆ G ₆₉	19	14 5
	6	T63		D ₄₅ 48 A ₄₉ K ₅₂ 56 GSLAP ₆₃ H ₆₆ 69 GTKYMV ₇₄	17	12 5
	7	Q76		<u>PG</u> ₅₈ A ₆₁ 73 MVIQGEPGA ₈₁ 84 RGK ₈₆ P ₁₁₂ N ₁₁₆ E ₁₂₀	18	18 0
	8	P79		MK ₅₂ 53 DEPGS ₅₉ 74 VIQGEPGA ₈₁ R ₈₄ K ₉₆ E ₁₂₀	18	13 6
	9	E108		<u>GHLRLT</u> ₂₁ 86 KKGS ₈₉ 107 DEPLTP ₁₁₂	15	12 3
	10	M117		H ₁₀ 13 CDIDGH ₁₈ R ₈₄ 111 TPG ₁₁₃ 116 NM ₁₁₇ 120 ER ₁₂₁ 124 DY ₁₂₅	17	16 1
	11	D128		Y ₆ 96 KTGQ ₉₉ 120 ER ₁₂₁ 124 DYLLDQGL ₁₃₁	15	14 1
Olea europaea 1CQA	1	T5		<u>SWQTYVDEHLM</u> ₁₂ 37 QS ₃₉	14	11 3
	2	S40		<u>DEHLM</u> ₁₂ A ₂₃ 37 QSSFPQ ₄₃ I ₅₂ K ₈₉ E ₁₀₉	16	11 5
	3	Q43		<u>GSV</u> ₃₄ 37 QSSFPQFKPQ ₄₇ 68 HLGGI ₇₂	19	15 4
	4	P46		<u>HDGSV</u> ₃₄ 42 PQFKPQ ₄₇ T ₅₀ 53 MK ₅₄ 68 HLGG ₇₁	19	16 3
	5	M75		A ₆₅ H ₆₈ 72 KYMVIQ ₇₈ 86 RGKKG ₉₀	16	15 1
	6	Q78		A ₆₃ 75 MVIQGE ₈₀ 82 GAVIRGK ₈₈ P ₁₁₄ N ₁₁₈	16	16 0
	7	A81		MK ₅₄ 57 EEEGH ₆₁ 77 IQGEAGA ₈₃ R ₈₆ K ₉₈	16	13 3
	8	G90		IKYM ₇₅ I ₇₇ 88 KK ₈₉ 91 SG ₉₂ 109 EE ₁₁₀ V ₁₁₂ P ₁₁₄	13	12 1
	9	P111		A ₂₃ S ₉₁ 109 EEPVTPGE ₁₁₆	10	8 2
3NUL	1	G17		VEGNH ₁₉ 107 DEPM ₁₁₁ Q ₁₁₄	11	10 1
	2	A37+K38		<u>Q</u> ₄ D ₈ H ₁₉ T ₂₁ V ₃₂ 36 SAKFPQ ₄₁ G ₆₈ E ₇₀ D ₁₀₇	14	10 4
	3	E41		G ₃₀ V ₃₂ 36 SAKFPQLKPQ ₄₅ 66 FLGGE ₇₀	17	11 6
	4	P44+Q45		<u>QDG</u> ₃₀ 40 PQ ₄₁ 43 KPQ ₄₅ D ₄₈ 51 KK ₅₂ F ₅₉ 66 FLGGE ₇₀	17	10 7
	5	T63		GFLAPT ₆₃ F ₆₆ 69 GEK I ₇₃ K ₈₆	12	10 2
	6	Q76		<u>PG</u> ₅₈ A ₆₁ 73 IQGEQ ₇₅ K ₈₆ 112 GG ₁₁₃ N ₁₁₆	12	11 1
	7	Q79		KK ₅₂ 55 EEPGF ₅₉ 75 IQG ₇₇ 79 QGA ₈₁	14	10 4
	8	G88		EK ₇₁ I ₇₅ 86 KK ₈₇ G ₈₈ 107 DE ₁₀₈ 111 TC ₁₁₂	10	9 1
	9	E108+P10		VEGNHLT ₂₁ 86 KKG ₈₈ 107 DEPM ₁₁₄	18	16 2
	10	E128+E13		W ₃ Q ₂₈ W ₃₃ 98 NO ₉₉ 120 ER ₁₂₁ 124 DYLISEL ₁₃₁	15	10 5

A

Especie analizada	Alérgeno comparado	Nº de Epítopo	Residuo central	Secuencia	Nº de residuos	Idénticos o conservados	variables
1G5U	1	S2		<u>2SWQTYVYDDH</u> ₁₀ Q ₃₅ Y ₁₂₅ 129 QGL ₁₃₁	14	13	1
	2	R19		<u>8DDH</u> ₁₀ 13 CDIDGHRLT ₂₁ 37 SS ₃₈ 107 DEPLT ₁₁₁	19	11	8
	3	S37 + S38		Q ₄ D ₈ 19 RLT ₂₁ V ₃₂ 35 QSSFPQ ₄₁ G ₆₉ D ₁₀₇	15	10	5
	4	Q41		<u>30GSV</u> ₃₂ 35 QSSFPQ <u>F</u> KSD ₄₅ H ₆₆ 69 GT ₇₀	17	9	8
	5	S44 + D45		<u>28HDGSV</u> ₃₂ 40 PQFKSD ₄₅ 48 AAVM K ₅₂ T ₆₃ H ₆₆ G ₆₉	19	12	7
	6	T63		D ₄₅ 48 AA ₄₉ K ₅₂ 58 GSLAPT ₆₃ H ₆₆ 69 GTKYMV ₇₄	17	10	7
	7	Q76		<u>57PG</u> ₅₈ A ₆₁ 73 MVIQGEPGA ₈₁ 84 RGK ₈₆ P ₁₁₂ N ₁₁₆ E ₁₂₀	18	18	0
	8	P79		<u>51MK</u> ₅₂ 55 DEPGS ₅₉ 74 VIQGEPGA ₈₁ R ₈₄ K ₉₆ E ₁₂₀	18	17	1
	9	E108		<u>17GHR</u> ₂₁ 86 KKGS ₈₉ 107 DEPLTP ₁₁₂	15	11	4
	10	M117		H ₁₀ 13 CDIDGH ₁₈ R ₈₄ 111 TPG ₁₁₃ 116 NM ₁₁₇ 120 ER ₁₂₁ 124 DY ₁₂₅	17	15	2
<i>Phleum pratense</i>	11	D128		Y ₆ 96 KTQG ₉₉ 120 ER ₁₂₁ 124 DYLLDQGL ₁₃₁	15	14	1

B

Especie analizada	Alérgeno comparado	Nº de Epítopo	Residuo central	Secuencia	Nº de residuos	Idénticos o conservados	variables
3NUL	1	G17		<u>15VEGNH</u> ₁₉ 107 DEPMT ₁₁₁ Q ₁₁₄	11	9	2
	2	A37+K38		Q ₄ D ₈ H ₁₉ T ₂₁ V ₃₂ 36 SAKFPQ ₄₁ G ₆₈ E ₇₀ D ₁₀₇	14	10	4
	3	E41		G ₃₀ V ₃₂ 36 SAKFPQ <u>I</u> KPQ ₄₃ 66 FLGGE ₇₀	17	10	7
	4	P44+Q45		<u>28QDG</u> ₃₀ 40 PQ ₄₁ 43 KPQ ₄₅ D ₄₈ 51 KK ₅₂ F ₅₉ 66 FLGGE ₇₀	17	8	9
	5	T63		<u>58GFL</u> ₆₃ F ₆₆ 69 GEK ₇₁ I ₇₅ K ₈₆	12	9	3
	6	Q76		<u>57PG</u> ₅₈ A ₆₁ 75 IQGEQ ₇₉ K ₈₆ 112 CG ₁₁₃ N ₁₁₆	12	10	2
	7	Q79		<u>51KK</u> ₅₂ 55 EEPGF ₅₉ 75 IQG ₇₇ 75 QGA ₈₁	14	10	4
	8	G88		<u>70EK</u> ₇₁ I ₇₅ 86 KK ₈₇ G ₈₈ 107 DE ₁₀₈ 111 TG ₁₁₂	10	8	2
	9	E108+P109		<u>15VEGNH</u> ₂₁ 86 KKG ₈₈ 107 DEPMTGGQ ₁₁₄	18	14	4
	10	E128+E130		Y ₃ Q ₂₈ W ₃₃ 98 NQ ₉₉ 120 ER ₁₂₁ 124 DYLIESEL ₁₃₁	15	7	8
1CQA	1	T5		<u>2SWQTYVDEHLM</u> ₁₂ 37 QSS ₃₉	14	14	0
	2	S40		Q ₄ 4 DEHLM ₁₂ A ₂₃ 37 QSSFPQ ₄₃ I ₇₂ K ₈₉ E ₁₀₉	17	16	1
	3	Q43		<u>32GSV</u> ₃₄ 37 QSSFPQFKPQ ₄₇ 68 HLGGI ₇₂	19	0	0
	4	P46		<u>30HDGSV</u> ₃₄ 42 PQFKPQ ₄₇ T ₅₀ 53 MK ₅₄ 68 HLGG ₇₁	19	17	2
	5	M75		<u>63APT</u> ₆₅ H ₆₈ 72 KYMVIQ ₇₈ 86 RGKKG ₉₀	16	15	1
	6	Q78		A ₆₃ 75 MVIQGE ₈₀ 82 GAVIRKG ₈₈ P ₁₁₄ N ₁₁₈	16	16	0
	7	A81		<u>53MK</u> ₅₄ 57 EEEGH ₆₁ 77 IQGEAGA ₈₃ R ₈₆ K ₉₈	16	14	2
	8	G90		<u>72I</u> ₇₅ KYM ₇₇ I ₇₈ 88 KK ₈₉ 91 SG ₉₂ 109 EE ₁₁₀ V ₁₁₂ P ₁₁₄	13	12	1
	9	P111		A ₂₃ S ₉₁ 109 EEPVTPGE ₁₁₆	10	9	1
	10						
3NUL	1	G17		<u>15VEGNH</u> ₁₉ 107 DEPMT ₁₁₁ Q ₁₁₄	11	11	0
	2	A37+K38		Q ₄ D ₈ H ₁₉ T ₂₁ V ₃₂ 36 SAKFPQ ₄₁ G ₆₈ E ₇₀ D ₁₀₇	14	11	3
	3	E41		G ₃₀ V ₃₂ 36 SAKFPQLKPQ ₄₅ 66 FLCGE ₇₀	17	14	3
	4	P44+Q45		<u>28QDG</u> ₃₀ 40 PQ ₄₁ 43 KPQ ₄₅ D ₄₈ 51 KK ₅₂ F ₅₉ 66 FLCGE ₇₀	17	12	5
	5	T63		<u>58GFL</u> ₆₃ F ₆₆ 69 GEK I ₇₅ K ₈₆	12	10	2
	6	Q76		<u>57PG</u> ₅₈ A ₆₁ 75 IQGEQ ₇₉ K ₈₆ 112 CG ₁₁₃ N ₁₁₆	12	10	2
	7	Q79		<u>51KK</u> ₅₂ 55 EEPGF ₅₉ 75 IQG ₇₇ 75 QGA ₈₁	14	10	4
	8	G88		<u>70EK</u> ₇₁ I ₇₅ 86 KK ₈₇ G ₈₈ 107 DE ₁₀₈ 111 TG ₁₁₂	10	8	2
	9	E108+P109		<u>15VEGNH</u> ₂₁ 86 KKG ₈₈ 107 DEPMTGGQ ₁₁₄	18	17	1
	10	E128+E130		W ₃ Q ₂₈ W ₃₃ 98 NQ ₉₉ 120 ER ₁₂₁ 124 DYLIESEL ₁₃₁	15	11	4

C

Especie analizada	Alérgeno comparado	Nº de Epítopo	Residuo central	Secuencia	Nº de residuos	Idénticos o conservados	variables
<i>Betula pendula</i> 1CQA		1	T5	<u>2SWQTYVDEHLM</u> ₁₂ <u>37</u> QSS ₃₉	14	14	0
		2	S40	<u>Q</u> ₄ <u>8</u> DEHLM ₁₂ <u>A</u> ₂₅ <u>37</u> QSSSFPO ₄₃ I ₇₂ K ₈₉ E ₁₀₉	17	16	1
		3	Q43	<u>32</u> GSV ₃₄ <u>37</u> QSSSFPOFKPQ ₄₇ <u>68</u> HLGGI ₇₂	19	19	0
		4	P46	<u>30</u> HDGSV ₃₄ <u>42</u> PQFKPQ ₄₇ T ₅₀ <u>53</u> MK ₅₄ <u>68</u> HLGG ₇₁	19	19	0
		5	M75	<u>63</u> APT ₆₅ H ₆₈ <u>72</u> IKYMV ₇₈ <u>86</u> RGKKG ₉₀	16	16	0
		6	Q78	<u>A</u> ₆₃ <u>75</u> MVIQGE ₈₀ <u>82</u> GAVIRGK ₈₈ P ₁₁₄ N ₁₁₈	16	16	0
		7	A81	<u>53</u> MK ₅₄ <u>57</u> EEEGH ₆₁ <u>77</u> IQGEAGA ₈₃ R ₈₆ K ₉₈	16	15	1
		8	G90	<u>72</u> IKY ₇₅ I ₇₇ <u>88</u> KK ₈₉ <u>91</u> SG ₉₂ <u>109</u> EE ₁₁₀ V ₁₁₂ P ₁₁₄	13	13	0
		9	P111	<u>A</u> ₂₃ <u>S</u> ₉₁ <u>109</u> EEPVT ₁₁₆ PG ₁₁₆	10	8	2

D

Especie analizada	Alérgeno comparado	Nº de Epítopo	Residuo central	Secuencia	Nº de residuos	Idénticos o conservados	variables
<i>Zea mays</i> 1G5U		1	S2	<u>2SWQTYVDDH</u> ₁₀ Q ₃₅ Y ₁₂₅ <u>129</u> QGL ₁₃₁	14	13	1
		2	R19	<u>8DDH</u> ₁₀ <u>13</u> CDIDGHR ₂₁ <u>37</u> SS ₃₈ <u>107</u> DEPLT ₁₁₁	19	13	6
		3	S37 + S38	<u>Q</u> ₄ <u>D</u> ₈ <u>19</u> RLT ₂₁ V ₃₂ <u>35</u> QSSFPQ ₄₁ G ₆₉ D ₁₀₇	15	10	5
		4	Q41	<u>30</u> GSV ₃₂ <u>35</u> QSSFPQFKSD ₄₃ H ₆₆ <u>69</u> GT ₇₀	17	8	9
		5	S44 + D45	<u>28</u> HDGSV ₃₂ <u>40</u> PQFKSD ₄₃ <u>48</u> A ₄₉ AVMK ₅₂ T ₆₃ H ₆₆ G ₆₉	19	11	8
		6	T63	<u>D</u> ₄₈ <u>49</u> AA ₄₉ K ₅₂ <u>58</u> GSLAP ₆₃ H ₆₆ <u>69</u> GTKYMV ₇₄	17	12	5
		7	Q76	<u>57</u> PG ₅₈ A ₆₁ <u>73</u> MVIQGEPGA ₈₁ <u>84</u> RGK ₈₆ P ₁₁₂ N ₁₁₆ E ₁₂₀	18	18	0
		8	P79	<u>51</u> MK ₅₂ <u>55</u> DEPG ₅₉ <u>74</u> VIQGEPGA ₈₁ R ₈₄ K ₉₆ E ₁₂₀	18	17	1
		9	E108	<u>17</u> GHRLT ₂₁ <u>86</u> KKGS ₈₉ <u>107</u> DEPLTP ₁₁₂	15	13	2
		10	M117	<u>H</u> ₁₀ <u>13</u> CDIDG ₁₈ R ₈₄ <u>111</u> TPG ₁₁₃ <u>116</u> NM ₁₁₇ <u>120</u> ER ₁₂₁ <u>124</u> DY ₁₂₅	17	14	3
		11	D128	<u>Y</u> ₆ <u>96</u> KTGQ ₉₉ <u>120</u> ER ₁₂₁ <u>124</u> DYLLDQGL ₁₃₁	15	14	1

E

Las Tablas 39 y 40 resumen la información detallada en la Tabla 38.

Tabla 39. Epitopos conformacionales compartidos de forma parcial o total con secuencias lineales de reconocimiento por células B para cada especie estudiada.

Modelos de profilinas	Epitopos de reconocimiento por células B conformacionales				
	Olea europaea L.	Betula pendula	Corylus avellana	Phleum pratense	Zea mays
Hev b 8	1 y 2	-	1	1, 2, 3 y 10	1, 2, 10 y 11
Bet v 2	1	1	-	-	-
Ara t 8	-	-	10	-	-

Tabla 40. Epitopos conformacionales compartidos parcial o totalmente con secuencias lineales de reconocimiento por receptores de células T para cada especie estudiada.

Modelos de profilinas	Epitopos de reconocimiento por células T conformacionales				
	Olea europaea L.	Betula pendula	Corylus avellana	Phleum pratense	Zea mays
Hev b 8	8	-	7 y 8	5, 7, 8 y 11	7 y 8
Bet v 2	5 y 7	5, 6 y 7	6 y 7	-	-
Ara t 8	5 y 7	-	5 y 7	5, 6 y 7	-

Como puede observarse en la Tabla 38 existen tres epitopos conformacionales no coincidentes ni de forma parcial ni total con epitopos lineales de reconocimiento por células B ó T (epitopos conformacionales número 1 en el modelo 3NUL de *Olea europaea*, *Phleum pratense* y *Corylus avellana*). El aminoácido central de este epitopo no coincidente es la glicina 17. Este residuo forma parte de la secuencia ampliamente conservada que constituye el *loop* característico de profilinas de plantas (Fig. 40). Aunque tanto este residuo como los residuos adyacentes estén muy conservados, sólo constituyen un epitopo conformacional en las secuencias y modelos indicados, y no en el resto de secuencias.

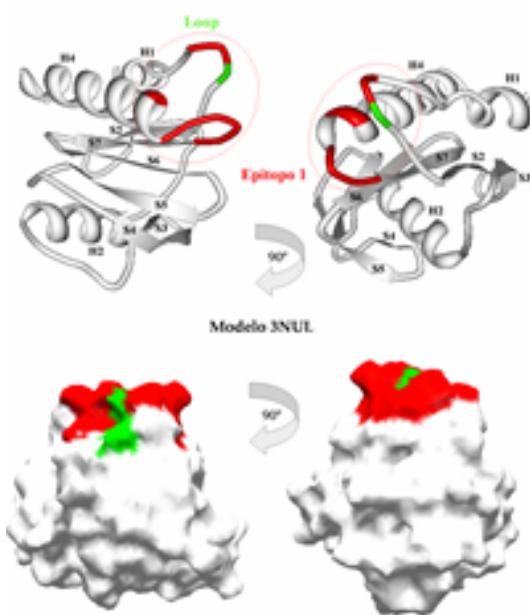


Figura 40. Representación 3D del epitopo conformacional 1 en el modelo 3D 3NUL. En rojo y verde se representan los aminoácidos que forman parte del epitopo conformacional. En verde se representan los aminoácidos que forman parte del *loop* característico de profilinas de plantas.

5. Caracterización preliminar de la expresión y la reactividad diferencial de las profilinas de *Olea europaea* y otras especies frente a diversos sueros anti-profilinas y establecer su localización celular.

5.1 Expresión de profilinas (Ole e 2) en el polen maduro de distintas variedades de olivo

El análisis mediante SDS-PAGE de extractos crudos obtenidos a partir de polen maduro de los 24 cultivares de olivo estudiados (ver tabla 4 de Materiales y Métodos), muestra los perfiles proteicos que aparecen en la Fig. 38. En dichos perfiles se aprecian bandas de distintas intensidades entre los que destacan dos formas de la proteína alergénica mayoritaria del polen del olivo (Ole e 1), de 18 y 20 kDa respectivamente. No se distinguen bandas claramente definidas en el intervalo entre 14-18 kDa, tamaño esperado para las profilinas del olivo.

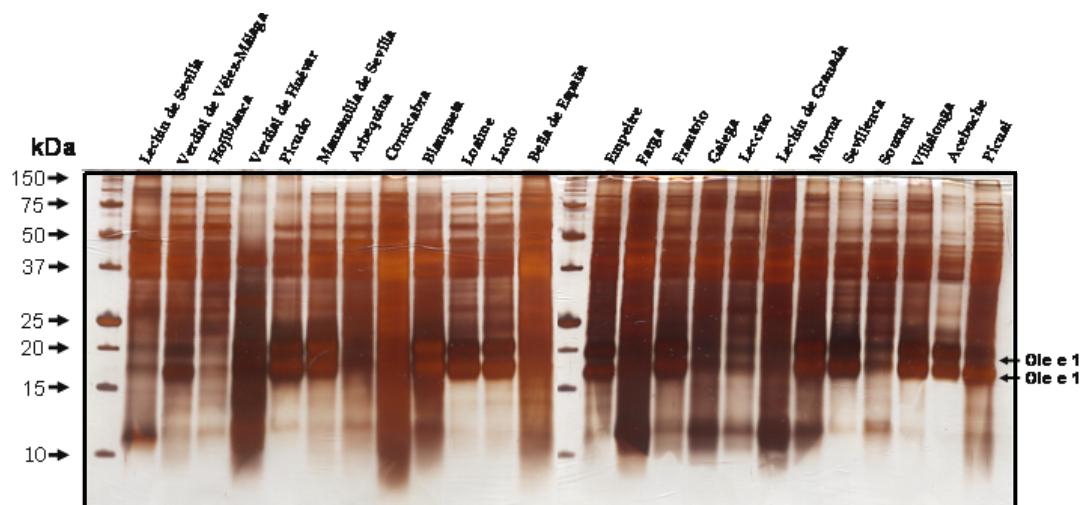


Figura 41. SDS PAGE al 12% de los extractos crudos de polen de 24 cultivares de olivo tras teñir con plata. 1 µgr de proteína total por calle.

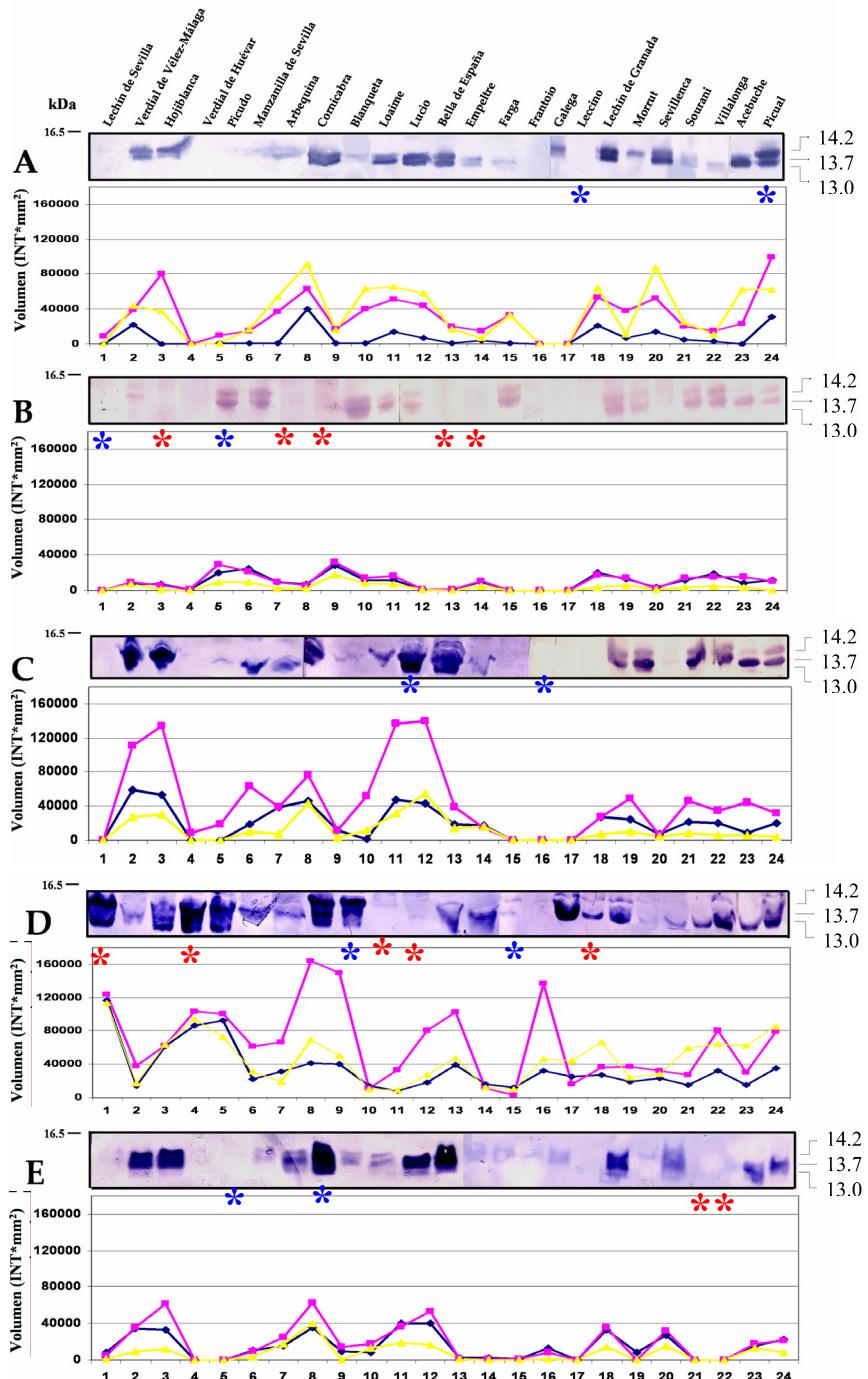


Figura 42. Análisis de la reactividad de los extractos proteicos de 24 variedades de olivo frente a distintos antisueros policlonales de maíz: anti-PRA (A), anti-ZmPRO3 (B), anti-ZmPRO5 (C), anti-ZmPRO4 (D), y de olivo: anti-Ole e 2 (E). Se observan al menos 3 bandas reactivas de 13, 13.7 y 14.2 kDa, correspondientes a las diferentes isoformas de las profilinas de las diferentes variedades. Cada inmunoblot va acompañado de la cuantificación densitométrica de dichas bandas: en amarillo (13 kDa), en rosa (13.7 kDa) y en azul (14.2 kDa). Los asteriscos rojas muestran un ejemplo de un extracto con reacción diferencial (muy

alta o muy baja) a distintos sueros, mientras que los de color azul muestran los extractos proteicos con reactividad diferencial a un suero dado.

Los experimentos de inmunoblot en los que se utilizaron antisueros frente a diferentes isoformas de profilinas de maíz y profilinas nativas de olivo mostraron grandes diferencias de reactividad con respecto a un grupo de polipéptidos de pesos moleculares estimados de 13, 13.7 y 14.2 kDa (Fig. 42). Estas diferencias en reactividad incluyen diferencias tanto cuantitativas (intensidad de las bandas) como cualitativas (número de bandas reactivas).

El análisis de la varianza de una vía para los diferentes antisueros frente a extractos proteicos de los 24 cultivares de olivo (Fig. 42 A-E) determinó la existencia de diferencias significativas ($F\text{-ratio}=14.06$, $p<0.05$). Los valores de reactividad siguen una distribución normal (Shapiro-Wilk, $p>0.05$), mientras que el Test de Levene indica no homogeneidad entre las varianzas ($p<0.05$). Las comparaciones múltiples de los cinco antisueros (Test de Games-Howell) determinaron que existen diferencias significativas ($p<0.05$) entre las parejas de sueros anti-PRA vs. anti-ZmPRO4, anti-PRA vs. anti-ZmPRO3, anti-ZmPRO4 vs. anti-ZmPRO5 y anti-ZmPRO3 vs. anti-ZmPRO5.

Algunos ejemplos, en los que se muestran claras diferencias entre cultivares respecto a la reactividad de cada uno de los cinco antisueros estudiados pueden ser: Leccino vs. Picual, Lechín de Sevilla vs. Picudo, Lucio vs. Frantoio, Blanqueta vs. Farga, así como Picudo vs. Cornicabra en el caso de los inmunoblots correspondientes a los sueros anti-PRA, anti-ZmPRO3, anti-ZmPRO5, anti-ZmPRO4 y anti-Ole e 2 respectivamente (Fig. 42A-E). Asimismo, es posible observar claras diferencias entre antisueros para un cultivar concreto, pueden ser: Hojiblanca, Arbequina, Cornicabra, Bella de España y Empeltre en el caso del inmunoblot correspondiente a anti-ZmPRO3; Lechín de Sevilla, Verdial de Huévar, Loaime, lucio y Leccino en el caso del inmunoblot correspondiente a anti-ZmPRO4; Sourani y Villalonga en el caso del inmunoblot correspondiente a anti-Ole e 2, Fig. 42A-E).

5.2. Expresión de las profilinas Bet v 2 (*Betula pendula*), Cor a 2 (*Corylus avellana*), Phl p 12 (*Phleum pratense*) y Zm 12 (*Zea mays*)

El análisis mediante SDS-PAGE de los extractos crudos obtenidos a partir de polen maduro de *Betula pendula*, *Corylus avellana*, *Phleum pratense* y *Zea mays*, dio como resultado los perfiles proteicos que se muestran en la Fig. 43, en la que también se muestra como referencia un perfil proteico de polen de *Olea europaea* (cultivar Picual). En este caso, en algunos de los extractos sí se distinguen bandas claramente definidas en el intervalo entre 14-18 kDa, tamaño esperado para las profilinas.

La detección de profilinas se realizó mediante inmunoblotting utilizando los mismos antisueros anteriormente descritos para *Olea europaea* (Fig. 44). En este caso es posible individualizar hasta dos bandas reactivas a los distintos anticuerpos, con pesos moleculares estimados de 13.7 y 14.2 kDa (Fig. 44).

Como muestra la figura 44, en este caso y al igual que en el olivo, se aprecian claras diferencias tanto en la reactividad de los diferentes extractos a un suero dado como en la reactividad de un determinado extracto a los distintos sueros ensayados.

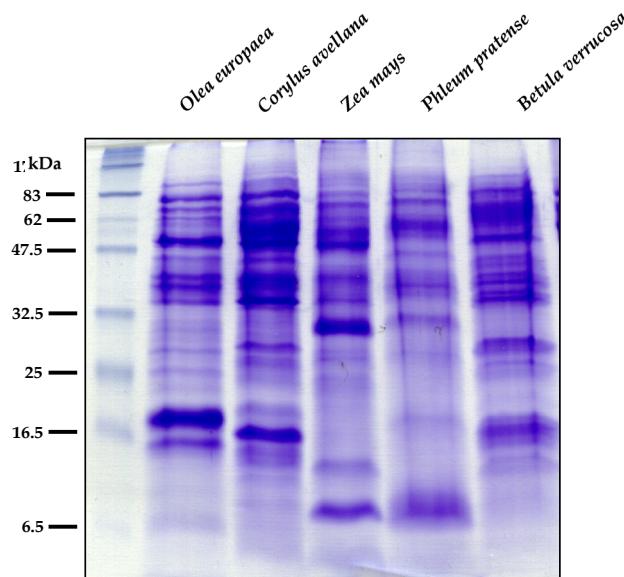


Figura 43. SDS-PAGE tricina al 12% teñido con azul Coomassie de los extractos crudos de polen maduro de diferentes especies (1. *Olea europaea* cv. Picual, 2. *Corylus avellana*, 3. *Zea mays*, 4. *Phleum pratense* y 5. *Betula pendula*).

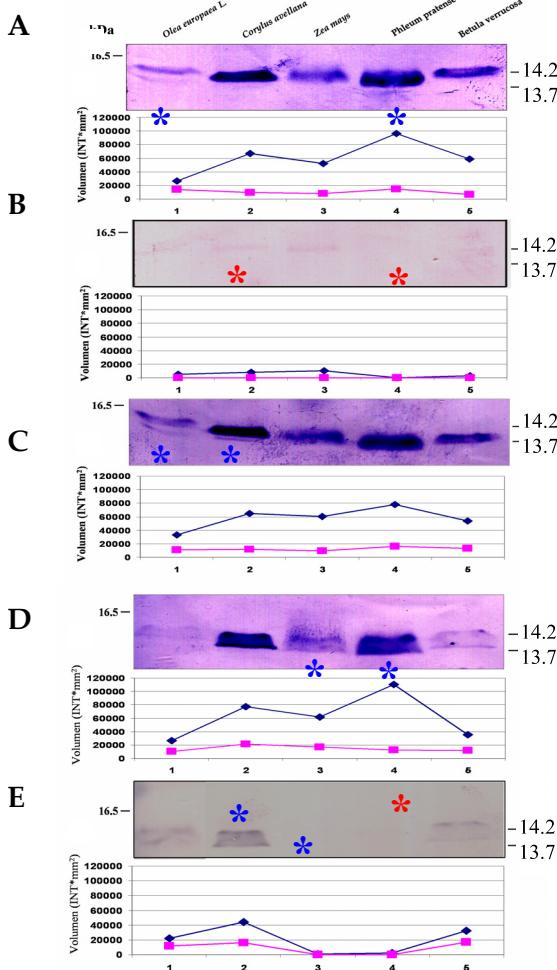


Figura 44. Inmunoblots correspondientes al gel de la figura 43 tratados con sueros policlonales frente a: profilinas nativas de maíz (anti-PRA) (A), isoforma 3 de profilina reproductiva (anti-ZmPRO3) (B), isoforma 5 de profilina vegetativa (anti-ZmPRO5) (C) y isoforma 4 de profilina vegetativa (anti-ZmPRO4) (D) y profilinas nativas de olivo (E). Se observan al menos 2 bandas de 13.7kDa y 14.2kDa, correspondientes a las diferentes isoformas de las profilinas de cada especie. Cada inmunoblot va acompañado de una gráfica de la cuantificación de las dos bandas: la de PM 13.7 kDa en rosa y la de PM entre 14.2kDa en azul (Fig. 44 A-E). Los asteriscos rojas muestran un ejemplo de un extracto con reacción diferencial (muy alta o muy baja) a distintos sueros, mientras que los de color azul muestran los extractos proteicos con reactividad diferencial a un suero dado.

Se llevó a cabo el análisis estadístico correspondiente a los datos de reactividad de los diferentes sueros (Fig. 44 A-F).

El análisis de la varianza de una vía para los diferentes antisueros determinó que existen diferencias significativas entre las cinco especies ($F\text{-ratio}=8.13$, $p<0.05$). Estos resultados siguen una distribución normal (test de Shapiro-Wilk: $p>0.05$), si bien no hay homogeneidad de varianzas (test de Levene: $p<0.05$). La comparación múltiple de los cinco antisueros (test de Games-Howell) mostró que existen diferencias significativas ($p<0.05$) entre el suero anti-ZmPRO3 vs. anti-PRA, Anti-ZmPRO4 y 5.

Algunos ejemplos, en los que se muestran claras diferencias entre cultivares respecto a la reactividad de cada uno de los cinco antisueros estudiados pueden ser: *Olea europaea*

vs. *Phleum pratense*, *Olea europaea* vs. *Corylus avellana*, *Zea mays* vs. *Phleum pratense* y *Corylus avellana* vs. *Zea mays* en el caso de los inmunoblot correspondientes a los sueros anti-PRA), anti-ZmPRO5, anti-ZmPRO4 y anti-Ole e 2.

Algunos ejemplos, en los que se muestran claras diferencias entre antisueros para un cultivar concreto, pueden ser: *Corylus avellana* y *Phleum pratense* en el caso de anti-ZmPRO3 y *Phleum pratense* en el caso del inmunoblot correspondiente a anti-Ole e 2.

5.3 Caracterización del número de isoformas de profilina (Ole e 2) mediante electroforesis 2D en polen de olivo

Con objeto de incrementar la capacidad de discriminación sobre los perfiles proteicos, se recurrió a la utilización de electroforesis 2D en uno de los extractos del polen normalmente utilizado como referencia (*Olea europaea* L. cv. Picual). El análisis mediante electroforesis bidimensional permitió diferenciar alrededor de 1400 manchas correspondientes al proteoma de polen maduro de dicha variedad (Fig. 45A). En dichos geles se muestran una serie de manchas muy relevantes, entre 18-20 kDa, con un amplio rango de puntos isoeléctricos que corresponden al alérgeno mayoritario del polen del olivo (Ole e 1). El análisis mediante inmunoblot de geles equivalentes, transferidos a membranas e incubados con el antisuero policlonal anti-profilina de olivo (anti-Ole e 2), muestra 4 manchas perfectamente individualizadas (P1, P2, P3 y P4) reactivas al anticuerpo (Fig. 45B). Los Pesos Moleculares de estas isoformas están comprendidos entre 12.74 y 13.92 y sus pI entre 3.89 y 4.16 (Tabla 41).

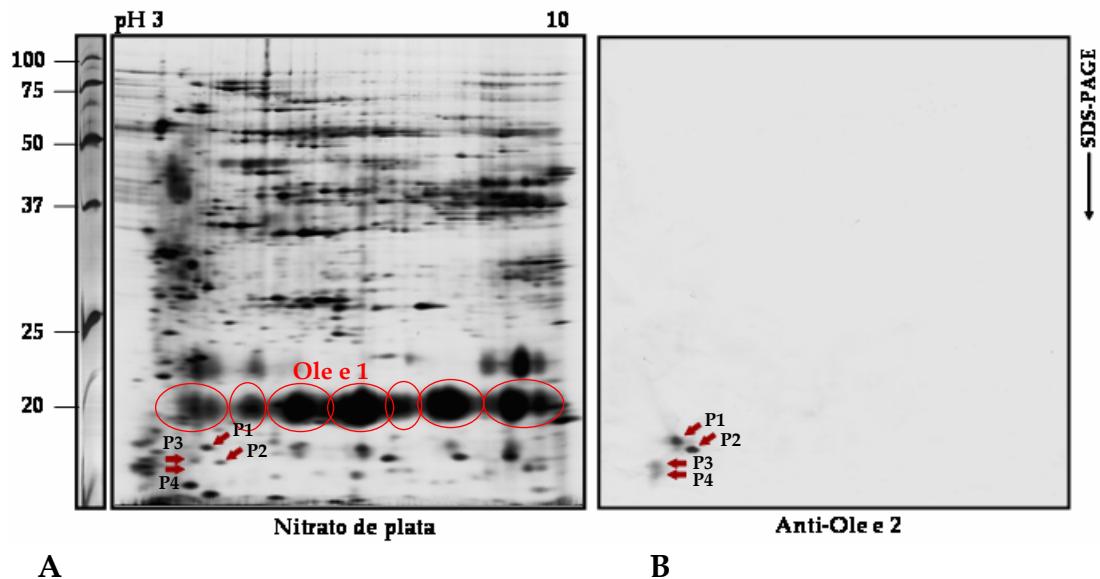


Figura 45. Análisis de la expresión de profilinas en polen de olivo de la variedad Picual, mediante electroforesis bidimensional en geles de poliacrilamida. A) gel teñido con plata. Se aprecian unas 1400 manchas correspondientes al proteoma de polen maduro de olivo de dicha variedad. (B) Inmunoblot correspondiente al gel (A), marcado con un antisero anti-Ole e 2, que detecta cuatro manchas correspondientes a isoformas de profilina. Se cargaron 100 µg de proteína total por gel.

Tabla 41. Pesos moleculares y puntos isoeléctricos estimados e intensidad relativa de las manchas correspondientes a las 4 isoformas de profilinas detectadas mediante electroforesis 2D.

Péptidos	Pm	pI	Intensidad relativa (%)
P1	13.92	4.16	100
P2	13.43	4.39	85
P3	12.93	3.84	53
P4	12.74	3.89	46

5.4. Caracterización del estado de glucosilación de isoformas de profilina (Ole e 2) mediante electroforesis 2D en polen de olivo

El tratamiento con concanavalina A de inmunoblots correspondientes a geles 2D como los descritos en el apartado anterior origina una serie de manchas, la mayoría correspondientes a proteínas de alto peso molecular. También se observa una señal

tenue entre 18-20 kDa, correspondiente al alérgeno mayoritario, Ole e 1 del polen del olivo (Fig. 46). Por el contrario no se observa marcado tras la utilización de la lectina en manchas situadas en una posición equivalente a la de los péptidos P1, P2, P3 ó P4 descritos en el apartado anterior.

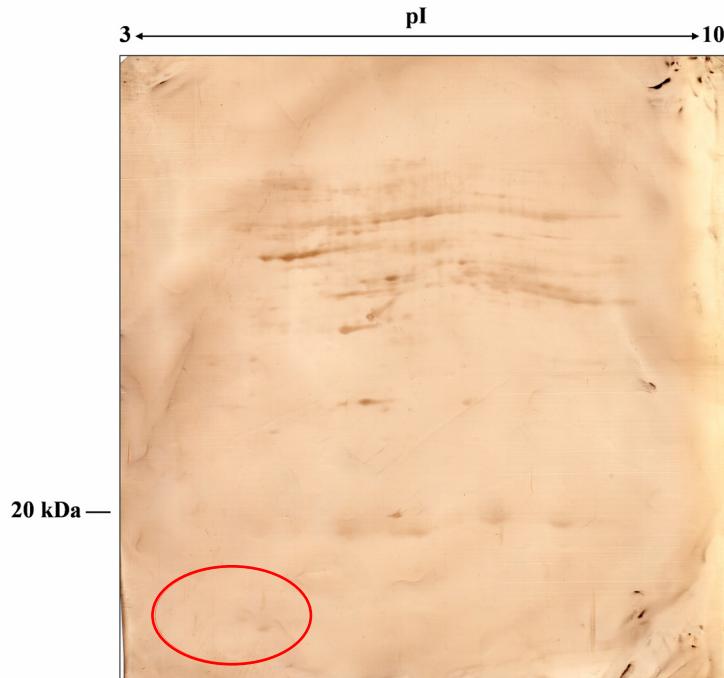


Figura 46. Tratamiento con concanavalina A de un blot correspondiente a una electroforesis 2D correspondiente a la Fig. 45. El círculo marca el lugar aproximado donde podrían situarse los *spot* correspondientes a profilinas (Fig. 45).

5.5 Estudio preliminar de la expresión de profilinas de *Olea europaea* durante la germinación del polen

Con el fin de analizar la expresión de las diferentes isoformas de profilinas a lo largo de la germinación del grano de polen del olivo en condiciones de cultivo *in vitro*, fueron determinados varios tiempos de referencia para el análisis de las muestras. La Figura Fig. 47 muestra los perfiles proteicos de extractos de polen de olivo de la variedad de referencia (Picual), obtenidos tras la prehidratación del polen previa al inicio de su cultivo, así como a diversos tiempos (5 min, 1h, 4h, 7h y 18h) tras el inicio del cultivo. En dicha figura también se ha incluido como referencia un extracto de polen maduro, obtenido de forma previa a la prehidratación.

No es posible identificar en el gel teñido con plata bandas que puedan corresponder claramente a profilinas.

Estas bandas sí son identificables en los correspondientes inmunobLOTS, tras incubar con cuatro antisueros frente a diversas isoformas de profilinas. En este caso se pueden diferenciar hasta 5 bandas correspondientes a 5 isoformas de profilina (Fig. 48), con pesos moleculares calculados de 13.0, 13.7, 14.2, 14.9 y 15.7 kDa. Aunque existen diferencias en la reactividad de los extractos a los diferentes antisueros utilizados, en general se puede apreciar un patrón de expresión similar: los niveles de las distintas isoformas de profilinas se mantienen prácticamente idénticas en polen maduro e hidratado. De forma consistente, al final del cultivo (7 a 18 horas) se produce un notable descenso en los niveles de todas las isoformas. Entre esas dos etapas (5 minutos a 4 horas de cultivo) sí pueden apreciarse algunas diferencias en la expresión de distintas isoformas, que afectan especialmente a aquellas más abundantes (13.7, 14.2 KDa)

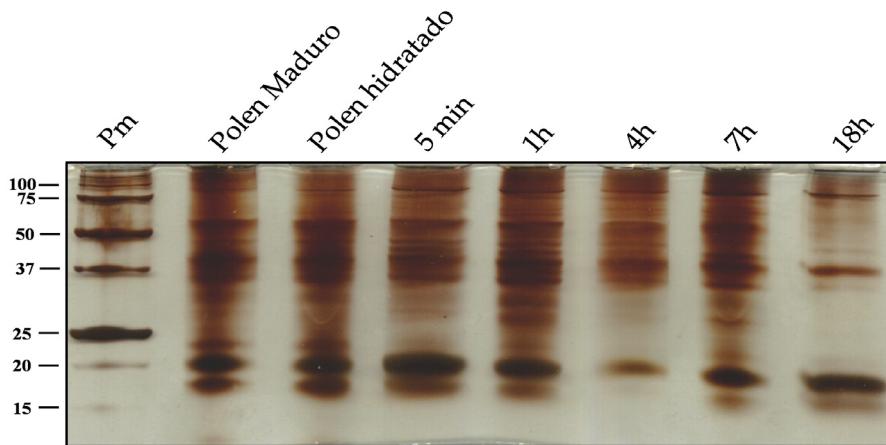


Figura 47. SDS-PAGE de extractos proteicos de polen de olivo de la variedad Picual en varios estadios de la germinación *in vitro*, y en polen maduro. 1 µgr de proteína total por calle.

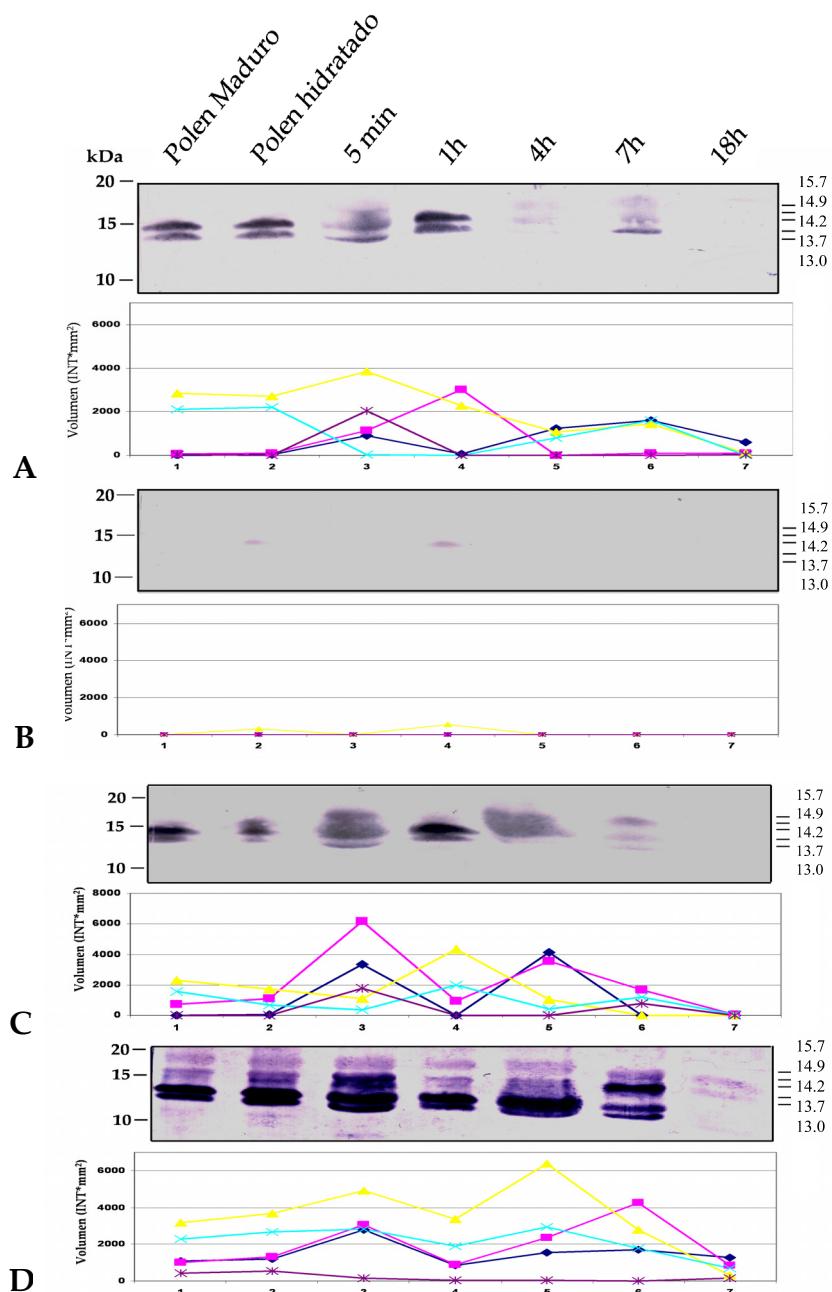


Figura 48. inmunoblot correspondientes al gel de la figura 41, probados con los antisueros anti-PRA (A), anti-ZmPRO3 (B), anti-ZmPRO5 (C) y anti-ZmPRO4 (D). Se observan al menos 5 bandas de 13.0, 13.7, 14.2, 14.9 y 15.7 kDa respectivamente, correspondientes a las diferentes isoformas de las profilinas en las diferentes etapas de germinación. Cada inmunoblot va acompañado de una gráfica de la cuantificación de las 5 bandas: la de PM 13.0 kDa en azul, 13.7 kDa en rosa, 14.2 KDa amarillo, 14.9 kDa turquesa y 15.7 kDa marrón (Fig. 48A-E).

5.6 Análisis de la reactividad cruzada entre profilinas vegetativas y reproductivas

Este estudio se inició con los ensayos realizados en extractos proteicos de polen de diferentes especies (*Olea europaea*, *Betula pendula*, *Corylus avellana*, *Phleum pratense* y *Zea mays*), con dos antisueros que reconocen isoformas de profilinas vegetativas de maíz (ZmPRO4 y 5) (Fig. 44C y 44D), en extractos proteicos de 24 variedades de polen de olivo con los mismos antisueros (Fig. 42 C y 42D), así como durante la germinación del polen de olivo (cv Picual) (Fig. 48C y 48D).

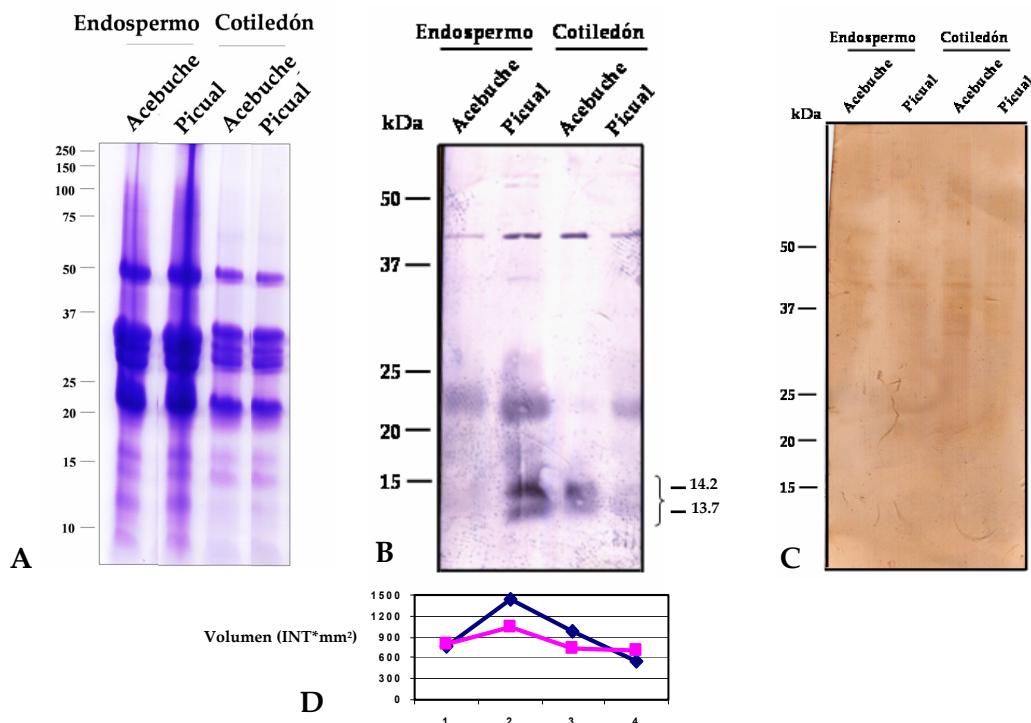


Figura 49. Análisis de reactividad cruzada entre profilinas vegetativas de semilla de olivo (endospermo y cotiledón) de los cultivares Acebuche y Picual, frente al antisuero anti-Ole e 2. A) gel SDS-PAGE al 12 % de extractos proteicos crudos de semillas de olivo (endospermo, representado por una estrella; cotiledón) de las variedades Acebuche y Picual. B) el inmunoblot correspondiente al gel (A) muestra una serie de bandas reactivas entre las que se encuentran al menos dos (13.7 y 14.2 kDa), correspondientes a profilinas vegetativas. Dichas bandas han sido cuantificadas y se muestran los valores en una gráfica. C) Tratamiento con concanavalina A de un blot correspondiente a (A), donde se muestran una serie de bandas reactivas, entre las cuales no aparecen la correspondiente a Ole e 2 (D).

Con objeto de determinar la posible expresión diferencial de isoformas de profilinas en tejidos somáticos y reproductores, se realizó un ensayo paralelo utilizando extractos proteicos obtenidos a partir de cotiledón y de endospermo de semillas de olivo de la variedad de referencia (Picual) y de olivo silvestre (acebuche). Los geles correspondientes (Fig. 49A) muestran perfiles proteicos completamente diferentes a los observados en polen maduro (i.e. Figura 41). En este caso, las bandas mayoritarias corresponden a distintas formas de proteínas de almacenamiento de semillas, con tamaños que oscilan entre 20 y 47 kDa (Alché *et al.* 2007). Cuando se analizan inmunoblotis incubados con un anticuerpo anti Ole e 2 de polen de olivo, se distinguen al menos dos bandas reactivas correspondientes a pesos moleculares de 13.7 y 14.2 kDa (Fig. 49B). Además, se observan otras bandas con pesos moleculares en torno a 45kDa y 22 kDa. Existen claras diferencias cuantitativas en las bandas tanto en el tipo de tejido (endospermo o cotiledón), como en la variedad analizada. Concretamente, las profilinas de endospermo de la variedad Picual exhiben una reactividad más elevada que las profilinas de cotiledón de la misma variedad. El tratamiento con concanavalina A dio lugar a una serie de bandas, aunque ninguna correspondiente a profilinas vegetativas (Fig. 49C).

5.7 Localización celular de profilinas

Una vez realizada la predicción teórica de la localización de las diferentes profilinas secuenciadas (capítulo 3.3.7.), se llevó a cabo una localización experimental con objeto de determinar si existe una distribución diferencial de las isoformas descritas en el presente trabajo. Para ello se realizaron inmunocitoquímicas al microscopio electrónico de transmisión (MET), utilizando secciones de granos de polen germinado de olivo (cv. Picual), que fueron incubadas con cuatro de los anticuerpos utilizados en los ensayos previos de este estudio (anti-ZmPRO3, anti-ZmPRO4, anti-ZmPRO5 y anti-PRA) (Figs 50, 51, 52, 53 y 54). En todas las inmunolocalizaciones efectuadas, se determinó que el citoplasma de la célula vegetativa/generativa es el lugar preferencial

donde se observan las partículas de oro, seguido de ambos núcleos (Figs. 52A y 53A). También se localizó abundante marcado en las aperturas (Figs. 50C, 52C), en la pared del polen, tubo polínico y en el ápice del tubo polínico (Figs. 54A y 54B) y en el material asociado a las cubiertas del grano de polen (Figs. 50B y 52B). No se observó marcado significativo en el resto de los compartimentos celulares ni en las organelas. No se observó marcado significativo en las secciones en las que se omitió la incubación con antisuero (controles negativos, de los cuales sólo se muestra uno de ellos en la Fig. 54C).

La intensidad general del marcado detectado sobre las secciones fue variable, dependiendo del antisuero utilizado.

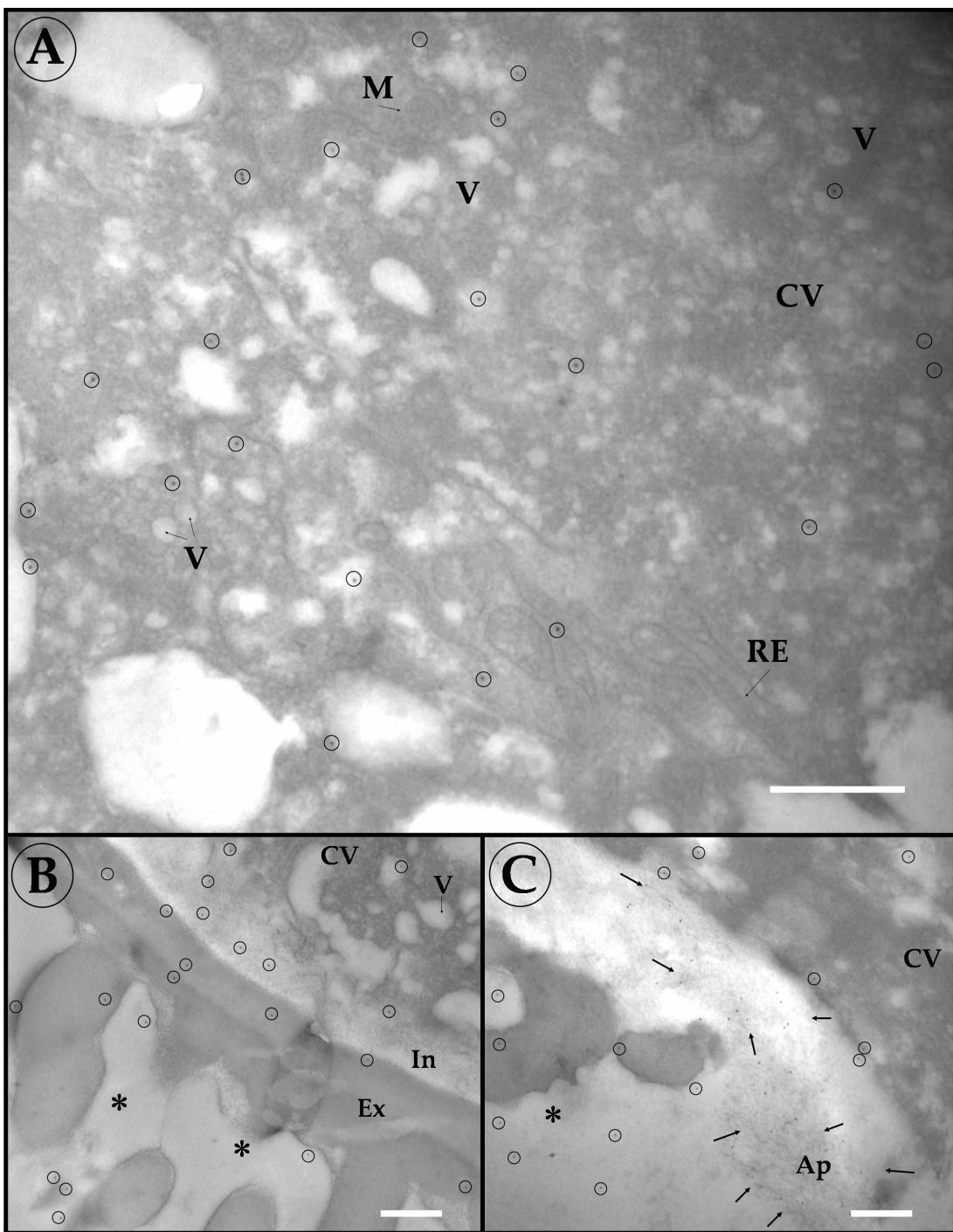


Figura 50. Inmunolocalización a MET de profilinas de polen de olivo en secciones de polen maduro de la variedad Picual durante la germinación, tras incubar con el antisero anti-PRA. A) vista general del citoplasma de la célula vegetativa, B) de las cubiertas del grano de polen y C) de una región apertural. La localización de las partículas de oro se destaca con círculos o flechas. Ap: apertura; CV: citoplasma de la célula vegetativa; Ex: exina; In: intina; M: mitocondria; N: nucleo; P: plastidio; RE: retículo endoplásmico; V: vesícula; asteriscos: material adherido a las cubiertas. Las barras representan 1μm.

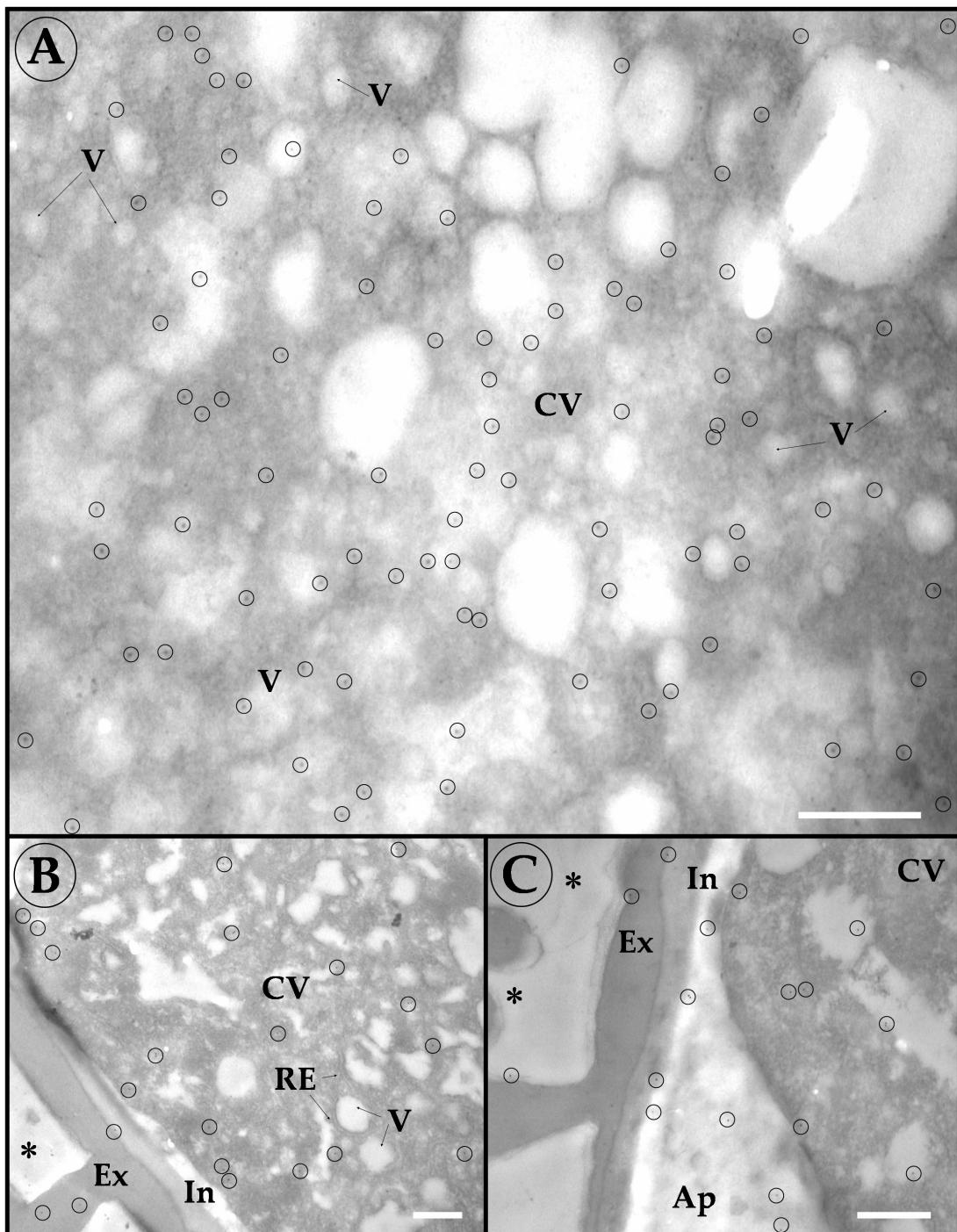


Figura 51. Inmunolocalización a MET de profilinas de polen de olivo en secciones de polen maduro de la variedad Picual durante la germinación, tras incubar con el antisero anti-ZmPRO3. A) Vista general del citoplasma de la célula vegetativa, B) de las cubiertas del grano de polen y C) de una región apertural. La localización de las partículas de oro se destaca con círculos o flechas. Ap: apertura; CV: citoplasma de la célula vegetativa; Ex: exina; In: intina; M: mitocondria; N: nucleo; P: plastidio; RE: retículo endoplásmico; V: vesícula; asteriscos: material adherido a las cubiertas. Las barras representan 1μm.

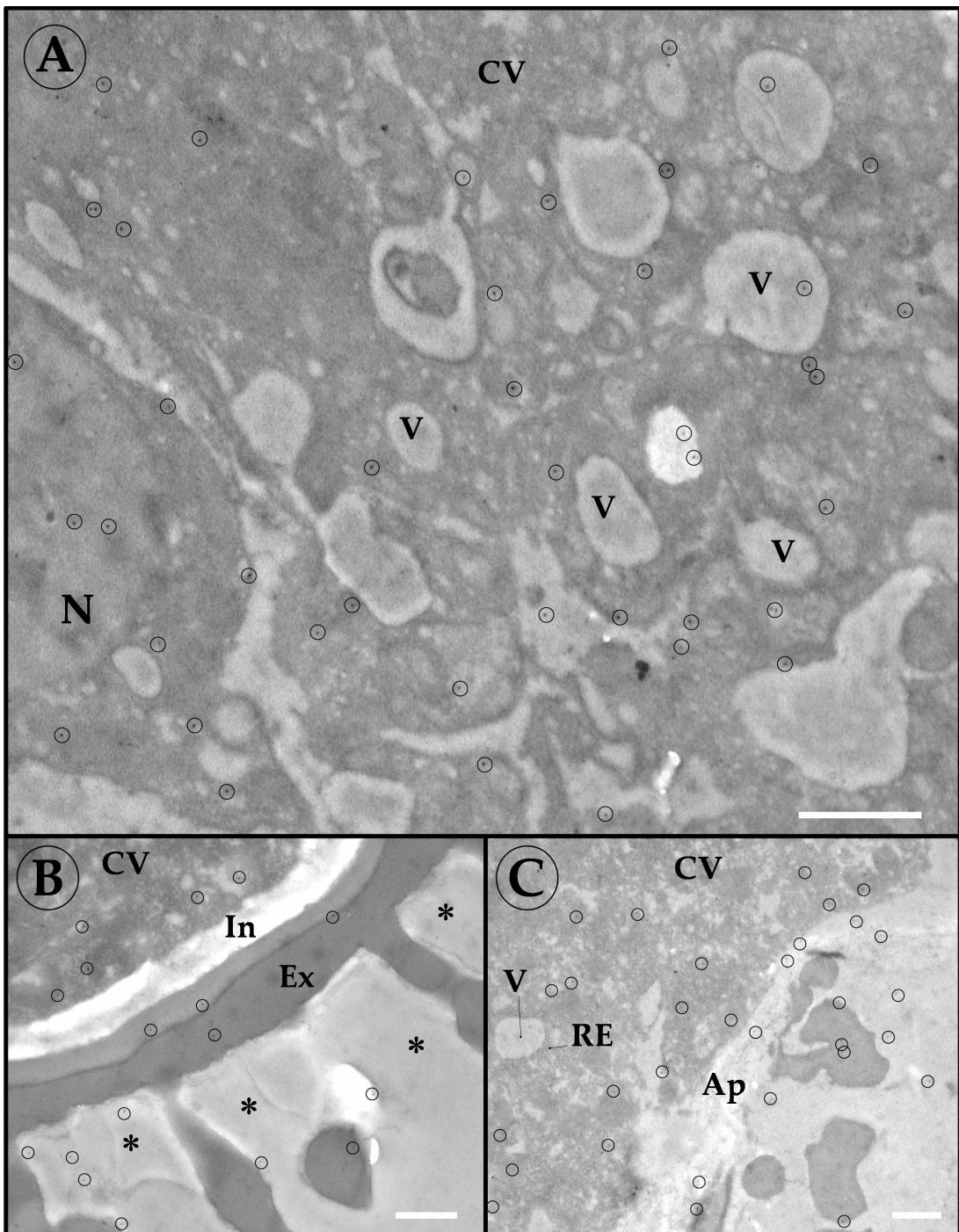


Figura 52. Inmunolocalización a MET de profilinas de polen de olivo en secciones de polen maduro de la variedad Picual durante la germinación, tras incubar con el antisuero anti-ZmPOR4. A) Vista general del citoplasma de la célula vegetativa, B) de las cubiertas del grano de polen y C) de una región apertural. La localización de las partículas de oro se destaca con círculos o flechas. Ap: apertura; CV: citoplasma de la célula vegetativa; Ex: exina; In: intina; M: mitocondria; N: nucleo; P: plastido; RE: retículo endoplásmico; V: vesícula; asteriscos: material adherido a las cubiertas. Las barras representan 1μm.

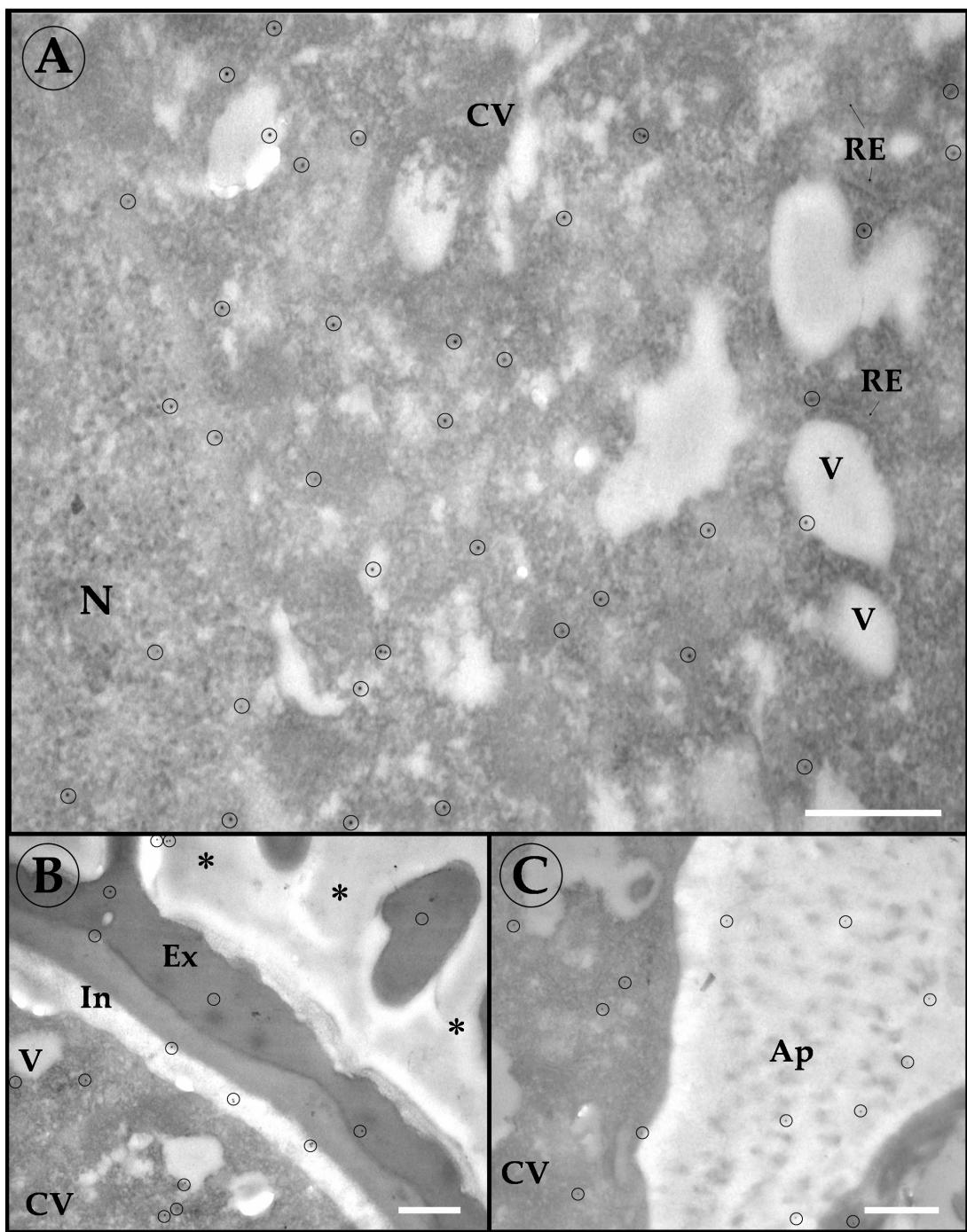


Figura 53. Inmunolocalización a MET de profilinas de polen de olivo en secciones de polen maduro de la variedad Picual durante la germinación, tras incubar con el antisero anti-ZmPRO5. A) Vista general del citoplasma de la célula vegetativa, B) de las cubiertas del grano de polen y C) de una región apertural. La localización de las partículas de oro se destaca con círculos o flechas. Ap: apertura; CV: citoplasma de la célula vegetativa; Ex: exina; In: intina; M: mitocondria; N: nucleo; P: plastidio; RE: retículo endoplásmico; V: vesícula; asteriscos: material adherido a las cubiertas. Las barras representan 1 μ m.

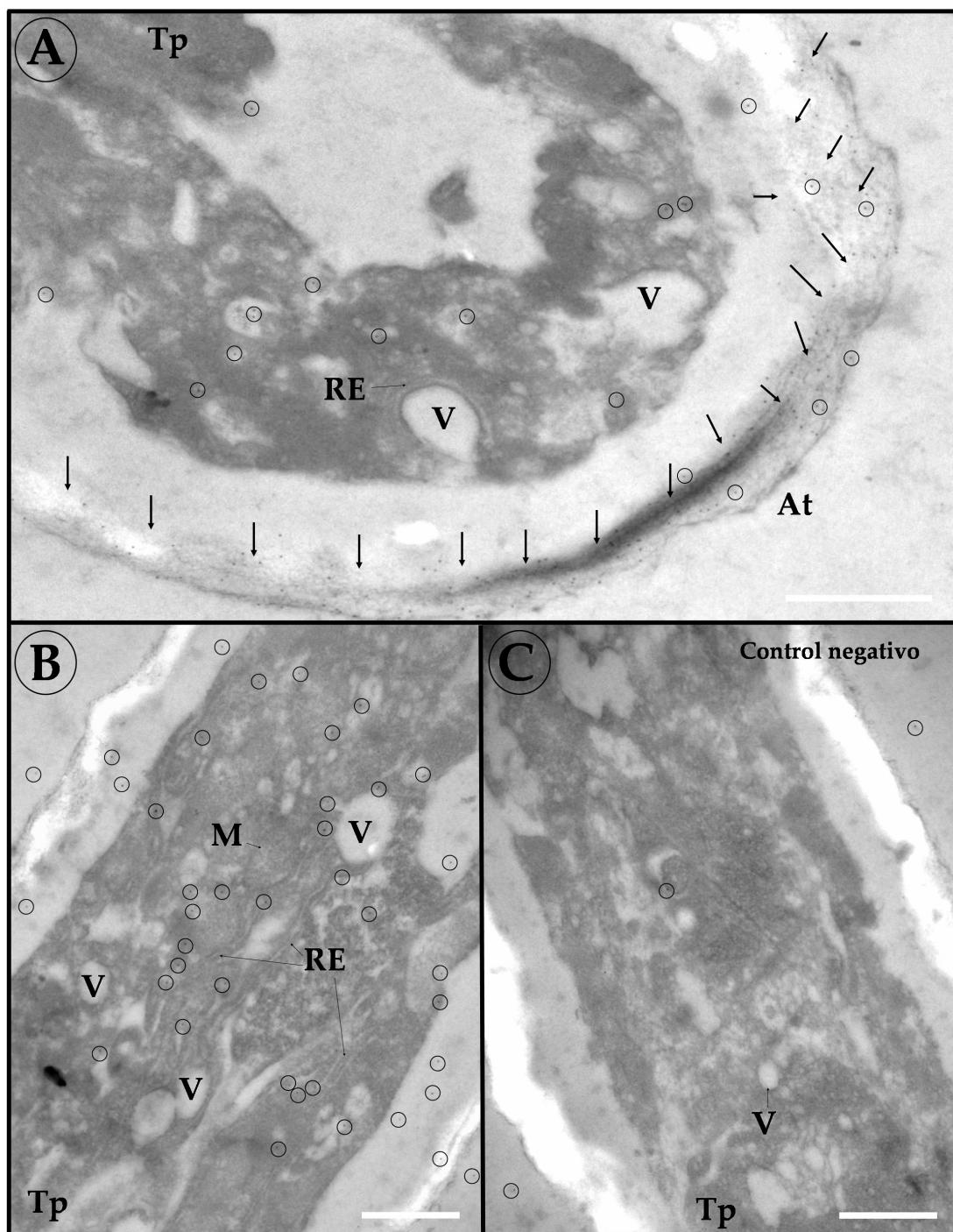


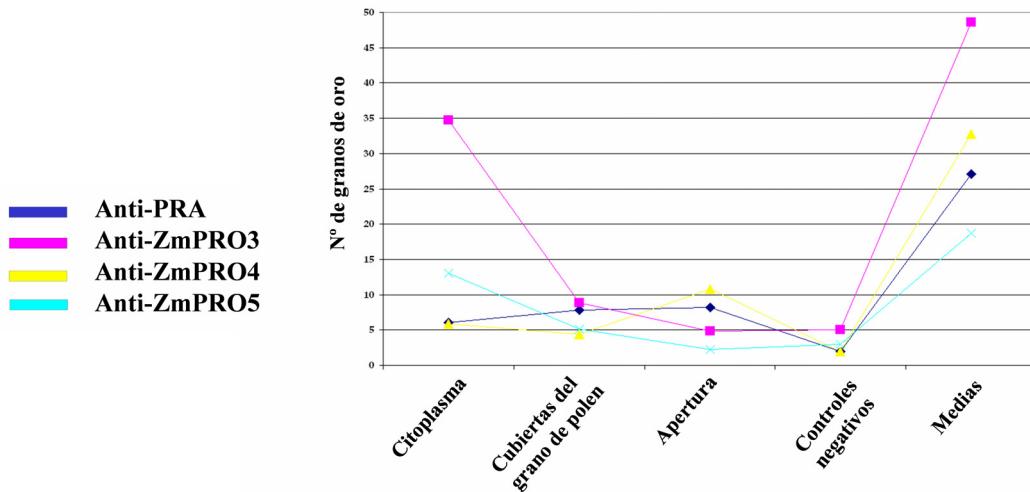
Figura 54. Inmunolocalización a MET de profilinas de polen de olivo en secciones de polen maduro de la variedad Picual durante la germinación, tras incubar con el antisuero anti-PRA. A) Vista general del ápice y B) de una sección longitudinal de un tubo polínico, C) control negativo. La localización de las partículas de oro se destaca con círculos o flechas. Ap: apertura; At: ápice del tubo polínico; CV: citoplasma célula vegetativa; Ex: exina; In: intina; M: mitocondria; N: nucleo; P: plastidio; RE: retículo endoplásmico; Tp: tubo polínico; V: vesícula; asteriscos: material adherido a las cubiertas. Las barras representan 1μm.

Con objeto de determinar adecuadamente las diferencias de marcado existentes, se procedió a un recuento de las partículas de oro presentes sobre cada uno de los compartimentos mencionados. Los resultados de dicha cuantificación se muestran en la Tabla 42.

El inmunomarcado más abundante se observó en las secciones incubadas con el antisuero anti-ZmPRO3 (Fig. 51), seguido de anti-ZmPRO4 (Fig. 52). Los antisueros anti-PRA y anti-ZmPRO3 mostraron una inmunolocalización preferencial en las cubiertas del grano de polen (Fig. 50B y 51B), mientras que anti-PRA y anti-ZmPRO4 mostraron una inmunolocalización preferencial en las aperturas del polen (Fig. 50C y 52C), más intensa que el del resto de los antisueros (Tabla 42).

Tabla 42. Recuento de granos de oro sobre cada uno de los componentes mayoritarios, para cada uno de los antisueros utilizados. Medidas realizadas como granos de oro/ μm^2 .

Distribución de profilinas					
Antisueros	Citoplasma	Cubiertas del grano de polen	Apertura	Control negativo	Media
Anti-PRA	6.06±3.94	7.83±4.67	8.22 ± 2.22	2.0±0.42	27.13±8.89
Anti-ZmPRO3	34.70±9.66	8.83±4.54	4.86±2.04	5.0±0.87	48.56±23.76
Anti-ZmPRO4	5.91±3.02	4.34±1.32	10.83±3.06	2.0±0.38	32.75±9.63
Anti-ZmPRO5	13.00±3.35	5.14±1.95	2.20±0.45	3.0±0.44	18.7±17.36



5.8 Expresión y purificación de proteínas recombinantes

Las funciones llevadas a cabo por las profilinas así como su regulación, pasan por la interacción con una serie de ligandos naturales (actina, PIP, PLP y otras proteínas). La caracterización experimental de estas interacciones requiere en la mayor parte de los casos disponer de cantidades relativamente ilimitadas de los agentes implicados en dicha interacción. En el caso de las profilinas, una de las alternativas más utilizadas es su expresión recombinante. Como paso previo a la expresión de las formas de profilinas descritas en el presente trabajo, se ha puesto a punto un sistema de expresión *in vitro* y purificación de profilinas y de alguno de sus ligandos, utilizando algunas isoformas bien caracterizadas: isoformas 2 y 4 de profilinas de *Arabidopsis thaliana* (AtPROF 2 y 4) (números de acceso Genbank™/EMBL Q42418 y Q38905 respectivamente), la isoforma I de profilina humana (hPROFI) (número de acceso P07737), así como una proteína ABP como es la vilina humana (hVLN) (número de acceso P09327). El objetivo fundamental de estos estudios es obtener estas profilinas recombinantes en un grado de concentración y pureza adecuados para llevar a cabo los experimentos de interacción entre profilinas y proteínas ligando. Tras utilizar las estrategias descritas en el apartado de material y métodos para la generación de las construcciones correspondientes, y la purificación de las proteínas recombinantes de los extractos, se analizaron las distintas fracciones de la elución final mediante SDS-PAGE. La figura 54 muestra las diferentes bandas obtenidas tras la digestión de las construcciones génicas correspondientes a los diferentes vectores de expresión. La figura 55 muestra los perfiles proteicos de las distintas fracciones analizadas. En el caso de las profilinas AtPROF 2, AtPROF 4 y hPROFI, se pueden observar bandas únicas en las fracciones analizadas con peso molecular bajo (14-15 kDa), compatibles con los tamaños esperados para estas profilinas (13.998, 14.550 y 15.054 Da, respectivamente). En el caso de la vilina humana hVLN, las fracciones muestran una única banda de PM cercano a 120 kDa, compatible con el PM esperado para esta proteína (121.695 Da).

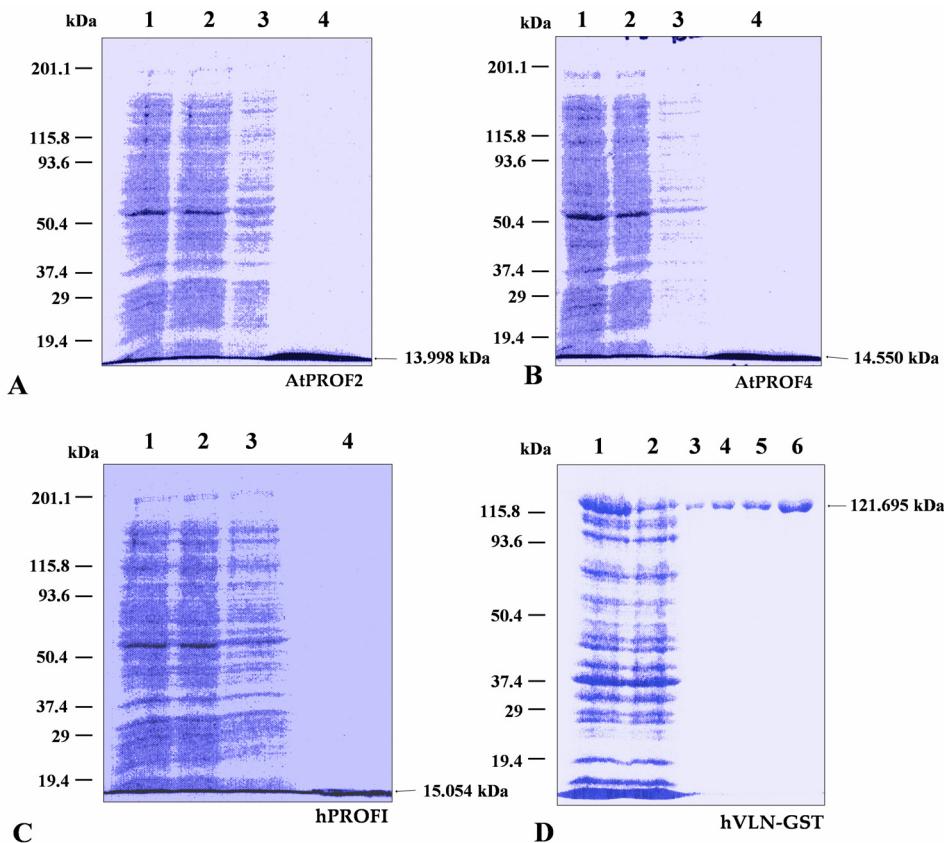


Figura 55. Tricina-SDS PAGE 12% teñido con Coomassie, de las diferentes etapas de purificación de: A) y B) isoformas 2 y 4 de profilina de *Arabidopsis thaliana*, respectivamente. C) isoforma I de profilina humana. En estas figuras, las calles analizadas incluyen: calle 1. Extracto bacteriano clarificado, calle 2. El mismo extracto tras su elución a través de la correspondiente columna (PLP-sefarosa en el caso de profilinas y resina conjugada con glutatión en el caso de la vilina humana) calle 3. Lavado de la columna con tampón I en el caso de las diferentes profilinas. Calles 4-6. Fracciones de profilinas/vilina eluídas con urea 7M/glutatión respectivamente.

DISCUSIÓN

5. 1 Las profilinas del polen constituyen productos génicos de gran importancia biológica, aunque su estudio en detalle constituye un área emergente

A pesar de la gran importancia biológica de esta familia de proteínas y de su elevada conservación molecular y estructural, la información disponible actualmente sobre las profilinas dista mucho de ser exhaustiva, especialmente en el caso de las profilinas del polen.

Una búsqueda con el término “profilin” a través de todas las bases de datos del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/gquery?term=profilin>), realizada en fecha posterior a la inclusión de las secuencias descritas en el presente trabajo conduce a los datos numéricos mostrados en la Fig. 56:



Fig. 56 Resultados numéricos resultantes de una búsqueda con el término “profilin” a lo largo de las bases de datos incluidas en el NCBI (marzo 2008).

Es destacable que en las dos bases de datos más representativas: "CoreNucleotide" y "Protein", el número de entradas corresponda a 1107 y 10.363. La mayor parte de estas secuencias han sido obtenidas en un número relativamente bajo de especies, entre las que destaca el hombre y otros mamíferos, como muestra la distribución de secuencias por especies que se indica en la Tabla 43.

Tabla 43: Distribución de secuencias incluidas en las bases de datos CoreNucleotide y Protein del NCBI por especies (Marzo 2008).

CoreNucleotide: Core subset of Protein: sequence database nucleotide sequence records	
Homo sapiens (112)	Homo sapiens (564)
Olea europaea (107)	Mus musculus (338)
Mus musculus (70)	Oryctolagus cuniculus (221)
Arabidopsis thaliana (40)	Arabidopsis thaliana (220)
Malus x domestica (38)	Oryza sativa (210)
Rattus norvegicus (33)	Dictyostelium discoideum (161)
Trichomonas vaginalis G3 (31)	Rattus norvegicus (151)
Toxoplasma gondii (27)	Oryza sativa Japonica Group (147)
Bos taurus (21)	Trypanosoma cruzi (123)
Zea mays (21)	Drosophila melanogaster (120)
Danio rerio (20)	Bos taurus (114)
Dictyostelium discoideum (20)	Trichomonas vaginalis (114)
Caenorhabditis elegans (19)	Olea europaea (113)
Macaca mulatta (16)	Paramecium tetraurelia (109)
Dictyostelium discoideum AX4 (16)	Trichomonas vaginalis G3 (108)
Oryza sativa (15)	Dictyostelium discoideum AX4 (104)
Oryza sativa Japonica Group (14)	Danio rerio (102)
Drosophila melanogaster (13)	Saccharomyces cerevisiae (102)
Corylus avellana (12)	Strongylocentrotus purpuratus (90)
Phleum pratense (12)	Vaccinia virus (86)
All other taxa (463)	All other taxa (7540)

Una búsqueda similar bajo el criterio "profilin and pollen" reduce aún mucho más el espectro de secuencias presentes, en este caso a 214 y 323 secuencias respectivamente para las bases CoreNucleotide y Protein. Teniendo en cuenta que en el presente estudio

se incluye información sobre 94 nuevas secuencias de profilinas de polen en *Olea europaea*, 10 en *Corylus avellana*, 8 en *Phleum pratense*, 7 en *Zea mays*, y 1 en *Betula verrucosa*, ya incluídas en las cifras mencionadas, se puede considerar que la información disponible hasta la fecha sobre profilinas en polen es bastante limitada. Las secuencias ya presentes en las bases de datos, junto con su relativa conservación, han facilitado el diseño de oligonucleótidos, capaces de amplificar la secuencia de este producto génico y por tanto abordar el presente estudio. Las secuencias obtenidas en este caso abarcan el marco de lectura abierto completo de las profilinas en todas las fuentes utilizadas, así como diversas secuencias genómicas.

Además de contribuir a una mayor y más completa información acerca de las profilinas reproductivas, este estudio confirma la enorme utilidad de técnicas rutinarias como (RT)PCR, clonación y secuenciación como herramientas para la caracterización y estudio del polimorfismo en estas proteínas. En este caso, la elevada conservación de las regiones elegidas para la elaboración de los cebadores ha permitido el uso de cebadores con secuencias bastante bien determinadas en lugar de cebadores ampliamente degenerados, para la realización de las amplificaciones.

5.2. El polimorfismo es probablemente una característica muy extendida en las familias de profilinas.

El polimorfismo en profilinas del olivo (*Ole e 2*) comenzó a ser estudiado hace una década en tan solo tres secuencias (Asturias et al. 1997). Estos autores encontraron microheterogeneidades en al menos 4 residuos de la secuencia primaria, con importantes implicaciones en la estructura 3D (Martínez et al. 2002). En el presente trabajo se describen al menos 38 posiciones consideradas variables dentro de la secuencia aminoacídica de las profilinas (un 25.37% de su secuencia), aunque por otro lado el nivel de variabilidad de estas posiciones es relativamente bajo (3.74 ± 0.90). Los intervalos de identidad entre las secuencias nucleotídicas y aminoacídicas para las profilinas analizadas oscilan entre 71.8% a 100% y 75.3% a 100%, respectivamente. Si lo

comparamos con otros productos génicos presentes en el polen del olivo, como es Ole e 1 (alérgeno mayoritario) ó Ole e 5 (Cu,Zn superóxido dismutasa), las profilinas están mucho menos conservadas, ya que Ole e 1 muestra intervalos de identidad de 86-100% (nd) y 85-100% (aa) (Hamman-Khalifa et al., 2008), mientras que en un reciente estudio, Zafra (2007) determina niveles de conservación para Ole e 5 en torno a 98.3-100% (nd) y 93.4-100% (aa).

Las microheterogeneidades observadas en todas estas secuencias analizadas no pueden en ningún caso ser consideradas artefactos generados *in vitro* como resultado de los errores de incorporación de la Taq polimerasa utilizada, ya que supondrían una tasa de error mucho más alta que la descrita para este enzima (del orden de $1/10^5$ nucleótidos por ciclo ó 1 error por cada 10000 pares de bases por ciclo. Puesto que los fragmentos amplificados en este trabajo poseen una secuencia relativamente corta (405 pb de media), podemos estar prácticamente seguros de la ausencia de errores de copia en las secuencias obtenidas. Otra prueba de la elevada fidelidad de la reacción puede apreciarse de forma indirecta cuando se analizan los alineamientos múltiples, ya que en éstos se mantienen extremadamente conservados diversos residuos característicos de la secuencias de profilinas.

De esta forma, los cambios prácticamente no afectan a los aminoácidos implicados en el mantenimiento de la estructura 3D, ni a los motivos de interacción con actina y PLP. Por el contrario, la variabilidad sí que afecta al motivo de interacción con PIP, a aminoácidos susceptibles de fosforilación y a otros residuos sobre los que actuarían diversas quinasas. Además, el polimorfismo sería el principal mecanismo para generar una variedad de isoformas con diferentes motivos postraduccionales (miristilaciones, amidaciones, y los ya mencionados de fosforilación, entre otros). Estas modificaciones y la posible implicación del polimorfismo sobre la función biológica y la capacidad alergénica de estas proteínas son tópicos que se discuten en detalle más adelante.

En cuanto al resto de las especies estudiadas en esta tesis, el número de posiciones polimórficas es mucho menor que en el olivo, debido en parte a que no se han

analizado variedades diferentes, y además porque el número de secuencias obtenidas o existentes en las bases de datos ha sido también mucho menor. Los resultados obtenidos sugieren sin embargo, que el polimorfismo también afecta a estas especies siguiendo básicamente el mismo patrón descrito para el olivo; es decir: elevada conservación en ciertos residuos clave, y amplio polimorfismo en el resto de residuos. La variabilidad de los residuos permite por otra parte distinguir unas especies de otras, ya que las comparaciones entre especies son en general estadísticamente significativas. La prácticamente total identidad entre las secuencias obtenidas de cDNA de polen y gDNA de olivo, parece indicar que el procesamiento de los mRNAs correspondientes a profilinas no incluye la eliminación de intrones, tratándose de un gen “intronless” al menos en el olivo. No todas las profilinas tienen esa característica. Como ejemplo, la profilina II de ratón puede ser procesada de forma alternativa, generando profilinas con distintas propiedades bioquímicas (Lambrechts et al., 2000). En plantas, diversas profilinas de *Arabidopsis* también poseen intrones distintivos a nivel funcional, que son capaces de dirigir la expresión de estos genes (Jeong et al. 2006). En manzana, existen diversas formas de la profilina Mal d 4, todas ellas con tres exones de longitud conservada (Gao et al. 2005). En el caso del olivo, el presente estudio relativo a secuencias genómicas debería ser extendido a un mayor número de secuencias y de variedades, así como ser contrastado con técnicas como Southern blot, con objeto de determinar la extensión de la familia génica de las profilinas en el olivo. El estudio debería ser igualmente ampliado al resto de las especies incluidas en este trabajo.

Algunas de las secuencias de profilinas analizadas muestran delecciones significativas de entre 1 y 9 nucleótidos. Aunque no son frecuentes en la literatura, existen descripciones de delecciones similares en tamaño, aunque localizadas en posiciones diferentes en las profilina humana de tipo 3 y en un homólogo de profilina virásica (Butler-Coleqje et al. 2007). Es dudoso que las delecciones observadas afecten la funcionalidad de la proteína, dado que no alteran la pauta de lectura ni a ninguno de

los aminoácidos clave para dichas funciones. En cualquier caso, dichas delecciones sí que afectan a las propiedades físico-químicas de las proteínas resultantes.

5.3 El polimorfismo observado en la secuencia nucleotídica de las profilinas permite predecir la existencia de una pléthora de formas y variantes de profilinas en plantas, que comparten estructuras 3D muy similares.

Una de las principales características observadas en las profilinas es la presencia de múltiples isoformas o variantes de estas proteínas, que han sido relacionadas con la existencia de variadas funciones (Baatout 1996). Las isoformas se consideran productos de genes discretos y difieren en sus propiedades bioquímicas y/o su patrón de expresión. La generación de isoformas o variantes de profilinas es una característica más frecuente en plantas que en animales, debido a la existencia de familias multigénicas que las codifican (Huang et al. 1996; Kovar et al. 2000). Además de la presencia de familias multigénicas, se han descrito otros mecanismos generadores de variabilidad en profilinas: a) *splicing* alternativo del ARNm, b) modificaciones postraduccionales y c) SNPs (single nucleotide polymorphisms) (Williams & Hochstrasser 1997; Collins et al. 1998), como se detalla en el capítulo de introducción.

Los resultados que se muestran en este trabajo en referencia a las secuencias de profilinas amplificadas, ya indican que es muy probable la existencia de extensas familias multigénicas. También documentan que son extremadamente frecuentes las microheterogeneidades en las secuencias nucleotídicas en las diferentes especies, especialmente en el olivo. Por tanto, ambos mecanismos pueden ser considerados como mayoritarios en cuanto a la generación de isoformas de profilinas en las especies estudiadas. Con respecto a los otros mecanismos de generación de isoformas, tenemos que considerar lo siguiente: no se ha encontrado evidencia alguna de la existencia de “*splicing*” alternativo, a pesar de que el análisis de secuencias genómicas ha sido muy limitado. Sin embargo, las pruebas obtenidas apuntan a que las profilinas constituyen

genes “intronless” al menos en el olivo, por lo que este mecanismo no debe ser especialmente significativo en la generación de isoformas en esta especie.

Respecto a la ocurrencia de modificaciones postraduccionales, el análisis realizado muestra que sí podría constituir un mecanismo capaz de generar un amplio panel de formas de las profilinas.

Los resultados de las correspondientes predicciones indican que podría existir una variabilidad relativamente grande como consecuencia de la presencia de sitios de miristilación (de 1 a 5 dependiendo de la especie, y en el caso del olivo del cultivar analizado), y/o de amidación, aunque de menor importancia en este último caso (Tabla 26).

A la vista de las predicciones realizadas, podemos considerar que la forma de modificación postraduccional más relevante en cuanto a la generación de isoformas de profilinas podría ser la fosforilación en residuos de Ser/Thr (Vemuri et al. 2001; Luan 2003) y Tyr (Guillen et al. 1999; Aparicio-Fabre et al. 2006). Como muestran las Tablas 22-25, son muy numerosos los lugares potencialmente susceptibles de fosforilación, así como las quinasas que podrían potencialmente producir dicha modificación.

Todas las modificaciones postraduccionales pueden generar de forma potencial diferencias en las propiedades físico-químicas de las proteínas resultantes, que incluirían su peso molecular y punto isoelectrónico. Por tanto, las variantes representadas en la Fig. 23 podrían ser mucho más numerosas si se tuvieran en cuenta estos parámetros.

Las diferencias entre las distintas isoformas y variantes de profilinas del polen no tienen por qué ser absolutamente drásticas. De hecho, si se considera un aspecto fundamental como es la estructura molecular, el polimorfismo sólo afecta a aspectos relativamente sutiles de dicha estructura.

Las predicciones de estructura secundaria realizadas sobre la base de las secuencias obtenidas indican que la distribución y el número de elementos de estructura secundaria están bien conservados en las cinco especies analizadas, a pesar del rango

de variabilidad de la secuencia primaria. Cabe destacar una única excepción, correspondiente a una de las láminas β (S1) que es sustituida de forma parcial o total por una α -hélice, de forma coincidente a la existencia de una delección en un aminoácido (*Betula verrucosa*) o en 3 de ellos (*Corylus avellana*, *Phleum pratense* y *Zea mays*) (Fig. 24). Cambios mínimos como los descritos en la estructura secundaria no deben suponer una variación excesiva en la geometría de la estructura 3D de la profilina (Wu et al. 1995; Noble et al. 1993; Eck et al. 1994; Lim et al. 1994). Es más, se ha descrito que la diversidad de la secuencia entre isoformas dentro de la misma especie puede dar lugar a diferencias locales (químicas y topológicas), que en general no afectan al plegamiento de la proteína (Nodelmann et al. 1999).

Es por ello por lo que el modelado de la estructura 3D de cualquiera de las secuencias obtenidas en el presente trabajo responde principalmente a uno de los tres modelos básicos de profilinas de plantas existentes (1CQA, 3NUL y 1G5U). Dichos modelos son bastante similares en términos generales, como muestra la superposición de los Ca, que produce imágenes prácticamente idénticas y solapantes, aunque con cierta variación en la R.M.S. (Fig. 21). Las únicas excepciones a estos modelos generales lo constituyen las secuencias mencionadas anteriormente en este mismo apartado y que se caracterizan por poseer delecciones de 1 y 3 aminoácidos. En este caso, los aminoácidos delecionados causan que el *loop* presente entre la α -hélice H1 (N-terminal) y la lámina β S1 sea de menor tamaño que en las correspondientes secuencias en las que no existen delecciones. Se trata de una mínima modificación en la estructura 3D, que como se indica más adelante, parece poseer mínimas o nulas implicaciones en la función biológica, aunque podría tener alguna mayor implicación en las propiedades alergénicas de la proteína.

Se conoce muy poco acerca de la implicación de las cisteínas en el mantenimiento de la estructura 3D de las profilinas. No parece que las cisteínas sean residuos relevantes para el plegamiento de la proteína y el mantenimiento de la estructura 3D. Alternativamente, diversos autores indican que factores como la presencia de puentes

de hidrógeno, interacciones entre aminoácidos, son mucho más importantes en este aspecto.

En las profilinas humanas se ha descrito la presencia de 3 residuos de cisteína (C12, C15, y C16) en la isoforma II, que se localizan en el *loop* estructuralmente conservado entre la α -hélice H1 y la lámina β S1. De ellas, sólo la C16 está conservada en la isoforma I humana. Se ha propuesto que en el mencionado *loop* se localizaría una red de puentes de hidrógeno que podría tener gran implicación en el mantenimiento de la estructura 3D. Sin embargo la cisteína presente en dicho *loop* no formaría puentes disulfuro, aunque sí contribuiría a la formación de puentes de hidrógeno. (Nodelman et al. 1999).

Las secuencias obtenidas en este trabajo muestran dos cisteínas altamente conservadas en las cinco especies analizadas (C13 y C108). Además, en el olivo han sido localizadas secuencias con una cisteína adicional en la posición C106, así como un clon con una única cisteína (C118).

Al menos en teoría, existiría por tanto un amplio abanico de posibilidades de creación de puentes disulfuro entre cisteínas intra e intercatenarias. Las predicciones realizadas indican que el único enlace intracatenario tolerado, según la resolución del modelo, sería el establecido entre las posiciones C13 y C118 en profilinas con 2 y 3 cisteínas en el caso de *Olea europaea*, así como entre C13 y 115/117 en *Corylus avellana*, *Phleum pratense* y *Zea mays*. Aunque termodinámicamente y estéricamente es bastante probable que dichos enlaces tengan lugar en la realidad, no existen hasta la fecha datos experimentales que confirmen su existencia.

Con respecto a las posibles cistinas intercatenarias, las predicciones realizadas indican que sería tanto estéricamente como termodinámicamente posible la existencia de formas diméricas de profilinas, que se mantendrían unidas a través de puentes disulfuro de tipo C13-C13, C117-C117, C118-C118 y/o C117-C118. No es descartable la formación de estructuras multiméricas, aunque la posible implicación de cistinas en su establecimiento no ha sido analizada. Además de en profilinas humanas (Babich et al.,

1996), se han descrito formas multiméricas de profilinas en *Betula verrucosa* y *Artemisia vulgaris* (Heiss et al., 1996). En la generación de estas formas, es bastante probable la implicación de otros tipos de interacciones (i.e puentes de hidrógeno), dado que estas formas suelen ser resistentes a su segregación mediante tratamientos con agentes reductores (Babich et al. 2005).

Finalmente, la formación de dímeros no es incompatible con la funcionalidad de la proteína. Se ha comprobado que las profilinas humanas I y II, son funcionales en sus formas diméricas, induciendo la polimerización de actina (Lambrechts et al. 1996). Los tetrámeros de profilinas nativas humanas también están implicados en la morfología y señalización celular. La existencia de polímeros de profilinas depende de las condiciones reductoras de los compartimentos de la célula donde éstas se localizan (Buss et al. 1992).

5.4 Las comparaciones de secuencias delimitan claramente el origen filogenético de las profilinas a nivel de especie y familia. Sin embargo el polimorfismo existente dificulta la distinción de relaciones variales.

La metodología utilizada en el presente trabajo para establecer las relaciones filogenéticas ha sido la denominada *Neighbor-joining* (Saitou & Nei 1987), usada normalmente para generar árboles filogenéticos basados en secuencias de ADN o proteínas. Este método está basado en *el criterio de mínima evolución*, considerado adecuado para proteínas muy conservadas y con una divergencia temprana en la evolución como son las profilinas. La principal virtud de este método comparado con otros (i.e. los denominados *maximum parsimony*, *maximum likelihood*, etc.) es su efectividad, ya que permite realizar análisis de grandes cantidades de secuencias, lo cual sería inviable para los otros métodos indicados.

Las comparaciones generadas a partir de las secuencias analizadas en su totalidad son capaces de diferenciar claramente unidades taxonómicas iguales o superiores a la

especie. De esta forma, son distinguibles los clados a los que pertenecen cada una de las cinco especies analizadas y cada una de las tres familias analizadas.

En aquellas especies en las que no se han distinguido variedades (todas salvo el olivo), el resto de propiedades físico-químicas (PM y pI) se mantienen casi constantes dentro de cada cluster, así como los motivos postraduccionales, existiendo alguna pequeña variación en los motivos de fosforilación o miristilación principalmente. Igual ocurre con la estructura 3D de las profilinas: cada tipo de estructura segregá en un clado diferente.

En la única especie del estudio en la que ha hecho distinción del origen varietal de las secuencias (el olivo), el análisis conjunto de todas las secuencias no ha permitido distinguir relaciones intervarietales. En comparación, otro producto génico ampliamente polimórfico y relativamente bien caracterizado, como es el alérgeno mayoritario del polen del olivo Ole e 1, sí que muestra relaciones intra e intervarietales considerablemente claras (Hamman-Khalifa 2008). En el caso de las profilinas, ha sido preciso clasificar de forma previa las secuencias de olivo en agrupaciones con características físico-químicas similares para poder entrever la existencia de similitudes intravarietales y algunas relaciones intervarietales. Las agrupaciones definidas podrían de alguna forma corresponder a las isoformas mayoritariamente presentes en los extractos de las diferentes variedades como se muestra en los inmunoblot incubados con sueros anti-profilinas mostrados en este trabajo. Este extremo precisaría de una comprobación analítica más precisa, que incluiría por ejemplo el uso de técnicas de electroforesis bidimensional y posterior la secuenciación de los spots correspondientes a profilinas discriminados mediante el uso de electroforesis bidimensional. De hecho, podría considerarse que la representación realizada en la Fig. 23, podría corresponder a un gel 2-D virtual.

El presente trabajo se ha limitado al análisis de un media de 3 clones de profilina por variedad de olivo. Es por ello posible que algunas de las isoformas presentes en el polen de cada variedad no hayan sido captadas en el presente estudio, especialmente

aquellas con menor abundancia relativa de sus mRNAs. De esta forma, la información disponible puede no ser suficiente para generar una separación cladística fiable, para la que sería necesaria la obtención de secuencias adicionales.

5.4. El polimorfismo de las profilinas refleja probablemente su multifuncionalidad

La diversidad de isoformas de profilinas se manifiesta a su vez en diferentes afinidades por ATP, actina y PLP (Staiger et al. 1993; Gibbon et al., 1997, 1998). Es la interacción con éstos y otros ligandos lo que constituye la base de la funcionalidad de estas proteínas (Jockusch et al., 2007). Por tanto, la coexpresión de numerosas isoformas de profilinas parece constituir un mecanismo capaz de ampliar las diferentes respuestas del citoesqueleto o las múltiples señales en respuesta al estrés (Meagher et al. 1999a) entre otras funciones.

A continuación se detallan algunas de las implicaciones del polimorfismo de las secuencias analizadas sobre los tres tipos de interacciones más relevantes de estas moléculas:

El análisis de los aminoácidos implicados en la interacción de las profilinas con la molécula de actina ha revelado que existe una identidad de prácticamente un 100% en las cinco especies analizadas (Tabla 22). Este nivel de conservación cercano al 100% también tiene lugar de forma frecuente entre organismos relacionados filogenéticamente. Cuando se comparan organismos filogenéticamente más alejados, los residuos potencialmente implicados en la interacción disminuyen sustancialmente su nivel de conservación, con excepción de K88 y G121 que se mantienen en una gran variedad de especies (Thorn et al. 1997).

Dada la frecuente coevolución de los genes de la actina y de las proteínas ABP, sería por tanto también esperable una elevada conservación de las moléculas de actina (Shelterline & Sparrow 1994). No se dispone de datos sobre genes de actina y su posible polimorfismo en las especies analizadas en este trabajo. Sin embargo, en

Arabidopsis, sí existe evidencia de la existencia de varios tipos de actina, que podrían ser diferencialmente reconocidas por distintas isoformas de profilinas y otras ABPs como ADF/cofilina (Kandasamy et al. 2007).

Hay que tener en cuenta que la interacción profilina-actina al menos en plantas no se basa únicamente en la existencia de los mencionados residuos conservados, sino que depende especialmente de la presencia de una conformación 3D particular denominada “binding pocket” que, junto con los residuos indicados forma parte de la superficie de interacción entre actina y profilina. Dicha superficie de interacción no se considera conservada en plantas (Thorn et al., 1997). El reconocimiento diferencial entre diversas isoformas de actina y profilina podría tener importantes efectos sobre la función del citoesqueleto. Un ejemplo extremo de esos posibles efectos ha sido recientemente descrito por Kandasami et al., (2007). En dicho ejemplo, plantas transgénicas de *Arabidopsis* que expresan elevados niveles de una actina reproductiva en tejidos vegetativos muestran síntomas de enanismo severo, así como organizaciones aberrantes de diversos órganos, como consecuencia de la alteración de la arquitectura del citoesqueleto. Estas alteraciones son atribuidas por los autores a interacciones inapropiadas entre la actina reproductiva y distintas ABPs vegetativas endógenas, entre las que estarían incluidas las profilinas.

En el caso de las secuencias analizadas en este trabajo, el denominado “binding pocket” está delimitado por dos *loops*, que forman una cavidad entre las láminas β 4-5 y 5-6. Se ha comprobado que en las cinco especies analizadas, parte de los aminoácidos que configuran esta cavidad (D53, G58, I73 y R84) están conservados, mientras que el resto de aminoácidos que la configuran sí muestran polimorfismo. Por tanto, serían predecibles una serie de diferencias entre las profilinas codificadas con respecto a la interacción entre profilina y actina. Es importante destacar que todas estas modificaciones también afectarían a la cinética de la hidrólisis de ATP-actina.

Todas las profilinas se unen a PLP y proteínas ricas en motivos de prolina, con excepción de las profilinas de algunos virus (Machesky et al. 1994).

La importancia de la interacción de las profilinas con PLP y proteínas ricas en motivos de prolina ha sido investigada en maíz mediante la generación de mutantes con sustituciones en un único aminoácido del dominio de interacción (Kovar et al., 2001). En algunos de estos mutantes se produce un incremento de la capacidad de unión a PLP, que tiene como resultado un incremento paralelo en la tasa de desplazamiento nuclear de ciertas células de *Tradescantia*. Estos autores proponen que la unión Profilina-PLP contribuye a regular el efecto de las profilinas sobre el ensamblaje de actina en las células vegetales.

La interacción profilina-PLP/proteínas ricas en prolina (y por tanto, indirectamente la interacción profilina-actina) parece estar regulada a su vez mediante mecanismos de fosforilación (Sathish et al., 2004; Aparicio-Fabre et al., 2006).

En las cinco especies analizadas en este trabajo, el análisis de este motivo de interacción ha revelado que existe una identidad del 100% (Tabla 23). Esta elevada conservación ha sido también constatada en numerosas especies, y se mantiene incluso entre organismos filogenéticamente muy distantes.

Aunque los residuos de este motivo no muestran polimorfismo, cabe destacar que existen dos residuos (Y6 e Y 125) susceptibles de fosforilación en dichos motivos (Tablas 23 y 24). La fosforilación diferencial de éstos podría constituir una forma de regulación, con influencia potencial en la dinámica del citoesqueleto de actina y en el tráfico de vesículas (Aparicio-Fabre et al., 2006).

El análisis de los aminoácidos implicados en la unión con las distintas moléculas de PIP ha revelado en este caso una mayor variabilidad que los motivos de interacción con actina y PLP indicados anteriormente (Tabla 19). La variabilidad es dependiente en muchos casos de la especie estudiada (o de la variedad estudiada en el caso del olivo).

El polimorfismo se localiza principalmente en una de las 2 regiones de las profilinas que interaccionan con PIP₂. Esta región está situada cerca del sitio de unión con poli-L-prolina (Schluter et al. 1997), y lejos de la zona de solapamiento entre las regiones de interacción con PIP₂ y actina.

Diversos experimentos de mutagénesis han mostrado que los cambios de ciertos aminoácidos de esta región de interacción son capaces de aumentar o disminuir la afinidad de las profilinas por PIP (Skare & Karlsson 2002). Si extrapolamos estas mutaciones a los cambios encontradas en las especies analizadas (Tabla 25), podríamos realizar una serie de predicciones. Por ejemplo, la variación en la carga de los aminoácidos R136 a D136 (este cambio tiene lugar de forma natural en *Olea europaea* y *Corylus avellana*) produciría una disminución de la afinidad por PIP₂. Idéntico efecto sería producido por el cambio de un aminoácido cargado a neutro (D8 a A8) (este cambio tiene lugar de forma natural en *Olea europaea*).

Las numerosas modificaciones observadas fruto del polimorfismo, provocarían la existencia de variantes de profilinas en las especies y variedades estudiadas, con propiedades bioquímicas y fisiológicas diferentes.

Como ejemplo, cabe citar que la estabilidad de los dímeros actina-profilina está ampliamente influenciada por la afinidad entre las profilinas y PIP. Ello se debe a que ambas moléculas (PIP y actina) “compiten” por las moléculas de profilina, ya que los dominios de interacción con ambas moléculas son solapantes (Lassing & Lindberg 1985). Esta interacción podría ser uno de los nexos de unión entre el control de la polimerización de actina y los procesos involucrados con la transmisión de señales (Sohn & Goldschmidt-Clermont 1994; Schluteret al 1997).

5.5. Es previsible una gran influencia de la conservación y del polimorfismo de las profilinas sobre la presencia de reacciones cruzadas y sobre la especificidad de la reacción alérgica en los pacientes hipersensibles, respectivamente.

Dos factores caracterizan la alergenicidad de las profilinas.

Por una parte, las profilinas son consideradas panalérgenos, es decir alérgenos presentes en una amplia variedad de fuentes vegetales, siendo responsables de la aparición de numerosas reacciones cruzadas. Esta elevada reactividad cruzada justifica

el uso actualmente creciente de una única profilina (la profilina recombinante de polen de abedul, Bet v 2) para el diagnóstico de esta alergia.

Por otra parte, diversos trabajos han documentado que la reactividad entre profilinas de plantas es sólo parcial. Existen incluso estudios que han revelado que las IgE pueden incluso diferenciar específicamente epitopos variables de profilinas de plantas, incluso de la misma familia.

El polimorfismo es una característica frecuente en muchas proteínas alergénicas. Se han descrito diferentes grados de polimorfismo en los alérgenos de distintas fuentes, entre las que se incluyen los ácaros del polvo, alimentos y alérgenos del polen de distintas especies arbóreas y herbáceas. Sin embargo, y aunque este polimorfismo alergénico comienza a ser detallado en profundidad, se conoce relativamente poco de las causas que lo originan. En algunos casos, el polimorfismo alergénico ha sido atribuido a la presencia de familias multigénicas. En otros alérgenos, la presencia de múltiples formas del alérgeno puede ser explicada por la existencia de modificaciones postraduccionales. En manzano (*Malus domestica*), han sido caracterizados hasta 18 genes Mal d 1, y se considera que las diferencias en alergenicidad que poseen distintos cultivares de la planta pueden deberse a esta amplia diversidad alélica. En olivo, ha sido recientemente demostrado que el polimorfismo del alérgeno Ole e 1 está claramente unido al carácter genético (cultivar) del que procede el polen analizado (Hamman-Khalifa et al., 2008).

El polimorfismo en profilinas y sus implicaciones en la alergia

Las herramientas bioinformáticas están transformando el campo de la predicción de la alergia, proporcionando bases de datos y herramientas para su predicción y gestión, tal como algoritmos basados en motivos estructurales y secuenciales (Brusic et al. 2003; Fiers et al. 2004).

Una serie de bases de datos de alérgenos ha sido creada, donde algunas de ellas muestran ambos tipos de motivos:

Bcipep, <http://www.imtech.res.in/raghava/bcipep> (Saha et al. 2005)

Consurf, <http://consurf.tau.ac.il> (Landau et al. 2005)

Allergen, <http://www.allergen.org>

Allergenome, <http://www.allergome.org>

Allergenonline, <http://www.allergenonline.com>

SDAP, <http://fermi.utmb.edu/SDAP>

Procall, <http://www.ifr.ac.uk/protall>.

El estudio de la predicción de la alergenicidad (Stadler & Stadler 2003; Who 2001; Zorzet et al. 2002) ha dado como resultado una serie de motivos o rasgos superficiales, comunes en la estructura de la gran mayoría de los alérgenos (Furmonaviciene et al. 2005). Esto se basa en una alta hidrofobicidad por parte de los residuos aminoacídicos que los componen y una buena accesibilidad a la región de la proteína, que se corresponde con los picos de alergenicidad elevada, y coincide en regiones con α -hélices, láminas β o giros β .

El estudio de perfiles de elevada antigenicidad predictiva de todas las secuencias de profilinas, basados en los parámetros ya mencionados, ha mostrado una prominente similitud en las cinco especies estudiadas. En el olivo existen dos regiones no comunes entre las especies (B1 y B2), y una en *Phleum pratense* (B3) de baja variabilidad, las cuales podrían ser un carácter distintivo en aquellas profilinas que las posean.

El estudio de la variabilidad en las regiones comunes ha mostrado que la A2 (posición 16-22), es la más variable, alcanzando un 42.55 % en *Olea europaea* (Fig. 31). A nivel de cultivar hemos observado que dos secuencias en Bella de España poseen un polimorfismo muy elevado y distintivo de las demás. Esta región coincide con uno de los loops externos, característicos de profilinas de plantas. En el caso del olivo y debido a su elevado polimorfismo este podría ser uno de los factores que diferencia a unas variedades de otras en relación con su mayor o menor carácter alergogénico. Otras diferencias con respecto al resto de las especies, consisten en: a) la existencia de una delección de un aminoácido en las secuencias de *Betula verrucosa* y 8 delecciones de las secuencias de *Corylus avellana* en la región del loop. Esto podría hacer que se vea

acortado el loop, siendo menos prominente hacia el exterior de la proteína, e incluso que desaparezca en determinadas variantes de profilinas; b) la existencia de una delección de 3 aminoácidos en la misma región donde se encuentra el *loop* en dos secuencias de *Corylus avellana*, y en todas las secuencias de *Phleum pratense* y *Zea mays*, además de los 13 clones de profilinas de *Olea europaea*. Esto podría propiciar que en estas especies o variedades, la antigenicidad de las profilinas sea significativamente menor.

Lo que hace que una proteína sea reconocida como un alérgeno se podría considerar cuando: a) los motivos aminoacídicos están compuestos por una alta proporción de *residuos de naturaleza fundamentalmente hidrofóbica expuestos en la superficie de la proteína* (Furmonaviciene 2005). Esto ocurre en alergenos de tipo profilinas, LTPs y proteínas de almacenamiento de semillas (Seong & Matzinger 2004) y b) *la polimerización de proteínas* como es el caso de profilinas en polen de diferentes especies durante la fase inicial de la respuesta alérgica (sensibilización en el primer contacto), podría explicar que proteínas altamente conservadas como las profilinas y que comparte similitudes con homólogos muy distantes filogenéticamente (profilinas humanas), sean capaces de inducir una respuesta inmune significativa (Valenta et al. 1991).

Los puentes disulfuro podrían representar uno de los principales mecanismos de las profilinas para su asociación, aunque no está clara su formación; tampoco se conocen las posibles combinaciones que podrían establecerse entre cisteínas, intra y/o intercadenarias, para dar lugar a los puentes disulfuro. No se descartan otros posibles mecanismos para su asociación como son interacciones hidrofóbicas e iónicas entre moléculas de profilina. En todas las secuencias analizadas de las cinco especies, se han encontrados dos cisteínas, una en el extremo C-terminal y otra en el N Terminal, a excepción de una secuencia con una cisteína (C118) o 3 cisteínas (C13, C106 y C118) en el olivo.

Mediante modelización molecular y midiendo la distancia entre C α de cisteínas (Tabla 15), se ha mostrado que en secuencias de olivo con 2 o tres cisteínas, los residuos mas

probables entre los que se podrían formar puentes disulfuro serían el 13 y el 118 en el olivo. Teniendo en cuenta la resolución de los modelos 3D utilizados (1G5U), Esto tampoco sería descartable en las especies *Corylus avellana* y *Phleum pratense*, así como en todas las secuencias de *Zea mays*. También existe la posibilidad de que se establezcan puentes disulfuro entre dos profilinas (homodímero), según el modelo 1G5U (Fig. 20) entre los carbonos 117-117 y 118-118, así como entre 117-118 (Tabla 16) de las α -hélices N y C terminal (Fig. 20). Por último, la formación de multímeros de profilinas no sería incompatible con las funciones llevadas a cabo por éstas a través de la interacción con sus ligandos (Jonckheere et al. 1999).

Existen evidencias por inmunolocalización de que las profilinas de plantas pueden salir al espacio extracelular, como ocurre cuando el polen se hidrata (ref), ya que durante la germinación *in vitro* del polen una cantidad sustancial de profilinas son liberadas del grano de polen y forman oligómeros (Mitterman et al. 1998). De igual modo, en individuos atópicos cuando se produce el contacto del polen u otra fuente que contenga profilinas con las mucosas, las proteínas son liberadas y expuestas a condiciones oxidantes en la superficie de la membrana de la mucosa del tracto respiratorio (Valenta et al. 1991, 1992; Vallier et al. 1992). Estas condiciones conducen a la polimerización de profilinas, afectando a la inmunogenicidad de esta proteína. Estos multímeros de proteínas podrían exhibir antígenos grandes o epítopos adicionales para eliciar la liberación mediada por IgE de una gran cantidad de histamina, por lo que los polímeros de profilinas representan uno de los agentes sensibilizantes importantes en la alergia al polen. La presencia de estos multímeros de profilinas se ve confirmado por experimentos de inmunización, demostrándose que las profilinas de abedul inducen la respuesta IgG-subclase 2 (IgG2) en ratón y mono rhesus, típica de antígenos poliméricos (Vrtala et al. 1996). La isoforma de profilina de maíz ZmPRO1 da lugar a formas multiméricas que persisten incluso después de la desnaturalización y de actuar los agentes reductores, de manera similar a lo que ocurre en profilinas nativas

humanas (Babich et al. 1996). De este modo se prueba la existencia de los multímeros de profilinas de plantas y su relevancia alergénica.

El reconocimiento de multímeros de profilinas de plantas no es debido a un simple efecto aditivo, sino que los multímeros de profilina más bien actúan en sinergia para facilitar el acceso estérico a los sitios de unión o presentar epítopos únicos (Psaradellis et al. 2000).

Implicaciones de epítopos de células B y T de profilinas en la alergia

Los alérgenos son proteínas que provocan una respuesta muy potente de linfocitos Th₂, culminando en la producción de anticuerpos IgE, que desencadenan una serie de síntomas de alergia. Sería de gran interés, la caracterización de la naturaleza de la superficie molecular de proteínas alergénicas, así como los mecanismos involucrados en su reconocimiento inicial, que conduce a una respuesta polarizada hacia células Th₂, mediante células del sistema inmune.

La respuesta mediada por IgE juega un papel principal en la reactividad cruzada entre alérgenos y la sintomatología de alergia (Aalberse et al. 1992). También se ha demostrado que la reactividad cruzada ocurre independientemente de IgE, estando mediada por células T. Un ejemplo lo tenemos en la reactividad a alérgenos de alimentos de origen vegetal (Mal d 1, Api g 1 y Dau c 1) con el alérgeno Bet v 1 de polen. En los primeros se ha visto que los alimentos tanto frescos como cocinados en que se pierden los epítopos conformacionales, inducen una activación de células T y los síntomas mediados por ellas; las reacciones mediadas por células T también ocurren en ausencia de la unión a IgE (Bohle et al. 2003).

El análisis de la superficie de diversos alérgenos, ha revelado características estructurales comunes. Hasta el momento sólo se conoce un limitado número de epítopos, sin embargo se ha visto que los de las células T son lineares (motivos continuos de entre 8 a 24 aminoácidos), mientras que los epítopos de células B pueden ser lineales o conformacionales (residuos concretos dentro de la estructura primaria de

la proteína, que en la conformación 3D se localizan próximos a la misma región de la proteína) (Langeveld et al. 2001). Cuando se lleva a cabo la construcción de epítopos conformacionales de profilinas (Tabla 35), vemos como los epítopos de células B experimentalmente determinados (Tabla 32 y 33), consisten en fragmentos continuos, donde la mayoría de ellos coinciden de forma parcial con parte de los epítopos conformacionales. Del mismo modo, los epítopos de células T (Tabla 36) son fragmentos de la secuencia aminoacídica donde parte de la secuencia forma parte de epítopos conformacionales, tanto de forma continua como discontinua. El análisis de epítopos conformacionales ha revelado su existencia en ambos tipos de células T y B. Igualmente la exposición hacia el exterior de parte de un epítopo perteneciente a células B y T con una gran proporción de aminoácidos hidrofóbicos, está de acuerdo con que existe una mayor dependencia del reconocimiento de las porciones hidrofóbicas de estos epítopos pertenecientes a los alérgenos (Seong & Matzinger 2004). Esto depende de una conformación determinada, más que la secuencia exacta de aminoácidos como ocurre con los epítopos conformacionales (Berezovskiy & Trifono 2000).

Según nuestros resultados se pueden deducir los siguientes hechos:

1. Los picos de antigenicidad predictiva elevada no coinciden con los epítopos de reconocimiento por células B, con la excepción de uno de ellos (A7).
2. Cuando se comparan entre especies, ciertos epítopos de reconocimiento por células B no poseen elevada homogeneidad en la identidad de la secuencia aminoacídica, siendo mayor homogeneidad entre variedades de olivo.
3. La comparación de los picos de “antigenicidad elevada” con los epítopos de células T y B en las cinco especies analizadas, muestra que la mayor parte de estos picos coinciden con epítopos mayoritarios de células T del conjunto de secuencias de profilinas, con excepción del pico A1, que coincide con un epítopo de células T minoritario.
4. El pico A2 de alergenicidad predictiva elevada, que es el de mayor variabilidad en *Olea europaea*, no coincide con epítopos de reconocimiento por células T y B,

encontrándose situado en una región donde existe un *loop* característico de plantas. El epítopo A2 forma un epítopo conformacional único en el modelo 1G5U y en el 3NUL.

5. Otra de las características que distinguen a las profilinas de plantas del resto es una cavidad rellena de solvente cerca de la superficie de unión a actina formado por dos *loops* y situada entre el aminoácido 54 y 83 (Thorn et al. 1997), donde no existe ningún epítopo de reconocimiento es por células B. En todas las especies analizadas, sólo se encuentran en esta estructura epítopos de reconocimiento por células T, la cual podría ser una de las regiones de mayor inmunogenicidad de profilinas de plantas.
6. El análisis de los epítopos únicos para células T, muestra diferencias dentro de las profilinas de las familias *Betulaceae* y *Poaceae*. En el primer caso, *Betula pendula* posee un epítopo (F41-F44) que no se encuentra en *Corylus avellana*, mientras en el segundo caso, existen 2 epítopos únicos en cada especie.
7. Por último, en el caso del olivo, el epítopo I53 no se encuentra en *Betula verrucosa*, *Corylus avellana* y *Phleum pratense*, aunque si en *Zea mays* de forma parcial con el epítopo F59.

Estos datos pueden explicar en el proceso de alergia, el papel llevado a cabo por las dos vías del sistema inmune, una dependiente de células T y mediada por receptores MHC II, y la otra con la implicación de IgE/IgG mediada por células B.

Los epítopos de células B, explicarían algunos síntomas de alergia respiratoria y su reactividad cruzada mediada por IgE entre especies, (Aalberse et al. 2001; kazemi et al. 2002; Pauli 2000; Rossi et al. 2001; Valenta et al. 1996; 1998). Por ejemplo, las profilinas de *Mercurialis annua*, Mer a 1, comparten epítopos con profilinas de *Helianthus agnus*, Hel a 2, siendo ambas reconocidas por células B. Ambas profilinas, poseen además dos regiones correspondientes a epítopos secuenciales para IgE (1-50 y 107-133) (Vallverdú et al. 1997). Sin embargo, en el caso de las especies analizadas, el factor diferenciador en los motivos de reconocimiento por células B es el polimorfismo de la secuencia aminoacídica. Por otro lado, este polimorfismo es un carácter distintivo entre

determinadas variedades de olivo, debido a la presencia de variabilidad diferencial en alguno de sus epítopos (10A4 y 5F2).

Otra vía para el reconocimiento de epítopos de las profilinas es la seguida por células T, importante en la sensibilización inicial al alérgeno, debido a que los picos predictivos de alergenicidad elevada coinciden con ellos, los cuales juegan un importante papel en las reacciones cruzadas entre pólenes de diferentes especies, así como entre alérgenos de polen y alimentos de origen vegetal (Bohle et al. 2003).

Se puede inferir que existen epítopos predominantes y/o exclusivos de células T, involucrados en la reactividad cruzada entre alérgenos de polen de diferentes especies, así como entre polen y alérgenos de alimentos de origen vegetal (Bohle et al. 2006). Esto es posible en profilinas, debido a que la reactividad cruzada entre alérgenos como Bet v 1 y Mal d 1 está restringida a un solo epítopo, localizado en la región C-terminal de Bet v 1, y que a su vez está muy conservada entre diferentes especies. Sin embargo, entre Bet v 1 y Api g 1, la reacción cruzada está asociada con varios epítopos de células T repartidos por la secuencia aminoacídica de Bet v 1. Si extrapolamos estos datos a las especies estudiadas aquí esto es lo que ocurre en las familias *Betulaceae* y *Poaceae* según se acaba de indicar (punto 6.). Además de que cada especie tenga un carácter alergénico diferencial, esta diferencia de epítopos podría explicar el que determinados alérgenos produzcan reacciones cruzadas de forma exclusiva con determinadas especies.

Profilinas y reacciones cruzadas

Uno de los mayores retos de la alergia molecular, es predecir el potencial alergénico de una proteína, particularmente en los nuevos alérgenos. En este sentido hay que distinguir dos aspectos: *la inmunogenicidad* que refleja el potencial de una proteína para inducir anticuerpos IgE, y *la reacción cruzada* que es la reactividad de anticuerpos IgE (generalmente preexistente) con la proteína diana. Además, la relación entre el potencial de unión a IgE y los síntomas clínicos, está influenciada por las propiedades

físicas (estabilidad y tamaño) y las propiedades inmunológicas (afinidad y valencia del epítopo) (Aalberse et al. 2000). La respuesta mediada por IgE juega un papel importante en la reactividad cruzada entre alérgenos y la sintomatología de alergia (Aalberse et al. 1992). Por otro lado se ha demostrado que la reactividad cruzada puede tener lugar independientemente de IgE, estando mediada por sólo células T. Un ejemplo lo tenemos en la reactividad a alimentos de origen vegetal relacionada con el alérgeno Bet v 1 de polen, y de otro lado alérgenos como Mal d 1, Api g 1 y Dau c 1 en alimentos de origen vegetal. En ellos se ha visto que los alimentos tanto cocinados, donde se pierden los epítulos conformacionales, como frescos inducen una activación similar de células T, así como las reacciones mediadas por células T ocurren también en ausencia de unión a IgE (Bohle et al. 2003).

Entre las proteínas alergénicas causantes de las reacciones cruzadas se incluyen profilinas, LTP, alérgenos de elevado peso molecular y/o glicoalérgenos (Egger et al. 2006). El polen se considera la fuente primaria de sensibilización (Hoffmann-Sommergruber et al. 1999; Valenta et al. 1996), que lleva a la generación de anticuerpos IgE, capaces de reaccionar con los alérgenos homólogos de alimentos (Valenta & Kraft 1996; Kazemi-Shirazi et al. 2000). En el polen, la reactividad cruzada es muy frecuente tanto entre especies taxonómicamente relacionadas (Pajarón et al. 1997) o no (Cuesta-Herranz et al. 1999). La asociación entre polinosis y sensibilización a alimentos de origen vegetal, ha sido demostrada en numerosas ocasiones, ya que pacientes con polinosis, frecuentemente poseen reacciones adversas después de la ingestión de éstos, debido a que sus respectivos alérgenos comparten estructuras o motivos.

Existen diferentes hipótesis que explican la asociación entre polinosis y sensibilización a alimentos procedentes de plantas: a) la más aceptada, se basa en el reconocimiento de estructuras comunes del polen y de alimentos vegetales por las inmunoglobulinas IgE. (Vieths et al. 2002); b) una segunda implica en el reconocimiento de alérgenos en polen y alimentos a las posibles presentes en ambos lectinas (Shibasaki et al. 1992; Aalberse et al. 1997).

Los datos disponibles indican que las profilinas de plantas pueden provocar una sensibilización cruzada de un individuo a varias especies y esto explica el por qué algunos pacientes atópicos al polen muestran reacciones frente a una amplia variedad de pólenes y alimentos de origen vegetal filogenéticamente distantes (Ma et al. 2006; Rodríguez-Pérez et al. 2003); no tienen incluso que poseer una identidad de secuencia muy elevada los alérgenos como es el caso de homólogos del alérgeno Bet v 1 en zanahoria (50%) para exhibir diferencias de unión a IgE y reactividad cruzada sin relevancia clínica (Ballmer-Weber et al. 2003); también es el caso de los alérgenos mayoritarios de *Plantago lanceolata* y *Olea europaea* (Pla 1 y Ole e 1) que comparten un 38.7% de identidad y existe un reconocimiento cruzado entre ellos, debido a que comparten epítopos comunes (Castro et al. 2007). En el caso de las profilinas, la identidad de secuencia es mayor del 50%.

En el presente trabajo, se ha mostrado:

1. La existencia de reacción cruzada entre profilinas de olivo y sueros anti-profilinas de maíz, con diferencias en la reactividad dependiendo incluso del cultivar o de la isoforma de profilina. También se ha mostrado el reconocimiento diferencial, dependiendo del cultivar, de profilinas vegetativas de semillas de olivo que formarían parte de alimentos de origen vegetal, al menos para animales con antisueros.
2. Los picos de elevada antigenicidad en las cinco especies analizadas son muy similares entre ellas, aunque existen diferencias en algunos de los picos, consistentes en una mayor o menor hidrofobicidad, antigenicidad y accesibilidad (Fig. 27), fruto de las diferencias en la composición aminoacídica de cada pico, o lo que es lo mismo el polimorfismo de la secuencia, dentro de cada especie o cultivar así como entre especies (Tabla 29-31).
3. Los epítopos de reconocimiento por células B, son iguales o muy similares en las secuencias de profilinas dentro de la misma especie o dentro del mismo cultivar (con excepción del epítopo 10A4 que posee mayor variabilidad entre cultivares dentro del

olivo), así como entre profilinas de diferentes especies. De nuevo las diferencias existentes provienen del polimorfismo intravarietal e interespecífico.

4. Entre las especies se comparte menor número de epítopenos para células T. Con estos datos, se puede explicar que podría existir reacción cruzada entre las especies analizadas, respecto a las profilinas, incluso aquellas más alejadas filogenéticamente como se ha comprobado, debido a que comparten numerosos epítopenos, unos comunes a todas las especies (reconocimiento por células B) y cuya variación de la secuencia aminoacídica produce diferencias de reconocimiento (Asturias et al. 1997) y otros comunes solamente entre algunas de las especies (reconocimiento por células T).

La localización de profilinas es dependiente de la isoforma y la función

La información que se tiene acerca de la localización celular de profilinas tanto en microsporas (von Witsch et al. 1998), como en granos de polen y tubos polínicos (Grote et al. 1995; Vidali & Heppler 1997; Valster et al., 2003) es de lo más diversa (Geitmann & Emons 2000). En el núcleo generativo y vegetativo del grano de polen (Hess et al. 1995), mientras que otros autores muestran que las profilinas están distribuidas uniformemente en el citoplasma del polen y del tubo polínico (Grote et al. 1993, 1995; Mittermann et al. 1995; Vidali et al. 1997). Además en estos trabajos no se han tenido en cuenta la presencia de diversas isoformas de profilinas mediante el uso de antisueros específicos para ellas, por lo que los resultados pueden haberse visto enmascarados debido a la presencia abundante de una isoforma con una distribución citosólica, frente a otras formas minoritarias con una distribución subcelular distinta.

Estudios semejantes, tomando como modelo la raíz, muestran como las profilinas se distribuyen de manera polarizada en pelos radicales de *Arabidopsis thaliana* (Santoni et al. 1998) y *Zea mays* (Braun et al. 1998; von Witsch et al. 1998; Baluska et al. 2000), con una marcada acumulación en el ápice dependiendo del estado de desarrollo (Baluska et al. 2001). Los resultados mostrados en este trabajo indican una localización diferencial de las profilinas, dependiendo de la isoformas presentes en la célula.

En general, se puede afirmar que las predicciones por métodos computacionales de la posible localización de las profilinas, basados en estudios de localización con proteínas eucariotas (Emanuelsson et al. 2007) coinciden con los resultados de las inmunolocalizaciones realizadas en este estudio.

Localización nuclear de profilinas

La probabilidad de localización nuclear de profilinas está entre el 20-35 % dependiendo de la especie. Concretamente en *Olea europaea* es más elevada que en el resto de las especies analizadas, con algunas secuencias en que es más baja (Tabla 40A). En cambio, en *Phleum pratense* en que la probabilidad de localización nuclear es más baja, existen algunas secuencias con una mayor probabilidad de localización nuclear (Tabla 40B). Todo esto aparentemente no parece estar relacionado con los cambios puntuales en el motivo típico de localización nuclear en plantas de algunas secuencias (I/L → A) (Yoneda 1997), puesto que su variabilidad es baja en las cinco especies. Los experimentos de inmunolocalización en el caso de anti-ZmPRO4 y 5 confirman la predicción de la localización nuclear de profilinas en el polen de olivo. Es posible que tal acumulación sea la consecuencia de una difusión pasiva debido al pequeño tamaño de la proteína que le permite pasar a través de los complejos del poro nuclear (Yoneda 1997); la proteína se une a determinados componentes nucleares, evitando su posterior salida del nucleo. Sin embargo, también habría que tener en cuenta un posible proceso activo y selectivo mediante una señal de localización nuclear no clásica y/o quizás otros elementos tales como proteínas de tipo importinas (Yoneda 1997, Mattaj & Conti 1999). Por otro lado, la localización de las profilinas en el citoplasma podría ser debido a que la mayoría de ellas están secuestradas en el citoplasma mediante la unión a ligandos naturales, y permaneciendo solamente una pequeña fracción libre para poder difundir; o bien, existe un mecanismo de transporte que exporta activamente a las moléculas de actina y profilina hacia el citoplasma (Witke 2004). En células animales, se ha encontrado una proteína tipo exportina, que es específica de profilina (exportina 6) y

que sólo reconoce al complejo actina-profilina, exportandolo fuera del nucleo. Esto demuestra una regulación muy fina de este complejo dentro del nucleo.

En el del núcleo se han localizado varios de los ligandos naturales de profilina como PIP₂ (Voorhout et al. 1992; Divecha et al. 1993; Mazzotti et al. 1995), actina (Schindler & Jiang 1989; Jiang et al. 1997) y otras ABPs, tales como ADF/cofilinas en maíz (Jiang et al. 1997) y CapG (Lu et al. 1998; Rando et al. 2000; Olave et al. 2002). La distribución nuclear sugiere que las profilinas podrían jugar un papel importante en el control de la función de la actina nuclear (Nguyen et al. 1998, Sasseville & Langelier 1998; Gonsior et al. 1999; Rando et al. 2000) y procesos tales como la condensación de la cromatina y la traducción de señales del citoplasma al nucleo (Zhao et al. 1998, Valster et al 2003), así como en la reorganización de la matriz nuclear e incluso estar implicadas en la regulación transcripcional mediante la interacción con factores transcripcionales que poseen motivos ricos en prolina (Hess & Valenta 1997). Tal es el caso del factor de transcripción p42POP, un nuevo ligando para profilinas, cuya actividad es regulada por ellas. Este factor actúa como un represor de la transcripción, con cuya interacción hace que disminuya su actividad represora (Lederer et al. 2004).

Localización de profilinas en el citoplasma y la membrana plasmática

El análisis predictivo que resultó con mayor probabilidad de localización de profilinas fue la citoplásmica. Dicha localización está de acuerdo con la aproximación experimental realizada por otros autores, en la que se midió el pool de profilinas que estaba implicado en la localización en la membrana plasmática, siendo hasta un 80% de ellas (Vidali & Hepler 1997). Esta localización en la membrana plasmática podría ser transitoria, de forma que tras una señal-estímulo extracelular, el *pool* de proteínas quedase libre dirigiéndose hacia el citoplasma para cumplir funciones específicas, mediante la interacción con ligandos específicos, o formar parte de un *pool* genérico de profilinas que lleve a cabo el remodelado del citoesqueleto de actina, lo que se haría debido a la variación de la relación G-actina/profilina, que da lugar al secuestro de

moléculas de G-actina, o permitiendo su adición a extremos libres de filamentos de actina (Staiger & Blanchoin 2006). Esta actividad podría verse modificada por los cambios locales de gradiente de Ca^{2+} (Franklin-Tong 1999), siendo estos más evidentes en el ápice del tubo, donde procesos como endocitosis y exocitosis (Hepler et al. 2001) y el crecimiento de los filamentos de actina (Gibbon et al. 1999) son muy activos. También los resultados de las inmunolocalizaciones realizadas dan un intenso marcado en el ápice del tubo.

En algunas especies existen diferencias notables en las propiedades bioquímicas y de afinidad por determinados ligandos, por parte de isoformas o variantes concretas de profilinas (Staiger et al. 1993), como también es el caso de la afinidad por PLP y G-actina de profilinas vegetativas y reproductivas. Estas últimas inhiben la hidrólisis de $\text{PI}_{4,5}\text{P}_2$ por fosfoinosítidos mas fuertemente que las profilinas vegetativas, proporcionando evidencias indirectas de que las profilinas reproductivas se unen a los fosfoinosítidos de la membrana plasmática con mayor afinidad que las profilinas vegetativas. En este sentido, se ha encontrado una localización de profilinas en la membrana plasmática de polen de abedul y maíz. Los dominios de la membrana plasmática enriquecidos en PIP_2 en determinados tejidos y de forma específica durante el desarrollo, puede actuar como un presunto centro de organización de actina F, donde bajo estímulos externos, la hidrólisis de PIP_2 podría llevar a la disociación de profilinas y otras proteínas de unión a PIP_2 como puede ser la actina, lo que haría que estas pudieran mediar los cambios en la organización del citoesqueleto. De este modo PIP_2 y otras proteínas de unión a actina como efectores de señales extracelulares (Ref.), permitirían la transmisión de señales extracelulares en la membrana plasmática y su posterior traducción vía complejos del citoesqueleto.

Las localizaciones asociadas a la membrana plasmática de profilinas en polen y el posible cambio hacia una distribución citoplasmática en tubo polínico es una de las pruebas a favor de la existencia de sistemas de señalización, donde el cambio en la localización de profilinas tiene lugar dependiendo de estímulos externos (Lassing &

Lindberg 1998; Goldschmidt-Clermont & Janmey 1991). Si tenemos en cuenta que el polen maduro deshidratado es una célula con una actividad basal, al menos una isoforma de profilina podría estar inmovilizada en la membrana a través de uniones con polifosfoinosítidos, y libre del *pool* que mantiene secuestradas a las moléculas de G-actina. Cuando el grano de polen aterriza en el estigma es activado por señales del microambiente de las papillas del estigma y se hidrata. Luego, las profilinas son liberadas de la membrana plasmática y distribuidas en el citoplasma del incipiente tubo polínico en crecimiento (Grote et al. 1995; Vidali & Hepler 1997). De esta forma se prepara a la actina y su dinámica red de filamentos para actuar en el crecimiento del ápice del tubo polínico (Cai et al. 1997).

Las inmunolocalizaciones de profilinas y la cuantificación de las partículas de oro muestran una distribución diferencial en el citoplasma, siendo el marcado más intenso en el caso de anti-ZmPRO3 con respecto a anti-PRA y anti-ZmPRO5 (Tabla 41). También se observa un mayor marcado (el doble) con el suero anti-ZmPRO4 respecto a los dos últimos sueros (anti-PRA y anti-ZmPRO5). Este marcado diferencial es lógico, si se tiene en cuenta que ZmPRO3 es una isoforma reproductiva de maíz. La isoforma ZmPRO3 también se localiza en la apertura del polen por donde emerge el tubo, en la exina y cerca de la membrana plasmática y la cantidad de marcado (número de granos de oro) es similar al mostrado por el suero anti-PRA, aunque mayor que el presentado por los antisuero que reconocen las isoformas vegetativas (ZmPRO4 y ZmPRO5). Además, con todos los sueros utilizados se han encontrado partículas de oro en el material adherido a la exina y fuera del grano. La localización diferencial de profilinas dependiente de la isoforma se ve reforzada por tres argumentos a tener en cuenta en los experimentos de inmunolocalización realizados: a) la especificidad de anticuerpos frente a isoformas concretas de profilinas; b) la mayor o menor reactividad cruzadas entre especies, para los anticuerpos desarrollados frente a epítopos de profilinas de maíz, debido al margen de identidad de secuencias aminoacídicas entre el maíz y el olivo (100 – 76.4%); esto viene apoyado por los experimentos de reacciones cruzadas

entre estos antisueros y diferentes cultivares de olivo (Fig. 41); y c) uso de anticuerpos frente a isoformas vegetativas que se han empleado en las inmunolocalizaciones de profilinas reproductivas de olivo.

Otras localizaciones celulares

Las predicciones de localización en otros orgánulos como mitocondrias y cloroplastos, resultó con una probabilidad baja, entre el 10-15%, dependiendo de la especie (Tabla 39). Existen determinadas excepciones, en las que la probabilidad es aún más reducida. La predicción de localización como proteínas de secreción mostró una probabilidad semejante (alrededor del 10 % de media), aunque en este caso las secuencias que componen la excepción poseen una probabilidad mayor. Sin embargo, en las localizaciones celulares realizadas en este estudio, no se han llegado a detectar en vesículas de secreción, ni tampoco en otros orgánulos rodeados por membrana posiblemente debido a que las profilinas involucradas podrían ser isoformas o variantes minoritarias dentro del *pool* de profilinas en la célula.

En trabajos previos se ha demostrada la interacción de profilinas con la dinamina, proteína que interviene en rutas de secreción y endocitosis de vesículas mediada por clatrina (Schafer 2004; Orth JD & McNiven MA 2003; Engqvist-Goldstein & Drubin 2003; da Costa et al. 2003; Qualmann & Kessels 2002; Brodsky et al. 2001), así como el tráfico de vesículas procedentes del Golgi y la organización de la membrana plasmática (Hinshaw 2000).

Otra localización predictiva de las profilinas, y que no ha sido confirmada por las inmunolocalizaciones, es en microcuerpos tales como peroxisomas. Entre las secuencias de profilinas obtenidas se han encontrado dos, una en olivo (nº 69, cv Picual) y otra en maíz (nº 120), que muestran una secuencia de tres aminoácidos en el extremo C-terminal (128-130 NRA) y que podría dirigir las profilinas a peroxisomas, con una probabilidad similar a la de los orgánulos anteriores. Dos tipos de proteínas se han visto que influyen en el tamaño y abundancia de peroxisomas. Una de ellas son las

proteínas semejantes a dinamina (GTPasas involucradas en el proceso intracelular de fisión) (Hinshaw 2000; Danino & Hinshaw 2001; Praefcke & McMahon 2004), y que al igual que en mitocondrias y cloroplastos, intervienen en la excisión de la membrana peroxisomal, proliferación y división (Thoms & Erdmann 2005). El bajo número de secuencias obtenidas con estos motivos, nos hace pensar que sólo algunas isoformas o variantes minoritarias de profilinas podrían estar involucradas en funciones concretas dentro de los peroxisomas, bien directa o indirectamente a través de su interacción con proteínas ligando.

Las profilinas en el proceso de germinación

Según nuestros resultados de inmunolocalización las profilinas están presentes en la apertura del polen por la que germina el tubo polínico, lo que indica la posible implicación de estas proteínas en la de germinación del polen. Durante el inicio y sucesivos etapas de este proceso, la apertura del grano por donde va aemerger el tubo sufre un proceso morfogénico, en el que el citoesqueleto y proteínas ABPs asociadas tienen un importante papel. El estudio de profilinas en este proceso ha sido poco estudiado (Grote et al 1993), y su localización en la apertura no había sido previamente documentada, siendo los estudios de nuestro grupo los primeros que lo han constatado (Jiménez-López et al. 2005, Morales et al. 2007). Mediante inmunofluorescencia con anticuerpos anti-Ole e 2 se observa una estructura en forma de anillo, alrededor de la región apertural por donde emerge el tubo polínico, que sugiere una masiva presencia de profilinas. Esta no se observa en las otras dos aperturas. Por otro lado inmunolocalizaciones al MET también se observó que había marca de granos de oro en dicha apertura, la exina y fuera del grano, así como en el ápice del tubo. Por otro lado los resultados de esta tesis muestran una localización diferencial de las isoformas según el antisuero utilizado (ver resultados, Tabla 42). El estudio bioquímico realizado durante diferentes etapas de la germinación (resultados, Fig 43), confirman diferencias cualitativas y cuantitativas en las isoformas de profilinas.

CONCLUSIONES

1. La elevada conservación nucleotídica de determinadas áreas en la secuencia de las profilinas permite el diseño de métodos de amplificación de secuencias de mRNA y gDNA de profilinas del polen de diferentes fuentes de forma altamente eficiente.
2. La conservación se localiza en posiciones muy concretas de la molécula, mientras que el resto de posiciones exhiben un alto grado de polimorfismo, especialmente en *Olea europaea*. Este nivel de polimorfismo es superior incluso al mostrado por otros productos génicos del polen considerados hasta ahora como altamente variables; probablemente también afecta a las profilinas de otras numerosas especies.
3. La comparación de las secuencias primarias delimita claramente el origen filogenético de las profilinas a nivel de especie y familia. Sin embargo el elevado polimorfismo existente dificulta el establecimiento de relaciones varietales en el olivo.
4. Uno de los mayores factores generadores de polimorfismo en las profilinas estudiadas, además de las microheterogeneidades de la secuencia primaria, es la presencia de numerosas modificaciones postraduccionales potenciales, especialmente fosforilaciones.
5. La generación de isoformas de profilinas debidas a “procesamiento alternativo” no es previsible al menos en el olivo, puesto que no aparecen intrones en las secuencias analizadas.
6. Las estructuras 3-D de las profilinas en las diferentes especies analizadas se ajustan adecuadamente a los modelos estructurales de profilinas de plantas presentes en las bases de datos, debido a la alta conservación de los residuos clave para la geometría de la proteína. Por otra parte los residuos polimórficos generan pequeñas modificaciones locales en la estructura 2-D y 3-D, las cuales no afectan a la estructura básica del esqueleto carbonado.
7. La presencia de cisteínas en la secuencia no parece ser relevante para el mantenimiento de la estructura 3-D de las profilinas analizadas, aunque podría explicar la presencia de formas diméricas/multiméricas.

8. El polimorfismo descrito puede afectar ampliamente la funcionalidad de las profilinas a través de modificaciones en su capacidad de unión a sus diversos ligandos naturales. En el caso de unión a actina, el polimorfismo afectaría a regiones de las profilinas implicadas indirectamente en la interacción entre ambas proteínas. En el caso de PLP/proteínas ricas en prolina, el polimorfismo modificaría el estado de fosforilación del motivo de interacción. Finalmente, en el caso de la unión a PIP, el polimorfismo afectaría directamente al motivo de interacción.
9. Los motivos conservados en la secuencia de las profilinas son responsables de la amplia presencia de reacciones alérgicas cruzadas entre profilinas de distintas especies y alimentos de origen vegetal.
10. El polimorfismo de las profilinas conduciría por otra parte a la existencia teórica de epitopos continuos y conformacionales diferenciales en estas proteínas, reconocidos por células T y B del sistema inmune humano. Este mecanismo explicaría la presencia de reacciones específicas a determinadas isoformas de profilinas por parte de los pacientes alérgicos.
11. Los resultados experimentales obtenidos confirman diversos aspectos predichos sobre la base del análisis de las secuencias primarias que incluyen: a) la presencia de distintas isoformas de profilinas, b) la reactividad diferencial de las distintas isoformas a distintos antisueros, y c) la amplia localización celular de las profilinas.

BIBLIOGRAFÍA

A

- Ahlholm J.U., Helander M.L., Savolainen J. 1998. Genetic and environmental factors affecting the allergenicity of birch (*Betula pubescens* ssp. *czerepanovii* [Orl.] Hämet-ahti) pollen. *Clinical experimental allergy* 28(11): 1384-8
- Alché J.D., Castro A.J., Jiménez-López J.C., Morales S., Zafra A., Hamman-Khalifa A.M. and Rodríguez-García M.I. 2007. Differential characteristics of olive pollen from different cultivars: biological and clinical implications. *Journal investigational allergology and clinical immunology* 17 (Suppl 1):17-23
- Alché J.D., Castro A.J., Olmedilla A., Fernandez M.C., Rodriguez R., Villalba M. and Rodriguez-Garcia M.I. 1999. The major olive pollen allergen (Ole e I) shows both gametophytic and sporophytic expression during anther development, and its synthesis and storage takes place in the RER. *Journal of cell science* 112 (15): 2501-2509
- Alché J.D., Castro A.J. and Rodríguez-García M.I. 2002. Localization of transcripts corresponding to the major allergen from olive pollen (Ole e I) by electron microscopic non-radioactive in situ RT-PCR. *Micron* 33 (1): 33-37
- Alché J.D., Cismondi I.A., Castro A.J., Hamman-Khalifa A.M. and Rodríguez-García M.I. 2003. Temporal and spatial gene expression of ole e 3 allergen in olive (*Olea europaea* L.) pollen. *Acta biologica cracoviensis series botanica* 45(1): 89–95
- Alché J.D., Corpas F.J., Rodríguez-García M.I. and del Río L.A. Identification and immunolocalization of superoxide dismutase isoenzymes of olive pollen *Physiologia plantarum* 104(5): 772-776
- 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 and cell physiology* 45(9): 1149-1157
- Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W. & Lipman D.J. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215: 403-10

- An Y.Q, Huang S., McDowell J.M., McKinney E.C. & Meagher R.B. 1996. Conserved expression of the *Arabidopsis* ACT1 and ACT3 actin subclass in organ primordia and mature pollen. *Plant cell* 8, 15–30
- An Y.Q., Qiang Y., McDowell J.M., Huang S., McKinney E.C., Chambliss S. & Meagher R. B. 1996. Strong, constitutive expression of the *Arabidopsis* ACT2/ACT8 actin subclass in vegetative tissues. *Plant journal* 10, 107–121
- Archer S.J., Vinson V.K., Pollard T.D. & Torchia D.A. 1994. Elucidation of the poly-L-proline binding site in *Acanthamoeba* profilin I by NMR spectroscopy. *FEBS letter* 337(2): 145-51
- Argyrous G. 2005. Statistics for Research: With a Guide to SPSS, Second Edition, SAGE UK, London
- Asturias J.A., Arilla M.C., Gómez-Bayón N., Aguirre M., Martínez A., Palacios R. & Martínez J. 1998. Cloning and immunological characterization of the allergen *Hel a 2* (profilin) from sunflower pollen. *Molecular immunology* 35(8):469-78
- Asturias J.A., Arilla M.C., Gómez-Bayón N., Martínez J., Martínez A. & Palacios R. 1997. Cloning and expression of the panallergen profilin and the major allergen (*Ole e 1*) from olive tree pollen. *Journal of allergy and clinical immunology* 100(3):365-72
- Asturias J.A., Gómez-Bayón N., Arilla M.C., Sánchez-Pulido L., Valencia A. & Martínez A. 2002. Molecular and structural analysis of the panallergen profilin B cell epitopes defined by monoclonal antibodies. *International immunology* 14(9):993-1001
- Asturias J.A., Ibarrola I., Bartolomé B., Ojeda I., Malet A. & Martínez A. 2002. Purification and characterization of *Pla a 1*, a major allergen from *Platanus acerifolia* pollen. *Allergy* 57(3): 221-7
- Asturias J.A., Ibarrola I., Eseverri J.L., Arilla M.C., González-Rioja R. & Martínez A. 2004. PCR-based cloning and immunological characterization of *Parietaria judaica* pollen profilin. *Journal investigational allergology and clinical immunology* 14(1): 43-8

Asturias J.A., Ibarrola I., Fernández J., Arilla M.C., González-Rioja R. & Martínez A. 2005. Pho d 2, a major allergen from date palm pollen, is a profilin: cloning, sequencing, and immunoglobulin E cross-reactivity with other profilins. *Clinical and experimental allergy* 35(3): 374-81

B

- Baird W.V. & Meagher RB. 1987. A complex gene superfamily encodes actin in petunia. *EMBO journal* 6: 3223–3231
- Baldi P., Cheng J. & Vullo A. 2005. Large-Scale prediction of disulphide bond connectivity. Advances in neural information processing systems (NIPS 2004) 17, L. Saul, Y. Weiss, and L. Bottou editors, MIT press, pp.97-104, Cambridge, MA
- Ballmer-Weber B.K., Wangorsch A., Bohle B., Kaul S., Kündig T., Fötisch K., van Ree R. & Vieths S. 2005. Component-resolved in vitro diagnosis in carrot allergy: does the use of recombinant carrot allergens improve the reliability of the diagnostic procedure?. *Clinical and experimental allergy* 35(7):970-8
- Ballmer-Weber B.K., Scheurer S., Fritzsche P., Enrique E., Cistero-Bahima A., Haase T. & Wüthrich B. 2002. Component-resolved diagnosis with recombinant allergens in patients with cherry allergy. *The journal of allergy and clinical immunology* 110(1):167-73
- Baluška F., Jasik J., Edelmann H.G., Salajová T. & Volkmann D. 2001. Latrunculin B-induced plant dwarfism: Plant cell elongation is F-actin-dependent. *Developmental biology* 231: 113-124
- Baluška F.J. & Volkmann D. 2002. Pictures in cell biology. Actin-driven polar growth of plant cells. *Trends in cell biology* 12(1): 14.
- Barral P., Villalba M., Rodriguez R. & Batanero E. 2006. The role of major olive pollen allergens Ole e 1, Ole e 9, and Ole e 10 on mice sensitization. *Annals of allergy, asthma & immunology* 96(3): 466-71

- Barral P., Batanero E., Palomares O., Quiralte J., Villalba M. & Rodríguez R. 2004. A major allergen from pollen defines a novel family of plant proteins and shows intra- and interspecies cross-reactivity. *Journal of immunology* 172(6):3644-51
- Bardezas R., Villalba M., Pascual C.Y., Batanero E. & Rodríguez R. 2004. Profilin (Che a 2) and polcalcín (Che a 3) are relevant allergens of Chenopodium album pollen: isolation, amino acid sequences, and immunologic properties. *The journal of allergy and clinical immunology* 113(6): 1192-8
- Bardezas R., Villalba M. & Rodríguez R. 2004. Recombinant expression, purification and cross-reactivity of chenopod profilin: rChe a 2 as a good marker for profilin sensitization. *Biological chemistry* 385(8):731-7
- Barranco D., Trujillo I. & Rallo L. (2005). Libro I. Elaiografía Hispánica. En: *Variedades del olivo en España*. Luís Rallo, Diego Barranco, Juan M. Caballero, Carmen del Río, Antonio Martín, Joan Tous e Isabel Trujillo (Eds.). Junta de Andalucía, MAPA y Ediciones Mundi-Prensa. Madrid
- Barranco D. & Rallo L. 1984. Las variedades de olivo cultivadas en Andalucía. M. de Agricultura, Junta de Andalucía, Madrid, Spain
- Batanero E., Barral P., Villalba M. & Rodríguez R. 2003. Encapsulation of Ole e 1 in biodegradable microparticles induces Th1 response in mice: a potential vaccine for allergy. *Journal of controlled release* 92(3):395-8
- Batanero E., Ledesma A., Villalba M. & Rodríguez R. 1997. Purification, amino acid sequence and immunological characterization of Ole e 6, a cysteine-enriched allergen from olive tree pollen. *FEBS Letters* 410(2-3): 293-6
- Batanero E., Villalba M., Ledesma A., Puente X.S. & Rodríguez R. 1996. Ole e 3, an olive-tree allergen, belongs to a widespread family of pollen proteins. *European journal of biochemistry* 241(3):772-8
- Bause E. 1983. Structural requirements of N-glycosylation of proteins. *Biochemical Journal* 209: 331-336

- Becker E.W. 2006. The roles of ATP in the dynamics of the actin filaments of the cytoskeleton. *Biological chemistry* 387(4): 401-6
- Bhargavi V., Chari V.B. & Singh S.S. 1998. Phosphatidylinositol 3-kinase binds to profilin through the p85 alpha subunit and regulates cytoskeletal assembly. *Biochemistry and molecular biology international* 46(2):241-8
- Björkegren C., Rozycki M., Schutt C.E., Lindberg U. & Karlsson R. 1993. Mutagenesis of human profilin locates its poly (L-proline)-binding site to a hydrophobic patch of aromatic amino acids. *FEBS letter* 333(1-2): 123-6
- Blom N., Gammeltoft S. & Brunak S. 1999. Sequence- and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites. *Journal of molecular biology* 294(5): 1351-1362
- Blom N., Sicheritz-Ponten T., Gupta R., Gammeltoft S. & Brunak S. 2004. Prediction of post-translational glycosylation and phosphorylation of proteins from the amino acid sequence. *Proteomics* 4(6): 1633-49
- Bögre L., Calderini O., Binarova P., Mattauch M., Till S., Kiegerl S., Jonak C., Pollaschek C., Barker P., Huskisson N.S., Hirt H. & Heberle-Bors E. 1999. A MAP kinase is activated late in plant mitosis and becomes localized to the plane of cell division. *Plant cell* 11(1):101-13
- Bögre L., Calderini O., Merskiene I. & Binarova P. 2000. Regulation of cell division and the cytoskeleton by mitogen-activated protein kinases in higher plants. *Results and problems in cell differentiation* 27:95-117
- Boluda L., Alonso C. & Fernández-Caldas E. 1998. Purification, characterization, and partial sequencing of two new allergens of *Olea europaea*. *The Journal of allergy and clinical immunology* 101(2 Pt 1):210-6
- Bradbury A.F. & Smyth D.G. 1987. Biosynthesis of the C-terminal amide in peptide hormones. *Bioscience Reports* 7:907-916
- Bradford M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72:248-254

- Biochemistry* 72: 248–254 Breiteneder H. & Radauer C. 2004. A classification of plant food allergens. *The journal of allergy and clinical immunology* 113(5):821-30
- Burastero S.E., Paolucci C., Breda D., Longhi R., Silvestri M., Hammer J., Protti M.P. & Rossi G.A. 2004. T-cell receptor-mediated cross-allergenicity. *International archives of allergy and immunology* 135(4):296-305
- Butler-Cole C., Wagner M.J., Da Silva M., Brown G.D., Burke R.D., Upton C. 2007. An ectromelia virus profilin homolog interacts with cellular tropomyosin and viral A-type inclusion protein. *Virology Journal* 4(1):76
- Butteroni C., Afferni C., Barletta B. , Iacovacci P., Corinti S., Brunetto B., Tinghino R., Ariano R., Panzani R.C., Pini C. & Di Felice G. 2005. Cloning and Expression of the *Olea europaea* Allergen Ole e 5, the Pollen Cu/Zn Superoxide Dismutase. *International archives of allergy and immunology* 137(1): 9-17

C

- Cao L.G., Babcock G.G., Rubenstein P.A. & Wang Y.L. 1992. Effects of profilin and profilactin on actin structure and function in living cells. *The Journal of cell biology* 117(5): 1023-9
- Carnés J. & Fernández-Caldas E. 2002. Ole e 4 and Ole e 5, important allergens of *Olea europaea*. *Allergy* 57 Suppl 71:24-8
- Carnés Sánchez J., Iraola V.M., Sastre J., Florido F., Boluda L. & Fernández-Caldas E. 2002. Allergenicity and immunochemical characterization of six varieties of *Olea europaea*. *Allergy* 57(4):313-8
- Carlsson L., Nyström L.E., Sundkvist I., Markey F. & Lindberg U. 1977. Actin polymerizability is influenced by profilin, a low molecular weight protein in non-muscle cells. *Journal of molecular biology* 115: 465-483
- Castro A.J., Alché J.D., Cuevas J., Romero P.J., Alché V. & Rodríguez-García M.I. 2003. Pollen from different olive tree cultivars contains varying amounts of the major allergen Ole e 1. *International archives of allergy and immunology* 131(3): 164-73

- Cedergren-Zeppezauer E.S., Goonesekere N.C., Rozycki M.D., Myslik J.C., Dauter Z., Lindberg U. & Schutt C.E. 1994. Crystallization and structure determination of bovine profilin at 2.0 Å resolution. *Journal of molecular biology* 240: 459-475
- Christensen H.E., Ramachandran S., Tan C.T., Surana U., Dong C.H. & Chua N.H. 1996. Arabidopsis profilins are functionally similar to yeast profilins: identification of a vascular bundle-specific profilin and a pollen-specific profilin. *Plant journal* 10: 269–279
- Chen g.J., Saigo H. & Baldi P. 2006. Large-Scale Prediction of Disulphide Bridges Using Kernel Methods, Two-Dimensional Recursive Neural Networks, and Weighted Graph Matching. *Proteins* 62(3): 617-629
- Cheng J., Randall A., Sweredoski M. & Baldi P. 2005. SCRATCH: a Protein Structure and Structural Feature Prediction Server. *Nucleic acids research* 33 (web server issue): w72-76
- Cheng J., Saigo H. & Baldi P. 2006. "Large-Scale Prediction of Disulphide Bridges Using Kernel Methods, Two-Dimensional Recursive Neural Networks, and Weighted Graph Matching". *Proteins* 62(3): 617-629.
- Christensen H.E., Ramachandran S., Tan C.T., Surana U., Dong C.H. & Chua N.H. 1996. Arabidopsis profilins are functionally similar to yeast profilins: identification of a vascular bundle-specific profilin and a pollen-specific profilin. *Plant journal* 10(2):269-79.
- Conover W.J. 1998. Practical Nonparametric Statistics (3rd Ed.)
- Cooper J.A. & Howell B. 1993. The when and how of Src regulation. *Cell*. 73(6):1051-4.
- Corbí A.L., Cortes C., Bousquet J., Basomba A., Cistero A., Garcia-Selles J., d'Amato G. & Carreira J. 1985. Allergenic cross-reactivity among pollens of Urticaceae. *International archives of allergy and applied immunology* 77(4):377-83
- Cullen P.J., Cozier G.E., Banting G. & Mellor H. 2001. Modular phosphoinositide-binding domains-their role in signalling and membrane trafficking. *Current biology* 11(21): R882-93

Czaplewski C., Oldziej S., Liwo A. & Scheraga H.A. 2004.. Prediction of the structures of proteins with the UNRES force field, including dynamic formation and breaking of disulfide bonds. *Protein Engineering, Design and Selection* 17, 29 - 36

D

D'Amato G., Cecchi L. & Liccardi G. 2007. Thunderstorm-related asthma: Not only grass pollen and spores. *The Journal of allergy and clinical immunology* Dec 20

De Castro E., Sigrist C.J., Gattiker A., Bulliard V., Langendijk-Genevaux P.S., Gasteiger E., Bairoch A. & Hulo N. 2006. ScanProsite: detection of PROSITE signature matches and ProRule-associated functional and structural residues in proteins. *Nucleic acids research* 34 (Web Server issue):W362-5.

De Corte V., Gettemans J. & Vandekerckhove J. 1997. Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate specifically stimulates PP60(c-src) catalyzed phosphorylation of gelsolin and related actin-binding proteins. *FEBS letters* 401(2-3): 191-6

Di Nardo A., Gareus R., Kwiatkowski D. & Witke W. 2000. Alternative splicing of the mouse profilin II gene generates functionally different profilin isoforms. *Journal of cell science* 113 Pt 21:3795-803

Dreborg S., Basomba A. & Einarsson R. 1986. Sensitivity to Parietaria officinalis and Parietaria judaica pollen allergens in a Spanish population. *Allergologia et immunopathologia* 14(6): 499-508

Duffort O., Palomares O., Lombardero M., Villalba M., Barber D., Rodríguez R. & Polo F. 2006. Variability of Ole e 9 allergen in olive pollen extracts: relevance of minor allergens in immunotherapy treatments. *International archives of allergy and immunology* 140(2): 131-8

Duncan D.B. 1955. Multiple range and multiple F tests. *Biometrics* 11: 1-42

E

- Eads J.C., Mahoney N.M., Vorobiev S., Bresnick A.R., Wen K.K., Rubenstein P.A., Haarer B.K. & Almo S.C. 1998. Structure determination and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* profilin. *Biochemistry* 37(32):11171-81
- Ebner C., Hirschwehr R., Bauer L., Breiteneder H., Valenta R., Ebner H., Kraft D. & Scheiner O. 1995. Identification of allergens in fruits and vegetables: IgE cross-reactivities with the important birch pollen allergens Bet v 1 and Bet v 2 (birch profilin). *The Journal of allergy and clinical immunology* 95(5 Pt 1): 962-9
- Emanuelsson O., Brunak S., von Heijne G. & Nielsen H. 2007. Locating proteins in the cell using TargetP, SignalP and related tools. *Nature protocols* 2(4): 953-71

F

- Fedorov A.A., Ball T., Valenta R. & Almo S.C. 1997. X-ray crystal structures of birch pollen profilin and Phl p 2. *International archives of allergy and immunology* 113(1-3): 109-13
- Fedorov A.A., Ball T., Mahoney N.M., Valenta R. & Almo S.C. 1997. The molecular basis for allergen cross-reactivity: crystal structure and IgE-epitope mapping of birch pollen profilin. *Structure* 5: 33-45
- Fedorov A.A., Magnus K.A., Graupe M.H., Lattman E.E., Pollard T.D. & Almo S.C. 1994. X-ray structures of isoforms of the actin-binding protein profilin that differ in their affinity for phosphatidylinositol phosphates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91(18): 8636-40
- Fedorov A. A., Shi W., Mahoney N., Kaiser D. A. & Almo S.C. 2000. A Comparative Structural Analysis of Allergen Profilins HEVB8 and BETV2. <http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=1G5U>
- Feo F., Martinez J., Martinez A., Galindo P.A., Cruz A., Garcia R., Guerra F. & Palacios R. 1997. Occupational allergy in saffron workers. *Allergy* 52(6): 633-41

- Fernández-Caldas E., Carnés J., Iraola V. & Casanovas M. 2007. Comparison of the allergenicity and Ole e 1 content of 6 varieties of *Olea europaea* pollen collected during 5 consecutive years. *Annals of allergy, asthma & immunology* 98(5): 464-70
- Fischer S., Grote M., Fahlbusch B., Müller W.D., Kraft D. & Valenta R. 1996. Characterization of Phl p 4, a major timothy grass (*Phleum pratense*) pollen allergen. *The Journal of allergy and clinical immunology* 98(1):189-98
- Focke M., Hemmer W., Hayek B., Götz M. & Jarisch R. 1998. Identification of allergens in oilseed rape (*Brassica napus*) pollen. *International archives of allergy and immunology* 117(2):105-12
- Fraczkiewicz R. & Braun W. 1996. A New Efficient Algorithm for Calculating Solvent Accessible Surface Areas of Macromolecules, ECCC3; Northern Illinois Univ.
- Fraczkiewicz R. & Braun W. 1998. Exact and efficient analytical calculation of the accessible surface areas and their gradients for macromolecules. *Journal of computational chemistry* 19: 319
- Fremisco J.R., Glass D.B. & Krebs E.G. 1980. Optimal spatial requirements for the location of basic residues in peptide substrates for the cyclic AMP-dependent protein kinase. *Journal of Biological Chemistry* 255:4240-4245

G

- Games P.A. & Howell J.F. 1976. Pairwise multiple comparison procedures with unequal n's and/or variances a Monte Carlo study. *Journal of Educational Statistics* 1: 113–125
- Gao Z.S., Weg W.E., Schaart J.G., Arkel G., Breiteneder H., Hoffmann-Sommergruber K. & Gilissen L.J. 2005. Genomic characterization and linkage mapping of the apple allergen genes Mal d 2 (thaumatin-like protein) and Mal d 4 (profilin). *Theoretical and applied genetics* 111(6):1087-97
- Gasteiger E., Hoogland C., Gattiker A., Duvaud S., Wilkins M.R., Appel R.D. et al. 2005. The proteomics protocols handbook, Humana Press, Hatfield.

- Gibbon B.C. 2001. Actin monomer-binding proteins and the regulation of actin dynamics in plants. *Journal of plant growth regulation* 20: 103-112
- Gibbon B.C. & Staiger C.J. 2000. Profilin, in Actin: A Dynamic Framework for Multiple Plant Cell Functions, C.J. Staiger, *et al.*, Eds. Kluwer: Dordrecht, pp. 45-65.
- Gibbon B.C., Ren H. & Staiger C.J. 1997. Characterization of maize (*Zea mays*) pollen profilin function in vitro and in live cells. *Biochemical journal* 327: 909-915
- Gibbon B.C., Zonia L.E., Kovar D.R., Hussey P.J. & Staiger C.J. 1998. Pollen profilin function depends on interaction with proline-rich motifs. *Plant cell* 10: 981-994 [Correction: *Plant Cell* 11:1603]
- Gill S.C. & von Hippel P.H. 1989. Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Analytical Biochemistry* 182:319-326
- Glass D.B., el-Maghrabi M.R. & Pilkis S.J. 1986. Synthetic peptides corresponding to the site phosphorylated in 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase as substrates of cyclic nucleotide-dependent protein kinases. *Journal of Biological Chemistry* 261:2987-2993
- Glass D.B. & Smith S.B. 1983. Phosphorylation by cyclic GMP-dependent protein kinase of a synthetic peptide corresponding to the autophosphorylation site in the enzyme. *Journal of Biological Chemistry* 258:14797-14803
- Goldschmidt-Clermont P.J., Machesky L.M., Baldassare J.J. & Pollard T.D. 1990. The actin-binding protein profilin binds to PIP₂ and inhibits its hydrolysis by phospholipase C. *Science* 247(4950):1575-8
- González E., Monsalve R.I., Puente X.S., Villalba M., Rodríguez R. 2000. Assignment of the disulfide bonds of Ole e 1, a major allergen of olive tree pollen involved in fertilization. *The journal of peptide research* 55(1):18-23
- Grand R.J.A. 1989. Acylation of viral and eukaryotic proteins. *Biochemical Journal* 258:625-638

- Grob M., Reindl J., Vieths S., Wüthrich B. & Ballmer-Weber B.K. 2002. Heterogeneity of banana allergy: characterization of allergens in banana-allergic patients. *Annals of allergy, asthma & immunology* 89(5): 513-6
- Grote M., Vrtala S. & Valenta R. 1993. Monitoring of two allergens, Bet v I and profilin, in dry and rehydrated birch pollen by immunogold electron microscopy and immunoblotting. *The journal of histochemistry and cytochemistry* 41(5): 745-50
- Guex N. & Peitsch M.C. 1997. Swiss-Model and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modelling. *Electrophoresis* 18: 2714–2723
- Guillén G., López-Sánchez L., San Román-Roque C., Sánchez F. & Villanueva M. A. 2001. Biochemical Characterization of Profilin from Seeds of Phaseolus vulgaris L. *Plant and cell physiology* 42:154-62
- Guillén G., Valdés-López V., Noguez R., Olivares J., Rodríguez-Zapata L.C., Pérez H., Vidali L., Villanueva M.A. & Sánchez F. 1999. Profilin in Phaseolus vulgaris is encoded by two genes (only one expressed in root nodules) but multiple isoforms are generated in vivo by phosphorylation on tyrosine residues. *Plant journal* 19(5): 497-508
- Guruprasad K., Reddy B.V.B. & Pandit M.W. 1990. Correlation between stability of a protein and its dipeptide composition: a novel approach for predicting *in vivo* stability of a protein from its primary sequence. *Protein Engyneering* 4:155–161

H

- Haarer B.K., Lillie S.H., Adams A.E.M., Magdolen V., Bandlow W. & Brown S.S. 1990. Purification of profilin from Saccharomyces cerevisiae and analysis of profilin-deficient cells. *Journal of cell biology* 110: 105-114
- Hall T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic acids symposium series* 41: 95–98

- Hamman-Khalifa A.M, Alché J.D., Jiménez-López J.C., Castro A.J. & Rodríguez-García M.I. 2004. Sequence polymorphism of the major olive pollen allergen (Ole e 1) in defined cultivars. *Pollen* 14: 100
- Hamman-Khalifa A., Castro A.J., Jiménez-López J.C., Rodríguez-García M. I. & Alché J.D. 2007. Differential characteristics of olive pollen from different cultivars: biological and clinical implications. *Journal of investigational allergology & clinical immunology* 17 Suppl 1:17-23
- Hawkins J., Davis L. & Bodén M. 2007. Predicting nuclear localization. *Journal of proteome research* 6(4):1402-1409
- Helander M.L., Savolainen J. & Ahlholm J. 1997. Effects of air pollution and other environmental factors on birch pollen allergens. *Allergy* 52(12): 1207-14
- Henikoff S. & Henikoff J.G. 1992. Amino acid substitution matrices from protein blocks. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America* 89: 10915-10919
- Hess M.W., Mittermann I., Luschnig C. & Valenta R. 1995 Immunocytochemical localisation of actin and profilin in the generative cell of angiosperm pollen: TEM studies on high-pressure frozen and freeze-substituted *Ledebouria socialis* Roth (Hyacinthaceae). *Histochemistry and cell biology* 104(6): 443-51
- Hightower R.C. & Meagher R.B. 1985. Divergence and differential expression of soybean actin genes. *EMBO journal* 4: 1-8
- Hightower R.C. & Meagher R.B. 1986. The molecular evolution of actin. *Genetics* 114, 315–332
- Hirschwehr R., Heppner C., Spitzauer S., Sperr W.R., Valent P., Berger U., Horak F., Jäger S., Kraft D. & Valenta R. 1998. Identification of common allergenic structures in mugwort and ragweed pollen. *The Journal of allergy and clinical immunology* 101(2 Pt 1): 196-206

- Hirschwehr R., Jäger S., Horak F., Ferreira F., Valenta R., Ebner C., Kraft D. & Scheiner O. 1993. Allergens from birch pollen and pollen of the European chestnut share common epitopes. *Clinical and experimental allergy* 23(9): 755-61
- Holgate S.T. 1998. Asthma and allergy-disorders of civilization?. *Monthly journal of the association of physicians* 91(3):171-84
- Hollander M. & Wolfe D.A. 1999. Nonparametric Statistical Methods (2nd Ed.).
- Huang S.R., McDowell J.M., Weise M.J. & Meagher R.B. 1996. The Arabidopsis profilin gene family--Evidence for an ancient split between constitutive and pollen-specific profilin genes. *Plant physiology* 111: 115-126.
- Huang S., An Y-Q, McDowell J.M., McKinney E.C. & Meagher R.B. 1997. The Arabidopsis ACT11 actin gene is strongly expressed in tissues of the emerging inflorescence, pollen and developing ovules. *Plant molecular biology* 33: 125–139
- Huecas S., Villalba M. & 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. *Journal of biological chemistry* 276(30): 27959-66

J

- Jankiewicz A., Baltes W., Bögl K.W., Dehne L.I., Jamin A., Hoffmann A., Haustein D. & Vieths S. 1997. Influence of food processing on the immunochemical stability of celery allergens. *Journal of the science of food and agriculture* 75: 359–370
- Janssen K.P. & Schleicher M. 2001. Dictyostelium discoideum: a genetic model system for the study of professional phagocytes. Profilin, phosphoinositides and the lmp gene family in Dictyostelium. *Biochimica et biophysica acta* 1525(3): 228-33
- Jiang C.J., Weeds A.G. & Hussey P.J. 1997. The maize actin-depolymerizing factor, ZmADF3, redistributes to the growing tip of elongating root hairs and can be induced to translocate into the nucleus with actin. *Plant journal* 12: 1035–1043
- Jockusch B.M., Murk K. & Rothkegel M. 2007. The profile of profilins. *Reviews of physiology, biochemistry and pharmacology* 159:131-49.

K

- Kaiser D.A., Goldschmidt-Clermont P.J., Levine B.A. & Pollard T.D. 1989. Characterization of renatured profilin purified by urea elution from poly-L-proline agarose columns. *Cell motility and the cytoskeleton* 14(2): 251-62
- Kandasamy M.K., Burgos-Rivera B, McKinney EC, Ruzicka DR, Meagher RB. 2007. Class-specific interaction of profilin and ADF isoforms with actin in the regulation of plant development. *Plant Cell* 19(10): 3111-3126
- Kandasamy M.K., McKinney E.C. & Meagher R.B. 2002. Plant profilin isoforms are distinctly regulated in vegetative and reproductive tissues. *Cell motility and the cytoskeleton* 52(1): 22-32
- Karamloo F., Scheurer S., Wangorsch A., May S., Haustein D. & Vieths S. 2001. Pyr c 1, the major allergen from pear (*Pyrus communis*), is a new member of the Bet v 1 allergen family. *Journal of chromatography. B, Biomedical sciences and applications* 756(1-2): 281-93
- King P., Hoffman D., Lowenstein H., Marsh D.G., Platts-Mills T.A. & Thomas W. 1994. Allergen nomenclature. WHO/IUIS Allergen Nomenclature Subcommittee. *International Archives of Allergy and Immunology* 105: 224–233
- Kishimoto A., Nishiyama K., Nakanishi H., Uratsuji Y., Nomura H., Takeyama Y. & Nishizuka Y. 1985. Studies on the phosphorylation of myelin basic protein by protein kinase C and adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinase. *Journal of Biological Chemistry* 260:12492-12499
- Kleber-Janke T., Crameri R., Appenzeller U., Schlaak M. & Becker W.M. 1999. Selective cloning of peanut allergens, including profilin and 2S albumins, by phage display technology. *International archives of allergy and immunology* 119(4):265-74
- Kolaskar A.S. & Kulkarni-Kale U. 1999. Prediction of three-dimensional structure and mapping of conformational epitopes of envelope glycoprotein of Japanese encephalitis virus. *Virology* 261(1): 31-42

- Kovar D.R., Drøbak B.K., Collings D.A. & Staiger C.J. 2001. The characterization of ligandspecific maize (*Zea mays*) profilin mutants. *Biochemical Journal* 358: 49-57
- Kovar D.R., Drøbak B.K. & Staiger C.J. 2000. Maize profilin isoforms are functionally distinct. *Plant cell* 12: 583-598
- Kreil G. 1984. Occurrence, detection, and biosynthesis of carboxy-terminal amides. *Methods in Enzymology* 106:218-223
- Kyte J. & Doolittle R. 1982. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *Journal of Molecular Biology* 157: 105-132

L

- Labarga A., Anderson M., Valentin F. & Lopez R. 2005. Web services at European Bioinformatics Institute, EMBnet.news, 11: 18-23
- Laemmli U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259): 680-5
- Lambrechts A., Braun A., Jonckheere V., Aszodi A., Lanier L.M., Robbens J., Van Colen I., Vandekerckhove J., Fässler R. & Ampe C. Profilin II is alternatively spliced, resulting in profilin isoforms that are differentially expressed and have distinct biochemical properties. *Molecular and cellular biology* 2000 20(21):8209-19
- Lambrechts A., van Damme J., Goethals M., Vandekerckhove J. & Ampe C. 1995. Purification and characterization of bovine profilin II. Actin, poly(L-proline) and inositol phospholipid binding. *European journal of biochemistry* 230: 281–286
- Lassing I. & Lindberg U. 1985. Specific interaction between phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and profilactin. *Nature* 314(6010): 472-4
- Ledesma A., González E., Pascual C.Y., Quiralte J., Villalba M. & Rodríguez R. 2002. Are Ca^{2+} -binding motifs involved in the immunoglobulin E-binding of allergens? Olive pollen allergens as model of study. *Clinical and experimental allergy* 32(10): 1476-83

- Ledesma A., Moral V., Villalba M., Salinas J. & Rodríguez R. 2006. Ca²⁺-binding allergens from olive pollen exhibit biochemical and immunological activity when expressed in stable transgenic Arabidopsis. *FEBS journal* 273(19): 4425-34
- Ledesma A., Rodríguez R. & Villalba M. 1998. Olive-pollen profilin. Molecular and immunologic properties. *Allergy*. 53(5): 520-6
- Ledesma A., Villalba M. & Rodríguez R. 2000. Cloning, expression and characterization of a novel four EF-hand Ca⁽²⁺⁾-binding protein from olive pollen with allergenic activity. *FEBS letters* 466(1): 192-6
- Ledesma A., Villalba M., Vivanco F. & 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):40-3
- Levene H. 1960. In *Contributions to Probability and Statistics: Essays in Honor of Harold Hotelling*, I. Olkin *et al.* eds., Stanford University Press, pp: 278-292
- Levesque R. 2007. SPSS Programming and Data Management: A Guide for SPSS and SAS Users, Fourth Edition, SPSS Inc., Chicago Ill
- Limmongkon A., Giuliani C., Valenta R., Mittermann I., Heberle-Bors E. & Wilson C. 2004. MAP kinase phosphorylation of plant profilin. *Biochemical and biophysical research communications* 324(1): 382-6
- Lindberg U., Schutt C.E., Hellsten E., Tjäder A.C. & Hult T. 1988. The use of poly(L-proline)-Sepharose in the isolation of profilin and profilactin complexes. *Biochimica et biophysica acta* 967(3): 391-400
- Lopez I., Anthony R.G., Maciver S.K., Jiang C.J., Khan S., Weeds A.G. & Hussey P.J. 1996. Pollen specific expression of maize genes encoding actin depolymerizing factor-like proteins. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America* 93: 7415–7420
- López-Torrejón G., Crespo J.F., Sánchez-Monge R., Sánchez-Jiménez M., Álvarez J., Rodriguez J. & Salcedo G. 2005. Allergenic reactivity of the melon profilin Cuc m

2 and its identification as major allergen. *Clinical and experimental allergy* 35(8):1065-72

López-Torrejón G., Ibáñez M.D., Ahrazem O., Sánchez-Monge R., Sastre J., Lombardero M., Barber D. & Salcedo G. 2005. Isolation, cloning and allergenic reactivity of natural profilin Cit s 2, a major orange allergen. *Allergy* 60(11): 1424-9
Lu J. & Pollard T.D. 2001. Profilin binding to poly-L-proline and actin monomers along with ability to catalyze actin nucleotide exchange is required for viability of fission yeast. *Molecular and cellular biology* 12: 1161–1175

M

Machesky L.M., Cole N.B., Moss B. & Pollard T.D. 1994. Vaccinia virus expresses a novel profilin with a higher affinity for polyphosphoinositides than actin. *Biochemistry* 33(35): 10815-24

Martínez A., Asturias J.A., Monteseirín J., Moreno V., García-Cubillana A., Hernández M., de la Calle A., Sánchez-Hernández C., Pérez-Formoso J.L. & Conde J. 2002. The allergenic relevance of profilin (Ole e 2) from *Olea europaea* pollen. *Allergy* 57 Suppl 71: 17-23

Martínez A., Asturias J.A., Palacios R., Sanz M.L., Sánchez G., Oehling A. & Martínez J. 1999. Identification of a 36-kDa olive-pollen allergen by in vitro and in vivo studies. *Allergy* 54(6): 584-92

McDowell J.M., Huang S., McKinney E.C., An Y.-Q. & Meagher R.B. 1996. *Arabidopsis thaliana* contains ten actin genes encoding six ancient protein subclasses. *Genetics* 142: 587–602

McKinney E.C., Heberle-Bors E., Kraft D. & Scheiner O. 1993. Identification of profilin as an actin binding protein in higher plants. *Journal of biological chemistry* 268: 22777-22781

McKinney E.C. & Meagher R.B. 1998. Members of the *Arabidopsis* actin gene family are widely dispersed in the genome. *Genetics* 149: 663-675

- McLean M., Gerats A.G.M., Baird W.V. & Meagher R.B. 1990 Six actin gene subfamilies map to five chromosomes of *Petunia hybrida*. *The Journal of heredity* 81: 341–346
- Meagher R.B. 1995. In Evolutionary Biology (Vol. 28) (Hecht, M.K. et al., Eds). 195–215, Plenum Press
- Meagher R.B. & Fechheimer M. 2003. The Cytoskeletal Proteome of *Arabidopsis*. In: Meyerowitz E. & Somerville C., (ed) *Arabidopsis*, pp. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. Metzler W.J., Bell A.J., Ernst E., Lavoie T.B. & Mueller L. 1994. Identification of the poly-L-proline-binding site on human profilin. *Journal of biological chemistry* 269(6): 4620-5
- Meagher R.B., McKinney E.C. & Vitale A.V. 1999. The evolution of new structures - clues from plant cytoskeletal genes. *Trends in Genetics* 15: 278-284
- Meagher R.B. & Williamson R.E. 1994. The Plant Cytoskeleton. In *Arabidopsis*, E. Meyerowitz, and C. Somerville, eds. (Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory Press). 1049-1084
- Mehta C.R. & Patel N.R. 1997. Exact inference in categorical data. *Biometrics* 53(1): 112-117
- Metzler W.J., Farmer 2nd B.T., Constantine K.L., Friedrichs M.S., Lavoie T. & Mueller L. 1995. Refined solution structure of human profilin I. *Protein science* 4: 450-459
- Metzler J.W., Bell A.J., Ernst E., Lavoie T.B. & Mueller L. 1994. Identification of the poly-L-proline-binding site on human profilin *Journal of Biological Chemistry* 269:4620–4625
- Mittag D., Vieths S., Vogel L., Becker W.M., Rihs H.P., Helbling A., Wüthrich B. & Ballmer-Weber B.K. 2004. Soybean allergy in patients allergic to birch pollen: clinical investigation and molecular characterization of allergens. *The Journal of allergy and clinical immunology* 113(1): 148-54
- Mitterman I., Swoboda I., Pierson E., Eller N., Kraft D., Valenta R. & Heberle-Bors E. 1995. Molecular cloning and characterization of profilin from tobacco (*Nicotiana*

tabacum). Increased profilin expression during pollen maturation. *Plant molecular biology* 27(1): 137-146

Morales S., Jiménez-López J.C., Castro A.J., Rodríguez-García M.I. & Alché J.D. 2007.

Olive pollen profilin (Ole e 2 allergen) co-localizes with highly active areas of the actin cytoskeleton and is released to the culture medium during in vitro pollen germination. *Journal of Microscopy-Oxford* (en prensa)

Mohapatra S.S., Lockey R.F. & Shirley S. 2005. Immunobiology of grass pollen allergens. *Current allergy and asthma reports* 5(5): 381-7

M'rani Alaoui M. 2000. Estudio a nivel celular de la germinación, emisión y elongación del tubo polínico en el olivo (*Olea europaea* L.). Ph.D. Thesis. University of Granada, Spain

N

Nakai K. & Kanehisa M. 1991. Expert system for predicting protein localization sites in gram-negative bacteria. *Proteins* 11(2):95-110

Nei M. 1987. Molecular Evolutionary Genetics, Columbia University Press

Niederberger V., Purohit A., Oster J.P., Spitzauer S., Valenta R. & Pauli G. 2002. The allergen profile of ash (*Fraxinus excelsior*) pollen: cross-reactivity with allergens from various plant species. *Clinical and experimental allergy* 32(6): 933-41

P

Paavilainen V.O., Bertling E., Falck S. & Lappalainen P. 2004. Regulation of cytoskeletal dynamics by actin-monomer-binding proteins. *Trends in cell biology* 14(7):386-94

Palomares O., Villalba M., Quiralte J. & 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. *Annals of allergy, asthma & immunology* 97(1):61-5

Palomares O., Swoboda I., Villalba M., Balic N., Spitzauer S., Rodríguez R. & Valenta R. 2006. The Major Allergen of Olive Pollen Ole e 1 Is a Diagnostic Marker for

Sensitization to Oleaceae. *International archives of allergy and immunology* 141:110-118

Palomares O., Villalba M. & 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. *Biochemistry journal* 369(Pt 3): 593-601

Pandjaitan B., Eibensteiner P.B., Vrtala S., Hayek B., Grote M., Reichelt R., Rumpold H., Valenta R. & Spitzauer S. 1999. pET-prof, a plasmid for high-level expression of recombinant peptides fused to a birch profilin-derived hexadecapeptide tag: a system for the detection and presentation of recombinant antigens. *Gene* 237(2): 333-42

Pantaloni D. & Carlier M.-F. 1993. How profilin promotes actin filament assembly in the presence of thymosin β 4. *Cell* 75: 1007-1014

Pearson L.L., Castle B.E. & Kehry M.R. 2001. CD40-mediated signaling in monocytic cells: up-regulation of tumor necrosis factor receptor-associated factor mRNAs and activation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *International immunology* 13(3): 273-83

Peitsch M.C. 1996. ProMod and Swiss-Model: internet-based tools for automated comparative protein modelling. *Biochemical Society transactions* 24: 274–279

Perrin D., Möller K., Hanke K. & Söling H.D. 1992. cAMP and $\text{Ca}^{(2+)}$ -mediated secretion in parotid acinar cells is associated with reversible changes in the organization of the cytoskeleton. *Journal of cell biology* 116(1):127–134

Pierce J.R. 1980. An Introduction to Information Theory: Symbols, Signals and Noise, Dover Publications, Inc., New York. Second edition

Pillai S., Silventoinen V., Kallio K., Senger M., Sobhany S., Tate J., Velankar S., Golovin A., Henrick K., Rice P., Stoehr P. & Lopez R. 2005. SOAP-based services provided by the European Bioinformatics Institute. *Nucleic acids research* 33: W25-28.

- Pinna L.A. 1990. Casein kinase 2 an “eminence grise” in cellular regulation?. *Biochimica et Biophysica Acta* 1054:267-284
- Pollard T.D. & Cooper J.A. 1984. Quantitative analysis of the effect of Acanthamoeba profilin on actin filament nucleation and elongation. *Biochemistry* 23(26):6631-41
- Pollastri G., Przybylski D., Rost B. & Baldi P. 2002. Improving the Prediction of Protein Secondary Structure in Three and Eight Classes Using Recurrent Neural Networks and Profiles. *Proteins* 47: 228-235

Q

- Quiralte J., Florido F., Arias de Saavedra J.M., Gómez A., Sáenz de San Pedro B., González E. & Rodríguez R. 2002. Olive allergen-specific IgE responses in patients with *Olea europaea* pollinosis. *Allergy* 57 Suppl 71: 47-52
- Qualmann B., Kessels M.M. 2002. Endocytosis and the cytoskeleton. *International review of cytology* 220: 93-144

R

- Rabilloud T., Brodard V., Peltre G., Righetti P. G. & Ettori C. 1992. Modified silver-staining for immobilized pH gradients. *Electrophoresis* 13: 264-266.
- Radauer C., Willerroider M., Fuchs H., Hoffmann-Sommergruber K., Thalhamer J., Ferreira F., Scheiner O. & Breiteneder H. 2006 Cross-reactive and species-specific immunoglobulin E epitopes of plant profilins: an experimental and structure-based analysis. *Clinical and experimental allergy* 36(7): 920-9
- Rallo L., Barranco D., Caballero J.M., del Río C., Martín A., Tous J. & Trujillo I. (Editores). 2005. Variedades de olivo en España. Junta de Andalucía, MAPA y ediciones Mundi-Prensa. Madrid.
- Ramachandran S., Christensen H.E.M., Ishimaru Y., Dong C.-H., Chao-Ming W., Cleary A.L. & Chua N.-H. 2000. Profilin plays a role in cell elongation, cell shape maintenance, and flowering in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 124: 1637-1647

- Reindl J., Anliker M.D., Karamloo F., Vieths S. & Wüthrich B. 2000. Allergy caused by ingestion of zucchini (*Cucurbita pepo*): characterization of allergens and cross-reactivity to pollen and other foods. *The Journal of allergy and clinical immunology* 106(2):379-85
- Ren H. & Xiang Y. 2007. The function of actin-binding proteins in pollen tube growth. *Protoplasma* 230: 171–182
- Rihs H.P., Rozynek P., May-Taube K., Welticke B., Baur X. 1994. Polymerase chain reaction based cDNA cloning of wheat profilin: a potential plant allergen. *International archives of allergy and applied immunology* 105(2):190-4
- Rodriguez J., Crespo J.F., Burks W., Rivas-Plata C., Fernandez-Anaya S., Vives R. & Daroca P. 2000. Randomized, double-blind, crossover challenge study in 53 subjects reporting adverse reactions to melon (*Cucumis melo*). *The Journal of allergy and clinical immunology* 106(5): 968-72
- Rodríguez R., Villalba M., Batanero E., González E.M., Monsalve R.I., Huecas S., Tejera M.L. & Ledesma A. 2002. Allergenic diversity of the olive pollen. *Allergy* 57 Suppl 71: 6-16
- Rodríguez R., Villalba M., Batanero E., Palomares O., Quiralte J., Salamanca G., Sirvent S., Castro L. & Prado N. 2007. Olive pollen recombinant allergens: value in diagnosis and immunotherapy. *Journal of investigational allergology & clinical immunology* 17 Suppl 1:4-10
- Rodríguez R., Villalba M., Batanero E., Palomares O. & Salamanca G. 2007. Emerging pollen allergens. *Biomedicine & pharmacotherapy* 61(1): 1-7
- Rodríguez R., Villalba M., Monsalve R.I. & Batanero E. 2001. The spectrum of olive pollen allergens. *International archives of allergy and applied immunology* 125(3): 185-95
- Rodríguez-Perez R., Fernández-Rivas M., González-Mancebo E., Sánchez-Monge R., Díaz-Perales A. & Salcedo G. 2003. Peach profilin: cloning, heterologous expression and cross-reactivity with Bet v 2. *Allergy* 58(7):635-40

Romero S, Didry D., Larquet E., Boisset N., Pantaloni D. & Carlier M.F. 2007. How ATP hydrolysis controls filament assembly from profilin-actin: implication for formin processivity. *Journal of biological chemistry* 282(11): 8435-45

S

Saitou N. & Nei M. 1986. The number of nucleotides required to determine the branching order of three species with special reference to the human-chimpanzee-gorilla divergence. *Journal of molecular evolution* 24: 189-204.

Sanger J.M., Mittal B., Dome J.S. & Sanger J.W. 1989. Analysis of cell division using fluorescently labeled actin and myosin in living PtK2 cells. *Cell motility and the cytoskeleton* 14(2): 201-19

Sankian M., Varasteh A., Pazouki N. & Mahmoudi M. 2005. Quence homology: a poor predictive value for profilins cross-reactivity. *Clinical and Molecular Allergy* 3: 13

Sathish K., Padma B., Munugalavadla V., Bhargavi V., Radhika K.V., Wasia R., Sairam M. & Singh S.S. 2004. Phosphorylation of profilin regulates its interaction with actin and poly (L-proline). *Cell Signalling* 16(5): 589-96

Sbornik M., Rakoski J., Mempel M., Ollert M. & Ring J. 2007. IgE-mediated type-I-allergy against red wine and grapes. *Allergy* 62(11):1339-40

Schafmeister C. 1990. Fast Algorithm for Generating CPK Images on Graphics Workstations. *Journal of Molecular Graphics* 8(4): 201-206

Schneider T.D. & Stephens R.M. 1990. Sequence Logos: A new Way to Display Consensus Sequences. *Nucleic Acids Research* 18: 6097-6100

Scheurer S., Wangorsch A., Haustein D. & Vieths S. 2000. Cloning of the minor allergen Api g 4 profilin from celery (*Apium graveolens*) and its cross-reactivity with birch pollen profilin Bet v 2. *Clinical and experimental allergy* 30(7):962-71

Scheurer S., Wangorsch A., Nerkamp J., Skov P.S., Ballmer-Weber B., Wuthrich B. *et al.* 2001. Cross-reactivity within the profilin panallergen family investigated by comparison of recombinant profilins from pear (Pyr c 4), cherry (Pru av 4) and

- celery (Api g 4) with birch pollen profilin Bet v 2. *Journal of chromatography. B, Biomedical sciences and applications* 756: 315–325.
- Schobert C., Gottschalk M., Kovar D.R., Staiger C.J., Yoo B.C. & Lucas W.J. 2000. Characterization of *Ricinus communis* phloem profilin, RcPRO1. *Plant molecular biology* 42(5): 719-30
- Schlüter K., Jockusch B.M. & Rothkegel M. 1997. Profilins as regulators of actin dynamics. *Biochimica et biophysica acta* 1359(2): 97-109
- Schuller A., Morisset M., Maadi F., Kolopp Sarda M.N., Fremont S., Parisot L., Kanny G. & Moneret-Vautrin D.A. 2005. Occupational asthma due to allergy to spinach powder in a pasta factory. *Allergy* 60(3):408-9
- Schutt C.E., Myslik J.C., Rozycki Nalin M.D., Goonesekere C. W. & Lindberg U. 1993. The structure of crystalline profilina- β -actin. *Nature* 365: 810 – 816
- Schwede T., Kopp J., Guex N. & Peitsch M.C. 2003. SWISS-MODEL: an automated protein homology-modeling server. *Nucleic acids research* 31: 3381-3385.
- Shapiro S.S. & Wilk M.B. 1965. An analysis of variance test for normality (complete samples). *Biometrika* 52(3 and 4): 591-611
- Sharrocks A.D., Yang S.H. & Galanis A. 2000. Docking domains and substrate-specificity determination for MAP kinases. *Trends in biochemical sciences* 25(9): 448-53
- Siegel S. & CastellanN.J. 1988. Nonparametric Statistics for the Behavioral Sciences (second edition). New York: McGraw-Hill.
- Simonsen A., Wurmser A.E., Emr S.D. & Stenmark H. 2001. The role of phosphoinositides in membrane transport *Current opinion in cell biology* 13(4): 485-92
- Singh S.S., Chauhan A, Murakami N. & Chauhan VP. 1996. Profilin and gelsolin stimulate phosphatidylinositol 3-kinase activity. *Biochemistry* 35(51):16544-9
- Singh S.S., Chauhan A., Murakami N., Styles J., Elzinga M. & Chauhan V.P. 1996. Phosphoinositide-dependent in vitro phosphorylation of profilin by protein

- kinase C. Phospholipid specificity and localization of the phosphorylation site. *Receptors & signal transduction* 6(2): 77-86
- Singh H. & Raghava G.P. 2001. ProPred: prediction of HLA-DR binding sites. *Bioinformatics* 17(12): 1236-7
- Skare P. & Karlsson R. 2002. Evidence for two interaction regions for phosphatidylinositol (4, 5)-bisphosphate on mammalian profilin I. *FEBS letters* 522(1-3): 119-24
- Sohn R.H. & Goldschmidt-Clermont P.J. 1994 Profilin: at the crossroads of signal transduction and the actin cytoskeleton. *Bioessays* 16(7): 465-72
- Song J.J., Zhang O., Liu Z. & Ran P. 2007. Mango profilin: cloning, expression and cross-reactivity with birch pollen profilin Bet v 2. *Molecular biology reports*
- Staiger C.J. 2000. Signalling to the actin cytoskeleton in plants. *Annual review of plant physiology and plant molecular biology* 51: 257-288
- Staiger C.J. & Blanchoin L. 2006. Actin dynamics: old friends with new stories. *Current opinion in plant biology* 9(6): 554-62
- Staiger C.J., Gibbon B.C., Kovar D.R. & Zonia L.E. 1997. Profilin and actin depolymerising factor: modulators of actin organization in plants. *Trends in plant science* 2: 275-281.
- Staiger C.J., Goodbody K.C., Hussey P.J., Valenta R., Drøbak B.K. & Lloyd C.W. 1993. The profilin multigene family of maize: differential expression of three isoforms. *Plant journal* 4(4): 631-41
- Staiger C.J., Yuan M., Valenta R., Shaw P.J., Warn R.M. & Lloyd C.W. 1994. Microinjected profilin affects cytoplasmic streaming in plant cells by rapidly depolymerizing actin microfilaments. *Current biology* 4: 215-219
- Stossel T.P. 1993. On the crawling of animal cells. *Science* 260(5111): 1086-94
- Superti-Furga G. & Courtneidge S.A. 1995. Structure-function relationships in Src family and related protein tyrosine kinases. *Bioessays*. 17(4):321-30

Swoboda I., Bhalla P.L., Xu H., Zhang Y., Mittermann I., Valenta R. & Singh M.B. 2001. Identification of pronp1, a tobacco profilin gene activated in tip-growing cells. *Plant molecular biology* 46(5): 531-8

T

Takenawa & Itoh 2001. Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate phosphatase regulates the rearrangement of actin filaments. *Molecular and cell biology* 17(7): 3841-9

Tawde P., Venkatesh Y.P., Wang F., Teuber S.S., Sathe S.K. & Roux K.H. 2006. Cloning and characterization of profilin (Pru du 4), a cross-reactive almond (*Prunus dulcis*) allergen. *The Journal of allergy and clinical immunology* 118(4): 915-22

Taylor S.J. & Shalloway D. 1996. Src and the control of cell division. *Bioessays* 18(1): 9-11

Tejera M.L., Villalba M., Batanero E. & Rodríguez R. 1999. Identification, isolation, and characterization of Ole e 7, a new allergen of olive tree pollen. *The Journal of allergy and clinical immunology* 104(4 Pt 1): 797-802

Theriot J.A. & Mitchison T.J. 1993. The three faces of profilin. *Cell* 75(5): 835-8.

Thommen A.A. 1931. Hay fever. In: A.F. Coca, M. Walzer & A.A. Thommen (eds.) *Asthma and hay fever* Y11. Thomas. Springfield

Thompson J.D., Higgins D.G. & Gibson T.J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22(22):4673-80

Thompson J.D., Gibson T.J., Plewniak F., Jeanmougin F. & Higgins D.G. 1997. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic acids research* 24: 4876-4882.

Thorn K.S., Christensen H.E., Shigeta R., Huddler D., Shalaby L., Lindberg U., Chua, N.H. & Schutt C.E. (1997). The crystal structure of a major allergen from plants. *Structure* 5: 19-32

- Towler D.A., Gordon J.I., Adams S.P. & Glaser L. 1998. The biology and enzymology of eukaryotic protein acylation. *Annual review of biochemistry* 57:69-99
- Treviño M.A., García-Mayoral M.F., Barral P., Villalba M., Santoro J., Rico M., Rodríguez R. & Bruix M. 2004. NMR solution structure of Ole e 6, a major allergen from olive tree pollen. *Journal biological chemistry* 279(37): 39035-41
- Tsukanova G. & Laaidi M. 2004. Flora, distribution of vegetation and pollen content of the air: significance for allergics. *Allergie et immunologie* 36(7): 256-9
- Tukey J.W. 1953. The problem of multiple comparisons. Princeton Univ., Princeton, NJ.

V

- Valenta R., Ball T., Vrtala S., Duchêne M., Kraft D. & Scheiner O. 1994. cDNA cloning and expression of timothy grass (*Phleum pratense*) pollen profilin in *Escherichia coli*: comparison with birch pollen profilin. *Biochemical and biophysical research communications* 199(1): 106-18
- Valenta R., Duchêne M., Pettenburger K., Sillaber C., Valent P., Bettelheim P., Breitenbach M. & Rumpold H., Kraft D. & Scheiner O. 1991. Identification of profilin as a novel pollen allergen; IgE autoreactivity in sensitized individuals. *Science* 253: 557-560
- Valenta R., Duchene M., Ebner C., Valent P., Sillaber C., Deviller P., Ferreira F., Tejkl M., Edelmann H. & Kraft D. 1992. Profilins constitute a novel family of functional plant pan-allergens. *The Journal of experimental medicine* 175(2): 377-85
- Valenta R., Ferreira F., Grote M., Swoboda I., Vrtala S., Duchene M., Deviller P., Meagher R.B., McKinney E.C. & Heberle-Bors E. 1993. Identification of profilin as an actin-binding protein in higher plants. *Journal of biological chemistry* 268(30): 22777-81
- Valster A.H., Pierson E.S., Valenta R., Hepler P.K. & Emons A.M.C. 1997. Probing the plant actin cytoskeleton during cytokinesis and interphase by profilin microinjection. *Plant cell* 9: 1815- 1824

- Vallverdú A., García-Ortega P., Martínez J., Martínez A., Esteban M.I., de Molina M, Fernández-Távora L., Fernandez J., Bartolomé B. & Palacios R. 1997. Mercurialis annua: characterization of main allergens and cross-reactivity with other species *International archives of allergy and applied immunology* 112(4): 356-64
- Vemuri B. & Singh SS. 2001. Protein kinase C isozyme-specific phosphorylation of profilin. *Cell Signalling* 13(6): 433-9
- van Ree R., Voitenko V., van Leeuwen W.A. & Aalberse R.C. 1992. Profilin is a cross-reactive allergen in pollen and vegetable foods. *International archives of allergy and applied immunology* 98(2): 97-104
- Verheyen E.M. & Cooley L. 1994. Profilin mutations disrupt multiple actin-dependent processes during Drosophila development. *Development* 120(4): 717-28
- Vinson V., Archer S.J., Lattman E.E., Pollard T.D. & Torchia D.A. Three-dimensional solution structure of Acanthamoeba profilin-I. *The Journal of Cell Biology* 122(6): 1277-1283
- Vidali L. & Hepler P.K. 1997. Characterization and localization of profilin in pollen grains and tubes of *Lilium longiflorum*. *Cell motility and the cytoskeleton* 36(4): 323-38
- Vieira O.V., Botelho R.J., Rameh L., Brachmann S.M., Matsuo T., Davidson H.W., Schreiber A., Backer J.M., Cantley L.C. & Grinstein S. 2001. Distinct roles of class I and III phosphatidylinositol 3-kinases in phagosome formation and maturation. *Journal of cell biology* 155:19–25
- Vidali L., Pérez H.E., Valdés López V., Noguez R., Zamudio F. & Sánchez F. 1995. Purification, characterization, and cDNA cloning of profilin from *Phaseolus vulgaris*. *Plant physiology* 108(1): 115-23.
- Volkmann D. & Baluška F.J. 1999. Actin cytoskeleton in plants: from transport networks to signalling networks. *Microscopy research and technique* 47(2): 135-54.
- Voronin V., Aionesei T., Limmongkon A., Barinova I., Touraev A., Laurière C., Coronado M.J., Testillano P.S., Risueño M.C., Heberle-Bors E. & Wilson C. 2004

The MAP kinase kinase NtMEK2 is involved in tobacco pollen germination. *FEBS letters* 560(1-3): 86-90

von Witsch M., Baluška F., Staiger C.J. & Volkmann D. 1998. Profilin is associated with the plasma membrane in microspores and pollen. *European journal of cell biology* 77(4): 303-12

W

Wagner S. & Breiteneder H. 2002. The latex-fruit syndrome. *Biochemical Society transactions* 30(Pt 6):935-40

Welling G.W., Weijer W.J., van der Zee R. & Welling-Wester, S. 1985. Prediction of sequential antigenic regions in proteins. *FEBS Letters* 188:215-218

Wiedemann P., Giehl K., Almo S.C., Fedorov A.A., Girvin M., Steinberger P., Rüdiger M., Ortner M., Sippl M., Dolecek C., Kraft D., Jockusch B. & Valenta R. 1996. Molecular and Structural Analysis of a Continuous Birch Profilin Epitope Defined by a Monoclonal Antibody. *Journal of biological chemistry* 271(47): 29915-21

Wilson C., Voronin V., Touraev A., Vicente O. & Heberle-Bors E. 1997. A developmentally regulated MAP kinase activated by hydration in tobacco pollen. *Plant cell* 9(11): 2093-100

Witke W. 2004. The role of profilin complexes in cell motility and other cellular processes. *Trends in cell biology* 14(8): 461-9

Witke W., Podtelejnikov A.V., Di Nardo A., Sutherland J.D., Gurniak C.B., Dotti C. & Mann M. 1998. In mouse brain profilin I and profilin II associate with regulators of the endocytic pathway and actin assembly. *EMBO Journal* 17(4): 967-76

Witke W., Sutherland J.D., Sharpe A., Arai M. & Kwiatkowski D.J. 2001. Profilin I is essential for cell survival and cell division in early mouse development. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America* 98: 3832-3836

Witke W., Sharpe A.H. & Kwiatkowski D.J. 1993. Profilin deficient mice are not viable.

Molecular Biology of the Cell 4:149a

Woodget J.R., Gould K.L. & Hunter T. 1986. Substrate specific of protein kinase C. Use of Synthetic peptides corresponding to physiological sites as probes for substrate recognition requirements. *European Journal of Biochemistry* 161:177-184

Y

Yarmola E.G. & Bubb M.R. 2006. Profilin: emerging concepts and lingering misconceptions. *Trends in biochemical sciences* 31(4): 197-205

Ye Q., Xu Y., Yan F., Tang L. & Chen F. 2001. Molecular Cloning and Characterization of Rice Pollen Profilin. *Acta biochimica et biophysica sinica* 33(4): 452-456

Yoneda Y. 1997. How proteins are transported from cytoplasm to the nucleus. *Journal of Biochemistry* 121: 811-817

Yu L.X., Nasrallah J., Valenta R. & Parthasarathy M.V. 1998. Molecular cloning and mRNA localization of tomato pollen profilin. *Plant molecular biology* 36(5): 699-707

Z

Zuidmeer L., Salentijn E., Rivas M.F., Mancebo E.G., Asero R., Matos C.I., Pelgrom K.T., Gilissen L.J. & van Ree R. 2006. The role of profilin and lipid transfer protein in strawberry allergy in the Mediterranean area. *Clinical and experimental allergy* 36(5): 666-75

University of Granada



Estación Experimental del Zaidín (CSIC)

Department of Biochemistry, Cell and Molecular Biology of Plants



*Molecular characterization of profilin polymorphism in the
pollen of olive and other allergenic species*

Doctoral Thesis

José Carlos Jiménez López

Granada, 2008

*Molecular characterization of profilin polymorphism in the
pollen of olive and other allergenic species*

*A thesis submitted to the University of Granada in partial fulfilment
for the requirements of the degree of
DOCTOR OF PHILOSOPHY*

José Carlos Jiménez López

Doctoral thesis supervisors

*Dr. J.D Alché Ramírez
Tenured Scientist of the CSIC*

*Prof. Dr. M.I. Rodríguez García
Research Professor of the CSIC*

SUMMARY

Summary



Profilin are ubiquitous and multifunctional proteins which are present in numerous pollens. They play key roles in the regulation of the actin cytoskeleton and in the processes of cell signalling. In plants, they are encoded by multigenic families, showing a large number of isoforms or variants. Profilins also have great interest as allergens.

The present Ph.D. report analyzes profilin (*Ole e 2* allergen) polymorphism in the pollen of the olive tree and other four species with allergenic potential (*Betula pendula*, *Corylus avellana*, *Phleum pratense* and *Zea mays*). This analysis was carried out by means of cellular and molecular techniques. Profilin sequences obtained from the pollen of a wide representation of the olive tree germplasm (24 cultivars) were compared between themselves, and also with those obtained from the others four species. All these sequences represent the basis for an extensive study carried out in silico, which includes the analysis of sequence conservation, structural stability, presence of posttranslational modifications, physicochemical properties and 3D structure of the resulting proteins. Polymorphism has also been analyzed as regard to several parameters involved in the allergenic character, as are the presence of modifications in the antigenicity of the profilin molecule, or the presence of amino acid substitutions in the immunodominant epitopes involved in the recognition by T and B cells of the human immune system. The presence of polymorphism has been experimentally documented, and the differential reactivity of the different forms of profilin to several antibodies has been proved.

Finally, cellular localization of profilin has been performed by using transmission electron microscopy immunocitochemistry. Several of the antisera used showed differential localization of these proteins.

In conclusion, the present study represents a wide screening of the molecular characteristics of the profilin in the olive pollen, and its comparison with those of other species, which allows us to predict numerous biological and clinical implications. The analytical determination of such implications can be clearly facilitated by this study.

THESIS APPROACH & OBJECTIVES

Thesis approach and objectives

As set out throughout the introduction section, plant profilins belong to multigenic families in plants, showing numerous isoforms and being widely present in many different plant tissues and organs. Profilins possess interaction domains for numerous ligands and can be considered multifunctional proteins, since they are involved in the control and regulation of the actin cytoskeleton and in cell signalling. Furthermore, profilins have allergenic characteristics in the pollen of many plants. Despite this wide functionality and their numerous and interesting peculiarities, they began to be studied and characterized in *Olea europaea* L. only at the end of the 90's, and mainly in relation to their allergenic characteristics. The present work is intended to characterize the genetic variability of pollen profilins in a wide representation of the germplasm of *Olea europaea* L., as well as other species like *Betula pendula*, *Corylus avellana*, *Phleum pratense* and *Zea mays*.

The main objective of the present work is to analyze *in silico* the characteristics of the different isoforms and clones obtained, and to establish in a theoretical way the implications of this polymorphism for many different aspects of the protein functionality, also including their allergenic characteristics.

For this purpose, the following specific objectives are proposed:

1. To obtain a significant number of profilin sequences from the mature pollen of a wide sample of the olive germplasm, and from other species broadly distributed and with allergogenic relevance.
2. To characterize structurally the sequences obtained by using bioinformatics tools, determining the extension of polymorphism.
3. To predict the influence of polymorphism on the 3D-structure, the biological function and the interactions with different ligands.

4. To analyze *in silico* the influence of the intraspecific polymorphism of olive profilins on their allergenic character and the presence of cross-reactions with different species.
5. To characterize the expression and the differential reactivity of profilins from *Olea europaea* L. and other sources to anti-profilin sera, and to establish their cellular localization. This objective is intended to show the real presence of differences among the profilins analyzed on the basis of the predictions performed.

CONCLUSIONS

1. High nucleotide conservation in certain areas of the profilin sequence permits the design of highly efficient methods for the amplification of profilin mRNA and gDNA sequences from pollens of different sources.
2. Conservation is located in precise positions of the molecule, whereas the remaining positions display a high degree of polymorphism, particularly in *Olea europaea*. Such level of polymorphism is even higher than that shown by other pollen gene products so far considered like highly variable; it also probably affects other numerous species.
3. The comparison of the primary sequences clearly delimits the phylogenetic origin of profilins as regard to species and families. However, the high level of polymorphism makes difficult the establishment of varietal relationships in the olive.
4. One of the major factors able to generate polymorphism in the profilins studied, in addition to the microheterogeneities present in the primary sequence, is the occurrence of numerous potential posttranslational modifications, specially phosphorylations.
5. The generation of profilin isoforms as the result of "alternative splicing" is not expected at least in olive, since no introns have been detected in the sequences analyzed.
6. Profilin 3-D structures in the species analyzed properly match the structural models of plant profilins present in the databases, as the result of the high conservation in key residues for the geometry of the protein. Alternatively, polymorphic residues generate small local modifications in both the 2-D and 3-D structures, which do not affect the basic structure of the skeletal carbonated protein.

7. The presence of cysteine residues in the sequence seems to be no relevant for the maintenance of 3-D structure in the profilins analyzed, although it could explain the presence of dimers/multimeric forms.
8. The described polymorphism may widely affect the functionality of profilins by means of modifications in their capacity of binding their different natural ligands. As for actin binding, polymorphism would affect regions of profilins indirectly involved in the interaction between both proteins. Regarding PLP/prolin-rich proteins, the polymorphism would modify the phosphorylation state of the interaction motif. Finally, with regard to PIP, polymorphism would directly affect the interaction motif.
9. Conserved motifs within the profilin sequences are responsible of the wide presence of crossed allergic reactions between profilins from different species and plant-derived food.
10. Profilin polymorphism would lead on the other hand to the putative presence of differential continuous and conformational epitopes in these proteins, which can be recognized by T and B cells of the human immune system. This mechanism may explain the presence of specific reactions to particular isoforms of profilins in allergic patients.
11. The experimental results obtained confirm several aspects already predicted on the basis of the analysis of the primary sequences. These include: a) the presence of different profilin isoforms, b) the differential reactivity of profilin isoforms to different antisera, and c) the wide cellular localization of profilins.