

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS**



**TESIS DOCTORAL**

**Proteínas transferidoras de lípidos (nsLTP): una familia de  
proteínas implicada en la alergia al tomate**

**Non-specific lipid transfer protein (nsLTP) : a protein family  
involved in tomato allergy**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

**Laura Martín Pedraza**

Directora

**María Teresa Villalba Díaz**

Madrid

# UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS  
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular



## TESIS DOCTORAL

**PROTEÍNAS TRANSFERIDORAS DE LÍPIDOS (nsLTP): UNA  
FAMILIA DE PROTEÍNAS IMPLICADA EN LA ALERGIA AL  
TOMATE**

**NON-SPECIFIC LIPID TRANSFER PROTEIN (nsLTP): A  
PROTEIN FAMILY INVOLVED IN TOMATO ALLERGY**

PRESENTADA POR

**Laura Martín Pedraza**

Director  
María Teresa Villalba Díaz

**Madrid, 2019**





U N I V E R S I D A D  
**COMPLUTENSE**  
M A D R I D

**DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD DE LA TESIS  
PRESENTADA PARA OBTENER EL TÍTULO DE DOCTOR**

D./Dña. Laura Martín Pedraza, estudiante en el Programa de Doctorado Doctorado RD99/2011 en Bioquímica, Biología Molecular y Biomedicina, de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Complutense de Madrid, como autor/a de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor y titulada:

Proteínas transferidoras de lípidos (nsLTP): una familia de proteínas implicada en la alergia al tomate / Non-specific lipid transfer protein (nsLTP): a protein family involved in tomato allergy

y dirigida por: Dra. María Teresa Villalba Díaz

---

**DECLARO QUE:**

La tesis es una obra original que no infringe los derechos de propiedad intelectual ni los derechos de propiedad industrial u otros, de acuerdo con el ordenamiento jurídico vigente, en particular, la Ley de Propiedad Intelectual (R.D. legislativo 1/1996, de 12 de abril, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Propiedad Intelectual, modificado por la Ley 2/2019, de 1 de marzo, regularizando, aclarando y armonizando las disposiciones legales vigentes sobre la materia), en particular, las disposiciones referidas al derecho de cita.

Del mismo modo, asumo frente a la Universidad cualquier responsabilidad que pudiera derivarse de la autoría o falta de originalidad del contenido de la tesis presentada de conformidad con el ordenamiento jurídico vigente.

En Madrid, a 5 de Junio de 2019

Fdo.: Laura Martín Pedraza

Esta DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD debe ser insertada en la primera página de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor.



La investigación presentada en esta *Tesis Doctoral* se ha realizado en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, de la Facultad de CC. Químicas de la Universidad Complutense de Madrid (UCM), bajo la dirección de la Dra. María Teresa Villalba Díaz.

Parte del trabajo experimental mostrado se ha llevado a cabo en colaboración con las Dras. Elena Molina Hernández y Sara Benedé Pérez del grupo de Bioactividad y Alergenicidad de proteínas y péptidos alimentarios (BIOPEP) del Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación (CSIC, Madrid, España), con el grupo de la Dra. Marta Bruix y los Drs. Héctor Zamora y David Pantoja Uceda del Instituto de Química-Física Rocasolano (CSIC, Madrid, España), con el grupo de la Dra. Cristobalina Mayorga del Instituto de Investigación Biomédica de Málaga (IBIMA, Málaga, España), con el grupo de los Drs. Javier Cuesta Herranz y Carlos Pastor Vargas del servicio de alergología e Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital Universitario Fundación Jiménez Díaz (IIS-FJD) (Madrid, España), con el grupo del Dr. Stephan Scheurer y la Dra. Andrea Wangorsch del grupo de Alergología Molecular (Vice's President) del Instituto Federal de Biomedicina y Vacunas Paul-Ehrlich-Institut (Frankfurt, Alemania) y con el grupo de la Dra. Susana Campuzano Ruiz del Departamento de Química Analítica de la Facultad de CC. Químicas de la UCM.

El apoyo financiero principal para la realización de esta *Tesis Doctoral* ha sido proporcionado por un contrato de investigación del Ministerio de Economía y Competitividad bajo la Red Temática de Investigación Cooperativa de Reacciones Adversas a Alérgenos y Fármacos en España (RIRAAF, Instituto de Salud Carlos III).





Para quien me conozca no le sorprenderá que esto es, sin dudarlo lo más difícil de esta etapa, decir adiós. El final de unos maravillosos casi 5 años en los que no sólo me ha servido para adquirir invaluable conocimientos como futura científica, si no en los que, indudablemente, he crecido como persona. Numerosas personas se han cruzado en mi camino durante todo este tiempo y a los que me gustaría dedicarles este trabajo.

En primer lugar, no puedo expresar con las suficientes palabras todo el agradecimiento que tengo para Mayte, por apostar por mí y darme toda tu confianza en 2013, por no sólo guiarme durante estos años, sino acompañarme. Gracias por ser mucho más que una magnífica maestra y directora de tesis en este duro pero maravilloso mundo de la ciencia y por estar al pie del cañón. Porque toda esta tesis es sólo una pequeña parte de lo agradecida que estoy y siempre estaré. A Rosalía, aunque hayamos compartido poco tiempo en el Laboratorio 1, siempre me ha fascinado el grandísimo conocimiento y la capacidad de enseñar que me has dado. Eres un referente para mí y para todos mis compañeros. Y no me puedo olvidar de Eva y Rodrigo, por aportar su granito de arena en este trabajo y darme calma cuando lo he necesitado.

Thanks to Dr. Stephan Scheurer and Dr. Andrea Wangorsch for giving me the opportunity to work with you as part of the team, for being so welcoming and kind to me and for teaching me with so much patience and good judgment. Thank you for trusting me for the future. From Germany I can be proud to have made great friends: Frank, Christina and Jonathan, with whom two coffees a day were not enough, to get a smile (or a dance) on hard days. I will always take you with me.

Gracias a todos los compañeros del L-1. Juan Carlos, mi compañero desde el día uno, grande tanto profesional como personalmente; Pablo, siempre dispuesto a ayudar aunque esté hasta arriba, eres un genio y sé que vas a llegar muy lejos y por último a Carmen, por ser la resistencia de "Biólogos en el departamento" conmigo. A Sara, te merecerías una dedicatoria individual en cada una de nuestras tesis, eso tenlo claro. Gracias por tener tanta paciencia enseñándome, por repasar conmigo una y mil veces las cuentas, por saber escucharme y sacarnos una sonrisa y carcajada a todos cada día, aunque no siempre pinte bonito o sea "de no". Como no acordarme de los chicos del L-3, Esperanza por mostrar al mundo lo que verdaderamente es la ciencia, para que sigas poniendo ese toque de genialidad a la par que humor en todo lo que te propones; a



Rodrigo, por ser una persona con tanta sensibilidad, siempre estarás invitado a un poco de berenjena rellena (de mi madre, por supuesto); y a mi Javi, gracias por todos los momentos de complicidad y abrazos de buenos días en el laboratorio.

Ya que tengo la oportunidad de dedicar unas palabras a las personas más importantes, no se me ocurre nadie mejor que protagonice este párrafo que mis chicas Cristina y Laura. He empezado estas páginas diciendo que poner fin a esta etapa era lo más complicado de todo, pero tengo claro que si algo me llevo conmigo es a vosotras, vuestra amistad y todos nuestros ratitos y viajes juntas. Cristina has sido un apoyo fundamental durante estos años, he podido ver en ti a una verdadera amiga, de las que pocas veces se encuentra. Y a Laura, mi pequeña gran aventurera. A veces sin saber por qué, los caminos de las personas se cruzan y aparece una conexión especial, nunca me cansaré de ver esa alegría, libertad y amor que desprendes.

He dejado para el final a aquellas personas a las que realmente quiero agradecerles todo su apoyo incondicional antes y durante estos últimos años, mi familia. A mi madre, gracias por todo tu cariño, tu apoyo y consejo siempre, a cada paso que doy y en cada decisión que tomo. Eres muy grande y no conozco a nadie que transmita más amor por los suyos, más entrega y cariño incluso en las dificultades, como lo haces tú. A mi padre, por enseñarme que se puede ser valiente con una de las sonrisas más bonitas que conozco dibujada en la cara. Gracias por enseñarme valores tan importantes como la constancia, la bondad y la solidaridad. No quisiera acabar con mi familia sin dar las gracias a mis abuelos, mis queridos abuelos.

Por último, durante toda esta etapa hay alguien que ha estado a mi lado día tras día, ayudándome en todo y aguantado conmigo con una paciencia infinita: Diego. Gracias por enseñarme a ser fuerte, a levantarme en cada caída, a que juntos podemos con todo. Gracias por hacer de la risa nuestra mayor arma, por apostar por mí, por mi futuro y acompañarme en cada decisión que tomamos remando en la misma dirección. ¡Juntos formamos el mejor equipo!

A mi familia,



## ÍNDICE/INDEX

---

ÍNDICE/INDEX.....	11
RESUMEN/SUMMARY .....	19
ABREVIATURAS/ABBREVIATIONS .....	25
INTRODUCCIÓN/INTRODUCTION .....	31
<b>1. LA REACCIÓN ALÉRGICA .....</b>	<b>31</b>
1.1. La alergia a alimentos .....	33
1.2. Factores que influyen en el desarrollo de la alergia a alimentos .....	37
1.3. Cofactores en la alergia a alimentos .....	39
<b>2. ALÉRGENOS .....</b>	<b>40</b>
2.1. Alérgenos de Clase I: superfamilia de las prolaminas .....	43
<b>3. REACTIVIDAD CRUZADA CAUSADA POR nsLTPs.....</b>	<b>47</b>
<b>4. PROCESADO INDUSTRIAL Y LA ALERGIA ALIMENTARIA.....</b>	<b>50</b>
4.1. Estabilidad al procesamiento térmico/industrial de las nsLTPs .....	53
<b>5. DIGESTIÓN GASTROINTESTINAL DE ALÉRGENOS ALIMENTARIOS .....</b>	<b>55</b>
5.1. Resistencia a la digestión gastrointestinal de las nsLTPs .....	59
<b>6. LA ALERGIA A TOMATE .....</b>	<b>60</b>
<b>7. ALÉRGENOS RECOMBINANTES .....</b>	<b>65</b>
7.1. Producción de proteínas recombinantes: sistemas de expresión .....	66
<b>8. DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO DE LA ALERGIA ALIMENTARIA.....</b>	<b>69</b>
8.1. Diagnóstico de la alergia alimentaria.....	70
8.2. Terapia en la alergia a alimentos: Inmunoterapia oral .....	73
<b>9. DETECCIÓN DE ALERGENOS EN PREPARADOS DE ALIMENTOS: UTILIZACIÓN DE GENOSENSORES .....</b>	<b>75</b>
<b>OBJETIVOS PRINCIPALES/AIMS .....</b>	<b>83</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS/MATERIALS &amp; METHODS .....</b>	<b>87</b>
<b>1. PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS TRANSFERIDORAS DE LÍPIDOS (nsLTPs) DE TOMATE.....</b>	<b>87</b>
1.1. Materiales .....	87
1.1.1. <i>Tomates</i> .....	87
1.1.2. <i>Soluciones de uso general</i> .....	87
1.2. Métodos .....	88
1.2.1. <i>Preparación de extracto proteico de semillas de tomate</i> .....	88
1.2.2. <i>Preparación de extracto proteico a partir de piel, pulpa y placenta de tomate</i> .	88

1.2.3.	<i>Purificación de los alérgenos nSola I 6 y nSola I 7 a partir de semillas de tomate</i>	89
1.2.4.	<i>Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS (PAGE-SDS)</i>	89
<b>2.</b>	<b>TÉCNICAS DE MANIPULACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS: PRODUCCIÓN RECOMBINANTE DE PROTEÍNAS EN <i>P. pastoris</i></b>	<b>90</b>
2.1.	<b>Materiales</b>	90
2.1.1.	<i>Microorganismos</i>	90
2.1.2.	<i>Vectores plasmídicos</i>	90
2.1.3.	<i>Medios de cultivo para la manipulación de <i>E. coli</i></i>	91
2.1.4.	<i>Medios para la manipulación de <i>P. pastoris</i></i>	92
2.1.5.	<i>Medios de cultivo para la expresión de proteínas marcadas para RMN</i>	92
2.1.6.	<i>Enzimas de restricción</i>	93
2.1.7.	<i>Soluciones de uso general</i>	93
2.2.	<b>Métodos</b>	94
2.2.1.	<i>Aislamiento de RNA de semillas de tomate</i>	94
2.2.2.	<i>Síntesis de cDNA</i>	94
2.2.3.	<i>Electroforesis de ácidos nucleicos</i>	95
2.2.4.	<i>Amplificación de DNA por PCR</i>	95
2.2.5.	<i>Digestión de DNA con enzimas de restricción</i>	97
2.2.6.	<i>Aislamiento y clonaje de fragmentos de DNA</i>	97
2.2.7.	<i>Aislamiento de DNA plasmídico a pequeña escala</i>	98
2.2.8.	<i>Ligación de fragmentos de DNA en pPICZαA y transformación de células competentes DH5αF'</i>	98
2.2.9.	<i>Transformación de células KM71H</i>	99
2.2.10.	<i>Expresión de proteínas recombinantes en células KM71H</i>	100
2.2.11.	<i>Purificación de las proteínas recombinantes rSola I 3, rSola I 6 y rSola I 7</i>	100
<b>3.</b>	<b>CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE PROTEÍNAS</b>	<b>101</b>
3.1.	<b>Materiales</b>	101
3.1.1.	<i>Alimentos de origen vegetal</i>	101
3.1.2.	<i>Soluciones de uso general</i>	101
3.1.3.	<i>Medios de cultivo para la expresión de proteínas marcadas para RMN</i>	102
3.2.	<b>Métodos</b>	102
3.2.1.	<i>Preparación de extractos proteicos de semillas</i>	102
3.2.2.	<i>Preparación de extractos proteicos de frutas, verduras y frutos secos</i>	102
3.2.3.	<i>Transferencia electroforética (Western blot)</i>	103
3.2.4.	<i>Electroforesis bidimensional</i>	103
3.2.5.	<i>Simulación del procesamiento térmico de los alérgenos del tomate</i>	104

3.2.6.	<i>Detección de azúcares con Concanavalina A</i>	104
3.2.7.	<i>Espectrometría de masas y secuenciación de proteínas</i>	105
3.2.8.	<i>Resonancia Magnética Nuclear (RMN)</i>	105
3.2.9.	<i>Determinación de características moleculares y búsqueda de similitud de secuencia</i>	106
<b>4.</b>	<b>CARACTERIZACIÓN ESPECTROSCÓPICA DE PROTEÍNAS</b>	<b>106</b>
4.1.	Métodos	106
4.1.1.	<i>Cálculo del coeficiente de extinción</i>	106
4.1.2.	<i>Análisis espectroscópico por dicroísmo circular</i>	107
4.1.3.	<i>Curvas de desnaturalización térmica (T<sub>m</sub>)</i>	108
<b>5.</b>	<b>CARACTERIZACIÓN INMUNOLÓGICA DE PROTEÍNAS</b>	<b>108</b>
5.1.	Materiales	108
5.1.1.	<i>Soluciones para los ensayos de inmunodetección en membrana</i>	108
5.1.2.	<i>Soluciones para los ensayos de inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA)</i>	108
5.1.3.	<i>Soluciones para el Test de Activación de Basófilos (BAT)</i>	109
5.1.4.	<i>Sueros</i>	109
5.1.5.	<i>Anticuerpos policlonales</i>	109
5.2.	Métodos	110
5.2.1.	<i>Test de Activación de Basófilos (BAT)</i>	110
5.2.2.	<i>Enzimoimmunoensayo (ELISA) indirecto</i>	110
5.2.3.	<i>Inmunodetección de proteínas tras Western Blot</i>	111
5.2.4.	<i>Ensayos de inhibición</i>	112
<b>6.</b>	<b>ENSAYOS DE DIGESTIBILIDAD GÁSTRICA Y DUODENAL</b>	<b>113</b>
6.1.	Materiales	113
6.1.1.	<i>Enzimas digestivas y fosfolípidos</i>	113
6.1.2.	<i>Medios de digestión</i>	114
6.2.	Métodos	114
6.2.1.	<i>Simulación de digestión gástrica y duodenal</i>	114
6.2.2.	<i>Análisis de péptidos generados</i>	115
6.2.3.	<i>Estudio de la capacidad de unir IgE de los péptidos generados tras la digestión por inmunodetección</i>	115
6.2.4.	<i>Estudio de alergenicidad remanente de los péptidos generados por ELISA</i>	115
<b>7.</b>	<b>ENSAYOS MEDIANTE CULTIVOS CELULARES</b>	<b>116</b>
7.1.	Materiales	116
7.1.1.	<i>Medio de cultivo de células dendríticas mieloides de la médula ósea de ratón (mDCs)</i>	116
7.1.2.	<i>Soluciones generales mDCs</i>	117

7.1.3. <i>Anticuerpos específicos</i> .....	117
7.2. Métodos .....	118
7.2.1. <i>Cultivo de mDCs de la médula ósea de ratón BALB/c</i> .....	118
7.2.2. <i>Estudio de la internación de alérgenos de tomate en mDCs</i> .....	119
7.2.3. <i>Aislamiento de enzimas lisosomales de células dendríticas</i> .....	121
7.2.4. <i>Estudio de la resistencia de las nsLTPs de tomate a la degradación por las enzimas lisosomales</i> .....	122
<b>8. TÉCNICAS ANALÍTICAS: GENERACIÓN DE UN GENOSENSOR PARA LA DETERMINACIÓN DE ALERGENOS EN ALIMENTOS</b> .....	<b>122</b>
8.1. Materiales .....	122
8.1.1. <i>Cebadores: detección de fragmentos genómicos</i> .....	122
8.1.2. <i>Reactivos</i> .....	123
8.2. Métodos .....	124
8.2.1. <i>Optimización del genosensor</i> .....	124
8.2.2. <i>Obtención de DNA genómico de extractos vegetales</i> .....	125
<b>CHAPTER I: Tomato allergy and its repercussion in cross-reactivity: Identification and characterization of natural tomato nsLTPs</b> .....	<b>129</b>
<b>1. ISOLATION AND IDENTIFICATION OF NATURAL TOMATO nsLTPs</b> .....	<b>131</b>
1.1. <i>Isolation and identification of natural tomato seed nsLTPs: Sola I 6 and Sola I 7</i> .....	134
1.2. <i>Isolation of natural tomato peel nsLTP: Sola I 3</i> .....	137
<b>2. PROTEIN CHARACTERIZATION OF ALLERGENIC nsLTP INVOLVED IN TOMATO ALLERGY</b> .	<b>137</b>
2.1. <i>Molecular characterization</i> .....	137
2.2. <i>Spectroscopy characterization</i> .....	139
<b>3. CROSS-REACTIVITY ASOCIATED WITH TOMATO nsLTP</b> .....	<b>141</b>
3.1. <i>In vitro IgE cross reactivity of natural allergens Sola I 6 and Sola I 7 from tomato seed</i>	143
<b>CHAPTER II: Recombinant production of tomato nsLTPs, Sola I 3, Sola I 6 and Sola I 7. 3D structure by Nuclear Magnetic Resonance (NMR)</b> .....	<b>145</b>
<b>1. RECOMBINANT PRODUCTION OF Sola I 3, Sola I 6 AND Sola I 7 IN <i>P. pastoris</i></b> .....	<b>148</b>
1.1. <i>Cloning and <i>P. pastoris</i> expression of tomato nsLTPs</i> .....	148
1.2. <i>Purification of the recombinant tomato nsLTPs</i> .....	149
1.3. <i>Molecular characterization of rSola I 3, rSola I 6 and rSola I 7</i> .....	152
1.4. <i>Spectroscopy characterization</i> .....	155
1.5. <i>Immunological validation of recombinant forms of tomato nsLTPs</i> .....	156
<b>2. 2D AND 3D STRUCTURE OF Sola I 6 AND Sola I 7 BY NMR</b> .....	<b>158</b>
2.1. <i>Theoretical secondary and tertiary structure prediction</i> .....	158
2.2. <i>NMR 2D and 3D structures of Sola I 6 and Sola I 7</i> .....	159

<b>CHAPTER III: Tomato nsLTPs cross-reactivity analysis: different allergenic nsLTPs in the same fruit.....</b>	<b>165</b>
<b>1. IgG CROSS-REACTIVITY ANALYSIS .....</b>	<b>168</b>
1.1. Titration of polyclonal antisera, anti-rSola I 3, anti-rSola I 6 and anti-rSola I 7. ....	168
1.2. Identification of the pl of these recombinant allergens with pAbs.....	169
1.3. IgG cross-reactivity between tomato nsLTPs.....	171
1.4. Presence of homologous proteins to Sola I 3, Sola I 6 and Sola I 7 in several vegetable foods .....	172
<b>2. IgE CROSS-REACTIVITY BETWEEN TOMATO nsLTPs.....</b>	<b>174</b>
<b>CHAPTER IV: Allergen stability: Mimicking thermal processing and gastrointestinal digestion of tomato nsLTPs. Dendritic cells allergen uptake and lysosomal degradation. ....</b>	<b>176</b>
<b>1. TOMATO PROCESSING AND THE INVOLVEMENT IN nsLTP ALLERGENICITY .....</b>	<b>182</b>
1.1. Glycation of tomato nsLTPs after food processing: structure and allergenicity stability	182
<b>2. IgE-REACTIVITY PATTERN AFTER <i>IN VITRO</i> DIGESTIBILITY OF TOMATO SEEDS AND PEEL nsLTPs WITH SIMULATED GASTROINTESTINAL FLUIDS .....</b>	<b>187</b>
2.1. SDS-PAGE analysis and chromatographic profile of the <i>in vitro</i> gastrointestinal digestion resulted peptides.....	187
2.2. Allergenic potency of tomato nsLTPs after <i>in vitro</i> digestion .....	192
<b>3. MIELOID DENDRITIC CELLS (mDCs) UPTAKE OF TOMATO nsLTPs AND LYSOSOMAL ENZYME DEGRADATION RESISTANCE. ....</b>	<b>197</b>
3.1. <i>In vitro</i> binding and mDCs uptake of Sola I 3, Sola I 6 and Sola I 7 .....	198
3.2. Lysosomal processing of allergenic tomato nsLTPs.....	203
<b>CHAPTER V: An example of the molecular diagnosis of tomato nsLTPs: allergy to pizza.....</b>	<b>208</b>
<b>1. PATIENTS SELECTION .....</b>	<b>209</b>
<b>2. IgE RECOGNITION OF PIZZA SAUCE ALLERGENS: THE IMPORTANCE OF A CORRECT DIAGNOSIS .....</b>	<b>209</b>
2.1. Detection of the potential primary nsLTP sensitizer .....	212
<b>CHAPTER VI: New techniques to detect allergens in foods. Stablishment of a Sola I 7-specific genosensor.....</b>	<b>214</b>
<b>1. Sola I 7 GENOSENSOR OPTIMIZATION.....</b>	<b>217</b>
1.1. Optimization of experimental variables of genosensor .....	218
1.2. Applicability with real samples and selectivity of genosensor .....	222
<b>CONCLUSIONES/CONCLUSIONS.....</b>	<b>229</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA/ BIBLIOGRAPHY .....</b>	<b>237</b>
<b>PUBLICACIONES/PUBLICATIONS.....</b>	<b>279</b>





**RESUMEN**

***SUMMARY***



## RESUMEN/SUMMARY

---

Type I hypersensitivity is a disorder characterized by raised IgE antibody levels against antigens in the environment that are harmless for most people (the so-called allergens). The prevalence of allergic diseases has dramatically increased in both developed and developing countries over the last decades. Among allergies, those induced by food allergens have an incidence that range from 2% among adults to 8% in the child population. The induced symptoms can vary from gastrointestinal, angioedema, oral or respiratory problems, urticarial or even systemic reactions such as anaphylaxis, severely compromising the patient's life.

Allergy should be recognized as a public health problem and efforts should be made towards its prevention, diagnosis and optimal treatment. The optimization of patient care requires a detailed study of the patient's history, an analysis of the possible environmental exposure factors; and the performance of suitable *in vivo* and *in vitro* diagnostic tests. For this purpose, skin tests should use standardized protein extracts, and if possible, with all the food tissues (seeds, peel and pulp) well represented and/or *in vitro* molecular diagnosis with relevant purified allergens.

Tomato (*Solanum lycopersicum*) belongs to the *Solanaceae* family. It has been described as one of the most prevalent plant-derived food sensitizers. In the allergogram of tomato fruit, to date 5 allergens –Sola I 1-Sola I 5- have been identified either in peel and pulp, being perfectly characterized. Most of them have been cloned and produced as recombinant proteins. Recently, numerous studies are focused on the role of seeds in triggering severe and unexpected allergic reactions. Tomato seeds extract has exhibited significant IgE reactivity, with SPT diagnostic studies showing larger diameter papules with tomato seed extract in certain patients compared to those get with total tomato protein extract, indicating the high relevance of seed proteins as a potential source of allergens. In this work, two new tomato seed allergens, Sola I 6 and Sola I 7, belonging to the non-specific lipid transfer protein (nsLTPs) family, have been identified and characterized, differing both structurally and allergenically to the already described tomato peel and pulp nsLTP, Sola I 3 (**Chapter I**).

Non-specific LTPs, belonging to prolamin superfamily, are small and compact proteins formed by 4 or 5  $\alpha$ -helices separated by short turns and a flexible and unstructured C-terminal tail firmly anchored by four disulfide bridges. They present a hydrophobic lipid-binding cavity and are divided in two different classes: class 1 (nsLTP1) which include Sola I 3 and Sola I 7; and class 2 (nsLTP2) as Sola I 6. nsLTP1 allergy is the most frequent cause of primary food allergy and food-induced anaphylactic reactions in Mediterranean countries, and involved in cross-reactivity processes that makes them be considered as important panallergen. Numerous patients sensitized to nsLTP1 allergens experience adverse reactions after ingestion of non-botanically related plant foods containing allergens of this class 1. However, type I hypersensitivity reactions by cross-reactivity between nsLTP1 and nsLTP2 have not been described.

The main objective of this thesis is to contribute to the in-depth study of tomato nsLTPs involved in sensitization processes. This detailed structural and functional comparison between these three nsLTPs, two of class 1 and one of class 2, located in the same fruit but in different tissues have provided novel insights into the complexity and relevance of this protein family and allergic sensitization.

In this study, the three tomato nsLTPs have been produced as recombinant proteins in the yeast *Pichia pastoris* and deeply characterized from structural and immunological point of views (**Chapter II**). Spectroscopic analyses of rSola I 3, rSola I 6 and rSola I 7 showed a secondary structure similar to other members of this protein family. Specific polyclonal antisera obtained from recombinant nsLTPs together with a pool of sera of allergic patients to each protein have been used to detect common IgG and IgE epitopes within other plant nsLTPs (**Chapter III**). The reactivity observed with kiwi and sunflower seeds, peach, peanut, apple and cherry extracts, perfectly matches with the high identity/similarity values of the amino acid sequence between these nsLTPs and those analysed from tomato. Cross-reactivity has not been detected with pollen nsLTPs. Our results demonstrate that Sola I 3 and Sola I 7, the tomato peel and seeds nsLTP1s, might well display cross-reactivity with other nsLTPs. The negative immunologic correlation between Sola I 6 and other nsLTPs show the absence of significant cross-reactivity of this allergen with other nsLTPs from other vegetables and pollens.

In recent years, the consumption of processed foods has increased dramatically, and these treatments generally produce multiple non-enzymatic and biochemical reactions in the food. Furthermore, another fundamental aspect to consider when assessing the allergenic potential of food allergens is the effect of gastrointestinal digestion, resulting in the production of large polypeptide fragments that retain the same, or sometimes increased ability to trigger the allergic response. Stability at high temperatures and after human digestion, and therefore proteolysis, implies the presence of immunologically active and relevant nsLTPs (**Chapter IV**). According to food processing, both tomato nsLTP1 allergens present a similar behaviour, undergoing a drastic loss of its ordered structure during severe heating, being preserved in the presence of a reducing sugar. On the other hand, Sola I 6 exhibits a greater stability when is subjected to a long treatment, losing only a 40% of its IgG recognition. During *in vitro* gastrointestinal digestion, Sola I 7 is the most stable tomato nsLTP, showing, with the presence of phosphatidylcholine, an immunoreactivity fragment even after 60 min of duodenal digestion. Next, we have also shown that despite structural and functional differences between tomato nsLTP1 and nsLTP2, both molecules retain comparable ability to bind and be internalized by mDCs. However, as previous resistance to gastrointestinal digestion results, tomato nsLTP1s show greater structural stability retaining some allergenic T-cell epitopes after at least 24 h of incubation with lysosomal enzymes.

Finally, in order to improve the diagnosis and personalized clinical treatments of sensitization to *S. lycopersicum*, an example of molecular diagnosis is provided, contributing to further insights into these allergenic molecules (**Chapter V**). These results show the need of Sola I 6 and Sola I 7 inclusion into CRD allergogram panel will improve the sensitivity and specificity of tomato allergy diagnosis, providing a more accurate clinical diagnosis. Besides, a novel and disposable electrochemical biosensor for PCR-free and selective detection of Sola I 7 has performed (**Chapter VI**). The biosensor was successfully applied to the selective analysis of the targeted Sola I 7 specific region directly in non-fragmented denatured genomic DNA extracted from tomato seeds.

## RESUMEN/SUMMARY

---

La hipersensibilidad tipo I es un trastorno caracterizado por niveles elevados de anticuerpos IgE contra antígenos presentes en el ambiente, los llamados alérgenos. La prevalencia de las enfermedades alérgicas ha aumentado drásticamente en las últimas décadas tanto en los países desarrollados como en los países en vías de desarrollo. Entre todas las alergias, las inducidas por alérgenos alimentarios tienen una incidencia que oscila entre el 2% entre los adultos y el 8% en la población infantil. Los síntomas inducidos pueden variar desde gastrointestinales, angioedema, problemas orales o respiratorios, reacciones de urticarias o incluso síntomas sistémicos como la anafilaxia, comprometiendo gravemente la vida de los pacientes.

La alergia debe ser reconocida como un problema de salud pública y deben hacerse esfuerzos para su prevención, diagnóstico y óptimo tratamiento. Una adecuada atención al paciente requiere un estudio detallado de su historia clínica, el análisis de los posibles factores ambientales y la realización de pruebas diagnósticas *in vivo* e *in vitro* adecuadas. Para ello, las pruebas cutáneas deberán utilizar extractos proteicos estandarizados y con todos los tejidos (semillas, piel y pulpa) bien representados y/o un diagnóstico molecular *in vitro* con los pertinentes alérgenos purificados.

El tomate (*Solanum lycopersicum*) pertenece a la familia de las Solanáceas. Se ha descrito como uno de los sensibilizadores alimentarios de origen vegetal más frecuentes. En su alergograma, hasta la fecha se han identificado 5 alérgenos tanto en la piel como en la pulpa, perfectamente caracterizados. Recientemente, numerosos estudios se han centrado en el papel de las semillas en el desencadenamiento de reacciones alérgicas graves e inesperadas. El extracto de semillas de tomate ha mostrado una reactividad IgE significativa, mostrando en SPT de ciertos pacientes, pápulas de mayor diámetro en comparación con las que se obtienen con extracto total, indicando la alta relevancia de las proteínas de semillas como fuente potencial de alérgenos. En este trabajo se han identificado y caracterizado dos nuevos alérgenos de semillas de tomate, Sola I 6 y Sola I 7, pertenecientes a la familia de las proteínas transferidoras de lípidos (nsLTP), que difieren tanto estructuralmente como

alergénicamente de la ya descrita nsLTP presente en la pulpa y la piel, Sola I 3 (**Capítulo I**).

Las nsLTPs, pertenecientes a la superfamilia de la prolamina, son proteínas pequeñas y compactas formadas por 4 ó 5  $\alpha$ -helices separadas por giros  $\beta$  y una cola C-terminal flexible y desestructurada, firmemente estabilizada por cuatro puentes disulfuro. Presentan una cavidad hidrofóbica de unión de lípidos y se dividen en dos clases principales: clase 1 (nsLTP1) que incluye Sola I 3 y Sola I 7; y clase 2 (nsLTP2) como Sola I 6. La alergia a las nsLTP1 es la causa primaria más frecuente de alergia a alimentos y de reacciones anafilácticas en los países mediterráneos y están implicadas en procesos de reactividad cruzada, considerándose importantes panalérgenos. Numerosos pacientes sensibilizados a nsLTP1s experimentan reacciones adversas después de la ingesta de alimentos vegetales no relacionados botánicamente que contienen alérgenos de esta clase 1 de proteínas. Sin embargo, no se han descrito reacciones de hipersensibilidad tipo I por reactividad cruzada entre nsLTP1 y nsLTP2.

El objetivo principal de esta tesis es contribuir al estudio en profundidad de las nsLTPs de tomate implicadas en procesos de sensibilización. Esta detallada comparación estructural y funcional entre estas tres nsLTPs, dos de clase 1 y una de clase 2, ha proporcionado nuevas perspectivas sobre la complejidad y relevancia de esta familia de proteínas y la sensibilización alérgica.

En este estudio, las tres nsLTPs de tomates han sido producidas como proteínas recombinantes en la levadura *P. pastoris* y se han caracterizado en profundidad desde un punto de vista estructural e inmunológico (**Capítulo II**). Los análisis espectroscópicos de rSola I 3, rSola I 6 y rSola I 7 mostraron una estructura secundaria similar a la de otros miembros de esta familia de proteínas. Se han utilizado antisueros policlonales específicos obtenidos a partir de estas nsLTPs junto con un grupo de sueros de pacientes alérgicos a cada proteína, para detectar posibles epítopos IgG e IgE comunes dentro de otras nsLTPs de plantas (**Capítulo III**). La reactividad observada con los extractos de semillas de kiwi y girasol, melocotón, cacahuete, manzana y cereza, se corresponde perfectamente con los altos valores de identidad/similaridad de la secuencia de aminoácidos entre estas nsLTPs. No se ha detectado reactividad cruzada con nsLTPs presentes en pólenes. Nuestros resultados demuestran que Sola I 3 y Sola I 7, las nsLTP1s



de la piel y semillas de tomate, podrían mostrar reactividad cruzada con otras nsLTPs. Los resultados negativos entre Sola I 6 y otras nsLTPs muestran la ausencia de reactividad cruzada significativa con otras verduras y pólenes.

En los últimos años, el consumo de alimentos procesados ha aumentado drásticamente, produciendo múltiples reacciones no enzimáticas y bioquímicas en los alimentos. Además, otro aspecto fundamental a tener en cuenta a la hora de evaluar el potencial alergénico de los alérgenos alimentarios, es el efecto de la digestión gastrointestinal, que da lugar a la producción de grandes fragmentos peptídicos que conservan la misma capacidad, o a veces mayor, de desencadenar la respuesta alérgica. Dicha estabilidad implica la presencia de nsLTPs inmunológicamente activas y relevantes (**Capítulo IV**). En relación al procesado alimentario, ambas nsLTP1 de tomate presentan un comportamiento similar, sufriendo una pérdida drástica de su estructura al someterlas a un calentamiento severo, pero conservándose en presencia de un azúcar reductor. Por otro lado, Sola I 6 presenta una mayor estabilidad, perdiendo sólo un 40% de su reconocimiento IgG. Durante la digestión gastrointestinal *in vitro*, Sola I 7 es la nsLTP de tomate más estable, presentando, en presencia de fosfatidilcolina, un fragmento inmunorreactivo incluso después de 60 min de digestión duodenal. A continuación, también hemos demostrado que a pesar de las diferencias estructurales y funcionales entre las nsLTP1 y nsLTP2 estudiadas, ambas moléculas conservan una capacidad comparable de unirse y internarse en las mDCs. Sin embargo, las nsLTP1s de tomate muestran una mayor estabilidad a la degradación por las enzimas lisosomales, conservando ciertos epítomos T alergénicos después de al menos 24 h de incubación.

Por último, para mejorar el diagnóstico y tratamientos clínicos personalizados de la sensibilización a *S. lycopersicum*, se presenta un ejemplo de diagnóstico molecular contribuyendo a una mejor comprensión de estas moléculas alergénicas (**Capítulo V**). Estos resultados muestran la necesidad de la inclusión de Sola I 6 y Sola I 7 en el panel de alérgenos del CRD, mejorando así la sensibilidad y especificidad del diagnóstico de la alergia al tomate. Además, se ha realizado un nuevo biosensor electroquímico desechable para la detección selectiva y sin PCR de Sola I 7 (**Capítulo VI**). El biosensor se aplicó con éxito al análisis selectivo de la región específica de Sola I 7 directamente en el ADN genómico no fragmentado y desnaturalizado extraído de las semillas de tomate.

## ABREVIATURAS/ABBREVIATIONS

---

**ACN:** acetonitrilo

**AGEs:** producto final de glicación

**AIT:** inmunoterapia de alérgenos

**APC:** célula presentadora de antígeno

**APC:** fluoróforo aloficocianina

**BA:** bicarbonato amónico

**BAT:** test de activación de basófilos

**BCA:** ácido bicinconínico

**BMGY:** medio complejo de glicerol tamponado

**BMMY:** medio complejo de metanol tamponado

**BSA:** seroalbúmina bovina

**βME:** beta-mercaptoetanol

**CBS:** tinción con azul de Coomassie

**CCDs:** determinantes de carbohidratos de reactividad cruzada

**CD:** dicroísmo circular

**CDR:** diagnóstico por componentes

**CLR:** receptor de carbohidratos lectina Tipo C

**ConA:** concanavalina A

**CTAB:** bromuro acetiltrimetilamonio

**D<sub>2</sub>O:** óxido de deuterio

**DB:** tampón de digestión

**DBPCFC:** test de alimentos doble ciego placebo control

**DEPC:** dietilpirocarbonato

**DM:** doble discordancia

**DMSO:** dimetil sulfoxido

**DNA:** ácido desoxirribonucleico

**DNAg:** ácido desoxirribonucleico genómico.

**dNTPs:** mezcla equimolar de los cuatro desoxirribonucleótidos

**DO:** densidad óptica

**DOL:** grado de marcaje

**DSS:** 2,2-dimetil-2-silapentano-5-sulfonato de sodio

**DTT:** ditioneitol

**EDTA:** ácido etilendiaminotetraacético

**ELISA:** ensayo de inmunoadsorción con enzimas ligadas

**EPIT:** inmunoterapia epicutánea

**FACS:** buffer de citometría de fluorescencia

**FB:** tampón de fraccionamiento

**FcεRI:** receptor de alta afinidad del fragmento Fc de IgE

**GAR-HRP:** anticuerpo de cabra frente a IgG de conejo conjugado con peroxidasa

**GI:** tracto gastrointestinal

**GM-CSF:** factor estimulador de colonias de macrófagos granulocíticos

**GM-CSF:** factor estimulador de colonias macrofágicas/granulocíticas

**HCR:** reacción en cadena de hibridación

**HLA:** antígenos de histocompatibilidad de leucocitos humanos

**HRP:** peroxidasa de rábano

**Ig:** inmunoglobulina

**IgEs:** inmunoglobulina tipo E específica

**IL:** interleuquina

**ILIT:** inmunoterapia intralinfática

**IPTG:** isopropiltiogalactósido

**ISAC:** chip de alérgenos inmovilizados en fase sólida

**LB:** medio de cultivo Luria-Bertani

**LOD:** límite de detección

**MALDI-TOF:** desorción ionización láser asistida por matriz-tiempo de vuelo

**MBs:** microesferas

**mDCs:** células dendríticas mieloides

**Met:** metionina

**MHC:** complejo principal de histocompatibilidad

**MOPS:** ácido 3-(N-morfolin) propano sulfónico

**MR:** receptor de manosa

**NC:** no complementaria

**nsLTP1:** proteína transferidora de lípidos de clase 1

**nsLTP2:** proteína transferidora de lípidos de clase 2

**nsLTPs:** proteínas transferidoras de lípidos no específicas

**OAS:** síndrome de alergia oral

**OIT:** inmunoterapia oral

**OPD:** o-fenilendiamina

**pAb:** anticuerpo policlonal

**PAGE-SDS:** electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS

**PBS:** tampón fosfato salino

**PC:** fosfatidilcolina

**PCR:** reacción en cadena de la polimerasa

**PE:** fluoróforo ficoeritrina

**PMSF:** fluoruro de fenilmetilsulfonilo

**PRs:** proteínas relacionadas con patogénesis

**R/A:** reducida/alquilada (iodoacetamida)

**RAGE:** receptor de productos finales de glicación

**RAM-HRP:** anticuerpo de conejo frente a IgG de ratón conjugado con peroxidasa

**RAST:** prueba de radioalergoadsorción

**RMN:** resonancia magnética nuclear

**RNA:** ácido ribonucleico

**RNA-bCp:** sonda de captura de RNA biotinilada

**RNA-bDp:** sonda de detección de RNA biotinilada

**RNAi:** ácido ribonucleico de interferencia

**RP-HPLC:** cromatografía líquida de

**SCIT:** inmunoterapia subcutánea

**SDS:** dodecilsulfato sódico

**SGF:** fluido de simulación de la digestión gástrica

**SIF:** fluido de simulación de la digestión intestinal

**SLIT:** inmunoterapia sublingual

**SM:** única discordancia

**SPCEs:** electrodos de carbón

**SPPT:** test de prueba cutánea-alimento

**SPT:** test de prueba cutánea

**Strep:** estreptavidina  
**TAE:** tampón Tri-acetato  
**TBP:** tributilfosfina  
**TBS:** tampón Tris salino  
**TCR:** receptor de células T  
**TE:** tris-EDTA buffer  
**TFA:** ácido trifluoroacético  
**Th:** células T colaboradoras  
**TLR:** receptores tipo Toll  
**Tm:** temperatura de fusión  
**TM:** triple discordancia  
**WB:** ensayo de inmunotransferencia

**INTRODUCCIÓN**

***INTRODUCTION***



## INTRODUCCIÓN/INTRODUCTION

### 1. LA REACCIÓN ALÉRGICA

El término alergia fue acuñado en 1906 por el médico pediatra austriaco Clemens Freiherr von Pirquet, cuando descubrió que, en las reacciones de hipersensibilidad adversas para el organismo, las moléculas que las desencadenaban, denominados antígenos, provocaban cambios en las respuestas mediadas por el sistema inmune.

La alergia o hipersensibilidad tipo I es una inmunopatología mediada por células e inmunoglobulinas pertenecientes al tipo E (IgE), y que lleva asociada una serie de patologías como la rinitis, conjuntivitis, eczema, síntomas orales, asma, trastornos gastrointestinales o el shock anafiláctico. Sin embargo, las reacciones de hipersensibilidad constituyen un conjunto muy heterogéneo de desórdenes inmunológicos, en las que todos ellos se caracterizan por presentar una respuesta excesiva y alterada del sistema inmune frente a sustancias que generalmente son inocuas para el organismo [Kay, 1997]. En función del agente mediador de la respuesta inmune, podemos encontrar cuatro tipos de reacciones de hipersensibilidad [Dahl & col., 2004] (**Tabla 1**).

**Tabla 1:** Resumen de las reacciones de hipersensibilidad.

Tipo	Respuesta inmune
Tipo I: Hipersensibilidad inmediata	Respuesta humoral (IgE)
Tipo II: Mediada por anticuerpos	Respuesta humoral (IgG o IgM)
Tipo III: Mediada por inmunocomplejos	Respuesta humoral (Inmunocomplejos)
Tipo IV: Mediada por linfocitos T	Respuesta celular (Linfocitos T y citoquinas)

De todas las reacciones de hipersensibilidad, la de tipo I o inmediata o mediada por IgE se estima que afecta a más de un 25% de la población en países desarrollados, observándose que su progresión es creciente y significativa en los países en vías de desarrollo. Los procesos alérgicos representan un problema de salud global que se ha ido agravando en las últimas décadas, incrementándose tanto su prevalencia como la gravedad de los síntomas que desencadenan. Los individuos que padecen estas patologías, también denominados **atópicos**, presentan una tendencia genética y/o familiar, generalmente manifestada desde la niñez o adolescencia, a sensibilizarse y



producir anticuerpos IgE en respuesta a sustancias comunes, generalmente proteínas, a los que se denomina alérgenos. Aunque estas patologías se denominen tradicionalmente en función del órgano al que afectan (rinitis, asma, eczema o afecciones gastrointestinales), todas ellas se encuentran estrechamente relacionadas [Togias, 2000; Leynaert & col., 2000].

Los alérgenos, dependiendo de la fuente biológica de la que procedan, van a acceder al organismo a través de diferentes vías. Los alérgenos que acceden por **vía aérea**, denominados aeroalérgenos, pueden ser tanto alérgenos de interior como de exterior. Los primeros se caracterizan por originar síntomas perennes y ser mayoritariamente de origen animal, como Der p 1 y Der p 2 de ácaros (*Dermatophagoides pteronyssinus*) [Lombardero & col., 1990; Bessot & col., 2011], Bla g 2 de cucaracha (*Blattella germanica*) [Helm & col., 1993; Arruda & col., 2001], o Fel d 1 del gato (*Felis domesticus*) [Kelly & col., 2012]. El grupo de aeroalérgenos de exterior se caracteriza por la estacionalidad de sus manifestaciones, siendo relevantes los alérgenos de pólenes de árboles como los de abedul (*Betula verrucosa*) [Ipsen & col., 1983; Hauser & col., 2011] o de olivo (*Olea europaea*) [Villalba & col., 1994], de gramíneas como la hierba timotea (*Phleum pratense*) [Ciprandi & col., 2017] o trigo (*Triticum sp.*) [Scibilia & col., 2006], de malezas como salsola (*Salsola Kali*) [Mas & col., 2015], artemisia (*Artemisia vulgaris*) [Mohapatra & col., 2008] y de ambrosia (*Ambrosia artemisiifolia*) [Wopfner & col., 2005] son alérgenos estacionales importantes en el Norte de Europa y América, respectivamente o los de hongos como los de alternaria (*Alternaria sp.*).

A diferencia de los aeroalérgenos, que interaccionan estructuralmente íntegros con las mucosas donde se produce la sensibilización del paciente, los alérgenos que entran en contacto con el individuo por la **ingestión** de alimentos, pueden llegar a sufrir importantes modificaciones estructurales antes de ser expuestos al sistema inmune. Aunque muchos de los antígenos alimentarios que son absorbidos no son capaces de sensibilizar ni inducir síntomas debido a la tolerancia que el organismo presenta frente a los mismos [Mowat, 2003], la alergia a alimentos constituye un problema sanitario muy importante en países industrializados. Existe una gran variedad de alimentos que pueden inducir procesos alérgicos. Algunos de los más comúnmente implicados en dichas reacciones se resumen en la **Tabla 2**.

**Tabla 2:** Principales alimentos implicados en reacciones alérgicas.

Fuente alimenticia	Alérgeno
Leche	Bos d ( <i>Bos domesticus</i> )
Huevo	Ovomucoide ( <i>Gallus gallus domesticus</i> )
Frutos Secos	Ara h 2/6 ( <i>Arachis hypogaea</i> )
Pescados y Mariscos	Tropomiosina ( <i>Penaeus monodon</i> )
Semillas y Especies	Sin a 1 ( <i>Sinapis alba</i> )
Legumbres	Len c 1 ( <i>Lens culinaris</i> )
Frutas	Pru p 3 ( <i>Prunus pérsica</i> )
Hortalizas	All c 3 ( <i>Allium cepa</i> )
Cereales	Tri a 14 ( <i>Triticum aestivum</i> )
Bebida alcohólica, Chocolate, Té y Café	Sac c ( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> )

La alergia **por contacto** a látex (*Hevea brasiliensis*) como Hev b 2 [Gawchik, 2011], es una de las más relevantes en el sector sanitario; y, por último, los alérgenos que acceden por vía **inyectable**, como los venenos de insectos o algunos fármacos, son importantes por la susceptibilidad de provocar reacciones anafilácticas a los individuos que las padecen.

### 1.1. La alergia a alimentos

De hace casi dos décadas data lo que se denominó como “primera oleada de síntomas” de las enfermedades alérgicas, las cuales iban asociadas al asma y rinitis alérgicas, afectando drásticamente a la población de países desarrollados. En esa época y según los estudios posteriores de Prescott & col., 2011 y Silva & col., 2016, la sensibilización a los aeroalérgenos afectaba a casi la mitad de la población en determinados países, mientras que la alergia a alimentos era poco frecuente. Sin embargo, en las dos últimas décadas ha surgido una “segunda oleada” de esta epidemia de reacciones alérgicas a alimentos, viéndose incrementada su frecuencia en torno a un 20% en los últimos diez años.

La alergia de alimentos es una respuesta inmune potencialmente severa que se desarrolla al consumir un determinado alimento o aditivo alimenticio [Branum & col., 2008] La incidencia de dichas reacciones de hipersensibilidad oscila entre un 2% en la población adulta y un 8% en la infantil. Dicha prevalencia es relativamente mayor cuando reducimos la franja temporal a los primeros años de vida y va disminuyendo progresivamente en la primera década de edad. Por ejemplo, la mayoría de los niños

que desarrollan alergia a la leche de vaca, lo hacen durante su primer año de vida, y de ellos, el 80% desarrollan tolerancia clínica a la misma antes de su quinto cumpleaños [Sampson, 2004].

Esta patología engloba cualquier reacción inmunológica anormal resultante de la ingestión de algún alimento que cause reacciones clínicas adversas y que esté mediada por IgE, diferenciándose de la intolerancia (también denominada hipersensibilidad a alimentos no alérgica) por ser ésta una respuesta adversa, generalmente crónica, causada por alguna patología fisiológica del individuo, como podría ser un desorden metabólico [Allen & col., 2006].

El comité de Colaboración Internacional de Asma, Alergia e Inmunología (iCAALL), define la alergia a alimentos como un efecto adverso a la salud debido a una respuesta inmune específica que ocurre reproduciblemente tras la ingestión de un determinado alimento [Lötvall & col., 2012] Dicha definición concuerda con la de otras guías internacionales en las que se incluyen respuestas inmunes mediadas por IgE, respuestas no mediadas por IgE, y las que resultan por la combinación de ambas [Pajno & col., 2018]. Las alergias alimentarias mediadas por IgE son las más comunes y mejor caracterizadas, asociándose a un mayor riesgo de reacciones severas, a veces fatales. La reexposición al alérgeno en estos pacientes una vez sensibilizados, desencadena la desgranulación mediada por IgE de las células efectoras, resultando en una rápida manifestación de los síntomas. Estos, en este tipo de reacción alérgica, pueden variar desde trastornos gastrointestinales como náuseas o dolor abdominal, síntomas respiratorios como la inflamación de las vías aéreas, síntomas de la piel como urticaria o prurito o incluso, reacciones sistémicas como la anafilaxia, comprometiendo gravemente la vida del individuo.

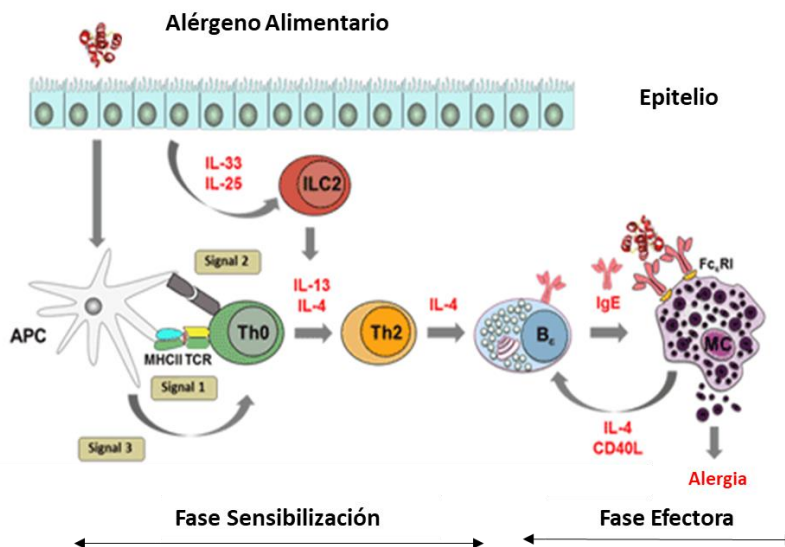
Por otro lado, se puede dar la alergia a alimentos no mediada por IgE que afecta principalmente al tracto gastrointestinal con reacciones inflamatorias asociadas a enfermedades atópicas, incluyendo entre otros, el síndrome de enterocolitis (FPIES) y por último, las alergias resultantes de la combinación de ambos mecanismos, como la esofagitis eosinofílica (EoE) (**Tabla 3**). Todas ellas presentan genes implicados en la respuesta Th2, aunque los mecanismos por los que ambas enfermedades pueden interactuar están por esclarecerse [Martin & col., 2018; Yu & col., 2016].

**Tabla 3:** Clasificación de las alergias a alimentos.

Subtipo	Prevalencia	Grupo afectado	Alérgenos comunes	Síntomas
<i>Alergia a alimentos mediada por IgE</i>	0.4-10%	Niños > Adultos	Leche, huevo, trigo, soja, frutos secos, semillas, pescado y marisco	Prurito, urticaria, angioedema, vómitos e hipotensión
Sin subtipo				
<i>Alergia a alimentos no mediada por IgE</i>	~0.05%	Niños y Adultos (3:1 ratio hombre-mujer)	Leche, trigo, huevo, cordero, soja y pollo	Vómitos y disfagia
EoE				
<i>Alergia a alimentos mixta</i>	No datos	Bebés y Niños	Leche, soja, arroz, huevo y avena	Vómitos severos y diarrea
FPIES				

### 1.1. Fases de la alergia a alimentos mediada por IgE: sensibilización y provocación

A pesar de que muchos aspectos de las bases moleculares y celulares de la alergia a alimentos continúan sin conocerse en profundidad, los acontecimientos que en ella se desarrollan, se pueden distribuir en dos fases. Una primera etapa de sensibilización, en la cual se produce la ruptura de la tolerancia al alimento y una segunda, la etapa efectora o de provocación, llevada a cabo por las células efectoras frente al alérgeno alimentario y que da lugar a los síntomas previamente mencionados [Lee, 2016] (**Figura 1**).



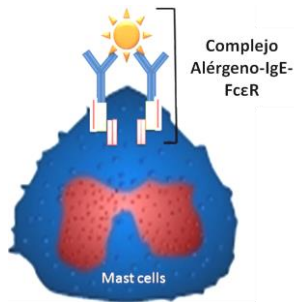
**Figura 1:** Mecanismo inmunológico clásico de la alergia a alimentos mediada por IgE. Imagen tomada de la web Paul-Ehrlich-Institut ([www.pei.de](http://www.pei.de)).

**Fase de sensibilización y memoria:** En esta primera etapa, el tracto gastrointestinal (GI) es un elemento clave, ya que, aunque su principal función sea la de procesar los alimentos ingeridos para que puedan ser absorbidos, el tracto GI también tiene el papel de prevenir la invasión de microorganismos. La mucosa intestinal está expuesta a una gran cantidad y diversidad de alimentos y microbios y, por tanto, tiene

el reto de saber distinguir entre patógenos potencialmente dañinos, y organismos comensales beneficiosos [Brandtzaeg & col., 1998; Lozupone & col., 2012]. Además de estas funciones, la mucosa del tracto GI constituye un sistema inmunológico muy eficaz y completo. Sin embargo, en numerosas ocasiones, la sensibilización a los alérgenos alimentarios también puede producirse a través de las vías respiratorias o la piel [Asero & col., 2011c] Tras la ingesta, las proteínas de los alimentos pasan a través de la barrera epitelial, contactando con las células presentadoras de antígeno (APC) del tracto GI, como las células de Langerhans, macrófagos, células B o células dendríticas. Los alérgenos son entonces captados en compartimentos vesiculares y procesados enzimáticamente en endosomas y lisosomas dando lugar a péptidos que van a ser presentados en la superficie celular mediante un acoplamiento a las moléculas de histocompatibilidad de clase II (MHC-II o HLA-II en humanos). Estos complejos estables se distribuyen en la superficie de las APC, donde se presentan a los linfocitos T naïve CD4<sup>+</sup>, los cuales en presencia de IL-4, se diferencian a células colaboradoras de tipo 2 (Th2), produciendo una serie de citoquinas como IL-5, IL-13 e IL-4. Estas citoquinas tipo-2 promueven la diferenciación de los linfocitos B a células plasmáticas productoras de anticuerpos IgE específicas de alérgenos, al igual que la proliferación y acumulación de mastocitos en el tracto intestinal, denominado mastocitosis. Por último, las inmunoglobulinas IgE, son distribuidas sistémicamente y se unen a los receptores de IgE de alta afinidad (FcεR) presentes en mastocitos y basófilos, dejando al individuo provisto de un remanente de células T y B específicas de memoria para responder a exposiciones posteriores del alérgeno [Metcalf & col., 2009; Forbes & col., 2008].

**Fase de provocación:** Tras la sensibilización, una reexposición de células del organismo al alérgeno alimentario provoca el entrecruzamiento de las moléculas IgE específicas unidas a los receptores FcεR de mastocitos y basófilos, induciendo su activación. Dicha activación se traduce en tres tipos de respuestas biológicas: por un lado, la secreción por exocitosis del contenido de los gránulos presentes en el interior celular, la denominada desgranulación al medio extracelular de mediadores proinflamatorios como la histamina o diversas proteasas (**Figura 2**), por otro lado, la síntesis y posterior secreción de mediadores lipídicos derivados de fosfolípidos

presentes en la membrana plasmática y, por último, la síntesis y secreción de citoquinas. Todos estos procesos son responsables de la sintomatología asociada a la alergia.



**Figura 2:** Entrecruzamiento del alérgeno tras su reexposición.

## 1.2. Factores que influyen en el desarrollo de la alergia a alimentos

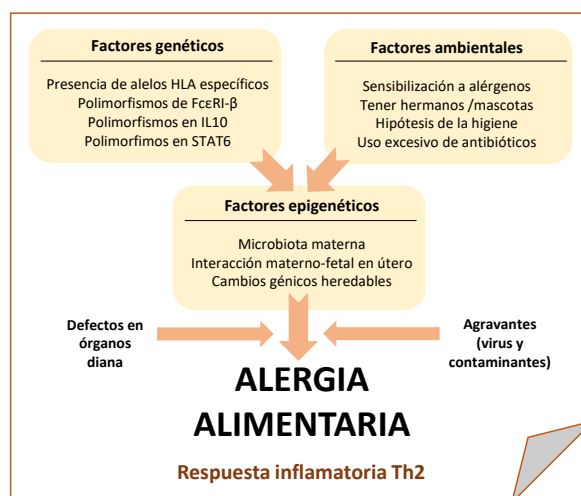
La alergia atópica es una enfermedad poligénica multifactorial, determinada tanto por factores intrínsecos (asociados a factores genéticos, edad o sexo), extrínsecos (factores ambientales) o la interacción entre ambos (factores epigenéticos), pudiéndose agravar por defectos en los órganos diana, infecciones virales o exposición a contaminantes ambientales (**Figura 3**).

Aunque el proceso completo responsable de la alergia a alimentos mediadas por IgE no se conoce en su totalidad, el hecho de que presente un **componente genético** es ampliamente aceptado [Benedé & col., 2015]. Debido a la complejidad de los procesos alérgicos se han utilizado diversas técnicas para la identificación de marcadores genéticos relevantes en los procesos alérgicos. De este modo se han podido describir polimorfismos en genes candidatos, vinculando determinados *loci* a la atopia, como el caso del *traductor de la señal y activador de la transcripción 6* (STAT6) asociado a la alergia a frutos secos, un polimorfismo del gen *IL10*, asociado al desarrollo de alergia a alimentos en determinadas poblaciones japonesas [Amoli & col., 2002; Campos Alberto & col., 2008] o mutaciones en el gen de la filagrina (FLG) implicado en el mantenimiento de la función de la barrera epitelial [Rahrig & col., 2019]. Además, al igual que en otras enfermedades atópicas, una historia familiar de atopia es un factor de riesgo muy importante, incrementándose en un 40% la probabilidad de padecer alergia a alimentos en aquellos pacientes con un familiar alérgico directo, y hasta un 80%, para aquellos con dos miembros directos de la familia afectados [Koplin & col., 2013].

Sin embargo, la predisposición genética por sí sola no puede explicar la elevada incidencia de las enfermedades alérgicas en los últimos años. De hecho, los **factores ambientales** son claves en el desarrollo de este tipo de alergia, destacando de entre todos ellos la *hipótesis de la higiene*. Esta hipótesis sostiene que “nuestro sistema inmune tiene que lidiar con numerosos factores y aprender a distinguir cuales son perjudiciales durante nuestra niñez, resultando plausible asumir que los niños que crecen en un entorno virtualmente estéril, terminarán con un sistema inmune menos educado y maduro de lo que debería ser” [Gross, 2015]. Numerosos estudios han demostrado que los niños con hermanos mayores o mascotas en el hogar presentan un menor riesgo de alergia a alimentos. Sin embargo, los nacidos a través de cesárea presentan un riesgo 7 veces mayor de padecer alergia al huevo, pescado o frutos secos [Savage & col., 2015; Eggesbo & col., 2003]. Además de la higiene excesiva, la disminución de la exposición a agentes microbianos por el uso excesivo de antibióticos también puede causar que la actividad de las células T reguladoras (Treg) se haya visto alterada, provocando un incremento de las respuestas Th1 y Th2 [Palomares & col., 2010].

En los últimos años, se han documentado numerosas evidencias de que la exposición a factores ambientales durante las etapas críticas del desarrollo puede alterar la expresión de genes y predisponer a ciertas enfermedades a través de **mecanismos epigenéticos** siendo un reflejo de las interacciones entre el ambiente externo y los genes [Prescott & col., 2011]. Dichos mecanismos se definen como la conexión entre genotipo y fenotipo, es decir, el conjunto de eventos que regulan la expresión génica de una célula sin alterar la secuencia de DNA. Los estudios realizados por Martino & col., 2010 y Goldberg & col., 2007 muestran como la diferenciación de Th1, Th2 o Treg puede regular cambios epigenéticos alterando la expresión de genes durante el desarrollo temprano del individuo. Parte de este incremento en la prevalencia de las alergias alimentarias puede ser debido a cambios ambientales que han tenido un impacto inicial en la expresión de genes en generaciones pasadas, induciendo cambios hereditarios en los patrones de expresión génica que aumentan el riesgo de padecer esta enfermedad [Hollingsworth & col., 2008]. De este modo, analizando las interacciones materno-fetal en el útero y los cambios en la microbiota intestinal materna, se ha planteado que la alergia materna puede influir posiblemente

en la edad de inicio y en el grado de severidad de la enfermedad atópica en el recién nacido [Pastor-Vargas & col., 2016; Aberg, 1993].



**Figura 3:** Factores que influyen en el desarrollo de la alergia alimentaria.

Además, numerosos pacientes que sufren alergia a pólenes o polinosis, frecuentemente muestran reacciones adversas tras ingerir una amplia gama de alimentos vegetales [Caballero & col., 1998; Cuesta-Herranz & col., 2000] y varias asociaciones entre las dos alergias han sido descritas en la literatura [Egger & col., 2006; Sicherer, 2001]. La IgE dirigida contra estructuras comunes compartidas y causantes de reactividad cruzada entre el polen y los alimentos, ha sido la explicación más ampliamente aceptada y experimentalmente apoyada, denominándose **síndrome polen-fruta (SPF)** [Rosace & col., 2019, Bohle, 2007; Vieths & col., 2002]. Un ejemplo de esta asociación ocurre entre Pru p 7 del melocotón y la proteína BP14 del polen de ciprés, causando desde síntomas leves hasta shock anafiláctico a los pacientes sensibilizados [Klingebiel & col., 2019; Sénéchal & col., 2019].

### 1.3. Cofactores en la alergia a alimentos

En ocasiones, las consecuencias de la alergia a alimentos pueden ser más graves si se encuentran implicados ciertos cofactores que pueden amplificar las respuestas alérgicas. La guía de la Academia Europea de Alergia e Inmunología Clínica (EAACI) define como cofactor a aquella circunstancia externa al paciente, asociada con una mayor gravedad de las reacciones alérgicas [Niggemann & col., 2014; Muraro & col., 2014]. Se estima que están implicados en el 25 al 39% de las reacciones anafilácticas a



alimentos en adultos [Smith & col., 2015]. Algunos de estos cofactores pueden ser **antiinflamatorios no esteroideos (AINEs)**, que pueden provocar un incremento de la permeabilidad gastrointestinal con el consiguiente aumento de la absorción intestinal de proteínas circulantes [Wolbing & col., 2013]. Además, en estudios de Gonzalez-Quintela & col., 2003 se ha descrito que el consumo de **alcohol** puede tener una influencia directa en los niveles de IgE total circulantes, relacionándolo directamente con el grado de consumo, pudiendo aparecer reacciones atópicas a determinados ingredientes de dichos licores. Y por último, el **ejercicio** es considerado como una circunstancia externa principal que favorece la aparición de reacciones alérgicas, debido por un lado a la redistribución de la sangre que transporta el alérgeno desde el intestino a los músculos esqueléticos y/o piel donde fenotípicamente, residen otros tipos de APC, y por otro a la activación de basófilos debido a los descensos de pH e incremento en la osmolaridad, resultando todo ello, en reacciones alteradas de liberación de mediadores proinflamatorios [Ansley & col., 2015; Scherf & col., 2016; Versluis & col., 2016].

## 2. ALÉRGENOS

Uno de los factores esenciales para el desarrollo de procesos alérgicos lo constituyen las moléculas desencadenantes del proceso, es decir, los alérgenos.

Son generalmente proteínas o glicoproteínas capaces de inducir la producción de anticuerpos IgE específicos en individuos susceptibles de desarrollar enfermedades alérgicas. Aunque hoy en día no se conocen con exactitud cuáles son los parámetros estructurales y/o funcionales que determinan que una especie molecular concreta pueda inducir alergia atópica, muchos de los alérgenos caracterizados hasta la fecha presentan ciertas propiedades comunes. En general, son moléculas de tamaño comprendido entre los 10 y 70 kDa, suficientemente pequeñas para poder atravesar la membrana de las mucosas y suficientemente grandes para presentar capacidad inmunogénica [Mygind & col., 1996; Riascos & col., 2009]. En ciertas ocasiones, también carbohidratos han sido considerados alérgenos [Commins & col., 2010; Kennedy & col., 2013]. En ocasiones, una molécula química de bajo peso molecular, como los isocianatos y los anhídridos, actúan como haptenos pudiendo, al unirse a una proteína

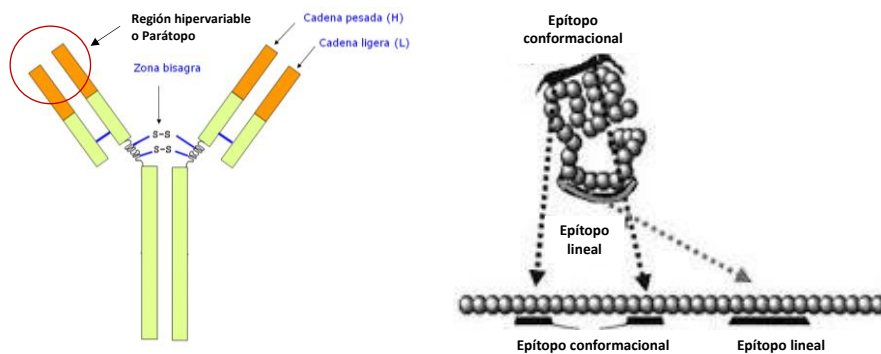
transportadora inmunogénica, constituir un alérgeno para los anticuerpos IgE del individuo alérgico.

La mayoría, si no todas, de las proteínas de una determinada fuente biológica son potencialmente alergénicas puesto que no existen patrones moleculares que definan a una molécula como alérgeno, pero el número de proteínas que reconozca un paciente sensibilizado dependerá de la base genética del individuo, de la complejidad de la fuente, de la abundancia, accesibilidad y estabilidad de dichas moléculas, así como de la sensibilidad y características de la técnica empleada para determinar dicha alergenicidad. Cuando hablamos de alérgenos alimentarios, los hábitos dietéticos y la forma de preparar las comidas, también influyen en la prevalencia de las alergias a alimentos [Sampson, 2004]. Los alérgenos procedentes de una determinada fuente cuya frecuencia de reconocimiento en los pacientes alérgicos es superior al 50% se denominan **alérgenos principales**, y son **alérgenos secundarios** cuando son reconocidos por menos del 50%. Muchos alérgenos poseen actividades enzimáticas diversas, como hidrolasas, oxidoreductasas, con función transportadora, estructural o de reserva, e incluso pueden actuar como inhibidores enzimáticos (**Tabla 4**).

**Tabla 4:** Principales funciones bioquímicas descritas en alérgenos.

Actividad bioquímica	Alérgenos
<b>TRANSPORTADORAS y DE DEFENSA</b>	
nsLTPs	Sol a 3, Pru p 3, Mal d 3, Cor a 8, Ole e 7
PR-10	Pru p 9, Cor a 1, Api g 1, Mal d 1, Sol a 4
Citocromo C	Lol p 10, Cyn d 10
Lipocalinas	Rat n 2, Mus m 1
<b>HIDROLÍTICAS</b>	
Proteasas	
Metaloproteasas	Colagenasa
Cistein-proteasas	Der p 1, Act d 1, Fic c 2, Ana c 2
Serín-proteasas	Cuc m 1, Der p 9, Der f 3, Api m 7
Glicosidasas	
Amilasas	Aca s 4, Hor v 28, Secc 28
Glucanasas	Hev b 2, Mus a 5
Pectatoliasas	Art v 6, Cup a 1
Pectinmetilesterasa	Act d 7, Sal k 1
Poligalacturonasas	Jun a 2, Cha o 2, Zea m 13
Quitinasas	Der p 15, Cas s 5, Hev b 11
<b>REGULADORAS</b>	
Proteínas de unión a Ca <sup>2+</sup>	Jun o 4, Fra e 3
Tropomiosina	Der p 10, Der f 10
Proteínas de unión a actina (Profilina)	Ara h 5, Sin a 4, Cor a 2, Fra e 2
<b>PROTEÍNAS DE RESERVA</b>	
Albúminas 2S	Sin a 1, Ara h 6, Pis v 1, Ana o 3
Globulinas 11S	Pis v 5, Sin a 2, Cor a 9
Otras albúminas	Ovoalbúmina

Las proteínas alergénicas poseen determinadas zonas en su estructura que van a ser reconocidas por las IgE específicas de sueros y células efectoras de pacientes alérgicos. Son regiones de 8-15 aminoácidos, denominadas epítomos o determinantes antigénicos, que son reconocidos por una región del anticuerpo denominada parátomo. Hay dos categorías de epítomos considerando su estructura y la interacción con el parátomo. Por un lado, los **epítomos lineales o continuos**, que interaccionan con el parátomo con una secuencia continua de aminoácidos dentro de su estructura primaria. Los **epítomos conformacionales o discontinuos** están constituidos por secuencias discontinuas de aminoácidos del antígeno, e interaccionan con el parátomo solo cuando la superficie tridimensional resultante de la estructura terciaria del antígeno está intacta (**Figura 4**). El conocimiento de los epítomos IgE de cualquier alérgeno es necesario para una mayor comprensión de la patología y de la posible utilización de estos en inmunoterapia.



**Figura 4:** Esquema de una IgE y de los diversos tipos de epítomos alergénicos.

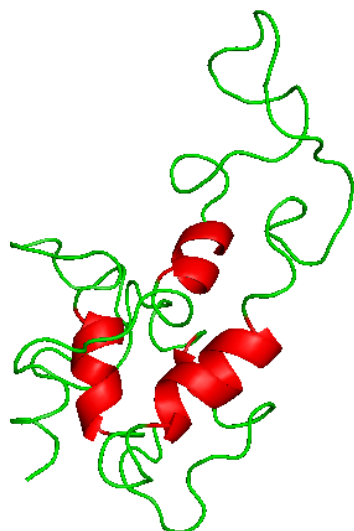
La sensibilización y desencadenamiento de síntomas en un determinado paciente a alérgenos de alimentos puede ocurrir en el tracto intestinal, alérgenos de **Clase I**, o pueden manifestarse la alergia como consecuencia de la sensibilización a un determinado aeroalérgeno, alérgenos de **Clase II**. Los alérgicos a alérgenos de Clase II desarrollan mediante reactividad cruzada, alergia a otros alérgenos comunes presentes en numerosos vegetales y frutos, experimentando síntomas orales y faríngeos cuando se ingieren en el alimento vegetal crudo. En estas alergias, por ejemplo las profilinas, proteínas encargadas de la regulación de los filamentos de actina [Rodríguez & col., 2017a], y las proteínas relacionadas con la defensa frente a patógenos (proteínas PR) generadas por las plantas como respuesta a los patógenos o estrés, como la familia de alérgenos homólogos a Bet v 1 (*Bet v 1 like*) con alérgenos como Mal d 1 de manzana o

Pyr c 1 de pera [Hofmann & col., 2013], son las dos superfamilias con mayor protagonismo. La mayoría de estos alérgenos de Clase II presentan epítomos conformacionales, siendo termolábiles y susceptibles a la degradación enzimática [Breiteneder & col., 2000].

## 2.1. Alérgenos de Clase I: superfamilia de las prolaminas

Los alérgenos principales de alimentos que desencadenan *per se* los procesos de hipersensibilidad tipo I son identificados como de Clase I, siendo proteínas muy solubles y estables a altas temperaturas, pH ácidos y acción de proteasas. Numerosos alérgenos han sido identificados, purificados y caracterizados en los últimos años, la mayoría pertenecientes a la superfamilia de las cupinas (globulinas 11S o leguminas y globulinas 7S o vicilinas) y la superfamilia de las prolaminas (albúminas 2S, inhibidores de  $\alpha$ -amilasa, inhibidores de proteasas y proteínas transferidoras de lípidos (nsLTPs)).

**Albúminas 2S:** Constituyen la principal fuente de nitrógeno durante la germinación, siendo solubles en agua y presentando un coeficiente de sedimentación entre 1.7 y 2S, de ahí su denominación [Bhatty & col., 1968]. Son proteínas pequeñas con masas moleculares entre 10-15 kDa que mantienen en general una estructura heterodimérica formada por dos cadenas polipeptídicas, una pesada de unos 9-10 kDa y otra ligera de unos 3-4 kDa, con la excepción de SFA-8 de girasol o de la albúmina 2S de guisante que presentan una única cadena. Esta estructura rica en cisteínas estabiliza las cadenas polipeptídicas mediante enlaces disulfuro intercatenarios e intracatenarios (**Figura 5**). Estas características, junto con el compacto plegamiento helicoidal, contribuyen a su resistencia a la proteólisis, así como a su alta estabilidad térmica y de pH [Blankestijn & col., 2018; Bueno-Díaz & col., 2019]. Esta estructura 3D compacta y estable aumenta el riesgo de tener reacciones alérgicas graves e incluso anafilácticas, por lo que se consideran alérgenos muy importantes [Monsalve & col., 2001]. La estructura de la proteína madura es el resultado de un proceso proteolítico postraducciona l complejo en el que las secuencias del péptido señal, secuencias terminales y del péptido de conexión entre las cadenas del precursor son eliminadas.



**Figura 5:** Modelado 3D de la albúmina 2S de mostaza amarilla (Sin a 1). Representado en rojo las hélices  $\alpha$  y en verde las estructuras desordenadas.

**Proteínas transferidoras de lípidos no específicas (nsLTPs):** Descritas por primera vez en 1975 por Kader como moléculas capaces de transportar lípidos entre membranas y de unir cadenas de acilos [Kader, 1975], posteriormente, se descubrió que se sintetizaban como preproteínas, conteniendo un péptido señal que dirige su secreción hacia la matriz extracelular, debilitándose la idea de su posible implicación en el tráfico de lípidos intracelulares. Cuarenta años después de su descubrimiento, todavía no se ha asignado a las nsLTPs un papel biológico definido, aunque se han propuesto funciones como el transporte de monómeros de cutina o su posible implicación en mecanismos de defensa de plantas. Sin embargo, estas proteínas despiertan un enorme interés tanto por su importancia como alérgenos muy ubicuos, acentuada por sus resistencias enzimática y térmica [Bencivenni & col., 2014] como por su interés biotecnológico con aplicaciones industriales como estabilizadores de la espuma en la cerveza [Douliez & col., 2001a].

Retrospectivamente, en 1992 Leonart & col. fueron los primeros en identificar una nsLTP alérgica en la piel del melocotón, denominándola según la nomenclatura de alérgenos, Pru p 3. Posteriormente, Pastorello & col. en 1994 describieron a un grupo de pacientes que presentaban síntomas de alergia oral tras el consumo de melocotones, asociando la alergia a las frutas de la familia de las Rosáceas (manzana, melocotón, cereza y pera) como un fenómeno de reactividad cruzada con la polinosis a abedul [Calkhoven & col., 1987]. Ya en 1997, Fernández-Rivas & col. publicaron un estudio con un grupo de pacientes alérgicos de España Central a frutos de Rosáceas sin polinosis, permitiendo distinguir las alergias a frutas asociadas a pólenes de las que no.

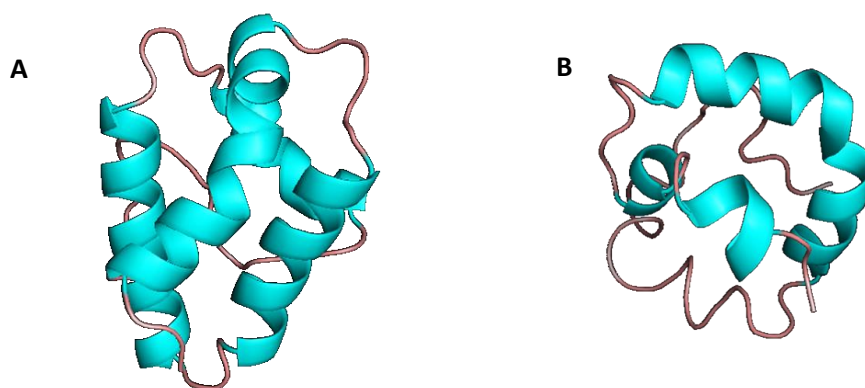
Estas proteínas se han identificado en numerosas plantas no relacionadas botánicamente como en la manzana, maíz, arroz, brócoli, cebolla, tomate, lechuga o cebada [Asero & col., 2000] y comparten propiedades funcionales y estructurales. Todas ellas se componen de una única cadena polipeptídica soluble, relativamente pequeña de entre 65 a 95 aminoácidos y que presentan puntos isoeléctricos básicos (9-10), debido a que su estructura primaria es rica sobre todo en residuos de lisina. Dentro de esta familia de alérgenos, cabe destacar dos clases: nsLTP1 con tamaños entre 9-10 kDa, y las nsLTP2 más compactas y pequeñas de aproximadamente 7-8 kDa (**Tabla 5**).

**Tabla 5:** Longitud de las nsLTPs alérgicas.

nsLTP	Especie	Longitud (aminoácidos)
<b>nsLTP1</b>		
Pru p 3	<i>Prunus persica</i>	91
Sola l 3	<i>Solanum lycopersicum</i>	91
Sola l 7	<i>Solanum lycopersicum</i>	92
Mal d 3	<i>Malus domestica</i>	91
Act d 10	<i>Actinidia deliciosa</i>	92
Api g 2	<i>Apium graveolens</i>	91
Ara h 9	<i>Arachis hypogaea</i>	92
Cor a 8	<i>Corylus avellana</i>	92
Jug r 3	<i>Juglans regia</i>	93
Vit v 1	<i>Vitis vinifera</i>	92
Tri a 14	<i>Triticum aestivum</i>	92
Sin a 3	<i>Sinapis alba</i>	92
Ole e 7	<i>Olea europea</i>	-
<b>nsLTP2</b>		
Sola l 6	<i>Solanum lycopersicum</i>	68
Pru ar 7k-LTP	<i>Prunus armeniaca</i>	68
Ara h 16	<i>Arachis hypogaea</i>	-
Jug r 8	<i>Juglans regia</i>	68
Bra r 3	<i>Brassica rapa</i>	66

Cuando se comparan las secuencias primarias de estas proteínas, generalmente presentan un porcentaje de identidad de entre 35-50% y de similitud de aproximadamente 70% [Gomar & col., 1997]. Poseen ocho cisteínas altamente conservadas a lo largo de la estructura primaria. Además, en muchas plantas presentan una naturaleza multigénica, donde varios genes codifican nsLTPs en un mismo genoma, generando isoformas que se expresan diferencialmente en los distintos tejidos desempeñando distintas funciones, como en el caso de la zanahoria [Sterk & col., 1991], el maíz [Sossountzov & col., 1991] o el tomate [Martín-Pedraza & col., 2016; Giangrieco & col., 2015].

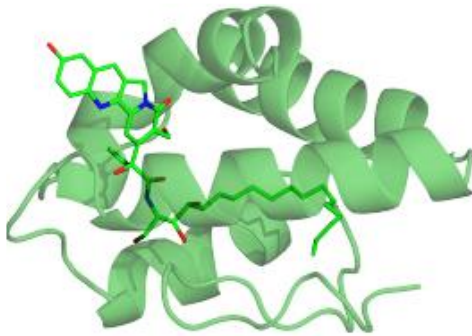
La estructura tridimensional de estos alérgenos, determinada experimentalmente por Resonancia Magnética Nuclear (RMN) o difracción de Rayos X, es una estructura compacta formada por 4 o 5 hélices  $\alpha$  separadas por giros cortos y con un segmento C-terminal flexible y desestructurado (**Figura 6**). Esta estructura está firmemente anclada por los cuatro puentes disulfuro mencionados anteriormente, formando un motivo de 8 cisteínas con un patrón de C-X<sub>n</sub>-C-X<sub>n</sub>-CC-X<sub>n</sub>-CXC-X<sub>n</sub>-C-X<sub>n</sub>-C. Las dos familias de nsLTPs presentan diferente distribución de los puentes disulfuro: las nsLTP1 muestra un apareamiento en cisteínas 1-6, 2-3, 4-7 y 5-8, siendo C-X<sub>10</sub>-C-X<sub>14</sub>-CC-X<sub>20</sub>-CXC-X<sub>23</sub>-C-X<sub>14</sub>-C [Pasquato & col., 2006], mientras que en las nsLTP2, las posiciones de las cisteínas 5 y 6 se muestran intercambiadas y por lo tanto quedarían los siguientes pares de 1-5, 2-3, 4-7 y 6-8, con una estructura final de C-X<sub>8</sub>-C-X<sub>14</sub>-CC-X<sub>9</sub>-CXC-X<sub>24</sub>-C-X<sub>7</sub>-C [Hoh & col., 2005]. Las nsLTPs presentan una gran cavidad interna hidrofóbica que simula un túnel que recorre todo el eje largo de la molécula, aunque en las nsLTP2, dicha cavidad es menor. Curiosamente, otros alérgenos vegetales como las albúminas 2S, cuya estructura 3D también se han analizado, muestran estructuras tridimensionales similares a las nsLTPs.



**Figura 6:** Modelado 3D de nsLTP1 de avellana Cor a 8 (**A**) y de nsLTP2 de nuez Jug r 8 (**B**). En azul se muestran las hélices  $\alpha$  y en rosa los motivos desordenados.

La cavidad de estos alérgenos puede alojar componentes lipídicos como ácidos grasos, fosfolípidos, palmitoil-CoA o prostaglandina B<sub>2</sub>, dependiendo de las dimensiones del túnel [Bublin & col., 2014; Salcedo & col., 2004; Kader, 1996]. Recientemente, se ha identificado el ligando de Pru p 3 como un derivado del alcaloide camptotecina unido a una molécula lipídica de fitoesfingosina (**Figura 7**). La unión de los alérgenos a lípidos puede contribuir a aumentar o disminuir la alergenicidad de los mismos [Thomas, 2014], debido a que son importantes candidatos para el reconocimiento por el sistema inmune

innato, capaces de inducir respuestas Th2 generando reacciones alérgicas en los individuos susceptibles [Tordesillas & col., 2017; Cubells-Baeza & col., 2017].



**Figura 7:** Modelado 3D de Pru p 3 con su ligando 10-hidroxi-camptotecina unido a fitoesfingosina. Imagen tomada de la publicación de Cubells-Baeza & col., 2017.

En general, las nsLTPs se encuentran mayoritariamente presentes en la piel de los frutos, lo que explicaría el hecho de que numerosos pacientes sensibilizados a estas proteínas toleren su ingesta tras pelar el fruto. Este aspecto fue abordado por Borges & col., 2006, al investigar la localización de las nsLTPs en diferentes frutas de la familia de Rosáceas y con excepción de la ciruela y el albaricoque, todas se concentraban en la piel. Estas proteínas se localizan primariamente en el citosol y son posteriormente excretadas, pudiendo influir en la vía de sensibilización. De este modo, la piel del melocotón es particularmente rica en Pru p 3, habiéndose descrito reacciones anafilácticas en pacientes españoles tras el contacto cutáneo con la piel del fruto [Fernandez-Rivas & col., 2003]. Sin embargo, recientes estudios demuestran la existencia de varias isoformas de estos alérgenos a altas concentraciones en la pulpa de tomate [Pravettoni & col., 2009], al igual que en las semillas de tomate [Bencivenni & col., 2014], avellana [Rigby & col., 2008] y pimientos [Cruz & col., 2010], sugiriendo la posible correlación de su distribución en función del género y especie vegetal.

### 3. REACTIVIDAD CRUZADA CAUSADA POR nsLTPs

La mayoría de los pacientes con alergia a alimentos presentan reacciones adversas a múltiples fuentes. Esta polisensibilización puede deberse a la sensibilización independiente y simultánea a varias fuentes alérgicas (co-sensibilización), o estar ocasionada por el reconocimiento por parte de las IgEs del paciente de epítopos comunes en alérgenos homólogos de varias fuentes alérgicas tras la sensibilización a

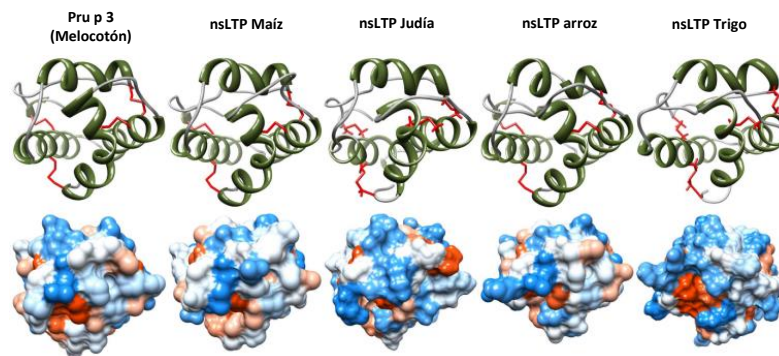


una de ellas, fenómeno denominado reactividad cruzada [Ferreira & col., 2007]. La reactividad cruzada puede desencadenar reacciones alérgicas graves e inesperadas para el paciente. Los niveles de IgE específica, así como la afinidad de las IgE por el antígeno, son factores importantes, pero lo que va a determinar en mayor medida este fenómeno son las características estructurales de los antígenos implicados tanto a nivel de estructura primaria como terciaria, al compartir regiones altamente conservadas [Hauser & col., 2010], involucrando epítomos lineales o conformacionales.

En el fenómeno de reactividad cruzada hay una premisa decisiva basada en la proximidad filogenética entre organismos alergénicos. La presencia de panalérgenos, tales como las profilinas, identificadas en pólenes y alimentos; las polcalcinas, presentes sólo en pólenes o las nsLTPs, son proteínas evolutivamente muy conservadas por desempeñar funciones esenciales para numerosas especies, pudiendo desarrollar reactividades cruzadas incluso entre pólenes y alérgenos alimentarios sin relación filogenética alguna. Desde una perspectiva clínica, la reactividad cruzada a través de estos panalérgenos, supone sensibilizaciones altamente problemáticas a veces concatenadas en el tiempo, que pueden desencadenar síntomas o no. Además, los panalérgenos podrían estar implicados en el proceso de expansión intermolecular de epítomos, mecanismo inmunológico por el que el reconocimiento de un determinado epítomo de un antígeno puede conducir la respuesta inmunitaria alérgica a través de otros epítomos [Gould & col., 2008]. Sin embargo, la reactividad cruzada asociada a otros alérgenos alimentarios como las albúminas 2S entre especies no relacionadas botánicamente parece ser infrecuente debido a la limitada similitud de las secuencias de aminoácidos de los miembros de esta familia y a la proteólisis gradual que sufren estas proteínas cuando se produce la germinación, reduciendo significativamente la probabilidad de estos procesos y viéndose restringida a los miembros de familias filogenéticamente relacionadas [Noorbakhsh & col., 2011; Bueno-Diaz & col., 2019], como en el caso de las Anacardiáceas.

Las **nsLTPs** se han identificado en multitud de fuentes vegetales, tanto en pólenes de árboles y malezas como en alimentos. Es la causa más frecuente de alergia primaria a alimentos junto con las proteínas de reserva y de ocasionar reacciones anafilácticas en los países mediterráneos, con gran capacidad de presentar reactividad cruzada [Valenta

& col., 1992; Van Ree & col., 1995]. Algunos estudios recientes han demostrado que la mayoría de los pacientes alérgicos a Rosáceas y sensibilizados sólo a nsLTPs, también experimentan reacciones adversas tras la ingestión de alimentos vegetales no relacionados botánicamente, aunque alimentos como la zanahoria, patata o plátano, no han originado síntomas a pesar de presentar este tipo de proteínas [Asero & col., 2007; Asero & col., 2002]. Este hecho podría deberse a la gran semejanza en la estructura terciaria de las nsLTPs de diversas fuentes vegetales, compartiendo el motivo común de 4 hélices  $\alpha$  estabilizadas por 4 puentes disulfuro con una cavidad central para la interacción con lípidos (**Figura 8**). Aunque el melocotón a través del alérgeno Pru p 3 es considerado como el alimento causante de la mayor parte de las alergias alimentarias a nsLTP en España y el sensibilizador primario de los pacientes a través de estos alérgenos, numerosos pacientes sensibilizados a nsLTP1 desarrollan alergia a otras fuentes vegetales tales como frutos secos, cereales, tomate y otras verduras [Asero, 2011a]. Sin embargo, reacciones de hipersensibilidad de tipo I por reactividad cruzada entre nsLTP1 y nsLTP2 no se han descrito.



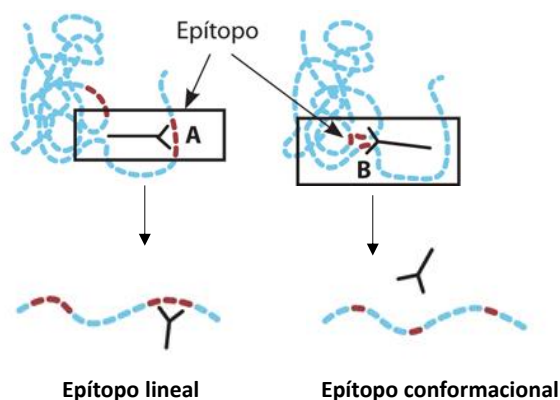
**Figura 8:** Estructura 3D de diferentes nsLTP1 presentes en alimentos vegetales. Imagen tomada de la publicación Hauser & col., 2010.

En cuanto al perfil de reconocimiento y de síntomas de estos pacientes a estos alérgenos, existe mayor gravedad cuando presentan alergia exclusivamente a frutas, mientras que las reacciones alérgicas suceden con mayor frecuencia en pacientes que además son polínicos [Palacín & col., 2012]. En conjunto, las nsLTPs son los principales alérgenos responsables de reactividad cruzada identificados en la mayoría de los alimentos vegetales, así como en el polen. La sensibilización a una u otra nsLTP depende de las diferencias geográficas, vías de sensibilización, tipo de dieta y se asocian a menudo con síntomas graves.

#### 4. PROCESADO INDUSTRIAL Y LA ALERGIA ALIMENTARIA

La gravedad de los síntomas desencadenados por proteínas presentes en los alimentos depende de dos factores principales: la primera es la susceptibilidad del sistema inmunitario de cada individuo a una determinada fuente alérgica y la segunda, es el potencial alérgico de los alérgenos contenidos en dicho alimento.

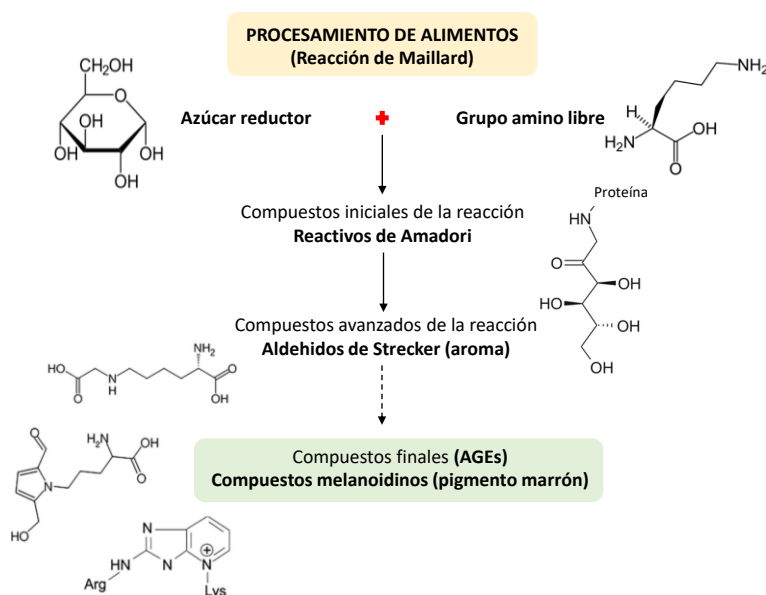
En los últimos años, se ha hecho cada vez más frecuente el consumo de alimentos procesados, causando modificaciones que implican múltiples reacciones enzimáticas y no enzimáticas en dicho alimento. El procesamiento de los alimentos hace que mejoren propiedades como el sabor, la textura, el color, aumente la preservación, la seguridad, variedad y el aspecto de los mismos [Sathe & col., 2009a]. Durante este procesado, las proteínas sufren cambios significativos, donde la naturaleza y extensión de dichos cambios van a depender de la temperatura utilizada, de la duración del tratamiento, la matriz del alimento, condiciones como el pH de la mezcla y las características intrínsecas a la proteína. Así el procesamiento de un alimento puede implicar la pérdida de la estructura terciaria o incluso, la secundaria de las proteínas, junto con la rotura de los puentes disulfuro, la formación de agregados e incluso su proteólisis [Davis & col., 2001]. Además de las alteraciones físicas, las proteínas pueden sufrir cambios químicos a altas temperaturas, que conlleven a la formación de uniones covalentes entre los grupos aminos de los aminoácidos y otros constituyentes de la matriz del alimento o aditivos, como los azúcares reductores. Por lo general, los epítopos conformacionales son más vulnerables durante el procesamiento de los alimentos, al poder ser destruidos por los tratamientos térmicos [Teodorowicz & col., 2017], mientras que los lineales siguen estando íntegros y con capacidad de unirse a los anticuerpos IgE (**Figura 9**).



**Figura 9:** Tipos de epítomos desencadenantes de reacciones alérgicas tras procesamiento térmico.

De entre todas las reacciones que tienen lugar tras los procesamientos llevados a cabo en la industria alimentaria, la que ocurre con mayor frecuencia es la **reacción de Maillard**, causando la glicación en los residuos aminoacídicos de ciertos alérgenos [Gupta & col., 2018]. Se trata de una reacción no enzimática entre el grupo carbonilo de un azúcar reductor y los grupos amino de aminoácidos básicos durante el procesamiento térmico de los alimentos, viéndose favorecido por las altas temperaturas o condiciones alcalinas. En una primera etapa, se produce la formación de una base de Schiff gracias a la unión del grupo carbonilo del azúcar reductor y el grupo amino de la proteína (N terminal o grupo  $\epsilon$ -amino de los residuos de lisinas, argininas o histidinas u otros aminoácidos), intermedio muy inestable que se reordena para formar los productos de Amadori o también llamados ketaminas. Estos productos son inestables cuando se someten a calentamiento excesivo o a largos periodos de almacenamiento, por lo que son degradados a derivados de furfurales y a compuestos carbonilos, dependiendo del azúcar reductor que haya participado y del pH de la reacción [Ames, 2007]. Posteriormente, todos estos compuestos carbonilos se transformarán, vía degradación de Strecker, en aldehídos que serán reducidos dando lugar al aroma tan característico de los alimentos procesados como el pan horneado o la fritura de tomate. En una última fase, la condensación de los furfurales y aldehídos formados generarán los compuestos marrones melanoidinos, compuestos poliméricos causantes del color de estos alimentos [Beck & col., 1990]. Los productos finales de la reacción de Maillard (AGEs) tienen el potencial de alterar la estructura y actividad biológica de algunos alérgenos, pudiendo

ser considerados como factores directamente relacionados con la patogénesis de la alergia alimentaria al desencadenar la respuesta inmunitaria (**Figura 9**).



**Figura 9:** Resumen esquemático de la reacción de Maillard.

La glicación de los alérgenos mediante la reacción de Maillard puede no provocar cambios significativos en la alergenicidad del alimento como ocurre en el caso de la nuez [Downs & col., 2016b] o puede transformar un alimento no alergénico a uno alergénico, por la formación de nuevas estructuras inmunogénicas, denominadas neoalérgenos o neoantígenos [Sathe & col., 2005]. Estos incrementan el riesgo a padecer alergia en aquellos individuos sensibilizados al alérgeno original, describiéndose en ocasiones como tras el procesamiento de un alimento, la generación de nuevos epítopos alergénicos en una proteína, explica el hecho de que algunos individuos no toleren el alimento procesado, mientras que lo pueden consumir en crudo sin ningún tipo de peligro. Además, la aparición de estos neoantígenos, causa un incremento en el potencial alergénico de numerosos alimentos como en el caso de la tropomiosina presente en la vieira o los alérgenos Ara h 1, Ara h 2 y Ara h 3 del cacahuete [Maleki & col., 2000; Beyer & col., 2001].

En la reacción de Maillard, además de aminoácidos como la lisina, la arginina o en ocasiones las histidinas, puede haber otros implicados, como se ha descrito en el caso de procesados de mango o zumo de naranja, en los que, tras periodos largos de almacenamiento, se han encontrado productos de Amadori sobre ácido aspártico, o en el caso de productos procesados de tomate, donde se han descrito productos de

Amadori derivados de serina [del Castillo & col., 2002]. En relación al azúcar reductor empleado, la glucosa, fructosa y ribosa son los más comunes, observándose mejores rendimientos de la reacción de Maillard cuando se trata de pentosas.

La glicoconjugación de las proteínas de los alimentos durante la reacción de Maillard normalmente suele conllevar la activación de las APC y el reconocimiento por parte de determinados receptores presentes en las membranas de las células dendríticas y la inducción de las respuestas derivadas de los linfocitos T, desempeñando, por lo tanto, un papel fundamental en la inducción de la respuesta inmune. Este es el caso del receptor de productos finales de reacción (RAGE), el cual según estudios de Mueller & col., 2013 reconoce preferentemente el alérgeno de huevo OVA glicado que la forma sin modificar. Similares resultados se obtuvieron en ensayos donde la sensibilización por vía cutánea o a través de la mucosa con extracto de cacahuete procesado de ratones BALB/c, daban lugar a un incremento de la respuesta inmune mediada por IgE [Moghaddam & col., 2014]. Sin embargo, la respuesta alérgica tras la glicación depende tanto de la proteína como del azúcar implicado en la reacción, resumiendo algunos ejemplos en la **Tabla 6**.

**Tabla 6:** Impacto de la reacción de Maillard en la alergenicidad de varias proteínas de alimentos.

Alimento	Alérgeno	Azúcar reductor	Respuesta alérgica
Huevo	Ovomucoide	Glucosa (96 h, 50°C)	Incremento inmunoreactividad
Cacahuete	Ara h 2/6	Glucosa (20 min, 145°C)	Incremento reactividad IgE
Cacahuete	Ara h 1	Glucosa (20 min, 145°C)	Disminución reactividad IgE
Manzana	Mal d 3	Glucosa (120 min, 100°C)	Incremento reactividad IgE
Bacalao	Parvalbúmina	Glucosa (5, 12, 24, 48 h, 60°C)	Incremento capacidad unión IgE
Marisco	Tropomiosina	Glucosa (180 min, 60°C)	Incremento reactividad IgE
Avellana	Cor a 11	Glucosa (20 min, 145°C)	Disminución reactividad IgE y liberación de mediadores

#### 4.1. Estabilidad al procesamiento térmico/industrial de las nsLTPs

Los tratamientos térmicos (calentamiento en seco o húmedo) y no térmicos (mecánico, enzimático, irradiación) se llevan a cabo en la industria alimentaria con el fin de mejorar la calidad, la estabilidad, la ausencia de contaminantes y contribuir, por tanto, a la seguridad alimentaria. Tras estos procesamientos, la mayoría de las proteínas con masas moleculares altas pierden su capacidad alérgica, pero aquellos alérgenos de baja masa molecular como las albúminas 2S o las nsLTPs parecen no alterarse. La estabilidad a altas temperaturas y a la acción proteolítica de enzimas, implica la

presencia de formas intactas y por tanto activas de alérgenos en los alimentos procesados y en determinadas bebidas como zumos, cerveza y vino, donde las nsLTPs han sido identificadas como alérgenos relevantes [García-Casado & col., 2001] [García-Robaina & col., 2001; Pastorello & col., 2003a]. Algunos miembros de esta familia de proteínas mantienen su alergenicidad tras tratamientos a altas temperaturas, como el caso de Zea m 14 contenido en las tortitas de maíz tras 30 min a 121 °C o 160 min a 100 °C [Pastorello & col., 2003b; Brenna & col., 2000; Lindorff-Larsen & col., 2001]. Además, se han obtenido respuestas positivas *in vivo* en basófilos tras el calentado 30 min a 100 °C del extracto de piel de manzana, el cual posee grandes cantidades de Mal d 3.

El uso de aditivos en la fabricación de determinados alimentos es un aspecto clave para preservar la estructura de los alérgenos y por tanto su capacidad de unir IgE. Es por ello imprescindible determinar la alergenicidad de las proteínas en el contexto de la complejidad del alimento, es decir de su matriz. Algunos estudios realizados sobre el tratamiento llevado a cabo para elaborar la mantequilla de almendra Bargman & col., 1992, muestran que el procesamiento de la almendra cruda, y más concretamente de su nsLTP Cor a 8, no afecta a su capacidad de unir IgE. Lo mismo ocurre con Mal d 3, donde tras analizar dicho alérgeno en la fabricación de néctares o zumos de manzana, mantiene la capacidad de unión a IgE cuando es tratado con glucosa en tratamientos drásticos durante 2 h a 100 °C (pudiendo favorecerse la reacción de Maillard), comparado con la muestra sin el azúcar, donde la estabilidad de la nsLTP de manzana se ve comprometida al inducirse pequeños cambios en su estructura secundaria, con una disminución de hasta 30 veces en la unión a IgE y de 100 veces en la capacidad de liberación de mediadores proinflamatorios [Sancho & col., 2005]. En general los zumos, néctares, purés, batidos o compotas de alimentos que contienen nsLTPs, no suelen ser tolerados por los pacientes sensibilizados, debido al alto grado de estabilidad de estos alérgenos que, junto a su resistencia a las proteasas, incrementa su importancia clínica [Van Ree, 2002].

## 5. DIGESTIÓN GASTROINTESTINAL DE ALÉRGENOS ALIMENTARIOS

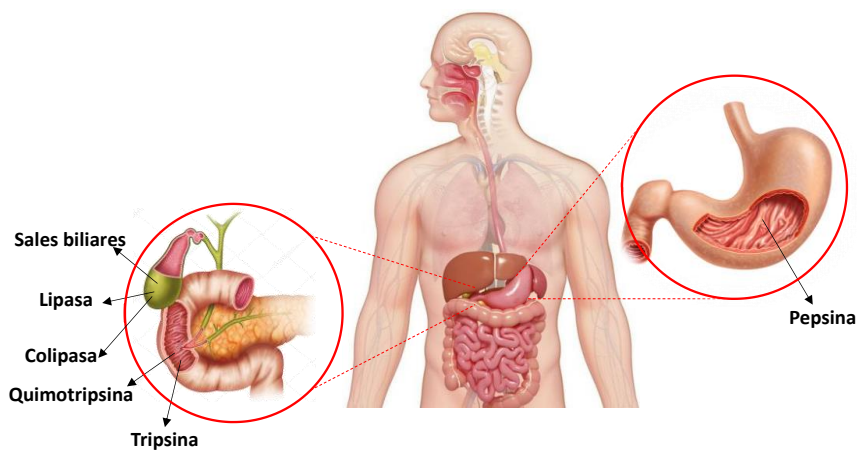
El estudio de las propiedades moleculares de los alérgenos alimentarios ha suscitado un enorme interés desde un punto de vista clínico. La estabilidad al calor, a diferentes pH y a la proteólisis constituyen características comunes de algunos alérgenos, ya que su biodisponibilidad está directamente influida por la resistencia al procesamiento que ha sufrido el alimento y por la digestión de éste en el tracto intestinal [Jimenez-Saiz & col., 2014]. Aunque la digestibilidad no es un indicador consistente de la alergenicidad del alimento, las proteínas con capacidad de inducir la sensibilización y estimular la respuesta alérgica deben mantener, tras su digestión, una integridad estructural suficiente como para originar la diferenciación de las células T y la activación mediante su unión a las IgE ancladas en las células efectoras [Rutier & col., 2012; Lehmann & col., 2006]. Por este motivo, uno de los aspectos fundamentales a considerar cuando se evalúa el potencial alergénico de las proteínas alimentarias es el efecto que tiene sobre su estructura y capacidad inmunogénica la digestión GI. Para poder alcanzar los tejidos linfáticos asociados a la mucosa intestinal, los alérgenos tienen que ser capaces de resistir al ambiente ácido del estómago, tolerar la presencia de surfactantes y la digestión por las enzimas GI [Mackie & col., 2010], tanto preservándose la estructura intacta o generándose fragmentos peptídicos de un tamaño suficientemente grande para que conserven la capacidad de desencadenar la respuesta alérgica, o incluso incrementarla, al quedar expuestos epítomos ocultos [Verhoeckx & col., 2015; Benedé & col., 2014]. Aunque existe un consenso en cuanto a la estabilidad de numerosos alérgenos, la falta de correlación entre los experimentos de digestibilidad *in vitro* y la alergenicidad de la proteína implicada se ha puesto de manifiesto en numerosos estudios. Esto puede ser debido a que los ensayos de digestibilidad *in vitro* dependen de las condiciones de hidrólisis, implicando la utilización de enzimas con órdenes de magnitud superiores a los que encontramos *in vivo*, o a que se ignoren las posibles interacciones de las proteínas estudiadas con otros componentes del alimento o de la digestión. Además, no debe ser descartado que pequeñas cantidades de los alérgenos intactos escapen a la digestión *in vivo*, desarrollando la respuesta inmune [Benedé & col., 2015].



Sin embargo, la mayoría de los antígenos potenciales presentes en la dieta son excluidos por el organismo mediante una combinación de mecanismos de carácter no inmune que tienen lugar en el lumen del tracto gastrointestinal. En primer lugar, las funciones digestivas gástrica y pancreática limitan en gran medida la cantidad de antígeno que puede llegar a entrar en contacto con la mucosa intestinal. En segundo lugar, dicha mucosa actúa como una auténtica barrera de células epiteliales unidas fuertemente entre sí y recubiertas por una capa de *mucus* de hasta 600  $\mu\text{m}$  de espesor, que previene la entrada de virus, bacterias y antígenos, excluyendo a moléculas mayores de 17 kDa [Mayer, 2003]. Por último, dentro del epitelio intestinal existe una gran cantidad y variedad de células no epiteliales implicadas en la respuesta inmune. La existencia de estados inmaduros de dicha barrera durante la infancia reduce su eficiencia [Weaver & col., 1987], lo que puede justificar que durante el primer año de vida se produzca el mayor número de casos de alergia a alimentos. Sin embargo, y a pesar de la eficiencia que representa esta barrera para frenar el paso de sustancias, aproximadamente el 2% de los antígenos alimentarios ingeridos son absorbidos y transportados por el organismo, incluso cuando la mucosa intestinal está plenamente desarrollada [Husby & col., 1987].

La digestión de las proteínas ingeridas comienza con la masticación y maceración dentro de la cavidad oral, fragmentando la comida en pequeñas partículas facilitando, de este modo, la posterior digestión por las enzimas gastrointestinales. En la cavidad oral, enzimas como la  $\alpha$ -amilasa y la lipasa lingual secretadas por las glándulas salivares, comienzan la digestión enzimática [Pekar & col., 2018]. Posteriormente, las proteínas entran en el estómago mezclándose en el medio ácido del estómago, activándose el pepsinógeno, zimógeno inactivo de la pepsina, que se activa dando lugar a la pepsina. Simultáneamente, las proteínas a pH ácidos son desnaturalizadas, quedando expuestos sitios de procesamiento y siendo más susceptibles a la hidrólisis enzimática. Con un pH óptimo entre 1.8-3.2, la pepsina, una aspartato proteasa, hidroliza proteínas preferentemente entre residuos hidrofóbicos y aromáticos como la fenilalanina, tirosina, triptófano o leucina [Oka & col., 1970; Tang, 1963]. En individuos adultos sanos, lo normal es tener un pH entre 1.5 y 3 con concentraciones de pepsina que rondan entre 0.11-0.22 mg/ml incrementándose hasta 0.58 mg/ml tras la ingestión de alimentos [Lu

& col., 2010]. En neonatos, el ácido gástrico presenta un mayor pH, implicando una reducción en la actividad de la pepsina que, junto con las bajas concentraciones de otras enzimas digestivas, causa una menor proteólisis en el tracto gastrointestinal comparada con los adultos [Gan & col., 2018]. Una situación similar ocurre a edades avanzadas, donde se reduce la producción del fluido gástrico, asociado generalmente con infecciones por *Helicobacter pylori* o episodios de gastritis recurrentes [Feldman & col., 1996]. Además, en ocasiones el pH sufre fluctuaciones dependiendo de la cantidad y composición de la comida ingerida. Así, comidas ricas en proteínas presentan una capacidad tamponadora mayor, pudiendo ascender a valores de pH 6.5, mientras que comidas ricas en grasas, tienden a la acidificación del medio [Kalantzi & col., 2006; Charman & col., 1997]. Tras la entrada de la comida al intestino, el pH ácido del contenido gástrico induce la secreción de secretina, que a su vez promueve la secreción de bicarbonato del páncreas para incrementar el pH hasta 7. La presencia de aminoácidos en el duodeno conlleva la liberación de las enzimas pancreáticas (lipasa, colipasa y sales biliares), la tripsina, quimotripsina, enteropeptidasas y elastasas, entre otras, que son secretadas en forma de zimógenos y con un pH óptimo en torno a 7.5 (Figura 10).



**Figura 10:** Dibujo esquemático de las principales enzimas encargadas de la digestión gastrointestinal.

Algunos alérgenos de los alimentos presentan patrones moleculares específicos para resistir a la actividad proteolítica llevada a cabo por las enzimas que intervienen en la digestión gastrointestinal, siendo capaces de alcanzar la mucosa intestinal como fragmentos peptídicos de tamaño considerable e inmunológicamente activos. Así, diversos estudios han demostrado que la digestión de la albúmina 2S de cacahuete por

pepsina, tripsina y quimotripsina origina grandes residuos peptídicos con el mismo potencial inmunológico que el previo a la digestión [Koppelman & col., 2010; Apostolovic & col., 2016], incluso tras un tratamiento previo del alérgeno con calor. Sin embargo, otros alérgenos de la familia de proteínas relacionadas con la patogénesis, PR-10, como del apio, Api g 1, manzana, Mal d 1, melocotón, Pru p 1 y avellana, Cor a 1 se desnaturalizan parcialmente a pH ácidos, siendo degradados y perdiendo la capacidad de unir IgE rápidamente durante la digestión y de estimular a las células del sistema inmune [Sancho & col., 2011].

Además de las condiciones fisiológicas del intestino y de la susceptibilidad intrínseca del alérgeno a ser degradado enzimáticamente, algunos de los componentes que contiene la fuente alergénica pueden afectar a la estabilidad de la proteína a la degradación gastrointestinal. Como ejemplo, la internación de los alérgenos de manzana Mal d 1, de ternera Bos d 5 o de avellana Cor a 8 en las células Caco-2 se ve reducida cuando la composición del alimento es rico en proteínas, carbohidratos o grasas, ralentizándose la digestión [Schulten & col., 2011]. De la misma manera, el alérgeno principal de la nuez de Brasil, Ber e 1, mantiene su potencial alergénico sólo cuando interacciona con una fracción lipídica propia del fruto seco [Mirotti & col., 2013].

Los lípidos se definen como pequeñas moléculas de naturaleza hidrofóbicas o anfipáticas. Entre ellos ácidos grasos, triglicéridos, glicerofosfolípidos, esfingolípidos y glicolípidos han sido descritos por participar en la sensibilización alérgica [Fahy & col., 2009]. La interacción de los alérgenos de alimentos con lípidos puede alterar su capacidad de acceder a los sitios activos del sistema inmune en los tejidos linfáticos asociados al intestino, facilitando el paso del alérgeno a través de la barrera epitelial intestinal o alterando su proceso de degradación por el mismo, afectando de esta manera, a su potencial alergénico. Algunos lípidos de la dieta pueden actuar como adyuvantes cuando se asocian con determinados alérgenos, incrementando la respuesta inmune específica a ese alérgeno [Bublin & col., 2014]. Estos complejos lípido-alérgeno pueden generarse durante el procesamiento de los alimentos con aceites vegetales ricos en triacilgliceroles (95%), fosfolípidos (4.5%) y ésteres de colesterol; o durante la digestión, donde la bilis proporciona diversos lípidos adicionales como la fosfatidilcolina que, al mezclarse con el alérgeno por la perístasis del duodeno, facilita

su emulsión. La unión de estos lípidos puede producirse a través de cavidades hidrofóbicas existentes en la estructura de los alérgenos mediante interacciones electroestáticas en la mayoría de los casos, destacando las familias de alérgenos homólogos a Bet v 1, nsLTPs o las albúminas 2S. En este sentido, algunos estudios realizados por Petersen & col., 2014, muestran como la interacción con lípidos estabiliza la estructura del alérgeno Ara h 8, proteína de cacahuete homologa a Bet v 1, que es degradada más rápidamente al someter al alérgeno a la digestión sin lípido.

### 5.1. Resistencia a la digestión gastrointestinal de las nsLTPs

Como se ha mencionado anteriormente, las nsLTPs poseen un motivo estructural común que posee una cavidad hidrofóbica capaz de unir una gran variedad de ligandos lipídicos. En estudios de Tordesillas & col., 2013 se ha especulado que la actividad antimicrobiana de las nsLTPs puede resultar de la interacción y permeabilización de las membranas biológicas, gracias en parte por la capacidad de albergar estos lípidos.

La unión de las nsLTPs a lípidos puede tener diferentes efectos en su digestibilidad. En la mayoría de los casos, esta unión incrementa su resistencia a la digestión. Este es el caso de la de melocotón Pru p 3, semillas de girasol Hel a 3 o semilla de uva Vit v 1, donde la presencia de la fosfatilcolina, naturalmente presente en el duodeno, en los ensayos de digestión *in vitro* tiene un papel protector [Vassilopoulou & col., 2006], aumentando así la capacidad de inducir la liberación de histamina por los basófilos y causar reacciones alérgicas cutáneas. Lo mismo ocurre con algunas albúminas 2S, ya que presentan una estructura terciaria y una cavidad hidrofóbica muy similar al de las nsLTPs, como ocurre en el caso de la proteína Bra j 1 de mostaza la cual permanece estable tras 60 min [Thomas & col., 2004] o Sin a 1 de mostaza, observándose un limitado grado de degradación tras 2 horas de digestión [Sirvent & col., 2012]. Por el contrario, la digestión gastrointestinal *in vitro* de la nsLTP de trigo se acentúa tras la unión a lípido [Abdullah & col., 2016]. En este caso, tras 120 min de digestión, solo un 30% de la proteína unida a lípido permanece intacta, comparada con el 80% de la proteína sin ligando. Esto se explica porque la unión del alérgeno al lípido incrementa la flexibilidad de la cadena polipeptídica, incluidas las zonas donde se encuentran los sitios consenso de digestión, desplazándolos de la cavidad hidrofóbica, presentando de este

modo, ese sitio de corte de un modo más accesible e incrementando la velocidad de proteólisis.

En conclusión, las nsLTPs constituyen panalérgenos presentes en fuentes vegetales, cuya gran incidencia alérgica en la población es producto en parte de su resistencia al procesamiento térmico y a la digestión proteolítica.

## 6. LA ALERGIA A TOMATE

El tomate (*Solanum lycopersicum*), pertenece a la familia de las Solanáceas, junto con la patata, la berenjena o la planta ornamental fuente de sustancias narcóticas denominada belladona mortífera. Es considerado un fruto y no una verdura, debido a que su parte comestible es la que contiene las semillas [Zacharisen & col., 2002], al contrario de las verduras, que están en una parte claramente diferenciada de la comestible, como ocurre con el pimiento, por ejemplo. Es un fruto muy importante en la dieta mediterránea y su consumo anual se incrementa en un 4.5% de media a lo largo de todo el mundo [USDA, 2007; FAO, 2007]. Según los últimos datos, la producción mundial de tomate batió su récord histórico en 2014 al alcanzar la cifra de 170,750 millones de kilos producidos, según datos de Faostat, el organismo de estadística de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO). Dicho organismo destaca que el aumento en la producción mundial de tomate en los últimos diez años ha sido del 32%. China sigue encabezando la lista de productores de este alimento, llegando a producir el 30.8% del total mundial. India y Estados Unidos se mantienen en segunda y tercera posición, mientras que España ocupa el quinto lugar.

En Italia y España se producen más de 6 de cada 10 tomates (62%) que se cultivan en la Unión Europea (UE), de los cuales gran parte se destinan a la exportación, aunque los mayores países exportadores de tomate mundial son México y Marruecos. Analizando los datos de la exportación de tomates en España durante los últimos diez años, en 2016 se ha incrementado en un 2.64 % con respecto al volumen exportado en 2007 [FAO, 2017].

Este incremento en el consumo es debido a sus propiedades beneficiosas para la salud, donde en estudios de Giovannucci, 1999 y Pandey & col., 1995 correlacionan el

consumo regular de tomate con un descenso en el riesgo de padecer algunos tipos de cáncer o enfermedades cardiovasculares. Estos efectos se han atribuido a la composición, rica en moléculas antioxidantes como los polifenoles,  $\beta$ -carotenos y el alto contenido en licopenos de los zumos de tomate [La Vecchia, 1998; Weisburger, 1998] no viéndose alterado el contenido en flavonoides o compuestos fenólicos durante su procesamiento [Dewanto & col., 2002; Rao, 2004].

El tomate ha sido descrito como uno de los vegetales causantes de gran parte de sensibilizaciones, con una frecuencia alérgica que oscila entre 1.5-20.0% en diferentes poblaciones de pacientes con IgE específica [Ballmer-Weber & col., 2011; Geroldinger-Simic & col., 2011; Westphal & col., 2004]. De este modo en una población de niños italianos, la tasa estimada de sensibilización a tomate osciló entre el 1.7% y el 39%, sensibilizados también a diferentes aeroalérgenos [de Martino & col., 1988]. En particular, en la región mediterránea española, el 6.5% de la población alérgica está sensibilizada al tomate, aunque el 80% de estos pacientes toleran su consumo. En recientes estudios se ha determinado que, de los 1734 pacientes españoles analizados, la prevalencia de la sensibilización a tomate acompañada con síntomas alérgicos era del 1.8% [Larramendi & col., 2008]. Existen más de 10.000 variedades de tomates de las cuales, las 6 variedades más consumidas (tomate raft, pera, tomate rosa, tomate de ensalada, tomate de rama y cherry) presentan una composición alérgica similar, demostrándose que en la piel se concentra una mayor cantidad de alérgenos que en la pulpa, induciendo mayores respuestas cutáneas [Ferrer & col., 2008].

De este modo, hasta la fecha se han descrito diversos alérgenos en los diferentes tejidos del tomate que se encuentran incluidos en la base de datos *WHO/IUIS Allergen Nomenclature* (**Tabla 7**).

**Tabla 7:** Alérgenos descritos en el tomate con sus correspondientes masas moleculares (incluyendo el péptido señal si lo hubiera). Los \* muestran los alérgenos de tomate aislados.

Alérgeno	Tipo de alérgeno	Masa molecular (kDa)
Sola I Polen	-	-
Sola I 1*	Profilina	14.4
Sola I 2*	$\beta$ -Fructofuranosidasa	61.3
Sola I 3*	nsLTP clase 1 (piel/pulpa)	11.6
Sola I 4*	Bet v 1-like (PR-10)	17.9
Sola I 5*	Ciclofilina	17.8
Sola I 6*	nsLTP clase 2 (semillas)	9.8
Sola I 7*	nsLTPs clase 1 (semillas)	11.8
Sola I ARP60S	Proteína ácida ribosomal P2	-
Sola I Quitinasa	Quitinasa clase 1	27.6
Sola I Glucanasa	Glucanasa	37.5
Sola I Peroxidasa	Peroxidasa	38.7
Sola I PG	Poligalacturonasa	50.0
Sola I PME	Pectin metilesterasa	60.0
Sola I SOD	Superóxido dismutasa	15.3
Sola I TLP	Taumatina	17.7
Sola I Vicilina 7S	Vicilina 7S	66.2

Las reacciones alérgicas graves a este fruto son menos frecuentes cuando los pacientes poseen sensibilizaciones a pólenes. Muchas alergias a frutos o vegetales se han asociado a la alergia al látex o a polen, debido a la reactividad cruzada a través de las profilinas, estimándose que aproximadamente el 22% de los pacientes alérgicos al tomate están sensibilizados a la profilina de tomate Sola I 1 [Westphal & col., 2004]. Síntomas como hinchazón, urticaria o el síndrome de alergia oral (OAS) se han descrito tras el consumo de tomates en pacientes con alergia a los pólenes de gramíneas o abedul [Boccafogli & col., 1994]. En el caso de las sensibilizaciones a tomate y pólenes, las de pólenes ocurren antes que las sensibilizaciones al vegetal, pero cuando hablamos del síndrome látex-fruta, la sensibilización a tomate ocurre de manera simultánea a la sensibilización a esta sustancia. En relación a otros alérgenos de tomate, el 17% de los pacientes están sensibilizados a la  $\beta$ -fructofuranosidasa, Sola I 2 [Foetisch & col., 2003; Westphal & col., 2003] y hasta el 15% fueron sensibilizados exclusivamente a la nsLTP del tomate, Sola I 3. Además, la pectin metilesterasa, Sola I PME, la poligalacturonasa, Sola I PG, la superóxido dismutasa, Sola I SOD [Foetisch & col., 2001], una glucanasa y una quitinasa, y una PR-10, Sola I 4, se han descrito como alérgenos del tomate [Wangorsch & col., 2015].

Vandenplas & col., 2008 estudió una serie de trabajadores de invernadero que presentaban alergia ocupacional al polen de tomate. Estos trabajadores presentaban predominantemente síntomas en las vías respiratorias superiores e inferiores, pero ninguno tenía alergia por ingestión al tomate.

Una de las formas más habituales en las que se consume el tomate en todo el mundo es procesado en forma de salsas o alimentos preparados, aunque en países mediterráneos el consumo de tomate crudo es muy importante. En Estados Unidos, la producción de tomate fresco alcanzó los 2 millones de toneladas en 2006, mientras que 10 millones de toneladas se destinaron a su procesamiento [USDA, 2007]. Jenab & col., 2005 muestran que el consumo de tomate crudo de media en algunos países de Europa es de 5.9 g/día, mientras que 9.8 g/día es de tomate procesado/cocinado. Además, el incremento de las reacciones alérgicas tras comer tomate cocinado, sugiere la presencia de alérgenos que permanecen estables a altas temperaturas y a distintos procesamientos, que no pueden ser profilinas, térmicamente muy lábiles. Es por ello, por lo que resulta necesario analizar no solo las alergias al tomate crudo, sino también a sus derivados procesados, identificando las modificaciones en las propiedades de unión a IgE de los diferentes alérgenos cuando son sometidos a los diferentes tratamientos químicos y/o térmicos [Pravettoni & col., 2009].

Otro aspecto a destacar relativo al estudio de la alergia a alimentos vegetales es el hecho del contenido alergénico diferencial en las distintas partes del fruto. Desde hace unos años, numerosas investigaciones se han centrado en aislar y caracterizar los alérgenos de las semillas de los frutos para analizar su papel en el desencadenamiento de reacciones alérgicas severas e inesperadas. Los estudios de Sirvent & col., 2014 mostraron que alrededor del 85% de los pacientes alérgicos al kiwi estaban sensibilizados a al menos un alérgeno de las semillas de kiwi, siendo la globulina 11S, Act d 12 el alérgeno de semillas mayoritario, con un reconocimiento por más del 50% (39/55) de los pacientes alérgicos incluidos en este estudio. Las semillas de tomate son una fuente rica en proteínas (22-33% de su peso seco) cuyo extracto presenta una significativa reactividad IgE en ciertos pacientes, en los que las pruebas cutáneas muestran pápulas de mayor diámetro con el extracto de semillas que con el de tomate total comercial [Bässler & col., 2009].



En 2009 Pravettoni & col. identificaron una isoforma de nsLTP en las semillas del tomate de la variedad “Galeon” y “Joy” distinta de la ya descrita en la piel y pulpa (Sola I 3). Esta isoforma parecía estar implicada en los procesos de transporte de lípidos desde el endospermo al embrión, así como en la protección de la semilla frente a infecciones de la planta durante la germinación [Sheoran & col., 2005]. Esta nsLTP de las semillas posee capacidad de unir IgEs incluso en los derivados comerciales de tomate, tales como tomates pelados, purés o pasta de tomate. Estos resultados muestran la importancia de que en un mismo fruto coexistan distintas nsLTPs alergénicas, donde las de las semillas podrían adquirir el papel de “alérgenos ocultos” para las pruebas diagnósticas típicas de las consultas [Martin-Pedraza & col., 2016].

El tratamiento de las alergias a alimentos más frecuente consiste en la estricta evitación del alimento. Esto no siempre es fácil cuando se trata de un alimento presente en muchos platos y que, en ocasiones, se pueden producir reacciones accidentales debidas a la presencia de alérgenos en alimentos ocultos. Las reacciones alérgicas provocadas por el tomate, varían, como se ha mencionado anteriormente, desde síntomas de alergia oral, reacciones gastrointestinales hasta sistémicas como la anafilaxia. Es por ello, por lo que, en los países mediterráneos, donde se consume tomate diariamente, resulta en una disminución importante en la calidad de vida de los pacientes.

En los últimos años se han utilizado diversas estrategias para disminuir la frecuencia, o al menos, la gravedad de los síntomas. Una de ellas, es la selección de cultivos de tomate con un reducido potencial alergénico, y en ese sentido la utilización de variedades más antiguas parece ser más segura para los consumidores afectados [Dölle & col., 2011] y, por otro lado, el control de factores ambientales, tales como la aplicación de etileno o ácido salicílico [Armentia & col., 2003] podrían reducir las manifestaciones alérgicas. Una última estrategia es la selección de tomates hipoalergénicos utilizando técnicas de silenciamiento de genes mediante el ácido ribonucleico de interferencia (RNAi), con el objetivo de obtener tomates en la que componentes alergénicos como la nsLTP de la piel o las profilinas estuvieran ausentes y se transmitiera esa hipoalergenicidad a los cultivos posteriores, al igual que se hizo con el alérgeno Mal d 1 de manzana o Ara h 2 de cacahuete [Gilissen & col., 2005; Dodo &

col., 2005]. Se han obtenido resultados positivos para el alérgeno de tomate Sola I 3 (nsLTP1), mostrando como los frutos de dichas plantas presentaban una disminución, aunque no la pérdida total en la alergenicidad, con concentraciones de este alérgeno de 0.02% en la línea transgénica comparado con 0.4% en los tomates sin modificar [Lorenz & col., 2006]. Sin embargo, en el caso de la profilina (Sola I 1), los cultivos no fueron viables, ya que el bloqueo de la expresión de dicho alérgeno producía alteraciones fenotípicas importantes, especies enanas y de floración temprana, que originaba tomates no aptos para su consumo. Por eso, se produjo su sustitución por la profilina no alérgica derivada de la levadura, confirmando la hipoalergenicidad de dichos tomates y la no alteración fenotípica, ya que la función biológica de la profilina se mantenía al introducir la de origen micótico [Le & col., 2006a; Le & col., 2006b; Le LQ & col., 2010]. Sin embargo, estos organismos genéticamente modificados todavía no están muy aceptados y validados en Europa, teniendo mayor interés comercial las otras alternativas mencionadas.

## **7. ALÉRGENOS RECOMBINANTES**

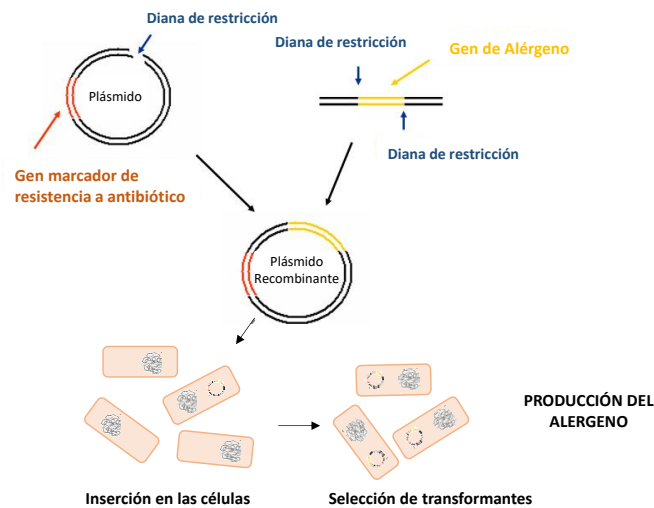
La aplicación de las técnicas de ingeniería genética para aislar y caracterizar alérgenos y mejorar sus rendimientos de producción ha incrementado notablemente el conocimiento sobre estos. Con esta aproximación se ha logrado la determinación de la secuencia primaria completa de los alérgenos con mayor o menor relevancia clínica, facilitando el conocimiento de sus propiedades estructurales y funcionales, con la identificación de proteínas homologas y de epítomos comunes en fuentes próximas o alejadas filogenéticamente, y la obtención de los alérgenos recombinantes en cantidades suficientes para abordar su inclusión en técnicas diagnósticas.

Los alérgenos recombinantes obtenidos deben poseer características moleculares e inmunológicas equivalentes a las del alérgeno natural, lo que hace necesario su validación frente al alérgeno natural. Esto incluye toda una serie de técnicas que permiten determinar la equivalencia inmunológica y alergénicas de las moléculas clonadas, así como la caracterización de su estructura a distintos niveles. La producción recombinante permite obtener el alérgeno en gran cantidad, calidad y pureza, evitando

polimorfismos o asociaciones típicas dentro de la fuente natural. De este modo, la disponibilidad del estudio con un único alérgeno aislado, permite profundizar en las propiedades antigénicas o alérgicas, siendo aplicables tanto en la diagnosis como en la terapia de las reacciones alérgicas. Esto permite el diseño de moléculas que persigan una mayor efectividad en los tratamientos de AIT, así como reducir en la medida de lo posible las reacciones severas que puedan ocurrir durante la administración de la terapia.

### 7.1. Producción de proteínas recombinantes: sistemas de expresión

La tecnología del DNA recombinante engloba toda una serie de técnicas de laboratorio que permiten la clonación de una determinada secuencia de nucleótidos. Para ello, se clona el cDNA en un vector plasmídico y se inserta en un sistema heterólogo, donde dicho DNA se amplifica produciéndose la síntesis de la proteína recombinante. Este sistema dependerá de las características de la proteína que se quiere expresar (Figura 11).



**Figura 11:** Esquema de la producción recombinante en levaduras y bacterias.

Los **sistemas de expresión procariontas**, fundamentalmente *Escherichia coli*, han permitido la obtención de gran número de proteínas recombinantes con correcto plegamiento y biológicamente activas. *E. coli* es una bacteria fácil de cultivar y de modificar genéticamente. Su nivel de producción rápido y con un alto rendimiento, acumulándose proteína recombinante en una proporción que puede llegar en ocasiones

hasta el 80% de su peso seco, hace que sea la primera posibilidad que se tiene en cuenta cuando se quiere expresar un DNA para producir una proteína. Las bacterias son útiles para la expresión de proteínas de pequeño tamaño, siempre que no presenten modificaciones postraduccionales ni puentes disulfuro en su estructura. Además, cuando las bacterias están forzadas a producir grandes cantidades de proteína se producen formas recombinantes mal plegadas que ocasionan agregados citoplasmáticos insolubles, los llamados cuerpos de inclusión, a partir de los cuales es difícil de procesar para obtener la proteína en su forma activa. El muestrario de vectores de expresión utilizados en bacterias es muy amplio, pero uno de los más usados son los plásmidos pET. En ellos los genes clonados se encuentran bajo el control de la RNA polimerasa del bacteriófago T7. Esta polimerasa es tan selectiva y productiva que hasta el 50% de los residuos de la bacteria se destinan a la síntesis del mRNA del gen clonado. Dichos plásmidos se utilizan en conjunto con células que tengan en su cromosoma la secuencia codificante para la RNA polimerasa T7 bajo el control del promotor lacUV5, el cual es inducible mediante la adición de IPTG, un análogo de lactosa no metabolizable.

Dentro de los sistemas de **producción eucariotas**, se utilizan habitualmente las levaduras y las células de insecto, aunque en ocasiones, las plantas transgénicas y las células de mamíferos pueden resultar útiles en determinadas circunstancias. Las levaduras presentan muchas de las ventajas de los sistemas bacterianos como el alto rendimiento, la estabilidad de la cepa productora, , medios baratos y químicamente definidos, pero además, son capaces de llevar a cabo modificaciones postraduccionales como glicosilaciones, y favorecer el correcto plegamiento de proteínas complejas, incluso las que tienen un elevado número de puentes disulfuro como las nsLTPs o albúminas 2S, ya que su proceso de producción es muy similar al de las células de mamífero. La levadura *Pichia pastoris* es la más utilizada en la expresión de genes heterólogos. *P. pastoris* es una levadura metilotrófica que pertenece al limitado número de especies que son capaces de emplear metanol como única fuente de carbono. Su metabolismo que ocurre en los peroxisomas, esta catalizado en sus primeras etapas por la enzima alcohol oxidasa (codificado por los genes AOX1 y AOX2) [Couderc & Baratti, 1980]. Presenta ventajas como la no hiperglicosilación de las proteínas expresadas, la baja contaminación de otros microorganismos y además la posibilidad de integrar varias copias del vector en su genoma, generando transformantes estables. En este caso, los

vectores de expresión que se utilizan son los pPICz y pPICz $\alpha$ . Estos plásmidos se integran en el cromosoma de la levadura mediante recombinación homóloga, estabilizando la cepa y dirigiendo la proteína al medio extracelular, facilitando su posterior purificación gracias a la secuencia de secreción factor- $\alpha$  en el N-terminal de la proteína. Adicionalmente, estos plásmidos permiten la expresión de proteínas recombinantes a partir del gen bajo el control del promotor AOX1, conteniendo el gen de resistencia a zeocina para la selección de los plásmidos recombinantes.

Otros sistemas de interés para la expresión de proteínas recombinantes que requieren modificaciones postraduccionales complejas para su correcta actividad son las células de insecto. La transformación se realiza mediante vectores basados en baculovirus, virus infectivos para invertebrados, aunque pueden aparecer agregados proteicos o fallos en la glicosilación. Las células de mamífero son las idóneas para producir proteínas de mamíferos que necesiten modificaciones postraduccionales, aunque su rendimiento es bajo en comparación con los sistemas anteriores y su mantenimiento es caro. Por último, las plantas transgénicas, como *Arabidopsis thaliana* presentan varias ventajas como el menor riesgo de contaminación por patógenos animales, un escalado más barato y el hecho de que produzca proteínas vegetales con modificaciones postraduccionales (**Tabla 8**).

**Tabla 8:** Comparativa de los distintos sistemas de expresión de proteínas recombinantes.

Sistema de expresión	Ventajas	Inconvenientes
Bacterias	Producción rápida Alto rendimiento	Cuerpos de inclusión No modificaciones postraduccionales
Levaduras	Alto rendimiento Modificaciones postraduccionales	Tiempo de producción alto
Células de insecto	Modificaciones postraduccionales complejas	Agregados proteicos Plegamiento inadecuado
Células de mamífero	Expresión proteínas de animales	Costoso Bajo rendimiento
Plantas transgénicas	Bajo coste	Tiempo de producción alto

Debido a la complejidad en su estructura terciaria, con 4 puentes disulfuro muy conservados, numerosas proteínas recombinantes de la familia de las nsLTPs han sido producidas en *P. pastoris*, mostrando una actividad inmunológica equivalente a las formas naturales, constituyendo una herramienta muy útil para el diagnóstico [Asero & col., 2000]. Ejemplos, son Pru p 3 de melocotón, Mal d 3 de manzana o Sin a 3 de mostaza, aunque hasta la actualidad, ninguna nsLTP de tomate ha sido producida de forma recombinante.

## 8. DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO DE LA ALERGIA ALIMENTARIA

Uno de los objetivos de las investigaciones en el área de la alergia es introducir mejoras en el diagnóstico y de esta manera conseguir tratamientos más optimizados y personalizados. Tanto el diagnóstico de las enfermedades alérgicas como la terapia de las mismas se han realizado en las últimas décadas con los extractos crudos preparados a partir de las fuentes alérgicas, en la mayoría, pero no todos los casos, estandarizados con respecto al alérgeno principal y con una composición proteica más o menos conocida. Los extractos son útiles para determinar a qué fuentes biológicas son alérgicos o están sensibilizados los pacientes y para medir la cantidad de IgE total del paciente frente al conjunto de alérgenos presentes en ella.

Sin embargo, su uso presenta varios problemas tanto por la presencia de compuestos no alérgicos, como lípidos, hidratos de carbono, pigmentos u otros contaminantes, que podrían desencadenar una reacción alérgica dando lugar a falsos positivos, como por la carencia de alérgenos relevantes en una proporción adecuada lo que daría lugar a la obtención de falsos negativos. En el caso de la alergia alimentaria, la presencia específica de diferentes alérgenos en las semillas de ciertos frutos, como el kiwi [Sirvent & col., 2014] cuya presencia está poco representada cuando se utiliza el extracto completo, dificulta un diagnóstico correcto. En numerosas ocasiones se diagnostica a los pacientes porque presentan síntomas clínicos, pero paradójicamente presentan resultados negativos en las pruebas cutáneas convencionales [Ballmer-Weber & col., 2011; Martín-Pedraza & col., 2016]. De este modo, los alérgenos recombinantes representan una alternativa a los alérgenos naturales para el diagnóstico de la alergia, ya que permite por un lado el control de la concentración e integridad de los mismos, así como la composición exacta de la mezcla o bien el poder complementar los extractos con estos alérgenos cuya concentración es muy baja en los extractos obtenidos a partir de la fuente natural. Por ello, el disponer de alérgenos recombinantes que conserven los epítopos presentes en los extractos alérgicos naturales, es fundamental para una mejora en el diagnóstico y la terapia de estas patologías.

### 8.1. Diagnóstico de la alergia alimentaria

Las enfermedades alérgicas se diagnostican realizando en primer lugar una historia clínica, denominado anamnesis. Este proceso puede ir seguido de determinadas pruebas clínicas, que pueden ser de dos tipos:

Las **pruebas de punción cutáneas** que consisten en provocar una reacción alérgica en la epidermis del paciente al añadir una pequeña cantidad de alérgeno en la piel, ya sea del extracto comercial (*Skin Prick Test (SPT)*) o directamente introduciendo la lanceta en el alimento en cuestión (*Skin Prick-Prick Test (SPPT)*). Para ello, resultaría imprescindible el uso de estándares adecuados, bien sea con extractos enriquecidos con los alérgenos menos representados, con extractos de cada uno de los tejidos del fruto o partes del alimento (extracto de semillas, piel o pulpa por separado) o extractos de los alimentos sometidos al procesamiento que ha desencadenado la reacción alérgica en el paciente (salsas, alimentos crudos o tostados). Se considera como resultado positivo el tener pápulas 3 mm mayores que el control negativo, siendo un método rápido para un primer cribado de los pacientes (**Figura 12**) [Sampson, 2004].



**Figura 12:** Imagen de prueba de punción cutánea.

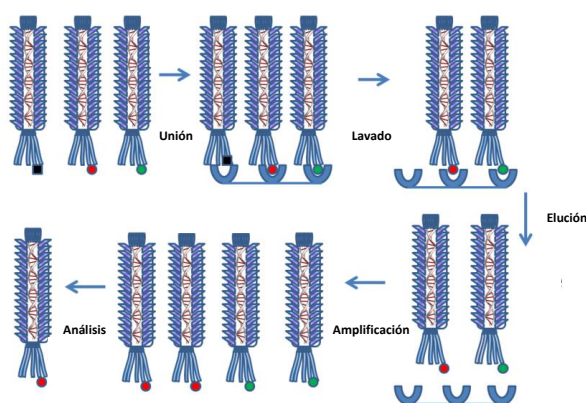
La **determinación *in vitro*** de los niveles de IgE específica presentes en el suero del paciente puede llevarse a cabo mediante RAST, ImmunoCAP o ELISA. En los años 90, se introdujo en el campo de la alergia el denominado diagnóstico molecular en el que un grupo de alérgenos recombinantes seleccionados atendiendo a su relevancia alérgica pueden ser suficientes para sustituir a los extractos naturales para la determinación de los perfiles de sensibilización de los pacientes [Valenta & col., 1991; Valenta & col., 1999a; Moser & col., 1994]. Esta técnica diagnóstica se ha denominado Diagnóstico por Componentes o CRD (*component-resolved diagnosis*) [Treadler & col., 2012].

El diagnóstico molecular utiliza alérgenos naturales o recombinantes para determinar los patrones de sensibilización en los pacientes, saber cuáles son las fuentes primarias de sensibilización, identificar la presencia de alérgenos implicados en reacciones de reactividad cruzada, siendo además especialmente importante en aquellos casos en los que la concentración del alérgeno sea muy baja o procedan de tejidos poco representados en la fuente biológica, incrementando así la exactitud en el diagnóstico. De este modo, la elección del tratamiento adecuado para una posible inmunoterapia resulta precisa [Canonica & col., 2013]. La técnica RAST (*radioallergosorbent test*) permite la detección de IgE específicas frente a determinados alérgenos usando isotopos radiactivos. En la actualidad, dicha técnica se ha sustituido por los test CAP los cuales utilizan enzimas como marcadores, al presentar mayor especificidad [Doña & col., 2018]. Estos se encuentran disponibles como plataformas simples o múltiples para determinar *in vitro* la IgE específica (IgEs) frente a determinados alérgenos. Las de uso individual como los ImmunoCAP Phadia®, permite medir la presencia de IgEs hacia aquellos alérgenos indicados por la historia clínica del paciente. Por otro lado, las plataformas múltiples o micromatrices de alérgenos, permiten la definición de la respuesta IgE de un individuo hacia un espectro enorme de alérgenos colocados en un chip [Tschepppe & col., 2017] con la utilización de pequeñas cantidades de suero. Fue desarrollado por primera vez en 2002 por Hiller & col., donde VBC Genomics puso a punto la tecnología del microarray que fue introducido posteriormente en el producto comercial ImmunoCAP *Immuno Solid Phase Allergen Chip* (ISAC) comercializado por ThermoFisher Scientific. El ISAC permite medir semicuantitativamente la unión de IgE a 112 alérgenos diferentes de 51 fuentes alergénicas diferentes. Posteriormente, el proyecto MeDALL desarrolló el microarray, incrementando el número de alérgenos disponibles desde 112 hasta 176, de los cuales 127 son alérgenos recombinantes [Lupinek & col., 2014] y el resto extractos. En la actualidad, Indoor Biotechnology produce un microarray para la detección y determinación cuantitativa de la IgE específica y total frente a 11 alérgenos. Sin embargo, aunque la potencia de estas plataformas está demostrada, debido a posibles discrepancias en los resultados obtenidos usando componentes alergénicos o extractos alergénicos, por una baja representaci3n de un determinado alérgeno en el extracto o a problemas en el límite de cuantificaci3n de la técnica [Matricardi & col., 2016]; y a su



elevado coste, hace que deba ser la última alternativa diagnóstica, aplicable a los casos en los que se desconozca la fuente primaria o el diagnóstico resulte difícil de esclarecer.

En los últimos años, el Phage Display ha sido una técnica puesta a punto para la determinación de proteínas y epítomos. Se basa en la expresión de péptidos o proteínas fusionadas a proteínas de la cubierta de los fagos. Un cribado de alto rendimiento o *high-throughput screening*, descrito por primera vez en 1985a por Smith & col., ha demostrado ser una herramienta muy potente en cuanto al estudio de interacciones específicas anticuerpo-alérgeno por su versatilidad, eficiencia y simplicidad, al poder desarrollar librerías de péptidos y permitir el enriquecimiento o amplificación del péptido seleccionado (*biopanning*) (Figura 13). En combinación con aproximaciones computacionales, es un método muy efectivo para identificar alérgenos o epítomos IgE de los alérgenos más relevantes [Tiwari & col., 2012; Chen & col., 2016].



**Figura 13:** Representación esquemática de la técnica Phage Display.

La unión de alérgenos alimentarios a anticuerpos IgEs anclados en las células efectoras conlleva la liberación de mediadores y la aparición de los síntomas de la alergia. El uso de **modelos celulares de la respuesta alérgica** permite detectar la verdadera relevancia de los alérgenos para inducir una reacción mediada por IgE, a diferencia de los ensayos inmunológicos *in vitro* tradicionales. Estos modelos celulares suelen ser basófilos o mastocitos humanos en los que se cuantifican marcadores de desgranulación celular, como ocurre en el caso del BAT (*Basophil Activation Test*).

Para el diagnóstico de las alergias a alimentos o a fármacos, se realizan además **pruebas de provocación** mediante la administración de dosis crecientes de la fuente alérgica sospechosa hasta llegar a dosis habituales del alimento, por vía oral

enmascarando el sabor con algún otro plato. El DBPCFC (*Double-Blind Placebo-Controlled Food Challenge*) es la técnica estrella o “gold standard” para evaluar la alergenicidad de un alimento, en el cual ni el alergólogo ni el paciente conocen si se está administrando el activo o el placebo, resultando costoso y potencialmente peligroso para el paciente. Para poder realizar esta prueba adecuadamente, se debe eliminar el alimento sospechoso de desencadenar la respuesta alérgica de 7 a 14 días antes de la misma, estando siempre bajo supervisión médica durante la prueba médica.

## **8.2. Terapia en la alergia a alimentos: Inmunoterapia oral**

Para el tratamiento de la alergia, según la Organización Mundial de la Salud (OMS), la inmunoterapia es el único tratamiento curativo. Actúa en la desensibilización del paciente tras administrar dosis crecientes del extracto alérgico correspondiente [Nurmatov & col., 2017]. Estos tratamientos requieren de una administración periódica e ininterrumpida durante varios años, habiéndose descrito algunos efectos secundarios como reacciones adversas durante el tratamiento. Aunque el 86% de estas reacciones adversas son moderadas, en ocasiones se han desencadenado reacciones anafilácticas e incluso la muerte del paciente [Cox & col., 2011; Antico & col., 2006].

En la alergia a alimentos, la inmunoterapia oral (OIT) y la sublingual (SLIT) son efectivas en la desensibilización a alergia a leche, huevo, cacahuete y avellana, aunque casos de esofagitis eosinofílica han sido descritos como una complicación de las inmunoterapias orales para la alergia alimentaria y la inmunoterapia sublingual para las alergias respiratorias. La gastritis eosinofílica y la colitis eosinofílica también ocurrieron raramente después de OIT con huevo y leche [Babaie & col., 2017]. La primera OIT que se administró fue descrita por 1908 por Schofield, desensibilizando con éxito a un niño al huevo. En Europa, la SLIT representa en torno al 80% de la inmunoterapia específica, al ser más segura y fácil de administrar [Casale & col., 2009; Cox & col., 2010], siendo las reacciones adversas más comunes de carácter local como edema local o prurito en la mucosa oral. Aunque la OIT puede realizarse de forma segura, los pacientes pueden experimentar reacciones severas como complicaciones gastrointestinales, debido a la acumulación de las dosis y los largos periodos de tratamiento [Begin & col., 2014]. En el caso del melocotón, el organismo financiado por la Unión Europea en la inmunoterapia de alergia a alimentos, se centró en su nsLTP1, Pru p 3. De este modo, dos mutantes de

la forma recombinante de Pru p 3 que presentaban sustituciones en los aminoácidos de la superficie importantes para la unión a IgE y la destrucción de los puentes disulfuro y otras dos modificadas químicamente mediante reducción-alquilación y tratamiento con glutaraldehído, demostraron que el alérgeno principal del melocotón pierde su inmunogenicidad cuando se altera su estructura [Zuidmeer-Jongejan & col., 2012; Jongejan & col., 2016]. Del mismo modo, actualmente está comercializada una SLIT de extracto de melocotón enriquecido en su nsLTP, estando asociado a una importante inmunosupresión de las células T efectoras, promoviendo una regulación en la respuesta inmune [Fernández-Rivas & col., 2009b; Gomez & col., 2017; Palomares & col., 2018].

En los últimos años, se han realizado avances para desarrollar terapias más efectivas mediante el uso de vías alternativas como la intralinfática (ILIT) o la epicutánea (EPIT), con las que se han obtenido buenos resultados, reduciendo el tiempo de tratamiento. En el caso de la EPIT, ha demostrado ser eficaz en el tratamiento de rinoconjuntivitis asociado a alergia a pólenes, al igual que en el tratamiento de alergia a alimentos en niños, donde la sensibilización al alérgeno es reciente y evitando los efectos secundarios y número de abandonos de la OIT [Esposito & col., 2018]. Además, la alternativa ILIT usada en numerosos estudios de pacientes alérgicos a pólenes, permite el uso de dosis más pequeñas del alérgeno, disminuyendo así, el riesgo de efectos secundarios [Senti & col., 2019].

La utilización de nuevos adyuvantes como vehículos de administración o variantes hipoalérgicas modificadas pueden ser otra aproximación novedosa para el tratamiento de la alergia [Moingeon, 2012]. Los adyuvantes son sustancias capaces de potenciar el efecto terapéutico de una vacuna contra el alérgeno sin ser un alérgeno *per se* y deben ser seguros, estables y promover las respuestas de las células Treg-IgG4. En los últimos años, se han llevado a cabo investigaciones intensivas para desarrollar nuevos adyuvantes que pueden potenciar respuestas inmunitarias adecuadas en las células diana (inmunopotenciadores) como diferentes agonistas de los receptores TLR o sales minerales (hidróxido de aluminio), entre otros. Entre las estrategias para obtener alérgenos modificados, la modificación química es la más exitosa, utilizándose actualmente en la práctica clínica. Sin embargo, otras estrategias para generar variantes hipoalérgicas como los péptidos, proteínas de fusión o derivados recombinantes se

encuentran en diferentes etapas de desarrollo [Campana & col., 2017]. Un estudio muy reciente de Benito-Villalvilla & col., 2018 muestran como las vacunas de próxima generación formuladas mediante el acoplamiento de alergoides al polisacárido manán no oxidado y dirigidas a las células dendríticas a través de los receptores de lectina tipo C, representan una estrategia prometedora para el tratamiento de estas patologías.

En conclusión, son necesarios estudios en mayor profundidad para mejorar la seguridad y eficiencia de estos tratamientos. Además, los pacientes deben poner en una balanza las reacciones frecuentes que ocurren durante la inmunoterapia con el riesgo de sufrir reacciones muy severas al consumir accidentalmente el alimento, teniendo en cuenta la posibilidad de una desensibilización exitosa al final del tratamiento.

## **9. DETECCIÓN DE ALERGENOS EN PREPARADOS DE ALIMENTOS: UTILIZACIÓN DE GENOSENSORES**

El reglamento de la Unión Europea nº 1169/2011 del Parlamento Europeo y del Consejo del 25 de octubre de 2011 sobre información alimentaria facilitada al consumidor tiene como objetivo proteger la salud de los consumidores y asegurar su derecho a estar correctamente informados de los alimentos adquiridos. La presencia de alérgenos y sustancias que provocan intolerancias alimentarias debe estar obligatoria y correctamente indicada en la etiqueta de los productos. Los 14 alérgenos cuya presencia en el etiquetado es de obligado cumplimiento se resumen en la **Tabla 9**.

**Tabla 9:** Alimentos de obligado etiquetado en alimentos envasados y no envasados.

<b>Alimentos</b>
<b>Cereales</b> que contienen gluten (trigo, espelta, cebada, centeno, avena...)
<b>Crustáceos</b> y sus derivados
<b>Huevo</b> y sus derivados
<b>Pescado</b> y sus derivados (excepto la gelatina)
<b>Cacahuete</b> y sus derivados
<b>Soja</b> y sus derivados (excepto aceite de soja)
<b>Leche</b> y productos lácteos (excepto lactitol)
<b>Frutos secos</b> (almendra, avellana, nuez, anacardo, nuez de Pecan, nuez de Brasil, pistacho...)
<b>Apio</b> y sus derivados
<b>Mostaza</b> y sus derivados
<b>Sésamo</b> y sus derivados
<b>Sulfitos</b> a concentraciones mayores de 10 mg/kg o 10 mg/l
<b>Altramuz</b> y sus derivados
<b>Moluscos</b> y sus derivados

La dosis umbral es la cantidad mínima de un ingrediente o estímulo que desencadena una respuesta, siendo para el caso de los alérgenos alimentarios, la concentración mínima capaz de desencadenar la reacción alérgica o simplemente la sensibilización del paciente [Crevel & col., 2008]. La determinación de la concentración máxima de un alimento para que no produzca efectos adversos es muy difícil de determinar, pues hasta la más mínima cantidad de un alérgeno puede provocar síntomas severos en individuos con elevado nivel de sensibilidad [Taylor & col., 2010].

Los alérgenos ocultos en los alimentos, son un problema grave de salud para los pacientes sensibilizados. En este contexto, se denomina alérgeno oculto a una sustancia que no es identificada o no se encuentra declarada en las etiquetas del producto. Esta omisión en la mayoría de los casos no es intencionada, pero estos alérgenos ocultos pueden inducir una gran variedad de reacciones de hipersensibilidad inesperadas, siendo un problema creciente. Los estudios de Añibarro & col., 2007 indican que el 41% de los pacientes analizados que consumieron un alérgeno oculto mostraron anafilaxis. A pesar de que las reacciones a alérgenos ocultos en frutos son relativamente infrecuentes, se han descrito casos en los que estaban implicados proteínas del kiwi, melón, manzana o melocotón. Del mismo modo, los saborizantes o salsas tales como las de mostaza, mayonesa, barbacoa o paprika, actúan generalmente como alérgenos ocultos dificultando su diagnóstico [Kanny & col., 1995].

En consecuencia, la industria alimentaria se encuentra ante la situación de tener que emplear frecuentemente el ambiguo mensaje de “puede contener” o “manufacturado con equipamiento compartido” en la etiqueta de sus productos, para alertar a los consumidores de la posible presencia de alérgenos ocultos [Boden & col., 2005]. Estas etiquetas en algunos casos pueden resultar confusas o engañosas para los individuos que presentan alergia alimentaria [Zurzolo & col., 2012]. Además, en numerosos estudios se muestra que un creciente número de consumidores con alergia a alimentos ignoran los etiquetados, independientemente de que las etiquetas transmitan información relevante, debido a su uso en ocasiones, innecesario.

La presencia de alérgenos no deseados en un alimento puede deberse a varias razones: **contaminación accidental** debido a los métodos de manipulación, con un ingrediente potencialmente alergénico en la fábrica o empresas colaboradoras, **contaminación no declarada** de un ingrediente potencialmente alergénico en alguno de los puntos de fabricación o **sustitución fraudulenta** de uno de los ingredientes del alimento por otro de menor valor nutricional o precio [Ellis & col., 2015]. Por todo ello, y para proteger la salud de los individuos alérgicos, es indispensable un correcto etiquetado de los alimentos, completo y sencillo de visualizar por el consumidor interesado. Para conseguir este propósito, resulta necesario desarrollar métodos analíticos de detección de alérgenos específicos, sensibles y reproducibles [de la Cruz & col., 2017].

La mayoría de los métodos de detección de alérgenos se dividen principalmente en dos grandes grupos: los ensayos inmunológicos y los basados en el DNA. En general, los primeros se basan en la unión específica entre una proteína alergénica y el anticuerpo que la reconoce específicamente, mientras que los segundos implican la extracción del DNA codificante de un alérgeno específico o de un fragmento del mismo o de la fuente que lo contiene. Todos ellos proporcionan características únicas que pueden hacerlos excelentes herramientas analíticas, debido a su alta sensibilidad, al ser selectivas, menos costosas y pudiendo, en algunos casos, ser capaces de realizar mediciones *in situ* en la industria alimentaria o en los laboratorios de control.

Un ejemplo es la utilización de biosensores. Un biosensor es un dispositivo que permite el reconocimiento de una molécula para un bioanálisis concreto [Kumar, 2008].

Existen diversos tipos de biosensores, de los cuales los **genosensores electroquímicos amperométricos** se basan en la detección electroquímica de la reacción de hibridación de dos cadenas de DNA complementarias, generando finalmente reacciones de oxidación-reducción. La construcción de los genosensores implica la inmovilización de una sonda de oligonucleótidos en la superficie del electrodo y la posterior detección de la cadena complementaria (*target*) por hibridación.

Convencionalmente, los métodos basados en DNA, conllevan la amplificación de ácidos nucleicos con una alta sensibilidad mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) con un alto coste y complejidad [Patolsky & col., 2001; Numnuam & col., 2008; Stoeva & col., 2006]. Aunque se han desarrollado genosensores para la detección de secuencias procedentes de algunos alérgenos alimenticios, incluyendo frutos secos como el cacahuete y la avellana [Tortajada-Genaro & col., 2012], el desarrollo de ensayos de hibridación electroquímica altamente sensibles sin necesidad de utilizar metodologías de amplificación de la señal ha supuesto un gran avance [Ruiz-Valdepeñas & col., 2018].

Como alternativas, se han descrito estrategias de amplificación isotérmica y libre de enzimas, como la Reacción en Cadena de Hibridación (HCR) debido a sus ventajas significativas que implican un funcionamiento simple, rentable e isotérmico [Ge & col., 2014; Zhai & col., 2015]. Tran & col., 2013 y Campuzano & col., 2017 han desarrollado el uso de anticuerpos para el reconocimiento del heterodúplex RNA/DNA o dúplex de RNA/RNA junto con los ensayos de hibridación. Estos ensayos fusionan las propiedades altamente selectivas del reconocimiento de los anticuerpos con la alta selectividad intrínseca de la hibridación. Este método tiene ciertas ventajas sobre los métodos inmunológicos más convencionales, como el ELISA que, posee bajos límites de detección y requiere reactivos costosos y largos tiempos de espera [Kokkinos & col., 2016]. El DNA se ve menos afectado que las proteínas por determinados tratamientos, cuyos cambios en la solubilidad o conformación, pueden tener un impacto negativo en la posterior detección [Bergerová & col., 2010; Gryson & col., 2010]. Además, las secuencias de DNA largas se descomponen en pequeños fragmentos durante el cocinado o procesamiento extenso, causando también fallos en los métodos de identificación basados en la PCR.

Todos estos inconvenientes se ven superados con el uso de genosensores basados en hibridación y detección con anticuerpos. Ruiz-Valdepeñas & col., 2017 han demostrado que la hibridación directa de un fragmento de DNA mitocondrial con una sonda de captura de RNA inmovilizada en bolas magnéticas funcionalizadas con estreptavidina (Strep-MBs) y el reconocimiento del DNA/RNA heterodúplex con un anticuerpo comercial marcado con una proteína bacteriana conjugada con la peroxidasa de rábano (ProtA-HRP40), permite la variación de corriente catódica  $H_2O_2/HQ$ . Esta variación se relaciona de forma directamente proporcional a la concentración del DNA diana presente en la muestra a analizar, en este caso, adulteraciones en alimentos con carne de caballo, presentando límites de detección (LOD) de 0.12 pM, tres veces menor que con los métodos convencionales.





**OBJETIVOS**

***AIMS***



## OBJETIVOS PRINCIPALES/AIMS

---

**This Thesis aims to contribute to the understanding of tomato nsLTPs involved in sensitization processes and allergic symptoms. This detailed structural and functional comparison between these three nsLTPs, two class 1 and one class 2, located in the same fruit but in different tissues provides novel insights into the complexity and relevance of this protein family and allergic sensitization.**

In chapters I, II and III, we first analyse the structural and immunological characteristics of the three nsLTPs identified in tomato peel and seeds, either their natural and recombinant forms. Allergy to nsLTP is the most frequent cause of primary food allergy in Mediterranean countries, being considered important panallergens. The study of possible cross-reactivity reactions with other food and pollens sources is critical to determine the antigenicity degree of a given allergen.

- a) The **isolation** of the tomato seeds nsLTP1, Sola I 7, nsLTP2, Sola I 6 and tomato peel and pulp nsLTP1, Sola I 3 from the natural source. The molecular and immunological characterization of these natural proteins.
- b) The **sequencing, cloning and recombinant production** of Sola I 3, Sola I 6 and Sola I 7 in *Pichia pastoris* in order to settle the difficulties surrounding the purification of allergens. The molecular, structural, functional and immunological characterization of these proteins and comparison with the natural counterparts.
- c) Determining the **three-dimensional structure** of tomato seeds allergenic nsLTPs through Nuclear Magnetic Resonance, comparing it with other nsLTPs described.
- d) The study of the **IgE and IgG cross-reactivity** between tomato allergens and with other allergenic nsLTPs from vegetables food and pollen.

In chapter IV we study the structural and immunological resistance of tomato nsLTPs considering them as food components in industrial processing and as allergens that have to undergo gastrointestinal digestion and uptake/lysosomal degradation by dendritic cells in order to trigger an immune response. During these processes, proteins undergo substantial changes, resulting in a different ability to induce histamine release and cause allergic reactions. Sometimes, foods containing nsLTPs are not tolerated by

sensitized patients, exhibiting the high degree of stability of these allergens to industrial processing, which together with their resistance to proteases, increases their clinical importance.

- a) **Glycation and food processing** experiments with detection of resistant IgG and IgE epitopes in Sola I 3, Sola I 6 and Sola I 7.
- b) The *in vitro* simulation of **human gastrointestinal digestion** with allergenic tomato nsLTPs in the presence and absence of phosphatidylcholine. Detection of degradation peptides and analysis of the immunoreactivity of the resultant hydrolysates.
- c) The study of the **internalization capacity** of these allergens in myeloid dendritic cells differentiated from BALB/c mice bone marrow and their resistance to degradation by the **lysosomal enzymes** contained in them. Analysis of the generation of antigenic peptides causing the immune response induction.

The diagnosis and prevention of food allergy have been analysed in chapters V and VI. It is essential an accurate diagnosis with standardised commercial extracts that include all the food tissues, as well as consider the possible processing that are carried out. In food industry, in order to achieve a correct protection of allergic individual's health, it is necessary to develop analytical methods for the detection of specific, sensitive and reproducible allergens.

- a) The **molecular diagnosis** in patients allergic to pizza sauce.
- b) The development of a **genosensor** for the detection of tomato allergens traces in processed foods with high sensitivity and specificity. The improvement of the conditions and requirements for its possible implantation in food industry.

With all these objectives, two main hypotheses are stated: both, nsLTP1 and nsLTP2 are expressed simultaneously in tomato fruits, and are engaged in tomato allergy and IgE sensitization to seed allergens needs to be considered in the pathology of tomato allergy.

**MATERIALES Y MÉTODOS**  
***MATERIALS & METHODS***



## MATERIALES Y MÉTODOS/MATERIALS & METHODS

---

### 1. PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS TRANSFERIDAS DE LÍPIDOS (nsLTPs) DE TOMATE.

#### 1.1. Materiales

##### 1.1.1. Tomates

Los tomates utilizados para la extracción tanto de las nsLTPs de semillas como de la pulpa, proceden de la variedad “*Applause*”, al ser la más comúnmente utilizada en el área Mediterránea. Se caracteriza por ser una variedad de un color rojo intenso, de tamaño medio y de sabor suave. Dichos tomates se obtuvieron de tiendas de alimentación locales.



**Figura 14:** Imagen de la variedad *Applause* de tomate, utilizada para el estudio.

##### 1.1.2. Soluciones de uso general

**PBS** (Tampón fosfato salino): NaCl 140 mM, KCl 2.7 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.5 mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  8.1 mM, pH 7.4.

**Ácido ascórbico** ( $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$ ): Ácido orgánico con propiedades antioxidantes para la elaboración de extractos de frutos.

**Tampón de aplicación de proteínas en PAGE-SDS:** Tris-HCl 50 mM, pH 6.8, SDS 2% (p/v), glicerol 10% (v/v), EDTA 2 mM y azul de bromofenol 0.01% (p/v).



**Tampón de electroforesis PAGE-SDS:** Tris-base 25 mM, glicina 192 mM y 0.1% SDS (p/v).

**Solución de teñido de proteínas:** Brilliant Blue R-250 0.25% (p/v), metanol 45% (v/v), ácido acético glacial 9% (v/v).

**Solución de desteñido:** Ácido acético glacial 7.5% (v/v).

**Bicarbonato amónico** (Tampón de extracción salino (BA)):  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  0.2 M pH 8.2 con 1 mM de PMSF.

## 1.2. Métodos

### ***1.2.1. Preparación de extracto proteico de semillas de tomate***

Las semillas de los tomates crudos fueron separadas manualmente de la piel y pulpa del fruto, así como de la placenta (carne de color blanquecino que rodea a las semillas). Para ello, se necesitó el uso de un colador para una correcta separación de las semillas del resto de tejidos, y posteriormente de un proceso de liofilización, con el fin de contribuir a una óptima separación. El material seco fue pesado y pulverizado con un mortero en presencia de aire líquido para evitar la degradación de las proteínas. El polvo resultante fue sometido a tres procesos consecutivos de extracción con PBS en presencia de 100 mM de PMSF (fluoruro de fenilmetilsulfonilo) durante 1 h en agitación a 4 °C, seguido de una centrifugación a 20.000 *g* durante 30 min a 4 °C. Los sobrenadantes fueron recolectados y dializados frente a agua destilada durante 48 h a 4 °C, en membranas de diálisis de 3.5 kDa de tamaño de poro. Los sobrenadantes resultantes fueron liofilizados y almacenados a -20 °C hasta su uso.

### ***1.2.2. Preparación de extracto proteico a partir de piel, pulpa y placenta de tomate***

La piel y pulpa de los tomates utilizados para la extracción de las semillas, fueron liofilizadas por separado. Tras ello, se llevó a cabo la pulverización de los mismos con ayuda de un mortero y aire líquido.

El polvo resultante fue sometido a tres procesos consecutivos de extracción con PBS y ácido ascórbico 10 mM durante 1 h en agitación a temperatura ambiente, seguido

de una centrifugación a 20.000 *g* durante 30 min a 4 °C. Los sobrenadantes fueron recolectados y dializados frente a agua destilada durante 48 h a 4 °C, en membranas de diálisis de 3.5 kDa de tamaño de poro. Los sobrenadantes resultantes fueron liofilizados y almacenados a -20 °C hasta su uso.

### **1.2.3. Purificación de los alérgenos *nSola I 6* y *nSola I 7* a partir de semillas de tomate**

El extracto de semillas de tomate liofilizado fue resuspendido en BA 20 mM, pH 8.2 y se llevó a cabo la cuantificación de la concentración de proteína total por el método de Lowry y el del ácido bicinónico o BCA (Pierce Chemical, Rockford, Ill) [Lowry & col., 1951, Smith & col., 1985b].

Puesto que la mayoría de las proteínas, a la vista de los perfiles electroforéticos, contenidas en el extracto de semillas eran de baja masa molecular, se llevó a cabo la purificación de las mismas a través de una cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC), utilizando una columna Ultrasphere C-18 con tamaño de partícula de 5 µm utilizando un gradiente de elución de agua-ácido trifluoroacético (TFA) (0.1%)/acetonitrilo (ACN)-TFA (0.1%) (0-60%) en 60 min y un flujo de 1 ml/min.

Las fracciones resultantes del perfil cromatográfico fueron analizadas en geles poliacrilamida al 17% en presencia de SDS (PAGE-SDS) mediante tinción con azul de Coomassie y por Dot Blot utilizando un pool de sueros de pacientes alérgicos a proteínas de semillas de tomate.

### **1.2.4. Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS (PAGE-SDS)**

Las electroforesis de proteínas se llevaron a cabo en un sistema *Mini-Protean II* (Bio-Rad). Se utilizaron geles de 0.75 mm de espesor, 7 cm de alto y 8 cm de ancho. Las muestras se corrieron en geles al 17% de poliacrilamida, con un gel concentrante del 4%.

Para su aplicación en los geles, las muestras se resuspendieron en tampón de aplicación, conteniendo en ocasiones un 5% (v/v) de β-mercaptoetanol (βME), en cuyo caso se calentaron a 85 °C durante 20 min. Las electroforesis se desarrollaron aplicando 25 mA por gel hasta que el marcador del frente (azul de bromofenol) quedara al límite

del gel y se utilizaron los patrones de masa molecular *Precision Plus Protein™ All Blue* (Bio-Rad) como referencia.

Finalizada la electroforesis, las proteínas se detectaron mediante tinción por azul de Coomassie R-250 (*Coomassie Brilliant Blue R-250* 0.25% (p/v), 45% metanol (v/v) y 10% ácido acético (v/v)). Para eliminar el exceso de colorante y poder visualizar las bandas, se utilizó ácido acético al 7.5% (v/v).

## 2. TÉCNICAS DE MANIPULACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS: PRODUCCIÓN RECOMBINANTE DE PROTEÍNAS EN *P. pastoris*

### 2.1. Materiales

#### 2.1.1. Microorganismos

**TOP10:** se trata de una cepa de *E. coli* con una eficiencia de transformación de  $1 \times 10^6$  ufc/ $\mu$ g de DNA superenrollado. Su genotipo es el siguiente: F-*mcrA* $\Delta$  (*mrr-hsdRMS-mcrBC*)  $\Phi$ 80*lacZ* $\Delta$ m15  $\Delta$ *lacX74 recA1 ara139 (ara-leu) 7697 galUgalK*rpsL(Str<sup>R</sup>) *endA1 nupG*.

**DH5 $\alpha$ F':** F'*endA1 hsdR17 (r<sub>K</sub><sup>-</sup>, m<sub>K</sub><sup>+</sup>) supE44tthi-1recA1 gyrA(NaIR) relA1*  $\Delta$ (*lacZYA-argF'*) U169 *deoR* [ $\Phi$ 80*dlac* $\Delta$ (*lacZ*)M15].

**KM71H:** *aox1* $\Delta$ :ARG4 *arg4*. En esta cepa del gen AOX1 presenta una delección y ha sido reemplazado con el gen ARG4 de *Saccharomyces cerevisiae*. La selección de las colonias positivas se realizará por zeocina, generadoras de cepas con fenotipo Mut<sup>s</sup>, debido a que el metabolismo del metanol queda a cargo del gen AOX2, el cual presenta un crecimiento más lento.

#### 2.1.2. Vectores plasmídicos

**pCR2.1:** utilizado para clonar fragmentos de DNA obtenidos por PCR siguiendo el protocolo del kit *Topo TA cloning* (Invitrogen). Se trata de un plásmido de 3.9 kpb que contiene un gen de resistencia a ampicilina. En el extremo 5' posee un residuo de

3´desoxitimidina para facilitar la inserción de los fragmentos amplificados por PCR que presentan una adenosina protuberante en 3´ por recombinación homóloga.

**pPICZαA:** Para la expresión de proteína recombinante en *Pichia pastoris* se utilizó este plásmido de 3.6 kpb que contiene un gen de resistencia a zeocina para la selección de transformantes. Contiene la región promotora y la de terminación de la transcripción del gen AOX1, situándose el sitio múltiple de clonaje entre ambas, lo que permite clonar el gen de interés bajo el control de dicho promotor. A continuación del promotor se encuentra la señal de secreción del factor α de *S. cerevisiae*, que va a permitir la secreción de la proteína recombinante al medio extracelular.

### **2.1.3. Medios de cultivo para la manipulación de *E. coli***

**LB** [Sambrook & col., 1989]: medio utilizado para el crecimiento de cepas bacterianas para la purificación de plásmidos. Este medio contiene lo siguiente: bacto triptona 1% (p/v), extracto de levadura 0.5% (p/v) y NaCl 1% (p/v). Para el crecimiento de células en medio sólido se añadió 15 g/l de agar bacteriológico. Para la selección de transformantes de *E. coli* se añadió al medio ampicilina a una concentración final de 50 µgr/ml.

**LB bajo en sales:** Se utilizó para la selección de transformantes de DH5αF'. Contiene un 0.5% (p/v) de NaCl. Se utiliza para el crecimiento de células transformadas de *E. coli* con resistencia al antibiótico zeocina por la presencia del plásmido, ya que este antibiótico se inactiva a altas concentraciones de NaCl. Las concentraciones de zeocina utilizadas fueron de 25 µg/ml, tras comprobación del pH 7 antes del proceso de autoclave.

**SOC:** se ha utilizado para el crecimiento de células TOP10 durante el proceso de transformación. Se compone de bacto triptona 2% (p/v), extracto de levadura 0.5% (p/v), NaCl 10 mM, KCl 2.5 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, MgSO<sub>4</sub> 10 mM y glucosa 20 mM.

**φBroth:** es un medio rico de crecimiento que se utiliza para el crecimiento de células DH5αF' transformadas con DNA plasmídico tras el choque térmico. Se compone de bacto triptona 2% (p/v), extracto de levadura 0.5% (p/v), MgSO<sub>4</sub> 0.4% (p/v), y KCl 10 mM. El pH se ajustó a 7.6 con KOH 4 M.

#### **2.1.4. Medios para la manipulación de *P. pastoris***

**YPD:** Medio usado para el crecimiento de la levadura, conteniendo 10 g/l de extracto de levadura, 20 g/l de peptona, 20 g/l de D-glucosa y 15 g/l de agar en el caso de medios sólidos.

**YPDS:** Medio para el crecimiento de células de *P. pastoris* tras su electroporación. Contiene 10 g/l de extracto de levadura, 20 g/l de peptona, 20 g/l de D-glucosa, 182.2 g/l de sorbitol y 15 g/l de agar en el caso de medios sólidos.

**BMGY:** Medio líquido rico en extracto de levadura para el crecimiento de las células de levadura transformadas con el plásmido que contiene el gen codificante del alérgeno. Contiene 10 g/l de extracto de levadura, 20 g/l de peptona, 10 ml/l de glicerol, 13.4 g/l de base de nitrógeno para levaduras sin aminoácidos, 400 µl/l de biotina y fosfato potásico 0.1 M, pH 6.0.

**BMGH:** Medio líquido mínimo, sin extracto de levadura ni peptona (para evitar las sales y pigmentos adicionales) para el crecimiento de las células de levadura transformadas con el plásmido que contiene el gen codificante del alérgeno. Contiene 10 ml/l de glicerol, 13.4 g/l de base de nitrógeno para levaduras sin aminoácidos, 400 µl/l de biotina y fosfato potásico 0.1 M, pH 6.0.

**BMMY:** Medio líquido rico en extracto de levadura para la inducción de la expresión al medio extracelular del alérgeno. Contiene 10 g/l de extracto de levadura, 20 g/l de peptona, 5 ml/l de metanol puro, 13.4 g/l de base de nitrógeno para levaduras sin aminoácidos, 400 µl/l de biotina y fosfato potásico 0.1 M, pH 6.0.

**BMMH:** Medio líquido mínimo, sin extracto de levadura ni peptona (para evitar las sales y pigmentos adicionales) para la inducción de la expresión al medio extracelular del alérgeno. Contiene 5 ml/l de metanol puro, 13.4 g/l de base de nitrógeno para levaduras sin aminoácidos, 400 µl/l de biotina y fosfato potásico 0.1 M, pH 6.0.

#### **2.1.5. Medios de cultivo para la expresión de proteínas marcadas para RMN**

Los medios de cultivo para la determinación de la estructura tridimensional de las nsLTPs de las semillas de tomate mediante RMN fueron los medios líquidos mínimos

anteriormente descritos, con algunas modificaciones, debido al requerimiento de doble marcaje de la proteína en su estructura primaria ( $C^{13}$  y  $N^{15}$ ):

**Medio de crecimiento o BMGH:** Contiene 10 ml/l de glucosa  $C^{13}$ , 13.4 g/l de base de nitrógeno para levaduras a proporción 1:3 de  $NH_4SO^{15N}$ / YNB sin aminoácidos ni sulfato amónico y fosfato potásico 0.1 M, pH 6.0.

**Medio de inducción o BMMH:** Contiene 5 ml/l de metanol puro marcado  $C^{13}$ , 13.4 g/l de base de nitrógeno para levaduras a proporción 1:3 de  $NH_4SO^{15N}$ / YNB sin aminoácidos ni sulfato amónico y fosfato potásico 0.1 M, pH 6.0.

#### 2.1.6. Enzimas de restricción

**BstXI:** Enzima con secuencia diana de nucleótidos CCANNNNN<sup>^</sup>NTGG.

**XhoI:** Enzima con secuencia diana de nucleótidos C<sup>^</sup>TCGAG.

**NotI:** Enzima con secuencia diana de nucleótidos GC<sup>^</sup>GGCCGC.

#### 2.1.7. Soluciones de uso general

**TAE:** Tris-acetato 40 mM (484 g/l de Tris base y 1.14 ml/l de ácido acético glacial), EDTA 2 mM. Se utilizó para la polimerización y desarrollo de geles de agarosa.

**TE:** Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7.5-8.0. Se utilizó como tampón para el mantenimiento de los plásmidos purificados almacenados.

**Tampón de aplicación de DNA (6x):** azul de bromofenol 0.25% (p/v), cianol de xileno 0.25 (p/v) y glicerol 30% (v/v).

**Tampón de lisis de colonias:** Tris 1 M, EDTA 0.5 M, NaOH 10 N y SDS 20% (p/v).

**Tampón de electroforesis de RNA:** MOPS 20 mM pH 7.0, acetato sódico 5 mM, y EDTA 1 mM.

**Tampón de revelado:** Bromuro de etidio 1  $\mu$ g/mL en  $H_2O$ -MilliQ.

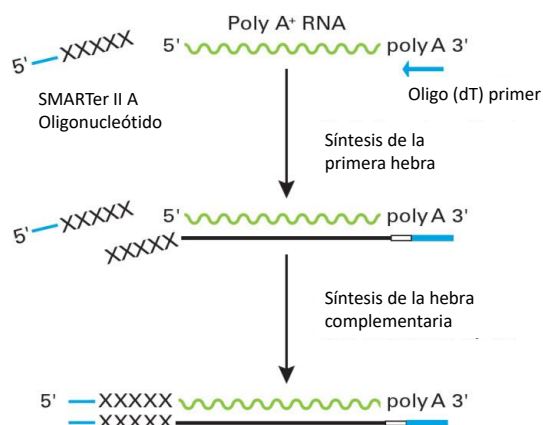
## 2.2. Métodos

### 2.2.1. Aislamiento de RNA de semillas de tomate

Para el aislamiento del RNA total de las semillas de tomate previamente liofilizadas, se trituró una cantidad de 1 g con la ayuda de un *Polytron* (Brinkmann Instruments) en presencia de un medio caotrópico de isotiocianato de guanidinio 4 M (7 ml/ 1 g de muestra) manteniendo la muestra en hielo y llevando a cabo 3 ciclos de un min. El homogenizado de la muestra se centrifugó en un rotor flotante durante 30 min a 2400 xg y 20 °C. El sobrenadante se recogió y centrifugó de nuevo 20 min a 4300 xg y 20 °C. Tras este proceso previo manual, se procedió a incorporarlo a las columnas proporcionadas por el kit RNeasy Plant Mini Kit (Quiagen). Los siguientes pasos de extracción de RNA se realizaron siguiendo las instrucciones del fabricante. El RNA se eluyó por duplicado con 50 µl del *RNase-free water* proporcionado en el kit, para una mayor eficiencia de recuperación. Todos los materiales necesarios para esta extracción fueron previamente tratados con agua estéril con dietilpirocarbonato (DEPC) (previamente incubada 2 h a 37 °C y posterior autoclavado) y cloroformo. La concentración del RNA en las muestras se estimó espectrofotométricamente a un máximo de absorbancia de 260 nm.

### 2.2.2. Síntesis de cDNA

El cDNA se sintetizó a partir del RNA total aislado utilizando la enzima transcriptasa reversa *Superscript II* (GibcoRBL) según las instrucciones del *SMART RACE cDNA Amplification kit* (Clontech).



**Figura 15:** Esquema de obtención de cDNA según el método descrito por el SMARTer RACE cDNA Amplification kit.

### 2.2.3. *Electroforesis de ácidos nucleicos*

El análisis de los plásmidos y fragmentos de DNA se realizó mediante geles de agarosa de punto de fusión convencional (Laboratorios Conda) al 0.8-2% (p/v) en tampón TAE, según [Sambrook & col., 1989]. Las electroforesis preparativas se desarrollaron a 4 °C en geles de agarosa de bajo punto de fusión (Ecogen) al 1%. El DNA se visualizó por tinción con bromuro de etidio e iluminación con luz UV. En todos los casos se utilizaron patrones de peso molecular, correspondientes a la digestión del DNA del fago  $\lambda$  con *HindIII*, de tamaño y concentración conocidos.

La electroforesis de RNA se llevó a cabo en geles de agarosa al 2% (p/v) en presencia de formaldehído al 6% (v/v). A las muestras de RNA se les añadió bromuro de etidio previo a su aplicación en el gel, para su visualización en el gel tras la electroforesis.

### 2.2.4. *Amplificación de DNA por PCR*

Las reacciones de amplificación por PCR se llevaron a cabo en un termociclador *Mastercycler® gradient* (Eppendorf). En cuanto a las condiciones de cada reacción, aunque todas ellas se realizaron con 30 ciclos, las temperaturas de hibridación siempre fueron de 5 °C inferior a la temperatura de desnaturalización ( $T_m$ ) calculada para los cebadores utilizados en la reacción.

#### Amplificación del gen de Sola I 6 y Sola I 7 a partir de semillas de tomate

El cDNA total de semillas de tomate se utilizó para obtener las secuencias completas de Sola I 6 y Sola I 7. Los cebadores utilizados en la primera amplificación se diseñaron a partir de la secuencia encontrada en la base de datos *PubMed* para Sola I 6 (NP\_001306883.1) y Sola I 7 (NP\_001316123.1). La lista de todos los cebadores utilizados se incluye en la **Tabla 10**.



**Tabla 10:** Cebadores utilizados para la amplificación del cDNA de Sola I 6 y Sola I 7 mediante PCR y para su clonaje.

Cebador	Secuencia nucleótidos	
LTP1-s	5' - AGRACCTRAAYGGNAAYACNCARTC - 3'	Sense (Sola I 7)
LTP1-as	5' - RTCRTCYTTNAGRTTNGGRTA - 3'	Antisense (Sola I 7)
NtSola7	5' - GCAATCACTTGTGGCCAAGTGGGA - 3'	Sense
Sola7picNt	5' - <u>cgtctcgagaaaaga</u> GCAATCACTTGTGGCCAAGT - 3'	Sense
Sola7picCt	5' - <u>ctgcgccgctta</u> ACTGATTGTGTACAGTT - 3'	Antisense
LTP2-s	5' - TGYATHTYGGNTTYATGAARGAYCC - 3'	Sense (Sola I 6)
LTP2-as	5' - AGGRTCYTTCATRAANCCRCADATRCA - 3'	Antisense (Sola I 6)
Sola6picNt	5' - <u>cgtctcgagaaaaga</u> - 3'	Sense
Sola6picCt	5' - <u>ctgcgccgctta</u> - 3'	Antisense
UPM	5' - CTAATACGACTCATAGGGCAAGCAAGCAGTGGTAACAACGCAGAGT - 3'	---

En el caso de Sola I 6, la primera etapa de amplificación se llevó a cabo con los cebadores degenerados LTP2 y UPM, amplificándose un fragmento de 265 nucleótidos. Tras comprobar su secuencia, se llevó a cabo una segunda amplificación con los cebadores que contenían los nucleótidos necesarios para poder insertar el DNA en el plásmido pPICZ $\alpha$ A, para lo cual se utilizaron los cebadores Sola6picNt y Sola6picCt, los cuales ya tenían incorporados la secuencia correspondiente al factor  $\alpha$  en el caso del cebador Sola6picNt y un codón stop y sitio de restricción NotI, en el caso del cebador Sola6picCt.

Para Sola I 7, la primera etapa de amplificación se llevó a cabo con los cebadores degenerados LTP1 y UPM, amplificándose un fragmento de 313 nucleótidos. Tras comprobar por secuenciación, se llevó a cabo la amplificación para poder insertar el gen de Sola I 7 en el plásmido pPICZ $\alpha$ A, para lo cual se utilizaron los cebadores Sola7picNt y Sola7picCt, al igual que en el proceso anterior.

#### Amplificación del gen de Sola I 3 a partir de la piel de tomate

Para la amplificación de la secuencia de Sola I 3 completa se partió de la secuencia ya descrita de este alérgeno en la base de datos *PubMed* AAB42069.1. Para llevar a cabo su clonaje, se siguió la misma estrategia previamente descrita para los alérgenos de

semillas de tomate, generando un fragmento de DNA de 330 pb. Dichos experimentos se llevaron a cabo en el Instituto Paul-Ehrlich-Institut en Frankfurt (Alemania).

Las muestras de DNA plasmídico de interés se secuenciaron de forma automática, haciendo uso del servicio de secuenciación de la Universidad Complutense de Madrid. Para ello se utilizaron los oligonucleótidos Universal M13 y cebadores de secuencia específica. En el proceso de secuenciación se empleó el sistema *Applied Biosystems BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Thermo Fisher) con DNA polimerasa Ampli Taq FS. Esta enzima es una forma doble mutante de la Taq polimerasa, que carece de actividad exonucleasa 5' → 3' y tiene una mutación en el dominio polimerasa, lo que permite una menor discriminación frente a dNTPs respecto a la enzima original. La amplificación se realiza en un termociclador de gradiente (Eppendorf). Una vez finalizada la reacción de secuenciación, las muestras se limpian utilizando el sistema *Optima DTR* (EdgeBio), preparándose la muestra para la secuenciación en un secuenciador de 96 capilares *3730XL DNA Analyzer* (Applied Biosystems). Dichos capilares llevan inyectado un polímero, *POP7* (Thermo Fisher), permitiendo la correcta separación de los fragmentos de DNA.

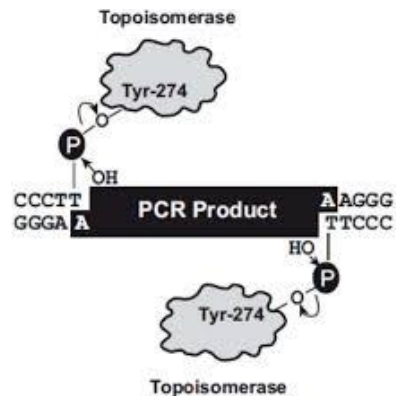
#### **2.2.5. Digestión de DNA con enzimas de restricción**

Las digestiones de plásmidos con las enzimas *NotI* y *XhoI* se llevaron a cabo durante 2 h a 37 °C, de manera secuencial, en el tampón adecuado para cada enzima de restricción según indicaciones del fabricante. Tras la digestión, las enzimas fueron inactivadas térmicamente mediante la incubación de las muestras a 65 °C durante 10 min. En el caso de la digestión con *BstXI*, se llevó a cabo durante 8 h a 30 °C en baño de agua con agitación suave, para evitar digestiones inespecíficas.

#### **2.2.6. Aislamiento y clonaje de fragmentos de DNA**

Los fragmentos de DNA se sometieron a electroforesis en geles de agarosa de bajo punto de fusión al 1% y se purificaron según las instrucciones del kit *Wizard PCR Preps* (Promega). Tras su purificación, los fragmentos de DNA se clonaron en el vector pCR2.1

y se transformaron las células TOP10 siguiendo las indicaciones de la casa comercial. Las células transformadas se seleccionaron en placas de LB/Ampicilina 50 µg/ml.



**Figura 16:** Esquema de la reacción de ligación de un fragmento de DNA en el plásmido PCR2.1.

La identificación de colonias transformadas positivamente se realizó mediante la lisis de las mismas con 40 µl de tampón de lisis, neutralizando la mezcla con 5 µl de HCl y añadiendo 5 µl de tampón de aplicación de DNA 6x. Las muestras se incubaron durante al menos 2 h a -80 °C y se centrifugaron en frío para facilitar la sedimentación del SDS junto con la mayor parte del DNA cromosómico. Los sobrenadantes conteniendo el DNA plasmídico se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 0.7% y se seleccionaron para la etapa siguiente aquellas colonias que presentaban una disminución en su movilidad electroforética respecto al plásmido sin inserto.

### **2.2.7. Aislamiento de DNA plasmídico a pequeña escala**

El aislamiento de DNA plasmídico a pequeña escala se llevó a cabo mediante el *GenElute™ Plasmid Miniprep Kit* (Sigma), partiendo de cultivos bacterianos de 5 ml de LB con ampicilina.

### **2.2.8. Ligación de fragmentos de DNA en pPICZαA y transformación de células competentes DH5αF'**

La ligación de fragmentos de DNA en el plásmido pPICZαA se realizó utilizando la enzima *DNA ligasa de bacteriófago T4* (Fermentas) utilizando el tampón indicado para dicha enzima. Las reacciones se incubaron 8 h a 16 °C. Las células competentes DH5αF'

fueron incubadas con la mezcla de ligación durante 15 min en hielo, y se transformaron mediante un choque térmico de 4 min a 37 °C y posterior enfriamiento en hielo durante 1-2 min. Se añadieron 800 µl de φBroth y se incubaron 1 h a 37 °C. Las células se concentraron por centrifugación 5 min 1900 xg y se crecieron en placas de LB bajo en sal con 25 µg/ml de zeocina.

### **2.2.9. Transformación de células KM71H**

Las células KM71H electrocompetentes se prepararon siguiendo las instrucciones indicadas en el manual del fabricante *EasySelect™ Pichia Expression Kit* y se utilizaron en el momento de su preparación. Se electroporaron mediante un electroproador *Gene Pulser* (Bio-Rad) con las construcciones derivadas de la ligación del vector pPICZαA con los insertos correspondientes al cDNA codificante de Sola I 3, Sola I 6 y Sola I 7, linearizado previamente con la enzima de restricción *BstXI* en todos los casos, después de haber realizado un mapa de restricción de los tres DNAs y haber comprobado que no existía ningún sitio de corte para esta enzima. Después del tratamiento con *BstXI* y previo a la electroporación, se realizó una precipitación de DNA plasmídico con una mezcla de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1) para eliminar el exceso de sales que pudieran interferir en la electroporación.

El proceso de transformación por electroporación se llevó a cabo incubando las células KM71H en hielo durante 5 min con un máximo de 10 µg de plásmido linearizado y precipitado en una cubeta de electroporación (Bio-Rad). Tras ello, se sometió a un pulso de 25 µF, 200 ohmios y 2000 V. Inmediatamente después, se añadió 1 ml de sorbitol 1M frío y se mantuvieron las células 1.5 h en hielo. Seguidamente, se añadieron 2 ml de YPD y se incubaron 2 h a 30 °C en agitación. Finalmente, las células se sembraron en placas de YPDS a tres concentraciones distintas de zeocina (100 µg/ml, 500 µg/ml y 750 µg/ml) para seleccionar las colonias transformantes, dejándolas crecer durante 3 días en una estufa a 30 °C.

### **2.2.10. Expresión de proteínas recombinantes en células KM71H**

Se realizaron primeramente pruebas de expresión a pequeña escala de unas 10-12 colonias transformadas de KM71H. Las células se crecieron en Erlenmeyer con muescas en los laterales para proporcionar una mayor aireación a las células. A continuación, se recogieron por centrifugación a 2980 xg durante 10 min en tubos SS34 y fueron resuspendidas cuidadosamente en movimientos circulares en 8 ml de medio de inducción o BMMY. Estos cultivos se mantuvieron durante 4 días a 30 °C, añadiendo 0.5% de metanol puro cada 24 h y cogiendo una alícuota diaria para el análisis de la expresión en función del tiempo. Los sobrenadantes recogidos a tiempos 24, 48, 72 y 96 h se analizaron por PAGE-SDS y se seleccionó el tiempo óptimo de expresión para cada proteína. Aquellas colonias que mostraron unos mejores niveles de expresión se eligieron para llevar a cabo el crecimiento a media escala (1 l de crecimiento en BMGY y reducción a 200 ml de inducción con BMMY).

Para optimizar la producción de las proteínas recombinantes, eliminar contaminantes derivados de la levadura, y reducir el número de pasos, se puso a punto simultáneamente la expresión en medio mínimo tanto de crecimiento (BMGH) como de inducción (BMMH).

### **2.2.11. Purificación de las proteínas recombinantes rSola I 3, rSola I 6 y rSola I 7**

Los cultivos de *P. pastoris* después de la inducción se centrifugaron a 4200 xg 30 min a 4 °C y el sobrenadante se dializó frente a BA 20 mM en bolsas de diálisis de tamaño de poro 3.5 kDa durante 18-20 h a 4 °C. El sobrenadante dializado fue centrifugado exhaustivamente para eliminar la posible contaminación proteica que pudiera haber agregado y precipitado durante la diálisis. Posteriormente, el sobrenadante (unos 250 ml) se aplicaron a una columna de intercambio aniónico en DEAE celulosa, cargada positivamente a pH 8.2. Los lotes que contenían las proteínas se liofilizaron y resuspendieron de nuevo en BA 20 mM. De este modo, se llevó a cabo una segunda etapa de purificación.

En el caso de la proteína rSola I 7, se aplicó a una columna Sephadex G-75 *Medium*. Para rSola I 6 y rSola I 3, la segunda etapa cromatográfica fue en una columna Sephadex G-50 *Superfine*. Las fracciones que contenían las proteínas se juntaron y liofilizaron. La última etapa de purificación de todas las nsLTPs de tomate fue una columna de Ultrasphere C18 de tamaño de partícula 5 µm para HPLC en fase reversa con un gradiente de acetonitrilo en 0.1% de TFA de 0-60% en 60 min.

### 3. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE PROTEÍNAS

#### 3.1. Materiales

##### 3.1.1. Alimentos de origen vegetal

Extractos vegetales tales como *Sinapis alba* (mostaza amarilla), *Brassica juncea* (mostaza oriental), *Actinia deliciosa* (Kiwi pulpa y semillas), *Cucumis melo* (melón semillas), *Cucurbita maxima* (calabaza semillas), *Capsicum annuum* (pimiento verde semillas), *Pinus pinea* (piñón), *Prunus dulcis* (almendra), *Corylus avellana* (avellana), *Malus domestica* (manzana piel), *Prunus persica* (melocotón Piel), *Linum usitatissimum* (lino semillas), *Sesamum indicum* (sésamo) y *Triticum spp.* (trigo) fueron preparados para el estudio, obteniéndose la materia prima de comercios locales.

##### 3.1.2. Soluciones de uso general

**Borato Sódico** (Tampón de extracción salino):  $\text{Na}_2[\text{B}_4\text{O}_5(\text{OH})_4] \cdot 8\text{H}_2\text{O}$  0.15 M pH 8.0 con 1 mM de PMSF.

**TBS** (Tris-buffered saline): Tris 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7.6.

**Tampón de transferencia:** Tris-base 48 mM, glicina 39 mM, 0.0375% de SDS (p/v) y 20% metanol.

### **3.1.3. Medios de cultivo para la expresión de proteínas marcadas para RMN**

Los medios de cultivo para la determinación de la estructura tridimensional de las nsLTPs de las semillas de tomate mediante RMN fueron los medios líquidos mínimos anteriormente descritos (BMGH y BMMH), con algunas modificaciones, debido al requerimiento de doble marcaje de la proteína en su estructura primaria ( $C^{13}$  y  $N^{15}$ ).

$^{15}N$ -( $NH_4$ )Cl,  $^{13}C$ -glucosa y  $^{13}C$ -metanol fueron adquiridos en Cambridge Isotope Laboratories. Los tampones, productos químicos, oligonucleótidos y reactivos de laboratorio comunes se obtuvieron de Sigma-Aldrich si no se indica lo contrario.

## **3.2. Métodos**

### **3.2.1. Preparación de extractos proteicos de semillas**

La preparación de extracto de semillas vegetales se realizó al igual que la extracción de semillas de tomate, previamente descrito en el apartado 1.2.1.

### **3.2.2. Preparación de extractos proteicos de frutas, verduras y frutos secos**

La preparación de estos extractos se realizó a partir de 5 gr de material liofilizado que se pulverizó con nitrógeno líquido y ayuda de un mortero hasta obtener un molturado fino. Se resuspendió en 100 ml de Borato sódico 0.15 M conteniendo 1 mM de PMSF tras lo cual se homogeneizó el material con potter en frío. Seguidamente se agitó mecánicamente durante 1 h a 4 °C para a continuación llevar a cabo una centrifugación a 9000 xg durante 20 min a 4 °C. El sobrenadante se guardó y se volvió a repetir el proceso con el sedimento otras dos veces más, tras lo cual se juntaron los sobrenadantes y se liofilizaron.

Adicionalmente, todos los extractos sufrieron un proceso de deslipidización, para reducir al máximo el contenido lipídico, por lo cual se resuspendieron en 100 ml de acetona en agitación suave durante 1 h tras lo cual se centrifugó a 9000 xg durante 20 min a 4 °C. En esta ocasión, se desechó el sobrenadante y el sedimento se dejó secar a temperatura ambiente durante 48 h, resuspendiéndose finalmente en 20 ml de BA 50

mM. Finalmente, tras centrifugarse se procedió a la cuantificación del contenido en proteína total mediante el método de Lowry o BCA y su visualización por PAGE-SDS.

En el caso de los frutos secos, debido a su alto contenido en lípidos, se procedió a su deslipidización previa a su extracción salina con BA 0.2 M siguiendo los mismos pasos que la extracción salina previamente explicada.

### **3.2.3. Transferencia electroforética (Western blot)**

La transferencia de proteínas se realizó sobre membranas de nitrocelulosa (*Amersham*) según el procedimiento descrito por Towbin [Towbin & col., 1979], tras su electroforesis en geles de poliacrilamida. Se realizó en un sistema semi-seco *Transfer-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell* (Bio-Rad), en tampón Tris-Base 48 mM, SDS al 0.0375% (p/v), glicocola 39 mM y Metanol al 20% (v/v). Se aplicó una intensidad de corriente de 1 mA/cm<sup>2</sup> durante 60 min, comprobando la eficacia de la transferencia bien mediante patrones de peso molecular de proteínas pre-teñidas con azul de Coomassie (*Prestained PAGE-SDS Standards, Low Range*; Bio-Rad), o por tinción de las proteínas ya fijadas en la membrana, por tinción con Rojo Ponceau, eliminado posteriormente con agua destilada o PBS.

### **3.2.4. Electroforesis bidimensional**

Se realizó esta técnica para la determinación experimental del punto isoeléctrico de cada proteína purificada y compararlo con el teórico derivado de la secuencia de aminoácidos de estas tres nsLTPs, así como de posibles isoformas de las mismas y de su detección mediante *immunoblotting* en extractos proteicos complejos. En la primera dimensión, se lleva a cabo un isoelectroenfoque, las proteínas se separan según su punto isoeléctrico (*Protean IEF*, Bio-Rad). Para su aplicación las proteínas puras (5 µg) o extractos de tomate (25 µg) se disolvieron en tampón de rehidratación (urea 8M, CHAPS 2% (p/v)) al que se añadió un 1.5% (v/v) de tributilfosfina (TBP) como agente reductor de puentes disulfuro. La muestra se depositó sobre tiras de gradiente de pH inmovilizado (*IPG*, Bio-Rad) de pH comprendido entre 3-10 y de 7 cm de largo. Esta primera dimensión



se desarrolló siguiendo estos pasos: 12 h de rehidratación activa, 20 min a 250 V, 2 h a 4000 V y voltaje creciente hasta 10000 V.

La segunda dimensión se llevó a cabo tras incubar las tiras en tampón de equilibrado I (urea 6 M, SDS 2% (p/v), Tris-HCl (pH 8.8) 0.375 M, 20% glicerol, y DTT 2% (p/v)), y II (urea 6 M, SDS 2% (p/v), Tris- HCl (pH 8.8) 0.375 M, 20% glicerol, DTT 2% (p/v), yodoacetamida 135 mM) y en el tampón de desarrollo de electroforesis. En esta dimensión, las proteínas se separaron mediante PAGE-SDS tal y como se ha descrito en apartados anteriores y se detectaron por tinción con Azul de Coomassie o transferencia a membranas de nitrocelulosa e inmunodetección con un anticuerpo policlonal específico para cada proteína problema.

### **3.2.5. Simulación del procesamiento térmico de los alérgenos del tomate**

Para simular el procesamiento que sufrirían los alérgenos de tomate en la preparación de salsas de tomate (barbacoa, ketchup, etc) en la industria alimentaria se llevó a cabo dos tipos de tratamiento térmico: uno suave de 90 °C durante 20 min y otro más severo a 100 °C durante 2 h en un bloque calefactor controlado por termostato *CH-100* (Boeco) en presencia o ausencia de  $\beta$ -D-glucosa (30% (p/p)). La cantidad de alérgeno utilizado fue 2.5  $\mu$ g para PAGE-SDS y de 5  $\mu$ g en el caso de ser utilizado como inhibidor en los ensayos de ELISA inhibición con sueros, antisueros o anticuerpos policlonales específicos de cada proteína.

### **3.2.6. Detección de azúcares con Concanavalina A**

La detección de proteínas con potenciales sitios de glicosilación, se realizó sobre membranas de nitrocelulosa tras su transferencia a partir de geles de poliacrilamida o PAGE-SDS. Las membranas se incubaron 1 h en tampón de bloqueo (TBS/polivinilpirrolidona 360 2% (p/v)), y después durante otra hora con Concanavalina A (Con A) biotilada a una concentración final de 1  $\mu$ g/ $\mu$ l en tampón de bloqueo. La membrana se lavó con TBS/Triton X-100 0.1% (v/v) y se incubó 1 h con estreptavidina-

HRP (1/1000). Los grupos  $\alpha$ -D-mannosyl and  $\alpha$ -D-glucosyl fueron detectados mediante reacción de quimioluminiscencia al igual que con el método de inmunodetección.

### **3.2.7. Espectrometría de masas y secuenciación de proteínas**

La determinación de la masa molecular de las proteínas reconocidas por los sueros de pacientes alérgicos se llevó a cabo tras su separación mediante PAGE-SDS en condiciones reductoras y mediante el uso de *EXQuest Spot Cutter* (Bio-Rad) se extrajeron las bandas deseadas y se sometieron a una digestión trípica manual durante 8 h a 37 °C. Tras sucesivos lavados con BA 50 mM, las muestras de en torno a 1-2  $\mu$ g, se mezclaron con una disolución saturada de ácido alfa-ciano-4-hidroxinámico en acetonitrilo acuoso al 30% y se analizaron en un espectrómetro *MALDI-TOF-TOF 4700 Autoflex III* (Bruker-Daltonics). De algunos péptidos generados durante la digestión se pudo hacer una secuenciación *de novo*.

Estos experimentos se llevaron a cabo en el Servicio de Proteómica y Genómica del Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC, Madrid) y de la facultad de Farmacia.

### **3.2.8. Resonancia Magnética Nuclear (RMN)**

Las muestras de los alérgenos Sola I 7 y Sola I 6 se prepararon para los experimentos de RMN a una concentración 0.5-0.7 mM en 90% H<sub>2</sub>O/10%D<sub>2</sub>O o en D<sub>2</sub>O que contenía sodio-4,4-dimetil-4-silapentano-1-sulfonato (DSS) a pH 5.5. Los espectros de RMN se realizaron a 298 K en un espectrómetro de *RMN Bruker AV 800* equipado con una criosonda de triple resonancia y una bobina de gradiente Z blindada activa. En la muestra no marcada, los espectros tradicionales 2D 1H-1H COSY, TOCSY y NOESY fueron adquiridos en H<sub>2</sub>O y D<sub>2</sub>O.

Los espectros de las proteínas marcadas fueron procesados con *Topspin* (Bruker Biospin, Karlsruhe) o *NMRPipe* (Delaglio) y analizados con *SPARKY* (T. D. Goddard y D. G. Kneller) y *NMRView* (Johnson). Para el cálculo de las estructuras, la de Sola I 7 fue calculada con el programa *Cyana v2.1* (Guntert), generando 100 estructuras. En el caso de Sola I 6, se obtuvo una estructura de modelo 3D completa basándose en proteínas homólogas y utilizando el programa *Modeller*.

Dichos estudios se llevaron a cabo en El Instituto de Química Física Rocasolano de Madrid (CSIC) por la Dra. Marta Bruix.

### **3.2.9. Determinación de características moleculares y búsqueda de similitud de secuencia**

**Masa molecular y punto isoeléctrico:** los valores teóricos de masa molecular y punto isoeléctrico de las proteínas se llevaron a cabo empleando el programa *ProtParam* disponible en el servicio ExPASy (<https://www.expasy.org>)

**Predicción de la presencia de péptido señal:** se utilizó el sistema de predicción facilitado por el servidor *SignalP 4.1* (ExPASy) basado en modelos de redes neuronales artificiales.

**Predicción de estructuras terciarias:** los modelados de la estructura tridimensional de las distintas proteínas se llevaron a cabo utilizando el servidor de modelado automático de proteínas *SWISS-MODEL*, basado en homología de estructura de proteínas, que proporciona el Swiss Institute of Bioinformatics (<https://swissmodel.expasy.org>).

**Búsqueda de grado de similitud/identidad de secuencias y alineamiento de proteínas homólogas:** la búsqueda de proteínas homólogas se llevó a cabo mediante *BLAST*. Los alineamientos de secuencia de aminoácidos se realizaron utilizando el programa *CLUSTALW*.

## **4. CARACTERIZACIÓN ESPECTROSCÓPICA DE PROTEÍNAS**

### **4.1. Métodos**

#### **4.1.1. Cálculo del coeficiente de extinción**

El coeficiente de extinción molar a 280 nm ( $\epsilon_{280}$ ) se calculó de manera teórica a partir de la ecuación [Wetlaufer, 1963]:

$$\epsilon_{280} = n^{\circ}\text{Tyr} \times \epsilon_{\text{Tyr}} + n^{\circ}\text{Trp} \times \epsilon_{\text{Trp}} + n^{\circ}\text{Cys-Cys} \times \epsilon_{\text{Cys-Cys}}$$

Siendo:

$$\epsilon_{\text{Tyr}} = 1340 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

$$\epsilon_{\text{Trp}} = 5540 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

$$\epsilon_{\text{Cys-Cys}} = 150 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

#### 4.1.2. *Análisis espectroscópico por dicroísmo circular*

Los espectros de dicroísmo circular (CD) en el UV-lejano fueron registrados con un espectropolarímetro *Jasco J-715* (Japan Spectroscopic Co.) con la configuración descrita por el hardware P/N manual de Jasco: 0302-0265 según lo descrito previamente [Verdino & col., 2008]. Las proteínas fueron preparadas en 0.2 mg/ml en BA 20 mM, pH 8.2. Los espectros fueron medidos en una cubeta cilíndrica con un paso óptico de 0.1 cm. Las elipticidades molares por residuo (grados  $\times \text{cm}^2 \times \text{dmol}^{-1}$ ) se calcularon en base al peso molecular medio por aminoácido obtenido a partir de la composición de cada proteína. La elipticidad molar por residuo se calculó a partir de la elipticidad registrada según:

$$[\Theta]_{\text{MWR}} = 3300 \times S \times H \times \text{MWR}/l \times c$$

Siendo:

$[\Theta]_{\text{MWR}}$ : elipticidad molar por residuo

S: sensibilidad de detección del aparato

H: diferencia en mm entre la línea base y el espectro de la muestra

MWR: peso molar medio por aminoácido

l: paso óptico en cm

c: concentración de proteína en mg/ml

#### 4.1.3. *Curvas de desnaturalización térmica (T<sub>m</sub>)*

El cálculo de la temperatura de desnaturalización de las proteínas se llevó a cabo mediante la realización de las curvas de desnaturalización térmica. Para ello, el dicrógrafo se conectó a un baño *Neslab RTE-111* que controló la temperatura de la celda o cubeta. Se registraron los cambios en la elipticidad molar a 208 nm que supone un mínimo de elipticidad de hélices  $\alpha$ , estructura predominante en las nsLTPs), en un rango de temperaturas entre 20 °C y 90 °C, con un incremento de 0.5 °C/min. Para estas mediciones se utilizaron cubetas cilíndricas de paso óptico 0.1 cm y una concentración de proteína en torno a 0.2 mg/ml en el mismo tampón que los espectros puntuales.

## 5. CARACTERIZACIÓN INMUNOLÓGICA DE PROTEÍNAS

### 5.1. Materiales

#### 5.1.1. *Soluciones para los ensayos de inmunodetección en membrana*

**Tampón de transferencia a membranas de nitrocelulosa:** su composición se ha incluido en la página 67.

**Tampón de lavado:** Se utilizaron dos tampones de lavado según el anticuerpo primario empleado: (1) *PBS-T*, (2) PBS con Tween-20 al 0.1% (v/v); *TBS-T*, TBS con Tween-20 al 0.1% (v/v).

**Tampón de bloqueo:** Se usaron dos soluciones según el anticuerpo primario empleado: (Bloqueo 1) *PBS-T-leche*, PBS-T con leche en polvo desnatada, libre de calcio, al 3% (p/v) o al 5% (p/v); (Bloqueo 2) *TBS-T-BSA*, TBS-T con albúmina de suero bovino (BSA, Sigma-Aldrich) al 3% (p/v).

#### 5.1.2. *Soluciones para los ensayos de inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA)*

**Tampón de lavado:** Tween-20 al 0.5% (v/v, Sigma-Aldrich) en PBS.

**Tampón de saturación:** Leche en polvo desnatada, libre de calcio al 3% (p/v) y Tween-20 al 0.1% (v/v) en PBS.

### **5.1.3. Soluciones para el Test de Activación de Basófilos (BAT)**

**Tampón de estimulación:** tampón HEPES de 1 M que contiene 0.78% NaCl (p/v); 0.037% KCl (p/v); 0.078% CaCl<sub>2</sub> (p/v); 0.033% MgCl<sub>2</sub> (p/v); 0.1% HSA (p/v); 10 µL/mL IL-3 (1 mg/mL)

### **5.1.4. Sueros**

Los sueros de pacientes procedentes del Hospital Regional Universitario de Málaga, cedido por el Dr. Miguel Blanca y la Dra. Cristobalina Mayorga y del Hospital Universitario Fundación Jiménez Díaz, cedidos por el Dr. Javier Cuesta Herranz permitieron la identificación de las nsLTPs alergénicas de semillas y pulpa y piel de tomate.

### **5.1.5. Anticuerpos policlonales**

Los antisueros policlonales frente a rSola I 3, rSola I 6 y rSola I 7 fueron producidos por el Dr. Carlos Pastor en la fundación Jiménez Díaz de Madrid. La obtención de los mismos se llevó a cabo mediante la inmunización de conejos New Zeland con 100 µg de las proteínas puras junto con adyuvante de Freund, tras un total de 6 inmunizaciones realizadas con periodicidad semanal. Las fracciones y purificadas a partir de los antisueros fueron obtenidas tras la diálisis de las muestras frente a PBS y purificación con una Proteína A-Sepharose (*GE Helthcare*).

En el caso de rSola I 6, se tuvo que realizar un recuerdo de dos inmunizaciones más para poder obtener una titulación adecuada en términos de especificidad y selectividad en el reconocimiento del antisuero. Las diluciones utilizadas para los antisueros fueron de 1:10000 para los alérgenos de semillas de tomate (rSola I 6 y rSola I 7) y de 1:200000 en el caso de rSola I 3.

El anticuerpo policlonal de cabra frente a IgG de conejo (GAR-HRP) conjugados con peroxidasa, fue suministrado por Bio-Rad.

El anticuerpo monoclonal específico anti-IgE humana fue producido y cedido amablemente por los laboratorios ALK-Abelló de Madrid, con una dilución utilizada para todos los ensayos de 1:5000, y el anticuerpo policlonal frente a IgG de ratón conjugado con peroxidasa (RAM-HRP) fue suministrado por Dako, y usado a una dilución 1:2000.

## 5.2. Métodos

### 5.2.1. *Test de Activación de Basófilos (BAT)*

Cien mililitros de sangre total heparinizada se incubaron con 20  $\mu$ L de tampón de estimulación y 1  $\mu$ L de anticuerpo monoclonal CCR3-APC (1 mg/mL) (BioLegend INC, San Diego, EE.UU.) durante 10 min a 37 °C. A continuación, se añadieron 100  $\mu$ L de las diferentes proteínas a estudiar (nsLTPs de semillas de tomate, Pru p 3, Ara h 9 y Hel a 3) y extractos (tomate total y semillas) a diferentes concentraciones siguiendo un patrón de dilución (0,1-0,00001  $\mu$ g/mL) y se incubaron durante 30 minutos a 37 °C. Como controles negativos y positivos se utilizaron PBS e IgE anti-humana (0,5 mg/mL) (BD Biosciences, NJ, EE.UU.), 100  $\mu$ L por pocillo, respectivamente. Después de 5 minutos en hielo, para detener el proceso de degranulación, las muestras fueron incubadas con anticuerpos monoclonales anti-CD 203c-PE y CD63 FITC (BioLegend) durante 15-20 minutos a 4 °C. Finalmente, se utilizó una solución de lisis (BD Biosciences) para la destrucción de los glóbulos rojos. Las células fueron analizadas usando un citómetro de flujo *FACSCalibur* (BD Biosciences), adquiriendo al menos 500 basófilos por muestra. Los resultados se presentaron como el porcentaje de basófilos activados (CD63+CD203c+CCR3+).

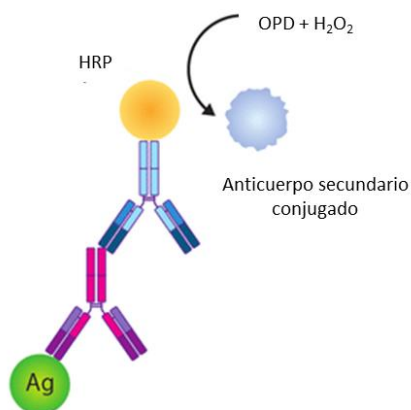
Dichos ensayos se llevaron a cabo en El Hospital Regional de Málaga por la Dra. Cristobalina Mayorga Mayorga y el Dr. Miguel González Visiedo.

### 5.2.2. *Enzimoimmunoensayo (ELISA) indirecto*

Todos los ensayos se llevaron a cabo en placas Costar de 96 pocillos de fondo plano y de alta capacidad de unión. Cada uno de los resultados mostrados se han realizado al menos por duplicado.

Se tapizaron las placas con 0.2  $\mu$ g de antígeno en PBS, pH 7.2, incubándose a 4 °C durante al menos 16 h. A continuación, tras 4 lavados de los pocillos con solución de lavado se bloquearon los sitios de unión inespecíficos con tampón de bloqueo durante 1 h a 37 °C. Después de incubaron las placas 2 h con los sueros de pacientes o 1 h en el

caso de antisueros policlonales primarios, diluidos en tampón de bloqueo (100  $\mu$ l/pocillo). Tras un nuevo lavado, se incubaron las placas durante 1 h con el segundo anticuerpo (100  $\mu$ l/pocillo) en tampón de bloqueo diluido a la mitad con PBS. Para el suero de conejo se usó como segundo anticuerpo una dilución de 1:3000 de GAR-HRP y para el caso de los sueros de pacientes alérgicos, se empleó un anticuerpo monoclonal anti-IgE humana obtenido en ratón a una dilución 1:5000. En este último caso, se realizó una tercera incubación con RAM-HRP (1:2000) durante 1 h a 37 °C. Las placas se lavaron nuevamente 4 veces y se procedió a su revelado con o-fenilendiamina (OPD, 0.63 mg/ml) disuelto en citrato sódico 0.1 M, pH 5.0, con 4% de metanol y un 0.032% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100  $\mu$ l/pocillo). La reacción se detuvo con 100  $\mu$ l de ácido sulfúrico 3 N a tiempo de 20 min para los sueros y de 8 min para el caso de anticuerpos y antisueros policlonales de conejo.



**Figura 17:** Esquema de ELISA indirecto.

La medida de densidad óptica a 492 nm se realizó en un lector de *ELISA iMarkT Microplate Reader* (Bio-Rad). En todos los ensayos se realizó un control negativo sin alérgeno tapizado y, dependiendo del tipo de ELISA, sin anti IgE o con el antisuero del conejo preinmunizado, cuyos valores de DO se sustrajo de los valores obtenidos para las distintas muestras.

### 5.2.3. Inmunodetección de proteínas tras Western Blot

Después de la transferencia de las proteínas a la membrana de nitrocelulosa, ésta se incubó 1 h con tampón de bloqueo a temperatura ambiente en continua agitación. Se añadió después el suero o antisuero diluido en el mismo tampón y se incubó 2 o 1 h, respectivamente, a temperatura ambiente. Después de lavar la membrana con tampón



de lavado 3 veces durante 10 min, se incubó durante 1 h a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario correspondiente. En el caso de la detección de IgE, y al igual que en ELISA, fue necesaria una incubación adicional con RAM-HRP. Tras lavar nuevamente, se procedió al revelado de la membrana por el método *WesternBright ECL* (Pierce en el caso de anticuerpos policlonales o Advansta en el uso de sueros de pacientes, debido a la diferencia en sensibilidad de cada uno) siguiendo las instrucciones del fabricante.

#### **5.2.4. Ensayos de inhibición**

Se preincubaron una mezcla de anticuerpo o suero (en tampón de bloqueo doblemente concentrado) junto a distintas diluciones del antígeno que se fueran a usar como inhibidor, bien proteína pura, extractos proteicos vegetales o péptidos resultantes de digestión gástrica o enzimática, durante 2 h en agitación suave y a temperatura ambiente. Tras ese tiempo se añadieron a los distintos pocillos previamente tapizados y saturados según el procedimiento descrito anteriormente.

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

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

Siendo:

$DO_{\text{obs}}$ : Densidad óptica a 492 nm en presencia de inhibidor.

$DO_{\text{blanco}}$ : Densidad óptica a 492 nm tapizando los pocillos con PBS en lugar de alérgeno.

$DO_{\text{max}}$ : Densidad óptica a 492 nm en ausencia de inhibidor.

Se realizaron también ensayos de inhibición mediante inmunotransferencia siguiendo el mismo procedimiento que en ELISA. Los porcentajes de inhibición se

calcularon con el programa *Multi Gauge V3.0* mediante su densitometrado, tomando como referencia de 100% de la señal la obtenida en la muestra sin inhibir.

## 6. ENSAYOS DE DIGESTIBILIDAD GÁSTRICA Y DUODENAL

### 6.1. Materiales

#### 6.1.1. *Enzimas digestivas y fosfolípidos*

**Pepsina:** 182 U/mg pepsina de origen porcino (Sigma). Peptidasa secretada al estómago con un pH óptimo de 2.0 y desactivada a un pH superior a 5.0. Rompe los enlaces peptídicos entre Phe-Phe y Phe-Tyr.

**Tripsina tipo I:** 34.5 U/mg tripsina pancreática de origen bovino (Sigma). Serán proteasa esencial en el proceso digestivo producida en el páncreas que es secretada en el duodeno. Presenta un pH óptimo de 8.0 y rompe enlaces detrás de los residuos aminoacídicos de Arg y Lys de una cadena polipeptídica.

**Quimotripsina tipo I-S:** 0.44 U/mg  $\alpha$ -quimotripsina pancreática de origen bovino (Sigma). Serán proteasa como la tripsina secretada al duodeno que rompe enlaces peptídicos tras el carboxilo terminal de aminoácidos como Trp, Tyr, Phe y Met.

**Lipasa tipo VI-S:** 24.7 U/mg lipasa pancreática de origen porcino (Sigma). Enzima que se encarga de romper los ácidos grasos de las grasas de los alimentos para que puedan ser absorbidos.

**Colipasa:** 1:895 mg/mg colipasa pancreática de origen porcino (Sigma). Cofactor proteico necesario para la actividad óptima de la lipasa pancreática. Se secreta en el páncreas exocrino en su forma inactiva, la pro-colipasa, y se activa en el lumen intestinal por acción de la tripsina. Tiene la función de prevenir los efectos inhibidores de las sales biliares sobre la actividad de la lipasa, facilitando la hidrólisis intraduodenal.

**Sales biliares:** 7.4 mM (Sigma) que contiene cantidades equimolares de glicodeoxicolato de sodio y taurocolato de sodio. Se forman a partir de los ácidos biliares

conjugados y son la forma en que el cuerpo guarda los ácidos biliares en la vesícula biliar, siendo secretados al intestino para la digestión de lípidos.

**Solución de Bowman-Birk:** Inhibidor de tripsina y quimotripsina (Sigma). Purificado de la soja, se añade a una concentración para inhibir el doble de la cantidad de tripsina y quimotripsina añadida a la digestión.

**Fosfatidilcolina (PC):** Fosfolípido que, junto con las sales biliares, ayuda a la solubilización de los ácidos biliares en la bilis, por lo que se usa como protector natural de las proteínas sometidas a digestión. Las vesículas de dicho fosfolípido fueron llevadas a concentración final de 9.58 mg/ml (Larodan).

### 6.1.2. Medios de digestión

**Fluido de simulación Digestión Gástrica (SGF):** 35 mM NaCl, pH 2.

**Fluido de simulación Digestión Duodenal (SIF):** 0.25 M Bis-Tris pH 6.5, 1 M CaCl<sub>2</sub> y una mezcla de sales biliares.

## 6.2. Métodos

### 6.2.1. Simulación de digestión gástrica y duodenal

**rSola I 3, rSola I 6 y rSola I 7:** Para el estudio de la degradación por enzimas digestivas se utilizaron 13 mg de cada una de las nsLTPs y 2 mg para la digestión con PC.

Se realizaron sobre las proteínas digestiones gástricas y duodenales *in vitro* [Jiménez-Saiz & col., 2013]. Para las primeras, el SGF se preparó con y sin la presencia de vesículas fosfolipídicas (PC) sonicada en hielo durante 20 min. Todas las digestiones gástricas se realizaron a pH 2.0 durante 60 min a 37 °C, con pepsina. Las alícuotas se retiraron a los 15, 30 y 60 min de incubación (G0, G15, G30 y G60).

Las digestiones duodenales comenzaron a partir de la digestión gástrica de 60 minutos reajustado el pH a 6.5, con la adición de la solución SIF. Tras precalentar a 37 °C durante 15 min la muestra, se añadieron la lipasa pancreática porcina, la colipasa pancreática, tripsina pancreática y  $\alpha$ -quimotripsina pancreática a la mezcla duodenal. Las reacciones se detuvieron después de 30 y 60 min de incubación a 37 °C (D30 y D60), añadiendo una solución de Bowman-Birk.

### **6.2.2. Análisis de péptidos generados**

Tras la realización de las digestiones de las proteínas, se llevó a cabo el análisis del perfil cromatográfico de degradación de las proteínas en péptidos. Para ello, se realizó una cromatografía en fase reversa RP-HPLC con una columna Ultrasphere C-18 5µm y un gradiente de acetonitrilo con 0.1% de TFA de 0-30% en 60 min para cada uno de los tiempos de la digestión de las tres proteínas con y sin fosfatidilcolina, aplicando 200 µg de cada muestra. Además, se analizaron los cromatogramas de todas las enzimas por separado en ausencia de las proteínas a analizar y los de las proteínas sin tratar.

Posteriormente las muestras sometidas a tratamiento con β-mercaptoetanol y calentadas durante 5 min a 95 °C y se aplicaron en geles comerciales *Criterion™ XT 16.2% Bis-Tris Gel, 12 + 2* (Bio-Rad) para la separación de péptidos de baja masa molecular, sometiéndolas a una corriente de 100V, con la posterior tinción de *Bio-safe Coomassie G-250* (Bio-Rad).

### **6.2.3. Estudio de la capacidad de unir IgE de los péptidos generados tras la digestión por inmunodetección**

Después de la separación por PAGE-SDS en geles de Tris-Tricina, se sometieron a transferencia semi-seca en un *Trans-Blot SD* (Bio-Rad, Richmond, CA) durante 30 minutos a 18 V. Posteriormente, se llevó a cabo la inmunodetección como se ha mencionado previamente con los sueros de pacientes alérgicos a cada una de las proteínas a dilución 1:5.

### **6.2.4. Estudio de alergenidad remanente de los péptidos generados por ELISA**

La capacidad de unir la IgE humana de los péptidos generados en cada uno de los tiempos de digestión de forma comparativa a la de las proteínas intactas fue evaluada por la técnica de ELISA de inhibición. Las placas fueron tapizadas con 2.5 µg de alérgeno por pocillo incubándose durante toda la noche a 4 °C. Después las placas fueron lavadas

con PBST (PBS Tween-20 0.05% (v/v)) e incubadas durante tres horas con tampón de bloqueo PBST 2.5%. Durante este tiempo, los sueros de pacientes alérgicos a dilución 1:15 (Sola I 7) y 1:7 (Sola I 3) fueron preincubados con varios tiempos de digestión (G0, G60 y D60) como inhibidores. Seguidamente, la mezcla de sueros e inhibidores se incubaron en la placa toda una noche. Tras sucesivos lavados, las placas se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente con un anticuerpo anti-IgE humana de conejo (1:1000) (Dako). Tras varios lavados, se incubó de nuevo durante 1 h a temperatura ambiente con pAb anti-IgG-HRP porcina (1:2000) (Dako). La reacción de amplificación de la señal se llevó a cabo gracias a la tiramida-biotina y la estreptavidina-HRP utilizadas siguiendo las instrucciones del fabricante *ELAST ELISA* (Perkin Elmer). Dichos ensayos se revelaron al igual que los ELISA descritos anteriormente, obteniendo la medida de densidad óptica de cada pocillo a 492 nm en un lector de *ELISA iMarkT Microplate Reader* (Bio-Rad).

Los resultados se analizaron como la concentración efectiva de la muestra o tiempo de digestión necesaria para inhibir el 50% de la señal (EC50, mg/ml) [Jiménez-Saiz, R. & col., 2011].

## 7. ENSAYOS MEDIANTE CULTIVOS CELULARES

### 7.1. Materiales

#### 7.1.1. Medio de cultivo de células dendríticas mieloides de la médula ósea de ratón (mDCs)

Para el cultivo de células dendríticas mieloides (mDCs) derivadas de la médula ósea de ratón se utilizaron Flask T75 (Cultek) con un volumen final de 15 ml, conteniendo  $1.5 \cdot 10^7$  células. Además, para la correcta diferenciación celular a células dendríticas mieloides, se suplementó el cultivo celular a día 4, 5 y 8 con 75  $\mu$ l del *Factor Estimulador de colonias de Macrófagos Granulocíticos (GM-CSF)* (20  $\mu$ g/ml PBS, 0.1% BSA) (R&D Systems).

La composición del medio para el cultivo de mDCs (500 ml) fue el siguiente:

RPMI 1640 (Sigma), 10% FBS (Lonza), 1% Penicilina/Estreptomicina/Glutamina (Lonza), 1mM Piruvato sódico (Sigma), HEPES (1:100) (Sigma), 0,1 mM  $\beta$ -ME (Sigma).

### 7.1.2. Soluciones generales mDCs

**FACS:** 1% BSA, 20 Mm EDTA en PBS estéril.

**Tampón de Fijación:** Paraformaldehído (PFA) 1%

**Tampón de Fraccionamiento (FB):** 10 mM Tris, 250 mM Dextrosa pH 7.0

**Tampón de Digestión (DB) 5x:** 500 mM citrato pH 4.8 + 10 mM DTT

### 7.1.3. Anticuerpos específicos

Los anticuerpos utilizados para la visualización de la internalización de los distintos alérgenos de tomate en las células dendríticas mediante citometría de flujo o FACS fueron los siguientes:

**APC anti-cd11c de ratón:** Marcador de proteína transmembrana presente en células dendríticas unido al fluorocromo alofocianina (BD). Es necesario para la interacción célula-célula durante la respuesta inflamatoria.

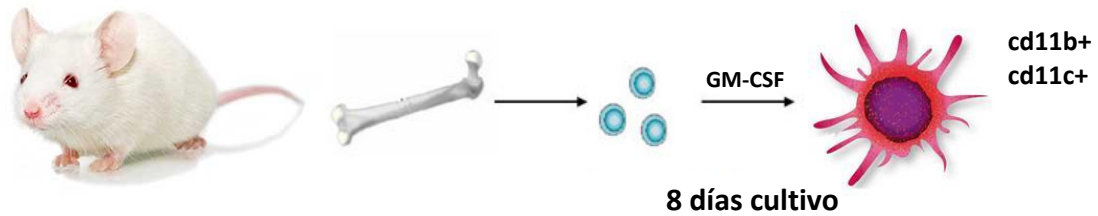
**PE anti- cd11b de ratón:** Marcador de proteína de la familia integrinas con un papel fundamental en la regulación de la adhesión celular y migración unido al fluorocromo ficoeritrina (eBioscience).

**Anticuerpo de bloqueo:** anti- CD16/32 de ratón (BD).

Para el marcaje de los alérgenos con un fluoróforo que permitiera detectar la posición del mismo en la célula dendrítica mielóide, se utilizó *AlexaFluor-488* (Thermo-Fisher) el cual presenta una excitación a  $\lambda = 490$  nm y emisión a  $\lambda = 525$  nm.

## 7.2. Métodos

### 7.2.1. Cultivo de mDCs de la médula ósea de ratón BALB/c



**Figura 18:** Esquema de la obtención de mDCs de la médula ósea de ratón.

Para la obtención de las células dendríticas mieloides de la médula ósea de ratón se utilizaron para cada ensayo 3 ratones BALB/c hembras de 8 semanas de vida, facilitados por el Animalario del Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC, Madrid).

Tras extraer los huesos fémur, tibia y peroné y lavar sucesivas veces con etanol al 70% para evitar contaminaciones, se procedió a cortar las epífisis de cada uno de los huesos bajo condiciones estériles, dejando la médula ósea expuesta. De este modo, con una jeringa de medio RPMI 1640 se lava la médula por ambos lados, vaciando el contenido en una placa Petri estéril. Posteriormente, se centrifuga el contenido medular 5 min a 5000 xg, desechando el sobrenadante. El precipitado de células se lava con tampón de lisis de hematíes *Reed Blood Cell lysing buffer* (Sigma) durante 1 min, tras lo cual se añade medio nuevo y centrifuga nuevamente 5 min 5000 xg, resuspendiéndose el sedimento de células en medio para proceder a su contaje en cámara de Neubauer (dilución 1:8 con *Trypan Blue Dye* (Lonza)).

Para el cultivo celular de las células dendríticas mieloides, en un Flask T75 con 15 ml de medio RPMI 1640 completo, se añaden  $1.5 \times 10^7$  células, complementando el medio con 75  $\mu$ l del factor GM-CSF antes mencionado, necesario para llevar a cabo la diferenciación celular de las células progenitoras de la médula ósea a mDCs. El cultivo de estas células se realiza durante 8 días en un incubador de 5% CO<sub>2</sub> a 37 °C, con renovación de medio y suplemento con GM-CSF en los días 4, 5 y 8. Tras los días de cultivo, se puede observar una clara diferenciación de células adherentes (macrófagos) y células no adherentes (mDCs). De este modo, el medio con las células dendríticas mieloides se recolecta para su uso inmediato en los ensayos de internación de las

distintas nsLTPs de tomate o bien, se congelan a una densidad de  $5 \times 10^6$  células/ml en viales de congelación de células (90% RPMI 1640, 10% Dimetil Sulfoxido (DMSO (Sigma)) para su posterior uso en los ensayos de degradación lisosomales.

### **7.2.2. Estudio de la internación de alérgenos de tomate en mDCs**

Se estudió la capacidad de internación o captura de las nsLTPs, tanto de piel como de semillas de tomate, por parte de las células dendríticas mieloides mediante citometría de flujo o FACS. Para ello, fue necesario el marcaje de 500 µg de cada alérgeno en tampón  $\text{NaHCO}_3$  0.1 M pH 9.0 con el fluoróforo AlexaFluor-488. La cantidad de AlexaFluor-488 necesario para el marcaje de cada alérgeno se calculó siguiendo la siguiente fórmula:

$$[(500 \mu\text{g alérgeno} / \text{Mm (g/mol)} \times 1000)/15.5] \times \text{DOL} = \mu\text{l AlexaFluor-488 a } 10 \text{ mgr/ml en DMSO}$$

Siendo:

DOL: "Degree of Labelling". Depende de la masa molecular de cada alérgeno. Según las especificaciones del fabricante.

Tras resuspender los 500 µg de alérgeno a una concentración 2 mg/ml en  $\text{NaHCO}_3$  0.1M pH 9.0, se centrifuga 10 min a 4 °C a máxima velocidad en microfuga. El sobrenadante se transfiere a una cubeta con imán adaptada para poder realizar el marcaje en agitación suave a temperatura ambiente. Posteriormente se añade gota a gota la cantidad previamente calculada del fluoróforo, dejándolo agitar 1 h en oscuridad. Seguidamente, se para la reacción con 50 µl de Tris-HCl 1M pH 8.8 previamente filtrado en filtros 0.2 µm. La reacción se deja 1 h agitando en oscuridad. Se llevan a cabo sucesivas etapas de purificación/filtración de la reacción en sistemas Nanosep® (Omega) con tamaño de poro 3 kDa, previamente equilibrado en PBS, con el fin de eliminar el exceso de fluoróforo no unido a la proteína. Para ello, se realizaron varios ciclos de centrifugación a 8000 xg durante 10 min, observándose una pérdida de color amarillo en el sobrenadante filtrado, debido a cantidades de AlexaFluor libre cada vez menores.



Por último, se realizó una cuantificación del alérgeno marcado mediante PAGE-SDS, tomando como control la proteína sin marcar.

Una vez que el alérgeno se hubo marcado, se ajustó la densidad del cultivo de mDC después de 8 días a  $2.5 \times 10^6$  células/ml con medio RPMI 1640 fresco, se añaden 200  $\mu$ l/pocillo a una placa de cultivo de 24 pocillos (Costar). Posteriormente, se añaden 200  $\mu$ l/pocillo de antígeno (Sola I 3, Sola I 6 o Sola I 7) marcado con AlexaFluor-488 a distintas concentraciones: 50  $\mu$ g/ml, 5  $\mu$ g/ml y 0.5  $\mu$ g/ml. Adicionalmente, como controles para poder realizar la compensación y calibración de cada ensayo, se incuban pocillos sin alérgeno, pero con marcaje de cada uno de los anticuerpos específicos de los receptores de superficie de las mDCs (PE y APC) previamente mencionados, al igual que pocillos con el doble marcaje.

Las células con el alérgeno se incuban a diferentes tiempos (15, 30 y 60 min), a 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>, tras lo cual se recolectan las células en tubos de citometría mediante un raspador de células (Fisher Scientific). Se realizan dos lavados de los pocillos con 400  $\mu$ l de PBS y se centrifugan los tubos 5 min a 5000 xg y 4 °C. Se añade 1 ml de solución FACS por tubo y centrifugación 5 min a 5000 xg y 4 °C. Tras desechar el sobrenadante, se vuelve a lavar con tampón FACS. Posteriormente, se resuspenden las células en 50  $\mu$ l de anticuerpo de bloqueo (1:25) y se incuba 30 min a 4 °C en oscuridad. Seguidamente, se añaden 50  $\mu$ l del cóctel de anticuerpos (PE-CD11b + APC-CD11c) y se incuba 30 min a en frío 4 °C en oscuridad. Por último, se lavan los tubos 4 veces con 1 ml de FACS centrifugándose 5 min a 5000 xg 4 °C y se fijan las células añadiendo 50  $\mu$ l de PFA al 1 % a cada tubo, analizando las muestras por citometría de flujo a la mañana siguiente.

Los análisis por citometría de flujo o FACS se llevaron a cabo en el CAI de Citometría y Microscopía de la Universidad Complutense de Madrid. El citómetro utilizado fue *FACSCalibur™* (DB), en el que la excitación se llevó a cabo con un láser azul de Argón de 15 mW que emite a 488 nm y un láser de diodo rojo que emite a 635nm. El programa de análisis utilizado en la unidad de citometría fue el *Cellquest Pro*, para el cual se trazó un área en el dotplot de tamaño y complejidad que acotase las células de interés, recogiendo al menos 10.000 eventos en dicha región para cada muestra.

Los resultados de citometría fueron analizados con el programa *FlowJo\_V10* y *SigmaPlot 11.0*.

### 7.2.3. Aislamiento de enzimas lisosomales de células dendríticas

Para aislar las enzimas lisosomales de las células dendríticas mieloides se parte de mDCs congeladas con una densidad de  $5 \times 10^6$  células/ml [Egger M. & col., 2011]. Las células se lavan con 20 ml/ $1 \times 10^7$  células de tampón de fraccionamiento (FB) y se centrifuga 5 min, 5200 xg y 4 °C, descartando el sobrenadante. El precipitado se resuspende en FB (0.75 ml/ $1 \times 10^7$  células) y es transferido a un sistema de rotura celular por fuerza mecánica o "douncer". Posteriormente se agita unas 20-25 veces en hielo, rompiendo las paredes celulares y se transfiere a un nuevo tubo para centrifugar 10 min, 6.000 xg y 4 °C. El sobrenadante es transferido a tubos de ultracentrífuga y se centrifuga en Ultracentrífuga *Optima*<sup>®</sup> *MAX-XP* (Beckman Coulter) 1 h a 100.000 xg y 4 °C.

El precipitado resultante contiene los lisosomas purificados e inmediatamente se deben resuspender en un volumen pequeño de FB, quedando una solución homogénea pero ligeramente turbia. Para poder obtener las enzimas lisosomales, la ruptura de los lisosomas se realiza con 5 ciclos de congelación/descongelación en nitrógeno líquido. Por último, se determina la concentración de enzimas por BCA y PAGE-SDS junto con las proteínas que iban a ser utilizadas en el ensayo.

La degradación de los alérgenos por las enzimas lisosomales se llevó a cabo en un termociclador *Mastercycler*<sup>®</sup> *gradient* (EPPENDORF), incubándose la mezcla a 37 °C. Tras el tiempo estimado de incubación, se inactivaron las enzimas con 5 min a 95 °C.

Para llevar a cabo las digestiones con las enzimas lisosomales sobre los alérgenos de tomate se preparó una mezcla maestra o Master Mix con las siguientes cantidades para un volumen final de 20 µl de:

5 µg de proteína (nsLTP), 4 µl DB (concentración final 1x) y 7 µg de enzimas lisosomales.

Los tiempos de incubación para el análisis de la resistencia a la degradación por las enzimas lisosomales fueron los siguientes: 0, 0.5, 1, 3, 8, 12, 24, 36 y 48 h.

#### 7.2.4. Estudio de la resistencia de las nsLTPs de tomate a la degradación por las enzimas lisosomales

El análisis de la resistencia de los alérgenos a la degradación por las enzimas lisosomales se realizó por PAGE-SDS (10  $\mu$ l) y por inmunodetección de las proteínas transferidas a membranas de nitrocelulosa (10  $\mu$ l) con sueros de pacientes alérgicos a cada una de las nsLTPs a dilución 1:5.

### 8. TÉCNICAS ANALÍTICAS: GENERACIÓN DE UN GENOSENSOR PARA LA DETERMINACIÓN DE ALERGENOS EN ALIMENTOS

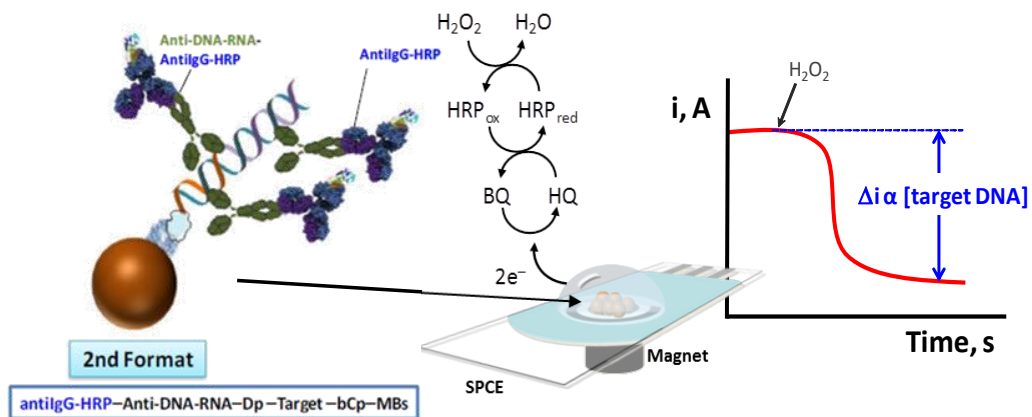


Figura 19: Visualización esquemática del formato de genosensor utilizado.

#### 8.1. Materiales

##### 8.1.1. Cebadores: detección de fragmentos genómicos

La detección de fragmentos de DNA genómico (DNAg) se realizó a partir del diseño de sondas específicas de DNA y RNA del alérgeno de semillas de tomate Sola I 7, correspondientes a una de las regiones con mayor grado de similitud entre nsLTPs.

5' ATTCATTCACATAGAAAAAAAAAACAACACTACATCTCAATATATACAAATTCAAGAAATATTTAAA  
 TTTTAGTAATCATGAAGGCTATCGCAATACTAGTTCTAGTTGTGCTAGCTGTGTTCCAGCTAGCAATGGT  
 TGCACGGGGCGCAATCACTTGTGGCCAAGTGGATGCTAACTTGACACCTGTGTCCCGTTCCTGACAC  
 AGGGTGGCGAGCCCGGTGCAGCATGCTGTAGCGGGGTGAGAACCTTGAATGGTAACACTCAATCCTC  
 TGATGATAGAAGAACCGCTTGCAACTGTGTTAAGGCTGCCGCGAATCGATACCCCAACCTTAAAGATG  
 ATGCGGCTCAATCTCTCCCTAGCAAGTGCGGCATATCCCTCACCGTCCCTATCTCCAGGACCGTCAACTG  
 TGACACAATCAGTTAAATTCAGCTGGATGGATAATGTTATAACCTCAATGTTGTTATAATGTATTAATA  
 AACCAAGGGTTGTTAAATCCTTGAACGTTGTAACATATTCAATTACTATGAGTTAATTTGAGTATGTTG  
 TTGTTCAAAAATGAATGTATTCCGTTTATAAATCATAAAGAAAGTTCAAATGATCGATCGTTACTTAAAA  
 AAAAAAGCA 3'

Dichas secuencias específicas de oligonucleótidos, sonda de captura de RNA biotinilada (RNA-bCp), la sonda de detección de RNA biotinilada (RNA-bDp) y la diana de DNA (Sigma) se reconstituyeron en agua libre de nucleasas a una concentración final de 100 µM, mostrándose en la siguiente **Tabla 11**.

**Tabla 11:** Cebadores o sondas utilizadas para la detección del gen de Sola I 7.

Sonda	Secuencia nucleótidos	pb
Captura RNA (RNA-bCp)	5'- Biotin – CUACAGCAUGCUGCACCGGGCUCGCCACCC - 3'	30
Detección RNA (RNA-bDp)	5'- UGUGUCAGGAACGGGACACAGGGUGCCAAG - Biotin - 3'	30
Target DNA	5'- CTTGGCACCTGTGTCCCGTTCCTGACACAGGGTGGCGAGCCCGGTGCAGCATGCTGTAG- 3'	60

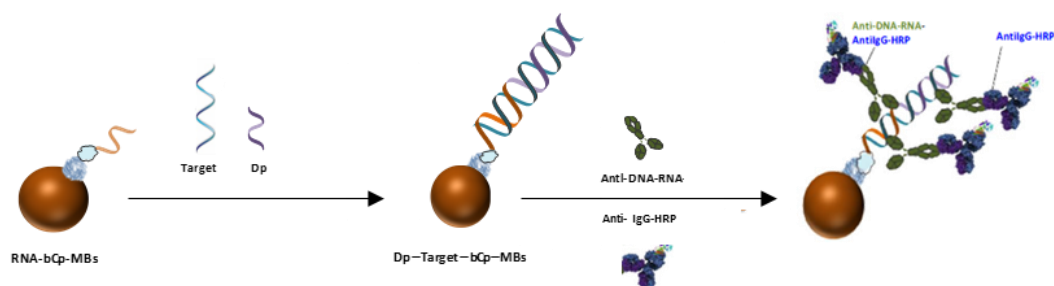
### 8.1.2. Reactivos

**Tampón de unión y lavado (B&W):** Tris-HCl 10 mM, 1 mM de EDTA y 2 M NaCl, pH 7.5.

**Tampón de bloqueo:** Caseína purificada al 1% p/v (Thermo Scientific).

## 8.2. Métodos

### 8.2.1. Optimización del genosensor



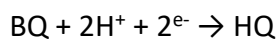
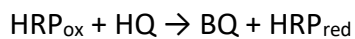
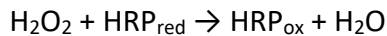
**Figura 20:** Etapas del proceso de obtención del genosensor.

Las microesferas Strep-MBs de 2.8  $\mu\text{m}$  de diámetro, 10 mg/ml (Dynal Biotech) se utilizaron como plataforma electroquímica magnética para la construcción del biosensor. Para ello, se añadieron alícuotas de 5  $\mu\text{l}$  de las mismas y lavó dos veces con 50  $\mu\text{l}$  de tampón B&W. Posteriormente, 25  $\mu\text{l}$  de 0.25  $\mu\text{M}$  RNA-bCp30mer en tampón B&W se incubaron con las microesferas durante 30 minutos a 37  $^{\circ}\text{C}$  y 950 rpm en agitador *Optic Ivymen System* (Sharlab). Los RNA-bCp-Strep-MBs preparados fueron lavados dos veces con 50  $\mu\text{l}$  de tampón de bloqueo comercial y concentrados gracias a un sistema magnético *DynaMag-2* (Invitrogen). A continuación, la reacción de hibridación en sándwich entre los complejos RNA-DNA se promovieron mediante la incubación de las microesferas modificadas en una solución que contenía 25  $\mu\text{l}$  de la sonda de detección RNA a 0.1  $\mu\text{M}$  (RNA-Dp30 mer) y la diana de DNA deseada (Target DNA 60mer) a 0.01 nM durante 30 min, a 37  $^{\circ}\text{C}$  y 950 rpm.

Una vez los MBs con el RNA-DNA heterodúplex estaban funcionalizados, para marcar enzimáticamente el sensor de DNA, fueron resuspendidos en anti-RNA-DNA (1 $\mu\text{g}/\text{ml}^{-1}$ ) y 40  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de anti-ratón IgG-HRP (Abcam) durante 60 min a temperatura ambiente. Finalmente, se realizaron dos lavados con 50  $\mu\text{l}$  de tampón de bloqueo.

Las mediciones amperométricas se realizaron utilizando un modelo de *CH Instruments* (Austin) en una celda electroquímica de carbono de 4 mm de diámetro *SPCEs* (DropSens) que contiene 10 ml de 0.05 M PBS pH 6.0 y 1 mM hidroquinona *HQ* (Sigma) y aplicando un potencial de detección de -0.20 V a temperatura ambiente. Una

vez estabilizada la línea de base, 50 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 0.1 M fueron añadidos y se registró la corriente electroquímica hasta que se alcanzó la estabilidad. De este modo, la magnitud de la corriente catódica medida es directamente proporcional a la concentración de la diana de DNA Sola I 7. En este ensayo, la HQ se utiliza como mediador electroactivo de los electrones que se desplazan a partir de la superficie del electrodo al centro Redox de HRP acoplado al RNA-DNA heterodúplex, siguiendo el mecanismo de reacción siguiente:



### 8.2.2. *Obtención de DNA genómico de extractos vegetales*

Para la extracción de DNA genómico (DNAg) de semillas de tomate y otros vegetales se utilizó el kit *NucleoSpin® Plant II* (MACHEREY-NAGEL), el cual se basa en el método de extracción con CTAB (Bromuro de hexadeciltrimetilamonio) y SDS (dodecilsulfato sódico) que se utiliza particularmente para tejidos vegetales. El material vegetal de partida fue liofilizado y pulverizado posteriormente con nitrógeno líquido, manteniendo unas condiciones mínimas de esterilidad. Ambos métodos de extracción presentan una primera etapa de lisis celular en la que el material vegetal se incubaba con detergentes (CTAB y SDS) y RNasa A durante 10 min a 65 °C. Tras un proceso de filtración del lisado celular y centrifugación 2 min a 11000 xg, se recoge el sobrenadante y se prepara para su unión en las columnas de dicho kit con 24-36% de clorhidrato de guanidina y etanol al 35-55%. Posteriormente, se incorporan a las columnas NucleoSpin para la unión del DNA y, finalmente, después de lavar y secar la membrana de sílice con 36-50% de clorhidrato de guanidina y 2-propanol al 20-35%, se eluye el DNAg total en 100 µl de tampón de elución (5 mM Tris/HCl, pH 8,5). Tras la cuantificación de la concentración de DNA mediante el espectrofotómetro *NanoDrop ND-1000®*, se verificó la correcta extracción en geles de agarosa al 0,8%.



**RESULTADOS Y DISCUSIÓN**  
***RESULTS & DISCUSSION***





## CHAPTER I: Tomato allergy and its repercussion in cross-reactivity: Identification and characterization of natural tomato nsLTPs

---

The most prevalent allergenic foods are those of vegetal origin, affecting approximately 2-4% of the European adult population [Asero, 2013]. Within them, tomato (*Solanum lycopersicum*) has been described as one of the most prevalent plant derived-food sensitizer [Lollier & col., 2014; Bassler & col., 2009; Larramendi & col., 2008; Ballmer-Weber & col., 2011; Geroldinger-Simic & col., 2011]. Particularly, 6.5% of this allergic population is sensitized to tomato fruit in the Spanish Mediterranean region although 80% of them tolerated its consumption [López-Matas & col., 2011].

Tomato, belonging to the *Solanaceae* or nightshade plant family, is a widely produced plant crop and one of the most consumed vegetables worldwide [Ortolani & col., 1988]. Although specific allergenic proteins, have been already identified in the peel and pulp of tomato fruit, such as Sola I 1 (profilin), Sola I 2 ( $\beta$ -fructofuranosidase), Sola I 3 (nsLTP), Sola I 4 (Bet v 1-like) and Sola I 5 (ciclophilin) [Welter & col., 2013a; Wangorsch & col., 2015; Giangrieco & col., 2015; Welter & col., 2013b] ([www.allergen.org](http://www.allergen.org)), genuine tomato allergy is uncommon. In most cases, sensitization or positive skin or *in vitro* tests occur in the absence of allergy manifestations to this food. The patients are in fact primarily sensitized to other airborne or food allergenic sources with which tomato allergens show cross-reactivity [Bernardi & col., 2011].

Several cases of food allergies without a positive *in vitro* diagnosis test have been reported. For these patients, different allergens have been specifically identified in certain tissues, such as the seeds of certain fruits like in kiwi [Sirvent & col., 2014], for example. This study allowed identifying a 2S albumin and an 11S globulin as IgE-reactive kiwi seed allergens, showing indeed a significant similarity to other previously reported food allergens. The concentration for these proteins located exclusively in seeds, is low. Therefore, when the full extract is used, the dilution of these allergens in the protein mixture hampers a correct diagnosis of the patient.

Regarding tomato allergy, and taking into account its background, several key points make plausible the existence of overlooked specific allergens in tomato seeds: a) Different seeds from other species are well-recognized as potent inducers of food

allergy, as previously shown with the kiwi example; b) It is well known that seeds can contain high amounts of allergenic proteins with very stable structures such as pathogenesis-related proteins, TLPs, or nsLTPs [Sirvent & col., 2009], as well as storage proteins like 2S albumins, 7S vicilins, or 11S globulins. All of them are potentially capable of sensitizing at the gastrointestinal level [Pascal & col., 2012] and can be involved in cross-reactivity processes observed with peanut, tree nuts, and other foods [Breiteneder & col., 2005b]; and c) Considering several food manufacturing and pre-cooked dishes, seeds are not frequently removed from the tomato, and therefore, they are usually ingested together with the rest of the fruit.

In summary, searching for new allergens in tomato seeds that may be responsible for allergic symptoms in certain patients, with negative SPT, appeared to be a necessary approach to further improve the diagnosis and, perhaps, the treatment of tomato allergy. Plant members of the nsLTP family are widely cross-reacting pan-allergens of 7-10 kDa molecular mass widespread in the plant kingdom. They are small basic cysteine-rich lipid-binding polypeptides with an isoelectric point (pI) of around 9 and a primary structure consisting of 65-95 amino acids. Indeed, in good agreement with the features of most food allergens, they are usually very stable proteins to thermal treatment and protease digestion [Gomar & col., 1996]. Their function, however, is not clear yet, but they have been implicated in lipids binding through a compact domain consisting of four or five  $\alpha$  helices separated by short  $\beta$ -turns and an unstructured C-terminal coil of variable size [Sicherer & col., 2006].

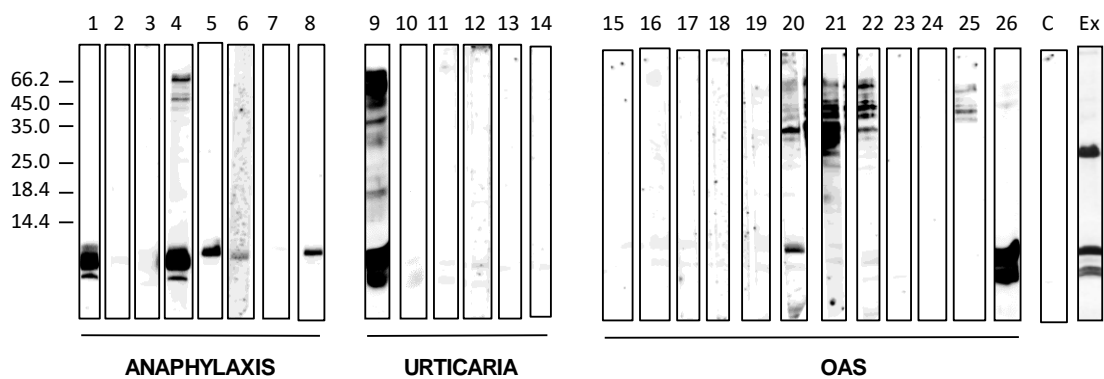
According to their different molecular masses, nsLTPs detected in many vegetable sources are divided in two subfamilies: nsLTP1 containing molecules of around 9 kDa, and nsLTP2, corresponding to those of about 7 kDa. These proteins are one of the most frequent causes of food-induced anaphylaxis [Palacin & col., 2010]. It has been reported that nsLTPs are predominantly present in the peel of fruits when up to 15% of patients with tomato allergy were sensitised to tomato nsLTP1, Sola I 3, but members from both classes have been also identified in tomato seeds by means of electrospray MS and MALDI imaging with functions in lipid transport processes from the endosperm to the embryo, as well as in the seed protection against infections during germination [Bencivenni & col., 2014; Sheoran & col., 2005].

## 1. ISOLATION AND IDENTIFICATION OF NATURAL TOMATO nsLTps

This study was originated by an onset of patients that reported clinical symptoms when they consumed tomato with seeds but tolerated the fruit when the seeds were removed. Twenty-six tomato allergic patients were recruited from the Allergy Services of Regional University Hospital of Málaga, the Hospital Infanta Leonor and Foundation Jiménez Díaz Hospital of Madrid. The inclusion criteria were a well-defined clinical history of tomato allergy and positive SPT to tomato. Patients were classified according to their clinical symptoms after tomato intake: mild reactions, including oral allergy syndrome (OAS), moderate reactions, such as urticarial, and severe reactions, including anaphylaxis [Sampson, 1998]. As negative controls, we included a group of age- and sex-matched individuals with tolerance to tomato and without food-allergic episodes. The study was conducted according to the principles of the Declaration of Helsinki and approved by the Ethic Committee of all hospitals. All participants were informed and signed the corresponding informed consents before being included in the study. The Ethical Committee of the Complutense University (Madrid, Spain) and Ethical and Research committee of Regional University Hospital of Malaga (#02/2012) approved the protocols used for this experimental work and all the methodology related to the use of human sera in the study. The average age of the patients was  $32.9 \pm 9.8$  years showing a strong predominance of female individuals (89%). Clinical symptoms can be described as: 12 patients (46.2%) showing OAS while the other 14 displayed moderate and systemic reactions. The most frequent of the latter moderate and were anaphylaxis in 30.8% and urticarial in 23% of the patients' sample. In addition, most of them showed positive SPT with other edible plants belonging to the *Rosaceae* family (73%), different nuts (69.2%), or other fruits of the latex-fruit syndrome (46.1%). Only four patients (15.4%) were also allergic to olive pollen (*Olea europaea*) and one was exclusively allergic to tomato. (Table 12).



Regarding reported symptoms after consumption of tomato seeds of these patients, tomato seeds, pulp, peel and placenta were manually separated and then extracts with individual tomato tissues were prepared. Placenta is defined as the whitish tissue that surrounds tomato seeds, and it was isolated separately from tomato pulp and peel for these experiments. Pulp is the reddish meat once discarded the peel, seeds and placenta. In order to carry out this process, a first phase of saline extraction was required from each tomato tissue of the most commercial variety previously lyophilized, and the delipidation was carried out, following the protocol previously described with minor modifications. [Sirvent & col., 2014]. Protein concentrations were determined using the BCA method and allergenic profile of patient's sera with tomato seeds extract was done after transference into nitrocellulose membranes as previously described [Kondo & col., 2001] (**Figure 21**).



**Figure 21.** Allergenic profile of tomato allergic patients. Western Blot of tomato seed extract (25 µg) and patient's sera (dilution 1:5), C (non-atopic sera), Ex (Coomassie blue staining of 25 µg of tomato seed extract).

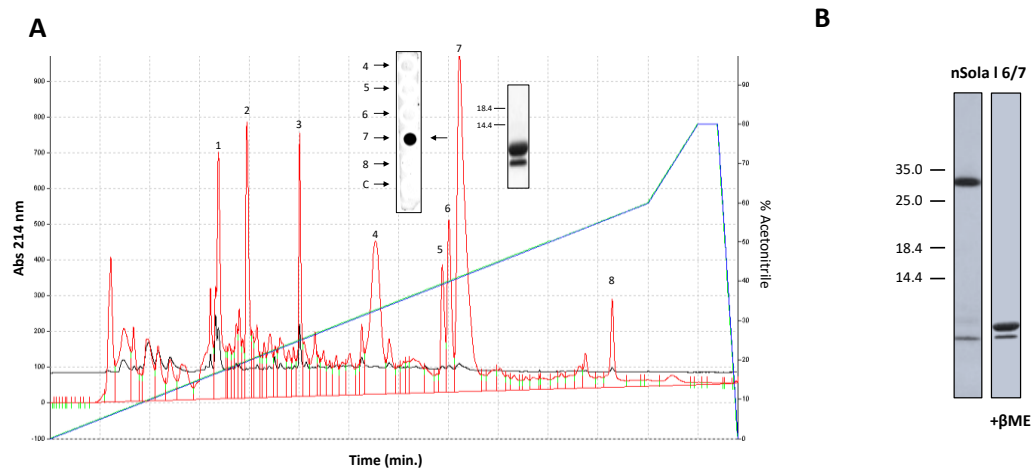
IgE binding to reactive proteins from tomato seeds extract under reducing conditions showed different patterns of IgE recognition after immunoblotting assays. Two bands of around 10 kDa were observed in 5 out of 8 patients (62.5%) with severe symptoms whereas they were only visible in one patient (16.6%) with mild ones. On the other hand, in most cases in patients with OAS, only IgE reactive bands corresponding to molecular masses between 30-50 kDa could be observed. These results suggest a correlation of low-molecular-mass proteins in tomato seeds with severe symptoms.

According to the performance of subsequent experiments, 3 pools of sera were made to each of the allergenic tomato nsLTPs:

- Pool 1 (Sola I 7 positive): 1+4+5+6+20+9+26
- Pool 2 (Sola I 6 positive): 1+4
- Pool 3 (Sola I 3 positive): 2+5+7+8+26

### 1.1. Isolation and identification of natural tomato seed nsLTPs: Sola I 6 and Sola I 7

In order to identify the nature and family to which these IgE reactive proteins belong, their purification was carried out. Tomato seed extract was undergone into an Ultrasphere reverse-phase C-18 column (RP-HPLC) with a 0.1% TFA/ACN gradient (0-60%) with a flow rate of 0.5 ml/min, generating a chromatographic profile shown in **Figure 22**. Protein elution was monitored by UV absorbance reading at 214 nm.



**Figure 22.** Purification of tomato seeds nsLTPs. **A.** Nucleosil-C18 (RP-HPLC) profile of nSola I 6 and nSola I 7 from tomato seeds, where the peak of interest is indicated in a Dot Blot and immunoblotting with a pool of sera (pool 1). **B.** SDS-PAGE and CBS of natural Sola I 6/7 (tomato seeds) under reducing and non-reducing conditions (2  $\mu$ g).

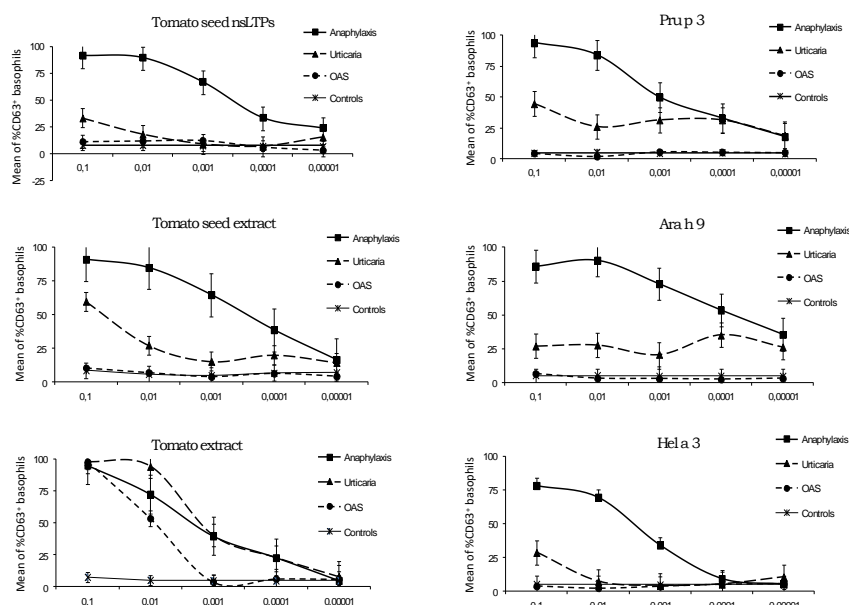
SDS-PAGE of purified nsLTPs was performed in 17% polyacrylamide gels under non-reducing and reducing conditions with  $\beta$ ME and were visualized by means of Coomassie blue staining (CBS). Under non-reducing conditions, a major band of about 30 kDa (formed by the trimer aggregation of the 10 kDa protein) and others of small size (a fainty band of 10 and 7 kDa) were observed, while after the addition of  $\beta$ ME, only two bands of 10 and 7 kDa were detected.

Both bands co-eluted at the same ACN percentage, being impossible the separation of both proteins although changing the conditions of the gradient, so these two bands obtained after SDS-PAGE fractionation in reducing conditions (10 and 7 kDa) were extracted from gels and analyzed. The EXQuest Spot Cutter (Bio-Rad) system was





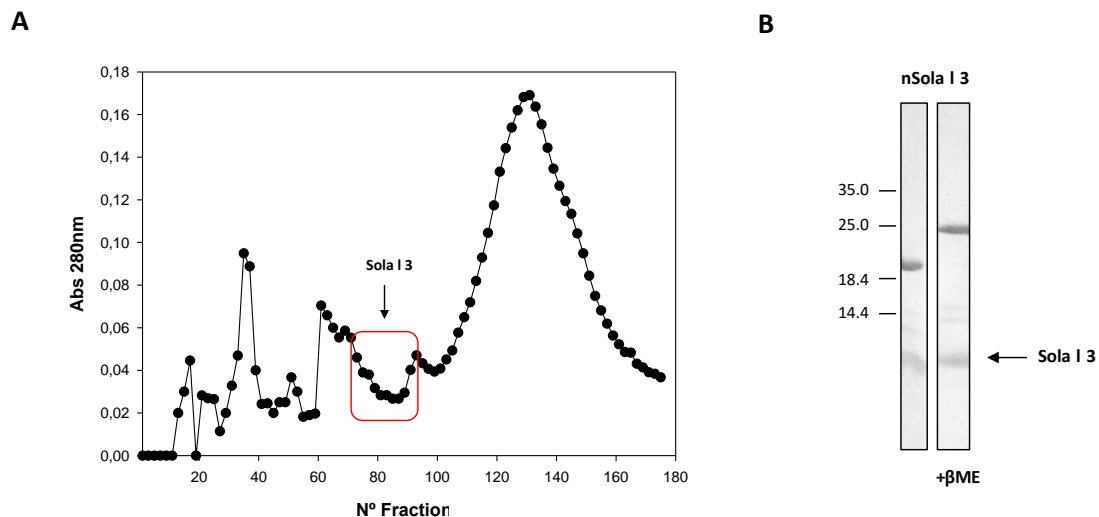
The allergenic capacity of the purified mixture of nSola I 6 and nSola I 7 obtained from tomato seeds was finally evaluated *in vivo* with SPT and *ex vivo* performing BAT (*Basophil Activation Test*) in 12 tomato allergic patients displaying different clinical symptoms (4 with anaphylaxis, 4 with urticaria and 4 with OAS). SPT was positive with whole tomato in 95.5% of cases, with tomato seed extracts in 68% and with the tomato seed nsLTPs in 50%. Controls did not show any positive result in SPT, even at the highest protein concentrations used. For BAT assays, 100  $\mu$ l of different purified nsLTPs, as tomato seeds nsLTP, Pru p 3, Ara h 9, and Hel a 3 and whole tomato and seeds extracts were added at different concentrations following a ten-fold dilution pattern as previously described [Sirvent & col., 2014]. Data showed that although either basophils of patients with severe symptoms, moderate and mild symptoms had a high reactivity with tomato extract, those with anaphylaxis had a higher level of activation with both the extract and the purified mixture of nsLTP of tomato seeds. These patients showed also reactivity and sensitivity to nsLTP from other vegetables, being very high for peach (Pru p 3) and peanut (Ara h 9), but much lower for sunflower seed (Hel a 3). It is also remarkable that the basophil sensitivity to tomato seed nsLTPs (Sola I 6 and Sola I 7), was one thousand-fold higher in patients with anaphylaxis when compared to urticaria or OAS patients (**Figure 24**).



**Figure 24.** Basophil Activation Test (BAT). Graphs represent the mean and SD of %CD63 cells from 12 representative cases of patients allergic to tomato with different clinical symptoms, Anaphylaxis (N=4), Urticaria (N=4) and OAS (N=4) and Controls (N=6).

## 1.2. Isolation of natural tomato peel nsLTP: Sola I 3

Once the allergenicity of tomato seeds nsLTPs was confirmed and in order to approach a more complete study of their implication in tomato allergy comparing with the other allergenic nsLTP described in pulp and peel, natural Sola I 3 was purified. The enriched fraction of nSola I 3 was obtained with an exclusion size chromatography in Sephadex G-50 *superfine*, whose eluted fractions were directly subjected to SDS-PAGE and stained with CBS. With this chromatographic step, pigments as well as other minor proteins were partially eliminated. Protein elution was monitored by UV absorbance at 280 and afterwards a SDS-PAGE with 17% polyacrylamide gels under reducing and non-reducing conditions with  $\beta$ ME. CBS of the fraction enriched in Sola I 3 showed bands between 10 and 20 kDa (**Figure 25**).



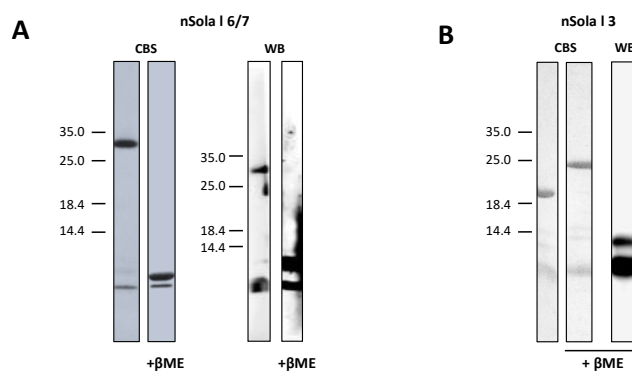
**Figure 25.** Purification of tomato peel nsLTP. **A.** Chromatographic elution profile in Sephadex G-50 *superfine* of nSola I 3 from tomato peel extract. **B.** SDS-PAGE and CBS of natural form of Sola I 3 (tomato peel) under reducing and non-reducing conditions (2  $\mu$ g).

## 2. PROTEIN CHARACTERIZATION OF ALLERGENIC nsLTP INVOLVED IN TOMATO ALLERGY

### 2.1. Molecular characterization

MS analysis of the mixture of both nsLTPs in the presence of  $\beta$ ME purified from HPLC, rendered two peaks corresponding to polypeptides with molecular masses of 9416.5 and 7023.7 Da, which matched well with the theoretical masses of the predicted

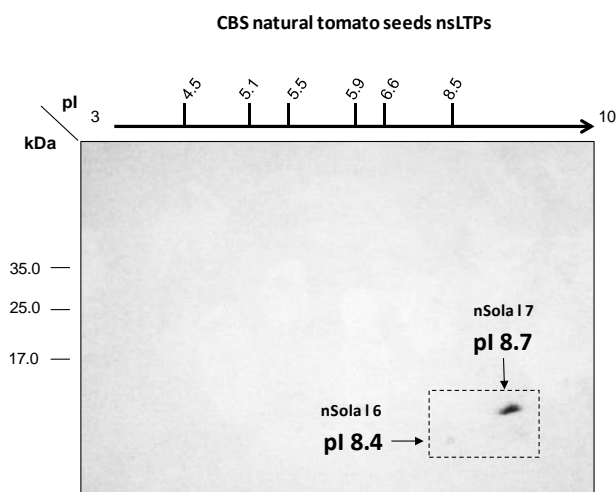
proteins from the GenBank databases. Samples were treated with  $\beta$ ME and heated during 20 min at 90 °C, and after SDS-PAGE, an immunodetection with a pool of sera (pool 1-3, pag. 126) reactive to these allergens was performed. The reducing treatment produced a decrease in the electrophoretic mobility of the trimeric form of Sola I 7, which would indicate a change in the tertiary structure of the protein, due to the rupture of the bonds between the monomers of about 10 kDa detected by MS analysis. On the contrary, both Sola I 6 and Sola I 3 showed no changes in terms of aggregation but exhibited slight electrophoretic mobility change probably due to the disruption of disulfide bridges (**Figure 26**).



**Figure 26.** CBS and Immunoblotting of tomato nsLTPs under reducing ( $\beta$ ME) and non-reducing conditions. **A.** nSola I 6 and nSola I 7 (2  $\mu$ g). **B.** Fraction enriched in nSola I 3 (2  $\mu$ g).

Inter- and intramolecular disulphide bridges of this type of proteins maintain their three-dimensional structure so when structure disturbances occur, caused by heat or other chemical agents, the changes are often reversible recovering again the original structure. Important allergens such as nsLTPs or 2S albumins present a high number of disulphide bridges (at least 4), closely related to their structural stability.

In order to better understand some of the molecular parameters of these new allergens in tomato seeds, natural tomato seed nsLTPs were subjected to two-dimensional electrophoresis (2D SDS-PAGE) and its pI of Sola I 6 and Sola I 7 were determined experimentally and compared with the expected pI values, which are 8.7 and 7.8, respectively. The spots corresponding to the allergens were visualized by CBS (Figure 27).



**Figure 27.** 2D SDS-PAGE of natural tomato seed nsLTPs (5  $\mu$ g). The molecular mass (kDa) and isoelectric point (pI) markers are indicated, as well as the identification of each spot corresponding to the nsLTPs described (Sola I 6 and Sola I 7).

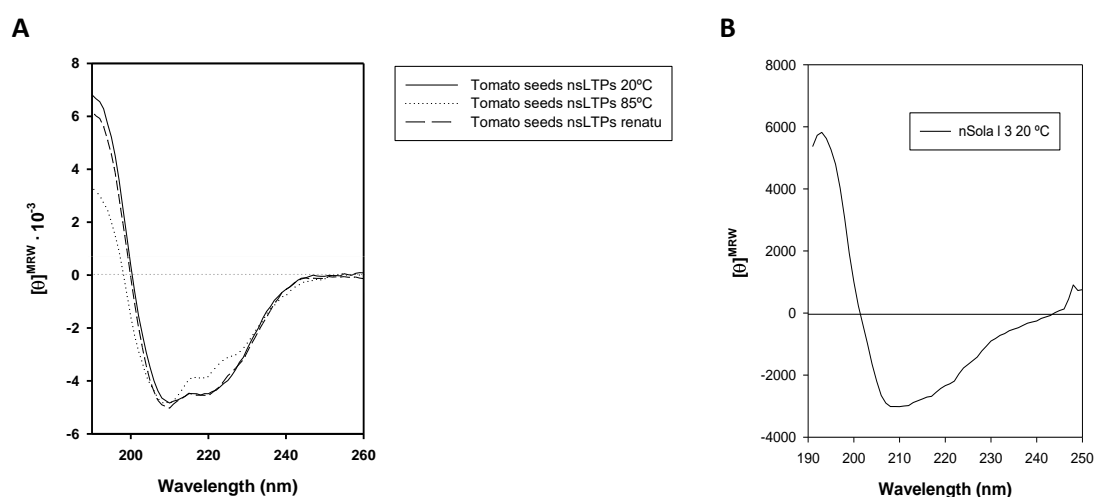
In the 2D SDS-PAGE experiments are observed spots that matched with the sizes and pIs theoretically determined for these allergens. In this way, two main ones around 10 and 8 kDa (a faint spot) and 8.7 and 8.4, corresponding to the monomers of Sola I 7 and Sola I 6, respectively were visualized. The experimental isoelectric points are very similar to the theoretical ones. These results are consistent with data from other nsLTPs described with basic isoelectric points, mostly with pH >7 [Zaman & col., 2009].

## 2.2. Spectroscopy characterization

The secondary structure of the purified mixture containing the two allergenic nsLTPs from tomato seeds and the natural Sola I 3 enriched fraction were spectroscopically analysed by means of CD in the far UV (Figure 28). As can be seen in the figure, the spectrum of the mixture of both tomato seeds nsLTPs shows two minima of 208 nm and 220 nm and Sola I 3 a minimum at 208 nm, with a characteristic profile according to the  $\alpha$ -helix enriched motif of the members of this protein family.

After thermal denaturation of tomato seeds nsLTPs, a decrease in the molar ellipticity at 220 nm is observed. However, this slight loss is fully recovered when sample

was returning to the initial temperature (20 °C). These data are consistent with the characteristic CD spectra published for the three-dimensional structures of these proteins [Pasquato & col., 2006]. The CD spectra at 25 °C of pear nsLTP, Pyr c 3 reported by Ramazzina & col., 2012, show the two characteristic negative minima at about 208 and 220 nm, typical of proteins containing a significant extent of  $\alpha$ -helical structure. In this protein, by increasing the temperature from 25 to 105 °C, the proteins underwent a quickly denaturation in the range 75-95 °C as revealed by the extent of spectral change at 220 nm. In other hand, nsLTP from peach also exhibited a higher stability, with small changes in the CD spectrum when measured up to 85 °C.



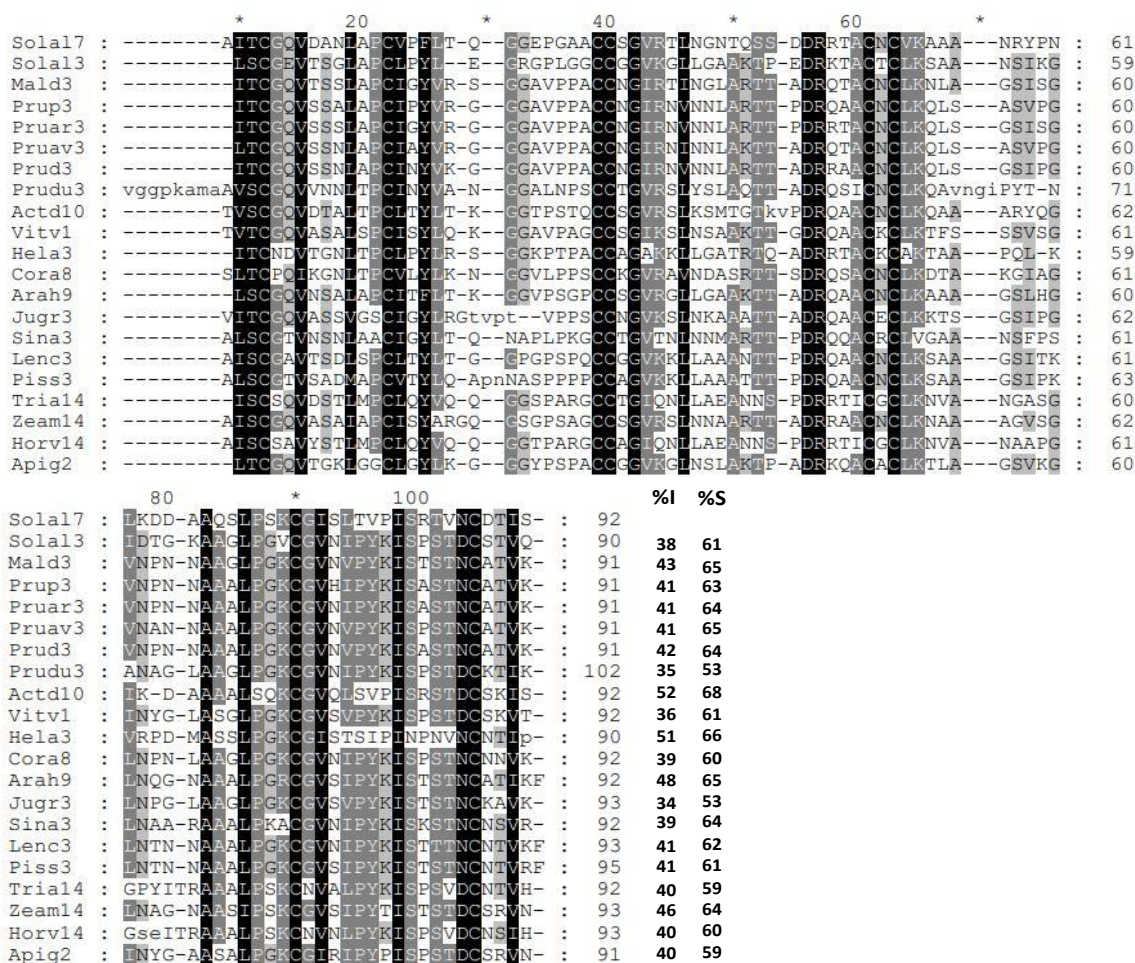
**Figure 28. (A).** Spectroscopic characterization of nSola I 6 and nSola I 7. CD spectrum in far UV at 20 °C; after a thermal denaturation process at 80 °C; and recovery at 20 °C (renaturalization). **(B).** Spectroscopic characterization of nSola I 3 in far UV at 20 °C.

In order to study the thermal stability of nSola I 6 and nSola I 7, their  $T_m$  was determined by registering changes in the protein molar ellipticity at 208 nm by increasing the temperature from 20 to 80 °C. The denaturation curve obtained did not present changes throughout the temperature range studied, which corresponds to a thermostable protein, as expected. In spite of not having been able to test the secondary structure stability of tomato seeds allergens at temperatures higher than 80 °C, results based on other proteins of this family described show nsLTPs  $T_m$  up to 90 °C.

### 3. CROSS-REACTIVITY ASSOCIATED WITH TOMATO nsLTP

The sequences of tomato nsLTP1, Sola l 7 was compared with those of other lipid transfer proteins Class 1, including Sola l 3 from tomato peel, and from several allergenic vegetable sources such as fruits, vegetables, nuts or seeds, all described as allergens.

Sola l 7 presents, in constrast to what was described in the pulp and peel of the same fruit, higher percentages of sequence identity with the nsLTP from kiwi seeds (Act d 10) (52%) [Bernardi & col., 2011], sunflower seeds (Hela 3) (51%) [Ukleja-Sokołowska & col., 2016] and, peanut (Ara h 9) (48%). On the contrary, with the tomato peel and pulp nsLTP1 Sola l 3 presents significantly lower sequence identity percentages (38%), similar to those obtained with nsLTPs from walnut (Jug r 3) (34%) and grape seeds (Vit v 1) (36%) (Figure 29).

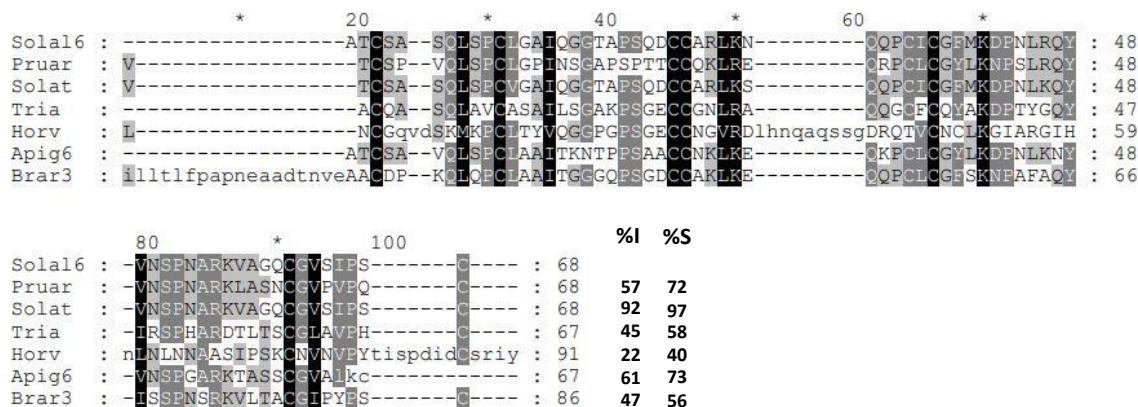


**Figure 29.** Comparison of amino acid sequences of allergenic nsLTP1. Alignment of Sola l 7 with nsLTP1 from *Solanum lycopersicum* (Sola l 3, AAB42069), *Malus domestica* (Mal d 3, AAT80633), *Prunus persica* (Pru p 3, CAB96876), *Prunus armeniaca* (Pru ar 3, P81651), *Prunus avium* (Pru av 3, AAF26449), *Prunus domestica* (Pru d 3, P82534), *Prunus dulcis* (Pru du 3, ACN11576), *Actinidia*

*deliciosa* (Act d 10, P86137), *Vitis vinifera* (Vit v 1, AAO33394), *Helianthus annuus* (Hel a 3, AAP47226), *Corylus avellana* (Cor a 8, AAK28533), *Arachis hypogaea* (Ara h 9, ABX56711), *Juglans regia* (Jug r 3, ACI47547), *Sinapis alba* (Sin a 3, ABU95411), *Lens culinaris* (Len c 3, AAX35807), *Pisum sativum* (Pis s 3, AJG44053), *Triticum aestivum* (Tri a 14, CAY54133), *Zea mays* (Zea m 14, AAA33493), *Hordeum vulgare* (Hor v 14) and *Apium graveolens* (Api g 2, ACV04796). Dashes indicate gaps; *black shading* conserved residues in all sequences; *dark grey* conserved residues in at least 18 and *light grey* conserved residues in at least 13. Identity percentages (%) and similarity (%S) with Sola l 7 are indicated.

The alignment of the same protein sequences compared to Sola l 3 revealed a high identity with the nsLTP sequence of lentils (Len c 3) (62%) [Akkerdaas & col., 2012], as well as with peanut protein (Ara h 9) (60%) [Krause & col., 2009] and celery (Api g 2) (61%) [Gadermaier & col., 2011].

Certain nsLTP2 are identified as proteins in the PubMed database, however, most of them have not been described as allergens. In this sense, the alignment of Sola l 6, the allergenic tomato seed nsLTP2, with other nsLTP shows high identity with that of potato (Sola t 7 kDa) (92%), in celery (Api g 6) (61%) [Vejvar & col., 2013] and in apricot (Pru ar 7 kDa) (57%) are the ones with the highest identity percentages, while the one described in barley (Hor v 7 kDa) (22%) is the least similar (**Figure 30**).



**Figure 30.** Comparison of amino acid sequences of nsLTP2 proteins. Alignment of Sola l 6 with nsLTP2 described from *Prunus armeniaca* (Pru ar 7 kDa), *Solanum tuberosum* (Sola t 7 kDa), *Triticum aestivum* (Tri a 7 kDa), *Hordeum vulgare* (Hor v 7 kDa), the allergenic *Apium graveolens* (Api g 6, P86809) and *Brassica rapa* (Bra r 3). Dashes indicate gaps; *black shading* conserved residues in all sequences; *dark grey* conserved residues in at least 18 and *light grey* conserved residues in at least 13. Identity (%) and similarity (%S) percentages with Sola l 6 are indicated.

The signal peptide of the nsLTPs compared in **figures 29-30** are not shown in the aligned sequences, since only the amino acids corresponding to mature protein sequences have been included. All of them conserved the eight cysteines widely preserved in order to confer the compact character of these proteins.

The three nsLTP identified in tomato tissues have significant differences in primary structure because that one described in pulp and peel, Sola I 3, displays a very low amino acid identity degree reaching barely 38% and 22%, with those present in seeds, Sola I 7 and Sola I 6, respectively. The involvement of the allergenic nsLTPs from tomato fruit in cross-reactivity processes with other vegetable foods such as fruits from the *Rosaceae* family or even a material like latex, adds more complexity to the diagnosis of this food allergy [Tordesillas & col., 2011, Asero, 2011b]. nsLTPs are indeed considered important panallergens [Hauser & col., 2010, Asero & col., 2011a] in which the analysis of the primary structure alignment of the natural tomato nsLTPs purified and different extracts as foodstuffs, such as fruits, nuts, or seeds is very important to be able to predict possible clinical implications. Considering that the currently known tomato allergens have been exclusively described in pulp or peel, together with the fact that seeds are commonly ingested with the pulp but correspond to a small percentage of the whole fruit, we here propose that Sola I 6 and Sola I 7 are key allergens, now described, which may be masked in the context of tomato IgE sensitization. This current identification is undoubtedly going to clarify the diagnosis of tomato allergy.

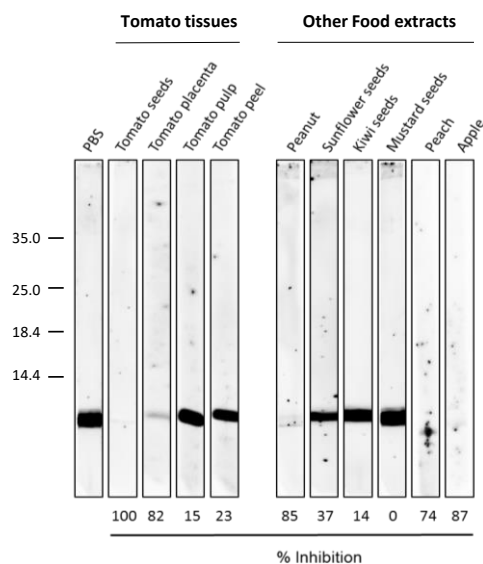
The possibility of obtaining these relevant and novel natural-tomato allergens is of great interest, since recombinant allergens in clinical diagnosis, although they are being of great use in *in vitro* diagnosis, present a serious problem in their use for *in vivo* diagnosis and therapeutic, as the regulation limits their use, not being able to use recombinant proteins in skin prick tests.

### **3.1. *In vitro* IgE cross reactivity of natural allergens Sola I 6 and Sola I 7 from tomato seed**

After analysing possible cross-reactivity relationships with other nsLTPs from plant sources considering the similarities of their amino acid sequences, some immunoblotting inhibition assays were performed. For this experiments, 1 µg of purified tomato seed proteins were assayed with a pool of seven sera (pool 1 pag. 126) (diluted 1:5) previously incubated with 300 µg (2 µg/µl) of extracts from tomato tissues (seeds, placenta, pulp, and peel) and peanut, sunflower, kiwi, and mustard seeds, peach, and apple extracts, used as inhibitors (**Figure 31**). Not surprisingly, IgE binding was completely inhibited with the tomato seeds extract. Placenta tissue produced inhibition



of about 82%, while, neither pulp nor peel extracts were able to significantly inhibit IgE binding. On the other hand, peanut, peach and apple almost completely inhibited IgE binding to the purified proteins, suggesting the existence in these extracts of proteins displaying strong cross-reactivity. Finally, whereas sunflower or kiwi seed extracts only showed partial inhibition, mustard seeds extract was completely non-reactive.



**Figure 31.** Immunoblotting inhibition of natural tomato seeds allergens with extracts from tomato seeds, tomato placenta, peanut, sunflower and mustard seeds used as inhibitors.

These results perfectly match with the alignments previously indicated for the major allergen of tomato seeds, Sola l 7. Thus, peanut, peach and apple nsLTP1 identified as Ara h 9, Pru p 3 and Mal d 3, have 48, 41 and 43% of identity and 85, 78 and 87% inhibition, respectively. However, sunflower seeds Hel a 3, which shows 51% of identity in its primary structure, presents a 37% of inhibition and the same is shown in the case of kiwi seeds nsLTP Act d 10, with an identity sequence of 52% and only an inhibition of 14%. These discrepancies in inhibition percentages, may be due to the differences in the allergen content within the food extract. On the other hand, mustard nsLTP, Sin a 3, shows a low percentage of sequence identity 39%, not seeing cross reactivity in *in vitro* assays.

Finally, despite the fact that the chemical nature of the amino acids are maintained to adopt the tertiary structure of these nsLTP1 proteins, with identity percentage of 38%, is not sufficient to have a significant cross-reactivity inhibition (with a maximum of 23% in tomato peel).

## **CHAPTER II: Recombinant production of tomato nsLTPs, Sola I 3, Sola I 6 and Sola I 7. 3D structure by Nuclear Magnetic Resonance (NMR).**

---

Over the past few years, allergens from various biological sources including pollens, foods, house dust mites, cockroaches, insect venoms, latex, moulds and fungi have been cloned from their specific cDNA. This was obtained from total or partial amino acid sequence information available [Arruda & col., 2001; Lorenz & col., 2001; Kurup & col., 2002; Müller, 2002; Andersson & col., 2003; Wopfner & col., 2005]. For the establishment of molecule-based diagnosis, most clinically relevant allergens are now available as well-characterized recombinant proteins that can be obtained in large quantities without batch-to-batch variations [Valenta & col., 1999b; Chapman & col., 2000; Wallner & col., 2004]. The use of purified recombinant allergens offers the best prospect for a rational and accurate allergy diagnosis where the component-resolved diagnosis (CRD), utilizing single molecules for serological testing, allows the analysis of sensitization profiles across geographical regions or within selected patient population, age or severity of symptoms [Steckelbroeck & col., 2008].

Moreover, the development of recombinant allergen-based allergy vaccines is an emerging strategy for the diagnosis and immunotherapy of type I allergic disorders [Bhalla, 2003; Bhalla & col., 2004], developing novel molecular products to be used in allergen-specific immunotherapy (SIT) [Ferreira & col., 2004; Wallner & col., 2007]. In this approach, pure and standardized recombinant allergens, cocktails of them, or IgE-binding epitopes of an allergen can be formulated to replace natural extracts.

These extracts are difficult to standardize regarding their allergenic content because, as it is reported by Sirvent & col., 2014 and Martin-Pedraza & col., 2016, several allergens may be misrepresented due to the low proportion of tissue in which they are found with respect to the rest of the fruit, for example in seeds. Furthermore, extract-based diagnosis allows the identification of allergenic sources but not of individual allergenic molecules [Pauli, 2000]. The use of recombinant proteins is necessary considering the low yield of certain allergens obtained from natural sources, and natural proteins with very similar molecular properties can elute together in the purification process, making diagnosis difficult.

Various heterologous systems for production of recombinant allergens have been used including *E. coli* bacteria, *P. pastoris* yeast, insect cells, mammalian cells, and plants. Focusing in nsLTPs production, initially, *E. coli* was used for the production of Pari j 1 from *Parietaria* pollen [Duro & col., 1997], Pru v 1 and 4 from cherry [Scheurer & col., 2001] and Sola l 3 from tomato [Le & col., 2006a]. However, the major disadvantage of using bacterial expression systems is the production of insoluble proteins forming inclusion bodies, which require solubilization with strong chaotropic agents followed by gradual refolding to obtain, sometimes unsuccessfully, functionally active protein. To overcome these problems, some of new bacterial host strains like *E. coli* Origami, facilitate formation of disulphide bonds even in reducing environment of the bacteria cytoplasm due to mutations of glutathione and thioredoxin reductases and offer higher protein yields by minimizing proteolytic degradation [Singh & col., 2006; Lauber & col., 2001]. With this system, proteins are frequently expressed as fusion-proteins to favour subsequent purification and to enhance their solubility, although the cleavage of the fusion peptide by specific proteases is often incomplete or unspecific, leading sometimes to fragmentation of the protein [Schmidt & col., 2002].

However, since IgE reactivity in most allergens is determined by both conformational and linear epitopes, the application of correctly folded molecules is essential to enable an optimal diagnostic value. As an alternative to *E. coli*, the yeast *P. pastoris* presents many of the advantages of eukaryotic organism expression systems, such as protein processing, disulphide bridge formation and some post-translational modifications, and it is also an easily manipulated system such as those based on *E. coli* or *S. cerevisiae*, but unlike the latter, this yeast strain avoids problems of hyperglycosylation at consensus sites. Only disulphide bonds out of other post-translational modifications have been described in nsLTP. Due to the complexity in their tertiary structure, with 4 or 5 disulphide bonds, numerous recombinant proteins of the nsLTPs family have been produced in *P. pastoris*, showing an immunological activity equivalent to the natural forms, constituting a very useful tool for diagnosis. Taking a step forward, as well as some allergenic nsLTPs from ragweed [Hiller & col., 1998], orange [Ahrazem & col., 2005], strawberry [Zuidmeer & col., 2006], apple and peach [Diaz-Perales & col., 2002], wheat [Klein & col., 1998; Safi & col., 2019], carrot [Asero &

col., 2000] and hazelnut [Lauer & col., 2008] have produced, no nsLTP of tomato has been produced in an appropriate recombinant form so far.

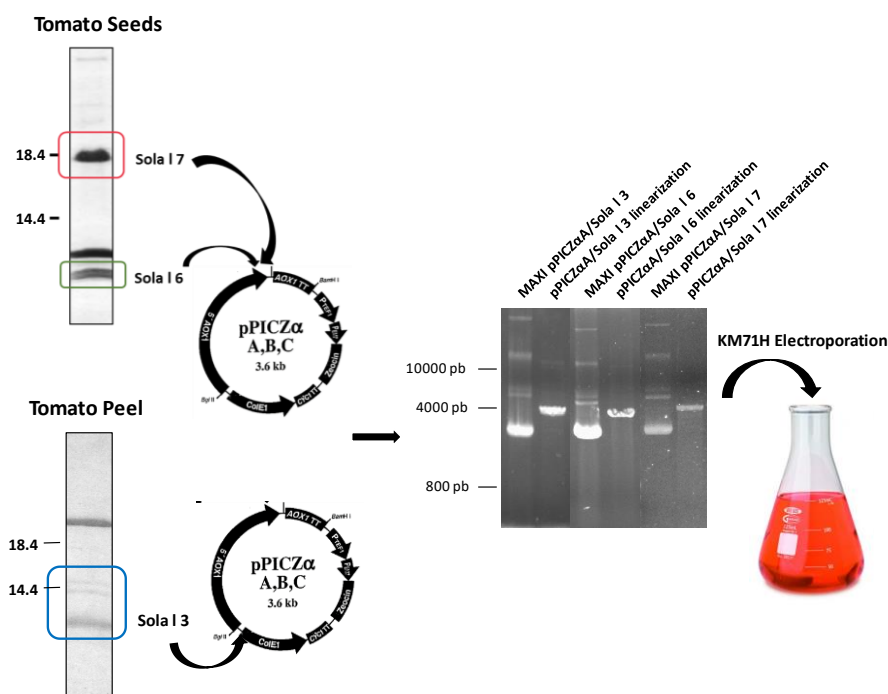
Before their clinical use, purified recombinant allergens should be carefully investigated for their biochemical, biophysical and immunological properties. Ideally, recombinant products should be fully characterized and their properties compared to the natural counterparts [Cromwell & col., 2004; van Ree, 2003; van Ree, 2004]. A critical aspect in the characterization concerns physicochemical properties of the molecules, since their production by heterologous systems might result in modifications leading to changes in their immunological properties. In general, physicochemical parameters are considered important for the characterization of protein preparations such as: a) primary sequence, b) purity, c) homogeneity, in which the recombinant preparation must be homogenous with respect to the molecular weight and/or comparable to the natural allergen and d) structure, the recombinant allergen must contain correctly folded protein [Ferreira & col., 2006].

*P. pastoris* presents the advantages of the enhancement of the expression level, the capability to introduce post-translational modifications, and depending on the chosen signal peptides, the secretion of the target protein into the supernatant of the culture [Schmidt & col., 2002]. For these reasons, it was chosen for the recombinant production of tomato allergens, both peel and seeds, Sola I 3, Sola I 6 and Sola I 7. In this way, we can separately analyse the allergenic potential of the two allergenic tomato seeds nsLTPs and possible cross-reactivity between themselves and with other allergens and their allergenic capacity compared with the major LTP from pulp and peel.

## 1. RECOMBINANT PRODUCTION OF Sola I 3, Sola I 6 AND Sola I 7 IN *P. pastoris*

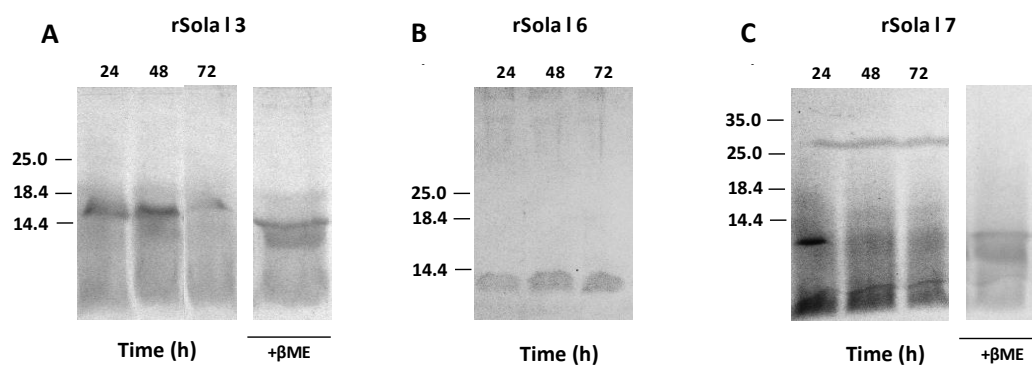
### 1.1. Cloning and *P. pastoris* expression of tomato nsLTPs

In order to obtain transforming colonies of KM71H cells with pPICZαA/Sola I 3, pPICZαA/Sola I 6 and pPICZαA/Sola I 7 constructions, the procedure indicated in Materials & Methods was followed and summarized in **Figure 32**, selecting them in YPDS medium in the presence of the antibiotic zeocin. These colonies present a Mut<sup>s</sup> phenotype, meaning a slow growth in methanol caused by the interruption of the AOX1 gene when the selected DNA is inserted. The colonies were tested for the expression of proteins taking samples at different times (24, 48 and 72 h) and the level of expression in the extracellular medium was analysed after cell sedimentation both with and without the presence of the reducing agent (βME), achieving maximum production after 72 hours of induction with methanol in the three cases. The colony with the highest yield and the lowest degradation was selected (**Figure 33**).



**Figure 32. Cloning scheme of tomato nsLTPs with pPICZαA plasmid.** 0.8% agarose gel showing DNA purification bands after the MAXIpreps and their respective linearization with *BSTXI* and precipitation with the chloroform/isoamyl alcohol method for electroporation in *P. pastoris* KM71H cells. The linearization of all pPICZαA constructions exhibit bands of around 3900 pb.

Bands observed in the agarose gel after the linearization and precipitation of the different constructions of pPICZ $\alpha$ A, show a molecular mass of around 3900 bp, being precisely of 3930 bp, 3856 bp and 3913 bp, corresponding to rSola I 3, rSola I 6 and rSola I 7, respectively.



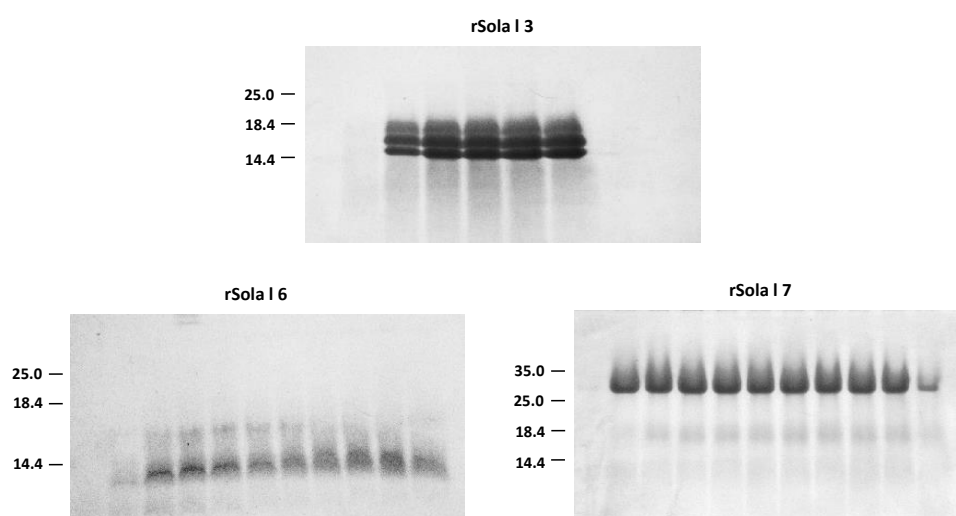
**Figure 33.** Timing expression of rSola I 3, rSola I 6 and rSola I 7 every 24 h until 72 h of induction in KM71H cells. **A.** Timing of rSola I 3, **B.** rSola I 6 and **C.** rSola I 7 expression, all of them under reducing and non-reducing conditions ( $\beta$ ME).

According to this figure, in the SDS-PAGE analysis of the expression of rSola I 3, bands between 14 and 18 kDa are observed under non-reducing conditions with no increase in band intensity, while a band of about 14 kDa under the presence of  $\beta$ ME is shown. In the case of the expression of the nsLTPs proteins from tomato seeds, a single band of about 10 kDa is detected for rSola I 6 and in the production of rSola I 7 a high intense band around 30 kDa is observed as well as others of smaller size (20 and 10 kDa), while under reducing conditions, a single band of 10 kDa is detected. This agree with the aggregation states of the natural form of Sola I 7. All these results are consistent with the molecular masses of natural proteins.

## 1.2. Purification of the recombinant tomato nsLTPs

The purification of the recombinant forms of these tomato nsLTPs was carried out by means of three consecutive chromatographic steps. After dialysis of the extracellular medium against 20 mM BA in membranes with a pore size of 3.5 kDa during 16 hours and subsequent centrifugation, the purification took place. Because these three proteins present a basic pI around 9, and they had been recombinantly produced in rich BMMY medium, where pigments and other contaminants have to be removed,

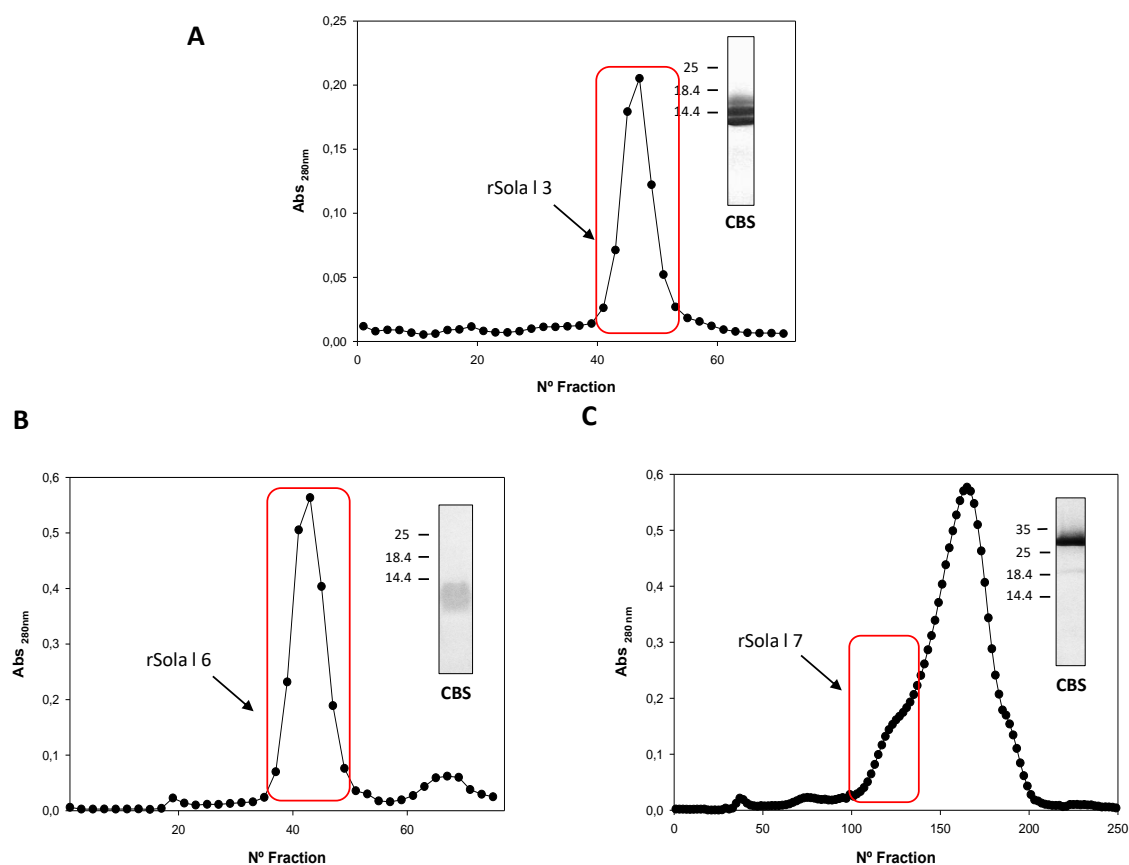
supernatants were applied in an anion-exchange column DEAE-cellulose previously equilibrated in 20 mM BA pH 8.9, and subjected to a gradient from 20 mM to 0.5 M of the same buffer. Tomato allergens eluted into the exclusion volume, and pigments and nucleic acids derived from yeast were retained into the resin column. Recombinant proteins were detected after SDS-PAGE and CBS of the eluted fractions in the exclusion volume as shown in the **Figure 34** and those containing the recombinant protein were pooled and lyophilized in batches.



**Figure 34.** SDS-PAGE and CBS of the fractions eluted in the exclusion volume of the first chromatographic stage on DEAE-cellulose for the three nsLTPs.

In this phase, yields of approximately 13 mg of rSola I 3, 8 mg of rSola I 6 and 28 mg of rSola I 7 were obtained per litre of culture medium. Although there are not many data about yields in the production of recombinant proteins in *P. pastoris*, compared to other yields for olive pollen recombinant proteins such as olive thaumatin-like protein rOle e 13 (5 mg/litre) [Torres & col., 2014], it can be concluded that these nsLTPs from tomato peel and seeds have been obtained with an optimal yield.

For the second purification step, different types of exclusion size chromatography were carried out depending on the molecular mass of each allergen. Thus, for the purification of rSola I 3 and rSola I 6, the lyophilized proteins were applied to a Sephadex G-50 *Superfine* column equilibrated in 0.15 M of BA (**Figure 35A and B**). Finally, rSola I 7 was loaded in a Sephadex G-75 column in 0.2 M ammonium bicarbonate and at a flow rate of 1 ml/min (**Figure 35C**).



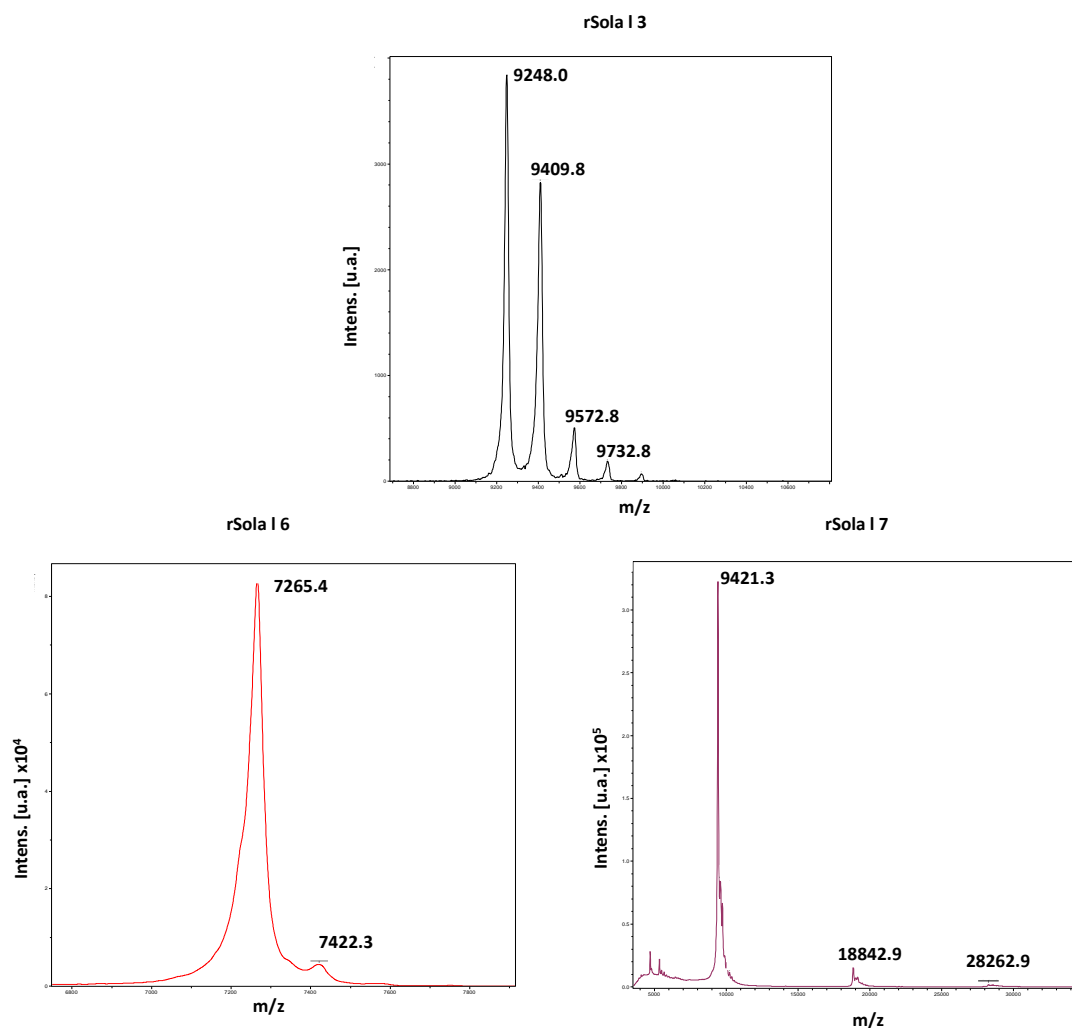
**Figure 35.** Second purification step of the allergenic tomato nsLTps and analysis in SDS-PAGE with CBS of the resulting fractions. **A.** Chromatographic profiles of rSola I 3 in Sephadex G-50 *Superfine* and **B.** rSola I 6, and **C.** Sephadex G-75 chromatographic profile for rSola I 7.

Finally, in order to obtain homogeneous allergenic proteins, a final purification step was carried out using a chromatography RP-HPLC with a Nucleosyl-C18 column, applying an ACN gradient from 0 to 60%. All tomato nsLTps in this study eluted at ACN percentages around 30%.



### 1.3. Molecular characterization of rSola I 3, rSola I 6 and rSola I 7

MS analyses of these recombinant nsLTPs were performed, rendering several peaks corresponding to a trimer in the case of Sola I 7 with 28,262 Da, a dimer of 18,842 Da and a monomer of 9,421 Da; a monomer for Sola I 6 with a mass of 7,265 Da. According to Sola I 3 a major peak of 9,248 Da was observed (**Figure 36**).

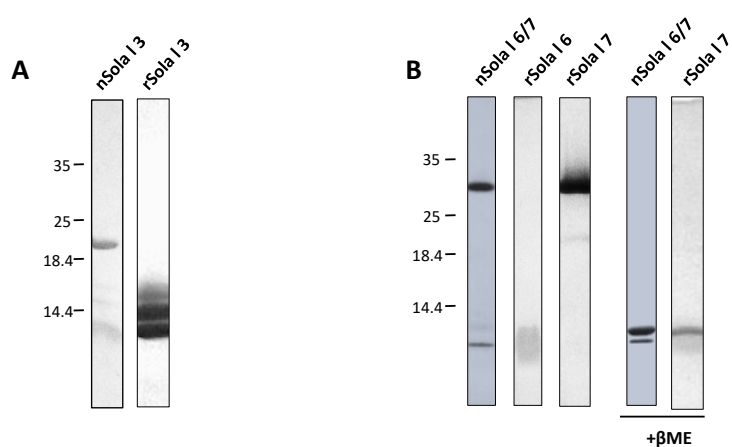


**Figure 36.** Mass spectrometry analysis of rSola I 3, rSola I 6 and rSola I 7. u.a, arbitrary units. m/z, mass/load ratio.

Besides, the N-terminal end sequences of all recombinant proteins were analysed by Edman degradation. The amino acid sequences of rSola I 3 and rSola I 7 match perfectly with those natural forms, present in the databases with reference numbers AAB42069 and NP\_001316123, respectively. However, the N-terminal of the rSola I 6 amino acid sequence exhibited four extra amino acids, probably as a consequence of an N-terminal incorrect internal processing by the yeast endopeptidases, a fact that has been previously documented for other proteins [Faus, 2000]. Thus, the increase in

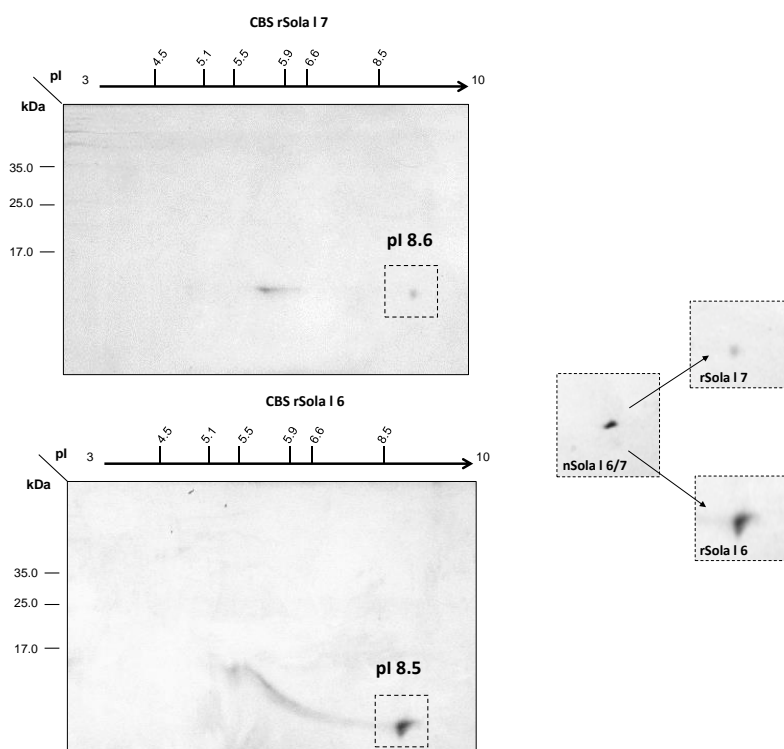
molecular mass of the peak, with respect to the theoretical molecular mass is adjusted with a difference of 228.2 Da corresponding to extra residues.

Bands shown in the mixture of natural nsLTPs of tomato seeds in SDS-PAGE coincide with the results of rSola I 7 mass spectrometry, where it can be concluded that this allergen is associated both in the natural and recombinant form, into a trimer form and a dimer, although most of this protein is in the monomer form. Thus, when Sola I 7 is subjected under reducing conditions, only a band around 10 kDa is detected (**Figure 37B**). Finally, in relation to rSola I 3, several peaks between 9 and 9.5 kDa are shown, perfectly agreeing with the different bands observed in acrylamide gels (**Figure 37A**).



**Figure 37.** SDS-PAGE and CBS analysis of natural and recombinant tomato nsLTPs.

In order to better understand some of the molecular parameters of these proteins, and compare them with their natural forms, recombinant and natural tomato seeds nsLTPs (Class1 and Class 2) were subjected to 2D electrophoresis and their pIs were determined experimentally in comparison with those of proteins purified from the natural tomato seeds (**Figure 38**). The dots were visualized by means of CBS. The comparison between natural and recombinant form of tomato peel nsLTP, Sola I 3, could not be evaluated because only an enriched form of the natural Sola I 3 was handled.

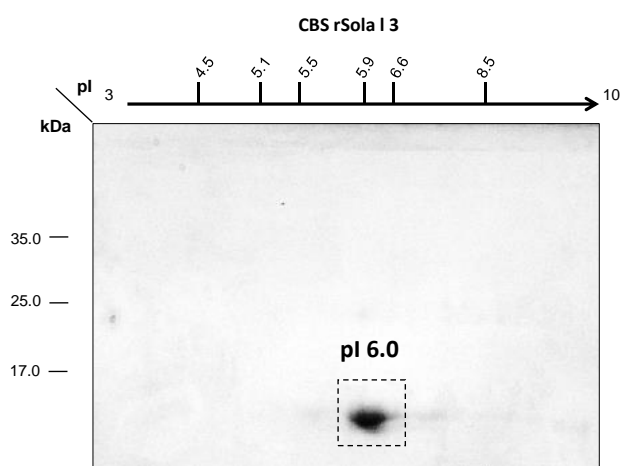


**Figure 38.** 2D SDS-PAGE of Sola I 6 and Sola I 7 (n/r). Both molecular mass markers (kDa) and pI markers are indicated, as well as a magnification of the main spots in each case.

According to the 2D SDS-PAGE analyses of the mixture of the natural forms of tomato seed nsLTPs, two spots were mainly observed, with basic pI and presented in Chapter I. After the purification of the recombinant forms of Sola I 6 and Sola I 7, a single spot is observed for each protein, matching both in electrophoretic mobility and in pI with the natural forms of these allergens.

Recombinant Sola I 6 exhibit a pI 8.5, comparing with the experimentally natural one of 8.4. Due to the extra residues incorporated in this allergen in its N-terminal, the theoretical pI incorporating these modifications decreases from 8.7 to 8.3, adjusting more to those experimentally obtained with the recombinant counterpart.

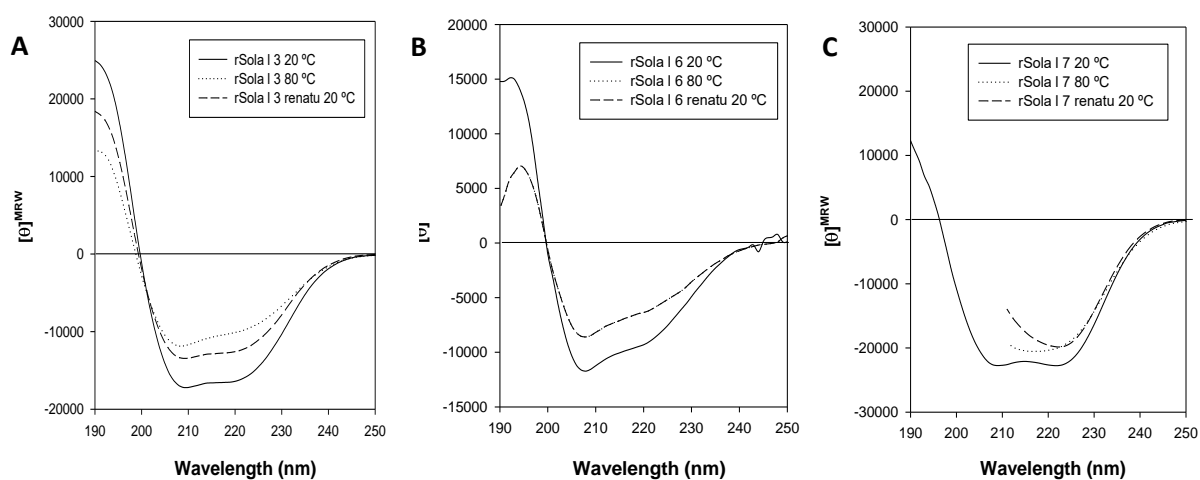
Regarding molecular parameters of the rSola I 3, after the analysis of its 2D SDS-PAGE shown in **Figure 39**, a single spot with a acidic pI of 6.0 is observed, which disagrees with the theoretical pI according to its amino acid sequence of 8.5. Although most nsLTPs are characterized for having a basic pI 7.5-12 [Nawrot & col., 2017; Offermann & col., 2015], the sequence of this recombinant form was again confirmed and corresponded to that submitted in the databases with no increase or decrease in the number of amino acids, as was determined by MS/MS.



**Figure 39.** 2D SDS-PAGE of rSola I 3. Both molecular mass markers (kDa) and pI markers are indicated.

#### 1.4. Spectroscopy characterization

. The content in secondary structure of purified recombinant proteins were spectroscopically determined and compared with the natural form of each allergen (**Figure 40**).



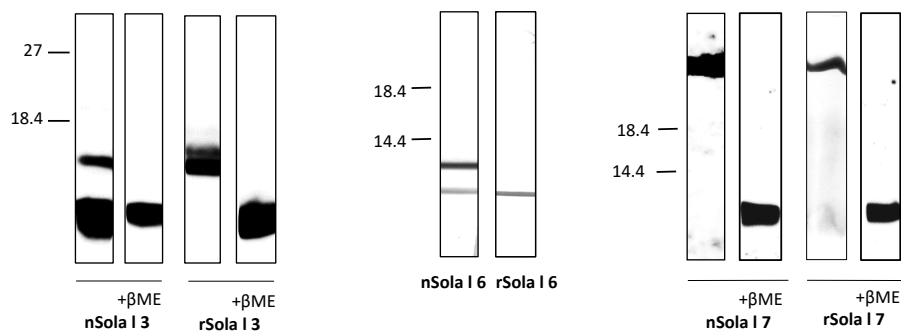
**Figure 40.** Spectroscopic characterization of rSola I 3, rSola I 6 and rSola I 7. **A.** CD spectra of rSola I 3 at 20 °C, 80 °C and after recovery at 20 °C (renatu 20 °C), and the same for rSola I 6 (**B**) and rSola I 7 (**C**).

As shown in the previous figure, all presented the typical characteristics of  $\alpha$  helix-enriched proteins as nsLTPs are [Pasquato & col., 2006; Lin & col., 2005] with the typical secondary structure with two minima, clearly marked at 208 and 220 nm.

For all proteins loss of molar ellipticity per residue after heating up to 80 °C, is almost negligible, due to a higher concentration in the cell by the possible partial evaporation of the solvent, observing that rSola I 6 (**Figure 40B**) is the nsLTP with the lowest molar ellipticity per residue. In all cases, allergenic nsLTPs recover almost their secondary structure and are stable until 80 °C. In the case of rSola I 7 (**Figure 40C**), the CD is only represented up to 210 nm since this protein is mostly trimeric, tending to naturally associate, so when the temperature increases and the buffer evaporates, the turbidity of the medium increases, expanding the apparent absorption and, therefore, stopping the photomultiplier to measure. If we eliminate the region of the erroneous spectrum, it can be concluded that the seed nsLTP1 recovered the structure after restored the original conditions. Finally, rSola I 3 (**Figure 40A**) presented the most stable secondary structure of all the allergenic tomato nsLTPs analysed. This allergen is described as the main one responsible of the IgE sensitization to this vegetable, probably due, among other factors, to the great resistance of denaturation. Same results are presented with almond nsLTP, displaying stable until 77 °C [Masthoff & col., 2013].

### 1.5. Immunological validation of recombinant forms of tomato nsLTPs

For the use of recombinant allergens in clinical practice and *in vitro* diagnosis, it is essential to validate them both structurally and immunologically with respect to their natural form. **Figure 41** exhibits the immunoblotting assays, after the transfer of natural and recombinant proteins into nitrocellulose membranes and subsequent incubation with sensitized patient' sera (pool 1-3, pag. 126). The analysis of IgE-recognition shows identical patterns in the size of the reactive bands and even in their intensity.



**Figure 41.** Immunological validation of the rSola I 3, rSola I 6 and rSola I 7 with a pool of allergenic sera.

With the three tomato nsLTPs separately in a recombinant form, the study of allergenic prevalence of each protein was carried out. A total of 8 sera recognize rSola I 7 (30.7%), 2 sera rSola I 6 (7.7%) and 5 sera rSola I 3 (19.2%), and taking as a reference the percentage of positive sera to at least one tomato nsLTP (42.3%), more than a half of them were sensitized to rSola I 7 (53.3%), followed by rSola I 3 (33.3%) and the less allergenic tomato nsLTP rSola I 6 (13.3%).

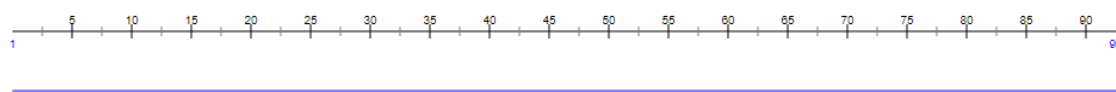
Although Sola I 3 is described as the main allergen responsible of the IgE sensitization to this vegetable [López-Matas & col., 2015], in this population selected for presenting severe symptoms after tomato ingestion, but without positive *in vitro* diagnostic tests with tomato commercial extracts, rSola I 7 is the most allergenic nsLTP, highlighting once again the need for the identification of allergens located in specific tissues such as seeds, which trigger unexpected and severe reactions although they can remain “hidden” in food preparations [Martin-Pedraza & col., 2016].

Due to these results, a combination of the two tomato seeds nsLTPs (Sola I 6 and Sola I 7) used in diagnostic tests would be very useful, as they are, the sum of both prevalences, which presents the highest percentage of sensitization in the studied population.

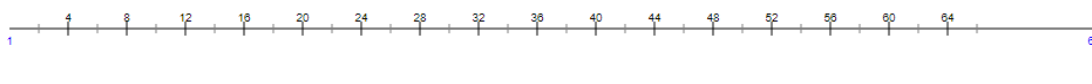
## 2. 2D AND 3D STRUCTURE OF Sola I 6 AND Sola I 7 BY NMR

### 2.1. Theoretical secondary and tertiary structure prediction

The prediction of the secondary structure of the three tomato nsLTPs sequences submitted in the database, without signal peptide was carried out according to the *PredictProtein* method (<https://www.predictprotein.org>), resulting in a 41.3%  $\alpha$  helix and a 58.7%  $\beta$ -turn for Sola I 7 (**Figure 42**) and a 27.94%  $\alpha$  helix, a 4.41%  $\beta$ -sheet and a 67.65%  $\beta$ -turn for Sola I 6 (**Figure 43**). These data are similar to those obtained experimentally by CD, although with small differences due to the particularities of the prediction or calculation systems used, although in both cases, the regions of aperiodic order and short turns predominate, being the  $\alpha$ -helix the predominant element of secondary orderly repetitive structure. In the same way, Sola I 3 sequence shows a theoretical secondary structure prediction of a 33.33%  $\alpha$ -helix and a 66.67% of  $\beta$  turn (**Figure 44**).



**Figure 42.** Secondary structure prediction of Sola I 7 with  $\alpha$ -helix in red.



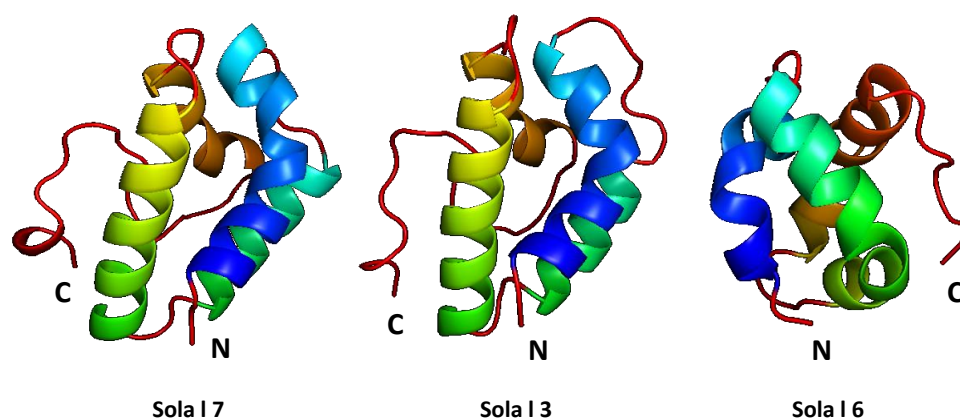
**Figure 43.** Secondary structure prediction of Sola I 6 with  $\alpha$ -helix in red and  $\beta$ -sheet in blue.



**Figure 44.** Secondary structure prediction of Sola I 3 with  $\alpha$ -helix in red.

3D structure of most studied lipid transfer proteins has been determined by both X-ray diffraction and NMR. These studies determined that they present a totally compact structure formed by 4 or 5  $\alpha$ -helix separated by short turns and a flexible and unstructured C-terminal tail. This 3D structure is firmly anchored by the four disulphide

bridges mentioned above, forming an 8-cysteine motif with the general structure of C-X<sub>n</sub>-C-X<sub>n</sub>-CC-X<sub>n</sub>-CXC-X<sub>n</sub>-C-X<sub>n</sub>-C-X<sub>n</sub>-C-X<sub>n</sub>-C. The two families of nsLTPs present different mating of the disulphide bridges: nsLTP1 shows the cysteine pairs 1–6, 2–3, 4–7 and 5–8, being C–X<sub>10</sub>–C–X<sub>14</sub>–CC–X<sub>20</sub>–CXC–X<sub>23</sub>–C–X<sub>14</sub>–C [Pasquato & col., 2006], while in nsLTP2, cysteines 5 and 6 seem to be interchanged and therefore the following structure 1–5, 2–3, 4–7 and 6–8, would remain C–X<sub>8</sub>–C–X<sub>14</sub>–CC–X<sub>9</sub>–CXC–X<sub>24</sub>–C–X<sub>7</sub>–C [Hoh & col., 2005]. The 3D modelling of Sola I 3, Sola I 6 and Sola I 7 was performed through the *SWISS-MODEL* server, taking as a model for Sola I 3 the tobacco nsLTP belonging to Solanaceae family (*Nicotiana tabacum*) [Da Silva & col., 2005], which has a 72.2% identity sequence; the aubergine nsLTP (*Solanum melongena*) for Sola I 7 [Jain & col., 2017], with a 91.3% identity sequence; and the wheat nsLTP2 (*Triticum sp.*) for the tomato Sola I 6 [Hoh & col., 2005] with a 47.0% of identity (**Figure 45**). The modeling obtained agrees in general with the compact structure described for other nsLTPs of plants.



**Figure 45.** 3D modeling (PDB format and *PyMOL* analysis) of the tomato nsLTPs Sola I 7, Sola I 3 and Sola I 6.  $\alpha$ -helix coloured in rainbow and  $\beta$ -turn in red. N-terminal (N) and C-terminal (C) protein are marked.

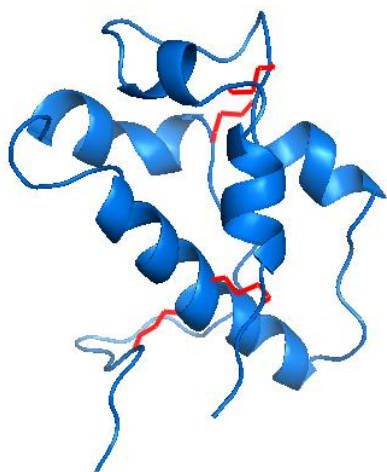
## 2.2. NMR 2D and 3D structures of Sola I 6 and Sola I 7

Sola I 7 and Sola I 6 samples were prepared for NMR experiments at 0.5-0.7mM in 90% H<sub>2</sub>O/10%D<sub>2</sub>O or in D<sub>2</sub>O containing sodium-4,4-dimethyl-4-silapentane-1-sulfonate (DSS) at pH 5.5. On the unlabeled Sola I 7 and Sola I 6 samples NOESY spectra were acquired in H<sub>2</sub>O and D<sub>2</sub>O. For the labelled sample of both proteins, a set of standard 2D and 3D spectra was recorded for assignment purposes as previously described [Frueh &



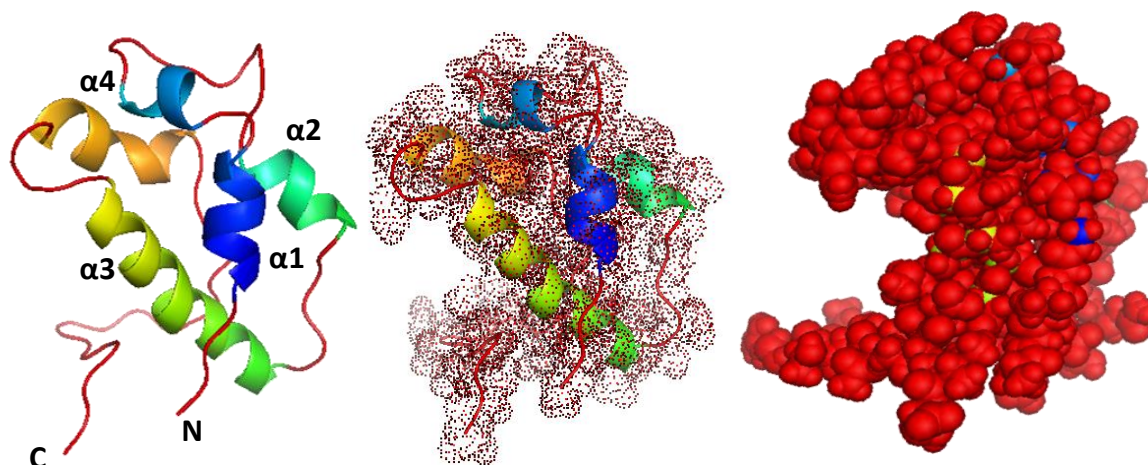
col., 2005; Pantoja-Uceda & col., 2009; Pantoja-Uceda & col., 2008; Pantoja-Uceda & col., 2012].

For the structure calculation of Sola I 7, 100 structures were generated. The NMR spectra of Sola I 7 in solution correspond to that of a typical folded peptide with good signal dispersion. The complete backbone assignment was achieved and a nearly complete (96.4 %) assignment of all hydrogen-bound  $^{15}\text{N}$ ,  $^{13}\text{C}$  was also obtained. For the secondary structure determination, four disulfide bridges were confirmed experimentally Cys4-Cys51, Cys14-Cys28, Cys29-Cys74 and Cys49-Cys88 (**Figure 46**). This arrangement is fully compatible with the one defined in the literature for the nsLTP1 protein family.

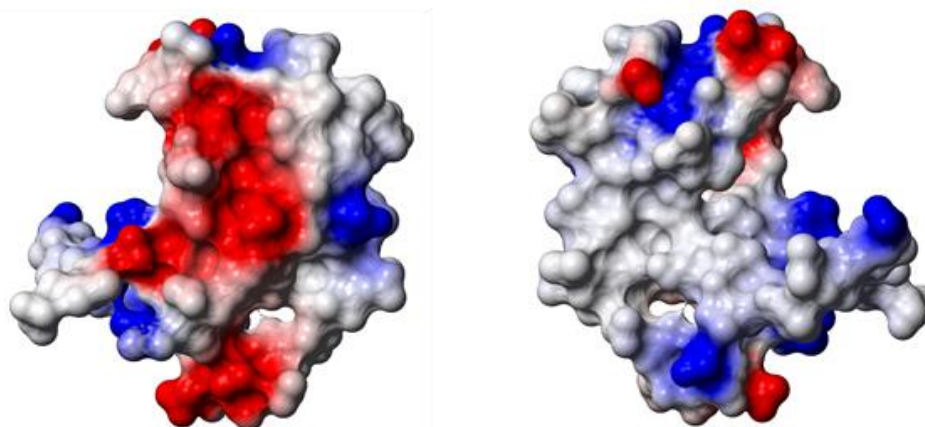


**Figure 46.** The cysteine side chains forming the four disulfide bridges are shown as stick models and colored in red.

According to the 3D structure shown in **Figure 47**, Sola I 7 is mainly helical and has a disordered C-terminal loop (residues 79-92), although a S-S bond between C49-C88 is linking this loop with the helical core that could improve the stability of the protein in response to proteases attack and heat denaturation [Wu & col., 2004]. The globular packed domain contains the  $\alpha$ -helical region (residues 6-18, 30-36, 42-58 and 61-73). Positive and negative charges are well distributed over the protein surface, with different patches of positive or negative potentials represented in **Figure 48**.



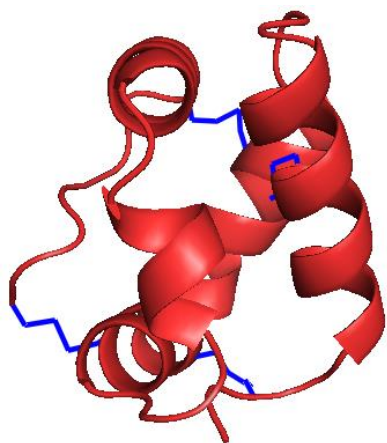
**Figure 47.** Ribbon diagram of the Sola I 7. The overall structure of the protein is shown as a ribbon model (colored by chainbows). The N-terminal and C-terminal are marked and the four  $\alpha$ -helices are labeled  $\alpha 1$ – $\alpha 4$ .



**Figure 48.** Electrostatic potential surface of Sola I 7. Some patches of positive and negative regions can be observed.

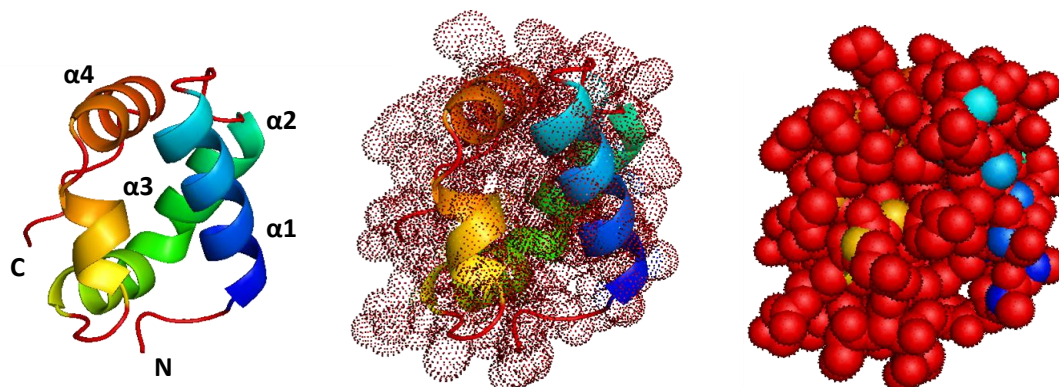
For the Sola I 6 2D and 3D structure determination, a first approach in the Rocasolano Institute (CSIC, Madrid) tried to calculate by using all the NMR data, experimental distance and angular restraints. However, because of the lack of signals for several residues, large widths and small signal intensities for other ones, only the 52.6% of the protein residues were in the most favoured regions of the Ramachandran plot indicating the poorness of the NMR data, so a realistic global fold of the protein could not be performed. In order to get a representative structure, that could be analysed in a similar way as Sola I 7, we decided to build a model 2D and 3D of Sola I 6 by using a homology modelling method complemented with experimental data. Secondary structure

elements for Sola I 6 were clearly delineated according to the high sequence homology between Sola I 6 and other proteins of known structure of the nsLTP2 protein family, with the pattern of Cys pairing, showing chemical shifts typical of oxidized states (Cys3-Cys35; Cys11-Cys25; Cys26-Cys61; Cys37-Cys68), represented in **Figure 49**.



**Figure 49.** The cysteine side chains forming the four disulfide bridges are showed as stick models and colored in blue.

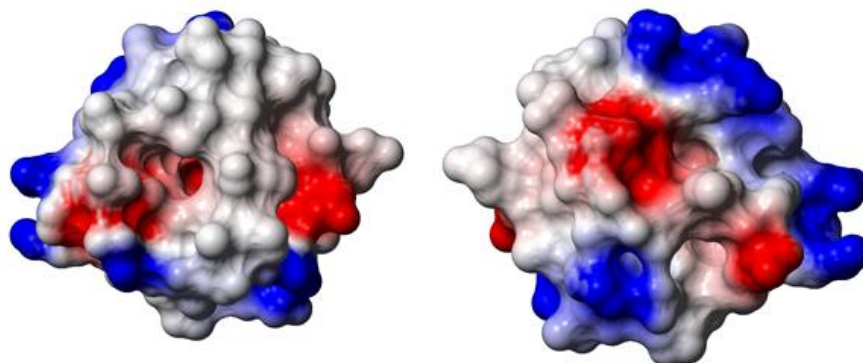
Besides, 3D structure of Sola I 6 is showed in **Figure 50**. Thus, it exhibits the typical fold of the LTP2 protein family with the globular packed domain contains the  $\alpha$ -helical region with residues 5-17, 23-31, 33-41 and 52-61.



**Figure 50.** Ribbon diagram of the Sola I 6. The overall structure of the protein is shown as a ribbon model (colored by chainbows). The N-terminal and C-terminal are marked and the four  $\alpha$ -helices are labeled  $\alpha 1$ – $\alpha 4$ .

Although both proteins adopt the same fold of the nsLTP family, helix 1, 2 and 4 have similar length in Sola I 7 and Sola I 6, whereas helix 3 is much larger in Sola I 7. As previously described for maize nsLTP2 [Samuel & col., 2002], a continuous stretch of hydrophobic residues, Cys61–Ile65, near the C terminus forms a flexible cap over the hydrophobic cavity. The C-terminal region also contains two cysteines bridged to the rigid portion of the molecule (Cys26–Cys61 and Cys37–Cys68) which help to maintain the correct orientation of the hydrophobic cap. Finally, the protein surface is also highly

charged with positive and negative regions distributed in both faces of the structure (Figure 51).



**Figure 51.** Electrostatic potential surface of Sola I 6. Some patches of positive and negative regions can be observed.

The tertiary structures of nsLTPs class 1 and class 2 from different origins like peach, wheat, rice, maize or barley seeds, among others, either in free state or in complex with lipids, have been determined by X-ray crystallography or NMR method [Pasquato & col., 2006; Samuel & col., 2002; Hoh & col., 2004; Gincel & col., 1994; Gomar & col., 1996; Charvolin & col., 1999; Han & col., 2001; Heinemann & col., 1996; Lerche & col., 1997; Lee & col., 1998]. All these studies show the unmistakable features of rigid and extended tertiary structures which is not affected by low pH environment [Alessandri & col., 2012], suggesting that the 3D structure of these allergens consists on four  $\alpha$ -helix and a long N-terminal signal sequence, with four disulfide bonds interconnecting the secondary structure. In all these proteins, the location of cysteines, hydrophobic amino acids, and relevant positively charged residues for the hydrophobic tunnel formation are well conserved. There are, however, notable differences between nsLTP1 and nsLTP2. In the -CXC- motif, an asparagine between the two cysteines in nsLTP1 is replaced by a hydrophobic amino acid in nsLTP2. Furthermore, the hydrophobic residue in the -CXC- motif of nsLTP2 is buried inside the molecule, whereas the hydrophilic residue of nsLTP1 is at the surface. In the 3D model of Sola I 6 and Sola I 7, these observations suggest that the central residue of the -CXC- motif may govern the cysteine pairing and influence the overall fold of the protein.

In the same way, the hydrophobic cavity of nsLTP2 is significantly different from nsLTP1 and these differences are important for its biological functions, in terms of lipid transport. In nsLTP1 this cavity is a tunnel-like into which a long fatty acyl chain could be

inserted, ranging in size from C10 to C18 in the case of maize nsLTP [Morris & col., 1992], whereas in nsLTP2 is a triangular hollow box. Not only the form but the size of the hydrophobic cavity in nsLTP1 and nsLTP2 are different, where those of nsLTP2 efficiently transferred lipid molecules being more flexible than nsLTP1, despite its smaller hydrophobic cavity [Douliez & col., 2001b].

## CHAPTER III: Tomato nsLTPs cross-reactivity analysis: different allergenic nsLTPs in the same fruit

---

Non specific LTPs have been identified in a multitude of plant sources, both in pollens and plant foods. It is one of the most frequent cause of primary food allergy and food-induced anaphylactic reactions and contributes to the so-called nsLTP syndrome, which is characterized by severe and systemic reactions in a high proportion of patients [Zuidmeer & col., 2007]. Among allergenic nsLTPs, those from *Rosaceae* family and other fruits can be considered as panallergens with a potential for cross-reactivity comparable to those shown in profilins and are mainly concentrated in the outer epidermal cell layers of the exposed plant surfaces, such as the fruit peel [van Ree & col., 1995; Borges & col., 2006; Carnés & col., 2002].

They are major allergens in fruits from the *Rosaceae* family, and in the Mediterranean area, nsLTPs have been described as major clinically relevant allergens in numerous plant-derived foods [Hartz & col., 2010]. In Spain nsLTPs from peach (Pru p 3) and cherry (Pru av 3) induce positive SPT in more than 89% of patients sensitised to each of these fruits [Ballmer-Weber, 2002]. However, allergenic nsLTPs have also been found in non-*Rosaceae* plant foods such as nuts (Ara h 9), seeds (Sin a 3), vegetables (Sola l 3), legumes (Cic a 3) and cereals (Zea m 14) [Lauer & col., 2009; San Miguel-Moncin & col., 2003; Sirvent & col., 2012; Pastorello & col., 2004a]. Sensitization to nsLTPs have also been described for some prevalent pollens via inhalation, including olive (Ole e 7) pellitory (Par j 1, Par j 2), mugwort (Art v 3), london plane tree (Pla a 3) and ragweed (Amb a 6) [Morales & col., 2014; Oeo-Santos & col., 2018; Colombo & col., 2003; Gadermaier & col., 2008].

Whereas nsLTPs have been proposed as major cross-reactive allergens identified in the majority of plant-derived foods as well as in pollens from diverse plants [Hauser & col., 2010], cross-reactivity among nsLTPs has not been investigated with enough depth so far. As previously mentioned, nsLTPs present an amino acid sequence identity percentage between 30-50% and similarities of approximately 70% [Gomar & col., 1997]. Pru p 3 is described as the most relevant nsLTP allergen in food, being the primary sensitizer in most cases. Some authors have suggested the existence of cross-reactivity

between Pru p 3 and other nsLTPs [Ahrazem & col., 2005; Diaz-Perales & col., 2000; Lombardero & col., 2004; Gadermaier & col., 2011; Tordesillas & col., 2011], although identity percentages between them are quite low. This would suggest that factors other than primary structure may be responsible for the cross-reactivity among nsLTPs, such as for instance the tertiary structure with specific aminoacids in key positions.

Recent studies on nsLTP cross-reactivity have shown that most patients allergic to *Rosaceae* and sensitized only to these allergens also experience adverse reactions after ingestion of other non-botanically related plant foods that have low sequence similarity percentages. This fact could be determined by the great similarity in tertiary structures between nsLTPs from different plant sources, with consists in a very conserved and compact structure with key aminoacids, or because low affinity interactions in certain IgE epitopes. However, in terms of why patients tolerate some foods and suffer severe adverse reactions with others nsLTPs, the presence of other matrix components or particularities in the linear or conformational epitope amino acid composition, could be an explanation [Morales & col., 2014]. Nevertheless, from a clinical perspective, the cross-reactivity through these panallergens involves highly problematic sensitivities, as it is capable of provoking cross-reactivity with numerous plant species.

Although peach across its nsLTP1 (Pru p 3) is considered the food causing most allergies, numerous patients sensitized to this protein develop allergy to other plant sources such as nuts (*Ara h 9*), cereals (*Zea m 14*) and tomatoes (*Sola l 3* and *Sola l 7*) [Asero, 2011b; Martín-Pedraza & col., 2016] that contain Class 1 of these allergens. However, type I hypersensitivity reactions by cross-reactivity between nsLTP1 and nsLTP2 have not been described.

Tomato nsLTPs, either from peel or seeds, *Sola l 3*, *Sola l 6* and *Sola l 7* are mainly associated with food allergy as has been described in Martín-Pedraza & col., 2016. However, cross-reactivity studies between tomato and other food sources have not been deeply performed. With this in mind and as mentioned above, several nsLTPs, Class 1 and Class 2, have been described as allergens in certain plant foods, presenting variable sequence identities between them and therefore it was necessary to study the possible IgG cross-reactivity, carrying out the production of rabbit polyclonal antisera

(pAb) of each recombinant tomato allergen and the IgE cross-reactivity with allergic patients' sera (pool 1-3, pag. 126) to each one of the tomato proteins.

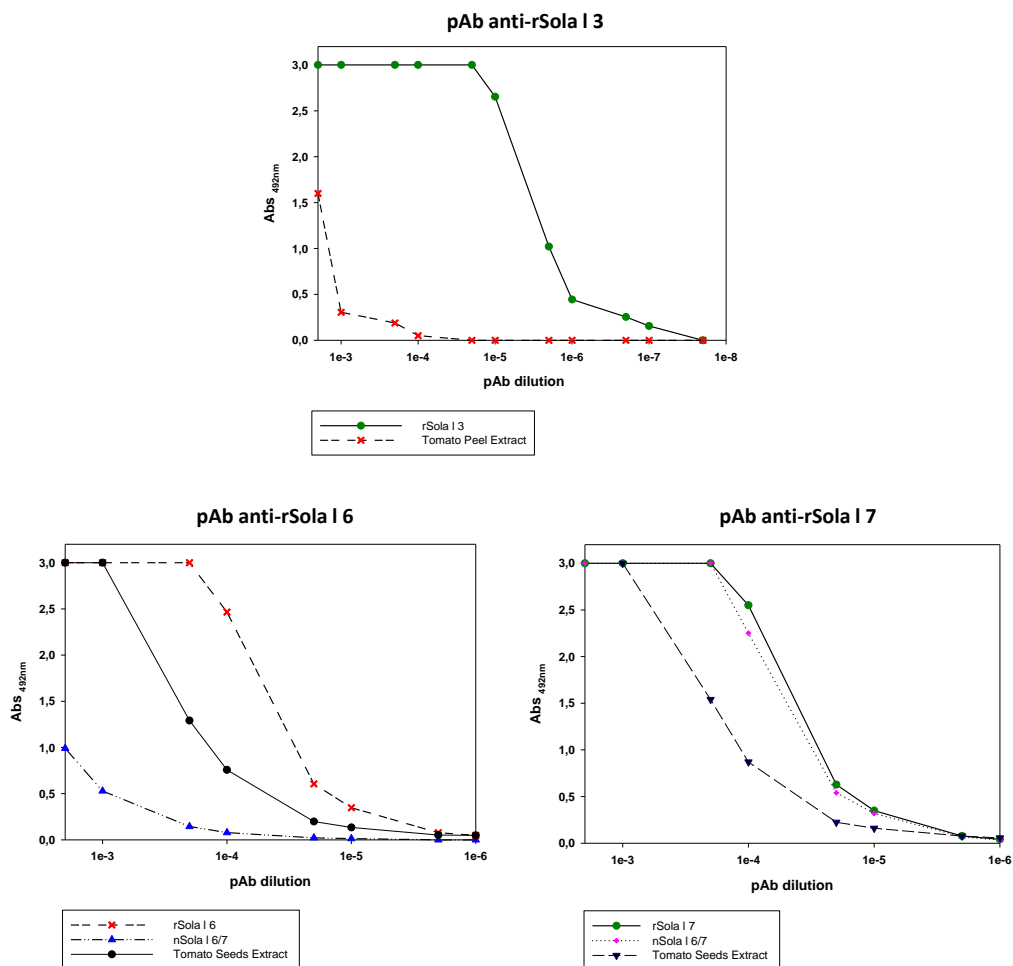
Furthermore, the possible cross-reactivity analysis between nsLTPs of different tissues of the same fruit and the subsequent question of why the same fruit has three or more allergenic proteins from the same family, is of great interest, either between nsLTPs of Class 1 (Sola I 3-Sola I 7) or between nsLTPs Class 1 and 2 (Sola I 3-Sola I 6 and Sola I 7-Sola I 6), make the study of the antigenicity and immunogenicity of these proteins highly relevant.



## 1. IgG CROSS-REACTIVITY ANALYSIS

### 1.1. Titration of polyclonal antisera, anti-rSola I 3, anti-rSola I 6 and anti-rSola I 7.

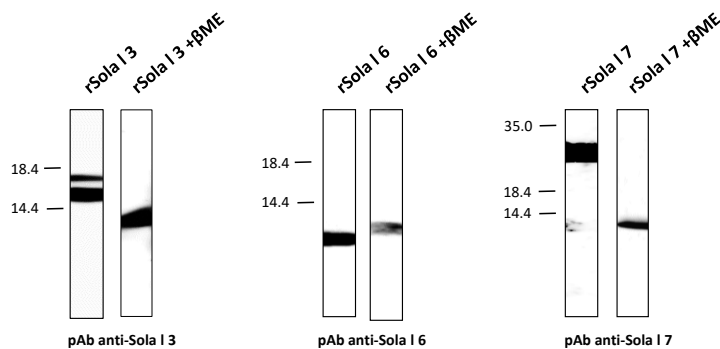
The polyclonal antisera (pAb) titration obtained after New Zealand rabbit immunization with the recombinant Sola I 3, Sola I 6 and Sola I 7, according to the protocol described in Materials & Methods, was evaluated for every allergens and for tomato peel protein extract, in case of Sola I 3, and tomato seeds extract, in the case of Sola I 6 and Sola I 7, by means of ELISA assays (**Figure 52**). The pAb titre obtained were established for the successive immunoassays, in an optimal dilution of 1:200000 for pAb anti-Sola I 3 and 1:30000 for pAb anti-Sola I 6 and pAb anti-Sola I 7.



**Figure 52.** ELISA titration curves of pAbs anti-Sola I 3, anti-Sola I 6 and anti-Sola I 7. Recombinant purified proteins Sola I 3, Sola I 6 and Sola I 7 and natural nSola I 6/7 were used, as well as tomato seed and peel protein extracts.

As it is represented in the figure, all pAbs have a titration curve with a correct displacement. In the case of pAb anti-rSola I 3, although 25  $\mu\text{g}/\text{well}$  of tomato peel extract was used, it has a low recognition probably due to the low concentration of this allergen in this tissue. However, the recognition of the purified recombinant allergen (0.2  $\mu\text{g}/\text{well}$ ) was well defined. Finally, both pAb anti-rSola I 6 and anti-rSola I 7 present a similar recognition of their respective proteins, detecting both at 0.2  $\mu\text{g}/\text{well}$  and using 20  $\mu\text{g}$  tomato seed extract/well. Highlighting that the titration curves of the mixture of natural tomato seed allergens show a greater recognition by the Sola I 7 pAb than by Sola I 6 pAb, probably due to the higher proportion of this nsLTP1 in the natural mixture.

After these titration assays, the recognition of allergens in both reducing and non-reducing conditions was checked, as shown in **Figure 53**.



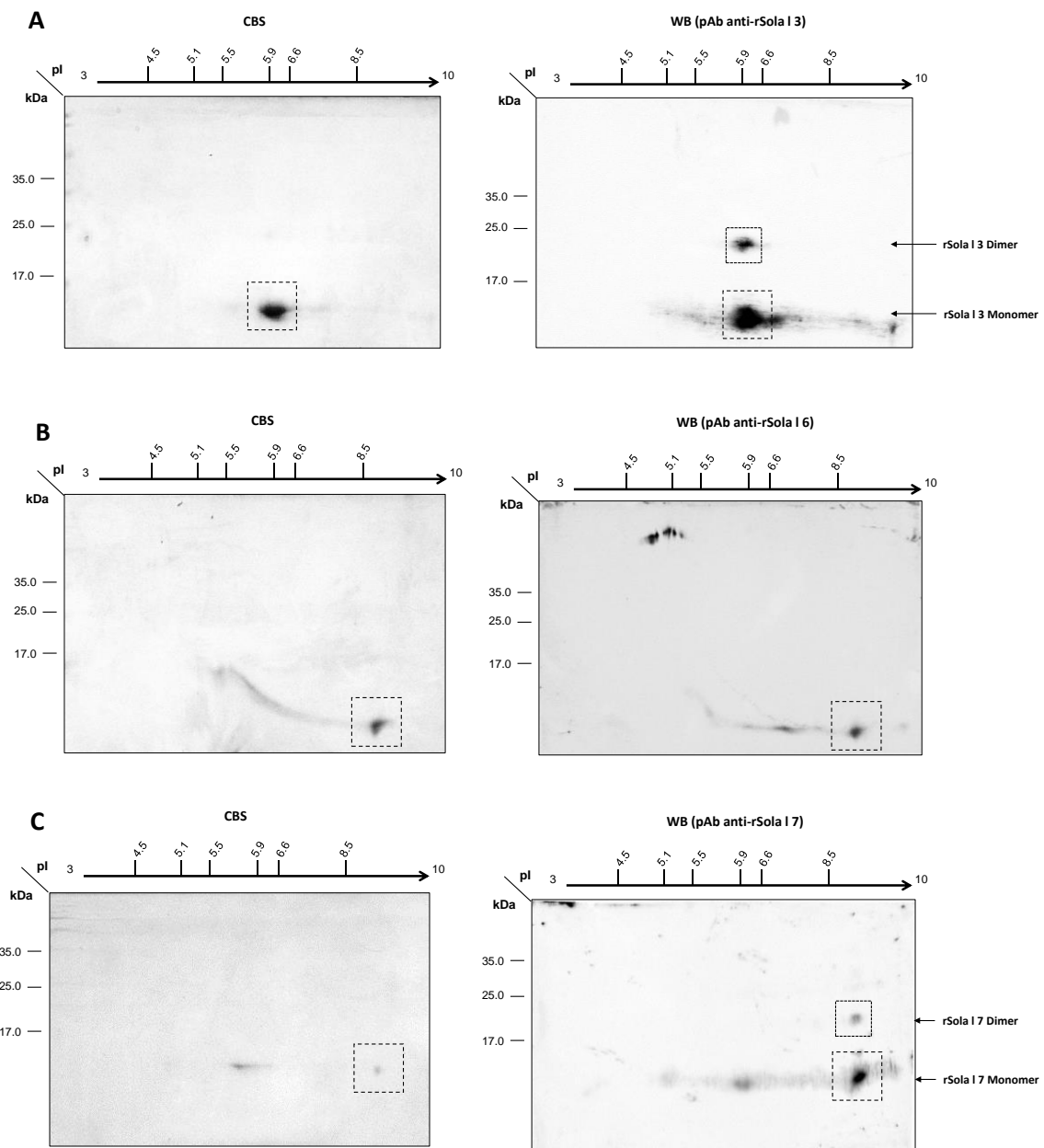
**Figure 53.** IgG recognition of each pAb under reducing ( $\beta\text{ME}$ ) and non-reducing conditions.

As can be seen, IgG recognition of Sola I 6 and Sola I 7 under reducing conditions is slightly decreased, probably due to the elimination of possible conformational immunoreactive epitopes of these proteins. Furthermore, the electrophoretic mobility of these tomato allergens when subjected to a reducing agent, exhibits a decrease into the polyacrylamide gel, clearly shown in the case of the monomer Sola I 6 as a consequence of the breakage of disulfide bonds.

## 1.2. Identification of the pI of these recombinant allergens with pAbs

The experimental pI of the three purified recombinant proteins was checked by 2D SDS-PAGE and detection by their pAbs. For this purpose, experiments were performed as shown in Materials & Methods, into gel strips with linear pH gradient (pH 3-10). The experiments performed in **Figure 54**, showed a perfect correlation detected by Coomassie blue staining (CBS) with those detected by WB. After Sola I 3 and Sola I 7

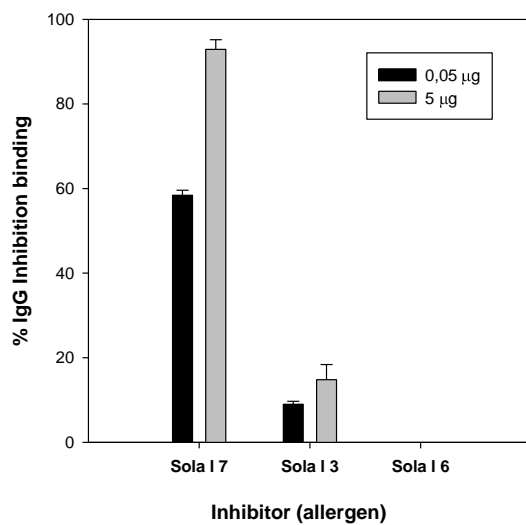
immunodetection experiments with the pAb, several reactive spots can be observed, corresponding with the protein's dimers, due to their uncompleted reduction.



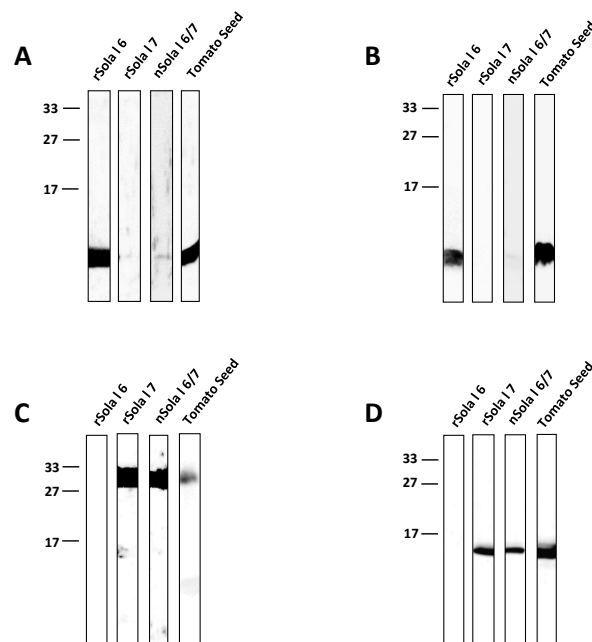
**Figure 54.** 2D SDS-PAGE of rSola I 3 (A), rSola I 6 (B) and rSola I 7 (C). CBS and pAb detection assays by WB for each one of them are shown.

### 1.3. IgG cross-reactivity between tomato nsLTPs

Although these three proteins present in different tissues from the same fruit, a low cross-reactivity recognition between nsLTPs Class 1 (Sola I 3 and Sola I 7) by pAbs is exhibited, obtaining only a 9% inhibition with 0.05  $\mu\text{g}$  and 15% when 5  $\mu\text{g}$  of Sola I 3 is used as inhibitor when 0.2  $\mu\text{g}$  of Sola I 7 coated into ELISA wells. This fact is consistent with the low sequence identity between them, 38%. Similarly, in this ELISA inhibition and reinforced in Western Blot assays, IgG recognition between the two tomato seeds nsLTPs (Sola I 6 and Sola I 7) is not observed either under reducing or non-reducing conditions (Figure 55 and 56).



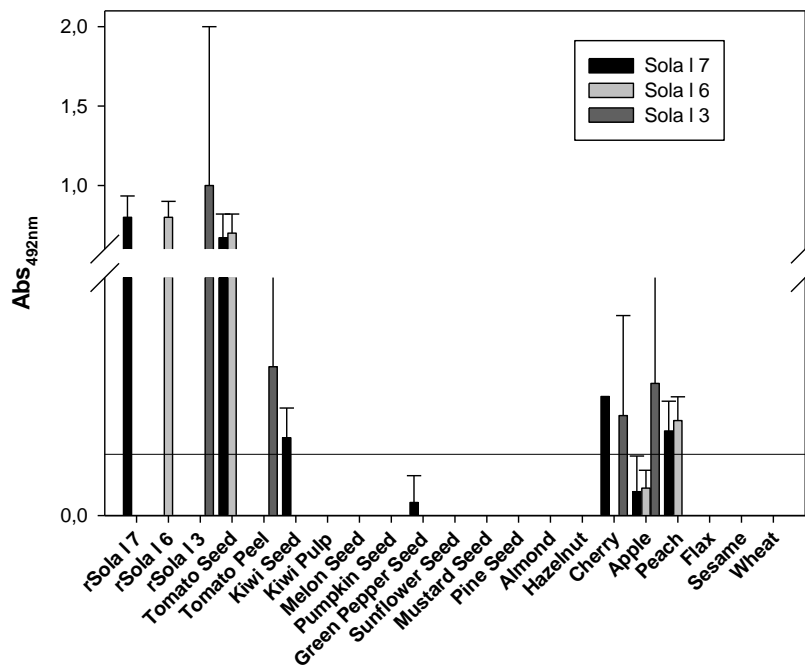
**Figure 55.** ELISA Inhibition of the pAb anti-Sola I 7 recognition with different amounts of Sola I 7, Sola I 6 and Sola I 3 used as inhibitors.



**Figure 56.** Immunoblotting analysis of the recognition of Sola I 6 and Sola I 7 by pAb. **A.** IgG recognition of 2  $\mu$ g of the different recombinant and natural tomato seed proteins and 20  $\mu$ g of tomato seed extract by pAb anti-Sola I 6 under non-reducing and **(B)** reducing conditions. **C.** same experiment with pAb anti-Sola I 7 under non-reducing and **(D)** reducing conditions.

#### 1.4. Presence of homologous proteins to Sola I 3, Sola I 6 and Sola I 7 in several vegetable foods

By means of ELISA assays and using specific Sola I 3, Sola I 6 and Sola I 7 pAbs, different extracts of plant foods such as fruits (apple, peach, cherry, tomato and kiwi), seeds (kiwi, melon, pumpkin, tomato, mustard, green pepper, sunflower flax and sesame), nuts (pine seeds, almond and hazelnut), vegetables (green pepper) or cereals (wheat) frequently used in the Mediterranean diet were tested (**Figure 57**). Thus it was possible to determine the existence of homologous proteins to these tomato nsLTPs (Class 1 and Class 2). Of all the extracts tested, tomato seed, kiwi seed, cherry and peach exhibited positive values for Sola I 7. For Sola I 6, only peach and tomato seeds were recognized. Finally, extracts of tomato peel, cherry and apple were able to block IgG binding to Sola I 3.



**Figure 57.** ELISA analysis of nsLTPs recognition in plant food extracts. Between 20 and 50  $\mu$ g of the tested extracts were used, previously optimized.

nsLTPs are major allergens in fruits from *Rosaceae* family. In Spain, nsLTPs Class 1 from peach (Pru p 3) and cherry (Pru av 3) induce positive SPT in more than 89% of patients sensitised to these fruits. Besides, apple also belong to the same family and their nsLTP present 80% sequence identity with Pru p 3 [Morales & col., 2014]. According to these results, IgG recognition by the tomato nsLTPs Class 1 pAb, Sola l 3 and Sola l 7 of most extracts of this plant family, is not uncommon. Moreover, when the identity between Sola l 3 and Pru p 3, Pru av 3 and Mal d 3 are 48.5 and 53%, respectively and with Sola l 7 are 41, 41 and 43%, respectively.

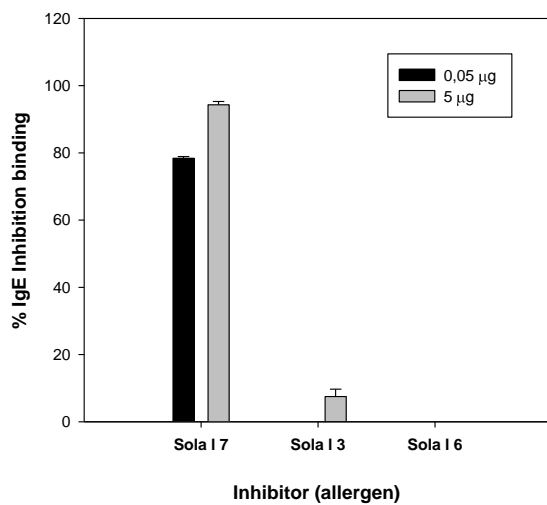
However, as mentioned above, cross reactivity studies between nsLTP1 and nsLTP2 have not been carried out. According to these data, we can observe how the Sola l 6 pAb recognizes the peach nsLTP and slightly the apple nsLTP, but not the cherry one, suggesting that these nsLTPs, may share common epitopes, despite their 29% identity in primary structure.

These positive results agree with those from Asero & col., 2002 and Mothes-Luksch & col., 2017, where allergic reactions to plant-derived food in Southern Europe are usually associated with systemic reactions, due to a primary sensitization to peach nsLTP and cross-reactivity reactions with onion, eggplant, mustard, tomato or pepper.

Allergenic nsLTPs have also been found in pollen and latex [Breiteneder & col., 2005a; Pastorello & col., 2004b], with significant associations between Art v 3 and Pla a 3 (mugwort and plane tree pollens nsLTPs, respectively) with respiratory symptoms, such as rhinoconjunctivitis, for example, and correlation was observed between sensitization to pollen and plant food nsLTPs, particularly between Pla a 3 and tree nut/peanut nsLTPs [Scala & col., 2015]. However, no cross-reactivity was observed with Parietaria pollen nsLTPs, Par j 1 and Par j 2 or olive pollen nsLTP, Ole e 7 with any food extract [Tordesillas & col., 2011]. Pollen extracts from cypress, olive, ash, *Chenopodium* sp. and *Lolium* sp. were tested with Sola l 3, Sola l 6 and Sola l 7 polyclonal antisera, but no positive results were obtained in any case.

## 2. IgE CROSS-REACTIVITY BETWEEN TOMATO nsLTPs

After the results of inhibition in the IgG recognition between tomato nsLTPs, these proteins were tested by ELISA inhibition with two sera reactive to each pair of proteins tested (Sola I 7-Sola I 3 (sera 26 and 5) and Sola I 7-Sola I 6 (sera 1 and 4)), to check if this minimum cross-reactivity between tomato nsLTPs1 and the null cross-reactivity between tomato seed nsLTPs (class 1-class 2), was also found at IgE level. Thus, results of up to 7.5% inhibition between Sola I 7 and Sola I 3 were obtained, being 0% for the pair Sola I 7-Sola I 6, as is presented in **Figure 58**.



**Figure 58.** ELISA Inhibition with a pool of sera from allergic patients and different amounts of Sola I 7, Sola I 6 and Sola I 3 as inhibitors.

Despite the fact that several proteins belonging to the nsLTP2 family are identified and characterized to date, little is known about their allergenic potential. So far, IgE-reactive nsLTP2s have been suggested in wheat (*Triticum aestivum*) [Lehto & col., 2010; Capocchi & col., 2005; Castagnaro & col., 1994], rape (*Brassica rapa*) [Toriyama & col., 1998], but not all of them were officially acknowledged by the IUIS Allergen Nomenclature Subcommittee. Interestingly, Vejvar & col., 2013 described protein expression of nsLTP2 from celery (*Apium graveolens*), Api g 6 clearly restricted to celery tuber while Api g 2, celery nsLTP1 was solely found in the aerial stalks, reflecting a tissue localization also found in wheat. In these studies, the majority of Api g 6 positive patients did not react to Api g 2, suggesting a limited epitope similarity between members of the nsLTP1 and nsLTP2 families, and consequently, reactivity to Api g 6 seems to be independent of nsLTP1 sensitization.

These results demonstrate for the first time the presence of two allergens of the same proteins family located in the same tissue of a fruit without IgG or IgE cross-reactivity and between two nsLTPs of the same class (Class 1) in different tissues of the same food, with possibly non-clinical cross reactivity implications in spite of presenting, all of them separately, cross-reactivity with homologous proteins of the *Rosaceae* family. Possible independent sensitizations could be carried out in the tomato nsLTP allergy, presenting different levels of severity symptoms depending on the allergenic nsLTP causing the pathology.

It can be concluded that the structure as well as other allergens and environmental factors can determine the frequency of patient sensitization.



## **CHAPTER IV: Allergen stability: Mimicking thermal processing and gastrointestinal digestion of tomato nsLTPs. Dendritic cells allergen uptake and lysosomal degradation.**

---

Allergenic capacity is dependent on the protein stability, which is defined as the ability to preserve their native, three-dimensional pattern after chemical, physical or enzymatic treatment over time [Breiteneder & col., 2005b; Deller & col., 2016]. The integrity of the allergenic protein structure can be modified according to different food treatments. They have the purpose to preserve food and improve the food quality [Sathe & col., 2009b]. Recent studies have attempted to determine the effect of processing on certain food allergens, to assess involved risks for the allergic consumer and to find methods to reduce or abolish allergenicity of food allergens.

Food processing can modify the structure and function of food proteins and simultaneously may alter (by increasing or decreasing) their allergenic properties [Cabanillas & col., 2018b]. They can destroy IgE epitopes or generate new ones, called neoallergens, transforming a food with a non-allergenic to another with allergenic features, causing the formation of new immunogenic structures [Sathe & col., 2005; Maleki & col., 2000]. On the other hand, although any single process by itself is sufficient to reduce or entirely eliminate the allergenicity of an allergenic food, studies carried out by Brenna & col., 2000, 2004 demonstrated that combinations of various treatments have proven rather effective in producing hypoallergenic peach juices, reducing the allergenic potency of its nsLTP, Pru p 3. Understanding the impact of food processing in threshold allergen doses alteration able to elicit an allergic reaction, is central to manage allergen risks in a factory environment.

Thermal processing operations have a multitude of physical and chemical effects on proteins altering their allergenic activity. They can affect to conformational epitopes being these more vulnerable compared to linear epitopes [Mils & col., 2009; Poms & col., 2004a; Teodorowicz & col., 2013], which are still intact after denaturation processes and able to bind antibodies. This is the case of the cherry allergen Pru v 3, which remains intact after processing, maintaining its immunogenicity [Jimenez & col., 2011]. Besides, certain chemical reactions occurring during thermal processing can also affect food

allergen integrity. One of the most relevant is Maillard reaction that cause the glycation of certain allergens [Downs & col., 2016a; Gupta & col., 2017]. It is a non-enzymatic glycation reaction between a reducing sugar and side-chains of amino acids, typically lysine or arginine residues, that takes place during the thermal processing of foods, being favoured by high temperatures or alkaline conditions. Following this condensation, a cascade of reactions produces a multitude of intermediates and final products known as advanced glycation end products (AGEs) [Dill, 1993; Martins & col., 2000; Wang & col., 2011] that have the potency to alter the structure and biological activity of some allergens, some of which may be considered as factors directly related to the pathogenesis of food allergy by triggering the immune response.

In addition, many of these AGEs confer the desirable brown colour and roasted flavour compounds commonly associated with thermal processing due to the increment of the carbohydrate's caramelization [Garza & col., 1999]. Studies by Chung & col., 1999, 2001 have suggested that Maillard reactions involving some food allergens, affect their allergenic activity. Sometimes, the presence of glycated proteins leads to an increase in the allergenic ability of the food through the production of AGEs, participating in the activation of APCs and recognition by dendritic cell membranes receptors, as well as induction of T cell-derived responses and thus playing a key role in the induction of the immune response. This is the case of the receptor RAGE (receptor for advanced glycation end products [Mueller & col., 2013 and Moghaddam & col., 2014].

Other aspect to consider when the allergenic potential of food allergens is evaluated, is the effect of gastrointestinal digestion. It is known that allergenic structures are usually able to survive the harsh acidic environment of the stomach, tolerate the presence of surfactants and resist digestion by gastrointestinal enzymes, in order to reach the gut-associated lymphoid tissues [Mackie & col., 2010; Polovic & col., 2007]. Many of the food allergens are stable proteins that are very resistant to digestion by gastrointestinal enzymes [Fu & col., 2002; Moreno, 2007] or can be digested into molecular mass peptide fragments big enough to retain the IgE binding and T-cell stimulating capacities [Jimenez-Saiz & col., 2014; Lehman & col., 2006].

Because of the difficulties involved in conducting *in vivo* experiments to evaluate the gastrointestinal stability of the different food allergens, *in vitro* digestion models

provide an alternative tool [Moreno & col., 2005a; Benedé & col., 2014; Bavaro & col., 2018]. However, some discrepancies between *in vitro* digestibility and allergenicity of certain allergens has been reported by many authors [Fu & col., 2002; Moreno, 2007; Untersmayr & col., 2008], maybe because the *in vitro* digestibility of a protein is influenced by the hydrolysis conditions and enzyme quantities, not considering the protein interactions with other digestive or food matrix components. In addition, even though certain proteins are consistently degraded in the *in vitro* assays, it cannot be discarded that small proportions of intact material escape digestion in an immunologically active form in an *in vivo* situation [Wickham & col., 2009].

Structural features of food proteins, such as extensive disulfide bond core, increase protein stability decreasing susceptibility toward proteolytic enzymes. Disulfide bonds have been important for the resistance of allergens to digestion, such as in the case of Ber e 1 from Brazil nut, Act d 2 from kiwifruit, and grape nsLTP [Bublin & col., 2008; Vassilopoulou & col., 2006]. The nsLTP 3D structure, anchored by four disulphide bridges, makes it highly resistant to heat and digestion [Asero & col., 2001; Pastorello & col., 2003b; Sancho & col., 2005]. In addition, there are several examples of food allergens that, once digested, retain the IgE binding, basophil mediator release capacity and T-cell stimulatory properties of the intact protein, such as Ara h 1 from peanut [Eiwegger & col., 2006] or Pers a 1 from avocado [Diaz-Perales & col., 2003], mainly because the proteolytic fragments form stable disulfide-bonded cores.

Although conformational epitopes are expected to be more susceptible to disruption than sequential ones, as happens with thermal processing [Jiménez-Saiz & col., 2015], it has been described in some cases, that proteolysis can enhance the induction of an effective allergic response, likely because unmask B-cell epitopes [Pomés, 2010]. On the contrary, unfolding by disruption of intramolecular disulfide bonds could decrease or even abolish the allergenicity of proteins [Hazebrouck & col., 2012]. Examples of it are the easily digestible pollen-related food allergens, where Mal d 1 (apple), Api f 1 (celery), and Cor a 1 (hazelnut) belonging to Bet v 1-like family, lose their ability to bind IgE and induce basophil degranulation. Similar stability is described for inhalant allergens, such as those for pollens, house dust mites or spores, which do not require specific stability to low pH levels or enzymes action [Rimmer & col., 2015].

Lipid interaction is another key point in the maintenance of allergenicity during the digestion of certain proteins, such as nsLTPs by the ability of these proteins to specifically bind them through their hydrophobic cavity. They are mainly phospholipids, being phosphatidylcholine (PC) the most abundant secreted by the stomach mucosa, and bile salts, synthesized by the liver and transported by the bile as mixed micelles to the proximal small intestine [Mackie & col., 2010; Maldonado-Valderrama & col., 2011].

The main objectives are to analyse the proteolytic fragments generated by the enzymatic digestion and to investigate their allergenic properties, as they may be immunogenic or have the potential to elicit an allergic response.

After food processing and its digestion, allergen uptake and processing by dendritic cells (DCs) is a pivotal step in the induction of Th2 responses. Dendritic cells are the most important antigen presenting-cells to activate naïve T cells, and they are therefore central players of the immune system crossing the bridge between innate and adaptive immunity, involved in the Th2 sensitization process against common allergens in individuals with genetic predisposition [Mildner & col., 2014; Froidure & col., 2015].

At the initial stage of sensitization, DCs are specialized for antigen capture, processing, presentation to T cells by means of Class II MHC and, in allergic individuals, the activation of naïve CD4+ T cells and differentiate into Th2, initiating an adaptive immune response [Ruiter & col., 2012b; Villadangos & col., 2007; Platt & col., 2010; Kapsenberg, 2003; MacDonald & col., 2008; Smole & col., 2009; Salazar & col., 2013]. Consecutively, Th2 cells and their cytokine production driven by IL-4 and IL-13 promote the production of allergen-specific IgEs from B cells. During the following effector phase the frequent exposure to the same allergen induces mast cell activation via cross-linking of allergen-specific IgEs on the surface and the release of histamine and other factors [Humeniuk & col., 2017].

DCs use several mechanisms for antigen uptake such as receptor-mediated endocytosis, macropinocytosis, or phagocytosis. Macropinocytosis is based on a non-specific uptake of antigens, nutrients, and soluble molecules. In immature DCs this macropinocytosis seems to be the dominant mechanism also involved in the uptake of pollen allergens such as Bet v 1 [Noirey & col., 2000; Smole & col., 2015] by expression

of low-specificity receptors in their membranes such as Toll-like. In contrast, phagocytosis internalizes large antigens, apoptotic cells, and opsonized pathogens. Although the process is usually initiated by the activation of specific surface molecules, non-specific phagocytosis can also be performed. In this mechanism, antigens are endocytosed by membrane-derived phagosomes and further processed in phagolysosomes [Svensson & col., 1997; Banchereau & col., 2000]. The third type is through receptor-mediated endocytosis, where specific receptors on the APC surface such as C-type lectin carbohydrate receptors (CLRs), mannose receptor (MR) or RAGE, among other, are involved [Sallusto & col., 1995; Figdor & col., 2002]. Uptake of allergens via receptor-mediated endocytosis can enhance the efficiency of priming of naïve T cells by 1000-fold in comparison to macropinocytosis. Upon allergen uptake by DCs, it is transported via mildly acidic early endosomes to the more acidic late endosomes, where low pH-dependent proteolytic enzymes degrade the allergen. Subsequent processing and lysosomal degradation of allergens is crucial, and most resistant peptides are presented via MHC II molecules to the T cell receptor (TCR) [Roche & col., 2015].

However, the activity of lysosomal extracts differs according to cell types. Enzymatic cocktails from DCs are 50 times less active compared to those from macrophages. Therefore, DCs can *in vivo* preserve internalized antigens in intact form for some hours. Based on recent findings, it seems that individual food allergens display different resistance to DC processing, even if they belong to the same protein family. As shown by Schulten & col., 2011b, the peach and hazelnut nsLTP displayed different stability when subjected to lysosomal degradation assays, being Cor a 8 more rapidly degraded as compared to Pru p 3.

As previously described, glycation of food allergens may have an impact on allergenicity. In order to exert a possible immunological effect, glycated proteins must be able to pass the intestinal epithelial barrier and to get in contact with immune system. In studies of Perusko & col., 2018, glycation of  $\beta$ -lactoglobulin increased the content of random secondary structures, reducing its folding stability and making the polypeptide more susceptible to endolysosomal proteolytic activity. Antigens highly susceptible to endolysosomal proteases are known to possess weak capacity of T-cell priming [Egger &

col., 2011], which perfectly explain the decreased T-cell stimulation by glycated  $\beta$ -lactoglobulin observed. On the contrary, Moghaddam & col., 2014 described that stimulation of DCs with AGE-modified protein extracts from dry roasted peanuts and dry roasted Ara h 1 induced Th2-polarization via the RAGE-receptor. In this assay, the exposure to protein extracts resulted in significantly enhanced IgG and IgE responses compared to raw peanut. In the same way, glycosylated allergen Der p 1 can be recognized by DCs through specific type of receptors, increasing the allergen uptake by the DCs [Ilchmann & col., 2010, Mueller & col., 2013].

DCs are major players in tuning the fine balance between tolerance induction and active immunity [Hammad & col., 2010]. For this reason, the design of novel vaccines targeting DCs has emerged as a useful approach to improve current AIT strategies [Palomares & col., 2017; Durand & col., 2015]. In this regard, next generation vaccines formulated by coupling allergoids to nonoxidized mannan and targeting DCs through CLR represent a promising strategy for AIT [Benito-Villalvilla & col., 2018]. These next generation vaccines enhance the allergen uptake by DCs and promote healthy immune responses to allergens.

For deeply study the antigen processing and presentation the development of allergic sensitization and elicitation by DCs, murine models are frequently used. However, the genetic background of different mouse strains has an effect on the development of allergic symptoms.

## 1. TOMATO PROCESSING AND THE INVOLVEMENT IN nsLTP ALLERGENICITY

### 1.1. Glycation of tomato nsLTPs after food processing: structure and allergenicity stability

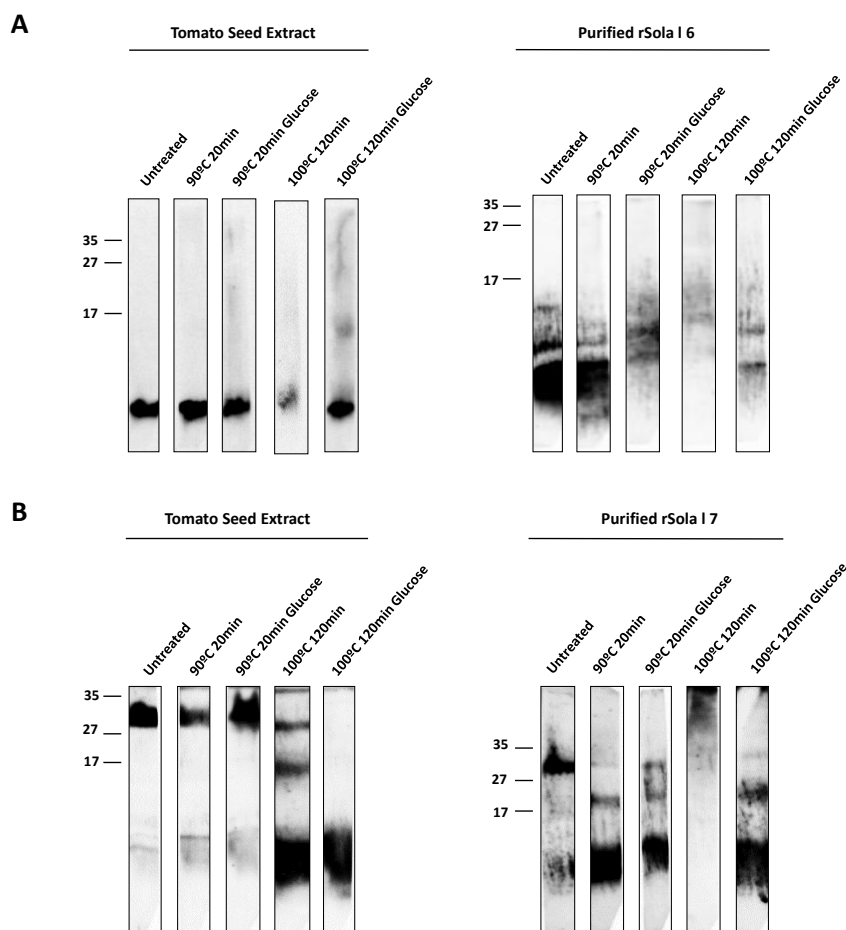
The thermal treatments (dry or wet heating) and non-thermal treatments (mechanical, enzymatic, irradiation) are carried out in the food industry in order to improve quality, preservation and food safety. After these processes, most proteins of high molecular mass lose their allergenic capacity, but the nsLTPs seem not to be altered.

The consumption of foods that contain cooked tomato or the consumption of foods with a tomato industrially processed, such as sauces, is part of our daily diet in most countries. Several studies of the effect of industrial processing on the allergenic capacity of several nsLTPs have been carried out. According to studies by Sancho & col., 2005, apple nsLTP, Mal d 3, shows a protection in the maintenance of IgE-binding capacity when it is treated with glucose for the manufacture of nectars or purees (favouring the Maillard reaction) even in severe treatments for 2 h at 100 °C, compared to the sample without sugar, where significant decrease in IgE binding (30-fold) and in its ability to induce the release of histamine in basophils (100–1000- fold) was observed.

In general, juices, nectars, purees, shakes, sauces or food compotes containing nsLTPs are not usually tolerated by sensitized patients, exhibiting the high degree of stability of these allergens to industrial processing, which together with their resistance to proteases, increases its clinical relevance [Van Ree, 2002].

For the preparation of most commercial products containing tomato, the addition of glucose is necessary for the acidity equilibrium of the fruit itself. In this way, to study the effect of certain thermal treatments carried out during the production of tomato foods on the stability and allergenicity of Sola I 3, Sola I 6 and Sola I 7, and their possible implication in Maillard reaction, two types of *in vitro* analyses, with and without the addition of 30% w/w  $\beta$ -D-glucose, were performed as is described in Materials & Methods.

For thermally processed foods such as juices, ultra-high-temperature processing (UHT) treatments are normally carried out. In this process, the use of microwaves and ultrasounds in pasteurization has proven effective in the inactivation both of the microbial population and of the enzymes responsible for the deterioration of fruit juice [Canumir & col., 2002; Tiwari & col., 2009]. To simulate this treatment, a mild heating of 20 min at 90 °C was performed. However, for the manufacturing of tomato sauces or jams, a severe heating for 2 h at high temperatures, 100 °C, is necessary. The allergenic stability of the different tomato nsLTPs during all these treatments was analysed by the immunodetection with specific pAb in 17% SDS-PAGE and subsequent transference into nitrocellulose membranes (for tomato seed extract and recombinant purified Sola I 6 and Sola I 7) (**Figure 59**), as well as in ELISA inhibition experiments (for rSola I 3, rSola I 6 and rSola I 7) (**Figure 61**).



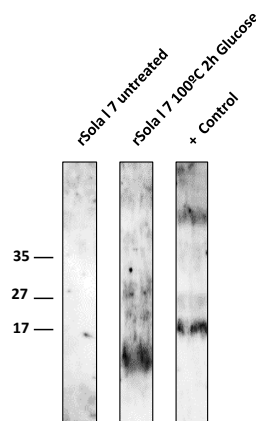
**Figure 59.** Immunoblotting assays **A.** 20 µg tomato seed extract and 2 µg of rSola I 6 under different treatments using pAb anti-Sola I 6 for detection (1:30000). **B.** 20 µg tomato seed extract and 2 µg of rSola I 7 under different treatments using pAb anti-Sola I 7 for detection (1:30000).



As shown in **Figure 59A**, the structure stability of Sola I 6 is not altered after the mild heating, while higher temperatures causes an almost total denaturation of the protein. When the tomato seed extract is subjected into the severe processing of 120 min at 100 °C, it can be observed that a small portion of Sola I 6 remains stable, whereas when the same treatment is subjected to the purified protein no band is observed. This may be due to the presence of lipids or other components in the protein extract, favouring the stability of the allergen, helping it to the structure integrity maintenance.

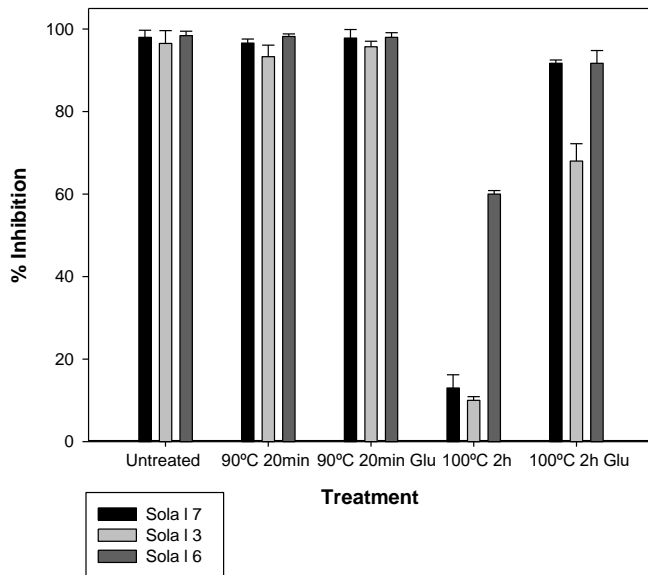
The same result is obtained with Sola I 7 (**Figure 59B**), where it also relevant the aggregation maintenance in trimer (30kDa) during the mild processing of the protein extract, observing an identical band compared to the control. However, during the severe heating, association between monomers is broken, observing a majority band of 10 kDa. When the pure recombinant protein is subjected to these *in vitro* experiments, no stability of the Sola I 7 trimeric form even at mild temperatures is observed. Like the other tomato seed nsLTP hypothesis, food matrix is of great importance for their structure and allergenic potency.

According to these preliminary results, the glycation reaction was analysed with Concanavalin A (ConA). Con A was the first lectin among others to be isolated in the pure form, being the best studied. It is synthesized in high concentration in the jack bean (*Canavalia ensiformis*) and is known to bind  $\alpha$ -glucosides, mannosides and biopolymers behaving these carbohydrate configurations as an effective ligand in the immobilization of glycoenzymes [Saleemuddin & col., 1991; Surolia & col., 1975]. As shown in **Figure 60** ConA experiments demonstrate the detection of sugars (glucose) bound by glycation to Sola I 7 treated with the long and severe processing industry method.



**Figure 60.** ConA staining of 3 µg rSola I 7 treated 120 min at 100 °C without/with 30% w/w β-D-glucose. + **Control** corresponds to 3 µg of the natural glycosylated Ole e 1 [Huecas & col., 1999].

Tomato nsLTPs present glycation when high temperatures, long processes and the presence of reducing sugars are included in the assays, favouring the formation of AGEs.



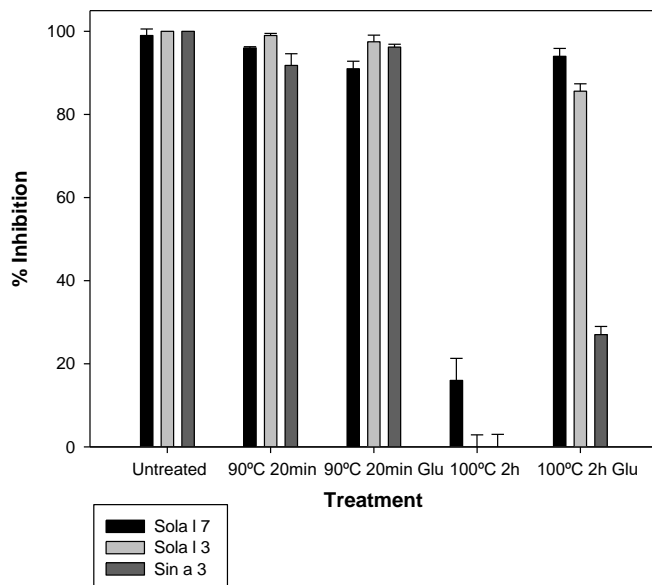
**Figure 61.** ELISA inhibition of the recognition of rSola I 3 (light grey) with the pAb at 1:200000 dilution, rSola I 6 (dark grey) and rSola I 7 (black) with pAbs at 1:30000 dilution, with 5 µg of each tomato nsLTP as inhibitor.

ELISA IgG inhibition have been performed by means of 0.2 µg/well coated of each protein, using as inhibitors allergens submitted to different treatments and detected with the specific pAb. In this way, a decrease in the percentage of inhibition can be seen, when the treatment affects in such a way that the allergen is not able to bind to the pAb, always taking the untreated protein as reference.

As can be seen in **Figure 61**, corroborating the previous results, both tomato nsLTPs class 1, either from peel (Sola I 3) or from seeds (Sola I 7) present a similar behaviour during all process, seeing a drastic loss of its structure during severe heating and maintenance in the presence of a reducing sugar. This shows that the presence of sugar during severe processing favours Maillard reaction, generating very stable AGEs that could trigger systemic allergic reactions. Sola I 6 exhibits a greater stability when is subjected to long process, reducing only a 40% of IgG binding. This may be due to the fact that nsLTP2s have a more compact 3D structure, which makes them more thermostable without the need of glucose in the medium [Samuel et al., 2002].

After the detection of IgG epitopes stability of the different tomato nsLTPs with their pAbs, ELISA inhibition tests were carried out with a pool of sera from patients allergic to Sola I 3 and Sola I 7 (pool 1 and 3, pag. 126), to determine not only the ability

to maintain their 3D structure after the food processing, but also its allergenic potential. To do this, a pool of sera that recognized the two tomato nsLTP1s was available, trying to compare the allergenicity of the allergenic tomato nsLTPs, one located in the peel and one in seeds. The IgE recognition of processed Sola I 6 could not be performed because of the lack of enough amount of positive sera available. In addition, this experiment was carried out with another nsLTP1 from yellow mustard seeds, Sin a 3 [Sirvent & col., 2012], and a pool of allergic patient sera from Hospital Universitario Fundación Jimenez Diaz allergic to mustard. Mustard seeds are presents in a multitude of additives and food sauces, often as a mixture or in combination with tomato sauce and is responsible of severe symptoms (**Figure 62**).



**Figure 62.** ELISA inhibition of the recognition of rSola I 3 (light grey), rSola I 7 (black) and rSin a 3 (dark grey) with a 1:5 sera dilution, after different treatments and 5  $\mu$ g of each nsLTP as inhibitor.

During the mild heating treatments, there are no changes in IgE recognition with any nsLTP analysed, with no significant changes respect to the untreated samples. However, during severe processing, a drastic reduction of their immunogenic capacity was observed, reducing up to 80% for Sola I 7 and totally for Sola I 3 and Sin a 3. The allergenicity of tomato nsLTP1s is maintained at similar levels than the untreated protein when allergens are subjected to the same treatment but in the presence of a reducing sugar, demonstrating once again the protective role of this because of the protein glycation.

In studies carried out by Sirvent & col., 2012, despite Sin a 3 conformational change after thermal treatment, this allergen maintained the IgE and IgG reactivity after

30 min at 95 °C, corroborating these results. However, as a novelty to those data previously shown, its allergenicity is reduced during severe treatment by almost 60% even with the presence of  $\beta$ -D-glucose, may be due to the possible protein glycation in spite of the presence of the reducing sugar.

nsLTPs heating resistance has been demonstrated for other LTPs in foods, such as the one in barley, which survives malting and brewing processes or in maize-induced food allergic reactions [Garcia-Casado & col., 2001; Pastorello & col., 2003b]. By controlled heating conditions, has been demonstrated that 160 minutes of thermal treatment at 100 °C almost totally eliminated the IgE-binding activity of the higher molecular mass bands but did not affect that of nsLTP. This observation appears of particular interest also from an immunologic point of view because although heating irreversibly alters the secondary structure of purified nsLTPs, the IgE binding to nsLTPs in heated samples is still strong. This fact suggests that linear epitopes could display an important role in the nsLTP sensitization because the primary structure is usually unaltered by physical treatment.

## **2. IgE-REACTIVITY PATTERN AFTER *IN VITRO* DIGESTIBILITY OF TOMATO SEEDS AND PEEL nsLTPs WITH SIMULATED GASTROINTESTINAL FLUIDS**

### **2.1. SDS-PAGE analysis and chromatographic profile of the *in vitro* gastrointestinal digestion resulted peptides**

Stability to heat, extreme pH, and proteolysis constitute shared features among many allergenic proteins, because their bioavailability is influenced by resistance to food processing and digestion [Breiteneder & col., 2005b]. Whereas digestibility is not a consistent predictor of food allergenicity, proteins with the capacity to induce sensitization and elicitation of an allergic response must retain, after digestion, structural integrity enough to induce T-cell differentiation and IgE-mediated activation of effector cells [Ruiter & col., 2012a].

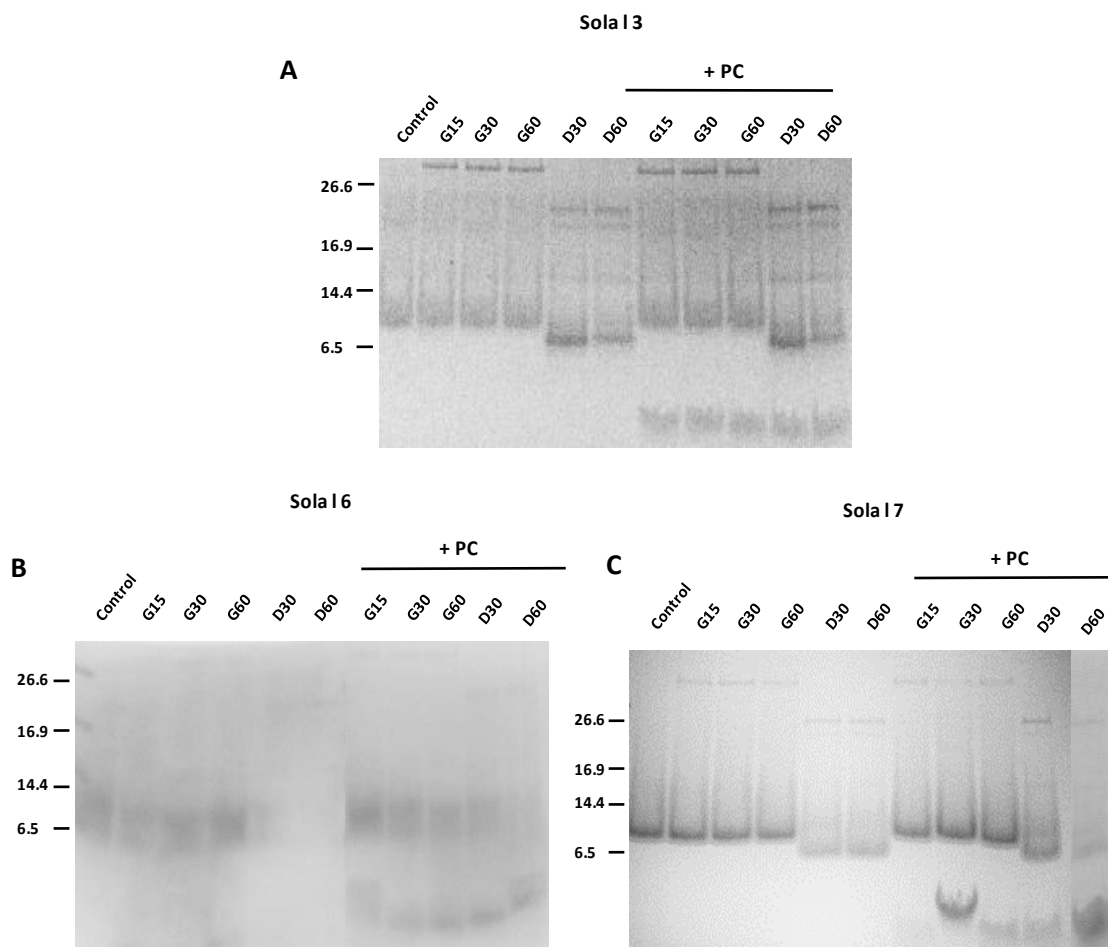
So far, studies investigating the gastrointestinal stability of tomato nsLTPs allergens have been performed *in vitro* by the use of enzymes of bovine or porcine origin as part of different digestion models, such as physiologically relevant systems where subsequent gastric and duodenal digestions are conducted under conditions that mimic *in vivo* processes [Dupont & col., 2010].

For some allergenic proteins, such as peanut allergens, it has been shown that the food matrix, especially rich in lipids, can affect the resistance to digestion and therefore the immune responses [Van Wijk & col., 2005]. These studies have highlighted the effect of not only the enzyme ratio, pH and concentration of physiological surfactants, but also the presence of lipids like PC and bile salts on gastrointestinal stability and their influence in the resulting immunoreactivity of the digests. We have previously shown that PC, a lipid secreted by the gastric mucosa, interacts with other allergens including nsLTPs slowing its breakdown during *in vitro* simulated gastric digestion and providing a slight protective effect on duodenal digestion [Moreno & col., 2005a; Vassilopoulou & col., 2006].

The strength of interaction partly depends on hydrophobic interactions, as reflected by the dependence on lipid type and alkyl chain length [Zhang & col., 2006]. Several food allergens are able to bind lipids and among them, the proteins of nsLTP family and therefore, tomato nsLTPs, present a lipid-binding cavity in their 3D structure, and so the study of their resistance to degradation by gastric and duodenal enzymes with and without the presence of this phospholipid is of great relevance due to a possible protective role in the degradation. Gastric and duodenal pH is essential for protein digestion. Since gastric digestion is performed in an acidic environment, recent studies by Zhang & col., 2007 have shown that  $\beta$ -lactoglobulin undergoes a structural transition on interacting with lipids indicated by a loss of  $\beta$ -sheet and an increase in  $\alpha$ -helix, being more pronounced at neutral pH. This pH also affects the oligomerization of this allergen which exists as a dimer at basic and neutral pH, and as an octamer at acidic pH values between 4 and 6. However, no secondary structure changes dependent on pH values have been observed in any of the tomato peel or seeds nsLTPs.

*In vitro* gastric and duodenal digestions were performed according to Moreno & col., 2005 with some modifications [Jiménez-Saiz & col., 2013]. For gastric digestions,

simulated gastric fluid (pH 2.0) containing phospholipid vesicles was prepared by dissolving PC as described Martos & col., 2010 and incubated with tomato nsLTPs during 60 min. Duodenal digestions were performed on the 60-min gastric digests re-adjusted to pH 6.5. The *in vitro* digestion of 13 mg of Sola I 3, Sola I 6 and Sola I 7 without PC and 2 mg of these nsLTPs with PC was carried out according to Materials & Methods. After SDS-PAGE separation on Precast Criterion 16.5% Tris-Tricine gels under reducing conditions ( $\beta$ ME), gastric and duodenal digestion of the three tomato nsLTPs are presented in **Figure 63**.



**Figure 63.** Patterns of 16.5% SDS-PAGE under reducing conditions of (A) Sola I 3 (B) Sola I 6 and (C) Sola I 7 after *in vitro* gastric and duodenal digestions with simulated gastrointestinal fluids. Control, nsLTP without digestion, G15 (gastric digestion 15 min) G30 (gastric digestion 30 min), G60 (gastric digestion 60 min), D30 (duodenal digestion 30 min), D60 (duodenal digestion 60 min). +PC indicates the incubation of each digest with this phospholipid.

A 60-min *in vitro* gastric digestion, either with PC or not, did not show any effect on the three tomato nsLTPs. As can be seen in the SDS-PAGE, a band of around 9-10 kDa is observed in the Sola I 3 and Sola I 7 digestions (**Figure 63A and 63C**), while one of about 7 kDa is shown in the digestion of Sola I 6 (**Figure 63B**), with no differences respect the control and corresponding to their respective molecular masses. Regarding *in vitro* duodenal digestions, the two tomato nsLTP1 allergens also showed similar trends. Even though, part of both proteins was found integrally showing a band of about 9-10 kDa, Sola I 3 and Sola I 7 were quickly partially degraded in the early stages of digestion into a fragment with molecular mass of around 6.5 kDa with no electrophoretic mobility differences between absence or presence of PC. On the other hand, although during the duodenal digestion of Sola I 6 no residual protein was observed by the end of this procedure, the digestion with PC allows the maintenance of the protein until at least the first 30 min of digestion.

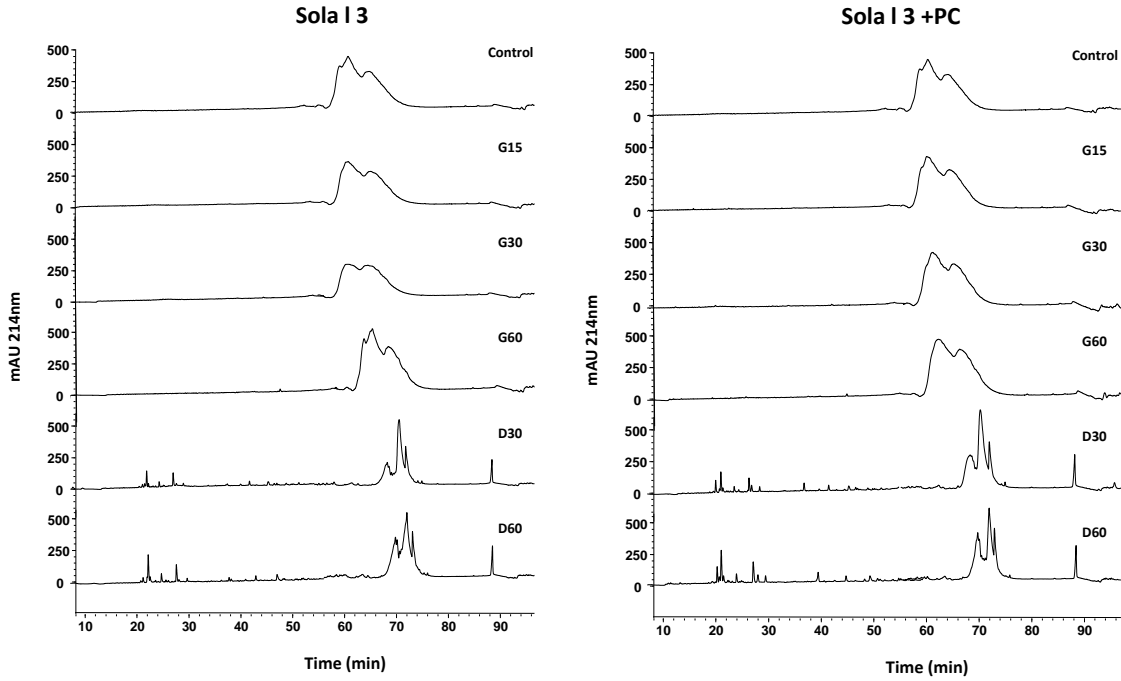
*In vitro* digestions carried out with human fluids [Benedé & col., 2014] yielded basically the same profile than simulated fluids, but progressed more rapidly, where the major cow's milk allergen  $\beta$ -casein was no longer present after 2 min of gastric digestion, comparing with 10 min for the simulated gastric fluids.

Although minimal degradation bands were detected by SDS-PAGE in the duodenal digests of Sola I 3 and Sola I 7, as estimated by the number and intensity of the small or hydrophilic peptides with low retention time and changes in the main peak corresponding to the allergen in the RP-HPLC analyses (**Figure 64**), hydrolysis during this phase is produced. Corroborating the SDS-PAGE results for Sola I 6, total degradation during duodenal *in vitro* digestion was obtained.

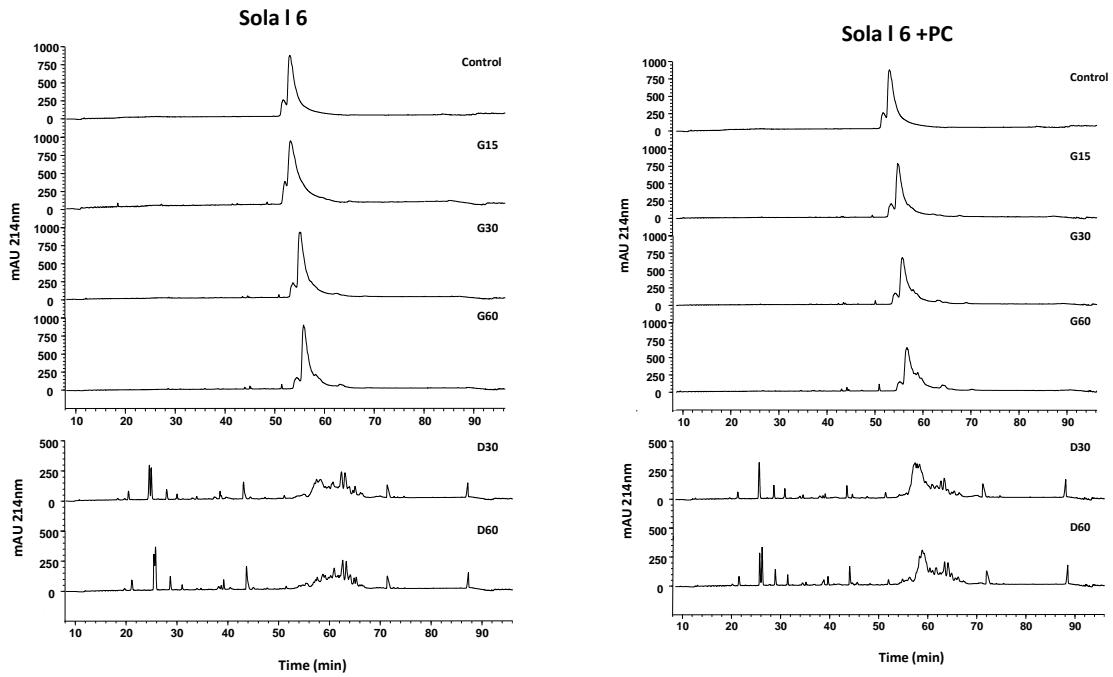
Compared to the controls, Sola I 7 is the tomato seeds allergenic protein that shows greater stability after gastric and duodenal digestion. In the case of the other tomato seed allergen, Sola I 6, a stable peak is observed both in shape and size during gastric digestion, which is totally degraded in numerous small peptides when duodenal fluids are used. Sola I 3 presents a chromatographic profile with a more expanded peak without showing significant changes during gastric digestions compared to pre-digestion protein control. However, in the chromatographic profiles of duodenal digestions, a split

in several higher peaks is observed. Chromatographic profiles of duodenal digestions in the presence of PC, exhibit a protective role against degradation.

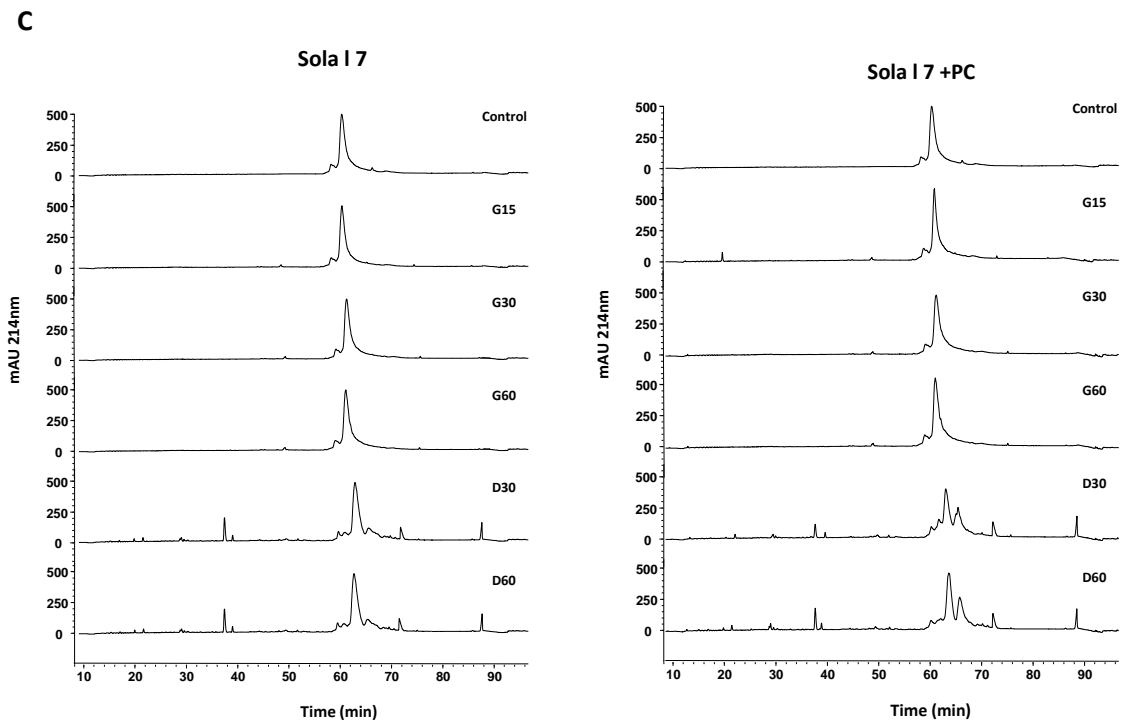
**A**



**B**







**Figure 64.** RP-HPLC analysis of tomato nsLTPs digestion products. Digestions were performed in the absence or presence of PC (+PC). **A.** Gastrointestinal digestion of nsLTP1 tomato peel allergen Sola I 3; **B.** Gastrointestinal digestion of nsLTP2 tomato seed allergen Sola I 6; **C.** Gastrointestinal digestion of nsLTP1 tomato seed allergen Sola I 7.

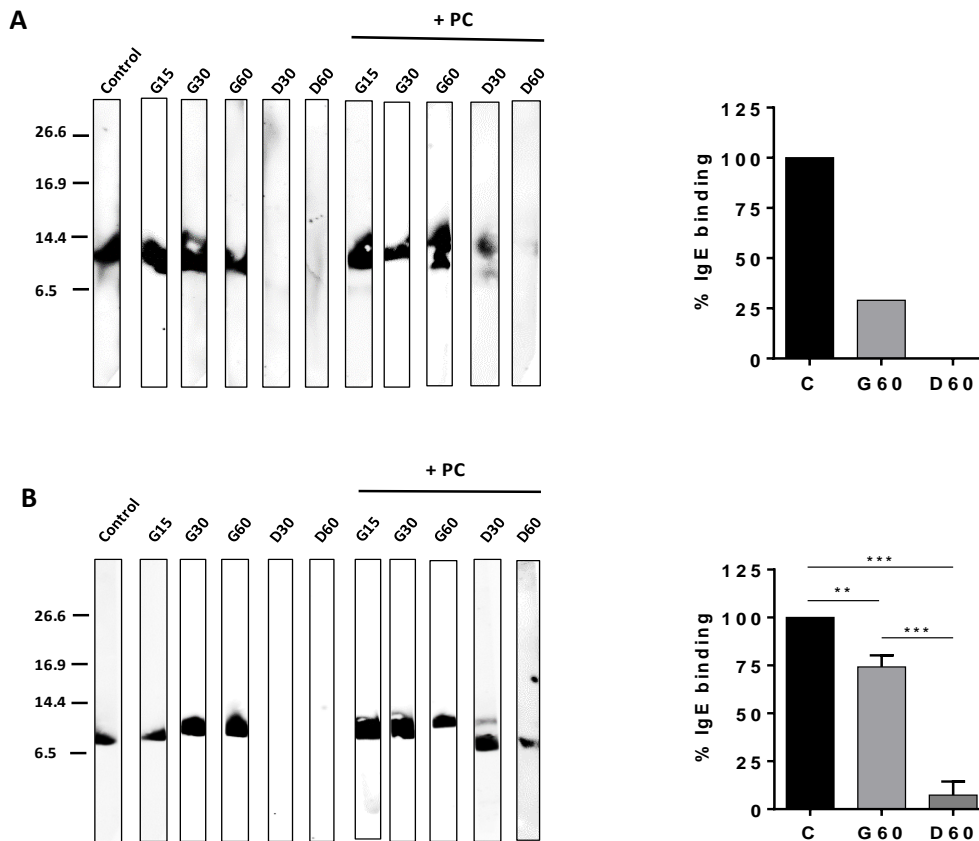
## 2.2. Allergenic potency of tomato nsLTPs after *in vitro* digestion

IgE reactivity against the degradation products of Sola I 3 and Sola I 7 was evaluated by immunoblotting and ELISA inhibition using a pool of sera from 5 and 7 tomato allergic patients (pool 1 and 3, pag. 126), respectively (**Figure 65**).

These experiments show that the immunoreactivity of Sola I 3 at the end of gastric digestion decreases to values of around 25% inhibition while Sola I 7 retains more IgE reactivity, showing an allergenicity reduction of 25%. IgE binding fell drastically at the end of the duodenal phase of the *in vitro* digestion. During the first 30 min of duodenal digestion with PC, IgE recognition is observed in the 10 kDa band, disappearing completely over time. In the case of Sola I 7, with the presence of PC a peptide resulting from the digestion (6.5 kDa) remains immunoreactive even after 60 min of duodenal digestion, although the integral protein fragment after gastric digestion is not recognised by patients' sera. It is, therefore, likely that this degradation product contributed to the residual IgE binding of the consecutive digests. The fact that the ELISA test shows a 7% inhibition in the Sola I 7 duodenal digestions but no recognition is

observed in immunoblotting, may be due to the fact that the first technique is more sensitive, being exposed all the conformational IgE epitopes presented in this allergen.

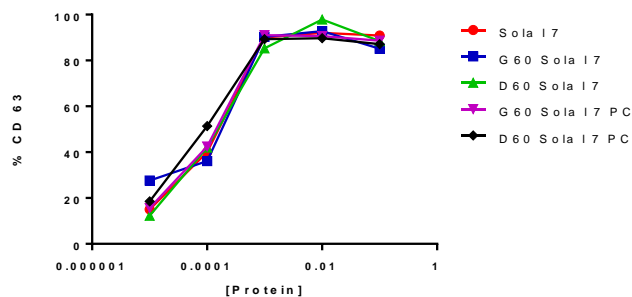
Generally, the IgE binding of the proteolytic fragments released by pepsin during the first stages of *in vitro* gastric hydrolyses was progressively reduced as the digestions proceeded.



**Figure 65.** Immunoblotting and ELISA inhibition of Sola I 3 (**A**) and Sola I 7 (**B**) after *in vitro* gastroduodenal digestions. Electrophoresis was performed using Tris-tricine 16.5% acrylamide gels under reducing agent. ELISA inhibition experiments were performed with 2.5 µg/ well coated protein, 1:10 dilution sera for Sola I 3 pool 3 and 1:15 for Sola I 7 of pool 1 and digest (Control, G60 and D60) serial dilution used as inhibitors. Control, nsLTP without digestion, G15 (gastric digestion 15 min) G30 (gastric digestion 30 min), G60 (gastric digestion 60 min), D30 (duodenal digestion 30 min), D60 (duodenal digestion 60 min). +PC indicates the incubation of each digest with PC.

Even if there is not a consensus on the physiologically representative enzyme-to-protein ratios that should be used in an *in vitro* digestibility study, digestion systems were standardised in terms of their protease activity on the basis of previously proposed physiologically relevant models [Lyons & col., 2011].

Thus, although the theoretical predictions of enzymatic cleavage points are very similar among the three allergenic tomato nsLTPs analysed (*Peptidecutter/Expasy*), in the *in vitro* studies performed, Sola I 6 is the most susceptible to degradation, while Sola I 7 remains the most resistant one, presenting at least an immunogenic fragment of about 6 kDa, able of being recognized by the sera of the patients via gastrointestinal tract. In this way, trying to study in-depth the repercussion of the digestion of this food allergen on its allergenicity, the allergenic capacity of the purified recombinant Sola I 7 and Sola I 7 digests with and without the presence of PC was finally evaluated *ex vivo* by performing Basophil Activation Test in a tomato allergic patient (serum 4) displaying severe symptoms as anaphylaxis (**Figure 66**).



**Figure 66.** BAT of recombinant Sola I 7 and its gastric (60 min) and duodenal (60 min) *in vitro* digestions with and without PC.

As it is shown in the figure, 60 min duodenal digestion of Sola I 7 does not affect the allergenicity pattern of the protein, being similar to the control, even without PC incubation. This result makes Sola I 7 an important allergen in the patient's sensitization, showing a high immunogenicity to resist both severe heat treatments in the presence of sugars, and the digestion of the food itself.

Besides the intrinsic susceptibility of an allergen to enzymatic degradation, the protein source itself influences stability to gastrointestinal protein digestion patterns. The activity of lingual, gastric and pancreatic lipase may play a significant role in allergen digestion and absorption. Due to exposed hydrophobic structures on allergens, lipids frequently interact with allergens [Bublin & col., 2014]. Interaction with physiological surfactants, such as phospholipids and bile salts, plays a key role in protein digestion [Mackie & col., 2010]. PC, a phospholipid secreted by the gastric mucosa that was included in our simulated gastric system, has been shown to hinder proteolysis of  $\beta$ -lactoglobulin [Mandalari & col., 2009]. Bile acids, that solubilise dietary fats, particularly lipolysis products of triglycerides through the formation of mixed micelles with

phospholipids and fatty acids, also facilitate the proteolysis by means of pancreatic enzymes of several dietary proteins [Gass & col., 2007; Martos & col., 2010], probably due to prolonged fasting in certain circumstances. However, considering the low concentration of bile acids present in the human duodenal fluid, it is not likely that it could favour the duodenal proteolysis of the bigger peptides generated by pepsin hydrolysis [Kalantzi & col., 2006].

Interaction between proteins, bile salts and PC phospholipids in our duodenal digestion system, which were present exclusively as mixed micelles, is a topic of great interest. Even if the allergen inserts into phospholipid vesicles during the simulated digestion, seems not to be the cause of the protective effect seen during the duodenal phase. Studies with  $\beta$ -lactoglobulin shown that when the loss of the  $\alpha$ -helical structure is thermally induced, the protective effect of PC resulted abolished. Therefore, such interactions should take place via the secondary fatty acid binding site in the hydrophobic groove along the single strand of  $\alpha$ -helix found in the protein [Mandalari & col., 2009].

Specific lipid binding is common for nsLTPs or Bet v 1 homologues, as well as  $\beta$ -lactoglobulin [Petersen & col., 2014]. It was recently shown that ligands binding to nsLTPs can have different effects on the *in vitro* digestibility. Simulated enzymatic digestion has been carried out for several nsLTPs, such as peach [Cavatorta & col., 2010; Abdullah & col., 2016], apple, cherry, grape [Vassilopoulou & col., 2006] or wheat, in most cases, binding of lipids to nsLTPs increases resistance to digestion. This was for instance shown for peach and sunflower seeds nsLTP [Berecz & col., 2013], whereby tertiary structure of nsLTP is stabilized against digestion when PC was added *in vitro* [Pali-Schöll & col., 2018]. The stable tertiary conformation of nsLTPs makes these allergens extremely resistant to thermal or enzymatic degradation and is thought to be one of the most important factor contributing to the severe systemic reactions in allergic patients [van Ree, 2002] and could be responsible for the observed clinical cross-reactivity [Aalberse, 2007; Fernandez-Rivas, 2009a]. This relevance of the 3D structure maintenance is demonstrated by Toda & col., 2011, when a Pru p 3-like folding variant was generated by means of disruption of disulfide bonds on reduction and alkylation (R/A Pru p 3) and was investigated for structural integrity and stability against gastrointestinal digestion comparing with native one. They described that R/A Pru p 3

was completely degraded after 5 minutes of *in vitro* gastric digestion and with 1 hour of trypsin treatment, its resistance to gastrointestinal proteolysis is dramatically reduced. The known resistance to pepsin digestion of a properly folded nsLTP, [Asero & col., 2000] would allow maintaining their allergenic motifs and thus its interaction with the immune system associated with the gastrointestinal epithelia, thereby inducing both sensitization and systemic symptoms observed in allergic patients [Scheurer & col., 2004]. These characteristics make them true food allergens, since they can sensitize the patient directly in the gastrointestinal tract [Poulsen, 2005]. Although the sensitization pathways of nsLTPs via the gastrointestinal tract are still not fully understood, resistance to pepsinolysis has been incorporated into the decision tree assessment for potential allergenic risks posed by novel foods [Thomas & col., 2004]. In contrast, *in vitro* gastroduodenal digestion of wheat nsLTP is enhanced after lipidic ligand binding. After 120 min of digestion only 30% of the protein with a ligand remained intact compared to 80% of the protein without ligand bound. While the cleavage pattern remains the same, the rate of proteolysis is accelerated. In this case, the lipid, not only does not stabilize the three-dimensional structure, but also increases the flexibility of a tyrosine residue by shifting it from the hydrophobic cavity, exposing the cleavage site to enzymes [Palacin & col., 2009].

Other properties of the food matrix influence the susceptibility of proteins to digestive enzymes [Di Stasio & col., 2017; Schulten & col., 2011a]. For example, a food matrix rich in protein, carbohydrates and fat was shown to influence the digestion of three different allergens, Mal d 1, Bos d 5 and Cor a 8.

The data presented in this study draw attention to interactions between allergens and other food components, especially lipids, which may affect the allergenicity of protein sensitising via the gastrointestinal tract and proteolytic fragments generated during digestion.

### 3. MIELOID DENDRITIC CELLS (mDCs) UPTAKE OF TOMATO nsLTPs AND LYSOSOMAL ENZYME DEGRADATION RESISTANCE.

To be recognized by T lymphocytes, protein antigens must be converted into short peptides bound to MHC molecules, which are displayed on the surface of APCs. The ability of these cells to generate peptides is, therefore, essential to the initiation of the immune response [Banchereau & col., 1998; Garcia & col., 2005].

Antigenic peptides are produced by lysosomal proteolysis, and, thus, efficient lysosomal degradation is often assumed to improve production of ligands for MHC class II molecules. Differences in immunogenicity between antigens are poorly understood and, therefore, approaches to induce antigen-specific immunity remain largely empirical, mostly from *in vitro* experiments [Antoniou & col., 2000].

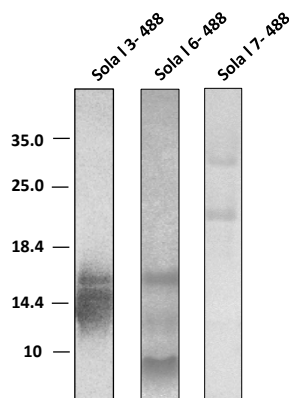
DCs can take many hours or days to cross from the periphery to lymphoid organs where they engage their cognate T cells to initiate immune responses. Therefore, antigen persistence provides a source of antigen for sustained processing and presentation by DCs within secondary lymphoid organs and, potentially, presentation of intact antigenic structures to B cells [Itano & col., 2003; Wykes & col., 1998]. Although the production of peptide–MHC class II complexes from an allergen may not always be favoured by restricting digestion, the enhanced dissemination and persistence of stable antigens should consistently contribute to immunogenicity. In this way, more resistant antigens may have a greater chance of surviving the digestive environment inside lysosomes contributing to the enhancement of antigen cross-presentation [Delamarre & col., 2005].

Functionally, splenic CD11b<sup>+</sup> DCs are potent inducers of CD4<sup>+</sup> T-cell proliferation [Dudziak & col., 2007]. Major advances have been made in the alignment of human and mouse DC subsets, supporting the notion of a parallel organization of the DC system in the two species. Mouse CD8a<sup>+</sup> /CD103<sup>+</sup> DCs, which are related to human CD141<sup>+</sup> DCs, with conserved abilities for cross presentation and Th1-polarization, underlining their crucial role against intracellular pathogens, and on the other hand, murine CD11b<sup>+</sup> DCs are related to human CD1c<sup>+</sup> DCs, both exhibiting Th2 and Th17- polarizing capabilities, underlining their crucial role against extracellular pathogens [Schlitzer & col., 2014].

### 3.1. *In vitro* binding and mDCs uptake of Sola I 3, Sola I 6 and Sola I 7

In order to study the allergen binding and uptake differences, and therefore possible immunogenicity between tomato allergens described in this thesis, myeloid dendritic cells derived from murine bone marrow of 8-week-old female BALB/c mice were isolated and cultured, as described in Materials & Methods section. After eight days of culture with the addition of the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), a population CD11c+, CD11b+ was identified, which polarize Th2 responses, crucial for the pathogenesis of allergy.

Fluorescence-labeled tomato allergens with AlexaFluor 488 succinimidyl ester, allows detection of binding and possible internalization of these antigens to dendritic cells by protein labelling through Lys residues and analysed by flow cytometry. **Figure 67** shows the pattern of bands of each AlexaFluor 488-Sola I 3, Sola I 6 and Sola I 7.

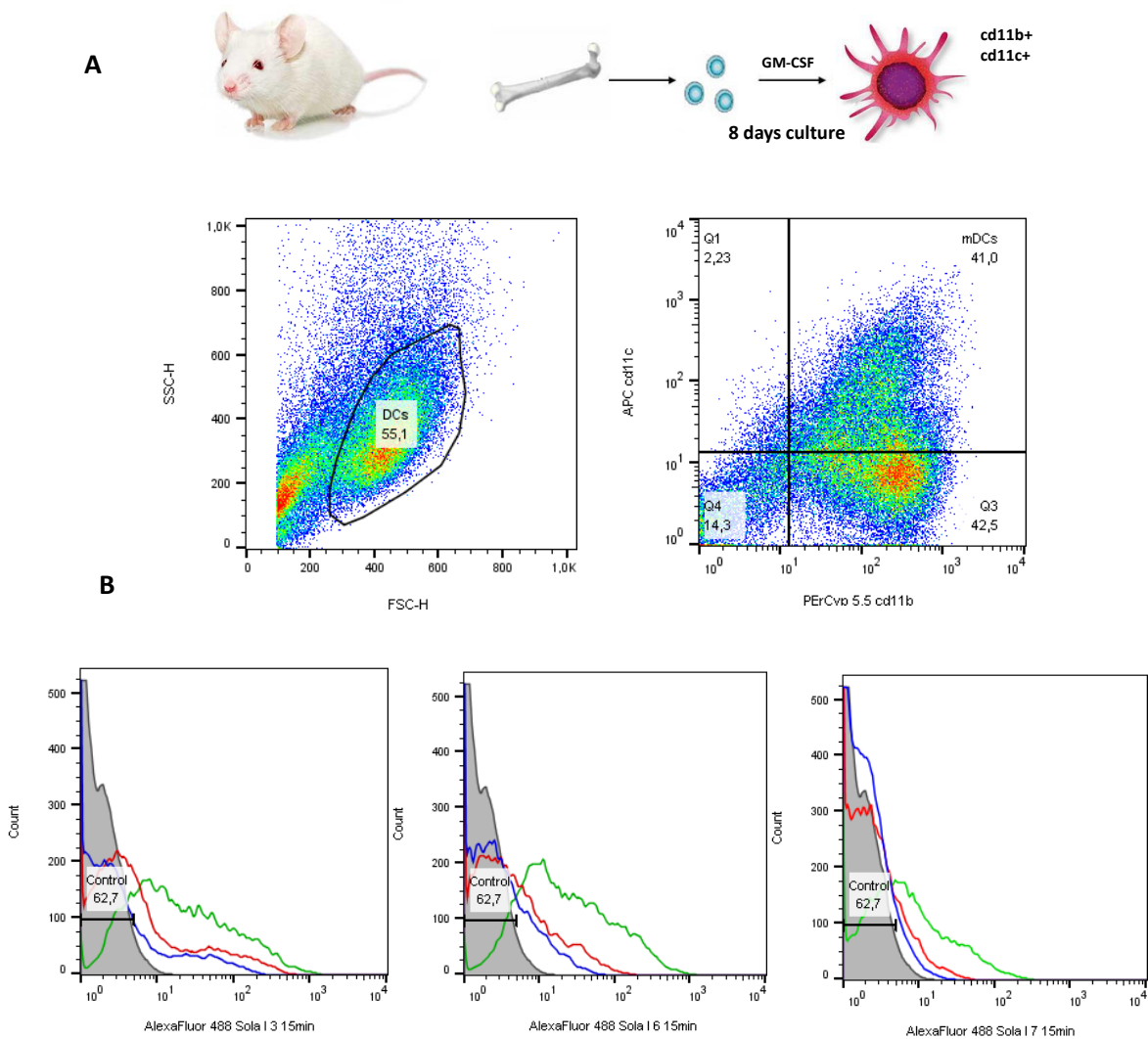


**Figure 67.** 17% SDS-PAGE of recombinant tomato nsLTPs labeled with AlexaFluor 488

As can be seen in the SDS-PAGE, the labeling of Sola I 3 does not cause any difference in the electrophoretic mobility of the protein, showing the double band of about 17 kDa characteristic of the recombinant form. In the case of Sola I 6-AlexaFluor 488, apart from the monomer of 7 kDa, a band of about 17 kDa can be seen. Finally, Sola I 7 labeled with the fluorophore presents the electrophoretic mobility characteristic of the dimer (20 kDa) and trimer (30 kDa), characteristic of this tomato seeds nsLTP1 allergen, although the monomer cannot be identified. These differences may be due to the affinity of the fluorophore for each of the allergens, accentuated with the low labeling performance of Sola I 7 maybe due to the reduced accessibility in the trimeric

molecule and the number of Lys in the primary sequence, only 3 comparing with 7 Lys residues in Sola I 3.

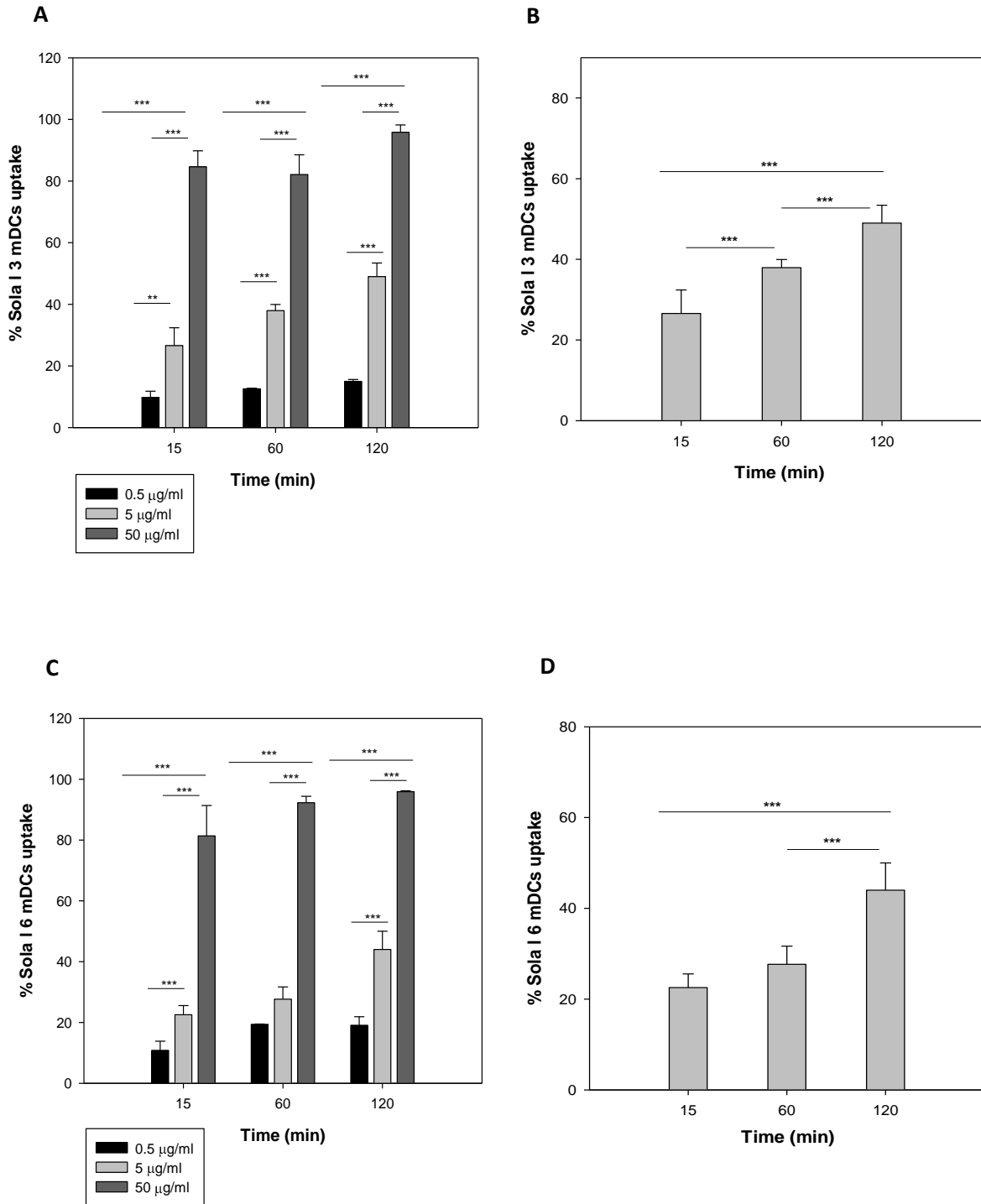
In addition, the myeloid dendritic cells were differentiated and cultivated during 8 days, after which allergens uptake at different concentrations (0.5, 5 and 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) and incubation times (15, 60 and 120 min) was carried out.

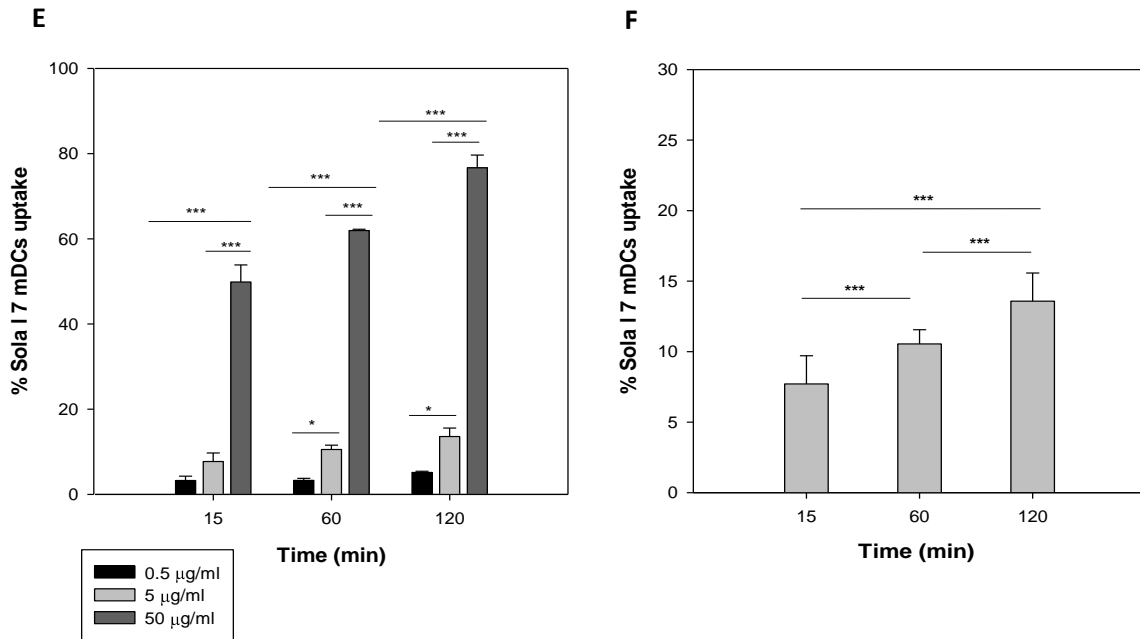


**Figure 68.** Flow cytometry analysis of tomato nsLTPs internalization by mDCs. Differentiated mDCs were incubated with 3 different concentrations (0.5 (blue line), 5 (red line) and 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (green line)) of AlexaFluor 488-Sola I 3, Sola I 6 and Sola I 7 at 37  $^{\circ}\text{C}$  and at three different times (15, 60 and 120 min). **A.** Schematic diagram of mDCs culture and identification of the population of interest by flow cytometry (CD11b+, CD11c+). Percentage of positive mDCs is indicated in the upper right corner of the scattergram **B.** Flow cytometry uptake assay of Sola I 3, Sola I 6 and Sola I 7 labeled with Alexa Fluor 488 by mDCs after 15 min of incubation.



In these figures, a dose-dependent uptake manner is exhibit in the three experiments, confirmed with the statistical analysis performed using IBM SPSS with all the conditions (**Figure 69**).





**Figure 69.** % of internalization of Sola I 3 (A), Sola I 6 (C) and Sola I 7 (E) by mDCs at different allergen concentrations (0.5, 5 and 50 µg/ml) and time points (15, 60 and 120 min). Percentage uptake comparison of 5 µg/ml allergen concentration between different incubation time points are represented in histogram (B) for Sola I 3, (D) for Sola I 6 and (F) for Sola I 7 ( $n = 3$ ). \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.005$ .

As can be seen, Sola I 7 is the allergen that presents the minor internalization, or at least less binding to the mDCs surface (13% at 60 min of incubation with 5 µg/ml) (Figure 69E). Although due to its oligomeric structure (dimer and trimer) a greater internalization could be expected, these results could be due to the poorly allergen labeling with AlexaFluor 488, as it has been commented previously. However, this internalization is greatly increased when maximum concentrations of 50 µg/ml are used, reaching up to 80% capture by mDCs. Analysing the internalization capacity of the tomato peel nsLTP, Sola I 3, a perfect trend is exhibited, with values of up to 30% in only 15 min of incubation, up to the capture of this allergen by almost 100% of the mDCs when incubations of 120 min and maximum concentrations are used (Figure 69A). Finally, Sola I 6, the tomato seeds nsLTP2 shows similar values to those of Sola I 3. However, no differences are observed in the percentage of uptake between 15 and 60 min of incubation, showing the increase after 120 min (Figure 69C). This could be due to a lower affinity of this allergen and therefore, a lower ability to be internalized by dendritic cells despite long incubation periods.

The % uptake progressively increased from 15 to 120 min of allergen incubation, demonstrating that Sola I 3 and Sola I 7 uptake by mDCs was time-dependent (**Figure 69B and 69F**). Interestingly, the increase in the internalization of both allergenic tomato nsLTP1 was significant at every time point, with a robust significant increase at 120 min ( $p < 0.001$ ), in contrast, the increase in the internalization of Sola I 6 was only significant after 60 min of allergen incubation (**Figure 69D**).

In addition to analysing the mDC & uptake of each tomato nsLTPs, a study of the fluorescence intensity has been carried out, determined as "mean". This parameter indicates the amount of each allergen (fluorescence) per cell, measure by arbitrary units (a.u). Thus, it can be concluded that the two tomato seeds nsLTPs (Sola I 6 and Sola I 7) present a comparable fluorescence intensity in each of the times and concentrations analyzed, exhibiting values of  $19.3 \pm 0.7$  a. u for Sola I 6 and  $17.34 \pm 1.0$  a. u for Sola I 7 with 5  $\mu\text{g/ml}$  and 15 min incubation. However, the pulp and peel nsLTP Sola I 3 shows up to 2.5 times more fluorescence intensity with respect to those of seed, ascending up to values of  $49.79 \pm 2.5$  a.u for same conditions.

Although a direct comparison between different nsLTPs is difficult since the internalization efficacy depends on several parameters, comparing the percentage of internalization by dendritic cells and the fluorescence intensity "mean" of the three allergenic tomato proteins analysed at different incubation times and at a standard concentration of 5  $\mu\text{g/ml}$ , we can see how Sola I 3 is the tomato nsLTP with the greatest capacity to be internalized at any of the times studied. These results demonstrate once again the already described great allergenicity of Sola I 3, which being primary sensitizer or through cross-reactivity with other nsLTPs, is capable of triggering severe allergic reactions. However, the fact that Sola I 6 shows a greater capacity of internalization by mDCs than Sola I 7 and a similar fluorescence intensity, indicates that this is not the only reason for a great immunogenic capacity, but in previous sections it has been demonstrated its low mDCs affinity with no time-dependent trend for this nsLTP2, which is totally degraded during gastrointestinal digestion. It could be thought that a little amount of intact protein or at least peptides with antigenic capacity, could be captured by the antigen-presenting cells of the intestinal mucosa and therefore trigger Th2

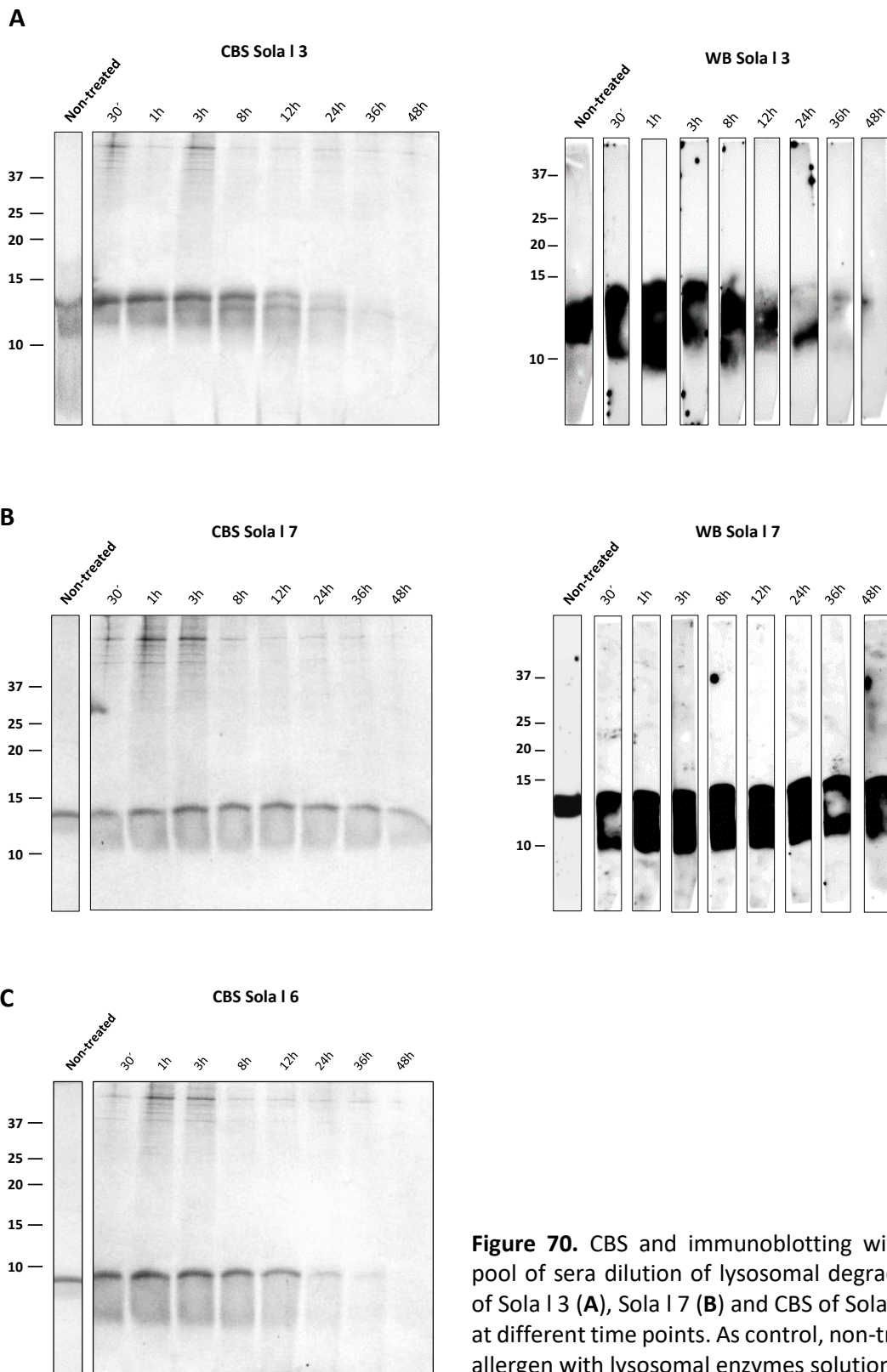
response. This leads us to think of its low allergenicity, corroborated by the low percentage of positive sera at Sola I 6.

A previous study by Allam & col., 2010 and Ashjaei & col., 2015 showed that the aeroallergen Phl p 5 and nsLTP from sunflower seeds (Hel a 3) binding to immature dendritic cells are dose and time-dependent with concentrations of 1, 2.5, 5, and 10 µg/ml for 5, 10, 30, 60, and 120 min incubation at 37 °C. At concentrations lower than 10 µg/ml for Phl p 5, almost no allergen uptake could be detected, not the same with Hel a 3. Although a further increase of Phl p 5 concentrations from 10 to 50 µg/ml increased uptake of this grass pollen allergen at 10, 30, and 60 min, these results suggest the strong allergenicity exhibit by nsLTPs.

### 3.2. Lysosomal processing of allergenic tomato nsLTPs

After the binding and allergen internalization by the dendritic cells, it is necessary their processing by the lysosomal enzymes of these APCs in order to present the protein fragments to T cells through MCH Class II. These epitopes with immunogenic capacity, are which therefore triggers the allergic response. In this way, the most resistant proteins to this acidic environment and to the degradation of the enzymes located in lysosomes will be able to maintain intact conformational and linear T epitopes.

Trying to analyse the lysosomal degradation resistance of these tomato allergens, the purification of the lysosomal enzymes of the previously differentiated dendritic cells and their quantification by BCA and visualization in 17% SDS-PAGE was performed. The incubation of 2.5 µg of each of the tomato nsLTPs was carried out with 3.5 µg of lysosomal enzymes during 30 min, 1 h, 3 h, 8 h, 12 h 24 h, 36 h and 48 h at 37 °C and subsequent enzymatic inactivation with 5 min at 95 °C. After each time point, the results of the resistance of Sola I 3, Sola I 6 and Sola I 7 to degradation by lysosomal enzymes were visualized by means 17% SDS-PAGE and subsequent CBS. In addition, immunodetection assays for Sola I 3 and Sola I 7 with a pool of sera from patients allergic to these nsLTP1 (pool 3 and pool 1, respectively) were carried out (**Figure 70**).



In the lysosomal enzymes' degradation tests done with Sola I 3 and despite the protein diffusion into the gel, a low molecular mass band corresponding to the allergen without undergoing an incubation process, is stable until 3 h, from when it is split into

two bands which are displayed until 24 h of degradation. The same results can be found in the IgE immunoblotting, where the band with the lowest molecular mass resulting from this splitting, mentioned above, maintains its allergenicity up to a maximum of 24 h.

On the other hand, according to these experiments, the full-length monomer Sola I 7 is the most stable nsLTP to lysosomal degradation. As shown, the protein remains stable without suffering apparent degradation after 48 h of incubation and without losing allergenicity. This is not the case of Sola I 6, where after 12 h of incubation, a great degradation is observed.

Different nsLTPs were subjected to these endolysosomal degradation assays. Delamarre & col., 2006 showed the endolysosomal degradation of Cor a 8 and Pru p 3, to complement T-cell activation studies. At defined time intervals, lysosomal degradation was monitored by SDS-PAGE, where Cor a 8 remained detectable for up to 5 h whereas the whole Pru p 3 protein was visible for up to 24 h [Schulten & col., 2009b; Tordesillas & col., 2009; Pastorello & col., 2010]. These immunological analyses demonstrated that Pru p 3 dominates the immune response to Cor a 8, supporting the clinical evidences that have suggested a primary sensitizer role for the nsLTP from peach in the sensitisation to other food nsLTPs [Hartz & col., 2010]. According to Toda & col., 2011, almost all of the native Pru p 3 was digested at 48 hours, but the unfolding of Pru p 3 influences its processing in antigen-presenting cells, being degraded after 3 h. However, both digestions render similar peptide clusters.

Other allergens, have been studied and in this way, Bet v 1 has also been demonstrated to dominate the cellular and IgE responses to other members of the Bet v 1-family [Bohle & col., 2005]. It contains one immunodominant T-cell-activating region important for cellular cross-reactivity with its homologs and shows limited susceptibility to endolysosomal processing.

In addition to other many considerations, slow endolysosomal degradation may contribute to the high allergenic potential. In this study, tomato seeds nsLTP class 1, Sola I 7 resulted stable after 48 h of degradation, demonstrating its clinical importance as a

possible allergen causing severe and unexpected allergic reactions due to its location in the fruit.

However, sensitization to other less stable nsLTPs to lysosomal degradation such as Sola I 6 cannot be ruled out under certain circumstances, e.g. an immature gastrointestinal immune system or when not exposed to Pru p 3 [Flinterman & col., 2008; Schulten & col., 2011b]. This could be a plausible explanation about why this allergen sensitizes to a small part of allergic population.

Taking into consideration all these data, in this chapter an *in vitro* study of each of the steps that a food allergen has to go through once is uptaken by and allergic individual has carried out. From the study of resistance to severe thermal processing, through stability to gastrointestinal degradation, and finally the ability to bind to APCs and their subsequent resistance to being degraded by the lysosomal enzymes they contain. All are crucial steps that an allergenic protein has to undergo, rendering the maintenance of T and B-cell epitopes with immunogenic capacity. Overlooking these results, Sola I 3 and Sola I 7, the allergenic tomato nsLTP1s, show a greater resistance to the enzymatic degradation both by digestive enzymes (gastric and duodenal) and lysosomal enzymes located in dendritic cells. This is not the case with Sola I 6, which is degraded rapidly, even in the presence of phospholipids such as PC. Although Sola I 6 shows a higher thermal resistance, due to presenting a more compact 3D structure typical of nsLTP2s, the fact that in the presence of a reducing sugar and subsequent Maillard reaction, Sola I 3 and Sola I 7 are also stable at severe processes (100 °C, 2 h), makes nsLTP1s of both tomato peel and seeds, more allergenic proteins, being recognized by a greater number of patients sensitized to this *Solanaceae* member. Demonstrating that under the Maillard reaction and concretely, the mannose receptor is involved in the enhanced capacity of monocyte-derived DCs to take up and internalizes roasting Ara h 3, Cabanillas & col., 2018a showed that this internalization was significantly enhanced in comparison with raw Ara h 3 after 10, 30, and 120 min of allergen incubation. Interestingly, blocking of the mannose receptor by mannan decreased the internalization of processed Ara h 3 up to levels of fluorescence intensity similar to natural peanut, which suggests that the mannose receptor might be responsible for an increased internalization in allergens that

are capable of carrying out this type of non-enzymatic reactions typical of industrial processing, such as Sola I 7 and Sola I 3.

Finally, another key feature of nsLTPs internalization by dendritic cells and subsequent sensitization, is the binding to lipids, which confers a protective role during gastrointestinal digestion, stabilizing the tertiary structure. According to Tordesillas & col., 2017 allergic sensitization is enhanced by the recognition of lipid-ligands carried by some allergens. These lipid-ligands could be exposed to immune cells at the time of first contact, inducing the production of specific IgE against the protein carrier associated with the ligands. In a later encounter, the interaction between the allergen and specific IgE bound to the high-affinity receptor (FcεRI) on the surface of effector cells (mast cells and basophils) would induce symptoms associated with allergy. In the case of Pru p 3, the lipid-ligand of this nsLTP, especially its phytosphingosine domain, is a critical collaborator for activation of dendritic cells, through receptor CD1 [León & col., 2012; Vartabedian & col., 2016], associated with enhanced induction of antigen-specific IgE in mouse models. These CD1 receptors can present lipids and glycolipids to T cell subpopulations, which in turn mediate effector functions including cytokine secretion. The importance of allergen administration along with other components to trigger the immune response was demonstrated by Rodriguez & col., 2017b where Pru p 3 is not capable of inducing anaphylaxis response in mouse models without the addition of LPS during sensitization, when this type of allergic response is induced. In the same way, the 2S albumin from Brazil nut, Ber e 1, was not sufficient to cause IgE or IgG production in mice, but the production of Ber e 1 specific IgE was determined when the co-administration of the allergen with polar lipid fractions isolated from the same nut was performed [Dearman & col., 2007].

All tomato nsLTPs, like all members of this protein family, have the ability to bind lipids. This not only stabilizes them against their enzymatic degradation, but also increases their ability to enhance an allergic response due to the possible interaction of these hydrophobic molecules present in the cavity of the nsLTPs with certain receptors, promoting their internalization and presentation to T cells.



## **CHAPTER V: An example of the molecular diagnosis of tomato nsLTPs: allergy to pizza.**

---

Sauces used in several foods such as pizza constitute a complex mixture of different allergens, which can lead to diagnostic problems [Soller & col., 2018]. It should be noted that pizza is one of the most popular foods in the world but allergic reactions following its ingestion as well as anaphylactic symptoms associated to these foods are however uncommon [Senna & col., 1998; Wong & col., 2004; Heffler & col., 2007]. Nonetheless, identifying precisely molecular allergens responsible for these unexpected reactions suffered by certain patients is an important goal in the clinical practice. This aim sometimes involves an additional difficulty for the clinician because food processing may result in changes involving allergen conformation. Those changes could result in the inactivation of existing IgE epitopes on a protein or being able to generate new ones by the food treatment itself.

After these processes in which the denaturation of allergens is frequently involved, new IgE epitopes may be exposed with more or less clinical repercussions [Sathe & col., 2005; Vila & col., 2001]. Accordingly, conformational epitopes, which are dependent on the 3D organization of the protein, are expected to be more susceptible to processing-induced destruction [Jiménez-Saiz & col., 2015]. Alternatively, sequential epitopes may be chemically altered during food processing through enzymatic hydrolysis [García-Casado & col., 2001]. Several patients with food allergies often possess high detectable IgE level directed to linear epitopes from allergens such as nsLTPs or storage proteins 2S albumins that become exposed after meals processing [Matsuo & col., 2015; Pomés, 2010].

The allergenic foods involved in the sensitization of patients included in this chapter are mustard and tomato fruit. Both have been considered as sources of important allergens in which, the mustard 2S albumin, Sin a 1, has been associated to frequent systemic symptoms [Hummel & col., 2015] and, on the other hand, tomato peel nsLTP sensitization, Sola I 3, is responsible for 15% of total tomato allergy.

## 1. PATIENTS SELECTION

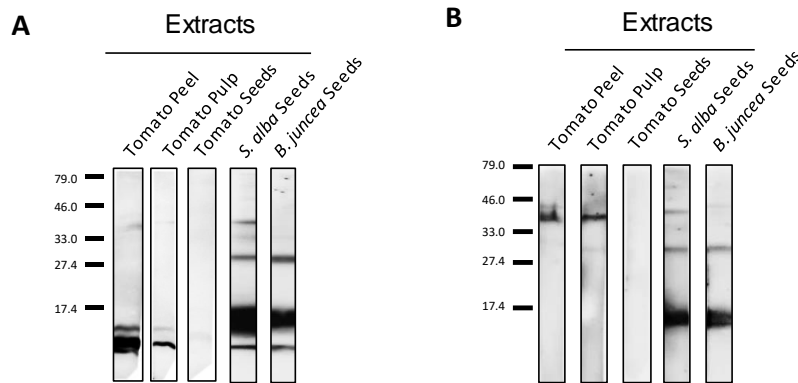
Patient #1 was a 21-years-old man who referred two episodes of systemic reactions including intense erythema, generalized urticarial and angioedema of hands within the first minutes of eating a pizza slice. Skin prick by prick test (SPPT) with pizza components were positive to tomato sauce (7 x 5 mm), and negative for cheese, tuna, and pizza dough. SPPT was positive to peel (30 x 11mm) and pulp (6 x 5 mm) of natural (non-processed) tomato.

Patient #2 was a child of 3.5-years-old with walnut allergy background. He suffered OAS, lipodema, perioral erythema and urticaria in abdomen after eating a chicken pizza with barbecue sauce but he tolerated chicken ingestion later on. The SPPT with pizza components was positive for the barbecue sauce, but SPPT with tomato peel and pulp was negative. Skin prick test resulted positive (7 x 4 mm) only to mustard (BIAL, Zamudio; Spain) and negative to egg, prawn, chicken, wheat, hazelnut, chestnut, soybean, peanut, (Laboratorios LETI, S.L.U.; Tres Cantos, Spain); milk, peach, *Anisakis simplex* (ALK-Abelló, Madrid. Spain).

## 2. IgE RECOGNITION OF PIZZA SAUCE ALLERGENS: THE IMPORTANCE OF A CORRECT DIAGNOSIS

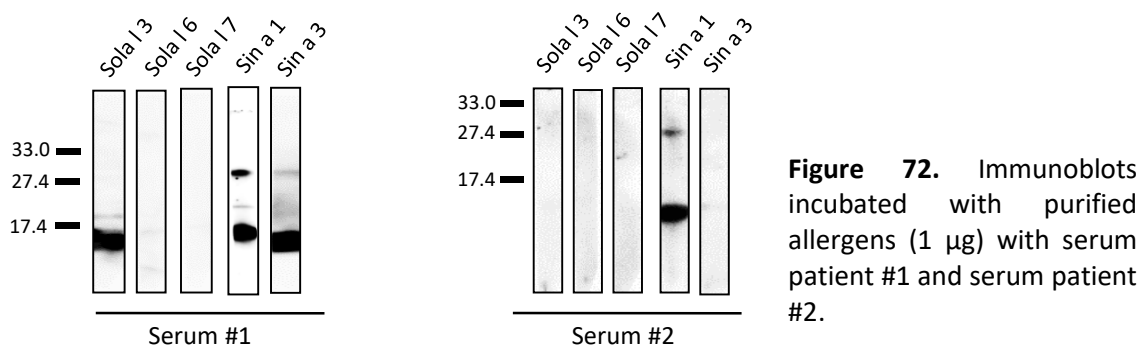
Both clinical cases referred two episodes of systemic reactions within the first minutes of eating a pizza slice. Both were not reactive to most components of pizza tested except tomato sauce. Serum of patient #1 strongly recognized IgE-binding bands in tomato peel and pulp extracts after immunoblotting as well as in both Yellow (*Sinapis alba*) and Oriental (*Brassica juncea*) mustard extracts, being both types mixed and presented as the common mustard sauce. An IgE-immunoreactive double band around 10 kDa was detected at tomato peel and pulp extracts, and three bands around 30, 15 and 10 kDa in both mustard seed extracts (**Figure 71A**). No signal was observed in tomato seeds extract. Regarding patient #2, only bands of 30 and 15 kDa, respectively, were detected in both mustard extracts (**Figure 71B**). A band of around 40 kDa was visible in tomato extracts and in yellow mustard extract. However, a band with the same

molecular mass was visible when a non-atopic serum was used as control considering that signal as non-specific.



**Figure 71.** Immunoblots with extracts, 20  $\mu$ g of tomato peel, tomato pulp, tomato seeds, and mustard seeds (*S. alba* and *B. juncea*) incubated with serum patient #1 (A) and serum patient #2 (B) 1:5 diluted.

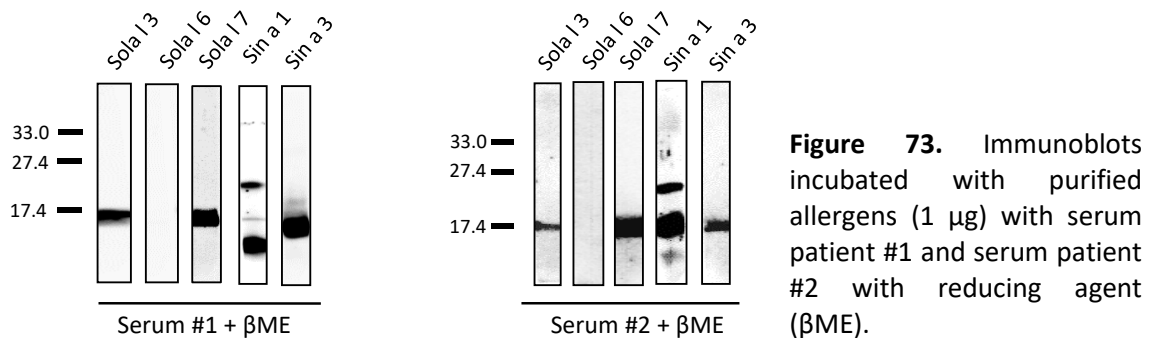
When natural and recombinant allergens as Sin a 1, a 2S albumin, and Sin a 3, Sola I 3, Sola I 7, and Sola I 6, all of them nsLTPs, were tested in immunoblotting or ELISA assays, specific IgEs in patient #1's serum recognized Sin a 1, Sin a 3 and Sola I 3. However, Sola I 7 and Sola I 6 were not detected by the serum of this patient. Patient #2 only recognized Sin a 1 represented by a double band of 15 and 30 kDa corresponding to the monomer and dimer, respectively, of the allergen, indicating that patient #1 appears to be allergic to barbecue sauce across mustard and tomato pulp/peel but patient #2 is allergic only through the mustard spice included in the sauce (Figure 72).



**Figure 72.** Immunoblots incubated with purified allergens (1  $\mu$ g) with serum patient #1 and serum patient #2.

These results were also supported by ELISA data with the following values of  $A_{492nm}$ : Sin a 1 (0.55), Sin a 3 (0.95), and Sola I 3 (0.21) for patient #1 and Sin a 1 (0.18) for patient #2, considering positive values those absorbance measurements at 492nm greater than three-fold the standard deviations above the mean of controls from non-

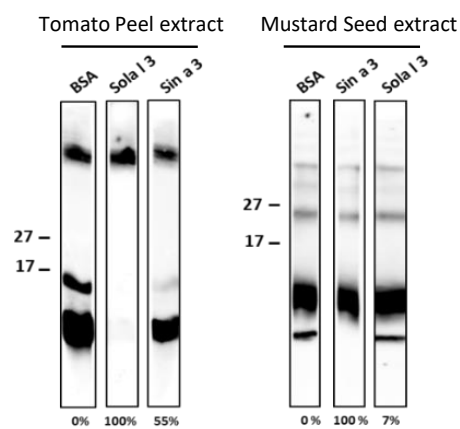
atopic donors (above 0.1). However, when purified nsLTPs were subjected to immunoblotting under reducing conditions with both sera, as is shown in **Figure 73**, IgE recognition of Sola l 7, Sola l 3, and Sin a 3 by both patients were observed. Considering the native allergens, the recognition of Sin a 1 is common in both patients, whereas nsLTPs from mustard, Sin a 3 and Sola l 3 from tomato has been only recognized by patient #1.



This is the reason why this patient's SPPT resulted positive to natural tomato whereas the patient #2 rendered a negative reaction. The IgE recognition by food-allergic patients to epitopes uncovered after protein denaturation, including the disruption of the disulfide bonds as a result of food processing or exposure to the digestive tract environment during ingestion is a frequent event in food allergy as previously described [Pastorello & col., 2003b]. Thus, the recognition of these internal regions within the different nsLTPs exposed when they are completely denatured could explain reactions to sauces prepared under thermal treatments such as barbecue or ketchup sauces. From a clinical viewpoint, the handling of proteins and extracts in the different diagnostic tools used in clinical practice, SPT, SPPT, or *in vitro* studies by immunoCAP in which proteins are used in native conditions or those such as immunoblotting where proteins are denatured and frequently under denaturing conditions could render this differential IgE recognition of allergens, misleading the clinician in their diagnosis [Brenna & col., 2000; Lindorff-Larsen & col., 2001; Koppelman & col., 2010].

## 2.1. Detection of the potential primary nsLTP sensitizer

In order to elucidate which allergen could be likely the nsLTP sensitizer in patient #1, inhibition experiments were carried out using tomato and mustard extracts transferred to membranes and Sola I 3 and Sin a 3 as inhibitors. IgE binding to 10-kDa molecular mass band of mustard seeds extract was completely blocked with Sin a 3, comparing with a barely visible inhibition when Sola I 3 was used as inhibitor. However, Sin a 3 elicited a 55% inhibition to tomato peel extract while Sola I 3 was able to abolish IgE binding of 10 and 15 kDa proteins completely, when whole tomato extract was used (Figure 74).



**Figure 74.** Immunoblotting inhibition experiments with 20 µg of tomato peel and mustard seed extracts, and 2 µg of purified Sola I 3 and Sin a 3 as inhibitors were performed. The inhibition percentage is shown in the bottom of the figure.

Therefore, both patients were allergic to pizza sauce, being Sin a 1 and nsLTP1 (Sin a 3 and Sola I 3) sensitizers for patient #1 whereas Sola I 7 seems to share linear IgE epitopes to the other nsLTPs involved in the reaction. Sin a 1 was apparently the only allergen responsible for sensitization of patient #2, however once again new IgE epitopes are uncovered when βME is used in the immunoblotting. These *in vitro* results suggest the idea that for patient #1 both mustard and tomato nsLTPs contribute to the sensitization and present partial IgE cross-reactivity between them. However, the possible sensitization of this patient to tomato and mustard nsLTPs by cross-reactivity to other nsLTP should not be discarded.

In summary, these cases further reinforce the need to investigate carefully the composition of multi-ingredient dishes, in order to identify unusual or hidden allergens or epitopes. Going further, the same ingredient as barbecue sauce of a pizza can contain

several components, in this case mustard and tomato, and allergic patients may be sensitized to different allergens from these two sources by co-sensitization or cross-reactivity with other allergens. The presence of certain ingredients in processed foods that may contain potential allergens, supports the need for the most complete panel of purified allergens possible, at least those showing differential cross-reactivity, to allow an accurate diagnosis in clinical practice. In addition, a thorough knowledge of the structural characteristics of these protein allergens involved is necessary for their correct manipulation. SPPT is a useful tool to identify IgE against allergens from specific tissues, which are poorly represented in the fruit, which could be difficult to detect with commercial allergenic extracts.

Another key point that emerges from this study is the implication in these allergies of different nsLTPs belonging to the same fruit, evidencing the already reported lack of cross-reactivity between them [Vereda & col., 2011]. In addition, Sin a 3 was also involved in sensitizing patient #1 exhibiting partial cross-reactivity to Sola I 3 and manifesting once again the complexity of the world nsLTP and finally the importance of using techniques such as immunoblotting or ELISA in the adequate conditions, for instance in the absence or presence of denaturing and reducing conditions, which could mimic the industrial manufacture of this type of food products.

## **CHAPTER VI: New techniques to detect allergens in foods. Stablishment of a Sola I 7-specific genosensor.**

---

Food allergy is gradually growing worldwide and is one of the major current health threats [Eissa & col., 2013]. The presence of hidden allergens in foods, by unintentional cross-contamination or by a lack of labelling in packaged foods, is of great risk for both allergic consumers and workers [Zurolo & col., 2012]. Moreover, their presence in food are usually in trace amounts, but they are enough to trigger an allergic reaction. By this fact and by the natural interference of the food matrix, their detection in foodstuffs can be often a very hard task [Alves & col., 2016]. Thus, highly specific and sensitive analytical methods able to detect traces of these allergens in a rapid, robust, reliable, end-user friendly and cost-effective way, are highly demanded for ensuring the compliance of food labelling and improving consumer protection [Ruiz-Valdepeñas Montiel & col., 2016].

During the past chapters, Sola I 7 has been described as the most allergenic nsLTP in tomato seeds, sharing location with nsLTP2 Sola I 6. These allergenic proteins, very stable and in very often masked in some commercial foods and sauces, causes severe and unexpected reactions, including anaphylaxis. Therefore, its presence in foods is a major concern for the food industry and food-allergic consumers.

A number of methods described in the scientific literature have been successfully applied to evaluate the presence of allergens in foods. Most of the methods for allergen detection are mainly divided in two large groups: the immunological assays and the DNA-based ones. In general, the immunological methodologies are based on specific binding between epitopes on the target molecule and an immunoglobulin specifically raised against the target by SDS-PAGE, immunoblotting or ELISA; and the DNA based ones involve the detection of specific fragments of genes encoding the target allergens usually by conventional, real-time, digital PCR, microarray or a combination of PCR-ELISA. Moreover, commercial production processes involve heat treatment and/or high-pressure industrial practices, which often destroy partially or totally the tertiary structure of food proteins despite the high stability of many of them, thereby avoiding their detection with conventional techniques that involve a specific protein-protein

interaction [Arlorio & col., 2007, Sun & col., 2012, Iniesto & col., 2013]. Therefore, methods based on detecting specific DNA fragments are advantageous because DNA remains intact longer under heat and pressure processing, showing constant concentrations and a conserved sequence within all species, allowing better extraction yields (even from processed and heat-treated samples) [Santiago-Felipe & col., 2014]. Conventional PCR methods although considered the gold standard methodology for the DNA detection, may fail when longer DNA targets are disrupted into small fragments during the extensive food processing [Ali & col., 2012]. Besides it is time-consuming, costly and require the use of external standards, these hindering the application of such methods to processed foods or complex food matrices [Holzhauser & col., 2014].

In this context, PCR amplification strategies coupled to electrochemical nucleic acid biosensing methodologies have been proposed to detect specific fragments of specific allergen-coding sequences [Betazzi & col., 2008, Ruiz-Valdepeñas Montiel & col., 2017a]. These strategies offer a more convenient and flexible alternative tool to conventional PCR-based methodologies and combine the high selectivity and sensitivity of nucleic acid amplification strategies with the interesting advantages provided by electrochemical sensors in food analysis (multiplexing capabilities, quantitative results, suitability to fabricate compact and low-cost devices) [Mishra & col., 2018]. Although some electrochemical DNA-based sensors have been developed to detect DNA/RNA allowing the food allergen identification of peanut 2S albumin, Ara h 2 [Lopez & col., 2014] or hazelnut nsLTP, Cor a 9 [Ruiz-Valdepeñas Montiel & col., 2017a], no electrochemical sensors for tomato allergens detection has been reported so far.

Moreover, to develop strategies of easy implementation in portable devices to perform routine determinations at decentralized settings, isothermal nucleic acid amplification strategies have been used together with electrochemical sensors [Barreda Garcia & col., 2015, Li & col., 2015, Barreda Garcia & col., 2016, Torrente-Rodríguez & col., 2016, Barreda Garcia & col., 2017, Jirakova & col., 2019]. Despite the attractive characteristics provided by these strategies, the design of affordable, quick and simple nucleic acid electrochemical biosensors able keeping the required sensitivity without involving the use of nanomaterials and/or target nucleic acid amplification strategies is still a practical challenge [Ruiz-Valdepeñas Montiel & col., 2018].

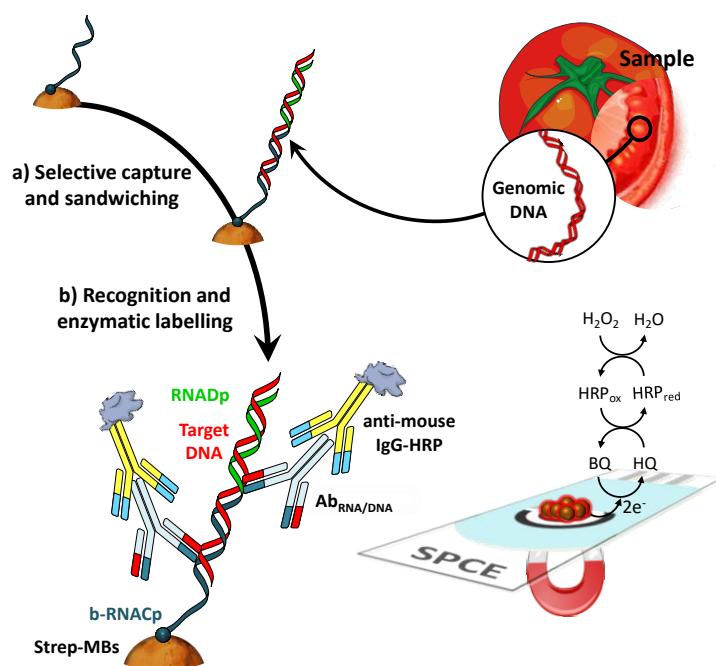


Recent results reported have shown the possibility of achieving significant and tuneable amplification by exploring novel assay configurations and labelling strategies leading to larger biomolecule or multienzyme loadings on appropriate detector bioreceptors (oligonucleotides or specific antibodies). Indeed, an attractive electroanalytical platform involving streptavidin-modified magnetic microbeads (Strep-MBs, 2.8  $\mu\text{m}$   $\varnothing$ , 10 mg mL<sup>-1</sup>) and amperometric transduction at screen-printed carbon electrodes (SPCEs) using the system HRP/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/HQ, was constructed to detect unequivocally the presence of horse meat without nucleic acid amplification by targeting a specific region of its D-loop mitochondrial genome directly in raw mitochondrial lysates. The method was based on the efficient capture of the target mitochondrial DNA on streptavidin-functionalized magnetic microcarriers previously modified with a specific biotinylated RNA probe. The resulting heteroduplexes immobilized on the MBs were labelled with a specific DNA-RNA antibody (AbRNA/DNA) previously incubated with Protein A conjugated with an homopolymer containing 40 units of HRP [Ruiz-Valdepeñas Montiel & col., 2017b].

In order to assess the early detection of tomato seeds allergen Sola I 7 in food samples and thus improve food safety by avoiding unexpected allergic reactions, a electrochemical nucleic acid biosensor for the detection on tomato seeds through the sensitive and selective determination of the Sola I 7 allergen by targeting a 60 nt-specific fragment of its coding-sequence has been created.

## 1. Sola I 7 GENOSENSOR OPTIMIZATION

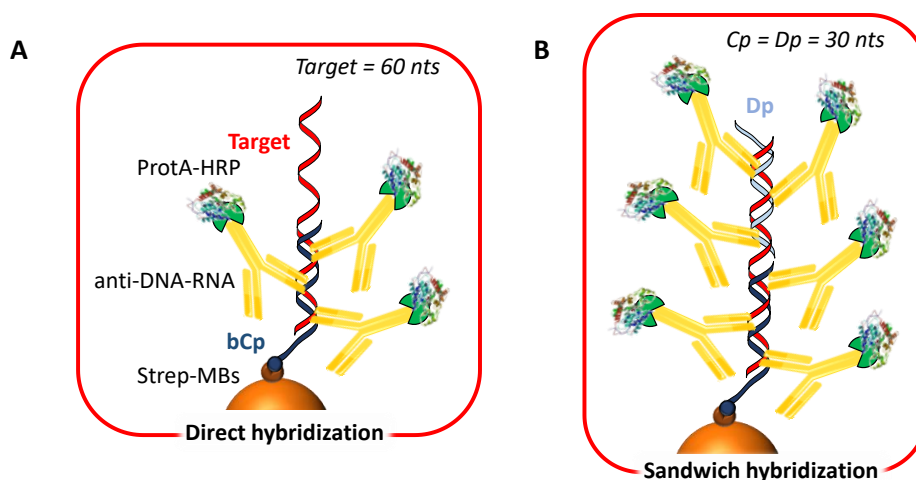
A schematic display of the fundamentals involved in the nucleic acid biosensing platform prepared for the determination of a specific fragment of the Sola I 7 allergen coding sequence is shown in **Figure 75**. In brief, magnetic microcarriers modified with a specific DNA biotinylated capture probe (b-RNACp) were used to selectively capture the synthetic target DNA or the denatured gDNA extracted, which was further hybridized with a specific RNA detector probe (RNADp). The resulting sandwiched 60-bp-RNA/DNA heterohybrids attached to the MBs were recognized by specific DNA-RNA antibodies (AbRNA/DNA with a binding site of about 6 bp in size [Qavi & col., 2011]) previously labeled with secondary antibodies conjugated with HRP (anti-IgG-HRP). The MBs prepared with the sandwich RNA/DNA heterohybrids captured and bearing a large number of HRP molecules, were magnetically attached on the screen-printed carbon electrodes (SPCEs) surface previously placed on a custom-fabricated magnetic holding block. The extent of the affinity reactions was followed by amperometry at -0.20 V (vs the Ag. pseudoreference electrode) in stirred solutions using the system H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/HQ. The variation in the cathodic current, attributed to the HRP reduction of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mediated by HQ, was proportional to the target DNA concentration [Volpe et al., 1998, Camacho et al., 2007].



**Figure 75.** Scheme of the MBs-based amperometric biosensing strategy developed at SPCEs for targeting a specific fragment of the Sola I 7 allergen coding sequence.

### 1.1. Optimization of experimental variables of genosensor

Results obtained using direct hybridization of the 60 nt-selected target with just a capture probe of 30 nt were compared with those provided by a sandwich-type hybridization configuration involving, in addition to the same capture probe, a detection probe of 30 nt. The sandwich-type hybridization format provided a 5.6-times higher sensitivity (calibration curve slope), which is in agreement with that expected considering that the binding epitope of the Ab<sub>RNA/DNA</sub> is about 6-bp in size [Qavi & col., 2011]. In this particular case, since there were 30 additional nucleotides, ideally there should be 5 additional Ab<sub>RNA/DNA</sub> molecules attached to each single 60 bp-heterohybrid which is consistent with the achieved amplification factor. This finding opens the possibility of tailoring the sensitivity of the assay by varying the heterohybrid length (**Figure 76**).



**Figure 76.** Schematic comparison between **(A)** direct hybridization with only a capture probe (bCp) and **(B)** sandwich hybridization with a capture probe (bCp) and detection probe (bDp).

According to previous results, a sandwich assay format and an AbRNA/DNA labeling with anti-IgG-HRP was selected for further work. Thereafter, all the experimental variables involved in the biosensor functioning were optimized taking as the selection criterion the largest ratio between the amperometric signals measured at  $-0.20$  V (vs. the Ag pseudoreference electrode) for 0.0 (blank, B) and 50 pM of synthetic target DNA (signal, S) (signal-to-blank, S/B, ratio). **Figures 77A and 77C** show that the S/B ratio increased with the concentration of the capture (b-RNACp) and detection (RNADp) probes up to 0.25 and 0.1  $\mu$ M values, respectively, and decreased with larger concentrations most likely due to the restricted hybridization efficiency when large amounts of probes are used [Liu & col., 2014, Zouari & col., 2018]. **Figure 77B** shows as 30 min were enough to allow the efficient b-RNACp immobilization on the Strep-MBs to ensure an effective hybridization.

Besides, amperometric responses measured with biosensors using the following protocols (all of them with incubation periods of 30 min and starting from the b-RNACp-MBs) were compared in order to develop a simpler and shorter assay:

- **Protocol 1:** one incubation step with a mixture solution containing the target DNA, RNADp, AbRNA/DNA and anti-IgG-HRP.
- **Protocol 2A:** two sequential incubation steps with solutions containing (1) the target DNA, RNADp, (2) AbRNA/DNA and anti-IgG-HRP.
- **Protocol 2B:** 2 sequential incubation steps with (1) the target DNA and with (2) a mixture solution containing RNADp, AbRNA/DNA and anti-IgG-HRP.

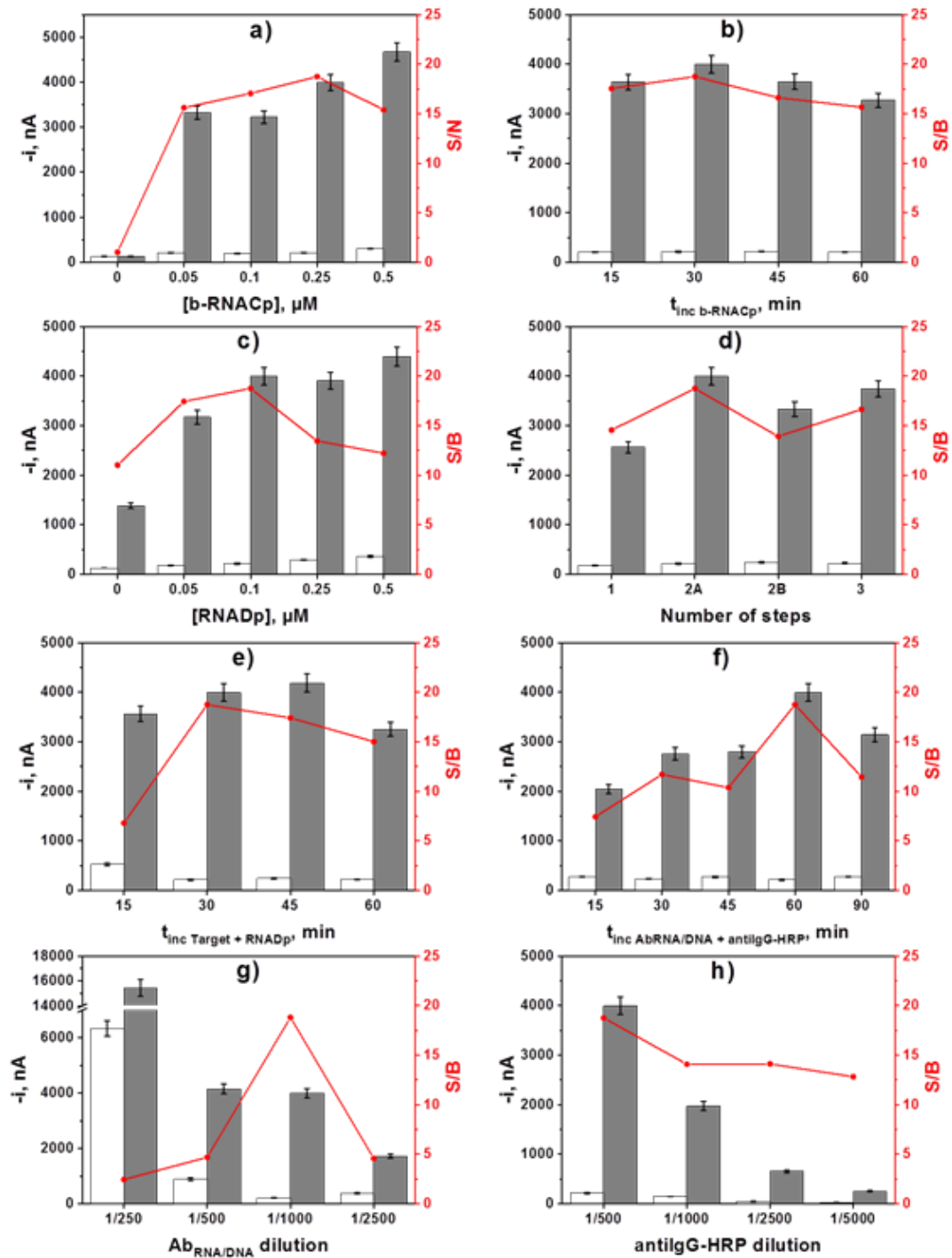
- **Protocol 3:** three sequential incubation steps with the (1) target DNA, (2) RNADp and with (3) a mixture solution containing AbRNA/DNA and anti-IgG-HRP.

**Figure 77D** shows as the protocol 2A provided better S/B ratio and, therefore, was selected for the construction of the biosensors fabrication. These results can be attributed to the improved efficiency of the hybridization reaction of the target DNA with RNADp and the labeling of AbRNA/DNA with anti-IgG-HRP in homogeneous solutions.

The time required for the two incubation steps (**Figures 77E and 77F**) as well as the AbRNA/DNA and anti-IgG-HRP concentrations were also optimized (**Figures 77G and 77H**). **Table 13** summarizes all the selected experimental variables as well as the ranges in which these variables were optimized.

**Table 13.** Optimization of the different experimental variables involved in the preparation of biosensors for the amperometric determination of Sola I 7 coding sequence.

Variable	Tested range	Selected value
Strep-MBs suspension, $\mu\text{L}$	-	5
[b-RNACp], $\mu\text{M}$	0-0.5	0.25
$t_{\text{inc b-RNACp}}$ , min	0-60	30
Number of steps	1-3	2A
[RNADp], $\mu\text{M}$	0-0.5	0.1
$t_{\text{inc target DNA+RNADp}}$ , min	0-60	30
$t_{\text{inc AbRNA/DNA + antiIgG-HRP}}$ , min	15-90	60
$\text{Ab}_{\text{RNA/DNA}}$ dilution	1/2,500-1/250	1/1,000
antiIgG-HRP dilution	1/5,000-1/500	1/500



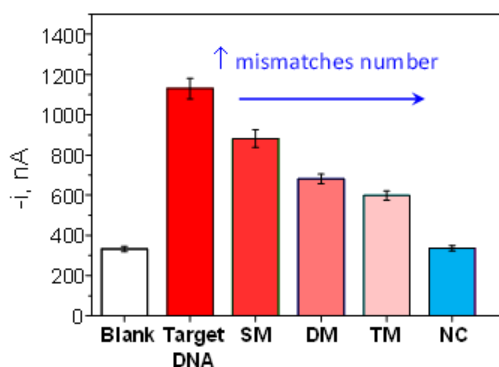
**Figure 77.** Optimization of the experimental variables involved in the preparation of Sola I 7 amperometric biosensors. Dependence of the amperometric responses measured for 0.0 (blank, B, white bars) and 50 pM of synthetic target DNA (signal, S, grey bars) specific to the Sola I 7 allergen coding sequence, and the corresponding S/B ratio values (red circles) with the b-RNACp concentration **(A)** Incubation time of the Strep-MBs on the b-RNACp solution **(B)** RNADp concentration **(C)** Number of steps involved in the protocol **(D)** Incubation times in the mixture solutions containing the target DNA and RNADp **(E)** and AbRNA/DNA and anti-IgG-HRP **(F)** concentration of AbRNA/DNA **(G)** and anti-IgG-HRP **(H)** Amperometric detection at  $-0.20$  V (vs. Ag pseudoreference electrode) at SPCEs. Error bars were estimated as triple of the standard deviation ( $n = 3$ ).

The analytical performance of the developed biosensor was tested using the 60 nt-synthetic target DNA. The relative standard deviation values obtained from the amperometric measurements provided by 8 different biosensors prepared in the same manner for 25 pM of the synthetic target DNA was 4.4%, thus indicating a good reproducibility of the fabrication and amperometric transduction protocols involved.

Furthermore, the storage stability of the b-RNACp-MBs conjugates was tested after storing them at 4 °C in Eppendorf tubes containing 50 µL of filtered B&W buffer. Each working day, amperometric responses were measured for 0 and 10 pM synthetic target DNA. No significant differences in the measured S/B ratio were apparent for a period of 69 days (no longer times were assayed), indicating an excellent stability of the b-RNACp-MBs conjugates.

## 1.2. Applicability with real samples and selectivity of genosensor

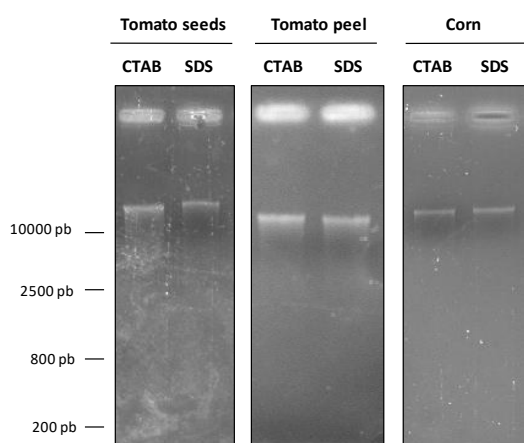
The selectivity of this strategy was checked by comparing the amperometric responses obtained in the absence and in the presence of 10 pM of the following synthetic sequences: target DNA, and DNAs with single mismatched (SM), double (DM), triple (TM) and a non-complementary DNA (NC). **Figure 78** shows as total discrimination was achieved against the NC sequence, while an acceptable selectivity was found against the mismatched sequences. The selectivity improved with the number of changed bases, showing a decrease in the amperometric responses obtained for the target DNA of 23, 40 and 50% for the SM, DM and TM sequences, respectively. These results suggest the feasibility of the developed biosensors to discriminate even between the numbers of mismatches in the analyzed sequence.



**Figure 78.** Amperometric responses obtained with the biosensors constructed to determine the Sola I 7 allergen coding sequence in the absence and in the presence of 10 pM synthetic target DNA, SM, DM, TM and NC sequences. Amperometric detection made at  $-0.20$  V (vs. Ag pseudoreference electrode) with SPCEs. Error bars were estimated as triple of the standard deviation ( $n = 3$ ).

After optimizing all the conditions and analyzing the sensitivity of the genosensor with the synthetic DNA, the electrochemical biosensor constructed for the determination of the Sola I 7 allergen coding sequence was applied to the analysis of 100 ng of non-fragmented plant-derived genomic DNA extracts. Nevertheless, a lower hybridization efficiency is expected considering the secondary and tertiary structures formed by such long targets which hinder an efficient hybridization to a surface-bound probe due to steric hindrance [Cederquist & col., 2010].

The gDNA samples were obtained from tomatoes of the “*Applause*” variety (carefully separating the seeds and the peel), and from corn cobs, all obtained from a local supermarket. gDNA from corn was selected because its allergenic nsLTP described, Zea m 14, exhibits one of the highest percentages of identity and similarity in its primary sequence with Sola I 7. The 46% sequence identity and 64% similarity are higher than the nsLTPs present in the peach and apple peel. Both nsLTPs (Zea m 14 and Sola I 7) come from seeds and if this developed biosensor does not recognize non-targeted Zea m 14 specific regions, therefore it can be concluded that it would not recognize other nsLTPs with lower sequence similarity. It is important to highlight also that corn and tomato are usually consumed as processed foods (corn pancakes or sauces), being reported and comparing with results previously described in this Thesis, that Zea m 14 and Sola I 7 possess similar thermal stability maintain their immunogenic capacity, triggering anaphylactic reactions even after severe processing at high temperatures for long periods of time [Pastorello & col., 2000; Pastorello & col., 2003b; Guillen & col., 2014]. In **Figure 79**, 100 ng of gDNA extraction by CTAB and SDS methods were visualized by 0.8% agarose electrophoresis, with similar results.

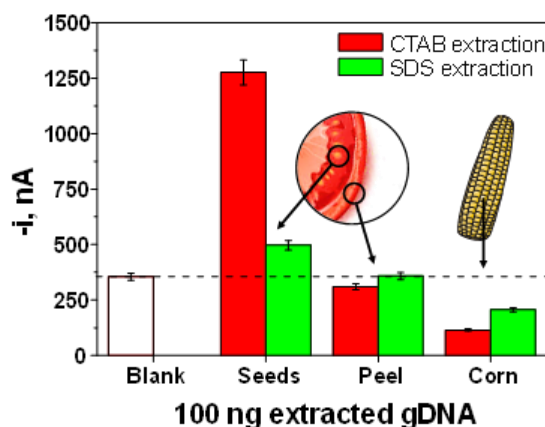


**Figure 79.** Agarose electrophoresis of tomato seeds, peel, and corn gDNA.



**Figure 80** compares the results obtained with the biosensor for the measurements of the gDNA extracted from tomato, seeds and peel, and corn using two different protocols (CTAB or SDS-based methods). Although good results were achieved using both extraction protocol, better concentration and DNA quality was obtained with CTAB method.

As a result, only amperometric responses significantly different from the blank were obtained for gDNA extracted from the tomato seeds which is fully consistent with the specific location of the target nsLTP in this part of the fruit [Martin-Pedraza & col., 2016], showing negative results with tomato peel gDNA (containing the allergenic class 1 nsLTP, Sola I 3) and even with corn, thus demonstrating the high selectivity and sensitivity of the biosensor in these challenging samples. These important features can be attributed to the combination in the same methodology of the hybridization processes selectivity, the unique specificity of commercial antibodies for RNA heterohybrids and the use of MBs as solid supports for the affinity reactions to minimize matrix effects in complex samples [Tran & col., 2013; Campuzano & col., 2017; Serafin & col., 2017]. These results can be considered as highly relevant taking into account the much bigger length of the intact analyzed gDNA (~792 Mb) compared with the synthetic target (60-mer). Indeed, this gDNA is actually the longest target DNA detected to date with an electrochemical biosensor. In addition, this is the first electrochemical DNA sensor applied to perform the direct determination in intact genomic DNA extracted from plants, without previous fragmentation or amplification and after just a denaturing step.



**Figure 80.** Amperometric responses measured with the biosensor constructed to determine the Sola I 7 allergen coding sequence in the absence of target DNA (blank) and for 100 ng of denatured gDNA extracted from tomato peel and seeds and corn. Amperometric detection performed at  $-0.20$  V (vs. Ag pseudoreference electrode) with SPCEs. Error bars were estimated as triple of the standard deviation ( $n = 3$ ).

According to these results, the first disposable electrochemical nucleic acid sensors for the unequivocal detection of tomato seeds through the sensitive and selective PCR-free detection of a specific fragment of the characteristic Sola I 7 allergen coding sequence, was developed. This biosensor exhibits a good sensitivity (LOD of 0.2 pM, 5 amol for the synthetic target) and selectivity and the analysis can be made in just 90 min with feasibility to be performed directly in 100 ng of extracted raw gDNA without previous fragmentation and after a denaturing step. The nice analytical performance of the implemented strategy without target nucleic acid amplification relies on the use of a sandwich hybridization assay leading to the formation of quite long RNA/DNA heteroduplexes and a commercial antibody with a high affinity to bind regions of only 6 bp in the RNA heterohybrids. Moreover, these bioplatfoms pave the way towards the sensitive detection of other nucleic acids regardless of their naturally occurring variety (DNA or RNA), origin (animal or plant), copy number (mitochondrial vs genomic) and length (from very long intact DNAs to degraded samples, difficult to be analyzed by conventional PCR-based methodologies), with no need for using nanomaterials or nucleic acid amplification. The simple handling of the biosensors with applicability at different settings and the relatively low cost per detection postulate these novel biotools as the basis for the electrochemical biosensing in routine analyses, even in locations where more complex laboratory equipment is not available, and with potential applications not only in food safety control and consumer protection but also in diagnostics, environmental monitoring, and genetic screening.



**CONCLUSIONES**

***CONCLUSIONS***



## CONCLUSIONES/CONCLUSIONS

---

In the present work, we have studied in detail the structural and functional properties of three allergenic non-specific Lipid Transfer Proteins (nsLTPs) members from a well-recognized allergenic protein family belonging to both pathogenesis-related (PR) protein and prolamin superfamilies, encompassing its two main classes (nsLTP1 and nsLTP2). Our results provide novel insights into the structural, immunological and functional features of these two protein classes and contribute to enhance the knowledge about their role in the context of food allergy diseases.

The main conclusions derived from this thesis are:

- a) Two novel allergenic nsLTPs in tomato seeds, Sola I 6, class 2 and Sola I 7, class 1 have been identified. These allergens were purified as a complex in their natural form and exhibited low identity and similarity percentage between them and with Sola I 3, nsLTP class 1 already described in tomato peel and pulp. Besides, highlighting the importance of seed proteins and condition of the extracts for the diagnosis, with a relevant clinical significance of nsLTP1 Sola I 7. In addition, the possibility of performing *in vivo* studies (SPT) with the two tomato seed nsLTPs as a pool, would dramatically improve the diagnostic efficacy of these sensitized patients.
- b) Sola I 3, Sola I 6 and Sola I 7 have been produced as recombinant proteins in the yeast *P. pastoris*. Molecular and immunological characterization of purified proteins demonstrated that the recombinant allergens conserved their properties unaltered in comparison with the natural ones. rSola I 3, rSola I 6 and rSola I 7 also show similar molecular parameters to other described nsLTP1 and nsLTP2, most of them with a basic isoelectric point (6.0, 8.5 and 8.6, respectively) and low molecular mass (9 kDa for nsLTP1 and 7 kDa for nsLTP2).
- c) The three-dimensional structure obtained by Nuclear Magnetic Resonance of Sola I 6 and Sola I 7 show the typical composition of members of this protein family, with 4  $\alpha$ -helices connected with  $\beta$ -turns and a non-structured C-terminal tail, stabilized by 4 highly conserved disulfide bonds.

In addition, the presence of a variable flexible hydrophobic cavity capable of housing lipidic nature molecules was described.

- d) Cross-reactivity studies with nsLTP1 tomato allergens, Sola I 3 and Sola I 7 exhibit high percentage of IgG inhibition with apple, peach, kiwi seeds and cherry extracts, corroborating the high percentage of sequence identity. According to nsLTP2, Sola I 6 only shares certain epitopes with peach extract. Due to the low cross-reactivity between tomato nsLTP1 both IgE and IgG level, possible co-sensitization reactions can be concluded when both proteins are involved. Similarly, the absence of cross reactivity between the class 1 and class 2 of tomato seeds nsLTP corroborates the results already described, even found in the same fruit.
- e) Industrial-like processing with high temperatures, prolonged periods of time and the presence of a reducing sugar, cause the glycation of the three allergenic tomato nsLTPs (Sola I 3, Sola I 6 and Sola I 7), carrying out the process known as Maillard reaction behaved through its union with Concanavalin A. This severe heating process, when no sugar is incorporated, causes a drastic immunogenicity decrease in these proteins, being Sola I 6 the most resistant tomato nsLTP to this denaturation.
- f) No effect on the three tomato nsLTPs has been found during the 60-min *in vitro* gastric digestion period, either with phosphatidylcholine or not. Whereas after duodenal digestion, Sola I 6 was completely degraded, tomato nsLTP1 proteolysis rendered a fragment with molecular mass of around 6.5 kDa either in the absence or presence of PC. This Sola I 7 fragment remains allergenic and positive in BAT, causing a reduction in only 25% of IgE recognition.
- g) The uptake of Sola I 3, Sola I 6 and Sola I 7 labelled with AlexaFluor 488 by myeloid dendritic cells exhibit a dose and time-dependent tendency, where Sola I 3 is the nsLTP with the greatest capacity to be internalized. Besides, the full-length monomer Sola I 7 is the most stable nsLTP to lysosomal enzymes degradation, remaining stable with neither suffering apparent degradation nor losing allergenicity after 48 h of incubation. The high stability properties of Sola I 7 demonstrates the great importance of

this nsLTP1 to the risk of severe and unexpected reactions in sensitized patients, compared to Sola I 6.

- h) Solving the need for novel detection methods, a specific Sola I 7 genosensor was performed in a sandwich assay format with the detection of the heterohybrid RNA/DNA labeling with anti-IgG-HRP. Total genomic DNA of tomato seeds was use for the detection of allergen traces in food preparation with good sensitivity and selectivity results.



## CONCLUSIONES/CONCLUSIONS

---

En el presente trabajo, hemos estudiado en detalle las propiedades estructurales y funcionales de tres proteínas alergénicas de la familia de proteínas de transferencia de lípidos (nsLTP) que pertenecen tanto a la superfamilia de proteínas relacionadas con la patogénesis (PR) como a la superfamilia de prolamina, englobando dos clases principales (nsLTP1 y nsLTP2). Nuestros resultados proporcionan nuevos conocimientos sobre las características estructurales, inmunológicas y funcionales de estas dos clases de proteínas y contribuyen a mejorar el conocimiento sobre su papel en el contexto de las enfermedades alérgicas alimentarias.

Las principales conclusiones que se derivan de esta tesis son:

- a) Dos nuevas nsLTPs alergénicas de semillas de tomate se han identificado, Sola I 6, de clase 2 y Sola I 7, de clase 1. Estos alérgenos fueron purificados conjuntamente en su forma natural y mostraron baja identidad y porcentaje de similitud entre ellos y con Sola I 3, la nsLTP de clase 1 ya descrita en la piel y pulpa del tomate. Además, destacando la importancia de las proteínas de semillas y el estado de los extractos para el diagnóstico, la incorporación de la nsLTP1 Sola I 7 es de gran relevancia clínica. Además, la posibilidad de realizar estudios *in vivo* (SPT) con los dos nsLTPs de semillas de tomate conjuntamente, mejoraría la eficacia diagnóstica de los pacientes sensibilizados.
- b) Sola I 3, Sola I 6 y Sola I 7 se han producido como proteínas recombinantes en la levadura *P. pastoris*. La caracterización molecular e inmunológica de las proteínas purificadas demostró que los alérgenos recombinantes conservan sus propiedades inalteradas en comparación con las naturales. rSola I 3, rSola I 6 y rSola I 7 también muestran parámetros moleculares similares a los descritos para otras nsLTP1 y nsLTP2, la mayoría de ellos con un punto isoeléctrico básico (6,0, 8,5 y 8,6, respectivamente) y una masa molecular baja (9 kDa en el caso de los alérgenos nsLTP1 y 7 kDa en el caso de los alérgenos nsLTP2).

- c) La estructura tridimensional obtenida por Resonancia Magnética Nuclear de Sola I 6 y Sola I 7 muestra la composición típica de los miembros de esta familia de proteínas, con 4  $\alpha$ -helices conectados por giros  $\beta$  y una cola C-terminal desestructurada, estabilizada por 4 puentes disulfuro altamente conservados. Además, se describió la presencia de una cavidad hidrofóbica flexible capaz de albergar moléculas de naturaleza lipídica en su interior.
- d) Los estudios de reactividad cruzada con los alérgenos de tomate nsLTP1, Sola I 3 y Sola I 7 muestran un alto porcentaje de inhibición a nivel de IgG con extractos de manzana, melocotón, semillas de kiwi y cereza, corroborando el alto porcentaje de identidad en sus secuencias. En relación a nsLTP2, Sola I 6 sólo comparte ciertos epítomos con el extracto de melocotón. Debido a la baja reactividad cruzada a nivel IgE e IgG entre las nsLTP1 de tomate, se pueden concluir posibles reacciones de co-sensibilización cuando ambas proteínas están involucradas en el desencadenamiento de reacciones alérgicas. Del mismo modo, la ausencia de reactividad cruzada entre la clase 1 y la clase 2 de nsLTP presente en las semillas de tomate, corrobora los resultados ya descritos, incluso estando presentes en el mismo fruto.
- e) Procesos de tipo industrial llevados a cabo con altas temperaturas, periodos prolongados de tiempo y en presencia de un azúcar reductor, provocan la glicación de las tres nsLTPs alérgicas de tomate (Sola I 3, Sola I 6 y Sola I 7), llevando a cabo el proceso conocido como Reacción de Maillard. La realización de procesos severos de calentamiento y sin presencia de este azúcar, provoca una drástica disminución de la inmunogenicidad de estas proteínas, siendo la nsLTPs Sola I 6 la más resistente a dicha desnaturalización.
- f) No se ha demostrado ningún efecto de la digestión gástrica *in vitro* sobre las tres nsLTPs de tomates durante 60 minutos, ya sea con fosfatidilcolina o sin ella. Tras la digestión duodenal, Sola I 6 se degradó completamente, mientras que la proteólisis de la nsLTP1 de semilla de tomate produjo un fragmento con una masa molecular de alrededor de 6.5 kDa en ausencia o presencia de PC. Este fragmento de Sola I 7 mantiene su alergenicidad y

resulta positivo en Test de Activación de Basófilos, provocando una reducción de sólo el 25% en su reconocimiento IgE.

- g) La unión de Sola I 3, Sola I 6 y Sola I 7 a células dendríticas mieloides muestran una tendencia dosis y tiempo dependiente, donde Sola I 3 es la nsLTP con mayor capacidad para ser internalizado. Además, el monómero de Sola I 7 es la nsLTP más estable a la degradación por las enzimas lisosomales, permaneciendo estable sin sufrir degradación aparente ni perder alergenicidad tras 48 h de incubación. La gran estabilidad de Sola I 7 demuestra la gran relevancia de esta nsLTP1 ante el riesgo de sufrir reacciones severas e inesperadas en los pacientes sensibilizados, en comparación con Sola I 6.
- h) Resolviendo la necesidad de nuevos métodos de detección, se desarrolló un genosensor específico de Sola I 7 en formato sándwich con la detección del heterohíbrido ARN/ADN. El ADN genómico total de las semillas de tomate se utilizó para la detección de trazas de este alérgeno en muestras procesadas, con buenos resultados en sensibilidad y selectividad.

**BIBLIOGRAFÍA**  
***BIBLIOGRAPHY***



**BIBLIOGRAFÍA/ BIBLIOGRAPHY**

---

- Aalberse, R. C. (2007). Assessment of allergen cross-reactivity. *Clinical and Molecular Allergy*, 5(1), 2.
- Abdullah, S. U., Alexeev, Y., Johnson, P. E., Rigby, N. M., Mackie, A. R., Dhaliwal, B., Mills, E. C. (2016). Ligand binding to an allergenic lipid transfer protein enhances conformational flexibility resulting in an increase in susceptibility to gastroduodenal proteolysis. *Scientific reports*, 6, 30279.
- Åberg, N. (1993). Familial occurrence of atopic disease: genetic versus environmental factors. *Clinical & Experimental Allergy*, 23(10), 829-834.
- Ahrazem, O., Ibáñez, M. D., López-Torrejón, G., Sánchez-Monge, R., Sastre, J., Lombardero, M., Salcedo, G. (2005). Lipid transfer proteins and allergy to oranges. *International archives of allergy and immunology*, 137(3), 201-210.
- Akkerdaas, J., Finkina, E. I., Balandin, S. V., Magadán, S. S., Knulst, A., Fernandez-Rivas, M., Ovchinnikova, T. V. (2012). Lentil (*Lens culinaris*) lipid transfer protein Len c 3: a novel legume allergen. *International archives of allergy and immunology*, 157(1), 51-57.
- Alessandri, S., Sancho, A., Vieths, S., Mills, C. E., Wal, J. M., Shewry, P. R., Hoffmann-Sommergruber, K. (2012). High-throughput NMR assessment of the tertiary structure of food allergens. *PLoS One*, 7(7), e39785.
- Ali, M. E., Mustafa, S., Hashim, U., Man, Y. B., Foo, K. L. (2012). Nanobioprobe for the determination of pork adulteration in burger formulations. *Journal of Nanomaterials*, 2012, 8.
- Allam, J. P., Würtzen, P. A., Reinartz, M., Winter, J., Vrtala, S., Chen, K. W., Niederhagen, B. (2010). Phl p 5 resorption in human oral mucosa leads to dose-dependent and time-dependent allergen binding by oral mucosal Langerhans cells, attenuates their maturation, and enhances their migratory and TGF- $\beta$ 1 and IL-10-producing properties. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 126(3), 638-645.
- Allen, K. J., Hill, D. J., Heine, R. G. (2006). 4. Food allergy in childhood. *Medical journal of Australia*, 185(7), 394-400.
- Alves, R. C., Barroso, M. F., González-García, M. B., Oliveira, M. B. P., Delerue-Matos, C. (2016). New trends in food allergens detection: toward biosensing strategies. *Critical reviews in food science and nutrition*, 56(14), 2304-2319.
- Ames, J. M. (2003). Nonenzymatic browning. *Encyclopedia of food sciences and nutrition*, 665-672.
- Ames, J. M. (2007). Evidence against dietary advanced glycation endproducts being a risk to human health. *Molecular nutrition & food research*, 51(9), 1085-1090.

- Amoli, M. M., Hand, S., Hajeer, A. H., Jones, K. P., Rolf, S., Sting, C., Ollier, W. E. R. (2002). Polymorphism in the STAT6 gene encodes risk for nut allergy. *Genes and immunity*, 3(4), 220.
- An Analysis of Consumption, Production and Trade Based on Statistics from the Food and Agriculture Organisation, FAO, European Commission Directorate General for Agriculture and Rural Development; 2007; available from [http://www.fao.org/unfao/bodies/conf/c2007/Index\\_es](http://www.fao.org/unfao/bodies/conf/c2007/Index_es)
- Andersson, K., Lidholm, J. (2003). Characteristics and immunobiology of grass pollen allergens. *International archives of allergy and immunology*, 130(2), 87-107.
- Anibarro, B., Seoane, F. J., Mugica, M. V. (2007). Involvement of hidden allergens in food allergic reactions. *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology*, 17(3), 168.
- Ansley, L., Bonini, M., Delgado, L., Del Giacco, S., Du Toit, G., Khaitov, M., Robson-Ansley, P. J. (2015). Pathophysiological mechanisms of exercise-induced anaphylaxis: an EAACI position statement. *Allergy*, 70(10), 1212-1221.
- Antico, A., Pagani, M., Crema, A. (2006). Anaphylaxis by latex sublingual immunotherapy. *Allergy*, 61(10), 1236-1237.
- Antoniou, A. N., Blackwood, S. L., Mazzeo, D., Watts, C. (2000). Control of antigen presentation by a single protease cleavage site. *Immunity*, 12(4), 391-398.
- Apostolovic, D., Stanic-Vucinic, D., De Jongh, H. H., De Jong, G. A., Mihailovic, J., Radosavljevic, J., Taylor, S. L. (2016). Conformational stability of digestion-resistant peptides of peanut conglutins reveals the molecular basis of their allergenicity. *Scientific reports*, 6, 29249.
- Arlorio, M., Cereti, E., Coisson, J. D., Travaglia, F., Martelli, A. (2007). Detection of hazelnut (*Corylus* spp.) in processed foods using real-time PCR. *Food Control*, 18(2), 140-148.
- Armentia, A., Callejo, A., Martín-Gil, F. J., Díaz-Perales, A., Salcedo, G. (2003). Enhancement of tomato allergenicity after treatment with plant hormones. *Allergologia et immunopathologia*, 31(1), 44-46.
- Arruda, L. K., Ferriani, V. P., Vailes, L. D., Pomés, A., Chapman, M. D. (2001). Cockroach allergens: environmental distribution and relationship to disease. *Current allergy and asthma reports*, 1(5), 466-473.
- Asero, R. (2011a). 7 Lipid Transfer Protein Cross-reactivity Assessed In Vivo and In Vitro in the Office: Pros and Cons. *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology*, 21(2), 129.
- Asero, R. (2013). Tomato allergy: clinical features and usefulness of current routinely available diagnostic methods. *J Investig Allergol Clin Immunol*, 23(1), 37-42.
- Asero, R., & Antonicelli, L. (2011c). Does sensitization to foods in adults occur always in the gut? *International archives of allergy and immunology*, 154(1), 6-14.

- Asero, R., Mistrello, G., Amato, S. (2011b). Anaphylaxis caused by tomato lipid transfer protein. *European annals of allergy and clinical immunology*, 43(4), 125.
- Asero, R., Mistrello, G., Roncarolo, D., Amato, S. (2007). Detection of some safe plant-derived foods for LTP-allergic patients. *International archives of allergy and immunology*, 144(1), 57-63.
- Asero, R., Mistrello, G., Roncarolo, D., Amato, S., Caldironi, G., Barocci, F., Van Ree, R. (2002). Immunological cross-reactivity between lipid transfer proteins from botanically unrelated plant-derived foods: a clinical study. *Allergy*, 57(10), 900-906.
- Asero, R., Mistrello, G., Roncarolo, D., de Vries, S. C., Gautier, M. F., Ciurana, C. L., Bulder, I. (2000). Lipid transfer protein: a pan-allergen in plant-derived foods that is highly resistant to pepsin digestion. *International archives of allergy and immunology*, 122(1), 20-32.
- Ashjaei, K., Palmberger, D., Bublin, M., Bajna, E., Breiteneder, H., Grabherr, R., Hoffmann-Sommergruber, K. (2015). Atopic donor status does not influence the uptake of the major grass pollen allergen, Phl p 5, by dendritic cells. *Journal of immunological methods*, 424, 120-130.
- Astwood, J. D., Leach, J. N., Fuchs, R. L. (1996). Stability of food allergens to digestion in vitro. *Nature biotechnology*, 14(10), 1269.
- Babaie, D., Mesdaghi, M., Nishino, M., Mansouri, M., Ebisawa, M. (2017). Oral and sublingual immunotherapy: potential causes for eosinophilic gastrointestinal disorders? *International archives of allergy and immunology*, 172(2), 89-98.
- Ballmer-Weber, B. K. (2002). Lipid transfer protein as a potential panallergen? *Allergy*, 57(10), 873-875.
- Ballmer-Weber, B. K., Hoffmann-Sommergruber, K. (2011). Molecular diagnosis of fruit and vegetable allergy. *Current opinion in allergy and clinical immunology*, 11(3), 229-235.
- Banchereau, J., Briere, F., Caux, C., Davoust, J., Lebecque, S., Liu, Y. J., Palucka, K. (2000). Immunobiology of dendritic cells. *Annual review of immunology*, 18(1), 767-811.
- Banchereau, J., Steinman, R. M. (1998). Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*, 392(6673), 245.
- Bargman, T. R. J., Rupnow, J. O. H., Taylor, S. T. L. (1992). IgE-binding proteins in almonds (*Prunus amygdalus*); identification by immunoblotting with sera from almond-allergic adults. *Journal of food science*, 57(3), 717-720.
- Barreda-García, S., González-Álvarez, M. J., de-los-Santos-Álvarez, N., Palacios-Gutiérrez, J. J., Miranda-Ordieres, A. J., Lobo-Castañón, M. J. (2015). Attomolar quantitation of *Mycobacterium tuberculosis* by asymmetric helicase-dependent isothermal DNA-amplification and electrochemical detection. *Biosensors and Bioelectronics*, 68, 122-128.



- Barreda-García, S., Miranda-Castro, R., de-Los-Santos-Alvarez, N., Miranda-Ordieres, A. J., Lobo-Castañón, M. J. (2017). Solid-phase helicase dependent amplification and electrochemical detection of Salmonella on highly stable oligonucleotide-modified ITO electrodes. *Chemical Communications*, 53(70), 9721-9724.
- Barreda-García, S., Miranda-Castro, R., de-los-Santos-Álvarez, N., Miranda-Ordieres, A. J., Lobo-Castañón, M. J. (2016). Comparison of isothermal helicase-dependent amplification and PCR for the detection of Mycobacterium tuberculosis by an electrochemical genomagnetic assay. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 408(30), 8603-8610.
- Bässler, O. Y., Weiss, J., Wienkoop, S., Lehmann, K., Scheler, C., Dölle, S., Weckwerth, W. (2009). Evidence for novel tomato seed allergens: IgE-reactive legumin and vicilin proteins identified by multidimensional protein fractionation– mass spectrometry and in silico epitope modeling. *Journal of proteome research*, 8(3), 1111-1122.
- Bavaro, S. L., Di Stasio, L., Mamone, G., De Angelis, E., Nocerino, R., Canani, R. B., Monaci, L. (2018). Effect of thermal/pressure processing and simulated human digestion on the immunoreactivity of extractable peanut allergens. *Food Research International*, 109, 126-137.
- Beck, J., Ledl, F., Sengl, M., Severin, T. (1990). Formation of acids, lactones and esters through the Maillard reaction. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung*, 190(3), 212-216.
- Begin, P., Chinthrajah, R. S., Nadeau, K. C. (2014). Oral immunotherapy for the treatment of food allergy. *Human vaccines & immunotherapeutics*, 10(8), 2295-2302.
- Bencivenni, M., Faccini, A., Zecchi, R., Boscaro, F., Moneti, G., Dossena, A., Sforza, S. (2014). Electrospray MS and MALDI imaging show that non-specific lipid-transfer proteins (LTPs) in tomato are present as several isoforms and are concentrated in seeds. *Journal of Mass Spectrometry*, 49(12), 1264-1271.
- Benedé, S., López-Expósito, I., Giménez, G., Grishina, G., Bardina, L., Sampson, H. A., López-Fandiño, R. (2014). In vitro digestibility of bovine  $\beta$ -casein with simulated and human oral and gastrointestinal fluids. Identification and IgE-reactivity of the resultant peptides. *Food chemistry*, 143, 514-521.
- Benedé, S., López-Expósito, I., Molina, E., López-Fandiño, R. (2015). Egg proteins as allergens and the effects of the food matrix and processing. *Food & function*, 6(3), 694-713.
- Benedé, S., López-Fandiño, R., Molina, E. (2017). Assessment of IgE Reactivity of  $\beta$ -Casein by Western Blotting After Digestion with Simulated Gastric Fluid. In *Food Allergens* (pp. 165-175). Humana Press, New York, NY.
- Benito-Villalvilla, C., Soria, I., Subiza, J. L., Palomares, O. (2018). Novel vaccines targeting dendritic cells by coupling allergoids to mannan. *Allergo Journal*, 27(8), 34-40.
- Berez, B., Mills, E. C., Parádi, I., Láng, F., Tamás, L., Shewry, P. R., Mackie, A. R. (2013). Stability of sunflower 2S albumins and LTP to physiologically relevant in vitro gastrointestinal digestion. *Food chemistry*, 138(4), 2374-2381.

- Bergerová, E., Hrnčířová, Z., Stankovská, M., Lopašovská, M., Siekel, P. (2010). Effect of thermal treatment on the amplification and quantification of transgenic and non-transgenic soybean and maize DNA. *Food Analytical Methods*, 3(3), 211-218.
- Bernardi, M. L., Giangrieco, I., Camardella, L., Ferrara, R., Palazzo, P., Panico, M. R., Santoro, M. (2011). Allergenic lipid transfer proteins from plant-derived foods do not immunologically and clinically behave homogeneously: the kiwifruit LTP as a model. *PLoS one*, 6(11), e27856.
- Bessot, J. C., Pauli, G. (2011). Mite allergens: an overview. *European annals of allergy and clinical immunology*, 43(5), 141.
- Bettazzi, F., Lucarelli, F., Palchetti, I., Berti, F., Marrazza, G., Mascini, M. (2008). Disposable electrochemical DNA-array for PCR amplified detection of hazelnut allergens in foodstuffs. *Analytica chimica acta*, 614(1), 93-102.
- Beyer, K., Morrow, E., Li, X. M., Bardina, L., Bannon, G. A., Burks, A. W., Sampson, H. A. (2001). Effects of cooking methods on peanut allergenicity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 107(6), 1077-1081.
- Bhalla, P. L. (2003). Genetic engineering of pollen allergens for hayfever immunotherapy. *Expert review of vaccines*, 2(1), 75-84.
- Bhalla, P. L., Singh, M. B. (2004). Engineered allergens for immunotherapy. *Current opinion in allergy and clinical immunology*, 4(6), 569-573.
- Bhatty, R. S., McKenzie, S. L., Finlayson, A. J. (1968). The proteins of rapeseed (*Brassica napus* L.) soluble in salt solutions. *Canadian journal of biochemistry*, 46(10), 1191-1197.
- Blankestijn, M. A., Otten, H. G., Suer, W., Weimann, A., Knol, E. F., Knulst, A. C. (2018). Specific IgE to peanut 2S albumin Ara h 7 has a discriminative ability comparable to Ara h 2 and 6. *Clinical & Experimental Allergy*, 48(1), 60-65.
- Boccafogli, A., Vicentini, L., Camerani, A., Cogliati, P., D'Ambrosi, A., Scolozzi, R. (1994). Adverse food reactions in patients with grass pollen allergic respiratory disease. *Annals of allergy*, 73(4), 301-308.
- Boden, M., Dadswell, R., Hattersley, S. (2005). Review of statutory and voluntary labelling of food allergens. *Proceedings of the Nutrition Society*, 64(4), 475-480.
- Bohle, B. (2007). The impact of pollen-related food allergens on pollen allergy. *Allergy*, 62(1), 3-10.
- Bohle, B., Radakovics, A., Lüttkopf, D., Jahn-Schmid, B., Vieths, S., Ebner, C. (2005). Characterization of the T cell response to the major hazelnut allergen, Cor a 1.04: evidence for a relevant T cell epitope not cross-reactive with homologous pollen allergens. *Clinical & Experimental Allergy*, 35(10), 1392-1399.
- Bohle, B., Zwölfer, B., Heratizadeh, A., Jahn-Schmid, B., Antonia, Y. D., Alter, M., Ebner, C. (2006). Cooking birch pollen-related food: Divergent consequences for IgE-and

- T cell-mediated reactivity in vitro and in vivo. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 118(1), 242-249.
- Borges, J. P., Jauneau, A., Brule, C., Culerrier, R., Barre, A., Didier, A., Rougé, P. (2006). The lipid transfer proteins (LTP) essentially concentrate in the skin of Rosaceae fruits as cell surface exposed allergens. *Plant physiology and biochemistry*, 44(10), 535-542.
- Brandtzaeg, P., Farstad, I. N., Haraldsen, G., Jahnsen, F. L. (1998). Cellular and molecular mechanisms for induction of mucosal immunity. *Developments in Biological Standardization*, 92, 93-108.
- Branum, A. M., Lukacs, S. L. (2008). Food allergy among US children: trends in prevalence and hospitalizations.
- Breiteneder, H., Ebner, C. (2000). Molecular and biochemical classification of plant-derived food allergens. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 106(1), 27-36.
- Breiteneder, H., Mills, C. (2005a). Nonspecific lipid-transfer proteins in plant foods and pollens: an important allergen class. *Current opinion in allergy and clinical immunology*, 5(3), 275-279.
- Breiteneder, H., Mills, E. C. (2005b). Molecular properties of food allergens. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 115(1), 14-23.
- Brenna, O. V., Pastorello, E. A., Farioli, L., Pravettoni, V., Pompei, C. (2004). Presence of allergenic proteins in different peach (*Prunus persica*) cultivars and dependence of their content on fruit ripening. *Journal of agricultural and food chemistry*, 52(26), 7997-8000.
- Brenna, O., Pompei, C., Ortolani, C., Pravettoni, V., Pastorello, E. A., Farioli, L. (2000). Technological processes to decrease the allergenicity of peach juice and nectar. *Journal of agricultural and food chemistry*, 48(2), 493-497.
- Bublin, M., Eiwegger, T., Breiteneder, H. (2014). Do lipids influence the allergic sensitization process? *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 134(3), 521-529.
- Bublin, M., Radauer, C., Knulst, A., Wagner, S., Scheiner, O., Mackie, A. R., Breiteneder, H. (2008). Effects of gastrointestinal digestion and heating on the allergenicity of the kiwi allergens Act d 1, actinidin, and Act d 2, a thaumatin-like protein. *Molecular nutrition & food research*, 52(10), 1130-1139.
- Bueno-Díaz, C., Martín-Pedraza, L., Benedé, S., Haroun-Díaz, E., de las Heras, M., Batanero, E., Villalba, M. (2019). Seed storage 2S albumins are predictive indicators of exclusive Anacardiaceae cross-reactivity. *Clinical & Experimental Allergy*.
- Caballero, T., Martin-Esteban, M. (1998). Association between pollen hypersensitivity and edible vegetable allergy: a review. *Journal of investigational allergology & clinical immunology*, 8(1), 6-16.

- Cabanillas, B., Jappe, U., & Novak, N. (2018b). Allergy to Peanut, Soybean, and Other Legumes: Recent Advances in Allergen Characterization, Stability to Processing and IgE Cross-Reactivity. *Molecular nutrition & food research*, 62(1), 1700446.
- Cabanillas, B., Maleki, S. J., Cheng, H., Novak, N. (2018a). Differences in the uptake of ara h 3 from raw and roasted peanut by monocyte-derived dendritic cells. *International archives of allergy and immunology*, 177, 35-39.
- Calkhoven, P. G., Aalbers, M., Koshte, V. L., Pos, O., Oei, H. D., Aalberse, R. C. (1987). Cross-reactivity among birch pollen, vegetables and fruits as detected by IgE antibodies is due to at least three distinct cross-reactive structures. *Allergy*, 42(5), 382-390.
- Camacho, C., Matías, J. C., Chico, B., Cao, R., Gómez, L., Simpson, B. K., Villalonga, R. (2007). Amperometric Biosensor for Hydrogen Peroxide, Using Supramolecularly Immobilized Horseradish Peroxidase on the  $\beta$ -Cyclodextrin-Coated Gold Electrode. *Electroanalysis: An International Journal Devoted to Fundamental and Practical Aspects of Electroanalysis*, 19(24), 2538-2542.
- Campana, R., Huang, H. J., Freidl, R., Linhart, B., Vrtala, S., Wekerle, T., Valenta, R. (2017). Recombinant allergen and peptide-based approaches for allergy prevention by oral tolerance. In *Seminars in immunology* (Vol. 30, pp. 67-80). Academic Press.
- Campos Alberto, E. J., Shimojo, N., Suzuki, Y., Mashimo, Y., Arima, T., Matsuura, T., Hata, A. (2008). IL-10 gene polymorphism, but not TGF- $\beta$ 1 gene polymorphisms, is associated with food allergy in a Japanese population. *Pediatric Allergy and Immunology*, 19(8), 716-721.
- Campuzano, S., Yáñez-Sedeño, P., Pingarrón, J. M. (2017). Electrochemical biosensing of microribonucleic acids using antibodies and viral proteins with affinity for ribonucleic acid duplexes. *Electrochimica Acta*, 230, 271-278.
- Canonica, G. W., Cox, L., Pawankar, R., Baena-Cagnani, C. E., Blaiss, M., Bonini, S., Van Wijk, R. G. (2014). Sublingual immunotherapy: World Allergy Organization position paper 2013 update. *World Allergy Organization Journal*, 7(1), 1.
- Canumir, J. A., Celis, J. E., de Bruijn, J., Vidal, L. V. (2002). Pasteurisation of apple juice by using microwaves. *LWT-Food Science and Technology*, 35(5), 389-392.
- Capocchi, A., Fontanini, D., Muccilli, V., Cunsolo, V., Saviozzi, F., Saletti, R., Galleschi, L. (2005). NsLTP1 and NsLTP2 isoforms in soft wheat (*Triticum aestivum* Cv. Centauro) and farro (*Triticum dicoccon* Schrank) bran. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(20), 7976-7984.
- Carnés, J., Fernández-Caldas, E., Gallego, M. T., Ferrer, A., Cuesta-Herranz, J. (2002). Pru p 3 (LTP) content in peach extracts. *Allergy*, 57(11), 1071-1075.
- Casale, T. B., Canonica, G. W., Bousquet, J., Cox, L., Lockey, R., Nelson, H. S., Passalacqua, G. (2009). Recommendations for appropriate sublingual immunotherapy clinical trials. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 124(4), 665-670.

- Castagnaro, A., García-Olmedo, F. (1994). A fatty-acid-binding protein from wheat kernels. *FEBS letters*, 349(1), 117-119.
- Cavatorta, V., Sforza, S., Aquino, G., Galaverna, G., Dossena, A., Pastorello, E. A., Marchelli, R. (2010). In vitro gastrointestinal digestion of the major peach allergen Pru p 3, a lipid transfer protein: molecular characterization of the products and assessment of their IgE binding abilities. *Molecular nutrition & food research*, 54(10), 1452-1457.
- Cederquist, K. B., Keating, C. D. (2010). Hybridization efficiency of molecular beacons bound to gold nanowires: effect of surface coverage and target length. *Langmuir*, 26(23), 18273-18280.
- Chapman, M. D., Smith, A. M., Vailes, L. D., Arruda, L. K., Dhanaraj, V., Pomés, A. (2000). Recombinant allergens for diagnosis and therapy of allergic disease. *Journal of allergy and clinical immunology*, 106(3), 409-418.
- Charman, W. N., Porter, C. J., Mithani, S., Dressman, J. B. (1997). Physicochemical and physiological mechanisms for the effects of food on drug absorption: the role of lipids and pH. *Journal of pharmaceutical sciences*, 86(3), 269-282.
- Charvolin, D., Douliez, J. P., Marion, D., Cohen-Addad, C., Pebay-Peyroula, E. (1999). The crystal structure of a wheat nonspecific lipid transfer protein (ns-LTP1) complexed with two molecules of phospholipid at 2.1 Å resolution. *European Journal of Biochemistry*, 264(2), 562-568.
- Chen, X., Negi, S. S., Liao, S., Gao, V., Braun, W., Dreskin, S. C. (2016). Conformational IgE epitopes of peanut allergens Ara h 2 and Ara h 6. *Clinical & Experimental Allergy*, 46(8), 1120-1128.
- Chung, S. Y., Champagne, E. T. (1999). Allergenicity of Maillard reaction products from peanut proteins. *Journal of agricultural and food chemistry*, 47(12), 5227-5231.
- Chung, S. Y., Champagne, E. T. (2001). Association of end-product adducts with increased IgE binding of roasted peanuts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(8), 3911-3916.
- Ciprandi, G., Scala, E., Ariano, R. (2017). Phleum pratense molecular pattern across Italy. *European annals of allergy and clinical immunology*, 49(4), 176-180.
- Colombo, P., Bonura, A., Costa, M. A., Izzo, V., Passantino, R., Locorotondo, G., Geraci, D. (2003). The allergens of Parietaria. *International archives of allergy and immunology*, 130(3), 173-179.
- Commins, S. P., Platts-Mills, T. A. (2010). Allergenicity of carbohydrates and their role in anaphylactic events. *Current allergy and asthma reports*, 10(1), 29-33.
- Couderc, R., Baratti, J. (1980). Oxidation of methanol by the yeast, *Pichia pastoris*. Purification and properties of the alcohol oxidase. *Agricultural and biological chemistry*, 44(10), 2279-2289.

- Cox, L., Larenas-Linnemann, D., Lockey, R. F., Passalacqua, G. (2010). Speaking the same language: the World Allergy Organization subcutaneous immunotherapy systemic reaction grading system. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 125(3), 569-574.
- Cox, L., Nelson, H., Lockey, R., Calabria, C., Chacko, T., Finegold, I., Khan, D. A. (2011). Allergen immunotherapy: a practice parameter third update. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 127(1), S1-S55.
- Cravotto, G., Cintas, P. (2007). The combined use of microwaves and ultrasound: improved tools in process chemistry and organic synthesis. *Chemistry—A European Journal*, 13(7), 1902-1909.
- Crevel, R. R., Ballmer-Weber, B. K., Holzhauser, T., Hourihane, J. O. B., Knulst, A. C., Mackie, A. R., Taylor, S. L. (2008). Thresholds for food allergens and their value to different stakeholders. *Allergy*, 63(5), 597-609.
- Cromwell, O., Suck, R., Kahlert, H., Nandy, A., Weber, B., Fiebig, H. (2004). Transition of recombinant allergens from bench to clinical application. *Methods*, 32(3), 300-312.
- Cruz, L. P., Ribeiro, S. F., Carvalho, A. O., Vasconcelos, I. M., Rodrigues, R., Cunha, M. D., Gomes, V. M. (2010). Isolation and partial characterization of a novel lipid transfer protein (LTP) and antifungal activity of peptides from chilli pepper seeds. *Protein and peptide letters*, 17(3), 311-318.
- Cubells-Baeza, N., Gómez-Casado, C., Tordesillas, L., Ramírez-Castillejo, C., Garrido-Arandia, M., González-Melendi, P., Díaz-Perales, A. (2017). Identification of the ligand of Pru p 3, a peach LTP. *Plant molecular biology*, 94(1-2), 33-44.
- Cuesta-Herranz, J., Lazaro, M., Figueredo, E., Igea, J. M., Umpierrez, A., De-Las-Heras, M. (2000). Allergy to plant-derived fresh foods in a birch-and ragweed-free area. *Clinical & Experimental Allergy*, 30(10), 1411-1416.
- Da Silva, P., Landon, C., Industri, B., Marais, A., Marion, D., Ponchet, M., Vovelle, F. (2005). Solution structure of a tobacco lipid transfer protein exhibiting new biophysical and biological features. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 59(2), 356-367.
- Dahl, R., Andersen, P. S., Chivato, T., Valovirta, E., De Monchy, J. (2004). National prevalence of respiratory allergic disorders. *Respiratory medicine*, 98(5), 398-403.
- Davis, P. J., Smales, C. M., James, D. C. (2001). How can thermal processing modify the antigenicity of proteins?. *Allergy*, 56, 56-60.
- de la Cruz, S., López-Calleja, I., Martín, R., González, I., Alcocer, M., García, T. (2017). Recent advances in the detection of allergens in foods. In *Food Allergens* (pp. 263-295). Humana Press, New York, NY.
- De Martino, M., Novembre, E., Cozza, G., De Marco, A., Bonazza, P., Vierucci, A. (1988). Sensitivity to tomato and peanut allergens in children monosensitized to grass pollen. *Allergy*, 43(3), 206-213.

- Dearman, R. J., Alcocer, M. J. C., Kimber, I. (2007). Influence of plant lipids on immune responses in mice to the major Brazil nut allergen Ber e 1. *Clinical & Experimental Allergy*, 37(4), 582-591.
- del Castillo, M. D., Ames, J. M., Gordon, M. H. (2002). Effect of roasting on the antioxidant activity of coffee brews. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(13), 3698-3703.
- Delamarre, L., Couture, R., Mellman, I., Trombetta, E. S. (2006). Enhancing immunogenicity by limiting susceptibility to lysosomal proteolysis. *Journal of Experimental Medicine*, 203(9), 2049-2055.
- Delamarre, L., Pack, M., Chang, H., Mellman, I., Trombetta, E. S. (2005). Differential lysosomal proteolysis in antigen-presenting cells determines antigen fate. *Science*, 307(5715), 1630-1634.
- Deller, M. C., Kong, L., Rupp, B. (2016). Protein stability: a crystallographer's perspective. *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology Communications*, 72(2), 72-95.
- Dewanto, V., Wu, X., Adom, K. K., Liu, R. H. (2002). Thermal processing enhances the nutritional value of tomatoes by increasing total antioxidant activity. *Journal of agricultural and food chemistry*, 50(10), 3010-3014.
- Di Stasio, L., Picariello, G., Mongiello, M., Nocerino, R., Canani, R. B., Bavaro, S., Mamone, G. (2017). Peanut digestome: Identification of digestion resistant IgE binding peptides. *Food and chemical toxicology*, 107, 88-98.
- Díaz-Perales, A., Blanco, C., Sánchez-Monge, R., Varela, J., Carrillo, T., Salcedo, G. (2003). Analysis of avocado allergen (Prs a 1) IgE-binding peptides generated by simulated gastric fluid digestion. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 112(5), 1002-1007.
- Diaz-Perales, A., Garcia-Casado, G., Sanchez-Monge, R., Garcia-Selles, F. J., Barber, D., Salcedo, G. (2002). cDNA cloning and heterologous expression of the major allergens from peach and apple belonging to the lipid-transfer protein family. *Clinical & Experimental Allergy*, 32(1), 87-92.
- Diaz-Perales, A., Lombardero, M., Sanchez-Monge, R., Garcia-Selles, F. J., Pernas, M., Fernandez-Rivas, M., Salcedo, G. (2000). Lipid-transfer proteins as potential plant panallergens: cross-reactivity among proteins of Artemisia pollen, Castanea nut and Rosaceae fruits, with different IgE-binding capacities. *Clinical & Experimental Allergy*, 30(10), 1403-1410.
- Dills Jr, W. L. (1993). Protein fructosylation: fructose and the Maillard reaction. *The American journal of clinical nutrition*, 58(5), 779S-787S.
- Dodo, H., Konan, K., Viquez, O. (2005). A genetic engineering strategy to eliminate peanut allergy. *Current allergy and asthma reports*, 5(1), 67.

- Dölle, S., Lehmann, K., Schwarz, D., Weckwert, W., Scheler, C., George, E., Worm, M. (2011). Allergenic activity of different tomato cultivars in tomato allergic subjects. *Clinical & Experimental Allergy*, 41(11), 1643-1652.
- Doña, I., Pérez-Sánchez, N., Barrionuevo, E., Fernandez, R., Montañez, M. I., Sanchez, M. I., Jaén, M. J. T. (2018). Comparison Between ImmunoCAP And RAST For Diagnosis of Hypersensitivity to Betalactams. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 141(2).
- Doulliez, J. P., Jégou, S., Pato, C., Larré, C., Mollé, D., Marion, D. (2001a). Identification of a new form of lipid transfer protein (LTP1) in wheat seeds. *Journal of agricultural and food chemistry*, 49(4), 1805-1808.
- Doulliez, J. P., Pato, C., Rabesona, H., Mollé, D., Marion, D. (2001b). Disulfide bond assignment, lipid transfer activity and secondary structure of a 7-kDa plant lipid transfer protein, LTP2. *European Journal of Biochemistry*, 268(5), 1400-1403.
- Downs, M. L., Baumert, J. L., Taylor, S. L., Mills, E. N. C. (2016a). Mass spectrometric analysis of allergens in roasted walnuts. *Journal of proteomics*, 142, 62-69.
- Downs, M. L., Simpson, A., Custovic, A., Semic-Jusufagic, A., Bartra, J., Fernandez-Rivas, M., Mills, E. C. (2016b). Insoluble and soluble roasted walnut proteins retain antibody reactivity. *Food chemistry*, 194, 1013-1021.
- Dudziak, D., Kamphorst, A. O., Heidkamp, G. F., Buchholz, V. R., Trumppheller, C., Yamazaki, S., Steinman, R. M. (2007). Differential antigen processing by dendritic cell subsets in vivo. *Science*, 315(5808), 107-111.
- Dupont, D., Mandalari, G., Molle, D., Jardin, J., Léonil, J., Faulks, R. M., Mackie, A. R. (2010). Comparative resistance of food proteins to adult and infant in vitro digestion models. *Molecular nutrition & food research*, 54(6), 767-780.
- Durand, M., Segura, E. (2015). The known unknowns of the human dendritic cell network. *Frontiers in immunology*, 6, 129.
- Duro, G., Colombo, P., Costa, M. A., Izzo, V., Porcasi, R., Di Fiore, R., Geraci, D. (1997). Isolation and characterization of two cDNA clones coding for isoforms of the *Parietaria judaica* major allergen Par j 1.0101. *International archives of allergy and immunology*, 112(4), 348-355.
- Egger M, Jurets A, Wallner M, Briza P, Ruzek S, Hainzl S, Pichler U, Kitzmuller C, Bohle B, Huber CG, Ferreira F. (2011). Assessing protein immunogenicity with a dendritic cell line-derived endolysosomal degradome. *PLoS One*; 6:e17278
- Egger, M., Mutschlechner, S., Wopfner, N., Gadermaier, G., Briza, P., Ferreira, F. (2006). Pollen-food syndromes associated with weed pollinosis: an update from the molecular point of view. *Allergy*, 61(4), 461-476.
- Eggesbø, M., Botten, G., Stigum, H., Nafstad, P., Magnus, P. (2003). Is delivery by cesarean section a risk factor for food allergy? *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 112(2), 420-426.



- Eissa, S., L'Hocine, L., Siaj, M., Zourob, M. (2013). A graphene-based label-free voltammetric immunosensor for sensitive detection of the egg allergen ovalbumin. *Analyst*, 138(15), 4378-4384.
- Eiwegger, T., Rigby, N., Mondoulet, L., Bernard, H., Krauth, M. T., Boehm, A., Szépfalusi, Z. (2006). Gastro-duodenal digestion products of the major peanut allergen Ara h 1 retain an allergenic potential. *Clinical & Experimental Allergy*, 36(10), 1281-1288.
- Ellis, D. I., Muhamadali, H., Haughey, S. A., Elliott, C. T., Goodacre, R. (2015). Point-and-shoot: rapid quantitative detection methods for on-site food fraud analysis—moving out of the laboratory and into the food supply chain. *Analytical Methods*, 7(22), 9401-9414.
- Esposito, S., Isidori, C., Pacitto, A., Salvatori, C., Sensi, L., Frati, F., Marcucci, F. (2018). Epicutaneous immunotherapy in rhino-conjunctivitis and food allergies: a review of the literature. *Journal of translational medicine*, 16(1), 329.
- Fahy, E., Subramaniam, S., Murphy, R. C., Nishijima, M., Raetz, C. R., Shimizu, T., Dennis, E. A. (2009). Update of the LIPID MAPS comprehensive classification system for lipids. *Journal of lipid research*, 50(Supplement), S9-S14.
- Faus, I. (2000). Recent developments in the characterization and biotechnological production of sweet-tasting proteins. *Applied microbiology and biotechnology*, 53(2), 145-151.
- Feldman, M., Cryer, B., McArthur, K., Huet, B., Lee, E. (1996). Effects of aging and gastritis on gastric acid and pepsin secretion in humans: a prospective study. *Gastroenterology*, 110(4), 1043-1052.
- Fernández-Rivas, M. (2009a). The place of lipid transfer proteins (LTP) in the cross-reactivity of plant foods. *Revue Française d'Allergologie*, 49(5), 433-436.
- Fernández-Rivas, M., Garrido Fernandez, S., Nadal, J. A., Alonso Díaz de Durana, M. D., Garcia, B. E., González-Mancebo, E., Tabar, A. I. (2009b). Randomized double-blind, placebo-controlled trial of sublingual immunotherapy with a Pru p 3 quantified peach extract. *Allergy*, 64(6), 876-883.
- Fernández-Rivas, M., González-Mancebo, E., Rodríguez-Pérez, R., Benito, C., Sánchez-Monge, R., Salcedo, G., Casas, M. L. (2003). Clinically relevant peach allergy is related to peach lipid transfer protein, Pru p 3, in the Spanish population. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 112(4), 789-795.
- Fernández-Rivas, M., van Ree, R., Cuevas, M. (1997). Allergy to Rosaceae fruits without related pollinosis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 100(6), 728-733.
- Ferreira, C. T., Seidman, E. (2007). Food allergy: a practical update from the gastroenterological viewpoint. *Jornal de pediatria*, 83(1), 7-20.
- Ferreira, F., Briza, P., Infuhr, D., Schmidt, G., Wallner, M., Wopfner, N., Achatz, G. (2006). Modified recombinant allergens for safer immunotherapy. *Inflammation &*

*Allergy-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-Inflammation & Allergy)*, 5(1), 5-14.

- Ferreira, F., Wallner, M., Thalhamer, J. (2004). Customized antigens for desensitizing allergic patients. *Advances in immunology*, 84, 79-130.
- Ferrer, A., Huertas, A. J., Larramendi, C. H., Pagán, J. A., Bartra, J., García-Abujeta, J. L., Carnés, J. (2008). Antigenic and allergenic differences between green and mature tomatoes. *Journal of investigational allergology & clinical immunology*, 18(5), 411.
- Figdor, C. G., van Kooyk, Y., Adema, G. J. (2002). C-type lectin receptors on dendritic cells and Langerhans cells. *Nature Reviews Immunology*, 2(2), 77.
- Flinterman, A. E., Akkerdaas, J. H., den Hartog Jager, C. F., Rigby, N. M., Fernandez-Rivas, M., Hoekstra, M. O., Pasmans, S. G. (2008). Lipid transfer protein–linked hazelnut allergy in children from a non-Mediterranean birch-endemic area. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 121(2), 423-428.
- Foetisch, K., Son, D., Altmann, F., Aulepp, H., Conti, A., Hausteiner, D., Vieths, S. (2001). Tomato (*Lycopersicon esculentum*) allergens in pollen-allergic patients. *European Food Research and Technology*, 213(4-5), 259-266.
- Foetisch, K., Westphal, S., Lauer, I., Retzek, M., Altmann, F., Kolarich, D., Vieths, S. (2003). Biological activity of IgE specific for cross-reactive carbohydrate determinants. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 111(4), 889-896.
- Forbes, L. R., Spergel, J. M., Saltzman, R. W. (2009). Food allergies and atopic dermatitis: differentiating myth from reality. *Pediatric annals*, 38(2).
- Froidure, A., Pilette, C. (2015). Human dendritic cells in allergic asthma and rhinitis. *Medecine sciences: M/S*, 31(2), 151-158.
- Frueh, D. P., Arthanari, H., Wagner, G. (2005). Unambiguous assignment of NMR protein backbone signals with a time-shared triple-resonance experiment. *Journal of biomolecular NMR*, 33(3), 187-196.
- Fu, T. J., Abbott, U. R., Hatzos, C. (2002). Digestibility of food allergens and nonallergenic proteins in simulated gastric fluid and simulated intestinal fluid a comparative study. *Journal of agricultural and food chemistry*, 50(24), 7154-7160.
- Gadermaier, G., Hauser, M., Egger, M., Ferrara, R., Briza, P., Santos, K. S., Ferreira, F. (2011). Sensitization prevalence, antibody cross-reactivity and immunogenic peptide profile of Api g 2, the non-specific lipid transfer protein 1 of celery. *PLoS one*, 6(8), e24150.
- Gadermaier, G., Wopfner, N., Wallner, M., Egger, M., Didierlaurent, A., Regl, G., Hawranek, T. (2008). Array-based profiling of ragweed and mugwort pollen allergens. *Allergy*, 63(11), 1543-1549.
- Gan, J., Bornhorst, G. M., Henrick, B. M., German, J. B. (2018). Protein digestion of baby foods: study approaches and implications for infant health. *Molecular nutrition & food research*, 62(1), 1700231.

- Garcia, K. C., Adams, E. J. (2005). How the T cell receptor sees antigen—a structural view. *Cell*, 122(3), 333-336.
- García-Casado, G., Crespo, J. F., Rodríguez, J., Salcedo, G. (2001). Isolation and characterization of barley lipid transfer protein and protein Z as beer allergens. *Journal of allergy and clinical immunology*, 108(4), 647-649.
- García-Robaina, J.C., De La Torre-Morín, F., Sánchez-Machín, I., Sánchez-Monge, R., Barber, D., Lombardero, M. (2001). Anaphylaxis induced by exercise and wine. *Allergy*, 56(4), 357-358.
- Garino, C., Zitelli, F., Travaglia, F., Coïsson, J. D., Cravotto, G., Arlorio, M. (2012). Evaluation of the impact of sequential microwave/ultrasound processing on the IgE binding properties of Pru p 3 in treated peach juice. *Journal of agricultural and food chemistry*, 60(35), 8755-8762.
- Garza, S., Ibarz, A., Pagan, J., Giner, J. (1999). Non-enzymatic browning in peach puree during heating. *Food research international*, 32(5), 335-343.
- Gass, J., Vora, H., Hofmann, A. F., Gray, G. M., Khosla, C. (2007). Enhancement of dietary protein digestion by conjugated bile acids. *Gastroenterology*, 133(1), 16-23.
- Gawchik, S. M. (2011). Latex allergy. *Mount Sinai Journal of Medicine: A Journal of Translational and Personalized Medicine*, 78(5), 759-772.
- Ge, Z., Lin, M., Wang, P., Pei, H., Yan, J., Shi, J., Zuo, X. (2014). Hybridization chain reaction amplification of microRNA detection with a tetrahedral DNA nanostructure-based electrochemical biosensor. *Analytical chemistry*, 86(4), 2124-2130.
- Geroldinger-Simic, M., Zelniker, T., Aberer, W., Ebner, C., Egger, C., Greiderer, A., Bohle, B. (2011). Birch pollen-related food allergy: Clinical aspects and the role of allergen-specific IgE and IgG4 antibodies. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 127(3), 616-622.
- Giangrieco, I., Alessandri, C., Rafaianni, C., Santoro, M., Zuzzi, S., Tuppo, L., Tamburrini, M., D'Avino, R., Ciardiello, M.-A., Mari, A. (2015). Structural features, IgE binding and preliminary clinical findings of the 7 kDa Lipid Transfer Protein from tomato seeds. *Mol. Immunol*, 66:154-163.
- Gilissen, L. J., Bolhaar, S. T., Matos, C. I., Rouwendal, G. J., Boone, M. J., Krens, F. A., Knulst, A. C. (2005). Silencing the major apple allergen Mal d 1 by using the RNA interference approach. *Journal of allergy and clinical immunology*, 115(2), 364-369.
- Gincel, E., Simorre, J. P., Caille, A., Marion, D., Ptak, M., Vovelle, F. (1994). Three-Dimensional Structure in Solution of a Wheat Lipid-Transfer Protein from Multidimensional 1H-NMR Data: A New Folding for Lipid Carriers. *European journal of biochemistry*, 226(2), 413-422.

- Giovannucci, E. (1999). Tomatoes, tomato-based products, lycopene, and cancer: review of the epidemiologic literature. *Journal of the national cancer institute*, 91(4), 317-331.
- Goldberg, A. D., Allis, C. D., Bernstein, E. (2007). Epigenetics: a landscape takes shape. *Cell*, 128(4), 635-638.
- Gomar, J., Petit, M. C., Sodano, P., Sy, D., Marion, D., Kader, J. C., Ptak, M. (1996). Solution structure and lipid binding of a nonspecific lipid transfer protein extracted from maize seeds. *Protein Science*, 5(4), 565-577.
- Gomar, J., Sodano, P., Ptak, M. (1997). Homology modelling of an antimicrobial protein, Ace-AMP1, from lipid transfer protein structures. *Folding and Design*, 2(3), 183-192.
- Gomez, F., Bogas, G., Gonzalez, M., Campo, P., Salas, M., Diaz-Perales, A., Torres, M. J. (2017). The clinical and immunological effects of Pru p 3 sublingual immunotherapy on peach and peanut allergy in patients with systemic reactions. *Clinical & Experimental Allergy*, 47(3), 339-350.
- Gonzalez-Quintela, A., Gude, F., Boquete, O., Rey, J., Meijide, L. M., Suarez, F., Vidal, C. (2003). Association of alcohol consumption with total serum immunoglobulin E levels and allergic sensitization in an adult population-based survey. *Clinical & Experimental Allergy*, 33(2), 199-205.
- Gould, H. J., Sutton, B. J. (2008). IgE in allergy and asthma today. *Nature Reviews Immunology*, 8(3), 205.
- Gross, M. (2015). Why did evolution give us allergies?. *Cell Press* R53.
- Gryson, N. (2010). Effect of food processing on plant DNA degradation and PCR-based GMO analysis: a review. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 396(6), 2003-2022.
- Guillen, D., Barranco, P., Palacín, A., Quirce, S. (2014). Occupational rhinoconjunctivitis due to maize in a snack processor: a cross-reactivity study between lipid transfer proteins from different cereals and peach. *Allergy, asthma & immunology research*, 6(5), 470-473.
- Gupta, R. K., Gupta, K., Sharma, A., Das, M., Ansari, I. A., Dwivedi, P. D. (2018). Maillard reaction in food allergy: Pros and cons. *Critical reviews in food science and nutrition*, 58(2), 208-226.
- Hammad, H., Plantinga, M., Deswarte, K., Pouliot, P., Willart, M. A., Kool, M., Lambrecht, B. N. (2010). Inflammatory dendritic cells—not basophils—are necessary and sufficient for induction of Th2 immunity to inhaled house dust mite allergen. *Journal of Experimental Medicine*, 207(10), 2097-2111.
- Han, G. W., Lee, J. Y., Song, H. K., Chang, C., Min, K., Moon, J., Kim, T. D. (2001). Structural basis of non-specific lipid binding in maize lipid-transfer protein complexes revealed by high-resolution X-ray crystallography. *Journal of molecular biology*, 308(2), 263-278.

- Hartz, C., Lauer, I., Moncin, M. D. M. S. M., Cistero-Bahima, A., Foetisch, K., Lidholm, J., Scheurer, S. (2010). Comparison of IgE-binding capacity, cross-reactivity and biological potency of allergenic non-specific lipid transfer proteins from peach, cherry and hazelnut. *International archives of allergy and immunology*, 153(4), 335-346.
- Hauser, M., Asam, C., Himly, M., Palazzo, P., Voltolini, S., Montanari, C., Wallner, M. (2011). Bet v 1-like pollen allergens of multiple Fagales species can sensitize atopic individuals. *Clinical & Experimental Allergy*, 41(12), 1804-1814.
- Hauser, M., Roulias, A., Ferreira, F., Egger, M. (2010). Panallergens and their impact on the allergic patient. *Allergy, Asthma & Clinical Immunology*, 6(1), 1.
- Hazebrouck, S., Guillon, B., Drumare, M. F., Paty, E., Wal, J. M., Bernard, H. (2012). Trypsin resistance of the major peanut allergen Ara h 6 and allergenicity of the digestion products are abolished after selective disruption of disulfide bonds. *Molecular nutrition & food research*, 56(4), 548-557.
- Heffler, E., Guida, G., Badiu, I., Nebiolo, F., Rolla, G. (2007). Anaphylaxis after eating Italian pizza containing buckwheat as the hidden food allergen. *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology*, 17(4), 261.
- Heinemann, B., Andersen, K. V., Nielsen, P. R., Bech, L. M., Poulsen, F. M. (1996). Structure in solution of a four-helix lipid binding protein. *Protein Science*, 5(1), 13-23.
- Helm, R., Cockrell, G., Sharkey, P., Brenner, R., Burks, A. W. (1993). In vitro translation of RNA from the German cockroach *Blattella germanica*. *Molecular immunology*, 30(18), 1685-1688.
- Hiller, K. M., Lubahn, B. C., Klapper, D. G. (1998). Cloning and expression of ragweed allergen Amb a 6. *Scandinavian journal of immunology*, 48(1), 26-36.
- Hiller, R., Laffer, S., Harwanegg, C., Huber, M., Schmidt, W. M., Twardosz, A., Chapman, M. (2002). Microarrayed allergen molecules: diagnostic gatekeepers for allergy treatment. *The FASEB Journal*, 16(3), 414-416.
- Hofmann, C., Scheurer, S., Rost, K., Graulich, E., Jamin, A., Foetisch, K., Adler, H. S. (2013). Cor a 1-reactive T cells and IgE are predominantly cross-reactive to Bet v 1 in patients with birch pollen-associated food allergy to hazelnut. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 131(5), 1384-1392.
- Hoh, F., Pons, J. L., Gautier, M. F., De Lamotte, F., Dumas, C. (2005). Structure of a liganded type 2 non-specific lipid-transfer protein from wheat and the molecular basis of lipid binding. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 61(4), 397-406.
- Hollingsworth, J. W., Maruoka, S., Boon, K., Garantziotis, S., Li, Z., Tomfohr, J., Schwartz, D. A. (2008). In utero supplementation with methyl donors enhances allergic airway disease in mice. *The Journal of clinical investigation*, 118(10), 3462-3469.

- Holzhauser, T., Kleiner, K., Janise, A., Röder, M. (2014). Matrix-normalised quantification of species by threshold-calibrated competitive real-time PCR: Allergenic peanut in food as one example. *Food chemistry*, 163, 68-76.
- Huecas, S., Villalba, M., Martínez-Ruiz, A., Rodríguez, R. (1999). Production and detailed characterization of biologically active olive pollen allergen Ole e 1 secreted by the yeast *Pichia pastoris*. *European journal of biochemistry*, 261(2), 539-546.
- Humeniuk, P., Dubiela, P., Hoffmann-Sommergruber, K. (2017). Dendritic cells and their role in allergy: uptake, proteolytic processing and presentation of allergens. *International journal of molecular sciences*, 18(7), 1491.
- Hummel, M., Wigger, T., Brockmeyer, J. (2015). Characterization of mustard 2S albumin allergens by bottom-up, middle-down, and top-down proteomics: a consensus set of isoforms of Sin a 1. *Journal of proteome research*, 14(3), 1547-1556.
- Husby, S., Foged, N., Høst, A., Svehag, S. E. (1987). Passage of dietary antigens into the blood of children with coeliac disease. Quantification and size distribution of absorbed antigens. *Gut*, 28(9), 1062-1072.
- Ilchmann, A., Burgdorf, S., Scheurer, S., Waibler, Z., Nagai, R., Wellner, A., Kalinke, U. (2010). Glycation of a food allergen by the Maillard reaction enhances its T-cell immunogenicity: role of macrophage scavenger receptor class A type I and II. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 125(1), 175-183.
- Iniesto, E., Jiménez, A., Prieto, N., Cabanillas, B., Burbano, C., Pedrosa, M. M., Linacero, R. (2013). Real Time PCR to detect hazelnut allergen coding sequences in processed foods. *Food chemistry*, 138(2-3), 1976-1981.
- Ipsen, H., Løwenstein, H. (1983). Isolation and immunochemical characterization of the major allergen of birch pollen (*Betula verrucosa*). *Journal of allergy and clinical immunology*, 72(2), 150-159.
- Itano, A. A., McSorley, S. J., Reinhardt, R. L., Ehst, B. D., Ingulli, E., Rudensky, A. Y., Jenkins, M. K. (2003). Distinct dendritic cell populations sequentially present antigen to CD4 T cells and stimulate different aspects of cell-mediated immunity. *Immunity*, 19(1), 47-57.
- Jain, A., Salunke, D. M. (2017). Crystal structure of nonspecific lipid transfer protein from *Solanum melongena*. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 85(10), 1820-1830.
- Jenab, M., Ferrari, P., Mazuir, M., Tjønneland, A., Clavel-Chapelon, F., Linseisen, J., Gonzalez, C. A. (2005). Variations in lycopene blood levels and tomato consumption across European countries based on the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) study. *The Journal of nutrition*, 135(8), 2032S-2036S.
- Jiménez-Saiz, R., Belloque, J., Molina, E., López-Fandino, R. (2011). Human immunoglobulin E (IgE) binding to heated and glycated ovalbumin and ovomucoid

- before and after in vitro digestion. *Journal of agricultural and food chemistry*, 59(18), 10044-10051.
- Jiménez-Saiz, R., Benedé, S., Miralles, B., López-Expósito, I., Molina, E., López-Fandiño, R. (2014). Immunological behavior of in vitro digested egg-white lysozyme. *Molecular nutrition & food research*, 58(3), 614-624.
- Jiménez-Saiz, R., Benedé, S., Molina, E., López-Expósito, I. (2015). Effect of processing technologies on the allergenicity of food products. *Critical reviews in food science and nutrition*, 55(13), 1902-1917.
- Jiménez-Saiz, R., López-Expósito, I., Molina, E., López-Fandiño, R. (2013). IgE-binding and in vitro gastrointestinal digestibility of egg allergens in the presence of polysaccharides. *Food hydrocolloids*, 30(2), 597-605.
- Jirakova, L., Hrstka, R., Campuzano, S., Pingarrón, J. M., Bartosik, M. (2019). Multiplexed Immunosensing Platform Coupled to Hybridization Chain Reaction for Electrochemical Determination of MicroRNAs in Clinical Samples. *Electroanalysis*, 31(2), 293-302.
- Jongejan, L., van Ree, R., Poulsen, L. K. (2016). Hypoallergenic molecules for subcutaneous immunotherapy.
- Kader, J. C. (1975). Proteins and the intracellular exchange of lipids. I. Stimulation of phospholipid exchange between mitochondria and microsomal fractions by proteins isolated from potato tuber. *Biochimica et biophysica acta*, 380(1), 31-44.
- Kader, J. C. (1996). Lipid-transfer proteins in plants. *Annual review of plant biology*, 47(1), 627-654.
- Kalantzi, L., Goumas, K., Kalioras, V., Abrahamsson, B., Dressman, J. B., Reppas, C. (2006). Characterization of the human upper gastrointestinal contents under conditions simulating bioavailability/bioequivalence studies. *Pharmaceutical research*, 23(1), 165-176.
- Kanny, G., Fremont, S., Talhouarne, G., Nicolas, J. P., Moneret-Vautrin, D. A. (1995). Anaphylaxis to mustard as a masked allergen in "chicken dips". *Annals of allergy, asthma & immunology: official publication of the American College of Allergy, Asthma, & Immunology*, 75(4), 340-342.
- Kapsenberg, M. L. (2003). Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. *Nature Reviews Immunology*, 3(12), 984.
- Kay, A. B., Barata, L., Meng, Q., Durham, S. R., Ying, S. (1997). Eosinophils and eosinophil-associated cytokines in allergic inflammation. *International archives of allergy and immunology*, 113(1-3), 196-199.
- Kelly, L. A., Erwin, E. A., Platts-Mills, T. A. (2012). The indoor air and asthma: the role of cat allergens. *Current opinion in pulmonary medicine*, 18(1), 29.

- Kennedy, J. L., Stallings, A. P., Platts-Mills, T. A., Oliveira, W. M., Workman, L., James, H. R., Commins, S. P. (2013). Galactose- $\alpha$ -1, 3-galactose and delayed anaphylaxis, angioedema, and urticaria in children. *Pediatrics*, 131(5), e1545-e1552.
- Klein, C., de Lamotte-Guéry, F., Gautier, F., Moulin, G., Boze, H., Joudrier, P., Gautier, M. F. (1998). High-Level Secretion of a Wheat Lipid Transfer Protein in *Pichia pastoris*. *Protein expression and purification*, 13(1), 73-82.
- Klingebl, C., Chantran, Y., Arif-Lusson, R., Ehrenberg, A. E., Östling, J., Poisson, A., Sarrat, A. (2019). Pru p 7 sensitisation is a predominant cause of severe, cypress pollen-associated peach allergy. *Clinical & Experimental Allergy*.
- Kokkinos, C., Economou, A., Prodromidis, M. I. (2016). Electrochemical immunosensors: Critical survey of different architectures and transduction strategies. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 79, 88-105.
- Kondo, Y., Urisu, A., Tokuda, R. (2001). Identification and characterization of the allergens in the tomato fruit by immunoblotting. *Int. Arch. Allergy Immunol*, 126, 294-299.
- Koplin, J., Allen, K., Gurrin, L., Peters, R., Lowe, A., Tang, M., Dharmage, S. (2013). The impact of family history of allergy on risk of food allergy: a population-based study of infants. *International journal of environmental research and public health*, 10(11), 5364-5377.
- Koppelman, S. J., Hefle, S. L., Taylor, S. L., De Jong, G. A. (2010). Digestion of peanut allergens Ara h 1, Ara h 2, Ara h 3, and Ara h 6: a comparative in vitro study and partial characterization of digestion-resistant peptides. *Molecular nutrition & food research*, 54(12), 1711-1721.
- Krause, S., Reese, G., Randow, S., Zennaro, D., Quarantino, D., Palazzo, P., Mari, A. (2009). Lipid transfer protein (Ara h 9) as a new peanut allergen relevant for a Mediterranean allergic population. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 124(4), 771-778.
- Kumar, A. (2008). Recent advances in DNA biosensor. *Sensors & Transducers*, 92(5), 122-133.
- Kurup, V. P., Shen, H. D., Vijay, H. (2002). Immunobiology of fungal allergens. *International archives of allergy and immunology*, 129(3), 181-188.
- Larramendi, C. H., Ferrer, A., Huertas, A. J., García-Abujeta, J. L., Andreu, C., Tella, R., López-Matas, M. A. (2008). Sensitization to tomato peel and pulp extracts in the Mediterranean Coast of Spain: prevalence and co-sensitization with aeroallergens. *Clinical & Experimental Allergy*, 38(1), 169-177.
- Lauber, T., Marx, U. C., Schulz, A., Kreuzmann, P., Rösch, P., Hoffmann, S. (2001). Accurate disulfide formation in *Escherichia coli*: overexpression and characterization of the first domain (HF6478) of the multiple Kazal-type inhibitor LEKTI. *Protein expression and purification*, 22(1), 108-112.



- Lauer, I., Alessandri, S., Pokoj, S., Reuter, A., Conti, A., Vieths, S., Scheurer, S. (2008). Expression and characterization of three important panallergens from hazelnut. *Molecular nutrition & food research*, 52(S2), S262-S271.
- Lauer, I., Dueringer, N., Pokoj, S., Rehm, S., Zoccatelli, G., Reese, G., Vieths, S. (2009). The non-specific lipid transfer protein, Ara h 9, is an important allergen in peanut. *Clinical & Experimental Allergy*, 39(9), 1427-1437.
- Le, L. Q., Lorenz, Y., Scheurer, S., Fötisch, K., Enrique, E., Bartra, J., Sonnewald, U. (2006a). Design of tomato fruits with reduced allergenicity by dsRNAi-mediated inhibition of ns-LTP (Lyc e 3) expression. *Plant biotechnology journal*, 4(2), 231-242.
- Le, L. Q., Mahler, V., Lorenz, Y., Scheurer, S., Biemelt, S., Vieths, S., Sonnewald, U. (2006b). Reduced allergenicity of tomato fruits harvested from Lyc e 1-silenced transgenic tomato plants. *Journal of allergy and clinical immunology*, 118(5), 1176-1183.
- Le, L. Q., Mahler, V., Scheurer, S., Foetisch, K., Braun, Y., Weigand, D., Vieths, S. (2010). Yeast profilin complements profilin deficiency in transgenic tomato fruits and allows development of hypoallergenic tomato fruits. *The FASEB Journal*, 24(12), 4939-4947.
- Ledl, F., & Schleicher, E. (1990). New aspects of the Maillard reaction in foods and in the human body. *Angewandte Chemie International Edition in English*, 29(6), 565-594.
- Lee, J. B. (2016). Regulation of IgE-mediated food allergy by IL-9 producing mucosal mast cells and type 2 innate lymphoid cells. *Immune network*, 16(4), 211-218.
- Lee, J. Y., Min, K., Cha, H., Shin, D. H., Hwang, K. Y., Suh, S. W. (1998). Rice non-specific lipid transfer protein: the 1.6 Å crystal structure in the unliganded state reveals a small hydrophobic cavity. *Journal of molecular biology*, 276(2), 437-448.
- Lehmann, K., Schweimer, K., Reese, G., Randow, S., Suhr, M., Becker, W. M., Rösch, P. (2006). Structure and stability of 2S albumin-type peanut allergens: implications for the severity of peanut allergic reactions. *Biochemical Journal*, 395(3), 463-472.
- Lehto, M., Airaksinen, L., Puustinen, A., Tillander, S., Hannula, S., Nyman, T., Lauerma, A. (2010). Thaumatin-like protein and baker's respiratory allergy. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*, 104(2), 139-146.
- León, L., Tatituri, R. V., Grenha, R., Sun, Y., Barral, D. C., Minnaard, A. J., Peng, W. (2012). Saposins utilize two strategies for lipid transfer and CD1 antigen presentation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(12), 4357-4364.
- Lerche, M. H., Kragelund, B. B., Bech, L. M., Poulsen, F. M. (1997). Barley lipid-transfer protein complexed with palmitoyl CoA: the structure reveals a hydrophobic binding site that can expand to fit both large and small lipid-like ligands. *Structure*, 5(2), 291-306.

- Leszczynska, J., Łącka, A., Szemraj, J., Lukamowicz, J., Zegota, H. (2003). The effect of microwave treatment on the immunoreactivity of gliadin and wheat flour. *European Food Research and Technology*, 217(5), 387-391.
- Leynaert, B., Neukirch, F., Demoly, P., Bousquet, J. (2000). Epidemiologic evidence for asthma and rhinitis comorbidity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 106(5), S201-S205.
- Li, C., Liu, Z., Cai, S., Wen, F., Wu, D., Liu, Y., Chen, J. (2015). An electrochemical microRNA biosensor based on protein p19 combining an acridone derivate as indicator and DNA concatamers for signal amplification. *Electrochemistry Communications*, 60, 185-189.
- Lin, K. F., Liu, Y. N., Hsu, S. T. D., Samuel, D., Cheng, C. S., Bonvin, A. M., Lyu, P. C. (2005). Characterization and structural analyses of nonspecific lipid transfer protein 1 from mung bean. *Biochemistry*, 44(15), 5703-5712.
- Lindorff-Larsen, K., Winther, J. R. (2001). Surprisingly high stability of barley lipid transfer protein, LTP1, towards denaturant, heat and proteases. *FEBS letters*, 488(3), 145-148.
- Liu, S., Lin, Y., Liu, T., Cheng, C., Wei, W., Wang, L., Li, F. (2014). Enzyme-free and label-free ultrasensitive electrochemical detection of DNA and adenosine triphosphate by dendritic DNA concatamer-based signal amplification. *Biosensors and Bioelectronics*, 56, 12-18.
- Lleonart, R., Cistero, A., Carreira, J., Batista, A., del Prado Moscoso, J. (1992). Food allergy: identification of the major IgE-binding component of peach (*Prunus persica*). *Annals of allergy*, 69(2), 128-130.
- Lollier, V., Denery-Papini, S., Brossard, C., Tessier, D. (2014). Meta-analysis of IgE-binding allergen epitopes. *Clinical Immunology*, 153(1), 31-39.
- Lombardero, M., García-Sellés, F. J., Polo, F., Jimeno, L., Chamorro, M. J., Garcia-Casado, G., Barber, D. (2004). Prevalence of sensitization to Artemisia allergens Art v 1, Art v 3 and Art v 60 kDa. Cross-reactivity among Art v 3 and other relevant lipid-transfer protein allergens. *Clinical & experimental allergy*, 34(9), 1415-1421.
- Lombardero, M., Heymann, P. W., Platts-Mills, T. A., Fox, J. W., Chapman, M. D. (1990). Conformational stability of B cell epitopes on group I and group II Dermatophagoides spp. allergens. Effect of thermal and chemical denaturation on the binding of murine IgG and human IgE antibodies. *The Journal of Immunology*, 144(4), 1353-1360.
- López, M. S. P., Cabanillas, G. F., Castañón, M. J. L., López-Ruiz, B. (2014). Development of a genosensor for peanut allergen ARA h 2 detection and its optimization by surface response methodology. *Biosensors and Bioelectronics*, 62, 350-356.
- López-Matas, M. Á., Larramendi, C. H., Ferrer, Á., Huertas, Á. J., Pagán, J. A., García-Abujeta, J. L., Carnés, J. (2011). Identification and quantification of tomato

- allergens: in vitro characterization of six different varieties. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*, 106(3), 230-238.
- López-Matas, M. A., Larramendi, C. H., Huertas, A. J., Ferrer, A., Moya, R., Pagan, J. A., Carnés, J. (2015). Tomato nsLTP as an "In Vivo" Diagnostic Tool: Sensitization in a Mediterranean Population. *Journal of investigational allergology & clinical immunology*, 25(3), 196-204.
- Lorenz, A. R., Scheurer, S., Haustein, D., Vieths, S. (2001). Recombinant food allergens. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 756(1-2), 255-279.
- Lorenz, Y., Enrique, E., LeQuynh, L., Fötisch, K., Retzek, M., Biemelt, S., Scheurer, S. (2006). Skin prick tests reveal stable and heritable reduction of allergenic potency of gene-silenced tomato fruits. *Journal of allergy and clinical immunology*, 118(3), 711-718.
- Lötvall, J., Pawankar, R., Wallace, D. V., Akdis, C. A., Rosenwasser, L. J., Weber, R. W., Fineman, S. M. (2012). We call for iCAALL: International Collaboration in Asthma, Allergy and Immunology.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of biological chemistry*, 193, 265-275.
- Lozupone, C. A., Stombaugh, J. I., Gordon, J. I., Jansson, J. K., Knight, R. (2012). Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. *Nature*, 489(7415), 220.
- Lu, P. J., Hsu, P. I., Chen, C. H., Hsiao, M., Chang, W. C., Tseng, H. H., Chen, H. C. (2010). Gastric juice acidity in upper gastrointestinal diseases. *World journal of gastroenterology: WJG*, 16(43), 5496.
- Lupinek, C., Wollmann, E., Baar, A., Banerjee, S., Breiteneder, H., Broecker, B. M., Hochwallner, H. (2014). Advances in allergen-microarray technology for diagnosis and monitoring of allergy: the MeDALL allergen-chip. *Methods*, 66(1), 106-119.
- Lyons, P. J., Fricker, L. D. (2011). Carboxypeptidase O is a glycosylphosphatidylinositol-anchored intestinal peptidase with acidic amino acid specificity. *Journal of Biological Chemistry*, 286(45), 39023-39032.
- MacDonald, A. S., Maizels, R. M. (2008). Alarming dendritic cells for Th2 induction. *Journal of Experimental Medicine*, 205(1), 13-17.
- Mackie, A., Macierzanka, A. (2010). Colloidal aspects of protein digestion. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 15(1-2), 102-108.
- Maldonado-Valderrama, J., Wilde, P., Macierzanka, A., Mackie, A. (2011). The role of bile salts in digestion. *Advances in colloid and interface science*, 165(1), 36-46.
- Maleki, S. J., Chung, S. Y., Champagne, E. T., Raufman, J. P. (2000). The effects of roasting on the allergenic properties of peanut proteins. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 106(4), 763-768.

- Mandalari, G., Mackie, A. M., Rigby, N. M., Wickham, M. S., Mills, E. C. (2009). Physiological phosphatidylcholine protects bovine  $\beta$ -lactoglobulin from simulated gastrointestinal proteolysis. *Molecular nutrition & food research*, 53(S1), S131-S139.
- Martin, L. J., He, H., Collins, M. H., Abonia, J. P., Myers, J. M. B., Eby, M., Rothenberg, M. E. (2018). Eosinophilic esophagitis (EoE) genetic susceptibility is mediated by synergistic interactions between EoE-specific and general atopic disease loci. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 141(5), 1690-1698.
- Martino, D. J., Prescott, S. L. (2010). Silent mysteries: epigenetic paradigms could hold the key to conquering the epidemic of allergy and immune disease. *Allergy*, 65(1), 7-15.
- Martín-Pedraza, L., González, M., Gómez, F., Blanca-López, N., Garrido-Arandia, M., Rodríguez, R., Mayorga, C. (2016). Two nonspecific lipid transfer proteins (nsLTPs) from tomato seeds are associated to severe symptoms of tomato-allergic patients. *Molecular nutrition & food research*, 60(5), 1172-1182.
- Martins, S. I., Jongen, W. M., Van Boekel, M. A. (2000). A review of Maillard reaction in food and implications to kinetic modelling. *Trends in food science & technology*, 11(9-10), 364-373.
- Martos, G., Contreras, P., Molina, E., López-Fandiño, R. (2010). Egg white ovalbumin digestion mimicking physiological conditions. *Journal of Agricultural and food chemistry*, 58(9), 5640-5648.
- Mas, S., Boissy, P., Monsalve, R. I., Cuesta-Herranz, J., Díaz-Perales, A., Fernández, J., Villalba, M. (2015). A recombinant Sal k 1 isoform as an alternative to the polymorphic allergen from *Salsola kali* pollen for allergy diagnosis. *International archives of allergy and immunology*, 167(2), 83-93.
- Masthoff, L. J., Hoff, R., Verhoeckx, K. C., van Os-Medendorp, H., Michelsen-Huisman, A., Baumert, J. L., Knulst, A. C. (2013). A systematic review of the effect of thermal processing on the allergenicity of tree nuts. *Allergy*, 68(8), 983-993.
- Matricardi, P. M., Kleine-Tebbe, J., Hoffmann, H. J., Valenta, R., Hilger, C., Hofmaier, S., Barber, D. (2016). EAACI molecular allergology user's guide. *Pediatric Allergy and Immunology*, 27, 1-250.
- Matsuo, H., Yokooji, T., Taogoshi, T. (2015). Common food allergens and their IgE-binding epitopes. *Allergy International*, 64(4), 332-343.
- Mayer, L. (2003). Mucosal immunity. *Pediatrics*, 111(Supplement 3), 1595-1600.
- Metcalfe, D. D., Peavy, R. D., Gilfillan, A. M. (2009). Mechanisms of mast cell signaling in anaphylaxis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 124(4), 639-646.
- Mildner, A., Jung, S. (2014). Development and function of dendritic cell subsets. *Immunity*, 40(5), 642-656.

- Mills, E. C., Sancho, A. I., Rigby, N. M., Jenkins, J. A., Mackie, A. R. (2009). Impact of food processing on the structural and allergenic properties of food allergens. *Molecular nutrition & food research*, 53(8), 963-969.
- Mirotti, L., Florsheim, E., Rundqvist, L., Larsson, G., Spinozzi, F., Leite-de-Moraes, M., Alcocer, M. (2013). Lipids are required for the development of Brazil nut allergy: the role of mouse and human iNKT cells. *Allergy*, 68(1), 74-83.
- Mishra, G., Barfidokht, A., Tehrani, F., Mishra, R. (2018). Food safety analysis using electrochemical biosensors. *Foods*, 7(9), 141.
- Moghaddam, A. E., Hillson, W. R., Noti, M., Gartlan, K. H., Johnson, S., Thomas, B., Sattentau, Q. J. (2014). Dry roasting enhances peanut-induced allergic sensitization across mucosal and cutaneous routes in mice. *Journal of allergy and clinical immunology*, 134(6), 1453-1456.
- Mohapatra, S. S., Lockey, R. F., Polo, F. (2008). Weed pollen allergens. *Clinical allergy and immunology*, 21, 127-139.
- Moingeon, P. (2012). Adjuvants for allergy vaccines. *Human vaccines & immunotherapeutics*, 8(10), 1492-1498.
- Monsalve, R. I., Villalba, M., Rodríguez, R. (2001). Allergy to mustard seeds: The importance of 2S albumins as food allergens. In *Internet Symp. Food Allergens* (Vol. 3, No. 2).
- Morales, M., López-Matas, M. Á., Moya, R., Carnés, J. (2014). Cross-reactivity among non-specific lipid-transfer proteins from food and pollen allergenic sources. *Food chemistry*, 165, 397-402.
- Moreno, F. J. (2007). Gastrointestinal digestion of food allergens: effect on their allergenicity. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 61(1), 50-60.
- Moreno, F. J., Mackie, A. R., Mills, E. C. (2005a). Phospholipid interactions protect the milk allergen  $\alpha$ -lactalbumin from proteolysis during in vitro digestion. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(25), 9810-9816.
- Moreno, F. J., Mellon, F. A., Wickham, M. S., Bottrill, A. R., Mills, E. C. (2005b). Stability of the major allergen Brazil nut 2S albumin (Ber e 1) to physiologically relevant in vitro gastrointestinal digestion. *The FEBS journal*, 272(2), 341-352.
- Morris, A. L., MacArthur, M. W., Hutchinson, E. G., Thornton, J. M. (1992). Stereochemical quality of protein structure coordinates. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 12(4), 345-364.
- Moser, M., Cramer, R., Brust, E., Suter, M., Menz, G. (1994). Diagnostic value of recombinant *Aspergillus fumigatus* allergen I/a for skin testing and serology. *Journal of allergy and clinical immunology*, 93(1), 1-11.
- Mothes-Luksch, N., Raith, M., Stingl, G., Focke-Tejkl, M., Razzazi-Fazeli, E., Ziegelmayer, R., Swoboda, I. (2017). Pru p 3, a marker allergen for lipid transfer protein sensitization also in Central Europe. *Allergy*, 72(9), 1415-1418.

- Mowat, A. M., Donachie, A. M., Parker, L. A., Robson, N. C., Beacock-Sharp, H., McIntyre, L. J., Chirido, F. (2004). The role of dendritic cells in regulating mucosal immunity and tolerance. *Generation and Effector Functions of Regulatory Lymphocytes*, 252, 291.
- Mueller, G. A., Maleki, S. J., Johnson, K., Hurlburt, B. K., Cheng, H., Ruan, S., Deterding, L. J. (2013). Identification of Maillard reaction products on peanut allergens that influence binding to the receptor for advanced glycation end products. *Allergy*, 68(12), 1546-1554.
- Müller, U. R. (2002). Recombinant Hymenoptera venom allergens. *Allergy*, 57(7), 570-576.
- Muraro, A., Roberts, G., Worm, M., Bilo, M. B., Brockow, K., Fernández Rivas, M., Bindslev-Jensen, C. (2014). Anaphylaxis: guidelines from the European Academy of Allergy and Clinical Immunology. *Allergy*, 69(8), 1026-1045.
- Mygind, N., Dahl, R. (1996). Epidemiology of allergic rhinitis. *Pediatric Allergy and Immunology*, 7(S9), 57-62.
- Nawrot, R., Józefiak, D., Sip, A., Kuźma, D., Musidlak, O., Goździcka-Józefiak, A. (2017). Isolation and characterization of a non-specific lipid transfer protein from *Chelidonium majus* L. latex. *International journal of biological macromolecules*, 104, 554-563.
- Niggemann, B., Beyer, K. (2014). Factors augmenting allergic reactions. *Allergy*, 69(12), 1582-1587.
- Noirey, N., Rougier, N., André, C., Schmitt, D., Vincent, C. (2000). Langerhans-like dendritic cells generated from cord blood progenitors internalize pollen allergens by macropinocytosis, and part of the molecules are processed and can activate autologous naive T lymphocytes. *Journal of allergy and clinical immunology*, 105(6), 1194-1201.
- Noorbakhsh, R., Mortazavi, S. A., Sankian, M., Shahidi, F., Tehrani, M., Azad, F. J., Varasteh, A. (2011). Pistachio allergy-prevalence and in vitro cross-reactivity with other nuts. *Allergology International*, 60(4), 425-432.
- Numnuam, A., Chumbimuni-Torres, K. Y., Xiang, Y., Bash, R., Thavarungkul, P., Kanatharana, P., Bakker, E. (2008). Potentiometric detection of DNA hybridization. *Journal of the American Chemical Society*, 130(2), 410-411.
- Nurmatov, U., Dhimi, S., Arasi, S., Roberts, G., Pfaar, O., Muraro, A., Van Wijk, R. G. (2017). Allergen immunotherapy for allergic rhinoconjunctivitis: a systematic overview of systematic reviews. *Clinical and translational allergy*, 7(1), 24.
- Oeo-Santos, C., Mas, S., Benedé, S., López-Lucendo, M., Quiralte, J., Blanca, M., Barderas, R. (2018). A recombinant isoform of the Ole e 7 olive pollen allergen assembled by de novo mass spectrometry retains the allergenic ability of the natural allergen. *Journal of proteomics*, 187, 39-46.

- Offermann, L. R., Bublin, M., Perdue, M. L., Pfeifer, S., Dubiela, P., Borowski, T., Hoffmann-Sommergruber, K. (2015). Structural and functional characterization of the hazelnut allergen Cor a 8. *Journal of agricultural and food chemistry*, 63(41), 9150-9158.
- Oka, T., Morihara, K. (1970). Specificity of pepsin: Size and property of the active site. *FEBS letters*, 10(4), 222-224.
- Ortolani, C. I. M. P., Ispano, M., Pastorello, E., Bigi, A., Ansaloni, R. (1988). The oral allergy syndrome. *Annals of allergy*, 61(6 Pt 2), 47-52.
- Pajno, G. B., Fernandez-Rivas, M., Arasi, S., Roberts, G., Akdis, C. A., Alvaro-Lozano, M., Eigenmann, P. (2018). EAACI Guidelines on allergen immunotherapy: IgE-mediated food allergy. *Allergy*, 73(4), 799-815.
- Palacin, A., Bartra, J., Muñoz, R., Diaz-Perales, A., Valero, A., Salcedo, G. (2010). Anaphylaxis to wheat flour-derived foodstuffs and the lipid transfer protein syndrome: a potential role of wheat lipid transfer protein Tri a 14. *International archives of allergy and immunology*, 152(2), 178-183.
- Palacín, A., Gómez-Casado, C., Rivas, L. A., Aguirre, J., Tordesillas, L., Bartra, J., Álvarez-Eire, G. G. (2012). Graph based study of allergen cross-reactivity of plant lipid transfer proteins (LTPs) using microarray in a multicenter study. *PloS one*, 7(12), e50799.
- Palacin, A., Varela, J., Quirce, S., Del Pozo, V., Tordesillas, L., Barranco, P., Salcedo, G. (2009). Recombinant lipid transfer protein Tri a 14: a novel heat and proteolytic resistant tool for the diagnosis of baker's asthma. *Clinical & Experimental Allergy*, 39(8), 1267-1276.
- Pali-Schöll, I., Untersmayr, E., Klems, M., Jensen-Jarolim, E. (2018). The Effect of Digestion and Digestibility on Allergenicity of Food. *Nutrients*, 10(9), 1129.
- Palomares, F., Gomez, F., Bogas, G., Campo, P., Perkins, J. R., Diaz-Perales, A., Mayorga, C. (2018). Immunological changes induced in peach allergy patients with systemic reactions by Pru p 3 sublingual immunotherapy. *Molecular nutrition & food research*, 62(3), 1700669.
- Palomares, O., Akdis, M., Martín-Fontecha, M., Akdis, C. A. (2017). Mechanisms of immune regulation in allergic diseases: the role of regulatory T and B cells. *Immunological reviews*, 278(1), 219-236.
- 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(2), 110-118.
- Palomares, O., Yaman, G., Azkur, A. K., Akkoc, T., Akdis, M., Akdis, C. A. (2010). Role of Treg in immune regulation of allergic diseases. *European journal of immunology*, 40(5), 1232-1240.

- Pandey, D. K., Shekelle, R., Selwyn, B. J., Tangney, C., Stamler, J. (1995). Dietary vitamin C and  $\beta$ -carotene and risk of death in middle-aged men: the Western Electric study. *American journal of epidemiology*, 142(12), 1269-1278.
- Pantoja-Uceda, D., Santoro, J. (2008). Amino acid type identification in NMR spectra of proteins via  $\beta$ - and  $\gamma$ -carbon edited experiments. *Journal of Magnetic Resonance*, 195(2), 187-195.
- Pantoja-Uceda, D., Santoro, J. (2009). Aliasing in reduced dimensionality NMR spectra: (3, 2) DH NHA and (4, 2) D HN (COCA) NH experiments as examples. *Journal of biomolecular NMR*, 45(4), 351.
- Pantoja-Uceda, D., Santoro, J. (2012). New amino acid residue type identification experiments valid for protonated and deuterated proteins. *Journal of biomolecular NMR*, 54(2), 145-153.
- Pascal, M., Muñoz-Cano, R., Reina, Z., Palacín, A., Vilella, R., Picado, C., Valero, A. (2012). Lipid transfer protein syndrome: clinical pattern, cofactor effect and profile of molecular sensitization to plant-foods and pollens. *Clinical & Experimental Allergy*, 42(10), 1529-1539.
- Pasquato, N., Berni, R., Folli, C., Folloni, S., Cianci, M., Pantano, S., Zanotti, G. (2006). Crystal structure of peach Pru p 3, the prototypic member of the family of plant non-specific lipid transfer protein pan-allergens. *Journal of molecular biology*, 356(3), 684-694.
- Pastorello, E. A., Farioli, L., Pravettoni, V., Ispano, M., Scibola, E., Trambaioli, C., Fortunato, D. (2000). The maize major allergen, which is responsible for food-induced allergic reactions, is a lipid transfer protein. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 106(4), 744-751.
- Pastorello, E. A., Farioli, L., Pravettoni, V., Ortolani, C., Fortunato, D., Giuffrida, M. G., Conti, A. (2003a). Identification of grape and wine allergens as an endochitinase 4, a lipid-transfer protein, and a thaumatin. *Journal of allergy and clinical immunology*, 111(2), 350-359.
- Pastorello, E. A., Farioli, L., Pravettoni, V., Robino, A. M., Scibilia, J., Fortunato, D., Ortolani, C. (2004a). Lipid transfer protein and vicilin are important walnut allergens in patients not allergic to pollen. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 114(4), 908-914.
- Pastorello, E. A., Monza, M., Pravettoni, V., Longhi, R., Bonara, P., Scibilia, J., Scorza, R. (2010). Characterization of the T-cell epitopes of the major peach allergen Pru p 3. *International archives of allergy and immunology*, 153(1), 1-12.
- Pastorello, E. A., Ortolani, C., Farioli, L., Pravettoni, V., Ispano, M., Borga, Å., Zanussi, C. (1994). Allergenic cross-reactivity among peach, apricot, plum, and cherry in patients with oral allergy syndrome: an in vivo and in vitro study. *Journal of allergy and clinical immunology*, 94(4), 699-707.



- Pastorello, E. A., Pompei, C., Pravettoni, V., Farioli, L., Calamari, A. M., Scibilia, J., Bonomi, S. (2003b). Lipid-transfer protein is the major maize allergen maintaining IgE-binding activity after cooking at 100 C, as demonstrated in anaphylactic patients and patients with positive double-blind, placebo-controlled food challenge results. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 112(4), 775-783.
- Pastorello, E. A., Robino, A. M. (2004b). Clinical role of lipid transfer proteins in food allergy. *Molecular nutrition & food research*, 48(5), 356-362.
- Pastor-Vargas, C., Maroto, A. S., Díaz-Perales, A., Villalba, M., Esteban, V., Ruiz-Ramos, M., Cuesta-Herranz, J. (2016). Detection of major food allergens in amniotic fluid: initial allergenic encounter during pregnancy. *Pediatric Allergy and Immunology*, 27(7), 716-720.
- Patolsky, F., Lichtenstein, A., Willner, I. (2001). Detection of single-base DNA mutations by enzyme-amplified electronic transduction. *Nature Biotechnology*, 19(3), 253.
- Pauli, G. (2000). Evolution in the understanding of cross-reactivities of respiratory allergens: the role of recombinant allergens. *International archives of allergy and immunology*, 123(3), 183-195.
- Pekar, J., Ret, D., Untersmayr, E. (2018). Stability of allergens. *Molecular immunology*, 100, 14-20.
- Perusko, M., van Roest, M., Stanic-Vucinic, D., Simons, P. J., Pieters, R. H., Cirkovic Velickovic, T., Smit, J. J. (2018). Glycation of the Major Milk Allergen  $\beta$ -Lactoglobulin Changes Its Allergenicity by Alterations in Cellular Uptake and Degradation. *Molecular nutrition & food research*, 62(17), 1800341.
- Petersen, A., Rennert, S., Kull, S., Becker, W. M., Notbohm, H., Goldmann, T., Jappe, U. (2014). Roasting and lipid binding provide allergenic and proteolytic stability to the peanut allergen Ara h 8. *Biological chemistry*, 395(2), 239-250.
- Platt, C. D., Ma, J. K., Chalouni, C., Ebersold, M., Bou-Reslan, H., Carano, R. A., Delamarre, L. (2010). Mature dendritic cells use endocytic receptors to capture and present antigens. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(9), 4287-4292.
- Polovic, N., Blanusa, M., Gavrovic-Jankulovic, M., Atanaskovic-Markovic, M., Burazer, L., Jankov, R., Velickovic, T. C. (2007). A matrix effect in pectin-rich fruits hampers digestion of allergen by pepsin in vivo and in vitro. *Clinical & Experimental Allergy*, 37(5), 764-771.
- Pomés, A. (2010). Relevant B cell epitopes in allergic disease. *International archives of allergy and immunology*, 152(1), 1-11.
- Poms, R. E., Anklam, E. (2004a). Effects of chemical, physical, and technological processes on the nature of food allergens. *Journal of AOAC International*, 87(6), 1466-1474.
- Poms, R. E., Capelletti, C., Anklam, E. (2004b). Effect of roasting history and buffer composition on peanut protein extraction efficiency. *Molecular nutrition & food research*, 48(6), 459-464.

- Poulsen, L. K. (2005). In search of a new paradigm: mechanisms of sensitization and elicitation of food allergy. *Allergy*, 60(5), 549-558.
- Pravettoni, V., Primavesi, L., Farioli, L., Brenna, O. V., Pompei, C., Conti, A., Pastorello, E. A. (2009). Tomato allergy: detection of IgE-binding lipid transfer proteins in tomato derivatives and in fresh tomato peel, pulp, and seeds. *Journal of agricultural and food chemistry*, 57(22), 10749-10754.
- Prescott, S., Nowak-Węgrzyn, A. (2011). Strategies to prevent or reduce allergic disease. *Annals of nutrition and metabolism*, 59(Suppl. 1), 28-42.
- Qavi, A. J., Kindt, J. T., Gleeson, M. A., Bailey, R. C. (2011). Anti-DNA: RNA antibodies and silicon photonic microring resonators: increased sensitivity for multiplexed microRNA detection. *Analytical chemistry*, 83(15), 5949-5956.
- Rahrig, S., Dettmann, J. M., Brauns, B., Lorenz, V. N., Buhl, T., Kezic, S., Braun, A. (2019). Transient Epidermal Barrier Deficiency and Lowered Allergic Threshold in Filaggrin-Hornerin (FlgHrnr-/-) Double-Deficient Mice. *Allergy*.
- Ramazzina, I., Amato, S., Passera, E., Sforza, S., Mistrello, G., Berni, R., Folli, C. (2012). Isoform identification, recombinant production and characterization of the allergen lipid transfer protein 1 from pear (Pyr c 3). *Gene*, 491(2), 173-181.
- Rao, A. V. (2004). Processed tomato products as a source of dietary lycopene: bioavailability and antioxidant properties. *Canadian journal of dietetic practice and research*, 65(4), 161-165.
- Riascos, J. J., Weissinger, A. K., Weissinger, S. M., Burks, A. W. (2009). Hypoallergenic legume crops and food allergy: factors affecting feasibility and risk. *Journal of agricultural and food chemistry*, 58(1), 20-27.
- Rigby, N. M., Marsh, J., Sancho, A. I., Wellner, K., Akkerdaas, J., van Ree, R., Summer, C. (2008). The purification and characterisation of allergenic hazelnut seed proteins. *Molecular nutrition & food research*, 52(S2), S251-S261.
- Rimmer, J., Santos, C., Yli-Panula, E., Noronha, V., Viander, M. (2015). Clinical and laboratory studies of the fate of intranasal allergen. *PloS one*, 10(5), e0127477.
- Roche, P. A., Furuta, K. (2015). The ins and outs of MHC class II-mediated antigen processing and presentation. *Nature Reviews Immunology*, 15(4), 203.
- Rodriguez, M. J., Aranda, A., Fernandez, T. D., Cubells-Baeza, N., Torres, M. J., Gomez, F., Mayorga, C. (2017b). LPS promotes Th2 dependent sensitisation leading to anaphylaxis in a Pru p 3 mouse model. *Scientific reports*, 7, 40449.
- Rodríguez, P. D. R., Díaz-Perales, A., Sanchez-Garcia, S., Escudero, C., Ibanez, M. D., Méndez-Brea, P., Barber, D. (2017a). Profilin, a change in the paradigm. *Journal of investigational allergology & clinical immunology*, 0-0.
- Rosace, D., Gomez-Casado, C., Fernandez, P., Perez-Gordo, M., del Carmen Dominguez, M., Vega, A., de Pedro, M. (2019). Profilin-mediated food-induced allergic reactions are associated with oral epithelial remodeling. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 143(2), 681-690.

- Ruiter, B., Shreffler, W. G. (2012a). Innate immunostimulatory properties of allergens and their relevance to food allergy. In *Seminars in immunopathology* (Vol. 34, No. 5, pp. 617-632). Springer-Verlag.
- Ruiter, B., Shreffler, W. G. (2012b). The role of dendritic cells in food allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 129(4), 921-928.
- Ruiz-Valdepeñas Montiel, V., Gutiérrez, M. L., Torrente-Rodríguez, R. M., Povedano, E., Vargas, E., Reviejo, A. J., Pingarrón, J. M. (2017b). Disposable amperometric polymerase chain reaction-free biosensor for direct detection of adulteration with horsemeat in raw lysates targeting mitochondrial DNA. *Analytical chemistry*, 89(17), 9474-9482.
- Ruiz-Valdepeñas Montiel, V., Pellicanò, A., Campuzano, S., Torrente-Rodríguez, R. M., Reviejo, Á. J., Cosio, M. S., Pingarrón, J. M. (2016). Electrochemical detection of peanuts at trace levels in foods using a magnetoimmunosensor for the allergenic protein Ara h 2. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 236, 825-833.
- Ruiz-Valdepeñas Montiel, V., Povedano, E., Vargas, E., Torrente-Rodríguez, R. M., Pedrero, M., Reviejo, A. J., Pingarrón, J. M. (2018). Comparison of Different Strategies for the Development of Highly Sensitive Electrochemical Nucleic Acid Biosensors Using Neither Nanomaterials nor Nucleic Acid Amplification. *ACS sensors*, 3(1), 211-221.
- Ruiz-Valdepeñas Montiel, V., Torrente-Rodríguez, R. M., de Rivera, G. G., Reviejo, A. J., Cuadrado, C., Linacero, R., Pingarrón, J. M. (2017a). Amperometric determination of hazelnut traces by means of Express PCR coupled to magnetic beads assembled on disposable DNA sensing scaffolds. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 245, 895-902.
- Safi, H., Wangorsch, A., Lidholm, J., Brini, F., Spiric, J., Rihs, H. P., Pastorello, E. A. (2019). Identification and molecular characterization of allergenic non-specific lipid-transfer protein from durum wheat (*Triticum turgidum*). *Clinical & Experimental Allergy*, 49(1), 120-129.
- Salazar, F., Ghaemmaghami, A. (2013). Allergen recognition by innate immune cells: critical role of dendritic and epithelial cells. *Frontiers in immunology*, 4, 356.
- Salcedo, G., Sanchez-Monge, R., Diaz-Perales, A., Garcia-Casado, G., Barber, D. (2004). Plant non-specific lipid transfer proteins as food and pollen allergens. *Clinical & Experimental Allergy*, 34(9), 1336-1341.
- Saleemuddin, M., Husain, Q. (1991). Concanavalin A: a useful ligand for glycoenzyme immobilization—a review. *Enzyme and microbial technology*, 13(4), 290-295.
- Sallusto, F., Cella, M., Danieli, C., Lanzavecchia, A. (1995). Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *Journal of Experimental Medicine*, 182(2), 389-400.

- Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual* (No. Ed. 2). Cold spring harbor laboratory press.
- Sampson, H. A. (2004). Update on food allergy. *Journal of allergy and clinical immunology*, 113(5), 805-819.
- Samuel, D., Liu, Y. J., Cheng, C. S., Lyu, P. C. (2002). Solution structure of plant nonspecific lipid transfer protein-2 from rice (*Oryza sativa*). *Journal of Biological Chemistry*, 277(38), 35267-35273.
- San Miguel-Moncin, M., Krail, M., Scheurer, S., Enrique, E., Alonso, R., Conti, A., Vieths, S. (2003). Lettuce anaphylaxis: identification of a lipid transfer protein as the major allergen. *Allergy*, 58(6), 511-517.
- Sanchiz, A., Cuadrado, C., Dieguez, M. C., Ballesteros, I., Rodríguez, J., Crespo, J. F., Novak, N. (2018). Thermal processing effects on the IgE-reactivity of cashew and pistachio. *Food chemistry*, 245, 595-602.
- Sancho, A. I., Rigby, N. M., Zuidmeer, L., Asero, R., Mistrello, G., Amato, S., Mills, E. N. C. (2005). The effect of thermal processing on the IgE reactivity of the non-specific lipid transfer protein from apple, Mal d 3. *Allergy*, 60(10), 1262-1268.
- Sancho, A. I., Wangorsch, A., Jensen, B. M., Watson, A., Alexeev, Y., Johnson, P. E., Hoffmann-Sommergruber, K. (2011). Responsiveness of the major birch allergen Bet v 1 scaffold to the gastric environment: impact on structure and allergenic activity. *Molecular nutrition & food research*, 55(11), 1690-1699.
- Santiago-Felipe, S., Tortajada-Genaro, L. A., Puchades, R., Maquieira, A. (2014). Recombinase polymerase and enzyme-linked immunosorbent assay as a DNA amplification-detection strategy for food analysis. *Analytica chimica acta*, 811, 81-87.
- Sathe, S. K., Sharma, G. M. (2009a). Effects of food processing on food allergens. *Molecular nutrition & food research*, 53(8), 970-978.
- Sathe, S. K., Sharma, G. M., Kshirsagar, H. H., Su, M., Roux, K. H. (2009b). Effects of Long-Term Frozen Storage on Electrophoretic Patterns, Immunoreactivity, and Pepsin in Vitro Digestibility of Soybean (*Glycine max* L.) Proteins. *Journal of agricultural and food chemistry*, 57(4), 1312-1318.
- Sathe, S. K., Teuber, S. S., Roux, K. H. (2005). Effects of food processing on the stability of food allergens. *Biotechnology advances*, 23(6), 423-429.
- Savage, J., Johns, C. B. (2015). Food allergy: epidemiology and natural history. *Immunology and Allergy Clinics*, 35(1), 45-59.
- Scala, E., Till, S. J., Asero, R., Abeni, D., Guerra, E. C., Pirrotta, L., Cecchi, L. (2015). Lipid transfer protein sensitization: reactivity profiles and clinical risk assessment in an Italian cohort. *Allergy*, 70(8), 933-943.

- Scherf, K. A., Brockow, K., Biedermann, T., Koehler, P., Wieser, H. (2016). Wheat-dependent exercise-induced anaphylaxis. *Clinical & Experimental Allergy*, 46(1), 10-20.
- Scheurer, S., Lauer, I., Foetisch, K., Moncin, M. S. M., Retzek, M., Hartz, C., Vieths, S. (2004). Strong allergenicity of Pru av 3, the lipid transfer protein from cherry, is related to high stability against thermal processing and digestion. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 114(4), 900-907.
- Scheurer, S., Pastorello, E. A., Wangorsch, A., Kästner, M., Haustein, D., Vieths, S. (2001). Recombinant allergens Pru av 1 and Pru av 4 and a newly identified lipid transfer protein in the in vitro diagnosis of cherry allergy. *Journal of allergy and clinical immunology*, 107(4), 724-731.
- Schlitzer, A., Ginhoux, F. (2014). Organization of the mouse and human DC network. *Current opinion in immunology*, 26, 90-99.
- Schmidt, M., Hoffman, D. R. (2002). Expression systems for production of recombinant allergens. *International archives of allergy and immunology*, 128(4), 264-270.
- Schulten, V., Lauer, I., Scheurer, S., Thalhammer, T., Bohle, B. (2011a). A food matrix reduces digestion and absorption of food allergens in vivo. *Molecular nutrition & food research*, 55(10), 1484-1491.
- Schulten, V., Nagl, B., Scala, E., Bernardi, M. L., Mari, A., Ciardiello, M. A., Ferreira, F. (2011b). Pru p 3, the nonspecific lipid transfer protein from peach, dominates the immune response to its homolog in hazelnut. *Allergy*, 66(8), 1005-1013.
- Schulten, V., Radakovics, A., Hartz, C., Mari, A., Vazquez-Cortes, S., Fernandez-Rivas, M., Bohle, B. (2009). Characterization of the allergic T-cell response to Pru p 3, the nonspecific lipid transfer protein in peach. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 124(1), 100-107.
- Scibilia, J., Pastorello, E. A., Zisa, G., Ottolenghi, A., Bindslev-Jensen, C., Pravettoni, V., Ortolani, C. (2006). Wheat allergy: a double-blind, placebo-controlled study in adults. *Journal of allergy and clinical immunology*, 117(2), 433-439.
- Sénéchal, H., Keykhosravi, S., Couderc, R., Selva, M. A., Shahali, Y., Aizawa, T., Charpin, D. A. (2019). Pollen/Fruit Syndrome: Clinical Relevance of the Cypress Pollen Allergenic Gibberellin-Regulated Protein. *Allergy, asthma & immunology research*, 11(1), 143-151.
- Senna, G. E., Chivellaro, M., Bonadonna, P., Dama, A., Mezzelani, P., Passalacqua, G. (1998). Pizza, an unsuspected source of soybean allergen exposure. *Allergy*, 53(11), 1106-1107.
- Senti, G., Freiburghaus, A. U., Larenas-Linnemann, D., Hoffmann, H. J., Patterson, A. M., Klimek, L., Weinfeld, D. (2019). Intralymphatic Immunotherapy: Update and Unmet Needs. *International archives of allergy and immunology*, 178(2), 141-149.
- Serafín, V., Torrente-Rodríguez, R. M., Batlle, M., De Frutos, P. G., Campuzano, S., Yáñez-Sedeño, P., Pingarrón, J. M. (2017). Comparative evaluation of the performance of

- electrochemical immunosensors using magnetic microparticles and nanoparticles. Application to the determination of tyrosine kinase receptor AXL. *Microchimica Acta*, 184(11), 4251-4258.
- Sheoran, I. S., Olson, D. J., Ross, A. R., Sawhney, V. K. (2005). Proteome analysis of embryo and endosperm from germinating tomato seeds. *Proteomics*, 5(14), 3752-3764.
- Sicherer, S. H. (2001). Clinical implications of cross-reactive food allergens. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 108(6), 881-890.
- Sicherer, S. H., Sampson, H. A. (2006). Food allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 117, S470-S475.
- Silva, L. A., Silva, A. F. M., Ribeiro, Â. C., Silva, A. O., Vieira, F. A., Segundo, G. R. (2016). Adult food allergy prevalence: reducing questionnaire bias. *International archives of allergy and immunology*, 171(3-4), 261-264.
- Singh, M. B., Bhalla, P. L. (2006). Recombinant expression systems for allergen vaccines. *Inflammation & Allergy-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-Inflammation & Allergy)*, 5(1), 53-59.
- Sirvent, S., Cantó, B., Gómez, F., Blanca, N., Cuesta-Herranz, J., Canto, G., Palomares, O. (2014). Detailed characterization of Act d 12 and Act d 13 from kiwi seeds: implication in IgE cross-reactivity with peanut and tree nuts. *Allergy*, 69(11), 1481-1488.
- Sirvent, S., Palomares, O., Cuesta-Herranz, J., Villalba, M., Rodríguez, R. (2012). Analysis of the structural and immunological stability of 2S albumin, nonspecific lipid transfer protein, and profilin allergens from mustard seeds. *Journal of agricultural and food chemistry*, 60(23), 6011-6018.
- Sirvent, S., Palomares, O., Vereda, A., Villalba, M., Cuesta-Herranz, J., Rodriguez, R. (2009). nsLTP and profilin are allergens in mustard seeds: cloning, sequencing and recombinant production of Sin a 3 and Sin a 4. *Clinical & Experimental Allergy*, 39(12), 1929-1936.
- Smith, G. P. (1985a). Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science*, 228(4705), 1315-1317.
- Smith, P. E., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M., Klenk, D. C. (1985b). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical biochemistry*, 150(1), 76-85.
- Smith, P. K., Hourihane, J. O. B., Lieberman, P. (2015). Risk multipliers for severe food anaphylaxis. *World Allergy Organization Journal*, 8(1), 1.
- Smole, U., Balazs, N., Hoffmann-Sommergruber, K., Radauer, C., Hafner, C., Wallner, M., Breiteneder, H. (2010). Differential T-cell responses and allergen uptake after exposure of dendritic cells to the birch pollen allergens Bet v 1.0101, Bet v 1.0401 and Bet v 1.1001. *Immunobiology*, 215(11), 903-909.

- Smole, U., Radauer, C., Lengger, N., Svoboda, M., Rigby, N., Bublin, M., Breiteneder, H. (2015). The major birch pollen allergen Bet v 1 induces different responses in dendritic cells of birch pollen allergic and healthy individuals. *PloS one*, 10(1), e0117904.
- Soller, L., La Vieille, S., Chan, E. S. (2018). First reported case in Canada of anaphylaxis to lupine in a child with peanut allergy. *Allergy, Asthma & Clinical Immunology*, 14(1), 64.
- Sossountzov, L., Ruiz-Avila, L., Vignols, F., Jolliot, A., Arondel, V., Tchang, F., Delseny, M. (1991). Spatial and temporal expression of a maize lipid transfer protein gene. *The Plant Cell*, 3(9), 923-933.
- Steckelbroeck, S., Ballmer-Weber, B. K., Vieths, S. (2008). Potential, pitfalls, and prospects of food allergy diagnostics with recombinant allergens or synthetic sequential epitopes. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 121(6), 1323-1330.
- Sterk, P., Booij, H., Schellekens, G. A., Van Kammen, A., De Vries, S. C. (1991). Cell-specific expression of the carrot EP2 lipid transfer protein gene. *The Plant Cell*, 3(9), 907-921.
- Stoeva, S. I., Lee, J. S., Thaxton, C. S., Mirkin, C. A. (2006). Multiplexed DNA detection with biobarcode nanoparticle probes. *Angewandte Chemie*, 118(20), 3381-3384.
- Sun, X., Guan, L., Shan, X., Zhang, Y., Li, Z. (2012). Electrochemical detection of peanut allergen Ara h 1 using a sensitive DNA biosensor based on stem-loop probe. *Journal of agricultural and food chemistry*, 60(44), 10979-10984.
- Surolia, A., Bishayee, S., Ahmad, A., Balasubramanian, K. A., Thambi-Dorai, D., Podder, S. K., Bachhawat, B. K. (1975). Studies on the interaction of concanavalin A with glycoproteins. In *Concanavalin A* (pp. 95-115). Springer, Boston, MA.
- Svensson, M., Stockinger, B., Wick, M. J. (1997). Bone marrow-derived dendritic cells can process bacteria for MHC-I and MHC-II presentation to T cells. *The Journal of Immunology*, 158(9), 4229-4236.
- Tang, J. (1963). Specificity of pepsin and its dependence on a possible 'hydrophobic binding site'. *Nature*, 199(4898), 1094.
- Taylor, S. L., Moneret-Vautrin, D. A., Crevel, R. W., Sheffield, D., Morisset, M., Dumont, P., Baumert, J. L. (2010). Threshold dose for peanut: risk characterization based upon diagnostic oral challenge of a series of 286 peanut-allergic individuals. *Food and Chemical Toxicology*, 48(3), 814-819.
- Teodorowicz, M., Fiedorowicz, E., Kostyra, H., Wichers, H., Kostyra, E. (2013). Effect of Maillard reaction on biochemical properties of peanut 7S globulin (Ara h 1) and its interaction with a human colon cancer cell line (Caco-2). *European journal of nutrition*, 52(8), 1927-1938.

- Teodorowicz, M., Van Neerven, J., Savelkoul, H. (2017). Food processing: The influence of the Maillard Reaction on immunogenicity and allergenicity of food proteins. *Nutrients*, 9(8), 835.
- The U.S. and world situation: fresh and processed tomatoes, USDA; 2007; available from [https://www.nass.usda.gov/Publications/Ag\\_Statistics/2007/index.php](https://www.nass.usda.gov/Publications/Ag_Statistics/2007/index.php)
- Thomas, K., Aalbers, M., Bannon, G. A., Bartels, M., Dearman, R. J., Esdaile, D. J., Hefle, S. L. (2004). A multi-laboratory evaluation of a common in vitro pepsin digestion assay protocol used in assessing the safety of novel proteins. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 39(2), 87-98.
- Thomas, W. R. (2014). Allergen ligands in the initiation of allergic sensitization. *Current allergy and asthma reports*, 14(5), 432.
- Tiwari, B. K., Muthukumarappan, K., O'donnell, C. P., Cullen, P. J. (2009). Inactivation kinetics of pectin methylesterase and cloud retention in sonicated orange juice. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 10(2), 166-171.
- Tiwari, R., Negi, S. S., Braun, B., Braun, W., Pomés, A., Chapman, M. D., Midoro-Horiuti, T. (2012). Validation of a phage display and computational algorithm by mapping a conformational epitope of Bla g 2. *International archives of allergy and immunology*, 157(4), 323-330.
- Toda, M., Reese, G., Gadermaier, G., Schulten, V., Lauer, I., Egger, M., Moncin, M. D. M. S. M. (2011). Protein unfolding strongly modulates the allergenicity and immunogenicity of Pru p 3, the major peach allergen. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 128(5), 1022-1030.
- Togias, A. G. (2000). Systemic immunologic and inflammatory aspects of allergic rhinitis. *Journal of allergy and clinical immunology*, 106(5), S247-S250.
- Tordesillas, L., Cubells-Baeza, N., Gómez-Casado, C., Berin, C., Esteban, V., Barcik, W., Díaz-Perales, A. (2017). Mechanisms underlying induction of allergic sensitization by Pru p 3. *Clinical & Experimental Allergy*, 47(11), 1398-1408.
- Tordesillas, L., Cuesta-Herranz, J., Gonzalez-Muñoz, M., Pacios, L. F., Compés, E., Garcia-Carrasco, B., Diaz-Perales, A. (2009). T-cell epitopes of the major peach allergen, Pru p 3: Identification and differential T-cell response of peach-allergic and non-allergic subjects. *Molecular immunology*, 46(4), 722-728.
- Tordesillas, L., Gómez-Casado, C., Garrido-Arandia, M., Murua-García, A., Palacin, A., Varela, J., Díaz-Perales, A. (2013). Transport of P ru p 3 across gastrointestinal epithelium—an essential step towards the induction of food allergy?. *Clinical & Experimental Allergy*, 43(12), 1374-1383.
- Tordesillas, L., Sirvent, S., Díaz-Perales, A., Villalba, M., Cuesta-Herranz, J., Rodríguez, R., Salcedo, G. (2011). Plant lipid transfer protein allergens: no cross-reactivity between those from foods and olive and Parietaria pollen. *International archives of allergy and immunology*, 156(3), 291-296.



- Toriyama, K., Hanaoka, K., Okada, T., Watanabe, M. (1998). Molecular cloning of a cDNA encoding a pollen extracellular protein as a potential source of a pollen allergen in *Brassica rapa*. *FEBS letters*, 424(3), 234-238.
- Torrente-Rodríguez, R. M., Campuzano, S., Montiel, V. R. V., Montoya, J. J., Pingarrón, J. M. (2016). Sensitive electrochemical determination of miRNAs based on a sandwich assay onto magnetic microcarriers and hybridization chain reaction amplification. *Biosensors and Bioelectronics*, 86, 516-521.
- Torres, M., Alvarez-García, E., Bartra, J., Alcántara, M., Palomares, O., Villalba, M., Rodríguez, R. (2014). The allergenic structure of the thaumatin like protein Ole e 13 is degraded by processing of raw olive fruits. *J Investig Allergol Clin Immunol*, 24(3), 162-168.
- Tortajada-Genaro, L. A., Santiago-Felipe, S., Morais, S., Gabaldón, J. A., Puchades, R., Maquieira, A. (2011). Multiplex DNA detection of food allergens on a digital versatile disk. *Journal of agricultural and food chemistry*, 60(1), 36-43.
- Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 76(9), 4350-4354.
- Tran, H. V., Piro, B., Reisberg, S., Duc, H. T., Pham, M. C. (2013). Antibodies directed to RNA/DNA hybrids: an electrochemical immunosensor for microRNAs detection using graphene-composite electrodes. *Analytical chemistry*, 85(17), 8469-8474.
- Treudler, R. (2012). Update on in vitro allergy diagnostics. *JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft*, 10(2), 89-99.
- Tschepe, A., Breiteneder, H. (2017). Recombinant allergens in structural biology, diagnosis, and immunotherapy. *International archives of allergy and immunology*, 172(4), 187-202.
- Ukleja-Sokołowska, N., Gawrońska-Ukleja, E., Żbikowska-Gotz, M., Bartuzi, Z., Sokołowski, Ł. (2016). Sunflower seed allergy. *International journal of immunopathology and pharmacology*, 29(3), 498-503.
- Untersmayr, E., Jensen-Jarolim, E. (2008). The role of protein digestibility and antacids on food allergy outcomes. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 121(6), 1301-1308.
- Valenta, R., Duchene, M., Ebner, C., Valent, P., Sillaber, C., Deviller, P., Kraft, D. (1992). Profilins constitute a novel family of functional plant pan-allergens. *Journal of Experimental Medicine*, 175(2), 377-385.
- Valenta, R., Duchene, M., Vrtala, S., Birkner, T., Ebner, C., Hirschwehr, R., Kraft, D. (1991). Recombinant allergens for immunoblot diagnosis of tree-pollen allergy. *Journal of allergy and clinical immunology*, 88(6), 889-894.

- Valenta, R., Twardosz, A., Vrtala, S., Kraft, D. (1999a). Large scale production and quality criteria of recombinant allergens. *Arbeiten aus dem Paul-Ehrlich-Institut (Bundesamt für Sera und Impfstoffe) zu Frankfurt aM*, (93), 211-24.
- Valenta, R., Vrtala, S. (1999b). Recombinant allergens for specific immunotherapy. *Allergy*, 54, 43-44.
- van Ree, R. (2002). Clinical importance of non-specific lipid transfer proteins as food allergens.
- van Ree, R. (2003). The CREATE project: a new beginning of allergen standardization based on mass units of major allergens. *Arbeiten aus dem Paul-Ehrlich-Institut (Bundesamt für Sera und Impfstoffe) zu Frankfurt aM*, (94), 70.
- van Ree, R. (2004). Clinical importance of cross-reactivity in food allergy. *Current opinion in allergy and clinical immunology*, 4(3), 235-240.
- van Ree, R., Fernández-Rivas, M., Cuevas, M., van Wijngaarden, M., Aalberse, R. C. (1995). Pollen-related allergy to peach and apple: an important role for profilin. *Journal of allergy and clinical immunology*, 95(3), 726-734.
- Van Wijk, F., Nierkens, S., Hassing, I., Feijen, M., Koppelman, S. J., De Jong, G. A. H., Knippels, L. M. J. (2005). The effect of the food matrix on in vivo immune responses to purified peanut allergens. *Toxicological Sciences*, 86(2), 333-341.
- Vandenplas, O., Sohy, C., D'Alpaos, V., Nootens, C., Thimpont, J., Weigand, D., Scheurer, S. (2008). Tomato-induced occupational asthma in a greenhouse worker. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 122(6), 1229-1231.
- Vartabedian, V. F., Savage, P. B., Teyton, L. (2016). The processing and presentation of lipids and glycolipids to the immune system. *Immunological reviews*, 272(1), 109-119.
- Vassilopoulou, E., Rigby, N., Moreno, F. J., Zuidmeer, L., Akkerdaas, J., Tassios, I., Mills, C. (2006). Effect of in vitro gastric and duodenal digestion on the allergenicity of grape lipid transfer protein. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 118(2), 473-480.
- Vecchia, C. L. (1998). Mediterranean epidemiological evidence on tomatoes and the prevention of digestive-tract cancers. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 218(2), 125-128.
- Vejvar, E., Himly, M., Briza, P., Eichhorn, S., Ebner, C., Hemmer, W., Gadermaier, G. (2013). Allergenic relevance of nonspecific lipid transfer proteins 2: Identification and characterization of A pi g 6 from celery tuber as representative of a novel Ig E-binding protein family. *Molecular nutrition & food research*, 57(11), 2061-2070.
- Verdino, P., Barderas, R., Villalba, M., Westritschnig, K., Valenta, R., Rodriguez, R., Keller, W. (2008). Three-dimensional structure of the cross-reactive pollen allergen Che a 3: visualizing cross-reactivity on the molecular surfaces of weed, grass, and tree pollen allergens. *The Journal of Immunology*, 180(4), 2313-2321.

- Vereda, A., Sirvent, S., Villalba, M., Rodríguez, R., Cuesta-Herranz, J., Palomares, O. (2011). Improvement of mustard (*Sinapis alba*) allergy diagnosis and management by linking clinical features and component-resolved approaches. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 127(5), 1304-1307.
- Verhoeckx, K. C., Vissers, Y. M., Baumert, J. L., Faludi, R., Feys, M., Flanagan, S., Wichers, H. (2015). Food processing and allergenicity. *Food and Chemical Toxicology*, 80, 223-240.
- Versluis, A., van Os-Medendorp, H., Kruizinga, A. G., Blom, W. M., Houben, G. F., Knulst, A. C. (2016). Cofactors in allergic reactions to food: physical exercise and alcohol are the most important. *Immunity, inflammation and disease*, 4(4), 392-400.
- Vieths, S., Scheurer, S., Ballmer, B. (2002). Current understanding of cross-reactivity of food allergens and pollen. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 964(1), 47-68.
- Vila, L., Beyer, K., Järvinen, K. M., Chatchatee, P., Bardina, L., Sampson, H. A. (2001). Role of conformational and linear epitopes in the achievement of tolerance in cow's milk allergy. *Clinical & Experimental Allergy*, 31(10), 1599-1606.
- Villadangos, J. A., Schnorrer, P. (2007). Intrinsic and cooperative antigen-presenting functions of dendritic-cell subsets in vivo. *Nature Reviews Immunology*, 7(7), 543.
- Villalba, M., Batanero, E., Monsalve, R. I., de La Pena, M. G., Lahoz, C., Rodríguez, R. (1994). Cloning and expression of Ole e I, the major allergen from olive tree pollen. Polymorphism analysis and tissue specificity. *Journal of Biological Chemistry*, 269(21), 15217-15222.
- Volpe, G., Draisci, R., Palleschi, G., Compagnone, D. (1998). 3, 3', 5, 5'-Tetramethylbenzidine as electrochemical substrate for horseradish peroxidase based enzyme immunoassays. A comparative study. *Analyst*, 123(6), 1303-1307.
- Wal, J. M. (2003). Thermal processing and allergenicity of foods. *Allergy*, 58(8), 727-729.
- Wallner, M., Briza, P., Thalhamer, J., Ferreira, F. (2007). Specific immunotherapy in pollen allergy. *Current opinion in molecular therapeutics*, 9(2), 160-167.
- Wallner, M., Gruber, P., Radauer, C., Maderegger, B., Susani, M., Hoffmann-Sommergruber, K., Ferreira, F. (2004). Lab scale and medium scale production of recombinant allergens in *Escherichia coli*. *Methods*, 32(3), 219-226.
- Wangorsch, A., Jamin, A., Foetisch, K., Malczyk, A., Reuter, A., Vierecke, S., Vieths, S. (2015). Identification of Sola I 4 as Bet v 1 homologous pathogenesis related-10 allergen in tomato fruits. *Molecular nutrition & food research*, 59(3), 582-592.
- Weaver, L. T., Laker, M. F., Nelson, R., Lucas, A. (1987). Milk feeding and changes in intestinal permeability and morphology in the newborn. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*, 6(3), 351-358.

- Weisburger, J. H. (1998). Evaluation of the evidence on the role of tomato products in disease prevention. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 218(2), 140-143.
- Welter, S., Dölle, S., Lehmann, K., Schwarz, D., Weckwerth, W., Worm, M., Franken, P. (2013b). Pepino mosaic virus infection of tomato affects allergen expression, but not the allergenic potential of fruits. *PloS one*, 8(6), e65116.
- Welter, S., Lehmann, K., Dölle, S., Schwarz, D., Weckwerth, W., Scheler, C., Franken, P. (2013a). Identification of putative new tomato allergens and differential interaction with IgEs of tomato allergic subjects. *Clinical & Experimental Allergy*, 43(12), 1419-1427.
- Westphal, S., Kempf, W., Foetisch, K., Retzek, M., Vieths, S., Scheurer, S. (2004). Tomato profilin Lyc e 1: IgE cross-reactivity and allergenic potency. *Allergy*, 59(5), 526-532.
- Westphal, S., Kolarich, D., Foetisch, K., Lauer, I., Altmann, F., Conti, A., Scheurer, S. (2003). Molecular characterization and allergenic activity of Lyc e 2 ( $\beta$ -fructofuranosidase), a glycosylated allergen of tomato. *European journal of biochemistry*, 270(6), 1327-1337.
- Wetlaufer, D. B. (1963). Ultraviolet spectra of proteins and amino acids. In *Advances in protein chemistry* (Vol. 17, pp. 303-390). Academic Press.
- Wickham, M., Faulks, R., Mills, C. (2009). In vitro digestion methods for assessing the effect of food structure on allergen breakdown. *Molecular nutrition & food research*, 53(8), 952-958.
- Wölbing, F., Fischer, J., Köberle, M., Kaesler, S., Biedermann, T. (2013). About the role and underlying mechanisms of cofactors in anaphylaxis. *Allergy*, 68(9), 1085-1092.
- Wong, G. A. E., King, C. M. (2004). Occupational allergic contact dermatitis from olive oil in pizza making. *Contact Dermatitis*, 50(2), 102-103.
- Wopfner, N., Gadermaier, G., Egger, M., Asero, R., Ebner, C., Jahn-Schmid, B., Ferreira, F. (2005). The spectrum of allergens in ragweed and mugwort pollen. *International archives of allergy and immunology*, 138(4), 337-346.
- Wu, G., Robertson, A. J., Liu, X., Zheng, P., Wilen, R. W., Nesbitt, N. T., Gusta, L. V. (2004). A lipid transfer protein gene BG-14 is differentially regulated by abiotic stress, ABA, anisomycin, and sphingosine in bromegrass (*Bromus inermis*). *Journal of plant physiology*, 161(4), 449-458.
- Wykes, M., Pombo, A., Jenkins, C., MacPherson, G. G. (1998). Dendritic cells interact directly with naive B lymphocytes to transfer antigen and initiate class switching in a primary T-dependent response. *The Journal of Immunology*, 161(3), 1313-1319.
- Yu, W., Freeland, D. M. H., Nadeau, K. C. (2016). Food allergy: immune mechanisms, diagnosis and immunotherapy. *Nature Reviews Immunology*, 16(12), 751.

- Zacharisen, M. C., Elms, N. P., Kurup, V. P. (2002). Severe tomato allergy (*Lycopersicon esculentum*). In *Allergy and asthma proceedings* (Vol. 23, No. 2, p. 149). OceanSide Publications.
- Zaman, U., Abbasi, A. (2009). Isolation, purification and characterization of a nonspecific lipid transfer protein from *Cuminum cyminum*. *Phytochemistry*, 70(8), 979-987.
- Zhai, Q., He, Y., Li, X., Guo, J., Li, S., Yi, G. (2015). A simple and ultrasensitive electrochemical biosensor for detection of microRNA based on hybridization chain reaction amplification. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 758, 20-25.
- Zhang, X., Ge, N., Keiderling, T. A. (2007). Electrostatic and hydrophobic interactions governing the interaction and binding of  $\beta$ -lactoglobulin to membranes. *Biochemistry*, 46(17), 5252-5260.
- Zhang, X., Keiderling, T. A. (2006). Lipid-induced conformational transitions of  $\beta$ -lactoglobulin. *Biochemistry*, 45(27), 8444-8452.
- Zouari, M., Campuzano, S., Pingarrón, J. M., Raouafi, N. (2018). Ultrasensitive determination of microribonucleic acids in cancer cells with nanostructured-disposable electrodes using the viral protein p19 for recognition of ribonucleic acid/microribonucleic acid homoduplexes. *Electrochimica Acta*, 262, 39-47.
- Zuidmeer, L., Salentijn, E., Rivas, M. F., Mancebo, E. G., Asero, R., Matos, C. I., Van Ree, R. (2006). The role of profilin and lipid transfer protein in strawberry allergy in the Mediterranean area. *Clinical & Experimental Allergy*, 36(5), 666-675.
- Zuidmeer, L., van Ree, R. (2007). Lipid transfer protein allergy: primary food allergy or pollen/food syndrome in some cases. *Current opinion in allergy and clinical immunology*, 7(3), 269-273.
- Zuidmeer-Jongejan, L., Fernandez-Rivas, M., Poulsen, L. K., Neubauer, A., Asturias, J., Blom, L., Garosi, P. (2012). FAST: towards safe and effective subcutaneous immunotherapy of persistent life-threatening food allergies. *Clinical and translational allergy*, 2(1), 5.
- Zurzolo, G. A., Mathai, M. L., Koplin, J. J., Allen, K. J. (2012). Hidden allergens in foods and implications for labelling and clinical care of food allergic patients. *Current allergy and asthma reports*, 12(4), 292-296.

**PUBLICACIONES**

***PUBLICATIONS***



---

**PUBLICACIONES/PUBLICATIONS**

---

1. **Martín-Pedraza L\***, González M\*, Gómez F, Blanca-López N, Garrido-Arandia M, Rodríguez R, Torres MJ, Blanca M, Villalba M, Mayorga C. (2016). Two nonspecific lipid transfer proteins (nsLTPs) from tomato seeds are associated to severe symptoms of tomato-allergic patients. *Molecular nutrition & food research*, 60(5), 1172-1182. doi: 10.1002/mnfr.201500782. Epub 2016 Mar 7. (IF 2018: 5.151)
2. Bueno C\*, **Martín-Pedraza L\***, Cuesta-Herranz J, Villalba M. (2016). Is the cross-reactivity of Sin a 1, 2S albumin from mustard seeds, exclusively restricted to Brassicaceae members? *JSM Allergy and Asthma*. (Not available in PubMed, included as miscellaneous)
3. Benedé S, Garrido-Arandia M, **Martín-Pedraza L**, Bueno C, Díaz-Perales A, Villalba M. (2017). Multifactorial modulation of food-induced anaphylaxis. *Frontiers in immunology*, 8, 552. doi: 10.3389/fimmu.2017.00552. eCollection 2017. Review. (IF 2017: 5.511)
4. Bueno-Díaz C, **Martín-Pedraza L**, Benedé S, Haroun-Díaz E, de Las Heras M, Batanero E, Cuesta-Herranz J, Villalba M. (2019). Seed storage 2S albumins are predictive indicators of exclusive Anacardiaceae cross-reactivity. *Clinical & Experimental Allergy*. doi: 10.1111/cea.13357. (IF 2017: 5.158)
5. Pereira-Barros MA, Barroso MF, L. **Martín-Pedraza L**, Vargas E, Benedé S, Villalba M, Rocha JM, Campuzano S, Pingarrón JM (in process) Direct PCR-free electrochemical biosensing of plant-food derived nucleic acids in genomic DNA extracts. Application to the determination of the key allergen Sola I 7 in tomato seeds. *Biosensors and Bioelectronics*. doi: 10.1016/j.bios.2019.05.011. (IF 2017: 8.173)
6. **Martín-Pedraza L**, Wangorsch A, Bueno-Diaz C, de las Heras M, Scheurer S, Cuesta-Herranz J, Villalba M. (in process). 2S albumins and nsLTP are involved in the anaphylaxis to pizza sauce: IgE recognition before and after allergen processing. *Food chemistry*. (IF 2017: 4.946)

\* Both authors contributed equally to the manuscript



