

## Caracterización computacional de los epítopes B de la quitinasa clase I de la *Ananas comosus* (piña)

### Computational characterization of epitopes of the chitinase B class I *Ananas comosus* (pineapple)

César Muñoz Mejía<sup>1</sup>, Jefferson Méndez<sup>2</sup>, Ricardo Vivas Reyes<sup>3</sup>, Javier Marrugo Cano<sup>4</sup>

#### Resumen

**Objetivos:** Determinar el potencial alergénico de la quitinasa de piña y proponer un modelo computacional de la estructura de esta proteína para la predicción de posibles sitios de unión a la IgE, a los Epítopes E, los que se encuentran implicados en las reacciones alérgicas de esta fruta.

**Métodos:** A partir de una secuencia de bases de ADN de piña, previamente reportada, que traduce para una proteína con homología a diferentes quitinasas de otras frutas, y mediante el uso de herramientas bioinformáticas y bases de datos disponibles en la red, se obtuvo un modelo computacional de quitinasa de piña y se analizaron su estructura y características fisicoquímicas para la predicción de epítopes dentro de la misma.

**Resultados:** Se generó un modelo computacional de una proteína de 204 aminoácidos, que pertenece al grupo de las quitinasas I. La predicción y posterior análisis de Epítopes obtenidos a partir de varios servidores bioinformáticos mostró que estos tienen características (Área de Superficie Relativa, RSA) que los hacen aptos para pertenecer a un sitio de unión a IgE.

**Conclusiones:** La quitinasa de piña estudiada posee homología con uno de los grupos de alérgenos de alimentos que está implicado en el síndrome látex-fruta, y podría ser la responsable de reacciones alérgicas a este alimento. Por otro lado, poder predecir estos epítopes es de utilidad también en el diseño de alimentos transgénicos.

**Palabras clave:** Piña, quitinasa, heveína, alérgeno, bioinformática, epítope, reactividad cruzada, *in silico*.

Fecha de recepción: 5 de noviembre 2010  
Fecha de aceptación: 15 de marzo de 2011

<sup>1</sup> Estudiante de la Facultad de Medicina de la Universidad de Cartagena (Colombia).

<sup>2</sup> Investigador del Grupo de Investigación en Química Cuántica y Computacional de la Universidad de Cartagena (Colombia).

<sup>3</sup> Profesor de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Cartagena (Colombia).

<sup>4</sup> Profesor del Instituto de Investigaciones Inmunológicas de la Universidad de Cartagena (Colombia).  
jmarrugo@unicartagena.edu.co

**Correspondencia:** Instituto de Investigaciones Inmunológicas. Universidad de Cartagena (Colombia) Campus de Zaragoza, sede pieda de Bolívar, Avenida el Consulado, calle 30 n° 48-1452. jmarrugoc@unicartagena.edu.co

## Abstract

**Objectives:** To determine the allergenic potential of pineapple's chitinase and propose a bioinformatic model of the structure of this protein for the prediction of possible epitopes E, that would be related in allergic reactions to this fruit.

**Methods:** From a DNA sequence of pineapple, previously reported, that translates for a protein similar to chitinases from other vegetable, using bioinformatic tools and databases available online, we obtained a computational model of pineapple's chitinase that was analyzed physically and chemically for the prediction of epitopes.

**Results:** The model was generated as a 204 aminoacids protein, that was classified as a chitinase class I. The prediction and analysis of epitopes from multiple bioinformatic servers showed that they have properties (Relative Surface Area, RSA) which make them capable to be part of antigenic site.

**Conclusions:** Pineapple's chitinase generated had similarities with a group of food allergens that has been related in the latex-fruit syndrome, and could be responsible of allergies to this fruit. In addition, the ability to identify these epitopes is also useful in the design of Genetically Modified Foods.

**Key words:** Pineapple, chitinase, heveth, allergenes, bioinformatics, epitope, coss-reactivity, *in silico*.

## INTRODUCCIÓN

La piña (*Ananas comosus*) es una de las frutas tropicales más consumidas en el mundo. A pesar de su bajo contenido de proteínas, (0.4 g por cada 100 g de pulpa), la piña es una fuente importante de enzimas proteolíticas como la bromelaína y la ananaína y otras como las quitinasas. A las primeras se les ha atribuido efectos medicinales alergénicos y a las últimas se las responsabiliza como potenciales panalérgenos en el síndrome de reactividad cruzada látex-fruta (1-3). En la actualidad, solo se han caracterizado dos alérgenos en la piña: Ana c1 (profilina) y el Ana c2 (bromelaína). En un estudio publicado por Reindl J. y Cols., hallaron una alta tasa de sensibilización a la profilina de piña y banano en individuos con alergia a frutas relacionada con los pólenes, sugiriendo que la profilina era el panalérgeno responsable de este fenómeno (4).

Las proteínas relacionadas con la patogénesis (PRP), son un grupo de proteínas que

participan en la defensa de las plantas. Se producen en respuesta al estrés biótico o abiótico (5). Algunas de estas proteínas han sido caracterizadas como alérgenos provenientes de los alimentos de origen vegetal (6, 7). Entre estas destacamos el Bet v1, que pertenece al grupo de las PR-10, responsable de la reactividad cruzada con el Mal d1 presente en la manzana, y el Api g1 del apio (8-10).

Las quitinasas son un grupo heterogéneo de proteínas con actividad hidrolítica en los enlaces b (1à4) de la quitina. Se encuentran distribuidas en los grupos 3,4 y 8 de las PRP (11, 12). Estas proteínas tienen actividad antimicrobiana, especialmente antifúngica, demostrada *in vitro* y en plantas transgénicas (13,15). Las quitinasas de plantas se clasifican en siete grupos dependiendo de su estructura. Se han identificado alérgenos en diversos alimentos de origen vegetal, como el banano, el aguacate, la uva, la castaña, entre otros, pertenecientes a los grupos I, II, III y IV (16,18). Las quitinasas clase I, con-

tienen un dominio conservado N-terminal de 40 aminoácidos rico en cisteínas, también conocido como dominio homólogo a la heveína, responsable del síndrome de reactividad cruzada látex-fruta; una región de bisagra y un dominio catalítico (11, 19, 20).

En la actualidad, el análisis bioinformático de las proteínas con potencial alergénico ha adquirido gran importancia. Como parte de la evaluación de este potencial, las herramientas bioinformáticas, son usadas para comparar la secuencia de aminoácidos de las proteínas candidatas, sus propiedades fisicoquímicas, sus relaciones biológicas y filogenéticas con las de bases de datos de alérgenos conocidos para predecir la potencial reactividad cruzada entre las nuevas proteínas alimentarias y las proteínas a las que la población ya se ha sensibilizado. Este tipo de análisis se hace necesario en el diseño de plantas transgénicas y productos farmacéuticos que utilizan la modificación genética de las proteínas con el fin de obtener algunas propiedades ventajosas (21).

De acuerdo con lo anterior, las quitinasas clase I son buenas candidatas para la búsqueda de posibles alérgenos de origen vegetal. En este estudio decidimos hacer un análisis y caracterización bioinformática de la quitinasa clase I de la piña (*Ananas comosus*), debido a su potencial alergénico y los hallazgos recientes de nuestro grupo (22).

## MÉTODOS

### Análisis de la secuencia de nucleótidos y aminoácidos

La secuencia de nucleótidos de la quitinasa clase I de la piña (*Ananas comosus*) se obtuvo a partir de la base de datos PineappleDB,

una base de datos de secuencias expresadas en clonas de DNA obtenidas a partir de la piña, en Contig 2241 (23). El marco de lectura (Open Reading Frame, ORF) de la proteína se obtuvo utilizando el servidor ORF Finder del NCBI (National Center for Biotechnology Information). La traducción a la secuencia de aminoácidos, se realizó con el servidor de proteómica EXPASY (Expert Protein Analysis System), dedicado al análisis de secuencias y estructuras de proteínas con la herramienta Translate Tool (24, 25). El análisis de la secuencia de aminoácidos se realizó con el servidor InterProScan, que utiliza diferentes bases de datos para caracterizar la familia, dominio o sitio funcional de una proteína. Las secuencias de quitinasas clase I alergénicas (pers a1, cas s5, mus a1.1) y la heveína se obtuvieron de la base de datos SDAP (Structural Database of Allergenic Proteins), que brinda información de proteínas alergénicas con varias herramientas computacionales para el estudio biológico de tales alérgenos (26). Los alineamientos entre estas y la quitinasa clase I de la piña (*Ananas comosus*) se realizaron con el servidor ClustalW (27), en el que se identifican las identidades, similitudes y diferencias entre las diferentes secuencias de aminoácidos.

### Modelamiento por homología

La búsqueda de los moldes para el modelamiento por homología se realizó con la herramienta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) del NCBI, a través de una comparación de la secuencia de aminoácidos de la proteína con las disponibles en las bases de datos y calculando la significancia estadística de dichas comparaciones. El modelamiento por homología se realizó en el servidor SwissModel, que utiliza moldes

tridimensionales de proteínas ya descritas para la generación automática de modelos (28). Los modelos obtenidos fueron evaluados con el diagrama de Ramachandran utilizando el servidor iMoltalk (29). La optimización de los modelos se realizó con el programa Sybyl7.00<sup>R</sup> y la evaluación se efectuó con los servidores PROCHECK, WHATIF, PROSA y ERRAT del Laboratorio para Genómica Estructural y Proteómica del NIH.

### **Predicción de epítopes**

La predicción de los epítopes se realizó de dos formas: linear o continua, y conformacional o discontinua. La primera es realizada con múltiple servidores: ABCpred (30), Bepipred (31) y BcePred (32). La presencia de Epitopes conformacionales, se realiza con el servidor CEP a partir de los modelos obtenidos por homología de la quitinasa de piña. Todas estas herramientas bioinformáticas elaboran predicciones epitópicas a partir de bases de datos de epítopes comparando los patrones repetitivos de las secuencias de aminoácidos, su perfil bioquímico (hidrofilicidad, flexibilidad, accesibilidad, exposición a la superficie y propensión antigénica) y su organización tridimensional (33).

### **Análisis de superficie**

Las áreas de superficie expuestas al solvente de los epítopes fueron obtenidas con los servidores VADAR (<http://redpoll.pharmacy.ualberta.ca/vadar/34>) y NetSurfP, los cuales a través de múltiples algoritmos y programas analizan y evalúan las estructuras de las proteínas a partir de secuencias de aminoácidos o con información PDB (35).

### **Sitios de glicosilación**

La predicción de los posibles sitios de O-glicosilación se llevó a cabo con el servidor

YinOYang (36) (<http://www.cbs.dtu.dk/services/YinOYang/>) y los de N-glicosilación con [http://www.cbs.dtu.dk/services/NetN\\_Glyc/NetNGlyc/](http://www.cbs.dtu.dk/services/NetN_Glyc/NetNGlyc/) (37), que emplean redes neurales para la predicción de sitios de glicosilación en secuencias de proteínas eucarióticas.

## **RESULTADOS**

### **Análisis de la secuencia de nucleótidos y aminoácidos**

De acuerdo con la descripción base de datos PinneappleDB, la secuencia de nucleótidos corresponde, por similitud, a una quitinasa putativa de *Arabidopsis thaliana*. El ORM resultó en una región desde la posición 240 a la 854 en la secuencia de nucleótidos. La traducción a la secuencia de aminoácidos permitió obtener una proteína de 204 aminoácidos. El análisis de dicha secuencia mostró que pertenece al grupo de quitinasas clase I (familia glicosil-hidrolasa 19), caracterizado por catalizar la hidrólisis de los enlaces Beta-1,4-N-actil-D- glucosamina en los polímeros de quitina, al cual pertenecen otras quitinasas homólogas caracterizadas como alérgenos, entre las que se encuentran la del aguacate (prs a1) y la de la castaña (cas s5), y se encontró cierta identidad en la secuencia de la quitinasa de piña obtenida y las alérgicas (ver Figura 1).

### **Modelamiento por homología y caracterización del modelo de quitinasa de piña**

Al realizar la búsqueda de las secuencias de proteínas disponibles en la base de datos PDB similares a la secuencia de la quitinasa de piña con la herramienta BLAST del NCBI se obtuvieron los moldes que fueron considerados como candidatos si tenían una identidad mayor al 30%. Los moldes

1DKV, 1CNS, 2BAA, 1DXJ, y 2CJL, mostraron un 41, 40, 40, 38 y 30% de identidad respectivamente. 2CJL, es una quitinasa secretada por el *Streptomyces coelicolor*, y mostró diferencias estructurales con los otros moldes (proteínas vegetales) y fue descartado; el resto de moldes fueron aceptados para usarlos en el modelamiento de la quitinasa de piña. El análisis geométrico de los modelos teóricos que se obtuvieron con el Swiss Modeller, mostró que el 97% de los residuos se encontraba dentro del área permitida para los modelos de quitinasa de piña donde se utilizaron como moldes 1DKV y 1CNS. Para los modelos creados a partir de los moldes de 2BAA y 1DXJ, el porcentaje de residuos en el área permitida fue del 96.3 y 94.5% respectivamente. También se generaron modelos a partir de combinaciones con varios moldes, y el modelo generado con 1CNS, 2BAA y 1DXJ fue el que arrojó el mayor porcentaje de un 97% de residuos en el área permitida. Con estos datos se consideró seguir la evaluación posterior solo con tres modelos: los generados a partir de 1CNS, 1DKV y el generado a partir de 1CNS-2BAA-1DXJ.

Después de haber realizado la optimización, la evaluación de estos tres modelos arrojó mejores resultados en el modelo generado a partir de 1CNS. El servidor VERIFY3D mostró un porcentaje del 83.76% de los residuos con un puntaje promedio 3D-1D >0.2, lo que indica un modelo satisfactorio. En el servidor PROCHECK, se obtuvo un factor G de - 0.14, lo que sugiere que el modelo es esteroquímicamente correcto. ERRAT mostró un porcentaje del 86.705% de la proteína en la que los valores de errores calculados están por debajo del 95% del índice de confiabilidad de rechazo. Con PROVE, se halló un porcentaje de átomos extremos “enterrados” de la proteína de un 7%.

La estructura secundaria del modelo de quitinasa de piña generado a partir de 1CNS está formada por 7 hélices  $\alpha$  y 9 asas. Las  $\alpha$ -hélices estaban compuestas por los siguientes residuos:  $\alpha$ 1, 2 al 17;  $\alpha$ 2, 71 al 81;  $\alpha$ 3, 89 al 94;  $\alpha$ 4, 96 al 108;  $\alpha$ 5, 118 al 123;  $\alpha$ 6, 130 al 135;  $\alpha$ 7, 141 al 148 y  $\alpha$ 8, 160 al 176 (ver Figura 1A).



Fuente: Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H et al. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 2007; 23:2947-8.

**Figura 1.** Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de los dominios catalíticos de las quitinasas alergénicas de aguacate (prs a1) y castaña (cas s5) con la secuencia del dominio catalítico de la quitinasa de piña propuesta. Obtenido mediante el servidor ClustalW.

## Predicción de epítopes

Se realizaron dos tipos de predicciones de epítopes, los lineales y conformacionales. La primera se realizó en diferentes servidores. En el servidor ABCpred, se predijeron dos regiones de la secuencia de aminoácidos correspondientes del V23 al G62 y la H119 a la S199. Con el servidor Bcepred, basados en las características de hidrofiliidad, flexibilidad, accesibilidad, exposición a la superficie y propensión antigénica en un método combinado, se predijeron epítopes en los siguientes segmentos de la secuencia: 13 al 20, 34 al 57, 80 al 97, 105 al 137, 148 al 157 y 164 al 204. El servidor BepiPred, mostró algunas diferencias cuando el umbral de especificidad para la predicción era alto; sin embargo, siempre se mostraba constante una región de aminoácidos en el segmento carboxilo-terminal de la quitinasa de piña, específicamente entre los aminoácidos Q115 al T129 y el G181 al S204.

La predicción de epítopes conformacionales fue completada con el servidor CEP. Los determinantes antigénicos obtenidos se muestran en la tabla 1 y en la figura 2C.

**Tabla 1**

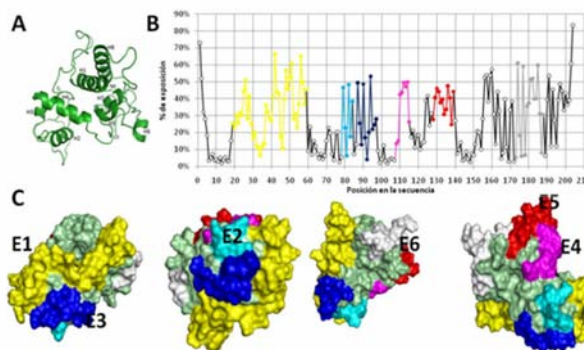
Epítopes B conformacionales presentes en el dominio catalítico de la quitinasa clase I de piña. Los residuos con una exposición menor del 25% son mostrados en minúscula. Obtenido mediante el servidor CEP<sup>33</sup>

Determinante antigénico	Secuencia
E1	19CGYGVaTGgPLAWgLCYNHEMSPSQlyCDSDSlyRcVEGaE59
E2	79EALNID84
E3	87HHpEYIEQNAT97
E4	108MNPiKkQ115
E5	123VGNwKpTKNdTLaKrlP139
E6	174DLMGvGREQsGDND188

**Fuente:** Datos tabulados por los autores.

## Análisis de superficie

A partir del modelo 3D generado y la secuencia del dominio catalítico de quitinasa se obtuvieron, dentro de los aminoácidos que están conservados en las quitinasas alergénicas (prs a1 y cas s5) y la quitinasa de piña propuesta, la serie de los mismos que están más expuestos (tabla 2 y figura 2B). Para ser considerado como expuesto debía tener un RSA > 20%. Se encontró que muchos de ellos estaban dentro de los determinantes antigénicos predichos anteriormente; solo dos (G157, D160) no se encontraban dentro de los epítopes. A pesar de que el Z-fit score arrojado por el servidor NetSurfP solo fue positivo para dos aminoácidos (D174 y D188), se tiene en cuenta el resto debido a que están dentro de la predicción de epítopes.



**Fuente:** Willard L, Ranjan A, Zhang H, Monzavi H, Boyko RF, Sykes BD et al. VADAR: a web server for quantitative evaluation of protein structure quality. *Nucleic Acids Res* 2003; 31:3316-9.

**Figura 2.** A. Modelo de cinta del dominio catalítico de la quitinasa de piña. B. Porcentajes de exposición al solvente de los distintos aminoácidos (Amarillo: E1; azul claro: E2; azul rey: E3; fucsia: E4; rojo: E5; gris: E6) fueron obtenidos por el servidor VADARhttp://redpoll.pharmacy.ualberta.ca/vadar/<sup>34</sup> C. Superficie molecular de los epítopes del dominio catalítico de la quitinasa de piña. A y C fueron construidos mediante el visualizador molecular PyMOL (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.3, Schrödinger, LLC, <http://www.pymol.org>)

**Tabla 2**

Área de Superficie Relativa (*Relative Surface Area, RSA*) para los aminoácidos conservados en las secuencias de los dominios catalíticos de quitinasas alergénicas (prs a1 y cas s5) y la quitinasa de piña propuesta. El Z-fit score es un indicador de confiabilidad para el RSA, dado por el servidor NetSurfP, cuyos valores por encima de 0 son considerados como una predicción confiable. Se especifica además si el aminoácido hace parte o no de algunos de los determinantes antigénicos predichos en este trabajo.

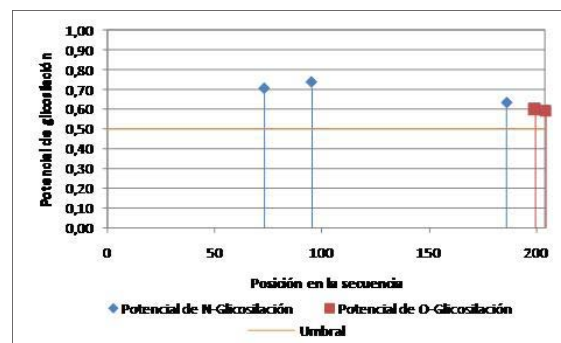
Aminoácido	Posición	RSA	Z-fit score	Epítoto en el que se ubica
A	24	30%	-2	E1
P	28	41%	-1	E1
E	38	32%	-1	E1
G	57	49%	-2	E1
D	84	38%	-0,818	E2
P	110	42%	-0,426	E4
K	114	49%	-2	E4
G	124	38%	-2	E5
D	132	37%	-2	E5
A	135	33%	-2	E5
R	137	40%	-0,924	E5
P	139	44%	-1	E5
G	157	54%	-2	--
D	160	57%	-2	--
D	174	61%	0,877	E6
G	177	59%	-0,14	E6
G	184	40%	-2	E6
D	188	30%	0,019	E6

Fuente: Datos tabulados por los autores.

### Potenciales sitios de glicosilación

El análisis con el servidor YingOYang arrojó como sitios probables de O-glicosilación las serinas ubicadas en las posiciones 199 y 204. Los potenciales sitios de N-glicosilación se

ubicaron en las asparaginas 73, 95 y 186; sin embargo, solo la asparagina 95 se encontraba dentro de la secuencia Asn-Xaa-Ser/Thr (siendo Xaa cualquier aminoácido, excepto prolina) (ver Figura 3).



Fuente: datos propios del autor.

**Figura 3.** Sitios probables de glicosilación en la secuencia del dominio catalítico de quitinasa. Los potenciales sitios de N-glicosilación (azul) fueron obtenidos por el servidor NetNGlyc 1.0<sup>37</sup> y los de O-glicosilación (rojo) por el servidor YinOYang<sup>36</sup>.

## DISCUSIÓN

Las quitinasas son enzimas que pertenecen a las familias 18 y 19 de las glicosil- hidrolasas; además de su papel en el sistema de defensa de las plantas, en especial la resistencia a infecciones por hongos y algunos insectos, también se les ha podido demostrar propiedades alergénicas. Recientemente, se han identificado algunos alérgenos de este tipo en alimentos como el aguacate, la castaña y el banano. A algunas quitinasas se las ha responsabilizado del síndrome de reactividad cruzada látex-fruta y se ha podido establecer que el dominio de unión a quitina homólogo al de heveína presente en el látex es el responsable del mismo (3, 7).

El papel del dominio catalítico de las quitinasas como alérgeno no ha sido establecido, por lo tanto, se hace necesario evaluarlo *in*

*in silico* y posteriormente confirmarlo experimentalmente. Nuestro grupo recientemente ha detectado la presencia de un componente de alrededor de 30 kD reconocido por la IgE de los sueros de pacientes alérgicos a piña, que nos sugeriría que podría tratarse de una quitinasa (22). De otra parte, Moyle y cols. publicaron una base de datos con secuencias de cDNA de piña. Al buscar homólogos a quitinasas en esta base de datos encontramos una secuencia que alineaba con la sonda utilizada. Esta plantilla sirvió de base para las predicciones y propuesta de un modelo computacional del dominio catalítico de la piña. Este modelo nos permitió, mediante el uso de las distintas herramientas bioinformáticas descritas en los métodos, predecir los posibles sitios accesibles a los anticuerpos, incluyendo la IgE (epítopes), y determinar otras propiedades importantes de este potencial alérgeno, como sus superficies expuestas y sus potenciales sitios de N y O-glicosilación.

La importancia de estos análisis *in silico* radica en que las predicciones de potenciales alérgenos tienen gran utilidad en la biotecnología (38), especialmente en el diseño de organismos modificados genéticamente. Este tipo de análisis hace parte de los algoritmos propuestos por la FAO-WHO (ALI-NORM 03/34, 2002) para el diseño y comercialización de alimentos transgénicos, con lo que se evitaría la introducción de potenciales alérgenos en estos alimentos, que pudieran desencadenar reacciones alérgicas en la población que los consuma. De otra parte, mediante el uso de estos algoritmos se pueden hacer predicciones sobre posibles o potenciales reacciones cruzadas, que tienen gran relevancia clínica, ya que nos permitiría anticiparnos a eventos adversos mediados por IgE que podrían desencadenar síntomas en los pacientes (38,39).

**Agradecimientos:** A la Universidad de Cartagena y a Colciencias por su apoyo financiero.

**Conflicto de interés:** Ninguno.

**Financiación:** Universidad de Cartagena y Colciencias, contrato n° 044-2004.

## REFERENCIAS

- (1) Baur X, Fruhmans G. Allergic reactions, including asthma, to the pineapple protease bromelain following occupational exposure. *Clin Allergy* 1979; 9: 443-50.
- (2) Gailhofer G, Wilders-Truschnig M, Smolle J, Ludvan M. Asthma caused by bromelain: an occupational allergy. *Clin Allergy* 1988; 18: 445-50.
- (3) Blanco C, Díaz-Perales A, Collada C, Sanchez-Monge R, Aragoncillo C, Castillo R, et al. Class I chitinases as potential pan-allergens involved in the latex-fruit syndrome. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 103: 507-13.
- (4) Reindl J, Rihs HP, Scheurer S, Wangorsch A, Hausteiner D, Vieths S. IgE reactivity to profilin in pollen-sensitized subjects with adverse reactions to banana and pineapple. *Int Arch Allergy Immunol* 2002; 128: 105-14.
- (5) Ebner C, Hoffmann-Sommergruber K, Breiteneder H. Plant food allergens homologous to pathogenesis-related proteins. *Allergy* 2001; 56 (Suppl 67): 43-4.
- (6) Breiteneder H, Clare Mills EN. Plant food allergens-structural and functional aspects of allergenicity. *Biotechnol Adv* 2005; 23: 395-9.
- (7) Asero R. Plant-derived food allergens: an overview. *Eur Ann Allergy Clin Immunol* 2006; 38: 220-3.
- (8) Ipsen H, Lowenstein H. Isolation and immunochemical characterization of the major allergen of birch pollen (*Betula verrucosa*). *J Allergy Clin Immunol* 1983; 72: 150-9.
- (9) Holm J, Baerentzen G, Gajhede M, Ipsen H, Larsen JN, Lowenstein H et al. Molecular basis of allergic cross-reactivity between group 1 major allergens from birch and



- apple. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 2001; 756: 307-13.
- (10) Bohle B, Radakovics A, Jahn-Schmid B, Hoffmann-Sommergruber K, Fischer G, Ebner C. Bet v1, the major birch pollen allergen, initiates sensitization to Api g1, the major allergen in celery: evidence at the T cell level. *Eur J Immunol* 2003; 33: 3303-10.
- (11) Collinge D, Kragh K, Mikkelsen J, Nielsen K, Rasmussen U, Vad K. Plant chitinases. *Plant J* 1993; 3: 31-40.
- (12) Breiteneder H, Radauer C. A classification of plant food allergens. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 113: 821-30; quiz 31.
- (13) Huynh Q, Hironaka C, Levine E, Smith C, Borgmeyer J, Shah D. Antifungal proteins from plants. Purification, molecular cloning, and antifungal properties of chitinases from maize seed. *J Biol Chem* 1992; 267: 6635-40.
- (14) Punja Z, Zhang Y. Plant chitinases and their roles in resistance to fungal diseases. *J Nematol* 1993; 25: 526-40.
- (15) Jach G, Gornhardt B, Mundy J, Logemann J, Pinsdorf E, Leah R et al. Enhanced quantitative resistance against fungal disease by combinatorial expression of different barley antifungal proteins in transgenic tobacco. *Plant J* 1995; 8: 97-109.
- (16) Díaz-Perales A, Collada C, Blanco C, Sánchez-Monge R, Carrillo T, Aragoncillo C, et al. Class I chitinases with hevein-like domain, but not class II enzymes, are relevant chestnut and avocado allergens. *J Allergy Clin Immunol* 1998; 102: 127-33.
- (17) Sowka S, Hsieh L, Krebitz M, Akasawa A, Martin B, Starrett D et al. Identification and cloning of prs a 1, a 32-kDa endochitinase and major allergen of avocado, and its expression in the yeast *Pichia pastoris*. *J Biol Chem* 1998; 273: 28091-7.
- (18) Pastorello E, Farioli L, Pravettoni V, Ortolani C, Fortunato D, Giuffrida MG et al. Identification of grape and wine allergens as an endochitinase 4, a lipid-transfer protein, and a thaumatin. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 111: 350-9.
- (19) Araki T, Torikata T. Structural classification of plant chitinases: two subclasses in class I and class II chitinases. *Biosci Biotechnol Biochem* 1995; 59: 336-8.
- (20) Mikkola J, Alenius H, Kalkkinen N, Turjanmaa K, Palosuo T, Reunala T. Hevein-like protein domains as a possible cause for allergen cross-reactivity between latex and banana. *J Allergy Clin Immunol* 1998; 102: 1005-12.
- (21) Bjorklund AK, Soeria-Atmadja D, Zorzet A, Hammerling U, Gustafsson MG. Supervised identification of allergen-representative peptides for in silico detection of potentially allergenic proteins. *Bioinformatics* 2005; 21: 39-50.
- (22) Marrugo J, Mercado, D, Hernández, L, Pérez, N, Villalba, V. Immunochemical Study of a Pineapple (*Ananas comosus*) Extract. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 113 (2): 52.
- (23) Moyle R, Crowe M, Ripi-Koia J, Fairbairn DJ, Botella JR. PineappleDB: an online pineapple bioinformatics resource. *BMC Plant Biol* 2005; 5: 21.
- (24) Gasteiger E, Gattiker A, Hoogland C, Ivanyi I, Appel RD, Bairoch A. ExpASY: The proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic Acids Res* 2003; 31: 3784-8.
- (25) Zdobnov EM and Apweiler R. InterProScan –an integration platform for the signature– recognition methods in InterPro. *Bioinformatics* 2001; 17(9): 847-8
- (26) Ivanciuc O, Schein CH, Braun W. SDAP: database and computational tools for allergenic proteins. *Nucleic Acids Res* 2003; 31: 359-62.
- (27) Larkin M, Blackshields G, Brown N, Chenna R, McGettigan P, McWilliam H et al. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 2007; 23: 2947-8.
- (28) Arnold K, Bordoli L, Kopp J, Schwede T. The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics* 2006; 22: 195-201.
- (29) Diemand AV, Scheib H. MolTalk-a programming library for protein structures

- and structure analysis. *BMC Bioinformatics* 2004; 5: 39.
- (30) Saha S, Raghava GP. Prediction of continuous B-cell epitopes in an antigen using recurrent neural network. *Proteins* 2006; 65: 40-8.
- (31) Larsen J, Lund O, Nielsen M. Improved method for predicting linear B-cell epitopes. *Immunome Res* 2006; 2: 2.
- (32) Kulkarni-Kale U, Bhosle S, Kolaskar AS. CEP: a conformational epitope prediction server. *Nucleic Acids Res* 2005; 33: 168-71.
- (33) Saha S, Raghava GPS. Bcepred: Prediction of Continuous B-Cell Epitopes in Antigenic Sequences Using Physico-chemical Properties. In: Nicosia G, Cutello V, Bentley PJ, Timis J., editors. ICARIS 2004, LNCS 3239, 197-204, Springer, 2004.
- (34) Willard L, Ranjan A, Zhang H, Monzavi H, Boyko RF, Sykes BDet al. VADAR: a web server for quantitative evaluation of protein structure quality. *Nucleic Acids Res* 2003; 31: 3316-9.
- (35) Gupta R, Jung E, Brunak S. Prediction of N-glycosylation sites in human proteins. *In preparation* 2004.
- (36) Petersen B et al. A generic method for assignment of reliability scores applied to solvent accessibility predictions. *BMC Struct Biol* 2009; 9: 51.
- (37) Gupta R, Brunak S. Prediction of glycosylation across the human proteome and the correlation to protein function. *Pac Symp Biocomput* 2002; 7: 310-22.
- (38) Jenkins JA et al. Structural relatedness of plant food allergens with specific reference to cross-reactive allergens: an in silico analysis. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 115 (1): 163-70.
- (39) Breiteneder H, Mills C. Structural bioinformatic approaches to understand cross-reactivity. *Mol Nutr Food Res* 2006; 50 (7): 628-32.