



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE MEDICINA**

**PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

**“ASOCIACIÓN MOLECULAR EN EL COLEOPTILO DE MAÍZ: ENTRE UNA LECTINA Y LA  $\beta$ -GLUCOSIDASA”**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

P R E S E N T A:

M. en C. JUAN ARCADIO MOLINA GUARNEROS

**Facultad de Medicina**



**TUTOR: Dr. FÉLIX CÓRDOBA ALVA**

**MÉXICO D. F.**

**2006**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Jurado asignado:

<b>Presidente</b>	<b>Dr. Juan Pedro Laclette San Román</b>
<b>Secretario</b>	<b>Dr. Félix Córdoba Alva</b>
<b>Vocal</b>	<b>Dr. Jaime Mas Oliva</b>
<b>Vocal</b>	<b>Dr. Luis Felipe Jiménez García</b>
<b>Vocal</b>	<b>Dr. Ruy Pérez Montfort</b>
<b>Suplente</b>	<b>Med. Cir. Juan José Mandoki Weitzner</b>
<b>Suplente</b>	<b>Dr. Abraham Landa Piedra</b>

El presente trabajo se desarrolló en la Unidad de Bioquímica e Inmunología del Instituto Tecnológico de Oaxaca (UBI-ITO-UNAM), en particular con el apoyo del Dr. Margarito Martínez Cruz, en los laboratorios de: Parasitología Molecular del Departamento de Microbiología y Parasitología; de Farmacología Celular; y el de Inmunofarmacología, del Departamento de Farmacología de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Recibió apoyo por los proyectos D.G.A.P.A.-UNAM, IN201095 e IN213500, además de los apoyos para investigación que otorgó la Facultad de Medicina a sus Profesores de Carrera en los años 2001-2005, al autor de esta tesis.

Esta tesis representa la culminación de mi formación académica. La he escrito con el orgullo de haber realizado mis estudios de Bachillerato, Licenciatura, Maestría y Doctorado en la Institución más grande en la historia de mi país, la Universidad Nacional Autónoma de México. Es aquí donde continué la educación que recibí en casa, donde gracias a mis “maestros”, compañeros y amigos, además me hice mejor persona. Donde también he tenido el honor de haberla servido en los últimos diecisiete años de mi vida, como profesor y más recientemente como representante de mis compañeros profesores en mi Facultad y en la Universidad.

Dedico esta tesis, a la memoria de mis finados padres y primeros “maestros”: Paz Guarneros y Arcadio Molina, quienes me educaron en la libertad, la honestidad y la solidaridad.

Agradezco el apoyo incondicional y paciencia de mi esposa Patricia Espinosa para lograr el desarrollo y culminación de mis estudios de posgrado exitosamente. El constante reto de mis hijos Rocio e Hiram a demostrar que podía terminarla.

A tres de mis mejores “maestros”, a mi tutor el Dr. Félix Córdoba quien me introdujo en las ciencias experimentales y me enseñó a hacer “ciencia”.

Al Maestro Juan José Mandoki Weitzner, quien me enseñó Farmacología, me apoyó siempre en los momentos más duros y mejor aún, me enseñó a ser mejor persona.

Al Maestro Nicandro Mendoza Patiño, mi maestro en la “política universitaria”, guía incansable en el deber ser y en el sentido verdadero de la actitud “entre universitarios”.

A mis muy queridos y entrañables amigos, compañeros y hasta adversarios, que con sus críticas bien intencionadas, han logrado que tome mejores decisiones.

Al Doctor José Narro Robles, quien a pesar de conocerme de poco tiempo, ha creído en mi persona, en mi convicción universitaria y me ha brindado su constante apoyo y amistad.

En general, a todo lo que representa la Universidad Nacional Autónoma de México, que además de instruirme desde mi adolescencia han hecho de mí una mejor persona. Me declaro ejemplo vivo de la “movilidad social” que ha brindado la UNAM a muchas generaciones.

<b>I.-INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>II.-MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>5</b>
<b>1.-ENSAYOS EN CÉLULAS DEL SISTEMA INMUNE MURINO</b>	<b>5</b>
a) Actividad fagocitaria	5
b) Reconocimiento de células peritoneales por el complejo molecular	5
c) Proliferación con células de timo y bazo	6
d) Reconocimiento de células de timo y bazo por el complejo molecular	7
<b>2.-CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD</b>	<b>7</b>
<b>3.-ESTIMACIÓN DE LA ACTIVIDAD HEMAGLUTINANTE</b>	<b>7</b>
<b>4.-ESTIMACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DEL COMPLEJO</b>	<b>7</b>
<b>5.-ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA Y DENSITOMETRÍA</b>	<b>8</b>
<b>6.-PURIFICACIÓN DE LA <math>\beta</math>-GLUCOSIDASA</b>	<b>8</b>
<b>7.-FILTRACIÓN EN GEL</b>	<b>8</b>
<b>8.-OBTENCIÓN DE LAS SECUENCIAS DE AMINOÁCIDOS</b>	<b>8</b>
<b>III.-RESULTADOS</b>	<b>10</b>
<b>1.-EN CÉLULAS DEL SISTEMA INMUNE MURINO</b>	<b>10</b>
<b>2.-CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD</b>	<b>14</b>
<b>3.-ESTIMACIÓN DE LA ACTIVIDAD HEMAGLUTINANTE</b>	<b>16</b>
<b>4.-ESTIMACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DEL COMPLEJO</b>	<b>18</b>
<b>5.-ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA Y DENSITOMETRÍA</b>	<b>18</b>
<b>6.-PURIFICACIÓN DE LA <math>\beta</math>-GLUCOSIDASA</b>	<b>20</b>
<b>7.-FILTRACIÓN EN GEL</b>	<b>20</b>
<b>8.-OBTENCIÓN DE LAS SECUENCIAS DE AMINOÁCIDOS</b>	<b>21</b>
<b>IV.-DISCUSIÓN</b>	<b>22</b>
<b>V.-BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>25</b>

## I.-INTRODUCCIÓN

Las lectinas son proteínas que se unen a carbohidratos específica y reversiblemente. Han sido ampliamente usadas en el fraccionamiento de glicoproteínas y subpoblaciones celulares (Sharon, 1990; Weiss, 1996; Van Damme, 1998). Las lectinas han probado ser herramientas útiles para reconocer antígenos glicosilados y marcadores en diferentes tejidos, tumores y células (Lascurain, 1997; Slifkin, 1990). Al presente, cientos de lectinas de diferentes orígenes han sido descritas (Sharon, 1990; Weiss, 1996; Van Damme, 1998).

Las lectinas de plantas son un grupo de proteínas bien conservadas a través de la evolución y han sido aisladas de varias especies de mono o dicotiledóneas. Las lectinas representativas del grupo de las gramíneas muestran amplia especificidad por azúcares y glicoconjugados: la aglutinina de germen de trigo y cebada (*Secale cereale*), reconocen e interactúan preferentemente con glicoconjugados conteniendo *N-acetil-glucosamina (NAc-Glc)* y ácido siálico (*Neu5Ac*) (Monsigny, 1980; Kubanek, 1982). El arroz (*Oryza sativa*) ha mostrado poseer lectinas específicas para *NAc-Glc* (Tabary, 1984) y residuos de manosa (*Man*) (Hirano, 2000); las lectinas de *Amaranthus genus* (Rinderle, 1989; Calderón de la Barca, 1988; Hernández, 1999), así como la lectina de *Agropyrum repens* (Cammue, 1985), son específicas para residuos de *N-acetil-D-galactosamina (NAc-Gal)* y glicanos unidos de manera O-glicosídica.

Hasta donde sabemos, para el maíz, una planta monocotiledónea del grupo de los cereales no hay reportes concluyentes de que exista una lectina aislada del mismo. Estudios serológicos de extractos de semillas de *Zea mays* everta indican que ellos generan anticuerpos específicos anti-B, aunque extractos de maíz aglutinan eritrocitos A1B significativamente menos que los eritrocitos de los grupos sanguíneos del grupo B y A2B (Prodanov, 1984). La presencia de actividad de lectina en semillas de maíz y extractos de coleoptilo ha sido reportada (Newburg, 1985; Martínez, 1993), mostrando que las lectinas de maíz poseen heterogeneidad; además su especificidad esta dirigida hacia residuos de manosa (*Man*) y glucosa (*Glc*) (Jancovic, 1990).

En el año de 1995, inicié la colaboración con el Dr. Félix Córdoba, siendo el responsable de la Unidad de Bioquímica e Inmunología que se formó entre el Instituto Tecnológico de Oaxaca y la Universidad Nacional Autónoma de México (UBI ITO-UNAM). Esta colaboración continuó hasta febrero de 2004, ya que fue interrumpida al iniciar el Dr. Córdoba su año sabático en el Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR), posteriormente en marzo del año 2005, otro investigador colaborador del grupo, el Dr. Abraham Landa Profesor del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina, inició su sabático en Tufts University en E.U.A.

Inicialmente, en este grupo nos propusimos estudiar a la lectina de coleoptilo de maíz, entonces purificada mediante el criterio electroforético (banda única de 88 kDa en electroforesis no disociante). Esta proteína purificada ¿mostraba los efectos conocidos por otras lectinas? (Concanavalina A y Fitohemaglutinina) sobre linfocitos de ratón de bazo y de timo: mitogenicidad, reconocimiento de poblaciones ó subpoblaciones de células, producción y secreción de factores solubles inmunomoduladores (producción de linfoxina) y en macrófagos de exudado peritoneal, si producía la activación de la actividad fagocitaria.

Ante la creciente demanda de muestras purificadas de la lectina de coleoptilo de maíz (LCM), para los ensayos en sistemas celulares, en el año 2000, el grupo del Dr. Córdoba en la Unidad de Bioquímica e Inmunología del ITO-UNAM, publicó un trabajo en el cual se intentó resolver el problema de la dificultad en obtener preparaciones estables de la LCM, en la actividad hemaglutinante, ya que los extractos precipitan y pierden actividad en corto tiempo. En este trabajo probaron varios amortiguadores para hacer la extracción y demostrar cual de ellos permitía una mejor producción y conservación de la actividad aglutinante de la LCM, siendo este el amortiguador de ascorbato-sacarosa, agregando como segundo paso la precipitación con acetona fría (Martínez y cols., 2000).

Posteriormente en 2001, el mismo grupo entonces en colaboración con el Dr. Edgar Zenteno del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina UNAM, publicó un trabajo en donde se reportó la purificación y caracterización de una lectina del coleoptilo de maíz, específica para galactosa (Martínez y cols., 2001). En ese trabajo reportaron la purificación de la lectina por cromatografía de afinidad en columna de Lactosyl-Sepharosa 4B. Encontrando una glicoproteína de 88.7 kDa compuesta principalmente por residuos de glutámico, aspártico, glicina y serina; en proporción menor contiene residuos de metionina y cisteína. Los carbohidratos que contiene en proporción de 12% del peso total comprenden; *galactosa, manosa, y N-acetil-D-glucosamina*. Se presentó bloqueado el amino terminal. El análisis de la secuencia de péptidos obtenidos mediante digestión con tripsina por MALDI-TOF (matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight), indicó que la LCM tiene 18% de homología con una proteína cinasa Ser/Thr putativa, dependiente de calcio, de *Arabidopsis thaliana*; y 39% de homología con una reductasa dependiente de NADPH de *Zea mays*.

La lectina mostró actividad hemaglutinante hacia varios tipos de eritrocitos, incluyendo los humanos tipos A, B y O. Los ensayos de inhibición por haptenos indicaron que la lectina interactúa con el OH del C4 de residuos de galactosa. El OH en el C1 juega un papel relevante en la interacción con la LCM, ya que los residuos de  $\beta$ -galactosa son mejor reconocidos que aquellos de la  $\alpha$ -galactosa. La más alta actividad específica se obtuvo de coleoptilos obtenidos al 7° día de sembrados.

En 2003, el grupo de la UBI ITO-UNAM publicó un trabajo relativo al análisis de las lectinas de coleoptilo de teosinte (*Zea diploperennis*) y de maíz (*Zea mays*). Se intentó buscar evidencia molecular del origen común del teosinte y del maíz a través de estas proteínas. La duplicación génica ha sido considerada un proceso activo en la evolución del genoma del maíz. Largamente ha sido sospechado que el maíz es el producto de un evento histórico tetraploide; los progenitores diploides divergieron hace 20.5 millones de años, mientras que el evento allotetraploide probablemente ocurrió aproximadamente hace 11.4 millones de años (Gaut, 1997; Carrari, 2001). Otra evidencia sugiere que el teosinte a través de translocaciones sexuales homeóticas dió origen al maíz (Ildis y cols., 2000). En ese trabajo del grupo del Dr. Córdoba, se purificaron las lectinas de coleoptilo de teosinte (LCT) y la de coleoptilo de maíz (LCM) y fueron comparadas para identificar su posible origen común. Ambas lectinas aglutinaron eritrocitos de origen humano y otras especies animales igualmente bien; aunque el tratamiento con sialidasa o proteasa incrementó la actividad hemaglutinante, todos los eritrocitos probados fueron aglutinados igualmente, indicando que la especificidad de las dos lectinas fué semejante.

Ambas lectinas mostraron especificidad por residuos de galactosa y esta parece estar dirigida principalmente al OH del C4; el carbono C1 anomérico de el mismo residuo, parece ser irrelevante para el acomodamiento de el receptor de LCT, ya que los anómeros  $\alpha$ - y  $\beta$ - fueron igualmente bien reconocidos por LCT en contraste con LCM, la cual reconoce preferencialmente  $\beta$ -anómeros. La lactosa (*Gal $\beta$ 1, 4Glc*) y *N-acetil-lactosamina* (*Gal $\beta$ 1, 4GlcNAc*) inhiben la actividad de la lectinas. La especificidad de estas lectinas por residuos de galactosa les permite interactuar con glicanos unidos de manera O-glicosídica conteniendo *Gal $\beta$ 1, 3GalNAc $\alpha$ 1, OSer/Thr* y *GalNAc $\alpha$ 1, OSer/Thr* presentes en la fetuína (Spiro y cols., 1974), mucinas submandibulares de ovino (Hill y cols., 1977) y de bovino (Schauer y cols., 1988), ó mucina de estómago, o de puerco (Zenteno y cols., 1995).

La actividad hemaglutinante de la LCT es inhibida por la glucoproteína humana  $\alpha$ 1 ácida (Schmid, 1979), y la fetuína, las cuales contienen glicanos unidos tri- y tetra-antenaria de manera N-glucosídica del tipo *N-acetil lactosamina* (Spiro y cols., 1974). La ovoalbúmina de pollo (Spik y cols., 1988) y la transferrina de pavo (Egge y cols., 1983), contienen unidos glicanos de manera O-manosídica y N-glucosídica, y mostraron capacidad no inhibitoria para ambas lectinas. La eliminación de ácido siálico de las glicoproteínas inhibitorias incrementó la interacción de ambas lectinas con sus correspondientes receptores al exponer residuos de galactosa ocultos; sin embargo el tratamiento con galactosidasa abolió la capacidad inhibitoria de esas glicoproteínas, confirmando la relevancia de interacciones de ambas lectinas con su receptor, aunque es claro que LCT parece poseer una mayor capacidad para reconocer residuos de galactosa, que la LCM, ya que concentraciones más altas de estructuras conteniendo galactosa, fueron necesarias para inhibir la actividad de LCT.



Eventos de duplicación dieron origen a isoformas cercanas en una misma especie, lo cual podría ser un mecanismo para controlar la expresión específica de acuerdo a las condiciones de desarrollo y ambientales (Lukens y cols., 2001; Chaumont y cols., 2001), a lo largo de la evolución del maíz, la cual ha sido favorecida por la selección humana durante la domesticación horticultural (Iltis y cols., 2000). Algunos dominios proteicos en la lectina de teosinte, parecen haber sido preservados, ya que ambas lectinas muestran inmunogenicidad cruzada junto con especificidad por azúcares. Las lectinas han evolucionado a través de duplicación génica y divergencia y sus dominios de unión a carbohidratos se han incorporado dentro de la familia de proteínas (Críspeles y cols., 1991; Rini y cols., 1995; Drickamer y cols., 1997).

El maíz y el teosinte pertenecen al grupo de las gramíneas; ellas muestran especificidad por galactosa, difiriendo de las lectinas del mismo grupo (tales como germen de trigo, arroz y cebada entre otras), la mayoría de ellas reconocen NAc-Glc y sus oligómeros (Kubanek y cols., 1982; Monsigny y cols., 1980; Tabary y cols., 1984), sugiriendo la posibilidad que el maíz y el teosinte emergieron de un precursor común y han evolucionado asistidos por una agricultura humana ancestral. Una publicación reciente (Matsuoka y cols., 2002) usando análisis microsatélite multilocus, de especies *Zea*, sugieren que el maíz originó de la domesticación de *Zea parviglumis*. Este reciente hallazgo podría explicar bien las diferencias en las secuencias de amino ácidos entre *Zea mays* y *Zea diploperennis* reportadas en esta publicación.

Cuando retomamos intentar lograr obtener la secuencia primaria de la LCM (ya que previamente nos había sido reportado bloqueado el amino terminal de la proteína, por el Dr. Felipe Massó en el Instituto Nacional de Cardiología Dr. Ignacio Chávez), iniciamos realizando nosotros mismos en la Facultad de Medicina, las electroforesis de las muestras purificadas por cromatografía de afinidad que nos proporcionó el Dr. Félix Córdoba, pero ahora las realizamos en condiciones disociantes (Laemli clásico).

Al correr las muestras en electroforesis disociante aparecieron dos bandas (una de 30 kDa y la otra de 60 kDa) en lugar de una banda de cerca de 90 kDa que se encuentra en las mismas muestras de lectina purificada en los análisis electroforéticos no disociantes (nativa). Por lo que se planteó como objetivo del presente trabajo, identificar la composición del complejo y las propiedades de cada una de las subunidades que lo componen, ¿cual posee la actividad de  $\beta$ -glucosidasa y cual la de lectina?

## RESUMEN

La lectina de coleoptilo de maíz esta fuertemente asociada junto con la  $\beta$ -glucosidasa (EC.3.2.1.21) en un complejo molecular único (88.7 kDa). En electroforesis en poliacrilamida-SDS, el complejo se disocia en dos componentes principales. De estos el 75% corresponde a la  $\beta$ -glucosidasa del maíz (60 kDa), identificada por su actividad enzimática, así como por dos péptidos trípticos de 16 aminoácidos que muestran cercana homología con la estructura de la secuencia primaria de esta enzima. En experimentos por separado, aislamos la enzima en forma monomérica del coleoptilo de maíz. Esto nos permitió concluir que la propiedad de lectina, como la aglutinación de eritrocitos, encontrada en el complejo molecular de 88.7 kDa., no se debe a la  $\beta$ -glucosidasa. Otra proteína (30 kDa.) disociada de los mismos geles de electroforesis en poliacrilamida-SDS, produjo varios péptidos trípticos, incluyendo la secuencia V(L)GP(Q)W(A)GGSGGSPVDITAEPQR, cercanamente homologa al precursor del factor agregante de la  $\beta$ -glucosidasa (BGAF) descrito recientemente. El péptido tríptico SAFTE(A)WN(V)ELK(V) esta también presente en el precursor de BGAF. El péptido KFHEQR, no se encuentra presente en el precursor de BGAF o en cualquier otra secuencia de proteínas examinadas. El péptido tríptico TYGPFGA mostró buena homología con la proteína precursora de BGAF. El péptido FEGLYLFHTPLGSGAN mostró identidad con la secuencia del precursor de BGAF. Así, la proteína de 30 kDa no parece ser idéntica a BGAF, pero es una molécula muy similar la cual puede estar involucrada con las propiedades de lectina del complejo molecular de 88.7 kDa.

## ABSTRACT

Corn Coleoptile lectin is present with  $\beta$ -glucosidase (EC.3.2.1.21) in a single tightly bound molecular association complex (88.7 kDa). SDS-PAGE of the molecular complex dissociates into two main components. Of these, at a concentration of 75%, the corn coleoptile  $\beta$ -glucosidase (60 kDa), is identified by enzymatic activity, with two 16-amino acid tryptic peptides displaying close homology with the primary structure of the enzyme. In separate experiments, we isolated homogenous monomeric enzyme of corn coleoptile. This allowed us to conclude that lectin properties like erythrocyte agglutination, found in the (88.7 kDa) molecular complex, is not due to the  $\beta$ -glucosidase bound in it. Another protein (30 kDa) dissociated from the same SDS-PAGE gels rendered several tryptic peptides, including a 20-amino acid sequence V(L)GP(Q)W(A)GGSGGSPVDITAEPQR closely homologous to the putative  $\beta$ -glucosidase aggregating factor (BGAF) precursor described recently. Tryptic peptide SAFTE(A)WN(V)ELK(V) was also present in the BGAF precursor. KFHEQR peptide was not present in BGAF precursor or any other protein sequence examined. Tryptic peptide TYGPFGA showed good homology with the BGAF precursor protein. FEGLYLFHTPLGSGAN peptide displayed identity with the BGAF precursor protein. Thus, the 30 kDa protein does not appear to be identical to BGAF, but is rather a similar molecule which could be endowed with the lectin properties of the 88.7 kDa molecular complex.

## II.-MATERIAL Y MÉTODOS

### 1) ENSAYOS EN CÉLULAS DEL SISTEMA INMUNE MURINO

#### a) Actividad fagocitaria

Para obtener los macrófagos peritoneales se utilizaron ratones macho Balb/c de 30 g de peso de 12 semanas de edad. Se les administró vía i.p. 3 mL de medio tioglicolato DIFCO (al 1%). A las 72 horas se sacrificaron por dislocación cervical. Se cortó la piel de la cavidad abdominal transversalmente. Se les administraron vía i.p. 10 mL de medio solución balanceada de Hank's. Se extrajeron los mismos 10 mL se transfirieron a un tubo de centrifuga estéril y se centrifugaron a 400Xg durante 10 minutos, se lavaron dos veces y se resuspendieron en medio D-MEM suplementado con suero bovino fetal al 10% (McCarron, 1984). Se contaron en cámara de Neubauer y se estimó la viabilidad por la exclusión de azul trypan, siendo de 95%. Se sembraron en placas de 96 pozos estériles (Nunc), a una densidad de  $2 \times 10^5$  células/pozo, se dejaron adherir durante 2 horas en condiciones de cultivo (37° C y 5% de CO<sub>2</sub>). Para las exposiciones al complejo molecular, se procedió a esterilizarlo por filtración (0.22 μ), se hicieron diluciones al doble en medio de cultivo, estas se adicionaron a los pozos (0.04 a 2.5 μg/pozo del complejo, cuantificada la proteína por la técnica de Bradford), se realizaron las exposiciones únicamente durante 24 horas.

Al término de las mismas se retiró el medio de cultivo y se sustituyó por una mezcla (100 μL) incubada previamente durante 1 hora a 37° C, de Zymosan-A/NBT (relación 1:1; 1 mg/mL en PBS 10 mM, pH 7.4). Se incubaron las células durante 1 hora en condiciones de cultivo. Posteriormente se retiró esta mezcla, se lavaron las células y se agregó 120 μL de hidróxido de potasio 2M y se dejó en agitación suave por 30 minutos. Posteriormente se agregaron 140 μL de dimetilsulfóxido para desarrollar color. Se leyó la placa en un lector de microplacas BIOTEK EL311 a una longitud de 630 nm contra un filtro de referencia de 405 nm. La cantidad de color es directamente proporcional a la actividad fagocitaria (Rook y cols., 1985). Con las absorbancias obtenidas, se realizó una gráfica de concentración del complejo molecular contra promedio de las absorbancias para cada concentración, con el Software SigmaPlot V 9.0 Se realizó el análisis estadístico con el software SigmaStat V 3.1.

#### b) Reconocimiento de células peritoneales por el complejo molecular

Preparación de frotis para el ensayo de fluorescencia indirecta.- Los macrófagos obtenidos de la manera descrita anteriormente, se sembraron en cajas de 24 pozos estériles, sobre cubre objetos redondos (13 mm). Se agregó una suspensión de células en medio de cultivo D-MEM, y se dejó en incubación a 37° C durante 2 a 6 horas. Transcurrido el tiempo de incubación se retiró el medio de cultivo con una pipeta y se secó al aire. Las células se fijaron adicionando metanol al 70% a la caja Petri, durante 10 min. Después de este período se eliminó el metanol con una pipeta y se dejó secar al aire. Se colocaron los cubreobjetos

sobre portaobjetos y se adicionó 20  $\mu$ l/cubreobjeto y se incubó durante 1 hora, con cualquiera de las siguientes tres soluciones, según sea el caso:

i) Lectina de coleoptilo de maíz-FITC 1:2 en PBS.

Las siguientes dos soluciones fue necesario prepararlas y dejarlas incubando a 37° C, aproximadamente 24 horas antes de adicionarlas al frotis.

ii) Preparar 500  $\mu$ l de una solución que contenga una concentración final de  $\alpha$ -lactosa 0.15M y lectina de coleoptilo de maíz-FITC 1:2; completar el volumen con PBS.

iii) Repetir el mismo procedimiento anterior, con la variante de que el carbohidrato fue  $\alpha$ -D-glucosamina.

Al término del período de la incubación, se lavaron los frotis con PBS. Se observó al microscopio de epifluorescencia Nikon Eclipse E600 a una longitud de excitación en el rango de 470-490 nm y una longitud de emisión de 520 nm. Se utilizó el equipo Nikon H-III para microfotografía, con película fotográfica Tri-X-Pan ASA 400 de Kodak.

c) Proliferación con células de timo y bazo (Mosmann, 1983)

Se utilizaron ratones macho de 6 semanas de edad, fueron sacrificados por dislocación cervical. Se extrajo el timo o bazo de manera aséptica, se eliminaron los glóbulos rojos con el amortiguador de lisis a 5° C ( $\text{NH}_4$  Cl 0.15 M;  $\text{KHCO}_3$  1 mM;  $\text{Na}_2$  EDTA 0.1 mM; pH 7.4). En un tubo de 15 mL se agregaron 5 mL del amortiguador por cada timo ó bazo, incubando 5 min a temperatura ambiente en agitación suave, se centrifugaron las células a 400Xg durante 10 minutos. Se lavaron dos veces con medio sin suero (Kruisbeek, 1992).

Se agregaron 3 mL de la solución de Ficoll-hypaque (histopaque) a 5° C a tubos de 15 ml, se adicionó el paquete celular el cual se depositó sobre la solución de Ficoll-hypaque. Se centrifugó durante 30 min a 800Xg a temperatura ambiente. Se retiraron los tubos de la centrífuga, se tomó la parte superior al anillo formado en el gradiente y lo menos posible de debajo del la interfase y se transfirió a otro tubo, se lavaron dos veces las células se contaron y se estimó la viabilidad con azul trypan. Se sembraron  $2 \times 10^5$  células/pozo en placas de 96 pozos en medio RPMI-1640 suplementado con suero bovino fetal al 10%. Se dejaron reposar durante dos horas en condiciones de cultivo, se estimó el tiempo cero mediante la reducción de metiltetrazolio (incubando en presencia de 100  $\mu$ g/pozo, por 4 horas). Al resto de los pozos se adicionó el complejo molecular a varias concentraciones mediante diluciones al doble (0.6-5.0  $\mu$ g mL), alguno de los estándares Fitoheماغlutinina o Concanavalina A como controles positivos. Cada 24 horas se estimó la reducción del MTT, centrifugando la placa y retirando el medio de cultivo, enseguida se adicionó 100  $\mu$ L de dimetilsulfóxido (Merck) y se agitó suavemente por 30 minutos. Se leyeron las absorbancia en un lector de microplacas Biotek EL311 a 570 nm contra un filtro de referencia de 405 nm. Se sacaron los promedios de ocho pozos y el error estándar de la media, se graficaron con el software Sigma-Plot V 9.0 y se hicieron los análisis estadísticos con el software Sigma-Stat V 3.1

d) Reconocimiento de células de timo y bazo por el complejo molecular  
Para los ensayos de marcaje con el complejo molecular-fluoresceinado se siguió el procedimiento descrito con los macrófagos de exudado peritoneal descrito anteriormente, pero empleando las células obtenidas de timo y bazo.

## **2) CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD**

La LCM fue preparada utilizando 500 g tejido húmedo de coleoptilos. Se germinaron semillas del tipo Berentsen 58-302, certificados por la Secretaría de Agricultura de México, durante 5 días en charolas en la oscuridad a 23°C como se describió previamente (Martínez y cols., 2001). Con los coleoptilos se preparó un extracto crudo por homogeneización, fue precipitado con acetona fría (4°C), el precipitado se disolvió en 70 mL de amortiguador de citratos 0.2 M a pH 6.4 y fue pasado por una columna de 1.5X20 cm de Sefarosa 6B acoplada con lactosa (Sigma Chemical), instalada dentro de un cuarto frío a 4° C. Se eluyó la muestra con una solución 0.2 M de lactosa en el mismo amortiguador de citratos. Se obtuvieron 30 fracciones de 2.5 mL cada una. Se juntaron los tubos 5 al 15 (25 mL), y se dializaron durante toda la noche contra un amortiguador de acetato de sodio 50 mM a pH 4.6. Se formó un precipitado que se recuperó por centrifugación a 7500Xg a 4° C. Se lavó tres veces con 6 mL del amortiguador de acetato de sodio, antes de ser disuelto en 3 mL de amortiguador frío de citratos 0.2 M, a pH 6.4, se hizo una segunda precipitación y un juego de lavados.

## **3) ESTIMACIÓN DE LA ACTIVIDAD HEMAGLUTINANTE**

La actividad hemaglutinante del complejo molecular purificado por cromatografía de afinidad fue evaluado en placas de 96 pozos de fondo cónico, para ensayar su con eritrocitos frescos del tipo O. Se hizo la cuantificación de proteína (Bradford) de las muestras, y se hicieron diluciones al doble en amortiguador de citratos 0.2 M pH 6.4. A cada pozo se le agregó 25 µL de eritrocitos humanos al 2% lavados, se agitó la placa y se dejó en reposo, a las cuatro horas fue leída. El título aglutinante de las muestras fue estimado usando la última dilución que produjo clara aglutinación de los eritrocitos mencionados.

## **4) ESTIMACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DEL COMPLEJO**

Con las mismas muestras se ensayó la actividad de  $\beta$ -glucosidasa utilizando como sustrato p-nitrofenil  $\beta$ -D-glucopiranosido (Sigma Chemical), siguiendo la técnica de Esen (1992). A 15 µL de la muestra se le agregaron 1,485 µL del amortiguador de citratos-fosfatos (10 y 20 mM respectivamente), pH 5.5 en un tubo eppendorf. Se tomaron 70 µL de la muestra diluida y se incubaron junto con 70 µL del p-nitrofenil  $\beta$ -D-glucopiranosido 5 mM en el mismo amortiguador a 25° C (1:1 v/v). La actividad enzimática del complejo fue medida espectro fotométricamente a 410 nm midiendo el p-nitrofenol liberado. Una unidad de actividad enzimática fue igual a la cantidad de enzima que hidrolizó 1 µM de nitrofenol/hora a 25° C.

## **5) ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA Y DENSITOMETRÍA**

Las electroforesis se llevaron a cabo en geles de poliacrilamida al 12% y SDS (Laemli, 1970), con las fracciones obtenidas de la columna de afinidad. Los geles fueron teñidos con azul de Coomassie y las bandas presentes fueron analizadas por densitometría en un densitómetro Helena Junior 24 a una longitud de onda de 580 nm, para obtener la concentración relativa de las bandas separadas provenientes de las fracciones de la cromatografía de afinidad.

## **6) PURIFICACIÓN DE LA $\beta$ -GLUCOSIDASA**

En experimentos separados, una muestra homogénea de  $\beta$ -glucosidasa de coleoptilo de maíz, fue preparada de acuerdo a lo descrito por Esen, 1992. Brevemente, el extracto de coleoptilo de maíz preparado en 50 mM de acetato de sodio pH 4.6 fue colocado en una pequeña columna catiónica de Bio-Rad 1X5 cm y la  $\beta$ -glucosidasa fué aislada usando un gradiente de pH (5.1 a 6.4) en 50 mM de acetato de sodio. La preparación mostró actividad de  $\beta$ -glucosidasa. Se examinó en electroforesis de poliacrilamida en SDS.

## **7) FILTRACIÓN EN GEL**

Para determinar si el complejo molecular identificado por cromatografía de afinidad podría ser separado a partir de homogenados totales, evitando la precipitación con acetona, se instaló una columna de filtración en gel (2.5X60 cm) empacada con sefarosa 6B y 1 M de cloruro de sodio como eluyente. Una muestra de 5 mL del homogenado fresco de coleoptilo de maíz fue clarificada por centrifugación y separada en fracciones de 5.5 mL para ensayos de actividad enzimática y aglutinación. Proteínas comerciales fueron empleadas como estándares de peso molecular de el volumen de elución de la columna (Roby, 1987). La proteína en la muestra fue estimada utilizando la prueba de azul de Coomassie, empleando albúmina bovina como estándar (Bradford, 1976).

## **8) OBTENCIÓN DE LAS SECUENCIAS DE AMINOÁCIDOS**

El complejo molecular fue sometido a electroforesis disociante y transferido a membranas de polivinilideno difluorado (PVDF), de acuerdo a el método descrito por Hedrik, 1968 y Matsudaira, 1973. La membrana fue teñida con azul de Coomassie y las bandas de 60 y de 30 kDa fueron recortadas y enviadas a secuenciar a la unidad HHMI Biopolymer Facility/W.M. Keck Biotechnology Research Laboratory at Yale University, New Haven, USA.

El amino terminal fue determinado usando la degradación química de Edman, utilizando el modelo 470A de secuenciador automático de Applied Biosystems.

Las proteínas de 60 y de 30 kDa provenientes de la electroforesis en poliacrilamida y SDS fueron digeridas con 1 µg de tripsina por 6 horas a 37° C. Los péptidos producto de la digestión fueron separados por HPLC. Un péptido con una masa de 1824 Da, fue usado para obtener la secuencia amino terminal interna. Los péptidos obtenidos se enviaron a secuenciar a la unidad HHMI Biopolymer Facility/W.M. Keck Biotechnology Research laboratory at Yale University.

Posteriormente con las secuencias obtenidas, se hicieron búsquedas en bancos de datos para proteínas como el GenBank y el banco de datos Europeo. Con la información obtenida se hicieron análisis de alineamientos de comparación con varias proteínas.



### III.-RESULTADOS

#### 1.- EN CÉLULAS DEL SISTEMA INMUNE MURINO

En nuestros resultados iniciales a) identificamos un efecto estimulante de la actividad fagocitaria no dependiente de la concentración, efecto inhibido por el ligando específico de la lectina (lactosa), cuando era incubada previamente con la lectina antes de ser adicionada a los cultivos (Figura 1), y no era inhibido por otros ligandos no específicos como N-acetilglucosamina (NAG).

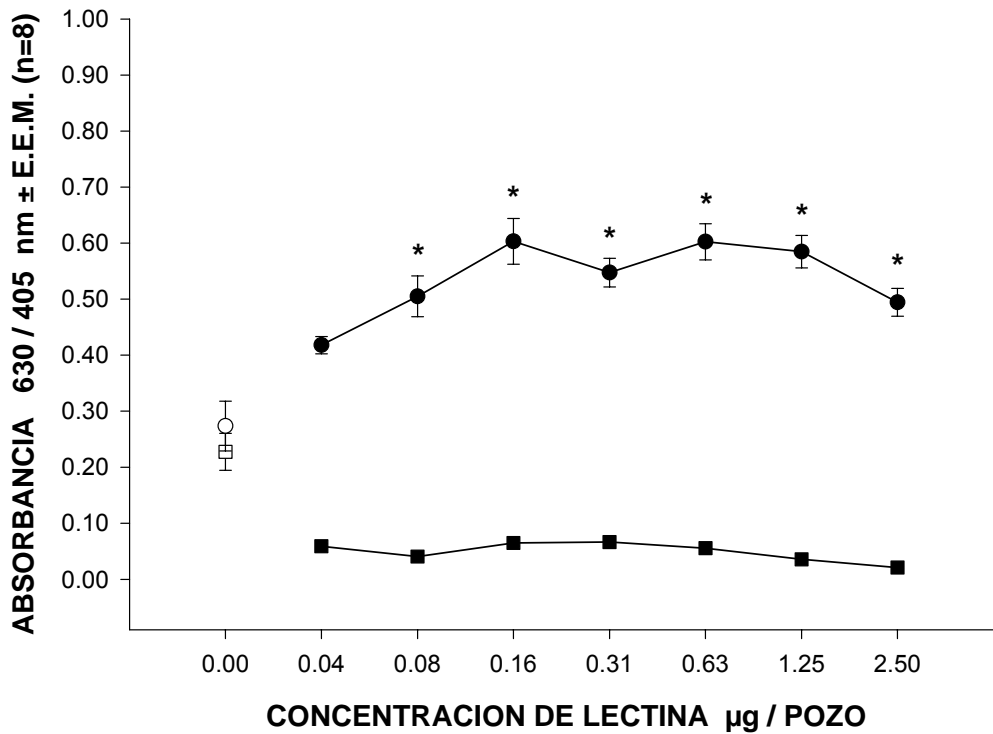


Figura 1.-Efecto *in vitro* del complejo molecular de coleoptilo de maíz (●) en la actividad fagocitaria de macrófagos de exudado peritoneal de ratón Balb/c (exposición durante 24 h). Células sin adicionar el complejo molecular (○) Estimación del efecto en la actividad mencionada cuando se preincuba el complejo molecular con lactosa 0.15 M (■). Células incubadas con lactosa 0.15 M sin el complejo molecular (□). Estimados mediante la reducción de azul de tetrazolio (NBT), \* $p < 0.05$ .

b) Identificamos un reconocimiento del 100% de los macrófagos peritoneales inducidos de ratón con medio tioglicolato (Figura 2), en contraste con los macrófagos peritoneales residentes, en los cuales la marca estuvo ausente, al igual que al incubarlas con otra proteína-fluoresceinada no relacionada (Figura 3).

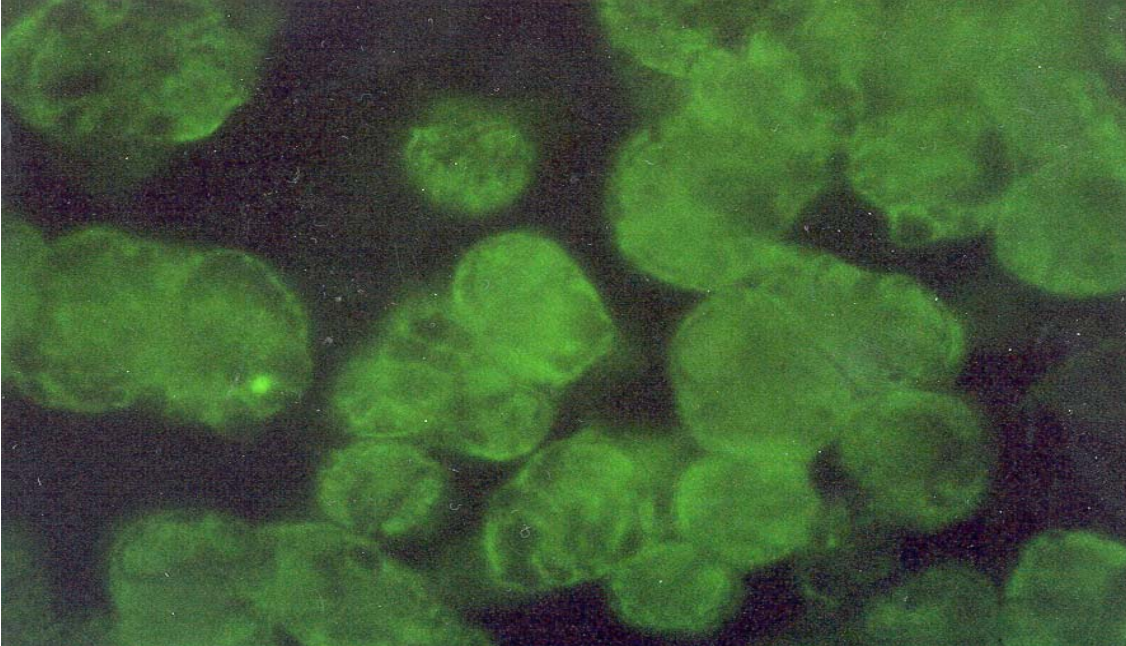


Figura 2.-Macrófagos peritoneales inducidos con medio tioglicolato, incubados con el complejo molecular-fluoresceinado (1000X).

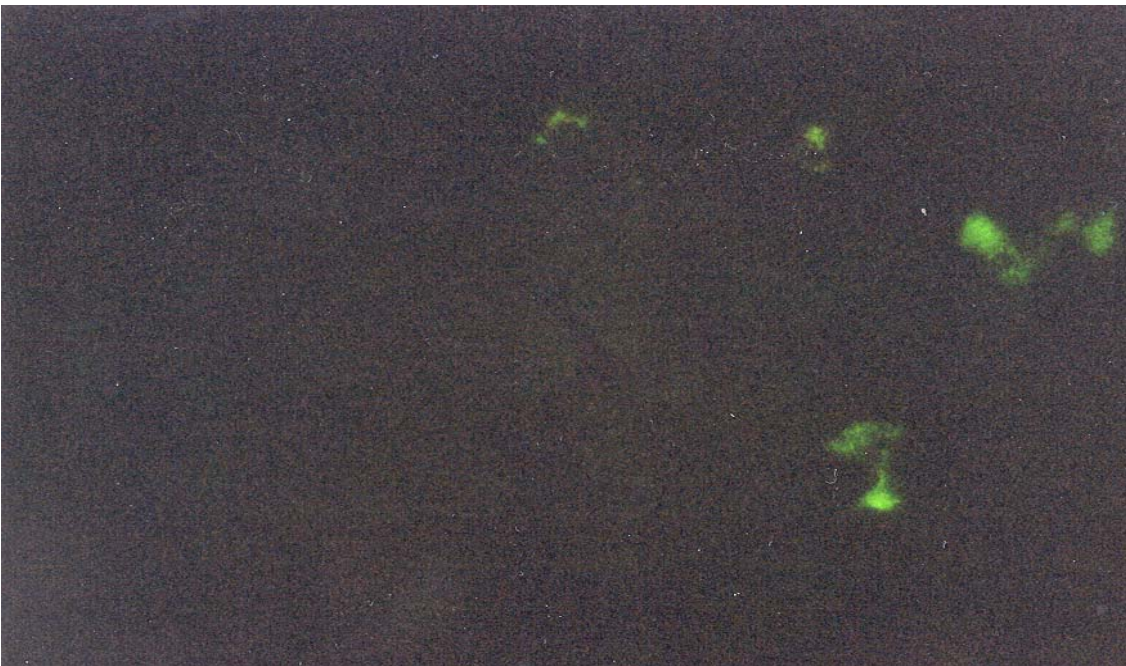


Figura 3.-Macrófagos peritoneales inducidos con medio tioglicolato, incubados con albúmina bovina-fluoresceinada (1000X).

El complejo molecular de coleoptilo de maíz mostró la ausencia de efecto mitógeno en células de timo (Figura 4) y de bazo (Figura 5).

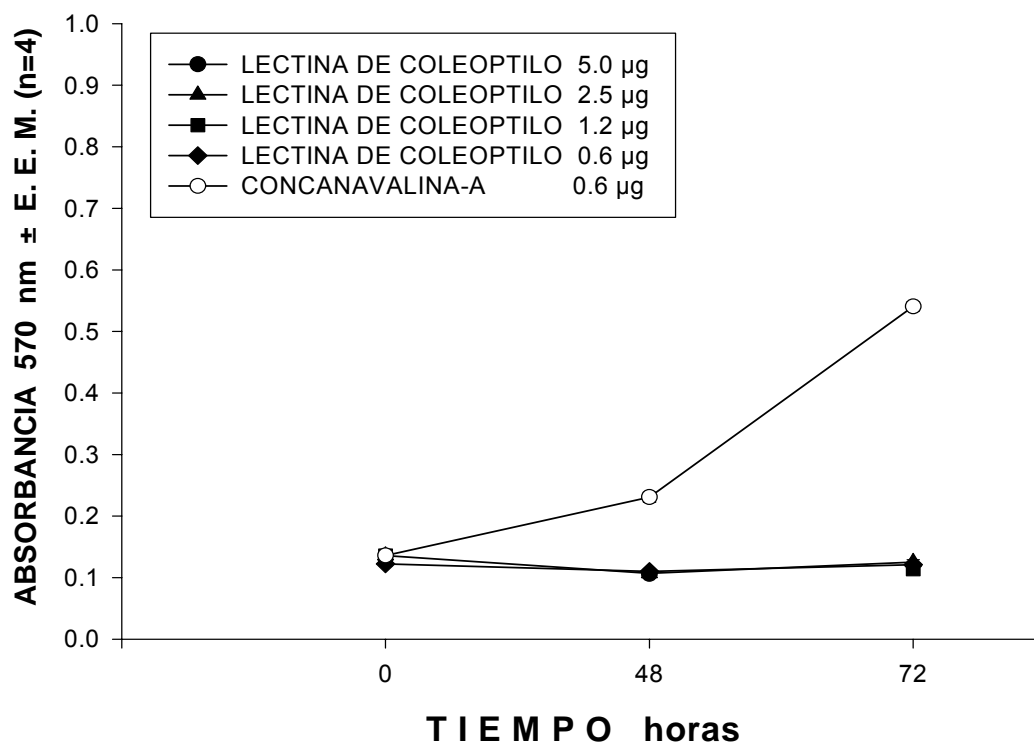


Figura 4.- Exposición *in vitro* de células de timo de ratón Balb/c al complejo molecular a varias concentraciones (●▲■◆), ó Concanavalina A (○). la proliferación se estimó mediante la reducción de metiltetrazolio (MTT).

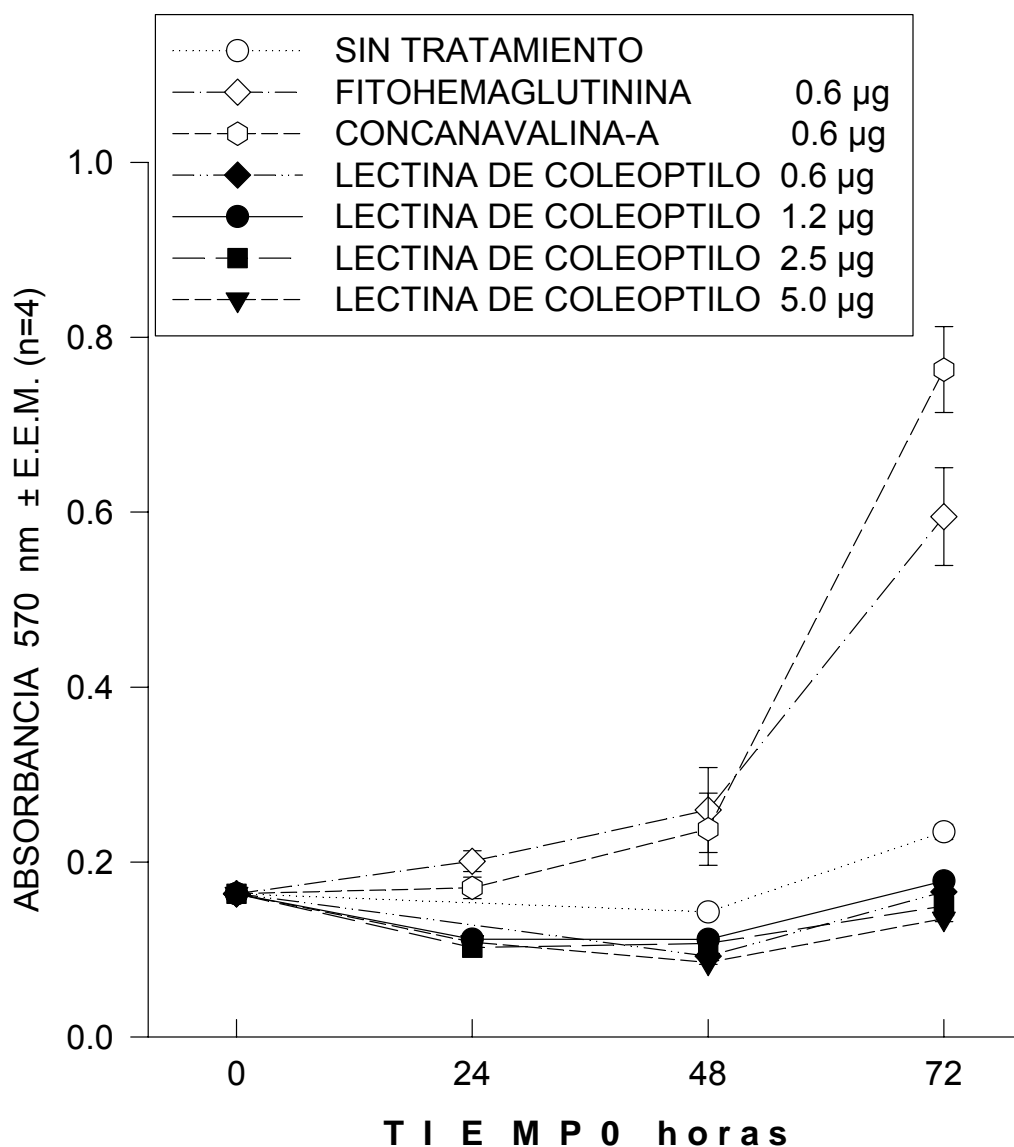


Figura 5.- Exposición *in vitro* de células de timo de ratón Balb/c al complejo molecular (◆●■▼) a varias concentraciones, Concanavalina A (○) ó fitohemaglutinina (◇), ó sin tratamiento (○). La proliferación se estimó mediante la reducción de metiltetrazolio (MTT).



c) Identificamos la casi ausencia de reconocimiento con el complejo molecular fluoresceinado, de células de timo (Figura 6) y bazo (Figura 7), mediante microscopia de epifluorescencia. d) no se produjo la secreción de linfoxina (datos no mostrados).

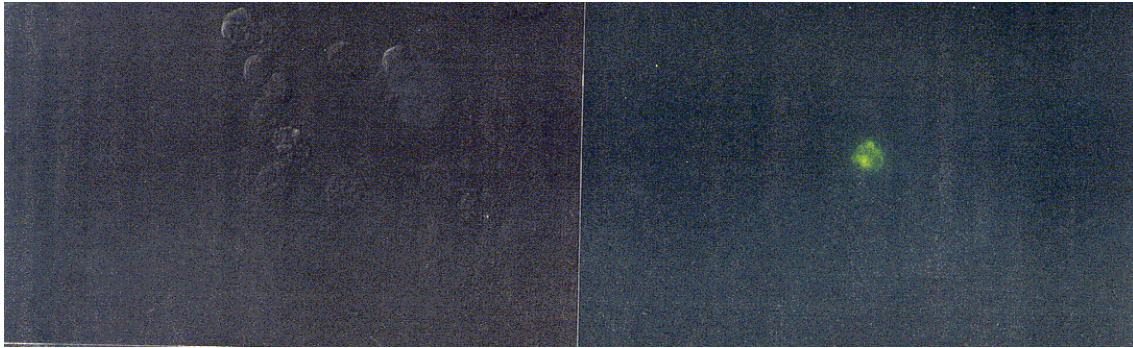


Figura 6.- Timocitos de ratón Balb/c incubados con el complejo molecular-fluoresceinado (1000X).

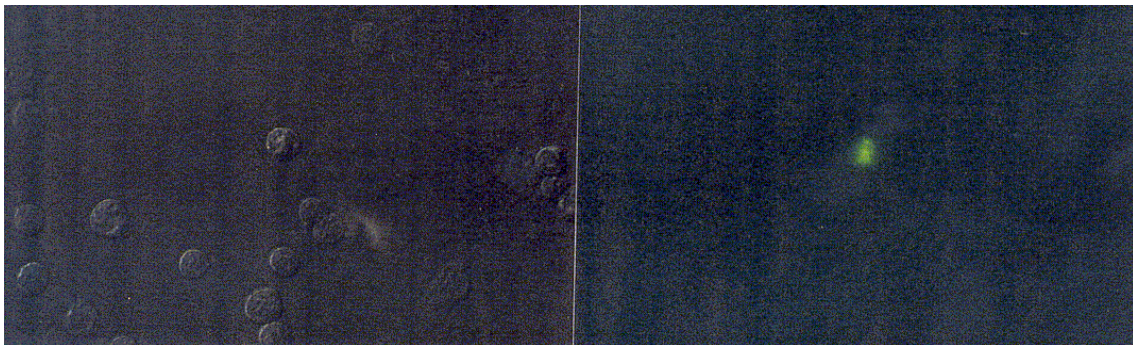


Figura 7.- Esplenocitos de ratón Balb/c incubados con el complejo molecular-fluoresceinado (1000X).

## 2.- CROMATOGRAFIA DE AFINIDAD.

En el cromatograma de las fracciones de la columna de afinidad de la muestra del precipitado de acetona del extracto de coleoptilo de maíz, es evidente que el pico de la actividad hemaglutinante y el pico de la actividad de  $\beta$ -glucosidasa eluyen en las mismas fracciones, cuando aproximadamente 200 mL del amortiguador 0.15 M de lactosa han pasado por la columna (Figura 8).

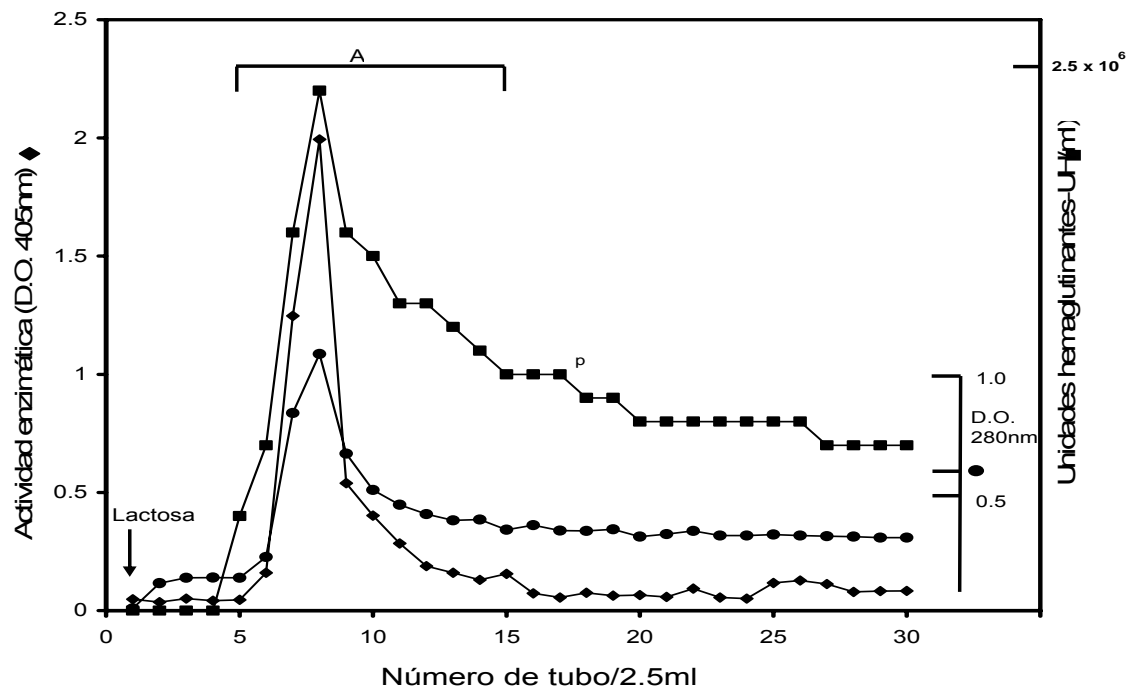


Figura 8.- Purificación del complejo molecular por cromatografía de afinidad. Un extracto de la precipitación de acetona fue disuelto en amortiguador de citrato 0.2 M a pH 6.4 y cargado en la columna de lactosyl-Sepharosa, lavado con el mismo amortiguador y eluído con lactosa 0.15 M.

Los resultados con geles de poliacrilamida al 4%, 7.5%, 10% y 12% (empleando como controles de peso molecular proteínas conocidas), revelaron que una muestra del conjunto de tubos No. 5-15 (A en la Figura 8) de la cromatografía, en amortiguador de citratos 0.2 M y pH 6.4, muestra una sola banda con una masa molecular de 88.7 kDa. (Figura 9), que denominamos complejo molecular lectina-enzima. Esta banda fue idéntica a la del trabajo que reportamos previamente empleando la lectina de coleoptilo purificada.

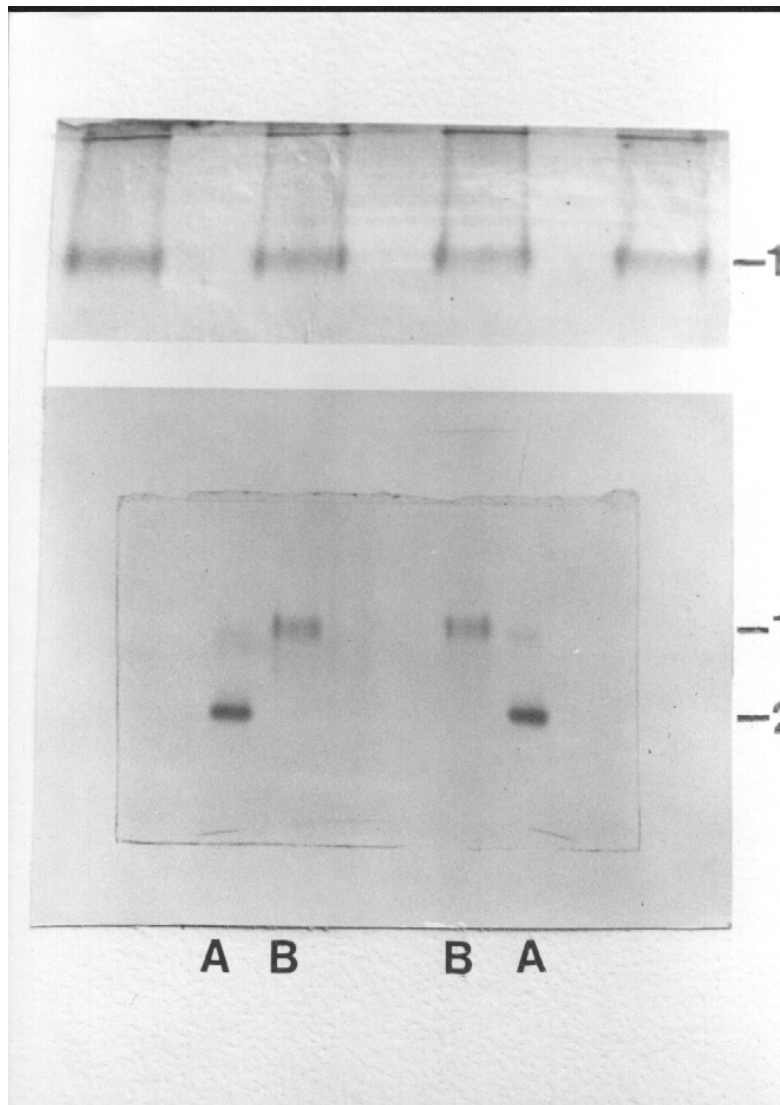


Figura 9.- Parte superior (1), complejo molecular de 88.7 kDa en electroforesis nativa (pH 8.3). Parte inferior (2), albúmina bovina en las mismas condiciones de electroforesis.

### 3.-ESTIMACIÓN DE LA ACTIVIDAD HEMAGLUTINANTE

Una muestra del conjunto de los tubos 5-15, con una concentración de 4.3 mg de proteína (determinada por Bradford), cuya actividad hemaglutinante fue de  $20 \times 10^6$  unidades/mg (casi el 75% de la actividad de la preparación total), mostró una actividad hemaglutinante elevadísima (45,000 unidades/mg), en la banda de 88 kDa en comparación con la actividad hemaglutinante de la proteína de 60 kDa (monómero de la  $\beta$ -glucosidasa), en donde la mencionada actividad estuvo prácticamente ausente. Sin embargo la actividad enzimática fue semejante en ambas bandas (Tabla I).

**Tabla I**

Actividades de lectina y  $\beta$ -glucosidasa en el complejo molecular

	Hemaglutinante ( U/mg )	Enzimática ( U/mg )
Complejo molecular de coleoptilo de maíz	45,000	160
( 88 kDa )		
Monómero $\beta$ -glucosidasa de coleoptilo de maíz	2	200

En otros experimentos, obtuvimos cuatro diferentes preparaciones de la LCM y estimamos su potencia aglutinante. Con nuestros datos y los reportados en el catalogo SIGMA elaboramos una tabla que nos permitió realizar una comparación de potencias (Tabla II). Si comparamos nuestra preparación 4 de la LCM (escogimos esta ya que resultó la menos potente de las 4 preparaciones que obtuvimos), con la lectina *Arachis hypogaea* (cacahuate), enlistada como la más potente en el catálogo SIGMA, nuestra lectina es 1.6 veces más potente que la que vende SIGMA. Otras comparaciones de la LCM (p. ej., la preparación 4 con la lectina de papa), darán como resultado valores de hasta 33 veces mayor potencia de la LCM con respecto a la esta lectina.



Tabla II.-Potencia de varias lectinas y de la lectina de coleoptilo de maíz.

Lectina de Maíz ó lectina comercial*	Mínima concentración de lectina que aglutina** (µg/mL)
Lectina de Maíz <b>Preparación 1</b>	0.009
Lectina de Maíz <b>Preparación 2</b>	0.03
Lectina de Maíz <b>Preparación 3</b>	0.05
Lectina de Maíz <b>Preparación 4</b>	0.06
Lectina de Arachis hypogaea (cacahuate)	0.1
Lectina de Erythina cristagalli	0.5
Aglutinina de <i>Ricin Communis</i>	1.0
Lectina de Solanum tuberosum (papa)	2.0

\*Catalogo de SIGMA 2004-2005.

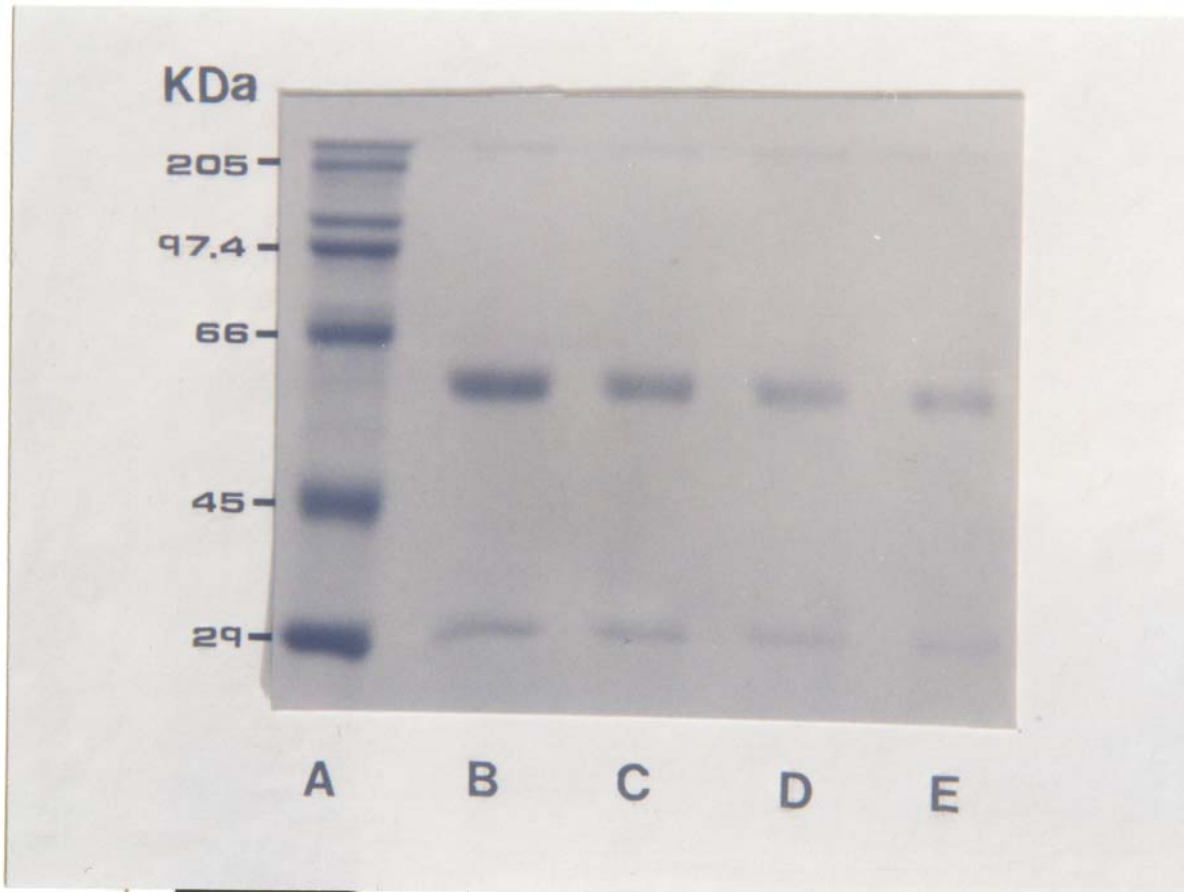
\*\*Aglutinación de una suspensión de eritrocitos humanos tipo O al 2%, después de 1 hr de incubación a 25° C.

#### 4.-ESTIMACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DEL COMPLEJO

La misma muestra de los tubos 1-15 tuvo una actividad de  $\beta$ - glucosidasa de 160 unidades/mg de proteína en el complejo molecular de 88 kDa (Tabla I).

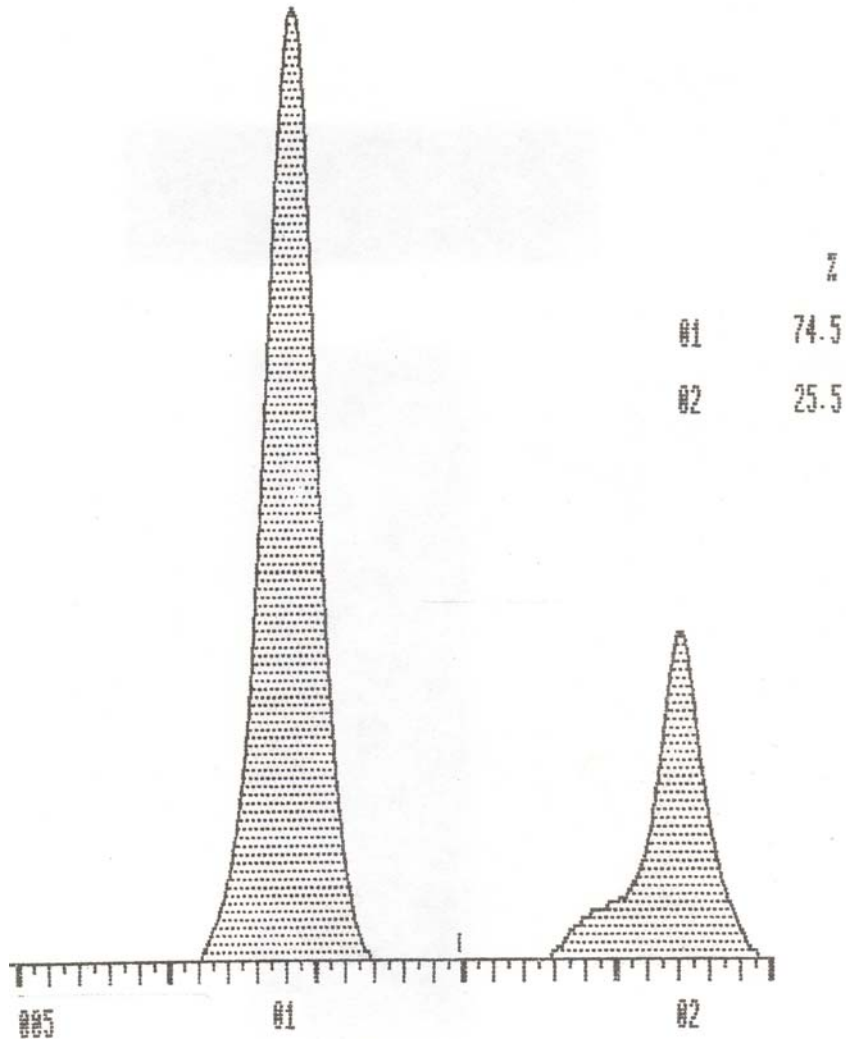
#### 5.-ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA Y DENSITOMETRÍA

Cuando el complejo molecular precipitado fue analizado mediante SDS-PAGE por el procedimiento de Laemli, se observaron dos bandas principales consistentemente en los geles teñidos con azul de Coomassie. Las masas moleculares estimadas fueron 60 kDa para la primera banda y 30 kDa para la segunda banda (Figura 10).



**Figura 10.-** Complejo molecular obtenido de la cromatografía de afinidad en electroforesis disociante. Se observan dos bandas, una de 60 kDa. Correspondiente a la subunidad de la  $\beta$ -glucosidasa y otra de 30 kDa correspondiente a la lectina hipotética. (A) marcadores de peso molecular miosina (205 kDa), fosforilasa b (97.4 kDa), albúmina sérica bovina (66 kDa), ovoalbúmina (45 kDa), anhidrasa carbónica (29 kDa). (B a E) carriles cargados con concentraciones de 10 (B), 5  $\mu$ g (C), 3  $\mu$ g (D) y 2  $\mu$ g (E), del complejo molecular obtenido de la cromatografía de afinidad.

El gel teñido fue examinado en un densitómetro y la concentración relativa de las bandas fue obtenida como se muestra en la Figura 11.



**Figura 11.-** Análisis densitométrico del gel disociante teñido con azul de Coomassie, leído a 590 nm. La primera banda corresponde a la proteína de 60 kDa y comprende el 75% de la muestra. La segunda banda corresponde a la proteína de 30 kDa y comprende el 25% restante

## 6.-PURIFICACION DE LA $\beta$ -GLUCOSIDASA.

Una muestra homogénea de  $\beta$ -glucosidasa de coleoptilo de maíz fue aislada en experimentos separados, de acuerdo a la técnica descrita por Esen, 1992. La muestra fue muy activa (200 unidades/mg) en presencia de p-nitrofenil  $\beta$ -D-glucopiranosido y se obtuvo una sola banda de 60 kDa en electroforesis disociante (Fig. 12), sin embargo la muestra presentó actividad hemaglutinante casi nula para eritrocitos tipo O (tabla I). Estos resultados sugieren que la actividad de lectina no es debida a la enzima de 60 kDa

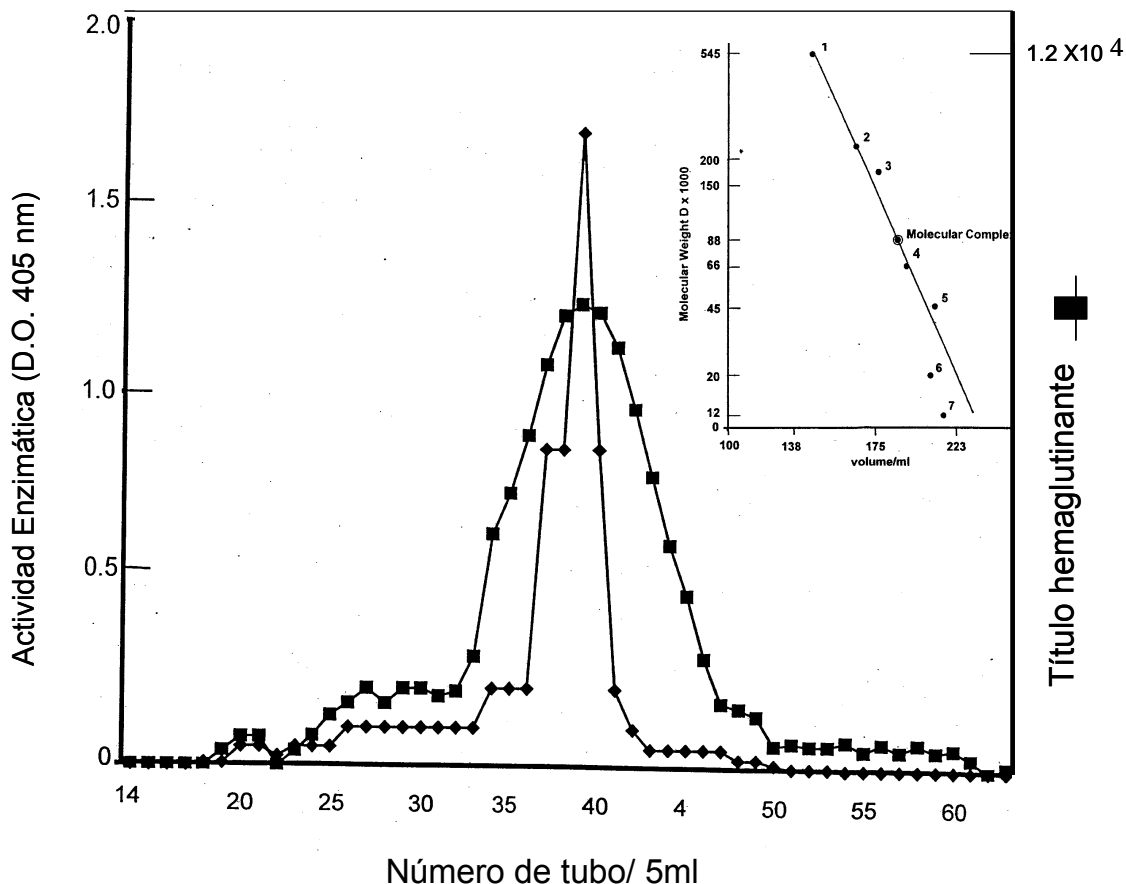


**Figura 12.-** Gel disociante de experimento por separado. (A) Marcadores de peso molecular; miosina (205 kDa), albúmina sérica bovina (66 kDa), ovoalbúmina (45 kDa). (B). Se observa el monómero de  $\beta$ -glucosidasa (60 kDa).

## 7.-FILTRACIÓN EN GEL

Experimentos utilizando cromatografía de filtración en gel del homogenado de coleoptilo completo en 1 M de NaCl, nos permitieron demostrar la presencia de un solo pico conteniendo ambas actividades, la enzimática y la aglutinante (Figura 13). La extrapolación del volumen de elución del pico único colectado contra volúmenes de elución de proteínas con pesos moleculares conocidos, nos

proporcionó un valor de peso molecular de 88 kDa muy semejante al obtenido para el complejo molecular aislado por el procedimiento habitual para nosotros de purificación por cromatografía de afinidad (Fig. 1).



**Figura 13.-** Experimento de filtración en gel para obtener el complejo molecular de extracto de coleoptilo de maíz a partir de homogenado de tejido en amortiguador de citrato de sodio 0.1 M pH 6.4, aplicado a una columna de Sefarosa 6B. Estándares de peso molecular: 1 ureasa (545 kDa); 2  $\beta$ -amilasa (200 kDa); 3 y globulinas de conejo (150 kDa); 4 albúmina sérica bovina (66 kDa); 5 ovoalbúmina (45 kDa); 6 inhibidor de tripsina (20 kDa); 7 citocromo c (12.4 kDa). Recuadro curva de calibración indicando un peso molecular de 88.7 kDa para el pico dual del complejo molecular.

## 8.-OBTENCIÓN DE LAS SECUENCIAS DE AMINOÁCIDOS

La primera banda de 60 kDa (75%) fue cortada del gel y sometida a una digestión trípica para obtener dos de los péptidos descritos en la tabla III. De estos se obtuvieron dos secuencias respectivamente: IGVQMLSPSEIPQRDWF y

LAGSYNMLGLNYYTSR. Una búsqueda en bases de datos de proteínas (EMBL/GenBank/DDBJ) mostró que ambas secuencias presentan una homología del 100% con la  $\beta$ -glucosidasa de maíz (Accesion number P49235) y otras glucosidasas de *Zea mays*, incluyendo la  $\beta$ -glucosidasa del precursor de cloroplasto (Esen, 1992; Feldwisch, 1994).

**Tabla III**

Secuencias de péptidos trípticos del complejo molecular a partir de SDS-PAGE

( Banda 1 )	Secuencia de aminoácidos de péptidos trípticos		Observaciones
60 kDa			
Péptido 1	62 IGVQMLSPSEIPQRDWFP	79	100% homología con $\beta$ -glucosidasa de maíz 1*
Péptido 2	375 LAGSYNMLGLNYYTSR	390	
( Banda 2 )	Secuencia de aminoácidos de péptidos trípticos		Observaciones
30 kDa			
Péptido 25	KFHEQR		No Homología
Péptido 68	( no se pudo secuenciar )		Mezcla de péptidos (MALDI-TOF)
Péptido 89	160 V(L)GO(Q)W(A)GGSGGSPVDITAEPR	180	95% homología con el promotor de BGAF 2*
Péptido 96	10 SAFTEWNEK	19	90% homología con el péptido señal BGAF 2*
Péptido 119 (A)	258 TYGPFGA	264	100% homología con BGAF proteína madura 2*
Péptido 119 (B)	20 FEGLYLFHTPLGSGAN	36	81% homología con BGAF proteína madura 2*

1\* EMBL/GEN BANK/DDBJ, P49235

2\* GEN BANK.AAFT1261

La banda 2 de 30 kDa (25%), fue separada del gel y procesada como la primera banda. Se obtuvieron varios péptidos trípticos (Tabla III). Se escogieron seis para el análisis de secuencia. El péptido No. 25 fue secuenciado como KFHEQR, aunque solamente se encontró homología del 30% con la secuencia de una proteína recientemente descrita por Blanchard, 2001 (Factor Agregante de la  $\beta$ -glucosidasa o BGAF, Accesion number AAFT1261). El péptido No.68 no produjo ningún resultado, pero el péptido No. 89 resultó con un 95% de homología con el péptido señal de la estructura primaria recientemente descrita como Factor Agregante de  $\beta$ -glucosidasa (BGAF). Esta proteína une  $\beta$ -glucosidasa en preparaciones de coleoptilo de maíz de variedades "nulas" de maíz, descritas previamente (Esen y Blanchard, 2000). Esta segunda secuencia fue homologa a la secuencia 160-180 de la misma BGAF, incluyendo a una secuencia de 11 amino ácidos también presente en la estructura primaria de la Jacalina, una lectina  $\alpha$ -galactosa específica de una planta (Roque-Barreira, 1985). El péptido No.96 produjo una secuencia de diez amino ácidos con una alta homología con BGAF (90%). El péptido 119(A), aunque produjo una secuencia más corta, la homología de la misma fue del 100% con BGAF. Por último el péptido 119(B) con una secuencia de 16 amino ácidos y 81% de homología con la proteína madura de BGAF.

Las comparaciones de las secuencias de los péptidos obtenidos de las proteínas de 60 y 30 kDa que nos proporcionó la Universidad de Yale con proteínas de los bancos antes mencionados se realizó mediante el programa CLUSTAL X. El anexo I muestra el alineamiento de las secuencias obtenidas de la proteína de 30 kDa de el complejo molecular y BGAF.

**ANEXO I.-COMPARACIÓN MEDIANTE UN ALINEAMIENTO DE SECUENCIAS DE AMINOACIDOS REPORTADAS PARA BGAF EN GENE BANK CON LAS SECUENCIAS OBTENIDAS DE LA PROTEINA DE 30 KDa QUE NOS PROPORCIONÓ LA UNIVERSIDAD DE YALE**

BGAF MASLQVTPT**SAFTQ**W**NELKF**EGLYLFHNYV**SGAN**QTQVVISNKAPIGIGATVVNNWTVCD  
 LCM **SAFTE**W**NELKF**EGLYLFH**TP**L**GS**GAN-----  
 \*\*\*\*\*.\*\*\*\*\*.\*\*\*\*\*

BGAF GPGPNAKLIARAQGLHIQAGNWNVNSFSLVFVDQRFSGSTLEVTGIVVESGEWAIVGGTGQ  
 LCM -----

BGAF FAMANGVISK**KLHGKT**SEGDI IQLTIHAFCPVLGATKRSATK**VGPWGGSGGSPMD**ITAEP  
 LCM -----**KFHEQR**-----**VGPWGGSGGSPVD**ITAEP  
 \* \* \*\*\*\*\*.\*\*\*\*\*

BGAF **Q**RLKSITVATGIAVTSIAFSYVDSAGQTQSAGRWGGSGGETEPVIQLGDSEVLTELSGTI  
 LCM **QR**-----  
 \*\*

BGAF GNVDGLTVITSIKFVTS**LKTYGPFGA**WNGSDTPFAIPVQOGSAIVGFFARAGVYLDALG  
 LCM -----**TYGPFGA**-----  
 \*\*\*\*\*

BGAF VYVRS**L**  
 LCM -----

BGAF --- **Beta Glucosidase Agregating Factor (Zea mays)** Genebank (AAFT1261.2).

LCM -- Las secuencias que nos reportó la Universidad de Yale.



#### IV.-DISCUSION

Nuestros experimentos iniciales con el complejo molecular en sistemas celulares, mostraron una actividad biológica importante sobre la actividad fagocitaria, en células mononucleares de exudado peritoneal en el ratón (Figura 1). Esta activación fue inhibida por preincubar el complejo molecular con su ligando específico (lactosa), a diferencia de cuando se preincuba con otro tipo de azúcar no específico para el complejo molecular (N-acetil-glucosamina), el cual no inhibe la activación señalada. Sin embargo, no logramos obtener curvas concentración-respuesta para este efecto. Adicionalmente observamos que el complejo molecular fluoresceinado, se liga y marca el 100% de estas células de exudado peritoneal (Figura 2), en contraste con las células residentes en esta cavidad a las cuales no marca. Este marcaje es específico por el complejo-FITC ya que como se ha descrito, la preincubación con el ligando específico (lactosa) inhibe el marcaje, o bien si se utiliza otra proteína fluoresceinada (Albúmina bovina), tampoco se observa la marca en las células (Figura 3).

Se ha descrito que lectinas como la aglutinina de germen de trigo (*Triticum vulgare*; Gallily y cols., 1988) y la Concanavalina A (*Canavalia ensiformis*; Maldonado y cols., 1998), incrementan la actividad fagocitaria de macrófagos (Tabla IV). También que otras lectinas como *Machaerocereus eruca* y la aglutinina de cacahuate (*Arachis hypogaea*) inhiben la actividad fagocitaria (Zenteno y cols., 1985; Maldonado y cols., 1994).

TABLA IV.- Propiedades de algunas lectinas en dos procesos celulares

LECTINA	ACTIVIDAD FAGOCITARIA	MITOGENICIDAD	AUTOR
Zea mays (coleoptilo de maíz)	ESTIMULA	NO PRESENTA	MOLINA, 1998
Arachis hypogaea (cacahuate)	INHIBE		
Amaranthus leucocarpus (amaranto)	INHIBE		MALDONADO, 1998
Artocarpus integrifolia (Jacalina)		PRESENTA	
Concanavalina A tipo VI	ESTIMULA	PRESENTA	MALDONADO, 1998
Glycine max (frijol soya)		PRESENTA	

Lycopersicon esculentum (tomate)		PRESENTA	
Phytolaca americana		PRESENTA	
Triticum vulgaris (trigo)	ESTIMULA	PRESENTA	GALLILLY, 1988

Los macrófagos una vez activados, presentan diversos receptores en su superficie, que no presentan antes de su activación. Estos receptores contienen azúcares específicos que son reconocidos por las lectinas. Esta unión lectina-receptor, modifica las propiedades inherentes de estos receptores, lo que podría explicar los efectos observados. Entre algunas de las lectinas que poseen actividad mitogénica conocida, tenemos a la jacalina, concanavalina A, frijol soya, tomate, fitohemaglutinina y la lectina de germen de trigo. Aparentemente el estado de agregación de estas lectinas, podría estar relacionado con su actividad mitogénica, a excepción de la *Phytolaca americana*.

En nuestro caso, la ausencia de mitogenicidad fue determinada en poblaciones celulares de linfocitos murinos de timo y bazo (Figuras 4 y 5), teniendo como control positivo a dos mitógenos muy conocidos (Concanavalina-A y Fitohemaglutinina). Es posible explicar esta ausencia, ya que cuando estudiamos si el complejo molecular identificaba células de timo o bazo (Figuras 6 y 7), encontramos que solamente lo hace en alrededor del 1% de ambas estirpes celulares. Aparentemente en estas células, el complejo molecular de coleoptilo de maíz, no reconoce ningún azúcar ya que no se liga a ningún receptor membranal, a diferencia de lo que hace en los macrófagos de exudado peritoneal (Figura 2).

Con estos interesantes resultados de la activación de este importante proceso celular en los macrófagos (actividad fagocitaria) así como el reconocimiento de células "activadas" de esta estirpe y de sus correspondientes implicaciones, y la observación de ausencia de efectos en otras estirpes celulares (linfocitos de timo y bazo), se estudiaron inicialmente los efectos del complejo molecular en sistemas celulares, pensando que correspondían a los de una sola proteína, ya que en electroforesis en condiciones nativas, las muestras de la columna de afinidad solamente mostraban una banda de 88 kDa (Figura 9).

Como se menciona en la introducción, cuando se observó que en electroforesis en condiciones disociantes, las muestras de estas columnas mostraban dos bandas principales (60 y 30 kDa), se hizo necesario identificarlas, a fin de estudiarlas nuevamente por separado y caracterizar sus efectos en sistemas celulares, por lo que interrumpieron estos estudios hasta lograr el aislamiento y caracterización bioquímica de cada proteína.

Por lo que en este trabajo, presento los resultados que confirman el aislamiento y purificación de una lectina de coleoptilo de maíz (LCM), descrita previamente por el grupo de la UBI ITO-UNAM encabezado por el Dr. Félix Córdoba (Martínez y cols., 2001; 2003). También presento los resultados que demuestran que la LCM purificada por cromatografía de afinidad es un complejo molecular de 88.7 kDa que contiene una  $\beta$ -glucosidasa (60 kDa), así como otra proteína de 30 kDa (Figura 11), aparentemente relacionada con la actividad hemaglutinante que muestra el complejo molecular. Este complejo molecular fue también obtenido en experimentos de filtración en gel a partir de homogenados totales de coleoptilo de maíz (Figura 13).

Estos resultados sugieren que el complejo molecular lectina-enzima, esta presente y activo en el coleoptilo en crecimiento. Esto es probablemente debido al hecho que la  $\beta$ -glucosidasa es una enzima esencial, que mediante la hidrólisis de enlaces  $\beta$ -glucosídicos, libera varios metabolitos del maíz (Sahi y cols., 1990); la aglicona DIMBOA (Long y cols., 1975), a partir de la hidrólisis del glúcósido del ácido hidroxámico 2-glucopiranosil 4-hidroxi-7-metoxi-1,-4-benzoxacin-3-ona (DIMBOAGlc), hidrólisis que libera agentes activos que protegen al maíz del gusano barrenador europeo (*Ostrinia nubilalis*; Klun y cols., 1967). Así como otros químicos de defensa incluyendo un número de ácidos hidroxámicos (Niemeyer y cols., 1988); metabolitos secundarios de la planta, que la protegen de la interacción Afidios-planta (Niemeyer y cols., 1991). La  $\beta$ -glucosidasa es también activa en la liberación de fitohormonas (Campos y cols., 1993, Brzobohaty y cols., 1993).

Como reportamos en nuestras primeras publicaciones del tema, la LCM (aquí mencionada como complejo molecular enzima-lectina), parece no solo estar presente en el maíz (*Zea mays*), sino también en el teosinte (*Zea diploperennis*), esta presencia además subraya la importancia de la  $\beta$ -glucosidasa para todas las especies del género *Zea* (Martínez y cols., 2001).

En relación a la actividad hemaglutinante, se observa que el complejo molecular enzima-lectina del coleoptilo de maíz, presenta muy alta actividad (45,000 UH/mg), en contraste a otras lectinas vegetales que presentan baja actividad (Germen de trigo, Fitoheamaglutinina M y E, Jacalina entre otras). Es posible que esto se deba a la estrecha unión de las dos proteínas que forman un agregado multivalente (varias moléculas de la proteína de 30 kDa., con una o pocas moléculas de enzima), lo que refuerza o multiplica las uniones con los eritrocitos dando lugar a tan altos títulos de aglutinación nunca reportados con otras lectinas vegetales (Tabla II).

De las secuencias de aminoácidos de nuestra proteína de 30 kDa, de nuestro complejo molecular enzima-lectina de coleoptilo de maíz, que nos reportó la Universidad de Yale, hay una de ocho aminoácidos (**GPWGGSGG**) de particular interés. Cuando se le busca en GenBank, para ver que otras proteínas conocidas

la poseen, encontramos que varias proteínas conocidas por su actividad de lectina contienen esta secuencia. Llama la atención que BGAF (descrita por Blanchard y cols., en 2001), tiene dos secuencias idénticas a el octapéptido mencionado y que la jacalina (*Artocarpus integrifolia*), una lectina específica para  $\alpha$ -galactosa también presenta dicha secuencia.

Cuando analizamos la actividad hemaglutinante de la  $\beta$ -glucosidasa, esta actividad es prácticamente nula (Tabla I). No hemos podido obtener cantidades suficientes de la proteína de 30 kDa y examinar su actividad aglutinante, por lo tanto no sabemos si aglutina eritrocitos como lo hace el complejo íntegro. Los datos de secuencias nos permiten suponer que dado que posee este dominio al parecer común a varias lectinas, cuando sea aislada y purificada en cantidades suficientes, si tendrá actividad aglutinante. Aunque creemos que dicha actividad será semejante a la de otras lectinas vegetales y no tan elevada como la del complejo molecular íntegro.

La actividad enzimática de  $\beta$ -glucosidasa del complejo molecular obtenido por cromatografía de afinidad fue muy semejante a la que se obtuvo purificando la enzima como monómero, mediante una columna catiónica y un gradiente de pH (actividad específica de 160 y de 200 unidades/mg), logrando obtener más del doble de actividad específica, que quien reportó el método original (Esen y cols., 1992; 96 U/mg), lo que hace ver el buen estado de nuestras preparaciones, mediante ambos procedimientos de purificación.

La purificación de la  $\beta$ -glucosidasa como monómero se logró muy exitosamente, mejorando inclusive la actividad específica reportada en el artículo de Esen y cols., 1992.

Para tratar de no utilizar la precipitación con acetona, se siguió un procedimiento de filtración en gel y lograr obtener en condiciones más naturales el complejo a partir de homogenados de tejido frescos. Parece claro que el complejo molecular enzima-lectina no es un artefacto del proceso de extracción purificación, ya que esta presente con el mismo peso molecular (88.7 kDa), con la actividad enzimática y hemaglutinante que en homogenados frescos de coleoptilo, como en el complejo aislado por cromatografía de afinidad.

Los datos bioquímicos, electroforéticos y de secuencia nos muestran que tenemos en el complejo molecular enzima-lectina dos componentes. Por un lado una  $\beta$ -glucosidasa. Por otro lado una proteína de 30 kDa, que posee un péptido (No. 119A) de siete aminoácidos con 100% de homología con BGAF, otro (No. 89) de veinte aminoácidos con 95% de homología con BGAF. Un tercer péptido (No. 96) de diez aminoácidos con 90% de homología con BGAF. Un cuarto péptido (No. 119B) de 16 aminoácidos con 81% de homología con BGAF. Un quinto péptido (No. 25) con 30% de homología con BGAF y un sexto péptido (No. 68),

que no se pudo secuenciar ya que aparentemente era una mezcla de dos péptidos.

Aparentemente nos encontramos con una proteína semejante a BGAF, que creemos que no es la misma, debido a la falta de homología absoluta con BGAF y porque a esta última no se le ha descrito actividad de lectina, a pesar de ser estudiada muy intensamente.

Hemos hecho alineamientos de comparación en donde queda claro que aunque hay secuencias semejantes entre nuestra proteína de 30 kDa, y BGAF ciertamente son muy pocas (ver anexo I). Al hacer un análisis de comparaciones múltiples con varias lectinas, también se encuentran algunas homologías, lo que puede entrever que estas semejanzas con otras lectinas refuerzan la propuesta de que la proteína de 30 kDa sea también una lectina.

Acerca de las fuerzas de unión y el mecanismo que mantiene fuertemente unidas a las dos proteínas del complejo en el coleoptilo de maíz, solamente podemos especular. En este momento nosotros sospechamos que la unión y el mecanismo son similares a el que ha sido postulado por Blanchard y Esen (2001), para el Factor Agregante de la  $\beta$ -glucosidasa (BGAF) y está presente en este nuevo caso.

Esen y Blanchard atribuyen a esta proteína (BGAF), un papel de chaperona de la enzima, que la protege de la proteólisis externa dentro de la célula de la planta. En tal caso, un efecto recíproco de chaperona, podría existir entre ambas proteínas involucradas.

Nosotros no podemos descartar un papel similar en la asociación molecular descrita aquí, donde se observa una reminiscencia del modelo antígeno-anticuerpo que parece válida también. Aunque podría haber un papel adicional para el complejo molecular de 88.7 kDa por descubrir, como la aglutinación con especificidad para galactosa. Esto podría ser un hallazgo importante en futuros experimentos de aislamiento de la proteína de 30 kDa que nos ayudaría a resolver el papel de la lectina en el complejo molecular.

El complejo molecular con actividad de  $\beta$ -glucosidasa, muestra esta actividad aproximadamente 7 días después de la germinación *in vitro* (Martínez y cols., 2001). Esto sugiere que el complejo y la actividad enzimática en él, son importantes y que en el momento crítico en el desarrollo del maíz, cuando la disponibilidad de promotores del maíz y los factores defensivos son más necesarios. Es quizá por la misma razón que una forma molecular de enzima unida a una lectina galactosa-específica se convierte en la estructura apropiada para ejecutar este papel esencial en la plántula tierna de 7 días de edad.

## V.-BIBLIOGRAFÍA

Blanchard D, Cicek M, Chen J, Esen A. Identification of  $\beta$ -glucosidase aggregating factor (BGAF) and mapping of BGAF binding regions on maize  $\beta$ -glucosidase. *J Biol Chem* (2001). **276** (15):11895-11901.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* (1976). **37**:248-254.

Brzobohaty B, Moore I, Kristoffersen P, Bako L, Campos N, Schell J, Palme K. Release of active cytokinin by a  $\beta$ -glucosidase localized to the maize root meristem. *Science* (1993). **262**:1051-1054.

Calderón de la Barca A, Vázquez-Moreno L. *Amaranthus cruentus* lectin: Purification, stability and some biochemical properties. *J Food Biochem* (1988). **12**:117-126.

Cammue B, Stinnisen HM, Peumans WJ. A new type of cereal lectin from leaves of couch grass (*Agropyrum repens*). *Eur J Biochem* (1985). **148**:315-322.

Campos N, Bako B, Brzobohaty B, Feldwisch J, Zettl R, Boland W, Palme K. Identification and characterization of a novel phytohormone conjugate specific  $\beta$ -glucosidase activity from maize, In : A. Esen (Ed). *Biochemistry and Molecular Biology Symp. Ser. Vol. 533*, American Chemical Society, Washington, U.S.A, (1993): 204-212.

Carrari F, Pérez-Flores L, Lijavetzky D, Enciso S, Sánchez R, Benech-Arnold R, Lusem N. Cloning and expresión of a sorghum gene with homology to Maize vp1. Its potential involvement in pre-harvest sprouting resistente. *Plant Mol Biol* (2001); **45**:631-640.

Chaumont F, Barrieu F, Wojcik E, Chrispeels MJ, Jung R. Aquaporins constitute a large and highly divergent protein family in maize<sup>1</sup>. *Plant Physiol* (2001). **125**:1206-1215.

Chrispeels MJ, Raihnel NV. Lectins, lectin genes, and their role in plant defense. *Plant Cell* (1991). **3** (1):1-9.

Drickamer K. Making a fitting choice: common aspects of sugar binding sites in plant and animal lectins. *Structure* (1997). **5**:465-478.

Egge H, Meter-Katalinic J, Paz-Parente J, Strecker G, Montreuil J, Fournet B. Carbohydrate structures of hen ovomucoid. A Mass spectrometry analysis. *FEBS Lett* (1983); **156**:357-362.

Esen A. Purification and partial characterization of maize (*Zea mays* L.)  $\beta$ -glucosidase. *Plant Physiol* (1992). **98**:174-182.

Feldwisch J, Vente A, Zettl R, Bako L, Campos N, Palme K. Characterization of two membrane-associated  $\beta$ -glucosidase from maize (*Zea mays* L.) coleoptiles. *Biochem J* (1994). **302**:15-21.

Gaut BS, Doebley JS. Evolution DNA sequence evidence for the segmental allotetraploid origin of Maize. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* (1997). **94**:6809-6814.

Hedrick JL, Smith AJ. Size and charge isomer separation and estimation of molecular weights of protein by disc gel electrophoresis. *Arch Biochem Biophys* (1968). **126**:155-164.

Hernández P, Bacilio M, Porrás F, Juárez S, Debray H, Zenteno E, Ortiz B. A comparative study on the purification of the *Amaranthus leucocarpus* syn. *hipocondriacus* lectin. *Prep Biochem Biotechnol* (1999). **29**:219-234.

Hill HD, Schwyzer M, Steinman HM, Hill RL. Ovine submaxillary mucin. Primary structure and peptide substrates of UDP-N-acetylgal-acetyllactosamine: mucin transferase. *J Biol Chem* (1977). **252**:3799-3804.

Hirano K, Teraoka T, Yamanaka H, Harashima A, Kunisaki A, Takahashi H, Hosokawa D. Novel mannose-binding rice lectin composed of some isolectins and its relation to a stress-inducible salt gene. *Plant Cell Physiol* (2000). **41**:258-267.

Illis HH. Homeotic sexual translocations and the origin of Maize (*Zea mays*, *Poacea*): A new look at an old problem. *Econ Bot* (2000). **54**:7-42.

Jancovic M, Cuperlovic M, Hadjukovis L. Salt-soluble lectins of corn grain, *Plant Physiol* (1990). **93**:1659-1662.

Klun JA, Titon CL, Brindley TA. 2-4 Dihydroxy-7-methoxy-1,4-benzoxazin-3-one (DIMBOA), an active agent in the resistance of maize to the European corn borer. *J Econ Entomol* (1967). **60**:1529-1533.

Kubanek J, Entlicher G, Kocourek J. Studies on lectins. LII Isolation and characterization of the lectin from rye germ (*Secale cereale* L.). *Acta Biol Med Ger* (1982). **41**:771-780.

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* (1970). **227**:680-685.

Lascrain R, Porrás F, Báez R, Chávez R, Martínez S, Alvarez G, Zenteno E. *Amaranthus leucocarpus* lectin recognizes human naive T cells subpopulations. *Immunol Invest* (1997). **23**:579-587.

Long BJ, Dunn GM, Rotley DG. Relationship of hydroxamic acid content in maize and resistance to northern corn leaf blight. *Crop Sci* (1975). **15**: 333-335.

Lukens L, Doebley J. Molecular evolution of the teosinte branched gene among maize and related grasses. *Mol Biol Evol* (2001). **33**:167-172.

Kruisbeek AM. Isolation of mouse mononuclear cells. In *Current Protocols in Immunology*, Edited by Coligan J.E, Kruisbeek A.M, Margulies D.H., Shevach E.M., Strober W. (1992). Vol. **1**:3.1.2-3.1.5

Maldonado G, Porras F, Fernández L, Vázquez L, Zenteno E. Effect of lectins on mouse peritoneal macrophage activity. *Immunological investigations* (1994). **23**:429-436.

Maldonado G, Gorocica P, Agundis C, Pérez A, Molina J, Zenteno E. Inhibition of phagocytic activity by the N-acetyl-D-galactosamine specific lectin from *Amaranthus leucocarpus*. *Glycoconjugate J* (1998). **15**:615-622.

Martínez Copca G. Estudio del efecto *in vitro* de la lectina de coleoptilo de maíz (*Zea mays*) para modular células mononucleadas del sistema inmune murino. Tesis de licenciatura Facultad de Química (1998).

Martínez M, Córdoba F. Isolation of fully active and stable corn coleoptile lectins. *Prep Biochem Biotechnol* (2000). **30**: 199-208.

Martínez M, Zenteno E, Córdoba F. Partial purification and characterization of teosinte coleoptile. *Lectins Biology, Biochemistry, Clinical Chemistry*; Bog-Hansen, T. C., van Driessche E., Franz H., Eds.;TEXTOP: Hellerup, Denmark (1993); Vol. **8** :132-136.

Martínez-Cruz M, Zenteno E, Córdoba F. Purification and characterization of a galactose-specific lectin from corn (*Zea mays*) coleoptile. *Biochim Biophys Acta* (2001). **1568**:37-44.

Martínez-Cruz M, Pérez-Campos E, Zenteno E, Córdoba F. Analisis of the lectins from Teosinte (*Zea diploperennis*) and Maize (*Zea mays*) coleoptiles. *J Agric Food Chem* (2003). **51**:3783-3789.

Matsudaira P. Sequence from picomole quantities of protein electroblotted onto polyvinylidene difluoride membranes. *J Biol Chem* (1973). **262**:10035-10038.

Matsuoka Y, Vigoroux Y, Goodman MM, Sánchez GJ, Buckler E, Doebley J. a single domestication for Maize shown by multilocus microsatellite genotyping. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* (2002). **99**:6080-6084.



McCarron RM, Goroff DK, Luhr JE, Murphy MA, Herscowitz HB. Methods for the collection of peritoneal and alveolar macrophages. *Methods in Enzymology*, (1984). **108**:274-297.

Mérida A, Vázquez L, Martínez M, Aquino T, Pérez-Campos E, Córdoba F. Dextran raffinose derivative assay for affinity purified corn coleoptile lectin. *Biosci Biotech Biochem* (1996). **60** (12):2064-2065.

Molina J, Landa A, Bautista G, Martínez M, Córdoba F. Molecular association of lectin and  $\beta$ -glucosidase in corn coleoptile. *Biochimica Biophysica Acta* (2004). **1674**:299-304.

Mosmann T. J. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Meth* (1983). **65**:55-63

Monsigny M, Roche AC, Sene C, Maget-Dana R, Delmotte F. Sugar-lectin interactions: how does wheat-germ agglutinin bind sialoglycoconjugates?. *Eur J Biochem* (1980). **104**:147-153.

Newburg DS, Concon JM. Lectins in wheat gluten proteins. *J Agric Food Chem* (1985). **33**:685-687.

Niemeyer HM. Hydroxamic acids (4-hydroxy-1,4-benzoxazin-3-one), defence chemicals in the gramineae. *Phytochemistry* (1988). **27**:3349-3358.

Niemeyer HM. Secondary plant chemical in aphid-host interaction, in: Peter DC, Webster JD, Choluber CJ (Eds.). *Aphid-Plant Interaction: Population to Molecules*, vol **101**, Oklahoma State University, Stillwater, OK, U.S.A. (1991).

Prodanov P, Atanasova N. An anti-B lectin from *Zea mays* everta. *Folia Haematol Int Mag Klin Morphol Blutforsch* (1984). **111**:84-85.

Rinderle SJ, Goldstein IJ, Matta KL, Ratcliffe RM. Isolation and characterization of amaranthin, a lectin present in the seeds of *Amaranthus caudatus*, that recognizes the T-(or cryptic T)-antigen. *J Biol Chem* (1989). **264**:16123-16131.

Rini M. Lectin structure. *Annu Rev Biomol Struct* (1995). **24**:551-557.

Roby JF, White BJ. *Biochemical Techniques: Theory and Practice*. Brooks/Cole Publishing company, Monterrey CA, U.S.A. (1987).

Rook GA, Steele J, Umar S, Dockrell HM. A simple method for the solubilisation of reduced NBT, and its use as a colorimetric assay for activation of human macrophages by  $\gamma$ -interferon. *J. Immunol Meth*, (1985). **82**:161-167.

Roque-Barreira MC, Campos-Neto A. Jacalin: an IgA-binding lectin. *J Immunol* (1985). **134**:1740-1743.

Sahi SV, Milton MD, Chilton WS. Corn metabolites affect growth and virulence of *Agrobacterium tumefaciens*. *Proc Natl Acad Sci* (1990). **87**:3879-3883.

Schauer R, Casals-Stenzel J, Corfield AP, Veh RW. Subcellular site of biosynthesis of O-acetylated sialic acids in bovine submandibular gland. *Glycoconjugate J*. (1988). **5**:257-270.

Schmid K, Binette JP, Dorland L, Vliegenthart JF, Fournet B, Montreuil J. The primary structure of the asialo-carbohydrate units of the first glycosylation site of human plasma  $\alpha$ 1-acid glycoprotein. *Biochim Biophys Acta* (1979). **581**:356-359.

Sharon N, Lis H. Legume lectins, a large family of homologous proteins. *FASEB J* (1990). **4**:3198-31208.

Sharon N, Lis H. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. *Glycobiology* (2004). **14**:11;53R-62R.

Slifkin M, Doyle RJ. Lectins and their application to clinical microbiology. *Clin Microbiol Rev* (1990). **3**:197-218.

Spik G, Coddeville B, Montreuil J. Comparative study of the primary structures of sero-lacto- and ovotransferrin glycans from different species. *Biochimie* (1988). **70**:1459-1469.

Spiro RG, Bhoyroo VD. Structure of the O-glycosidically linked carbohydrate units of fetuin. *J Biol Chem* (1974). **249**:704-711.

Tabary F, Balandreau J, Bourrillon R. Purification of the rice embryo lectin and its binding to nitrogenfixing bacteria from the rhizosphere of rice. *Biochem Biophys Res Commun* (1984). **119**:549-555.

Van Damme EJ, Peumans WJ, Barre A, Rouge P. Plant lectins: A composite of several distinct families of structurally and evolutionarily related proteins with diverse biological roles. *Crit Rev Biochem Mol Biol* (1998). **33**:209-258.

Weiss I, Drickramer K. Structural basis of the lectin-carbohydrate recognition. *Annu Rev Biochem* (1996). **65**:441-473.

Zenteno E, Vázquez L, Chávez R, Córdoba F, Wieruszkeski JM, Montreuil J, Debray H. Specificity of the isolectins from the plant cactus *Machaerocereus eruca* for oligosaccharides from porcine stomach mucin. *Glycoconjugate J* (1995). **12**:699-706.

## Molecular association of lectin and $\beta$ -glucosidase in corn coleoptile

Juan Molina<sup>a</sup>, Abraham Landa<sup>b</sup>, Gonzalo Bautista<sup>c</sup>, Margarito Martínez<sup>c</sup>, Félix Córdoba<sup>c,d,\*</sup>,<sup>1</sup>

<sup>a</sup>Departamentos de Farmacología, Facultad de Medicina UNAM, P.O. Box 70159, México D.F.

<sup>b</sup>Departamentos Microbiología, Facultad de Medicina UNAM, P.O. Box 70159, México D.F.

<sup>c</sup>Unidad de Bioquímica e Inmunología, Instituto Tecnológico de Oaxaca, Apartado postal 12, Admon. 4, Oaxaca. Oax., C.P. 68050, México

<sup>d</sup>Departamentos y Bioquímica, Facultad de Medicina UNAM, P.O. Box 70159, México D.F.

Received 15 March 2004; accepted 20 July 2004

Available online 12 August 2004

### Abstract

Corn coleoptile lectin is present with  $\beta$ -glucosidase (EC. 3.2.1.2.1) in a single tightly bound molecular association complex (88.7 kDa). SDS-PAGE of the molecular complex dissociates into two main components. Of these, at a concentration of 75%, the corn coleoptile  $\beta$ -glucosidase (60 kDa) is identified by enzymatic activity, with two 16-amino acid tryptic peptides displaying close homology with the primary structure of the enzyme. In separate experiments, we isolated homogenous monomeric enzyme of corn coleoptile. This allowed us to conclude that lectin properties like erythrocyte agglutination, found in the (88.7 kDa) molecular complex, is not due to the  $\beta$ -glucosidase bound in it. Another protein (30 kDa) dissociated from the same SDS-PAGE gels rendered several tryptic peptides, including a 20-amino acid sequence V(L)GP(Q)W(A)GGSGGSPVDITAEPQR closely homologous to the putative  $\beta$ -glucosidase aggregating factor (BGAF) precursor described recently. Tryptic peptide SAFTE(A)WN(V)ELK(V) was also present in the BGAF precursor. KFHEQR peptide was not present in BGAF precursor or any other protein sequence examined. Tryptic peptide TYGPFGA showed good homology with the BGAF precursor protein, FEGLYLFHTPLGSGAN peptide displayed identity with the BGAF precursor sequence. Thus, the 30 kDa protein does not appear to be identical to BGAF, but is rather a similar molecule which could be endowed with the lectin properties of the 88.7 kDa molecular complex. © 2004 Elsevier B.V. All rights reserved.

**Keywords:** Corn coleoptile lectin;  $\beta$ -Glucosidase;  $\beta$ -Glucosidase molecular association; Galactose lectin; *Zea mays*

### 1. Introduction

Several authors have already identified and studied lectin in corn coleoptile [1,2] and in corn grain [3,4]. A recent paper described studies done on purified lectin in which it was isolated by cold acetone precipitation followed by lactose-sepharose affinity chromatography. This work indicates that the purified lectin shows preferential affinity for galactose, either free or in glycoconjugates, as well as hemagglutination capacity to ABO human groups and red cells of various animals. In non-dissociating gel electrophoresis, the lectin is

present as a single broad band with a molecular mass of 88.7 kDa [5].

In this article, we present results that demonstrate that purified corn coleoptile lectin shows strong  $\beta$ -glucosidase activity in the same affinity chromatography samples displaying agglutination. When examined in SDS-PAGE with mercaptoethanol [6], purified lectin dissociates into two main bands [7]. We observed enzymatic activity and carried out sequence analysis of two amino acid peptides (18 amino acids each) displaying 100% homology with published enzyme sequences. The results show that the band with a molecular mass of 60 kDa is  $\beta$ -glucosidase [8–10], (EMBL/GenBank/DDBJ database accession number P49235). The second, more anodic band (30 kDa), produced tryptic peptides with useful sequences, several of them similar to the  $\beta$ -glucosidase aggregating factor (BGAF) precursor protein sequence, which was recently described [11,12].

\* Corresponding author. Tel.: +52 161 2123 5603; fax: +52 951 515 9856.

E-mail addresses: [martinezcu9@hotmail.com](mailto:martinezcu9@hotmail.com) (M. Martínez), [alvacor@cibnor.mx](mailto:alvacor@cibnor.mx) (F. Córdoba).

<sup>1</sup> Félix Córdoba is on sabbatical in the Biological Research Center (CIBNOR) in La Paz, B.C.S., México.

These results identify the lectin, described previously as purified corn coleoptile lectin [2,5], as a molecular complex containing  $\beta$ -glucosidase in close association with other proteins (peptides) that appear endowed with lectin properties. On the other hand, homogeneous monomeric  $\beta$ -glucosidase from corn coleoptile, isolated in separate experiments, showed no hemagglutinating activity.

This investigation places the lectin–enzyme complex in the field of corn physiology. Contrary to the lectin, the tightly associated  $\beta$ -glucosidase, controlled by gene ZM-p60.1 [13], is known to have a clear role in the liberation of active growth factors and various metabolites [14–16], and may also participate in defense mechanisms in corn [17,18]. It appears that the galactose specificity of the lectin and the glucoytic specificity of the enzyme, tightly bound in the same (88.7 kDa) molecular complex, are not fortuitous events.

## 2. Material and methods

Purified corn coleoptile lectin was prepared using 500 g wet/weight coleoptiles from Berentsen 58-302, certified by the Mexican Department of Agriculture (Secretaria de Agricultura de México). The corn germinated for 5 days in covered trays at 23 °C. As described before [5], the crude homogenate was acetone-precipitated in the cold (4 °C), dissolved in 70 ml 0.2 M citrate buffer at pH 6.4, and affinity-separated through a Sepharose 6B-lactose (Sigma Co., USA) 1.5×20-cm column inside a cold cabinet at 4 °C.

Tubes 5–15 (Fig. 1) were pooled (25 ml), dialyzed overnight against 50 mM sodium acetate pH 4.6, and the precipitate recovered by centrifugation at 7500×g and 4 °C. It was then washed three times with 6 ml each of 50 mM sodium acetate pH 4.6 solution before being dissolved in 3 ml of 0.2 M citrate pH 6.4 cold buffer. A second precipitation and set of washings rendered a preparation displaying two main bands only.

The affinity purified lectin was tested in 96 conic well plates for hemagglutination activity with human freshly obtained type O red cells. The titer was estimated using the last dilution that produced clear agglutination of 2% washed human red cells. In the same affinity-recovered samples,  $\beta$ -glucosidase activity was assayed using *p*-nitrophenyl  $\beta$ -glucopyranoside (Sigma) as substrate following the technique in Ref. [8]. One unit of enzyme activity was equal to 1  $\mu$ M of nitrophenol/hour at 23 °C room temperature.

SDS-PAGE [6] of the molecular complex (88.7 kDa) was stained with Coomassie blue and the bands present were analyzed by densitometry. A Helena Junior 24 (France) densitometer at 580 nm was used to obtain the relative concentration of the bands separated from the molecular complex.

Another sample of the molecular complex (88.7 kDa) was electrophoresed to PVDF membranes, according to the method described in Refs. [19,20]. The membrane was stained with Coomassie blue and the 60 kDa band was cut out and sent to HHMI Biopolymer Facility/W.M. Keck

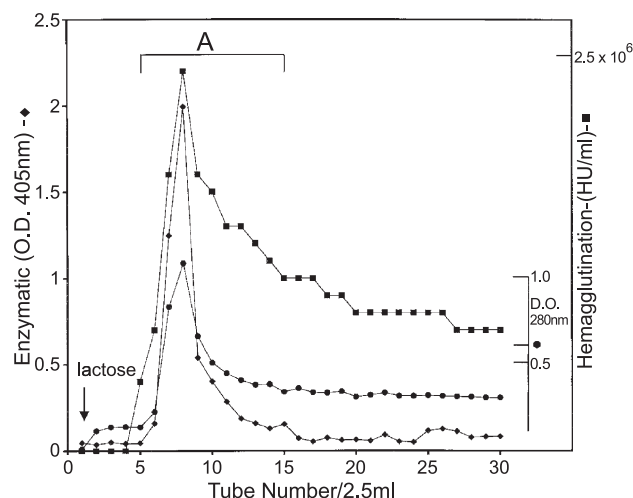


Fig. 1. Affinity purification of corn coleoptile lectin and  $\beta$ -glucosidase. Corn coleoptile extract after acetone precipitation was dissolved in 0.2 M citrate pH 6.4 buffer and poured onto a (2×20) Sepharose-lactosyl column. It was then washed exhaustively with the same buffer and eluted using 0.2 M lactose in the cold at 4 °C, as shown above. The fraction eluted in tubes 5–15 were pooled and dialyzed against 50 mM sodium acetate pH 4.6 overnight in the cold room. The precipitate was recovered by centrifugation at 4 °C and centrifuged at 7000 rpm, then dissolved in 3 ml citrate buffer pH 6.4 and tested for hemagglutination activity in the presence of 2% human erythrocytes type O in PBS.  $\beta$ -Glucosidase activity was tested using *p*-nitrophenyl  $\beta$ -D-glucopyranoside as substrate. Lactose (0.15 M) was used for elution as shown in the figure.

Biotechnology Research Laboratory at Yale University, New Haven, USA, for sequencing using Edman degradation chemistry. The amino-terminal and the Edman degradation were performed using the Applied Biosystems model 470A automated sequencer and manufacturer's procedures.

The proteins were then subjected to 26 cycles of N-terminal sequencing to obtain an internal amino-terminal sequencing. The 60 kDa protein from SDS-PAGE was digested with 1  $\mu$ g of trypsin for 6 h at 37 °C. The peptides produced by digestion were separated from HPLC and a peptide with a predicted mass of 1824 Da was used with the Edman degradation method to obtain the internal amino-terminal sequence.

The second band in the gel (30 kDa) was dissected and sequenced as described earlier. Tryptic peptide No. 25 displayed a short sequence showing no homology with known sequences. Peptide No. 68 consisted of a peptide mixture in small amounts that could not be used for sequencing. Peptide No. 96 displayed a 10-amino acid sequence and peptide No. 89 revealed a 20-amino acid sequence. Peptide No. 119 rendered a 7-amino acid peptide present in the BGAF precursor protein sequence, as well as a 16-amino acid sequence closely similar to the same BGAF precursor protein. These sequences were compared with published protein primary structures by means of protein databanks (GenBank AAFT1261).

In separate experiments, a homogeneous sample of corn coleoptile  $\beta$ -glucosidase was prepared according to the technique described in Ref. [8]. Briefly, the corn coleoptile extract prepared in 50 mM sodium acetate pH 4.6 was placed

in a small, 1 × 5 cm Bio-Rad (USA) cationic column, and the β-glucosidase was isolated using a 5.1–6.4 pH, 50 mM sodium acetate stepwise gradient. The preparation displayed β-glucosidase activity. It was then examined in SDS-PAGE electrophoresis for the presence of a single neat component with a molecular mass of 60 kDa, corresponding to the corn coleoptile homogenous monomeric β-glucosidase [8].

To determine if the molecular complex identified by affinity chromatography could be discerned in whole homogenates, avoiding the acetone precipitation, we set up a gel filtration column (2.5 × 60 cm) with Sepharose 6B and 1 M sodium chloride as the eluant. A sample of 5 ml of fresh corn coleoptile homogenate clarified by centrifugation was separated into 5.5 ml samples for agglutinin activity and enzymatic activity assays. Commercial (Sigma) proteins were employed for molecular weight standardization of the elution volume of the column [21]. The protein in the samples was estimated using the Coomassie blue binding test and bovine serum albumin as standards [22].

### 3. Results

Fig. 1 presents the results of the Sepharose-lactosyl affinity column (1.5 × 20 cm) of the acetone-precipitated sample of corn coleoptile extract. It is evident that the hemagglutination activity peak and the β-glucosidase activity peak eluted out at the same position: when approximately 200 ml of 0.15 M lactose buffer had passed through the column.

Results in 4%, 7.5%, 10% and 12% separate acrylamide gels (against proteins of known molecular mass as controls) revealed that a sample from the chromatography pool (tubes

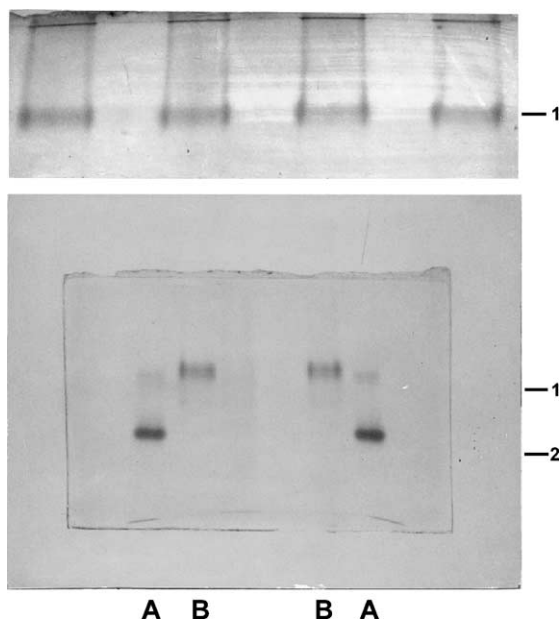


Fig. 2. Native-PAGE (pH 8.3) of the corn coleoptile lectins and β-glucosidase isolated in affinity chromatography as association complex. The complex is present as a single diffuse band of multiple identical samples. (1 and B) Molecular complex. (2 and A) Bovine serum albumin.

Table 1

Lectin and β-glucosidase activities in the molecular association complex		
	Hemagglutination (units/mg)	Enzymatic (units/mg)
Corn coleoptile molecular association complex (88 kDa)	45,000	160
Corn coleoptile homogenous β-glucosidase monomer	2	200

Hemagglutination specific activity and β-glucosidase specific activity of the molecular complex isolated and purified from Sepharose-lactosyl affinity chromatography (as shown in Fig. 1) compared with β-glucosidase activity exclusive in the (60 kDa) enzyme monomer, from separate experiments (Fig. 5).

5–15) in 0.2 M citrate buffer pH 6.4 displayed a single broad band with a molecular mass of 88.7 kDa. This was identical to the work using purified corn coleoptile lectin reported in previous publications [2,5] (Fig. 2). The pool sample revealed a protein content of 4.3 mg using a Coomassie blue binding test (Bradford). The hemagglutination activity was  $20 \times 10^6$  units, almost 75% of the hemagglutination activity of the whole preparation. The same sample displayed a β-glucosidase activity of 160 units/mg/protein (Table 1).

When the molecular complex precipitate was analyzed in SDS-PAGE by the Laemmli procedure [6], two main bands were consistently present in the Coomassie blue-stained gel. The estimated molecular mass values were 60 kDa for the more anionic band and 30 kDa for the second band (Fig. 3).

The blue-stained gel was examined in a densitometer and the relative band concentration obtained as shown in (Fig. 4). The first band (75%) was cut from the gel and tryptic digestion was used to obtain sequences from the complete 60 kDa protein and from a 1824 kDa polypeptide. The results were IGVQMLSPSEIPQRDWFP and LAGSYNMLGL-

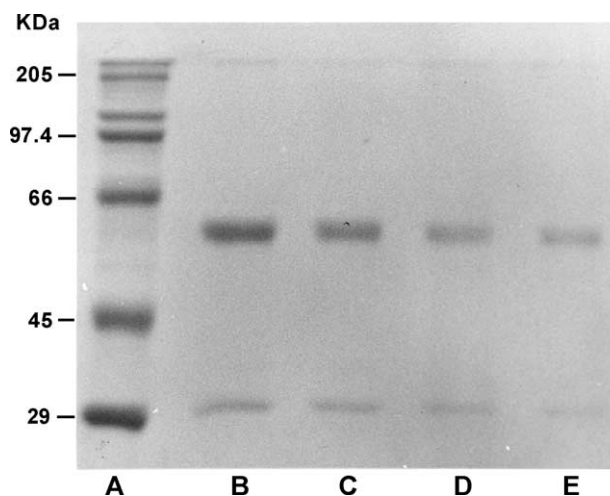


Fig. 3. SDS-PAGE of affinity-purified corn coleoptile lectin and β-glucosidase molecular complex. Two dissociated protein bands are present from the single protein in PAGE (Fig. 2) One of the 60 kDa bands corresponding to monomeric β-glucosidase and a 30 kDa protein from the hypothetical lectin. The molecular weight markers are: myosin (205 kDa), phosphorylase b (97.4 kDa), bovine serum albumin (66 kDa), oboalbumin (45 kDa) and anhydrase (29 kDa). (Line A) Molecular markers. (Lines B to E) Molecular complex concentrations: (B) 10 μg, (C) 5 μg, (D) 3 μg, (E) 2 μg.



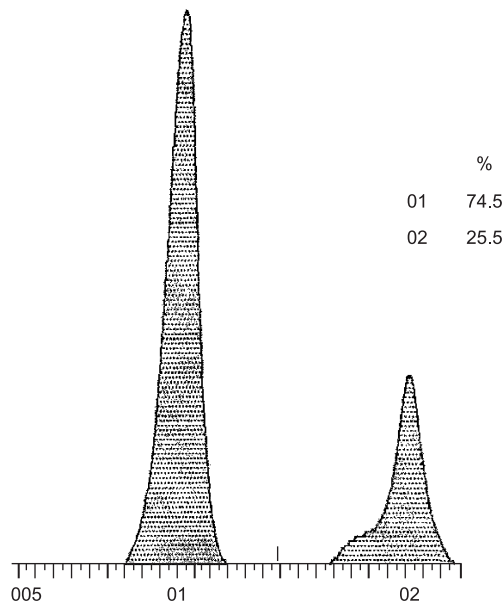


Fig. 4. Densitometric analysis of Coomassie blue stained SDS-PAGE protein bands, using a Helena Junior densitometer at 590 nm. The first protein band (60 kDa) comprised 75% of the sample, corresponds to corn coleoptile  $\beta$ -glucosidase (see Fig. 5). Protein band two appeared to be 25% of the total, which could be endowed with the lectin activity.

NYYTTSR, respectively (Table 2). A computer search in protein databases (EMBL/GenBank/DDBJ database, accession number P49235) showed that both N-terminal sequences matched perfectly with various glucosidases from *Zea mays*, including  $\beta$ -glucosidase chloroplast precursor [8,9].

The more anionic band (25%) was separated from the gel and processed like the first band. Several tryptic peptides

were obtained (Table 2). Peptide No. 96 gave a sequence SAFTE(A)WN(V)ELK(V) and peptide No. 89 a sequence V(L)GP(Q)W(A)GGSGGSPVDITAEPQR. The first sequence was compared with the signal peptide sequence, a sequence from a recently described primary structure of putative aggregating factor (BGAF) [12]. This structure binds  $\beta$ -glucosidase in corn coleoptile preparations from “null” varieties of corn described previously (Essen and Blanchard) [11]. The results showed 90% statistically non-significant homology (Yale Center).

The second sequence was homologous to sequence 161–180 of the same BGAF, including an 11-amino acid sequence also present in the primary structure of Jacalin, a plant  $\alpha$ -galactose specific lectin [23]. A third tryptic peptide from the same band (30 kDa) was sequenced as KFHEQR, but no homology was found in either  $\beta$ -glucosidase or in the BGAF precursor protein primary structure (Table 2). Two more sequences were obtained from tryptic peptides: TYGPFGA (peptide 119 A), homologous to BGAF mature protein, and FEGLYLFHTPLGFGAN (peptide 119 B), homologous to peptide signal, containing a third peptide not present in BGAF precursor protein (Table 2).

We then proceeded to test for lectin properties in corn coleoptile  $\beta$ -glucosidase (identified as part of the 88.7 kDa molecular complex). A homogeneous sample of corn coleoptile  $\beta$ -glucosidase was isolated in separate experiments, according to the technique described in Ref. [8]. The sample was very active (200 units/mg protein) against *p*-nitrophenyl  $\beta$ -glucopyranoside, and a single band of 60 kDa was obtained in SDS-PAGE (Fig. 5). The sample presented negligible agglutination using human type O erythrocytes (Table 1).

Table 2  
Molecular complex tryptic peptide sequences from SDS-PAGE (Fig. 3)

(Band1) (60 kDa)	a.a. sequences from tryptic peptides	Observations
Peptide 1	62 79 IGVQMLSPSEIPQRDWFP	100% homology corn $\beta$ -glucosidase ①
Peptide 2	375 390 LAGSYNMLGLNYTTSR	
(Band 2) 30 kDa	a.a. sequences from tryptic peptides	Observations
Peptide 25	KFHEQR	no-homology
Peptide 68	(no sequence)	peptide mixture (MALDI-TOF)
Peptide 89	160 180 V(L)GP(Q)W(A)GGSGGSPVDITAEPQR	95% homology with BGAF promoter ②
Peptide 96	10 19 SAFTEWNELK	90% homology with BGAF peptide signal ②
Peptide 119 (A)	258 264 TYGPFGA	100% homology with BGAF mature protein ② (sequence underlined)
Peptide 119 (B)	20 36 FEGLYLFHTPLGSGAN	81% homology with BGAF mature protein ②

①EMBL/GEN BANK/DDBJ, P49235

②GEN BANK.AAFT1261

Sequence composition of tryptic peptides from SDS-PAGE protein bands comprising the molecular complex. Protein band 1, peptides homologous with  $\beta$ -glucosidase primary structure. Peptides in band 2, postulated to correspond to a 30 kDa protein with lectin activity, associated with the enzyme in the original molecular complex.

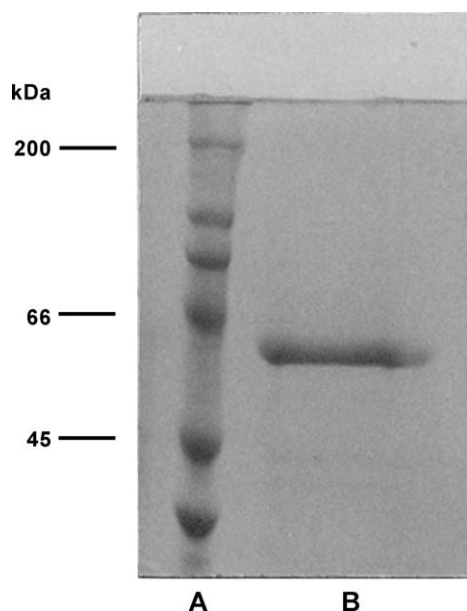


Fig. 5. SDS-PAGE of isolated and purified corn coleoptile β-glucosidase (60 kDa) monomer as a single protein band from separate experiment. Molecular weight markers are: myosin (200 kDa), bovine serum albumin (66 kDa), ovoalbumin (45 kDa). (A) Molecular markers. (B) Corn coleoptile β-glucosidase.

These results suggest that the lectin activity is not due to the 60 kDa enzyme firmly integrated in the molecular complex. Rather, it appears that the molecular complex lectin capacity resides in the 30 kDa protein disclosed in the dissociated gel, and/or is an inherent property of the whole molecular complex itself.

Finally, experiments using gel filtration chromatography of whole corn coleoptile homogenate in 1 M NaCl allowed us to demonstrate the presence of a single peak containing both agglutination and enzymatic activities. Extrapolation of the elution volume of the collected single peak against elution volumes of proteins with known molecular weights gave us a molecular weight value of 88 kDa, very similar to the value obtained for the molecular complex isolated by the usual affinity purification procedure (Fig. 1).

#### 4. Discussion

In this paper, we present results that confirm the isolation and purification of a corn coleoptile lectin described previously in this laboratory [2,5]. We also present results that demonstrate that the purified corn coleoptile lectin is actually an 88.7 kDa molecular association complex containing the 60 kDa β-glucosidase of corn coleoptile, as well as a 30 kDa protein apparently endowed with the hemagglutination capacity that the molecular complex exhibits. The molecular complex (88 kDa) was also evidenced in gel filtration experiments of whole corn coleoptile homogenates (Fig. 6).

These results suggest that the lectin–enzyme complex of high molecular weight is present and active in the growing corn coleoptile. This is probably due to the fact that β-glucosidase is an essential enzyme that, by means of splitting β-glucosyl linkages, releases various corn metabolites [14], hydroxamic acid [15], active agents that protect corn from European cork borer, such as 2:4 dihydroxy-7-methoxy-1–4 benzoxazin [16], secondary plant metabolites that protect it from aphid–plant interaction [17], as well as other defense chemicals, including a number of hydroxamic acids [18]. β-Glucosidase is also active in the release of novel phytohormones [24].

As we have shown in earlier publications, the purified corn coleoptile lectin (identified in this paper as the molecular complex) appears to be present not only in corn, but also in teosinte *Zea diploperennis*. This presence further underscores the importance of β-glucosidase for all species of the *Zea* genus [5].

As for the binding forces and the mechanism that produce such a strong association between a lectin and β-glucosidase in corn coleoptile, we can only speculate. At this time, we suspect that binding links and a mechanism similar to the ones postulated by Esen and Blanchard [11] for BGAF are present in this new case. When we consider the sequence similarities found between the 30 kDa protein and BGAF amino acid sequence, it is tempting to assume that a similar molecular organization mechanism is found in both molecular complexes. However, with BGAF, the determining difference resides in the activity of a lectin displaying clear galactose hemagglutination specificity in close molecular equilibrium with β-glucosidase, even in whole tissue homogenates that one can assume are close to a natural environment.

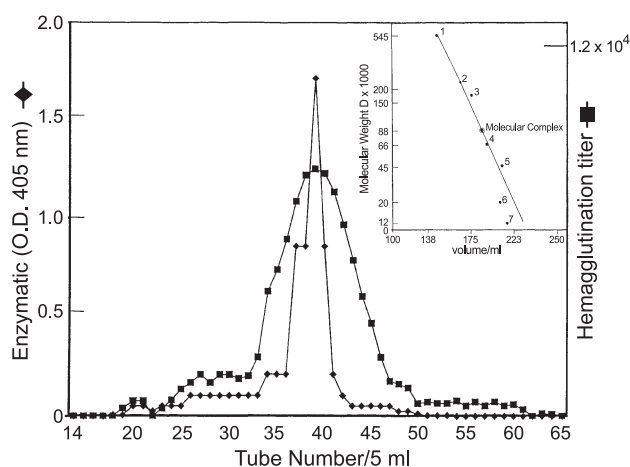


Fig. 6. Gel filtration experiment in a column (2.5×60 cm), with Sepharose 6 B developed with 1 M NaCl. 10 ml whole 0.1 M citrate sodium, pH 6.4 corn coleoptile homogenate was applied to the column and 5 ml fractions collected. Molecular weight markers. (Sigma): 1—Urease (545 kDa); 2—β-amylase (200 kDa); 3—γ-globulins rabbit (150 kDa); 4—serum albumin bovine (66 kDa); 5—ovoalbumin (45 kDa); 6—trypsin inhibitor (20 kDa); 7—cytochrome *c* (12.4 kDa). Inset: calibration curve indicating an 88.7 kDa molecular weight for the dual peak of the molecular complex.

Esen and Blanchard [11] attribute this protein a chaperone role in BGAF association, one that protects the enzyme from external proteolysis inside the plant cell. We cannot discount a similar role in the molecular association described here; their antigen–antibody model appears valid, too. In spite of this, a further role for the lectin in the 88.7 kDa corn coleoptile molecular complex remains to be disclosed, as the agglutination with galactose specificity found appears to be a significant finding.

Isolation experiments now underway will help resolve the issue of the existence of lectin activity in the molecular complex. A possibility is that the 30 kDa protein is active by itself. More likely, however, is that we will find that the high hemagglutination titers consistently present in the coleoptile preparations are the result of the supra-molecular organization of the complex described. In that case, a reciprocal chaperone effect would exist between the active proteins involved.

At the present time, the nature of the structural properties and binding forces that participate in the organization of the molecular complex is puzzling. It appears clear that the molecular enzyme–lectin complex is not due to an extraction-purification artifact, since it is present with the same molecular weight (88.7 kDa) and hemagglutination and enzyme activity in fresh crude coleoptile homogenates as in the complex isolated by affinity chromatography. Thus, despite being faced with a true molecular organization with a clear role in plant physiology and development, we cannot at this time advance any idea about the surface complement that reinforces and stabilizes the molecular complex itself.

The molecular complex with active  $\beta$ -glucosidase displays greater activity approximately 7 days after germination in vitro [5]. This suggests that the complex and the enzyme within it are important at that critical moment in corn development when the availability of corn promoters and defensive factors are most needed. It is perhaps for the same reason that a molecular form of enzyme bound to a galactose-specific lectin becomes the appropriate structure to perform this essential role in the tender, 7-day-old plantlet. Further experiments are in progress in this direction.

## Acknowledgments

We thank Dr. Eduardo Pérez Campos for densitometry and Jimena Córdoba for skillful technical assistance. We acknowledge the support from the UNAM (PAPIIT), Conacyt and SEP-COSNET, México.

## References

- [1] E.A. Lepekin, W.I. Ribak, Intraspecies heterogeneity of maize (*Zea mays* L.) lectin, Abstracts INTERLEC 10. Tenth International Lectins Conference, Charles University, Prague, Czechoslovakia, 1988, p. 74.
- [2] M.A. Martínez, E. Zenteno, F. Córdoba, Partial purification and characterization of corn coleoptile lectins, in: T.C. Bog-Hansen, E. van Driesche, H. Franz (Eds.), Lectins, Biology, Biochemistry, Clinical Chemistry, vol. 8, TEXTOP, Hellerup, Denmark, 1993, pp. 132–136.
- [3] P. Prodanov, N. Atanasova, An anti-B lectin from *Zea mays* everta, *Folia Haematol. Int. Mag. Klin. Blutforsch.* 111 (1984) 84–85.
- [4] M. Jankovic, M. Cuperlovic, L. Hajdukovic, Salt-soluble lectins of corn grain, *Plant Physiol.* 93 (1990) 1659–1662.
- [5] M. Martínez, E. Zenteno, F. Córdoba, Purification and characterization of a galactose-specific lectin from (*Zea mays*) coleoptile, *Biochim. Biophys. Acta* 1568 (2001) 37–44.
- [6] U.K. Laemmli, Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227 (1970) 680–685.
- [7] M. Martínez, E. Pérez-Campos, E. Zenteno, F. Córdoba, Analysis of the lectins from teosinte (*Zea diploperennis*) and maize (*Zea mays*) coleoptiles, *J. Agric. Food Chem.* 51 (2003) 3783–3789.
- [8] A. Esen, Purification and partial characterization of maize (*Zea mays* L.)  $\beta$ -glucosidase, *Plant Physiol.* 98 (1992) 174–182.
- [9] J. Feldwisch, A. Vente, R. Zettl, L. Bako, N. Campos, K. Palme, Characterization of two membrane-associated  $\beta$ -glucosidases from maize (*Zea mays* L.) coleoptiles, *J. Biochem.* 302 (1994) 15–21.
- [10] W.P. Nematollahi, S.J. Roux, A novel  $\beta$ -glucosidase from the cell wall of maize (*Zea mays* L.): rapid purification and partial characterization, *J. Plant Physiol.* 155 (1999) 462–469.
- [11] A. Esen, D.J. Blanchard, A specific  $\beta$ -glucosidase-aggregating factor is responsible for the  $\beta$ -glucosidase null phenotype in maize, *J. Plant Physiol.* 122 (2000) 563–572.
- [12] D.J. Blanchard, C. Muzzafer, CH. Jialum, A. Esen, Identification of  $\beta$ -glucosidase aggregating factor (BGAF) and mapping of BGAF binding regions on maize  $\beta$ -glucosidase, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 11895–11901.
- [13] P. Kristoffersen, B. Brzobohaty, I. Hohfeld, L. Bako, M. Melkonian, K. Palme, Development regulation of the maize Zm-p60.1 gene encoding a  $\beta$ -glucosidase located in plastids, *Planta* 210 (2000) 407–415.
- [14] S.V. Sahi, M.D. Milton, W.S. Chilton, Corn metabolites affect growth and virulence of *Agrobacterium tumefaciens*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87 (1990) 3879–3883.
- [15] B.J. Long, G.M. Dunn, D.G. Rotley, Relationship of hydroxamic acid content in maize and resistance to northern corn leaf blight, *Crop Sci.* 15 (1975) 333–335.
- [16] J.A. Klun, C.L. Titon, T.A. Brindley, 2,4-Dihydroxy-7-methoxy-1,4-benzoxazin-3-one (DIMBOA), an active agent in the resistance of maize to the European corn borer, *J. Econ. Entomol.* 60 (1967) 1529–1533.
- [17] H.M. Niemeyer, Secondary plant chemical in aphid–host interaction, in: D.C. Peter, J.D. Webster, C.J. Chlouber (Eds.), *Aphid–Plant Interaction: Population to Molecules*, vol. 101, Oklahoma State University, Stillwater, OK, p. 101.
- [18] H.M. Niemeyer, Hydroxamic acids (4-hydroxy-1,4-benzoxazin-3-ones), defence chemicals in the Gramineae, *Phytochemistry* 27 (1988) 3349–3358.
- [19] J.L. Hedrik, A.J. Smith, Size and charge isomer separation and estimation of molecular weights of proteins in disc electrophoresis, *Arch. Biochem. Biophys.* 126 (1968) 155–164.
- [20] P. Matsudaire, Sequence from picomole quantities of protein electroblotted onto polyvinylidene difluoride membranes, *J. Biol. Chem.* 262 (1973) 10035–10038.
- [21] J.F. Roby, B.J. White, *Biochemical Techniques: Theory and Practice*, Brooks/Cole Publishing Company, Monterey, CA, 1987.
- [22] M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principles of protein dye-binding, *Anal. Biochem.* 37 (1976) 157–223.
- [23] M.C. Roque-Barreira, A. Campos-Neto, Jacalin: an IgA-binding lectin, *J. Immunol.* 134 (1985) 1740–1743.
- [24] N. Campos, L. Bako, B. Brzobohaty, J. Feldwisch, R. Zettl, W. Boland, W. Palme, Identification and characterization of a novel phytohormone conjugate specific  $\beta$ -glucosidase activity from maize, in: A. Esen (Ed.), *Biochemistry and Molecular Biology Symp. Ser.*, vol. 533, American Chemical Society, Washington, 1993, pp. 204–212.