



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

CARACTERIZACIÓN DE LA MODIFICACIÓN
QUÍMICA DE TRIPTOFANOS EN LA SUPERFICIE DEL
ALERGENO HEVEÍNA

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO

P R E S E N T A:

ERNESTO LADRÓN DE GUEVARA REYES





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:

Presidente: Profa. Josefina Elizalde Torres

Secretario: Profa. Luz del Carmen Castellanos Román

Vocal: Profa. Adela Rodríguez Romero

1^{er} Suplente: Profa. Martha Patricia Coello Coutiño

2^o Suplente: Profa. Rosa Isela Del Villar Morales

Lugar donde se realizó la tesis:

Laboratorio Bioquímica 3 (BQ-3) en el Instituto de Química (IQ)
de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

Dra. Adela Rodríguez Romero

Asesora

Ernesto Ladrón de Guevara Reyes

Sustentante

Este trabajo se desarrolló en el Laboratorio Bioquímica 3 del Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) bajo la tutoría de la doctora Adela Rodríguez R. y con el gran apoyo y asesoría del Dr. Federico del Rio y la Dra. Isabel Chávez. Se contó con el apoyo de una beca de ayudante de investigador (SNI-III) del CONACYT. Con el gran apoyo y la amistad de **todos** los integrantes del departamento de bioquímica del IQ.... El teclador de este documento apoya la costumbre de agradecer a todos los químicos de la generación 2004 de la Facultad de Química de la UNAM.

Para Alina;

nire Ilargi



Quien quisiera ser caballero
y vender su vida cara
no sea ladrón de dinero
sino Ladrón de Guevara.

Francisco de Quevedo

Índice general

1. Introducción	1
1.1. Antígenos y anticuerpos	1
1.2. El dominio de heveína (Hev b 6.02)	2
1.3. Resonancia Magnética Nuclear de proteínas	5
1.3.1. Estructura tridimensional y topología general	5
1.3.1.1. RMN en dos dimensiones	6
1.3.1.2. Acoplamientos escalares	8
1.3.1.3. Interacciones a través del espacio	9
Objetivos	10
2. Procedimiento Experimental	11
2.1. Purificación del alergen heveína (Hev b 6.02)	11
2.2. Modificación química de los triptofanos del alergen	12
2.3. Experimentos de RMN	13
2.3.1. TOCSY (T ^O Tal C ^O rrrelated S ^P ectroscop ^Y)	13
2.3.2. NOESY (N ^O uclear O ^{VE} rhauser E ^F fect S ^P ectroscop ^Y)	13
2.3.3. Modificación química de los péptidos LysTrpLys y TrpGly	15
3. Resultados y Análisis	16
3.1. Purificación del alergen	16
3.2. Análisis de la modificación química	17
3.2.1. Modificación de TrpGly y LysTrpLys	17
3.2.2. Asignación de los sistemas de espín en el espectro TOCSY de la heveína nativa y modificada.	21
3.2.3. Asignación de señales NOESY secuenciales y de media y larga dis- tancia.	21
3.2.4. Asignación de los aminoácidos aromáticos	23
3.3. Comparaciones del dominio de heveína	25
Conclusiones	26

Apéndices	28
A. Conceptos básicos de RMN	29
B. Señales secuenciales	31
C. Secuencias proteicas con dominio de heveína	38
D. Análisis de TrpGly	40
Bibliografía	42

Índice de figuras

1.1. Esquema de un anticuerpo, la región hipervariable la representa el sitio de reconocimiento a antígenos.	2
1.2. Isopreno en sus isómeros cis y trans	3
1.3. Estructura química del polímero quitina	4
1.4. (A)Epítipo conformacional de heveína y configuración de puentes disulfuro. (B)Superficie potencial del epítipo. (C)Epítipos lineales de heveína, sitio de unión a carbohidratos y configuración de puentes disulfuro.	5
1.5. Desdoblamiento de los niveles energéticos debido al aumento en el campo magnético externo B_0 , la diferencia de energía E está en función de B_0	7
2.1. 2-(2'-Nitrofenilsulfonil)-3-metil-3-bromoindol	12
2.2. Interacciones interresiduos NOESY (azul) e interacciones interresiduo TOCSY (rojo). Para el péptido Val-Gly-Ser.	14
2.3. Conformaciones de la prolina.	15
3.1. (A)Diagrama de elución en columna de exclusión en gel Superdex 75.(B) Diagrama de elución en fase reversa C18 para heveína nativa(azul) y heveína modificada(naranja).	17
3.2. Espectro de absorción UV de las fracciones de la reacción.	18
3.3. Productos posibles para la reacción de BNPS-skatole y NBS-succinimida con triptofano [2, 8, 12, 15]	19
3.4. Espectro HSQC del dipéptido modificado.	20
3.5. Estructura química del indol	20
3.6. Variación del desplazamiento químico de los hidrógenos HN y H α de la cadena lateral para cada aminoácido. Las variaciones implican cambios en la estructura secundaria. NH _{nativa} - NH _{modificada} y H α _{nativa} - H α _{modificada}	22
3.7. En color naranja se muestran los aminoácidos modificados, en color azul los aminoácidos que muestran modificaciones en el desplazamiento químico.	23
3.8. Comparación de las señales aromáticas TOCSY de la heveína nativa(A) y modificada(B)	24
3.9. Esquema de comparación de los potenciales electrostáticos para A)Heveína nativa, B)Modificada triptofano 21, C)Modificada triptofano 23 y D)Modificada en triptofanos 21 y 23.	24

D.1. Numeración del indol	40
D.2. Espectro monodimensional de la mezcla del dipéptido con el dipéptido mo- dificado. Sección de las señales aromáticas de indol.	41
D.3. Espectro HSQC del dipéptido modificado.	41

Índice de tablas

1.1. Propiedades nucleares de los elementos presentes en biomoléculas.	7
3.1. Diferencia de las energías electrónicas calculadas mediante Hartree Fock 6-31+g(d).	20
C.1. Secuencias con dominio de heveína	38

Capítulo 1

Introducción

1.1. Antígenos y anticuerpos

Los antígenos son sustancias que causan una respuesta inmunitaria en un organismo genéticamente predispuesto a la inmunosensibilidad. Por otra parte, los alérgenos son antígenos que causan una respuesta llamada alergia o hipersensibilidad tipo I, que es causada por algunas proteínas presentes en el polen, caspa de animales, polvo, venenos de insectos, etc., así como por haptenos (moléculas orgánicas pequeñas).

En la hipersensibilidad del tipo I las Inmunoglobulinas del tipo E (IgE) son los anticuerpos específicos del reconocimiento, que están unidos a la membrana de células sanguíneas como los basófilos y mastocitos. Las inmunoglobulinas son glicoproteínas que se componen por una dominio constante (C) y un dominio variable (V), este último presenta hipervariabilidad, lo cual permite reconocer a infinidad de sustancias o moléculas extrañas a través de regiones de alta complementariedad (CDR). El dominio variable es altamente selectivo y está unido a una cadena que tiene muy poca variabilidad y tiene interacción con las células del sistema inmune (F_C). [Fig. 1.1].

En su mayoría los alérgenos que causan hipersensibilidad de tipo I son moléculas proteicas, que pueden estar glicosiladas y ser reconocidas por el dominio variable (V_L y/o V_H) de las IgE. Éstas cambian su estado conformacional y producen una señal hacia un receptor de alta afinidad en la superficie de los basófilos y/o mastocitos. El reconocimiento da lugar a la degranulación y a la liberación de histamina, heparina, citocinas, proteasas, leucotrienos ge-

nerando reacciones en cadena hasta llegar a una hinchazón grave (urticaria) o hasta anafilaxis.

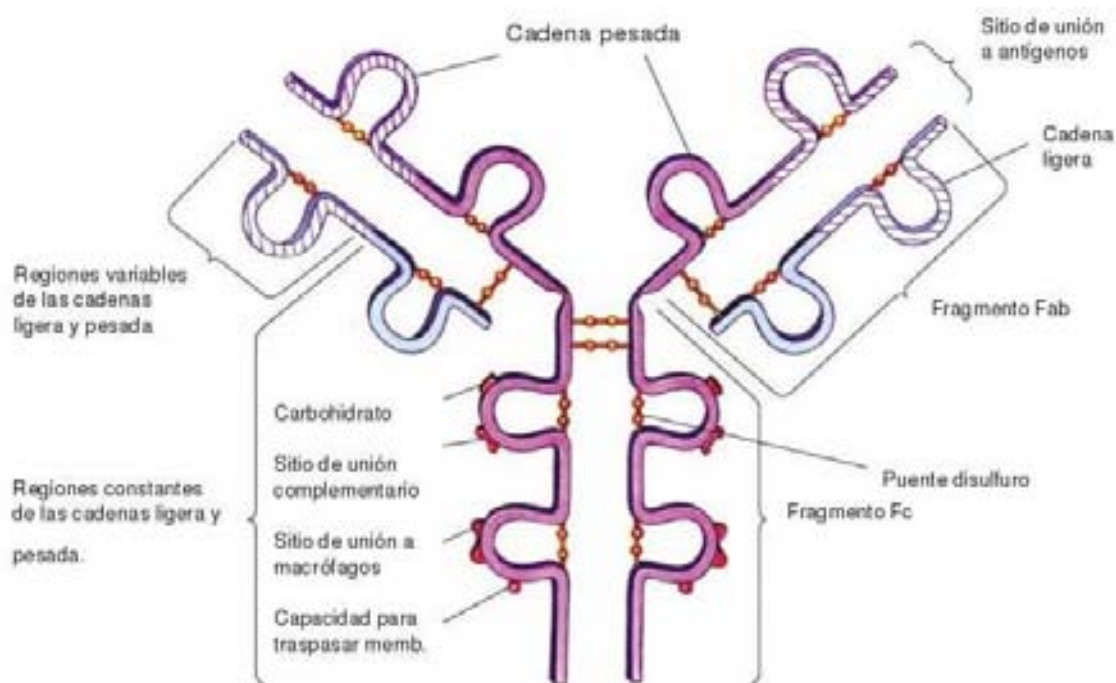


Figura 1.1: Esquema de un anticuerpo, la región hipervariable la representa el sitio de reconocimiento a antígenos.

1.2. El dominio de heveína (Hev b 6.02)

La heveína es un alérgeno que está constituido por una cadena peptídica de cuarenta y tres aminoácidos y se ha descrito que es la proteína mayoritaria en el látex del árbol de hule (*Hevea brasiliensis*). El látex es el citosol de las células laticíferas de este árbol y es una suspensión constituida por una gran cantidad de agua, por el cis-1,4-poliisopreno [Fig. 1.2] y además tiene alrededor de 200 proteínas. El cis-1,4-poliisopreno le confiere propiedades mecánicas muy importantes a este material, por lo que sus polímeros son de gran trascendencia para diversos usos cotidianos e industriales ya que presentan alta elasticidad y resistencia.

Los alérgenos de *H. brasiliensis* han sido clasificados por el subcomité de nomenclatura de alérgenos de acuerdo a cuando fueron descubiertos. A la fecha han sido descubiertos trece

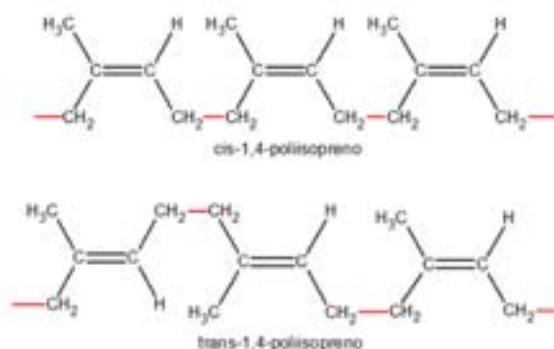


Figura 1.2: Isopreno en sus isómeros cis y trans

alergenos y sus respectivas isoformas (proteínas que tiene variaciones en uno o dos aminoácidos y cambian sus propiedades fisicoquímicas). La heveína tiene la denominación Hev b 6.02 (esta clasificación se basa en las primeras tres letras del género, la primera de la especie y el número consecutivo de registro).

El Hev b 6.02 fue descubierto en 1969 por Archer[6], tiene una masa molecular de 4727 Da, un pI de 4.7 y está constituido por una gran cantidad de glicinas y ocho cisteínas que forman cuatro puentes disulfuro los que le confieren una gran estabilidad (Fig. 1.4).

La heveína es una lectina, que se une a carbohidratos constituidos por oligómeros de N-acetilglucosamina (quitina, Fig. 1.3) con enlace glicosídicos β (1 $\rightarrow$ 4). El procedimiento de reconocimiento de azúcares por parte de las lectinas tiene una gran importancia, ya que este tipo de interacciones están presentes en procesos tales como las respuestas inmunes e inflamatorias, la organogénesis, la metástasis, y diversos procesos infecciosos, tanto patogénicos como simbióticos[4].

Las lectinas no tienen actividad enzimática y en muchos casos están glicosiladas, y se pueden encontrar tanto en el mundo animal, como en el vegetal, así como en los microorganismos. En general, algunas lectinas incluyen un motivo estructural de alrededor de 40 aminoácidos, con una estructura plegada que presenta 3 ó 4 puentes disulfuro, denominado *dominio de heveína*[10]. Se ha demostrado que la heveína y otras proteínas homólogas, presentes en plantas, son moléculas de defensa frente a organismos que producen quitina tales como hongos, bac-

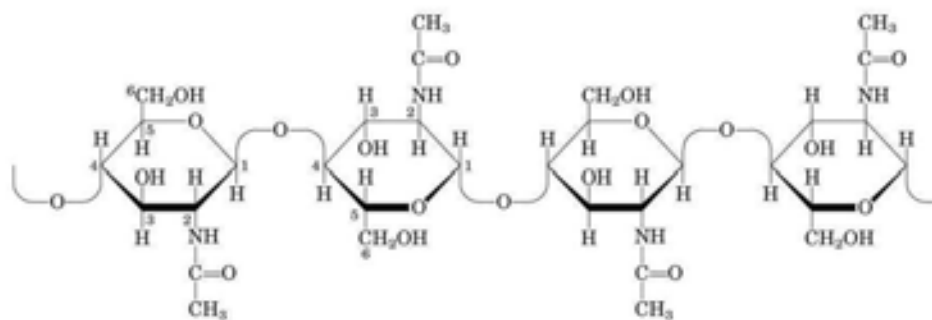


Figura 1.3: Estructura química del polímero quitina

terias e insectos. Además a estos dominios se les ha relacionado con la alergia al látex y con un padecimiento denominado síndrome de reactividad cruzada látex-frutas-polen-veneno.

Los dominios de heveína pueden encontrarse solos o formando cadenas polipeptídicas de varios dominios como en la lectina de la ortiga AUD (Aglutinina *Urtica dioica*) y la AGT (Aglutinina del germen de trigo), que muestran dos y cuatro dominios de heveína, respectivamente [14]. La AGT fue la primer lectina estudiada y su estructura de rayos X, así como su interacción con carbohidratos mediante RMN [13].

Se ha reportado mediante RMN el sitio de unión a carbohidratos de la heveína que involucra los siguientes residuos: SER19-TRP21-TRP23-TYR30 [Fig. 1.4][9]. Nuestro grupo de trabajo está interesado en el estudio de la heveína como un alérgeno, y recientemente hemos propuesto que el sitio de reconocimiento a azúcares forma parte de un determinante antigénico que comparte el mismo sitio de unión [1]. En un trabajo previo se propuso que los aminoácidos que podrían estar involucrados en el epítopo⁽¹⁾ y ser reconocidos por las IgE, son los aromáticos que están expuestos al disolvente.

En trabajos anteriores del grupo se realizó una modificación química usando BNPS-skatole y se cristalizó la proteína modificada; sin embargo, el cristal difractó pobremente, por lo que se decidió analizar el tipo de modificación realizada a través de RMN bidimensional (¹H¹H TOCSY Y NOESY).

¹Una región localizada en la superficie de un antígeno que es capaz de generar una respuesta inmune y de combinar con un anticuerpo específico.

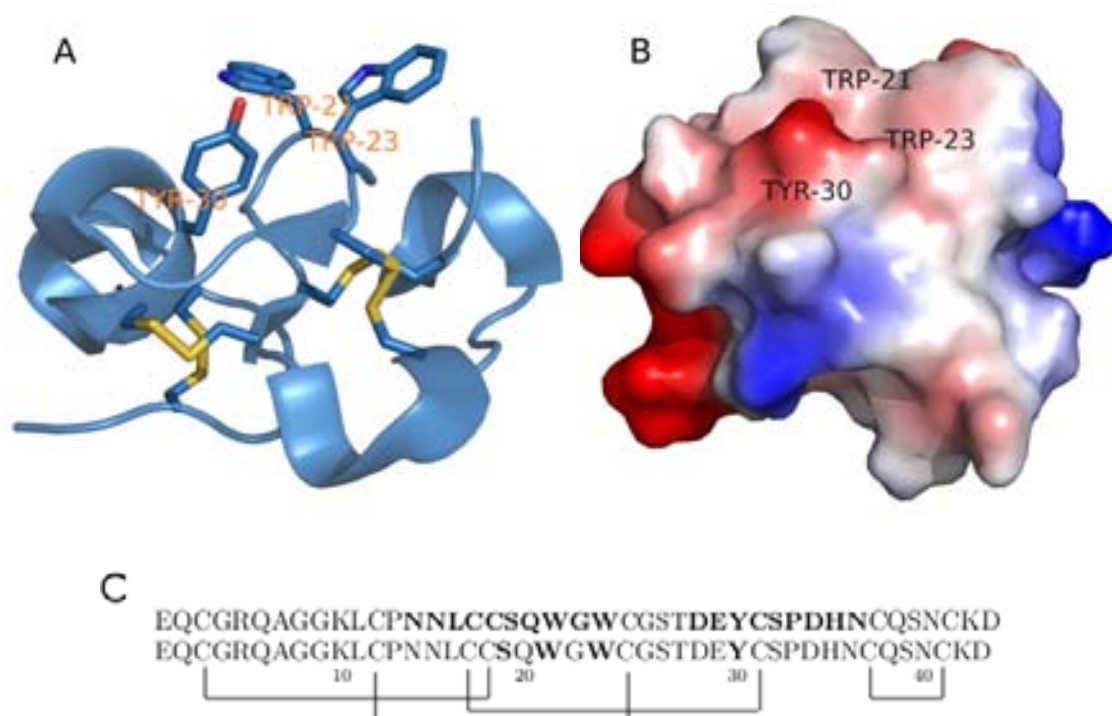


Figura 1.4: (A) Epítipo conformacional de heveína y configuración de puentes disulfuro. (B) Superficie potencial del epítipo. (C) Epítipos lineales de heveína, sitio de unión a carbohidratos y configuración de puentes disulfuro.

Se realizaron pruebas *in vitro* Elisa, Western Blot, Prick, Ab murinos (anticuerpos), etc. las cuales resultaron positivas y se demostró que la heveína modificada disminuye su interacción con anticuerpos IgG e IgE hasta en un 80 %.

El tamaño de esta proteína es ideal para una buena asignación de señales, ya que al poseer únicamente 43 aminoácidos no existirán muchos traslapes de señales y no es necesario enriquecerla con isótopos activos ^{13}C y ^{15}N .

1.3. Resonancia Magnética Nuclear de proteínas

1.3.1. Estructura tridimensional y topología general

La estructura tridimensional y la topología general de una cadena polipeptídica puede ser obtenida por RMN. Tiene la ventaja sobre la cristalografía de rayos X de que se puede tener

a la molécula en disolución. El espectro de RMN es generado colocando la muestra en un campo magnético y aplicando pulsos de radio frecuencia, los cuales perturban la magnetización nuclear generada por los momentos angulares de espín diferentes de cero. Las señales producidas son llamadas FID, por las siglas en ingles (Free Induction Decay) las cuales son captadas por bobinas. La transformada de Fourier de estas señales transitorias produce una función en una dimensión donde se observan todos los núcleos de un tipo a diferentes frecuencias, o desplazamientos químicos.

El átomo ^1H es el único que está presente normalmente en las proteínas, pero átomos como ^{13}C y ^{15}N pueden ser incorporados durante la biosíntesis de la proteína. Todos los ^1H de la proteína pueden ser observados excepto los hidrógenos lábiles como $-\text{NH}-$, $-\text{NH}_2$, $-\text{OH}$ y $-\text{SH}$.

1.3.1.1. RMN en dos dimensiones

El fenómeno de resonancia nuclear es el resultado de las manifestaciones del momento nuclear de espín del núcleo(I). Este confiere propiedades magnéticas a los núcleos y los hace sensibles a los campos magnéticos.

$$I_z = \hbar m \quad (1.1)$$

$$m = I, I - 1, \dots, -I. \quad (1.2)$$

donde I_z es una cantidad vectorial y tiene $2I + 1$ valores permitidos, $\hbar$ es la constante de Plank y m es el valor permitido, que genera la magnitud del momento angular de espín (S).

$$S = \hbar \sqrt{I(I + 1)} \quad (1.3)$$

El espín nuclear es una propiedad que presentan las partículas subatómicas, que puede tener valores positivos, entero o fraccionario. En el estudio de los biopolímeros hay varios núcleos que tienen isótopos activos en resonancia. [Tabla. 1.1]

La magnitud del momento angular de espín S está asociado con un momento magnético μ , y ambas cantidades son directamente proporcionales.

$$\mu = \gamma S \quad (1.4)$$

Tabla 1.1: Propiedades nucleares de los elementos presentes en biomoléculas.

Isótopo ($I = \frac{1}{2}$)	γ $10^{-7}(\text{radT}^{-1}\text{s}^{-1})$	ν 11.74 T (MHz)	Abundancia %	Sens. Rel.	Sens. Abs.
^1H	26.75	500.0	99.98	1.0	1.0
^{13}C	6.73	125.7	1.11	1.6×10^{-2}	1.8×10^{-4}
^{15}N	-2.71	50.7	0.37	1.0×10^{-3}	3.8×10^{-6}
^{31}P	10.83	202.4	100	6.6×10^{-2}	6.6×10^{-2}

Sensibilidad relativa en un campo constante, para un número equivalente de núcleos. La sensibilidad absoluta es el producto de la sensibilidad relativa por la abundancia natural[5].

La constante giromagnética γ tiene un valor para cada núcleo, y la sensibilidad de detección depende de ésta. Si sustituimos 1.2 en 1.3 obtenemos:

$$\mu = \hbar\gamma\sqrt{I(I+1)} \quad (1.5)$$

En un experimento de RMN la muestra se pone en presencia de un campo magnético B_0 durante algunos segundos. Existen $2I + 1$ valores de m , por lo tanto el mismo número de orientaciones para S_z . Entonces cuando el valor de I es $\frac{1}{2}$ existen dos orientaciones $m = \frac{1}{2}$ y $m = -\frac{1}{2}$

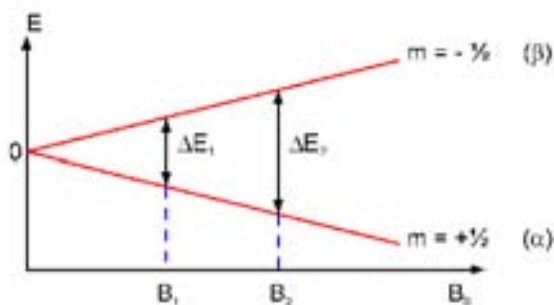


Figura 1.5: Desdoblamiento de los niveles energéticos debido al aumento en el campo magnético externo B_0 , la diferencia de energía E está en función de B_0 .

Durante el experimento se necesita que los niveles energéticos estén lo más separado posible y esto depende del campo aplicado. Esta diferencia energética es algo difícil de alcanzar por lo que la RMN es una técnica que necesita grandes cantidades de muestra, ya que la diferencia poblacional es muy pequeña y es la responsable de la sensibilidad. Para determinar

la población de espines en un estado a favor del campo se utiliza la ecuación de Boltzmann que se define a continuación.

$$\frac{N_\beta}{N_\alpha} = e^{\frac{-\Delta E}{k_B T}} \quad (1.6)$$

Donde N_α es la población de espines en el estado de menor energía ($m = \frac{1}{2}$) y N_β es la población con los espines restantes de mayor energía ($m = -\frac{1}{2}$), k_B es la constante de Boltzmann, T la temperatura absoluta y ΔE la diferencia de energía. Si combinamos la ecuaciones 1.2 y 1.5

$$m = \sqrt{I(I+1)} \quad (1.7)$$

por lo que la ecuación 1.4 es:

$$\mu = \hbar \gamma m \quad (1.8)$$

Ya que la energía de un dipolo magnético (espín polarizado) depende del campo magnético:

$$E = -\mu B_0 \quad (1.9)$$

Así la energía de los estados polarizados se expresa como:

$$E = -m \gamma B_0 \hbar \quad (1.10)$$

Entonces, la diferencia de energía entre dos niveles consecutivos se define como:

$$\Delta E = \gamma B_0 \hbar \quad (1.11)$$

1.3.1.2. Acoplamientos escalares

Además de los desplazamientos químicos[Apéndice A], un espectro de RMN contiene información acerca de las interacciones magnéticas entre núcleos (llamadas acoplamientos espín-espín). Los acoplamientos causan que algunas señales se desdoblén en multipletes con intensidades relativas y distancias específicas; es decir, las distancias entre adquisiciones de una señal múltiple son frecuencias, ya que están medidas en Hertz.

1.3.1.3. Interacciones a través del espacio

Para la identificación de núcleos cercanos en el espacio (no necesariamente unidos a través de un enlace covalente) se buscan las interacciones dipolares internucleares.

Cuando todos los núcleos observables en RMN de una molécula problema son sometidos al campo magnético éstos son polarizados, y al terminar el pulso, se genera una relajación en donde los núcleos buscan regresar al equilibrio. La probabilidad de emitir la energía absorbida es despreciable, por lo que los núcleos se relajan mediante vibraciones. Si su vibración es sobre un núcleo colocado a una distancia de 1.2 Å; por ejemplo al hablar de un enlace H-C, se podría decir que es una relajación escalar. En este último ejemplo la magnetización es aplicada sobre el hidrógeno, si el carbono fuera activo en resonancia ^{13}C se vería con mayor intensidad por esta relajación. Sin embargo, si la relajación es a una distancia menor a 5 Å con otro núcleo de hidrógeno por ejemplo, esta magnetización sería medida a través del espacio como una 'correlación NOESY'.

Objetivos

- Caracterizar la modificación química con BNPS-skatole de los triptofanos presentes en la superficie del alérgeno heveína.

Objetivos particulares

- Realizar la modificación química de la heveína nativa pura.
- Recopilar los espectros de RMN de la heveína nativa y la heveína modificada puras.
- Asignar las señales de los desplazamientos químicos de heveína y heveína modificada.
- Realizar la modificación química de dos péptidos modelo, TrpGly y LysTrpLys para simular la oxidación en la superficie de la heveína.

Capítulo 2

Procedimiento Experimental

2.1. Purificación del alérgeno heveína (Hev b 6.02)

La proteína fue purificada a partir del sedimento de látex ultracentrifugado de *Hevea brasiliensis*, el cual contiene a los lutoles (vacuolas). Para realizar la extracción de las proteínas a partir de los lutoles se utilizó un amortiguador de Tris·HCl al 50mM y NaCl 200mM a pH 8.2. Se pesaron 20 gramos de sedimento de látex de la clona GV-42, se homogeneizaron a 4 °C con un homogeneizador POLITRON PT-MR2100 agregando la mínima cantidad de disolución amortiguadora. El extracto se centrifugó a 40000 rpm y se midió el volumen del extracto para realizar una precipitación fraccionada con sulfato de amonio. Primero se llevó al 65 % de saturación para separar las proteínas de mayor tamaño y después al 100 %. Se dejó 16 horas en disolución saturada y después se centrifugó y el precipitado se resuspendió en Tris·HCl 50 mM pH 8.2. En esta última fracción se encuentran la heveína y sus isoformas tales como Hev b 6.0202 y pseudoheveína. Esta fracción fue dializada contra el mismo amortiguador a 4°C durante una noche con una membrana de corte de 3500 Da, con lo cual se logra solubilizar a las proteínas y eliminar el alto contenido de sulfato de amonio.

Este extracto se aplicó a una columna de Superdex 75 en un equipo de FPLC (Amersham Pharmacia Biotech). En esta columna se obtiene una fracción conteniendo a la heveína (95 %), que es la proteína mayoritaria y varias isoformas (5 %).

Esta fracción se aplicó a una columna C18 de fase reversa en un cromatógrafo de líquidos de alta eficiencia (HPLC) Agilent-HP 1100 con las fases móviles agua y acetonitrilo ambas

fases con ácido trifluoroacético al 0.1 %. Las fracciones obtenidas de la cromatografía fueron concentradas mediante liofilización.

La fracción conteniendo a la heveína fue recirculada para aumentar su pureza, ya que tiene una isoforma muy similar con tan solo un aminoácido diferente en la posición 15 (ASN15ASP), por lo que sus propiedades polares son muy parecidas y su retención en la columna C18 está en el intervalo entre 19 y 20 % de acetonitrilo. La heveína pura se almacenó a 4°C.

2.2. Modificación química de los triptofanos del alergen

La heveína pura fue modificada mediante una reacción de oxidación con BNPS-skatole (2-(2'-Nitrofenilsulfonil)-3-metil-3-bromoindol)[fig. 2.1] para estudios en Resonancia Magnética Nuclear de dos dimensiones. Este oxidante es selectivo para los residuos aromáticos, ya que se buscaba la modificación en los triptofanos 21 y 23, para demostrar su presencia en un epítipo conformacional en la superficie de este alergen.

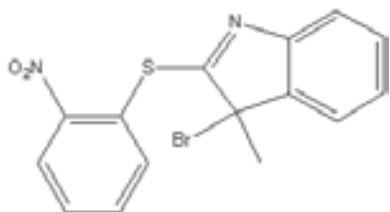


Figura 2.1: 2-(2'-Nitrofenilsulfonil)-3-metil-3-bromoindol

En exceso este reactivo puede afectar tanto las tirosinas como romper el enlace peptídico en el carboxilo de los triptofanos. En trabajos anteriores del grupo se obtuvieron las condiciones en la que la estructura primaria y secundaria no fueran afectadas. La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente en una proporción molar 7:1

(BPNS-skatole:Proteína) en 60 % de ácido acético glacial durante quince minutos. La reacción inmediatamente se suspende separando la proteína del oxidante mediante una columna de exclusión molecular Sephadex G25 (1.09m x 0.01m) con un flujo de 16 mL/hr y eluyendo con ácido acético 0.05M. Las fracciones obtenidas fueron dializadas contra agua y concentradas con membrana de corte molecular AMICON de 3500 Da, purificadas por HPLC en la columna de fase reversa y concentradas a sequedad mediante liofilización. El alergen he-

veína fue cuantificado mediante absorbancia a 280 nm usando un coeficiente de extinción de esta proteína $\epsilon_{280}^{1\%} = 2.56 \text{ mLmg}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

2.3. Experimentos de RMN

Los experimentos de RMN se hicieron en un amortiguador pH 5.6 H₂O/D₂O (9:1) en un equipo Varian Unity Plus 500, donde se obtuvieron los espectros TOCSY y NOESY, para la heveína nativa y la heveína modificada químicamente.

Para obtener los espectros se procesaron los FID(Free Induction Decay) con el programa NMRDraw, que es la interfase gráfica(GUI) del sistema de procesamiento de espectros multidimensionales NMRPipe.

2.3.1. TOCSY (TOtal Correlated SpectroscopY)

En el espectro TOCSY se pueden observar acoplamientos escalares a larga distancia, acoplamientos a través de los enlaces covalentes.

La secuencia de pulsos es: $d_1 - \frac{\pi}{2} - t_1 - \text{spin lock} - t_2$.

El pulso $\frac{\pi}{2}$ genera magnetización en el plano (x,y) que evoluciona libremente en el periodo t_1 bajo la influencia de los propios desplazamientos químicos y acoplamientos escalares. En este paso la magnetización se “confina” en el plano (x,y) por medio de una sucesión de pulsos. Esto último se realiza con el proceso *spin lock* mediante un pulso largo. En estas condiciones de acoplamiento fuerte los núcleos pierden su frecuencia original de resonancia, se hace una transferencia de coherencia (transferencia de magnetización) entre los núcleos que pertenecen al mismo sistema de espín. Mientras más largo sea el pulso(tiempo de mezclado), mayor será la intensidad de las señales y se puede llegar a medir acoplamientos hasta a 5 ó 6 enlaces de distancia.

2.3.2. NOESY (Nuclear Overhauser Effect SpectroscopY)

El experimento NOESY es la principal herramienta para el análisis conformacional de la proteína. El NOESY puede dar información sobre proximidad en los núcleos y orientación,

siempre y cuando estén a menos de 5 Å (Fig. 2.2).

La secuencia de pulsos es: $d_1 - \frac{\pi}{2} - t_1 - \frac{\pi}{2} - \tau_m - \frac{\pi}{2} - t_2$.

La intensidad de la correlación NOE es proporcional a $\frac{1}{r^6}$ ⁽²⁾ y por lo tanto es una relación directa para el cálculo de interacciones mediante mecánica molecular, generando una gran cantidad de restricciones. El efecto NOE es generado durante el tiempo de mezclado τ_m . Dependiendo de su tamaño, en proteínas resulta conveniente registrar varios NOESY de 50ms a 300ms. A tiempos mayores resulta el fenómeno de difusión de espín, que permite la transferencia de magnetización entre dos espines, aunque se encuentren alejados. Por esto último aparecen picos de cruce entre protones relativamente alejados, además de que las señales correspondientes a núcleos intrarresiduo se incrementan como en el TOCSY por el aumento en el tiempo de mezclado.

En este trabajo se establecieron estrategias de asignación de las señales de RMN pertenecientes a los aminoácidos, principalmente a las correlaciones de la cadena lateral con el protón unido al nitrógeno del enlace peptídico (sistemas de espín), seguidas de las asignaciones de los aminoácidos contiguos en la secuencia de la proteína (asignación secuencial)[5]. La co-

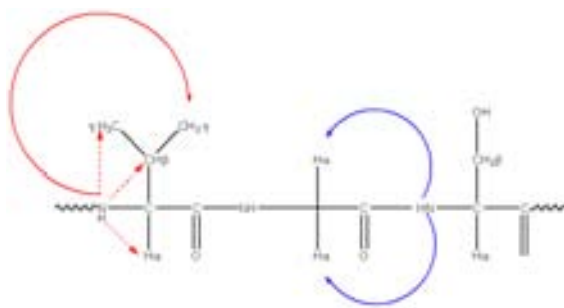


Figura 2.2: Interacciones interresiduos NOESY (azul) e interacciones interresiduo TOCSY (rojo). Para el péptido Val-Gly-Ser.

nectividad secuencial es interrumpida por el aminoácido prolina ya que este carece del protón amídico; sin embargo, cuando la prolina adopta una conformación trans, el aminoácido superior en la secuencia ($i+1$) observa a los hidrógenos δ de la prolina (i) (fig. 2.3)

²La expresión r^6 representa la sexta potencia de la distancia entre dos átomos, y a esto se refiere una interacción de larga distancia del tipo dipolar

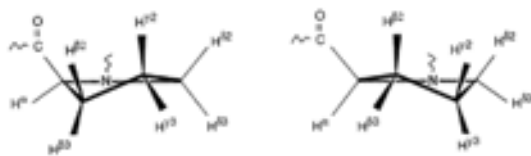


Figura 2.3: Conformaciones de la prolina.

2.3.3. Modificación química de los péptidos LysTrpLys y TrpGly

La modificación se realizó en ácido acético glacial durante 15 minutos, después se agregó un amortiguador de fosfatos pH 7 para mantener al producto oxidado en la fase acuosa y precipitar al oxidante, y se realizó una extracción con CHCl_3 donde tanto el reactivo que no reaccionó debe disolverse, así como el oxidante que no precipitó. El procedimiento anterior fue aplicado a ambos péptidos. La fase acuosa fue concentrada mediante liofilización y fue purificada por fase reversa C18. Se realizaron experimentos de RMN monodimensional (^1H) y bidimensionales ($^1\text{H}^1\text{H}$, $^{13}\text{C}^1\text{H}$).

Capítulo 3

Resultados y Análisis

En este trabajo se obtuvo una molécula de heveína modificada mediante métodos químicos, que alteraron el sitio de reconocimiento (epítipo) por IgE mediante la oxidación “específica” de los triptofanos[3]. Se realizó un seguimiento de la reacción mediante espectroscopía UV-vis [3, 11, 12]. La asignación de RMN 2D dio como resultado la confirmación de la secuencia de aminoácidos tanto de la heveína nativa como de la heveína modificada de la cual se realizó el análisis de la estructura secundaria. Los péptidos TrpGly y LysTrpLys sirvieron como modelo para encontrar el producto final en la proteína y proponer un modelo de modificación del epítipo.

3.1. Purificación del alérgeno

La figura 3.1 (A) muestra el perfil de elución de la columna de exclusión molecular Superdex 75 (FPLC) cuando se aplicó la fracción precipitada al 100 % con sulfato de amonio. Como se puede apreciar la heveína y sus isoformas son una fracción mayoritaria.

El diagrama de elución de HPLC donde se compara la purificación de la heveína nativa y sus isoformas, así como la elución de los productos de reacción de la heveína modificada se presenta en la figura 3.1 (B). Para los experimentos de RMN se separaron las fracciones más abundantes de la reacción, la fracción principal es denominada mod4 para futuras referencias en este trabajo.

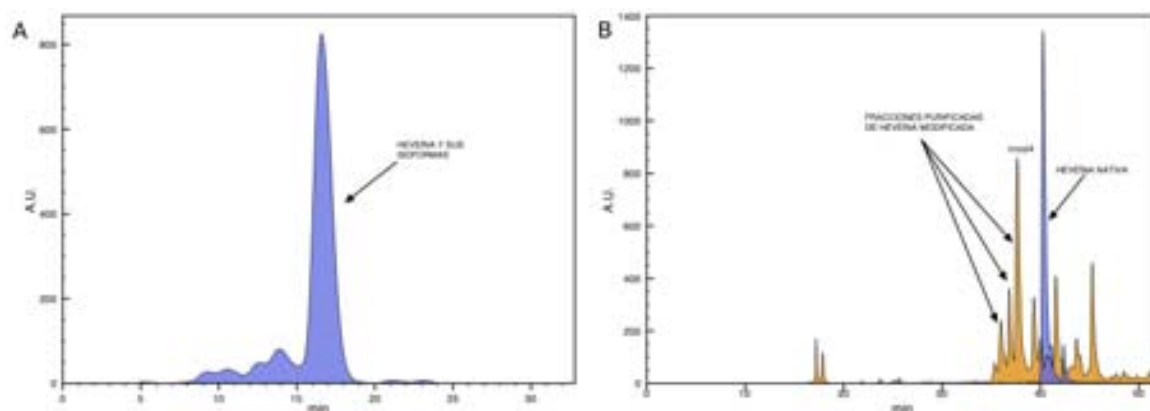


Figura 3.1: (A) Diagrama de elución en columna de exclusión en gel Superdex 75. (B) Diagrama de elución en fase reversa C18 para heveína nativa (azul) y heveína modificada (naranja).

3.2. Análisis de la modificación química

Ya que el triptofano es el aminoácido con mayor absorptividad en el espectro UV-Vis y en la heveína hay dos triptofanos y una tirosina, se utilizó esta técnica para el análisis y seguimiento de la reacción de modificación (oxidación)[2, 3, 8, 12]. En la figura 3.2 se muestran los espectros de las fracciones de la reacción de modificación entre 220 y 350 nm, donde el espectro de heveína es idéntico al espectro del triptofano. Por motivos de cantidad de muestra se graficaron en diferentes escalas, debido a que la absorbancia total varía en cada caso. Se observa que en todas las fracciones se mantiene un máximo a 280 nm, lo que nos permite decir que el anillo indólico se conserva; sin embargo, el mínimo a 250 nm desaparece en diferentes grados, lo que nos permite suponer una sustitución aromática sin ruptura del anillo.

3.2.1. Modificación de TrpGly y LysTrpLys

Las muestras de los dipéptidos no pudieron ser separadas efectivamente por fase reversa C18, por lo que el análisis fue a partir de una mezcla de reacción donde muy poca cantidad de muestra reaccionó.

Martenson y colaboradores [12] elaboraron un estudio comparativo de los derivados oxidados y bromados de indol para caracterizar los productos finales de la reacción de varios péptidos

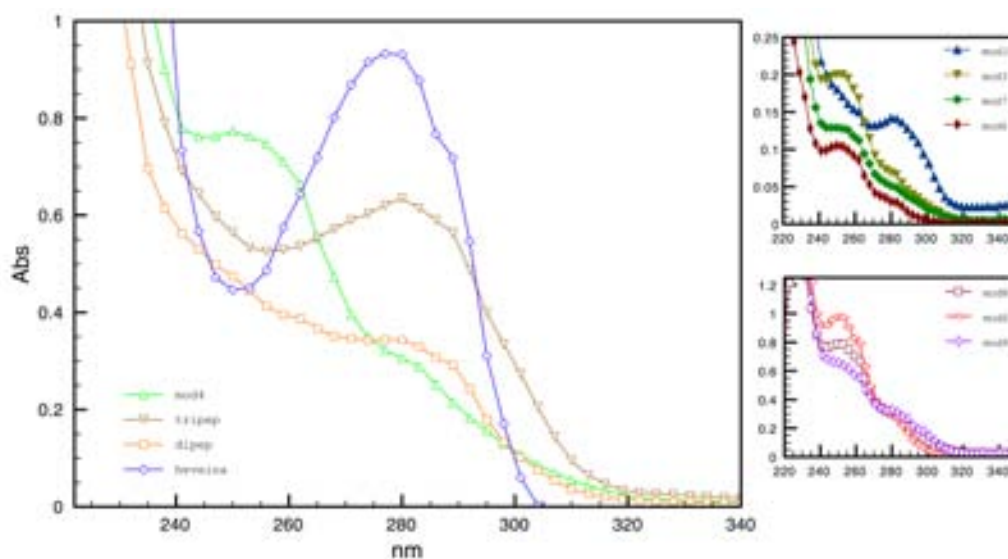


Figura 3.2: Espectro de absorción UV de las fracciones de la reacción.

con NBS (N-bromosuccinimida). Los productos obtenidos de la reacción con NBS fueron: oxiindolalanina, dioxiindolalanina(lactona), y derivados del bromo dioxiindolealanina (lactona) (Fig. 3.3). Sin embargo, estos autores no tuvieron un control preciso de la reacción ya que incubaron 24h a 37°C, y la mezcla fue variada, pero se pueden hacer comparaciones, aunque sus fracciones no tienen una alta pureza.

Nosotros incubamos a temperatura ambiente con BNPS-skatole (que es un oxidante mas débil), durante 15 minutos, y nuestra mezcla de reacción tiene menos productos, los cuales se aprecian en los experimentos $^{13}\text{C}^1\text{H}$ (HSQC, HMBC) para los péptidos. Con base en el análisis del espectro heteronuclear HSQC(espectro bidimensional donde se observan las correlaciones entre los núcleos ^{13}C y ^1H unidos por enlaces covalentes) de TrpGly pudimos observar la desaparición de la señal del hidrógeno en la posición dos del anillo indólico.

Dado que las condiciones de reacción de oxidación fue realizada en medio acuoso, donde el nucleófilo más abundante es el agua misma, nos permite intuir que el producto final es un alcohol o una cetona. Estos experimentos son anexados en el apéndice D.

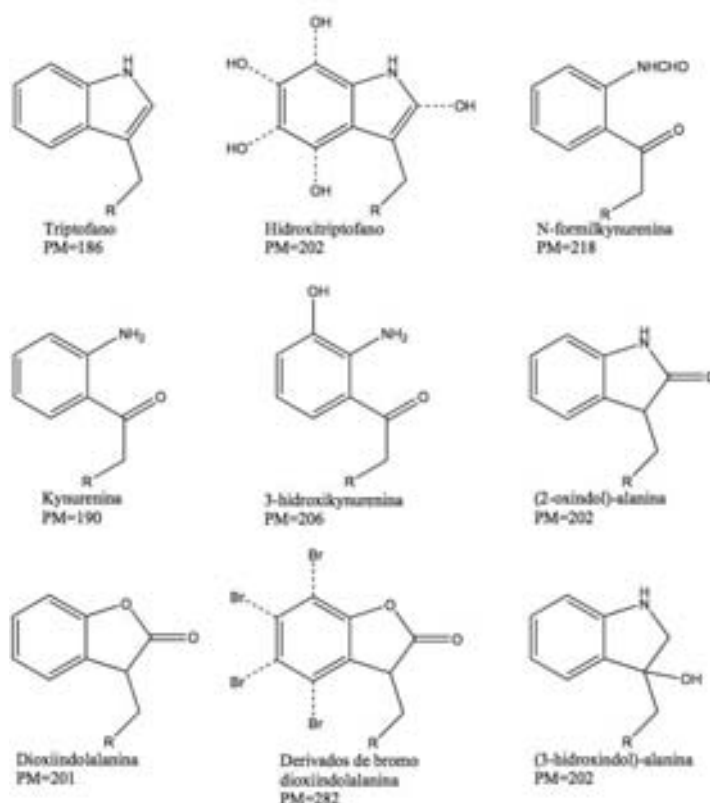


Figura 3.3: Productos posibles para la reacción de BNPS-skatole y NBS-succinimida con triptofano [2, 8, 12, 15]

Estos resultados concuerdan con estudios previos en donde se han detectado productos oxidados en la misma posición[2, 3, 12, 15], quienes realizaron estos estudios en indol, péptidos y en proteínas. Vestling y colaboradores [8] llegaron al mismo resultado; sin embargo, su análisis solo fue hecho con espectrometría de masas, ya que este oxidante es un agente comercial para el rompimiento de cadenas polipeptídicas.

En la figura 3.4 se observa las señales del anillo indólico en la zona de los aromáticos representado con flechas, en este caso se esperaban cinco señales para el anillo sin reaccionar, sin embargo, en el caso de el anillo modificado se tienen cuatro y la señal que desaparece es la del hidrógeno 2 del anillo indólico (Fig. 3.5).

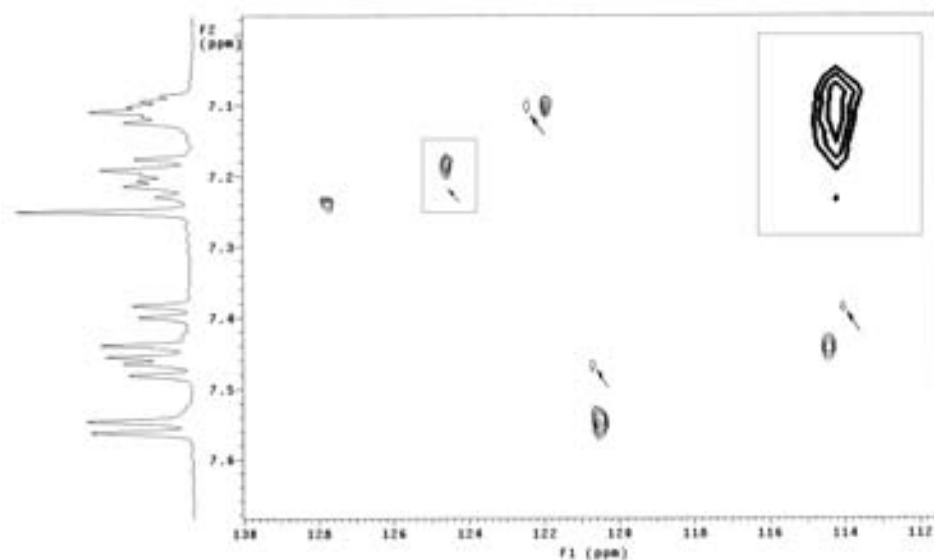


Figura 3.4: Espectro HSQC del dipéptido modificado.

Tabla 3.1: Diferencia de las energías electrónicas calculadas mediante Hartree Fock 6-31+g(d).

Tautómeros	Δ Energía kcal/mol
Ceto - Enol	21.1979

^aLas energías no están referenciadas contra ningún experimento, sin embargo la energía electrónica no da una tendencia conforme a cual tautómero es más favorecido en fase gas.

La señal de NH no se observa en esta zona ya que es un hidrógeno muy lábil además que aparece aproximadamente a 10 ppm. Esto confirma que en la posición dos se efectuó la oxidación.

Mediante cálculos mecánico cuánticos se obtuvieron energías relativas de las tautómeros ceto y enol en la posición 2 del anillo(Tabla 3.1).

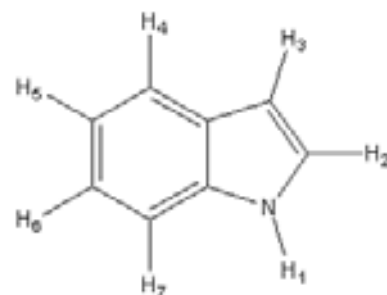


Figura 3.5: Estructura química del indol

3.2.2. Asignación de los sistemas de espín en el espectro TOCSY de la heveína nativa y modificada.

Al ser un experimento homonuclear, en los espectros se presenta una diagonal correspondiente a la correlación de los átomos consigo mismos. En primer lugar se deben identificar los sistemas de espín; cada sistema de espín pertenece a un aminoácido de la proteína. Algunos aminoácidos tienen un sistema de espín característico como son la alanina (Se observan: una señal $H\alpha$ y una señal para los 3 $H\beta$, ya que son idénticos magnéticamente), la treonina, la leucina, la valina y la isoleucina. Por otro lado, existen aminoácidos que su sistema de espín es muy similar como son; cisteína, serina, ácido aspártico, asparagina. Las señales de estos últimos aminoácidos pueden confundirse con los protones alifáticos de los aminoácidos histidina, fenilalanina, triptofano y tirosina porque todos ellos tienen un hidrógeno α y dos hidrógenos β . Para el análisis de las asignaciones la proteína se dividió en dos partes, primero los aminoácidos 20-30 (QWGWCGSTDEY) que es la región donde se espera la modificación, se muestra en esta sección, en el apéndice B se muestran los resultados para el resto de los aminoácidos.

3.2.3. Asignación de señales NOESY secuenciales y de media y larga distancia.

Para una asignación secuencial los sistemas de espín deben de estar identificados en un espectro TOCSY y en algunos casos se asigna en ambos espectros al mismo tiempo. La conectividad secuencial resulta de la interacción dipolar, a través del espacio, entre los protones del enlace peptídico (HN) de un residuo (i) con su homólogo siguiente ($i+1$) o mediante este último protón HN_i con los hidrógenos $H\alpha$, $H\beta$, $H\gamma$, $H\delta$ del residuo anterior (i) (fig 2.2).

Con el propósito de verificar si alguna otra cadena lateral sufrió cambios en presencia de los triptofanos oxidados se analizaron los espectros NOESY del resto de los aminoácidos. Como puede apreciarse en el apéndice B en donde se representan únicamente los hidrógenos de la cadena lateral sobre el espectro NOESY, la leucina 11 muestra un pico de cruce en 8.68 y 3.00 correspondiente a el acoplamiento dipolar de NH 11 (coordenada x- f_2) y HA 10 (coordenada y- f_1). Un espectro de RMN en dos dimensiones es en realidad una combinación de

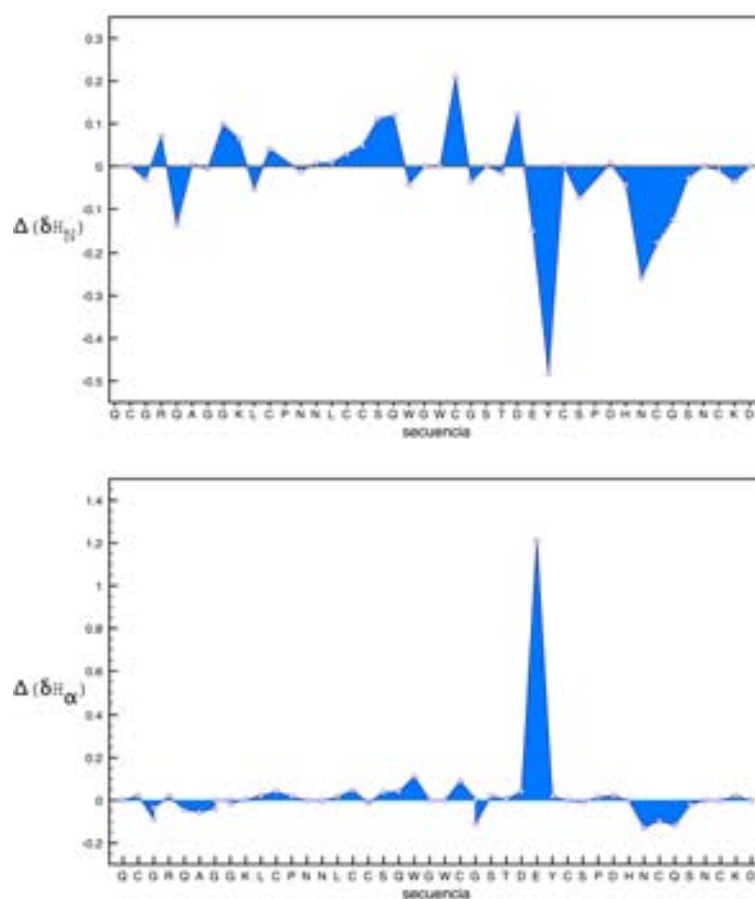


Figura 3.6: Variación del desplazamiento químico de los hidrógenos HN y $H\alpha$ de la cadena lateral para cada aminoácido. Las variaciones implican cambios en la estructura secundaria. $NH_{nativa} - NH_{modificada}$ y $H\alpha_{nativa} - H\alpha_{modificada}$.

espectros de 1D idénticos con la variación en el parámetro t_1 . Los espectros bidimensionales como COSY, TOCSY o NOESY, son simétricos con respecto a la diagonal, y las señales que se resaltan fuera de ella son llamadas picos de cruce e indican la interacción, o correlación debida al acoplamiento escalar (TOCSY) o a que compartan un mecanismo de relajación dipolar (NOESY).

En la figura 3.6 se grafican las diferencias en el desplazamiento químico de todos los $H\alpha$ y HN de la proteína, las demás señales no fueron graficadas debido a que los hidrógenos β no son observados para todos los aminoácidos debido a la calidad del espectro. Sin embargo,

cabe mencionar que una modificación en la estructura provoca frecuentemente una modificación en los desplazamientos químicos debido a los cambios en densidad electrónica en el núcleo.

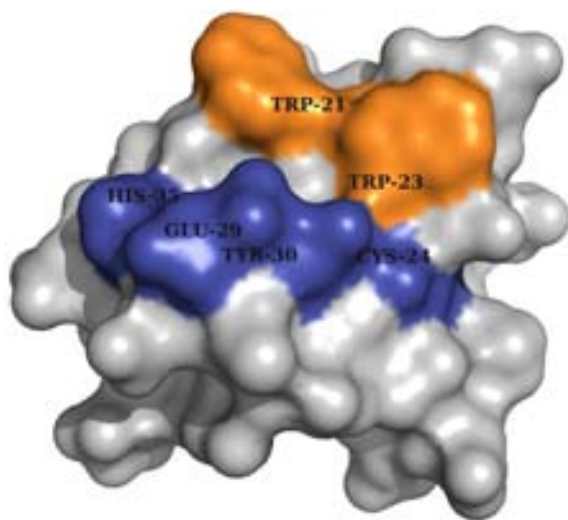


Figura 3.7: En color naranja se muestran los aminoácidos modificados, en color azul los aminoácidos que muestran modificaciones en el desplazamiento químico.

En la figura 3.7 se resaltan las diferencias de desplazamientos químicos de la cadena principal mayores a 0.2 ppm obtenidas de la figura 3.6. El análisis de estos gráficos nos lleva a pensar que los aminoácidos C24, E29, Y30 y H35 tuvieron un cambio en la conformación de su cadena lateral por los cambios conformacionales provocados por el producto oxidado, este resultado es de gran trascendencia ya que todos ellos están en el epítipo conformacional dominante que nuestro grupo ha reportado, a excepción del C24 [7].

3.2.4. Asignación de los aminoácidos aromáticos

En la figura 3.8 se presenta la región aromática del espectro TOCSY para la heveína y los productos de la reacción de modificación. Se analizaron las señales correspondientes a la cadena lateral de los aminoácidos aromáticos del epítipo. A pesar del traslape de señales, se llega a observar que hay un cambio en los desplazamientos químicos hacia campo alto, indicándonos que los hidrógenos de la molécula cambiaron de polaridad. Es interesante notar que la señal del aminoácido W23 desaparece. Sin embargo, por motivos de resolución no se puede definir lo mismo para el aminoácido W21.

Con base en los resultados obtenidos, tanto para los péptidos como para la heveína mo-

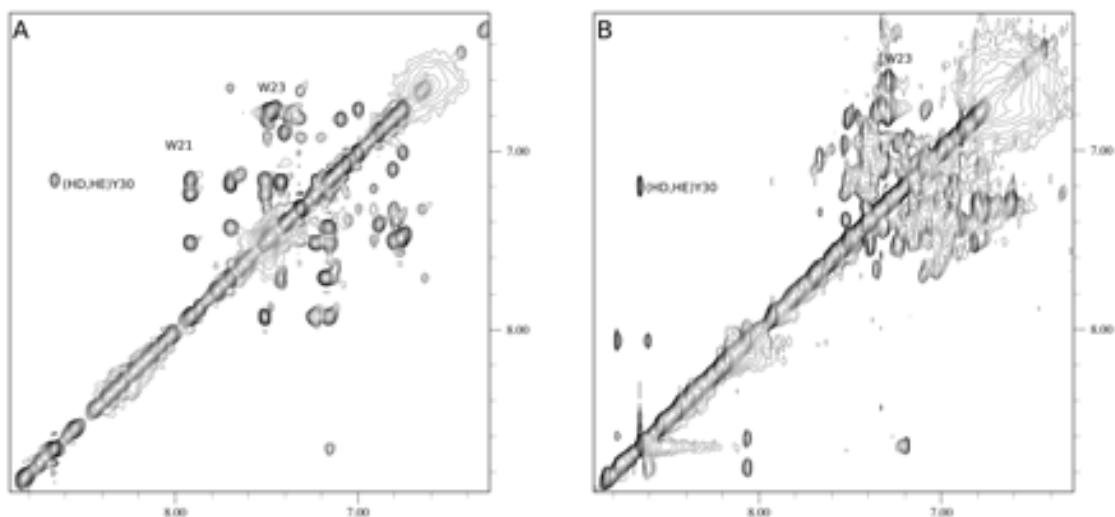


Figura 3.8: Comparación de las señales aromáticas TOCSY de la heveína nativa(A) y modificada(B)

modificada, podemos sugerir que el producto final de la oxidación con BNPS-skatole en las condiciones utilizadas en este trabajo fue la oxiindolalanina. A pesar de que el producto final solo difiere en la presencia de dos oxígenos adicionales, estos provocan un cambio conformacional en la región del epítipo.

En la figura 3.9 se muestra un modelo *in silico* de la superficie potencial calculada por medio de la aproximación de Poisson-Boltzman para los posibles productos de la modificación en W21, W23 o ambos, así como el potencial de la proteína nativa en las mismas condiciones.

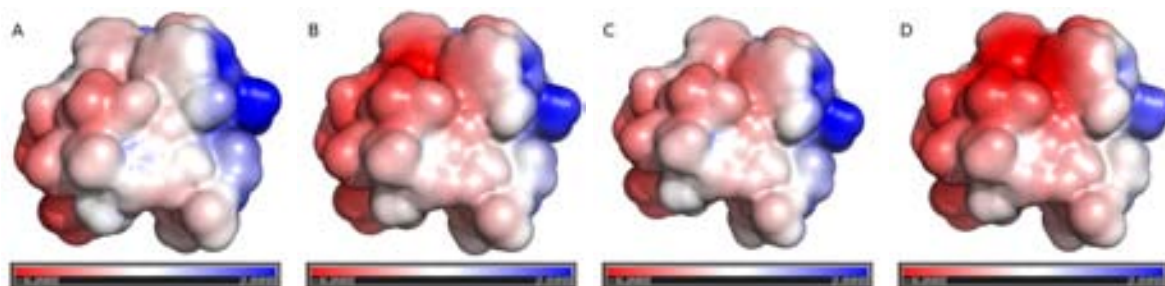


Figura 3.9: Esquema de comparación de los potenciales electrostáticos para A)Heveína nativa, B)Modificada triptofano 21, C)Modificada triptofano 23 y D)Modificada en triptofanos 21 y 23.

3.3. Comparaciones del dominio de heveína

La secuencia de aminoácidos presentada en la heveína está presente en numerosas proteínas de frutas y vegetales con una homología mayor al 70 % (esta búsqueda fue realizada en el servidor **ExPASy** y se muestra en el apéndice C). Es interesante que todos los dominios son estudiados debido a que tienen actividad como lectina, que se ha propuesto como un mecanismo de defensa de las plantas contra patógenos. Sin embargo, por estudios recientes en nuestro grupo[1] se ha demostrado que la alergenicidad causada por esta proteína en humanos depende del mismo sitio de unión.

Conclusiones

Con base en los resultados obtenidos por espectroscopía UV-VIS podemos decir que la reacción con BNPS-skatole fue exitosa. Las condiciones experimentales fueron similares a las usadas en experimentos previos de nuestro grupo en donde se confirmó que la cadena polipeptídica se mantenía intacta, esto es, no se rompía ningún enlace peptídico, y únicamente los triptofanos fueron modificados.

A partir del análisis de los espectros de RMN bidimensionales TOCSY Y NOESY logramos observar que las correlaciones TOCSY de las cadenas laterales de los triptofanos tuvieron un desplazamiento a campo alto, cuando se compara con las mismas señales de la proteína nativa. Estos resultados indican que se presentó un cambio en la polaridad del anillo indólico. Además podemos asegurar que la modificación química sucedió en W23; sin embargo, por motivos de resolución no lo podemos decir a ciencia cierta para W21.

Por otra parte, al comparar los desplazamiento químicos de las dos cadenas polipeptídicas (modificada y sin modificar) cuantificamos la diferencia entre ambos valores para la cadena principal. Estos resultados nos permiten sugerir que la zona de los triptofanos sufre un cambio de conformación local en los aminoácidos C24, E29, Y30 y H35, que son parte del epítipo conformacional. Cabe mencionar que no fue posible obtener con un alto grado de homogeneidad a la proteína modificada denominada mod4, por lo que no se pudieron asignar todos los desplazamientos químicos, lo que nos hubiera permitido determinar si existían más variaciones en las cadenas laterales de los aminoácidos restantes. Sin embargo, basados en reportes de otros grupos de investigación podemos decir que en las condiciones de oxidación utilizadas sólo se modifican los triptofanos[1, 3, 12].

Para poder determinar el tipo de oxidación que sufrieron los triptofanos se utilizaron dos

péptidos modelo, TrpGly y LysTrpLys, los cuales fueron oxidados con el mismo reactivo. El análisis del experimento HSQC de los péptidos permitió determinar la desaparición del hidrógeno en la posición dos del anillo indólico. En trabajos realizados por otros grupos de investigación [2, 3, 12, 15], en donde se llevaron a cabo reacciones de oxidación de proteínas y péptidos modelo con el BNPS-skatole y reactivos similares, se reporta de manera constante uno de varios productos que tiene particularmente un grupo hidroxilo en la posición dos del anillo indólico denominado 2-oxiindolalanina. Basándonos en dichos resultados podríamos sugerir que nuestro producto concuerda con lo obtenido anteriormente.

Entre nuestras perspectivas están los estudios de la interacción alérgeno-anticuerpo por RMN y difracción de rayos X para identificar los residuos de aminoácido que intervienen en la misma.

Apéndice

Apéndice A

Conceptos básicos de RMN

- Desplazamiento químico (δ)

Se le conoce como desplazamiento químico a la frecuencia en la que un núcleo, expuesto a un campo magnético B_0 , está en resonancia con la frecuencia de Larmor, que es la frecuencia asociada a la diferencia de energía ΔE , necesaria para pasar de un estado energético a otro.

Por lo tanto el desplazamiento químico es una frecuencia ligeramente diferente entre el mismo tipo de núcleo, a la frecuencia de Larmor, ello debido a las contribuciones de los momentos magnéticos de núcleos vecinos.

En unidades de frecuencia (Hz), el desplazamiento químico es proporcional al campo magnético aplicado. Para evitar que la medida dependa de B_0 , se expresa en ppm (partes por millón).

$$\delta(ppm) = 10^6 \times \frac{\nu - \nu_{ref}}{\nu_{ref}} \quad (A.1)$$

donde ν es la frecuencia del núcleo y ν_{ref} es la frecuencia del compuesto de referencia que en macromoléculas es por ejemplo: propanoato de 3-trimetilsilano (TSP).

- Constante de acoplamiento espín-espín(J)

La constante de acoplamiento caracteriza la interacción escalar (a través de enlaces) entre núcleos que están unidos por uno, dos o más enlaces covalentes en una estructura química, J es un campo magnético independiente.

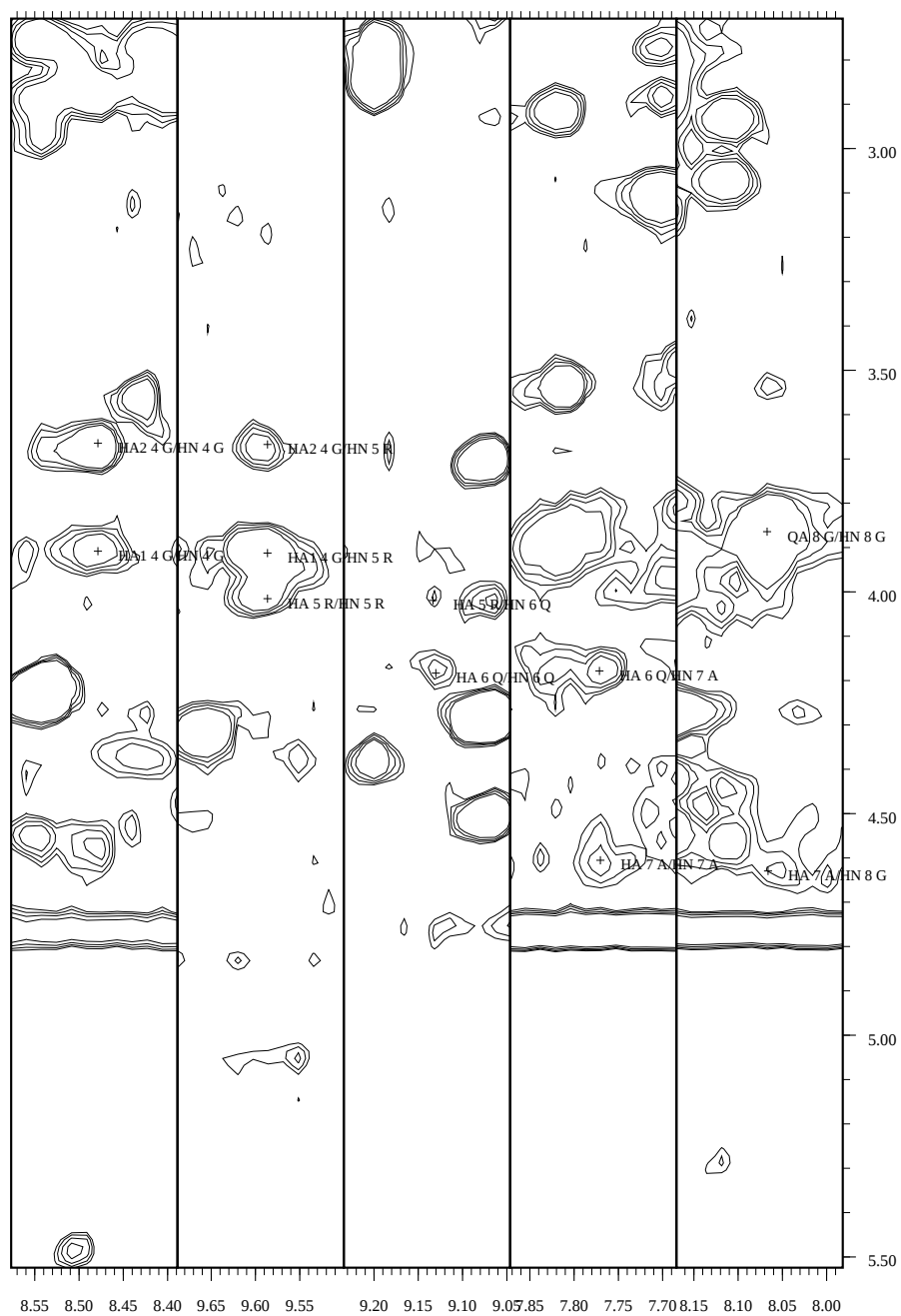
- Efecto Nuclear Overhauser (**NOE**)

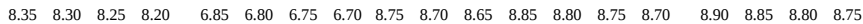
Es un cambio fraccional de la intensidad de un vector cuando otra resonancia es irradiada en un experimento de doble irradiación. Las señales NOE son consecuencia de interacciones dipolares entre diferentes núcleos y son inversamente proporcionales a la sexta potencia de la distancia internuclear. Los NOE son expresados en por ciento de la intensidad de resonancia no perturbada.

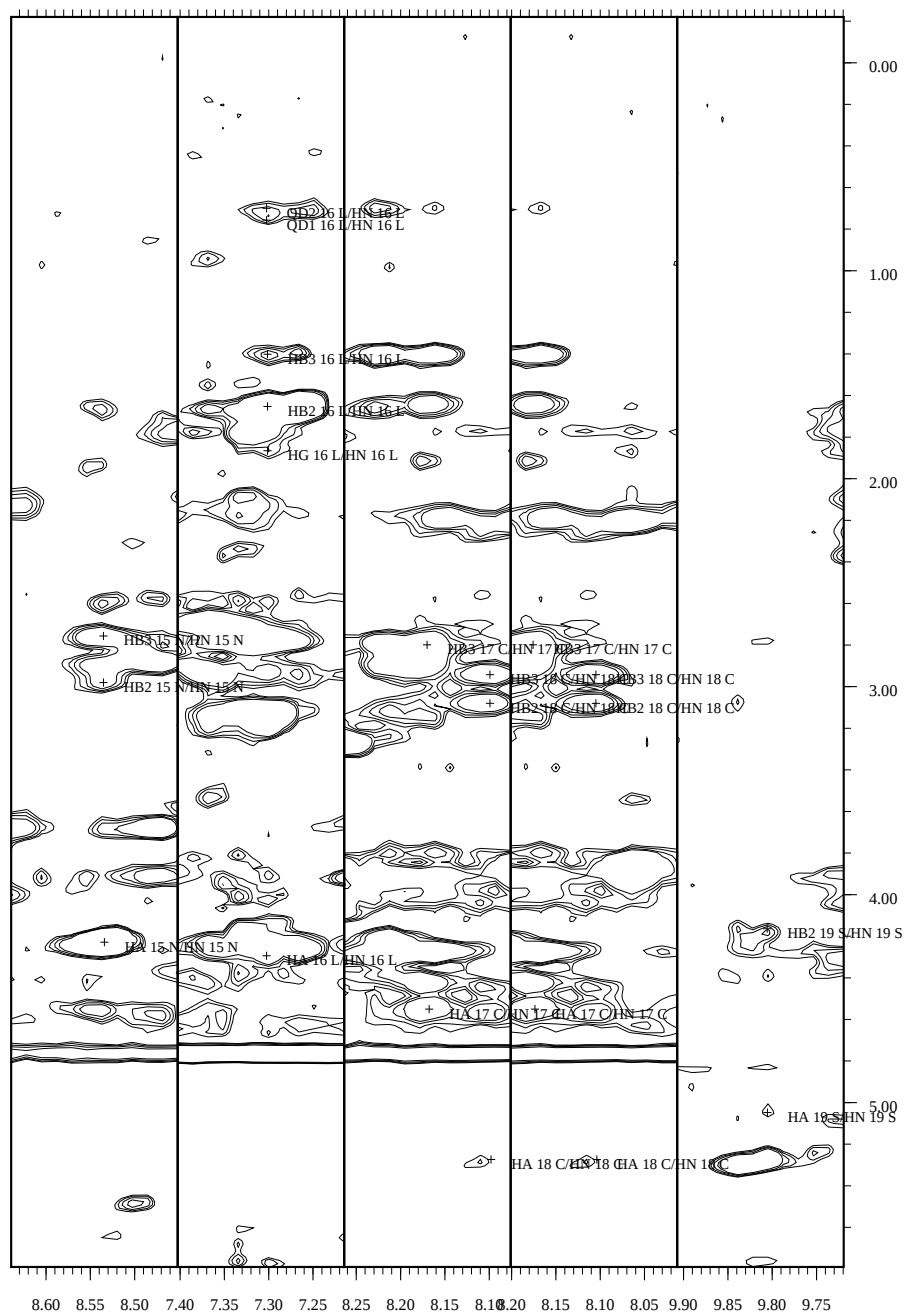
Apéndice B

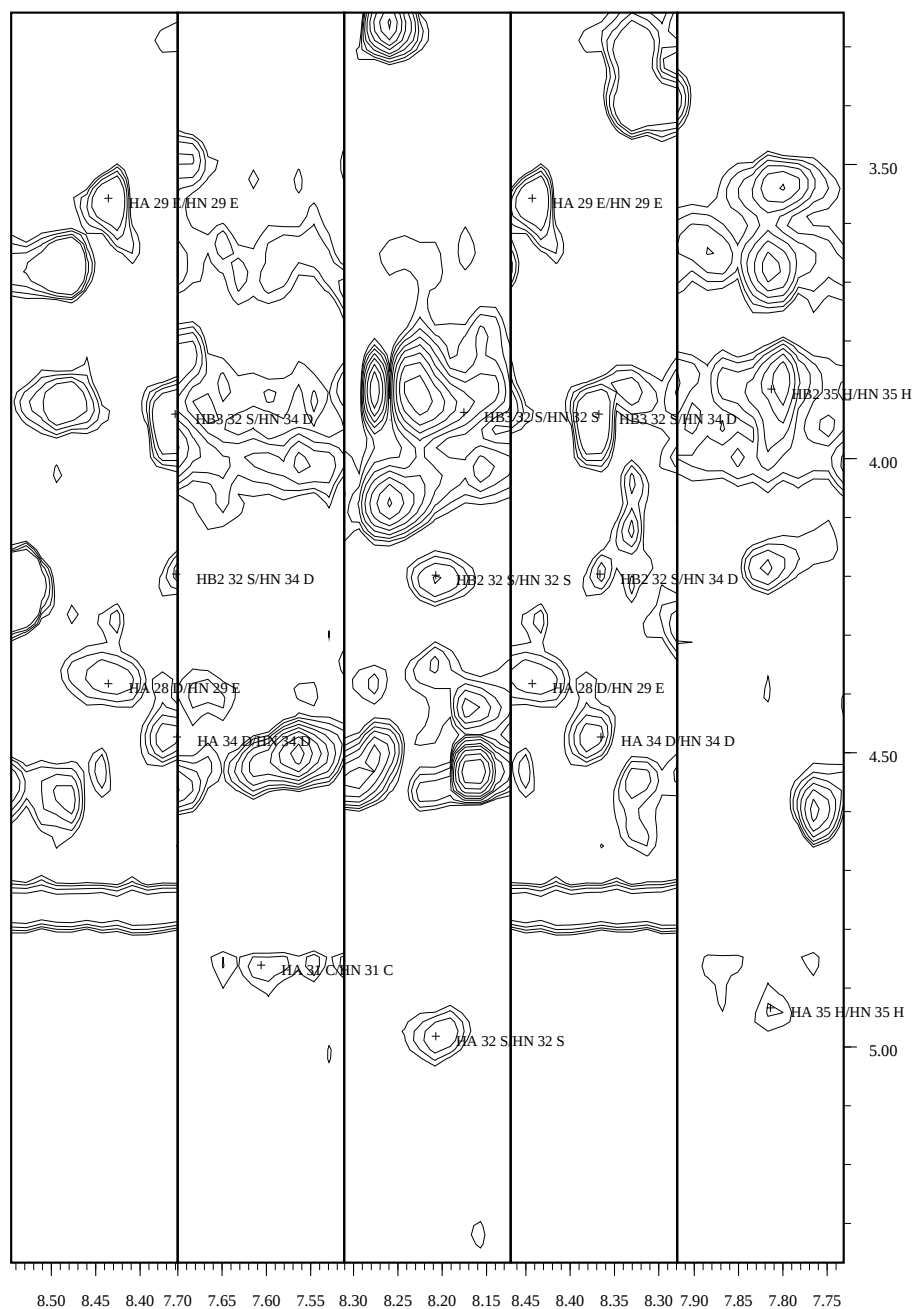
Señales secuenciales

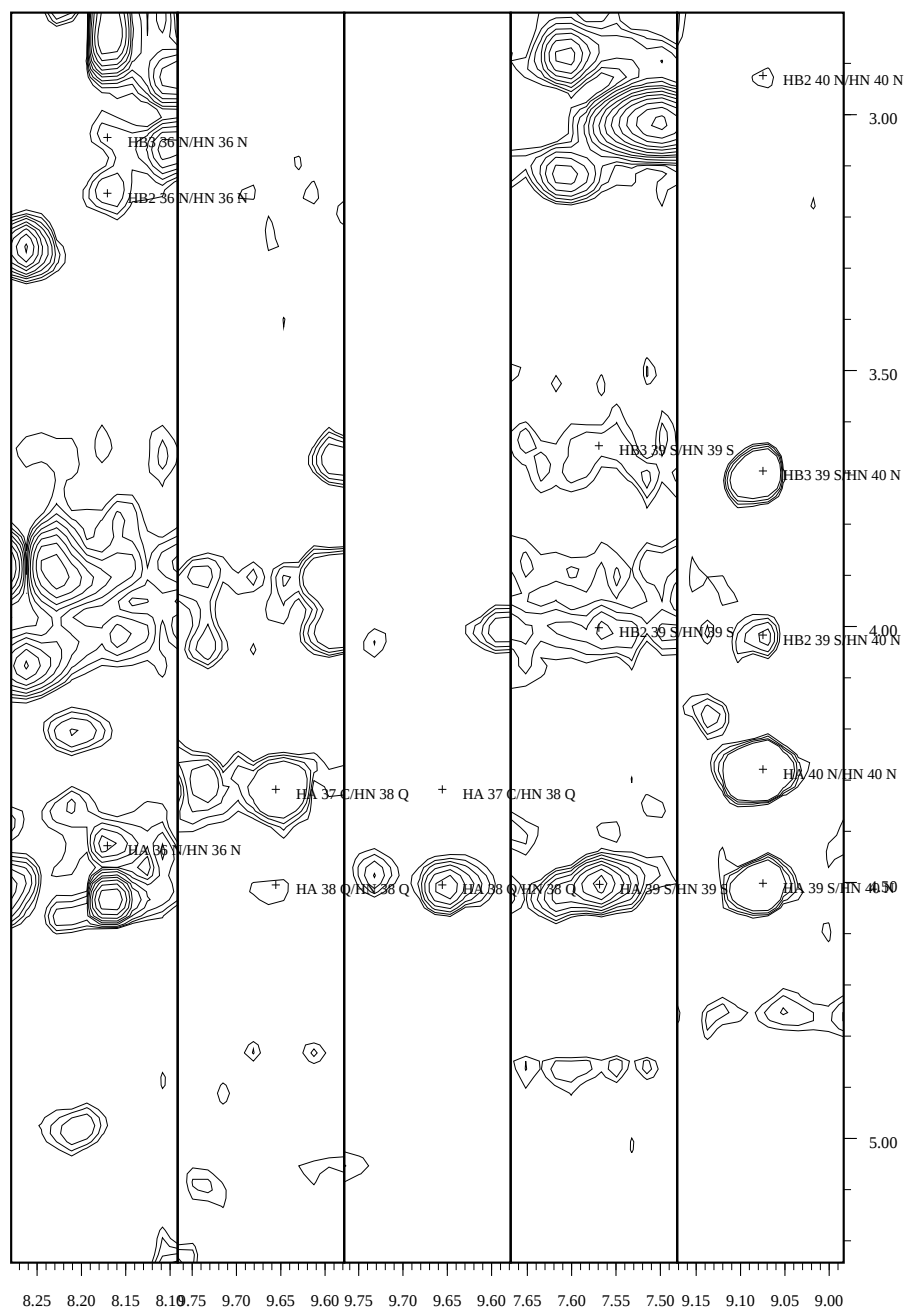
En este apéndice se presentan las señales NOESY de la heveína modificada químicamente y se representan los picos de cruce correspondientes a la cadena lateral de los aminoácidos, asignados previamente en el espectro TOCSY.











Apéndice C

Secuencias proteicas con dominio de heveína

Tabla C.1: Secuencias con dominio de heveína

Secuencia		Descripción	
1	EQCGRQAGGKLCNNLCCSQYGWCGSSDDYCSPSKNCQSNCK	42	PSEUDOHEVEINA <i>Hevea brasiliensis</i>
18	EQCGRQAGGKLCNNLCCSQWGWCGSTDEYCSPDHNCQSNCKD	60	PROHEVEINA <i>Hevea brasiliensis</i>
22	EQCGKQAGGQTCNNLCCSQYGWCGDTDDYCSPSKNCQSNCK	63	QUITINASA <i>Populus tremula</i>
24	EQCGRQAGGKTCNNLCCSQYGYCGNTDDYCSPSKNCQSNCK	64	QUITINASA <i>Galega orientalis</i>
22	QQCGRQAGGQTCPGGICCSQWGYCGTTADYCSPTNNCQSNCK	62	QUITINASA <i>Wasabia japonica</i>
16	QQCGRQRGGRLCGGNLCCSQFGWCGSTPEYCSPSQGCQSQC	57	Fragmento producido por herida <i>Solanum lycopersicon</i>
26	QQCGRQRGGALCGNNLCCSQFGWCGSTPEYCSPSQGCQSQC	66	Fragmento producido por herida <i>Solanum tuberosum</i>
22	QQCGRQAGGRTCANLCCSQYGYCGTTAEYCSPSQGCQSQC	62	Secuencia obtenida del genoma <i>Vitis vinifera</i>
22	EQCGRQAGGALCPGGLCCSQFGWCGNTDDYCKKENGQSQC	62	Precursor de ENDOQUITINASA <i>Theobroma cacao</i>
22	QQCGRQRGGALCSGNLCCSQFGWCGSTPEYCSPSQGCQSQC	62	QUITINASA <i>Nicotiana tabacum</i>
20	EQCGRQANGALCPNRLCCSQFGWCGNTDEYCKNCCQSQC	58	Precursor de ENDOQUITINASA <i>Cucurbita</i> cv. <i>Ebisu Nankin</i>
25	EQCGRQAGGALCPGRLCCSQFGWCGSTNDYCGP-GCQSQC	63	QUITINASA <i>Leucaena leucocephala</i>
20	QQCGRQRGGALCGGNLCCSQFGWCGSTPEYCSPSQGCQSQC	60	Proteína patogénica 4b <i>Capsicum chinense</i>
21	QNCGRQAGGQTCANLCCSQWGYCGTSDHNCNPSKNCQSNCR	62	Sin caracterizar <i>Populus balsamifera</i> subsp. <i>trichocarpa</i>
26	EQCGRQAGGALCPGGLCCSQFGWCGSTSDYCGP-TCQSQC	64	Precursor de ENDOQUITINASA <i>Persea americana</i>
23	QQCGRQRGGALCSGNLCCSQFGWCGSTQEYCSPSQGCQSQC	63	Proteína inducida por herida y patogénica <i>Nicotiana tabacum</i>
22	QQCGRQGGGRTCPGNICCSQYGYCGTTADYCSPTNNCQSNCK	62	QUITINASA <i>Arabidopsis thaliana</i>
26	QQCGRQKGGALCSGNLCCSQFGWCGSTPEFCSPSQGCQSQC	66	Fragmento proteína inducida por herida <i>Solanum tuberosum</i>
21	EQCGRQANGALCPNRLCCSQHGWCGSTDEYCKNGCQSQC	59	QUITINASA <i>Momordica charantia</i>
20	EQCGRQAGGALCPNGLCCSQHGWCGTSDYCAA-GCQSQC	58	ENDOQUITINASA <i>Humulus lupulus</i>
23	QQCGRQRGGAVCSGLCCSQYGWCGSTPEYCSPSQGCQSQC	63	Fragmento proteína inducida por herida <i>Capsicum annuum</i>
24	EQCGRQAGGALCPGGLCCSQFGWCGNTDPYCGKD-CQSQC	62	QUITINASA <i>Musa acuminata</i>
1	EQCGRQAGGALCPGGLCCSQFGWCGSTADYCTV-PGCQSQC	40	Precursor de ENDOQUITINASA TIPO 2 <i>Gossypium mexicanum</i>
Continúa en la siguiente página			

Tabla C.1 – continuación

Secuencia		Descripción	
23	EQCGRQAGGALCPGGLCCSQFGWCGSTADYCTV-PGCQSQC	62	QUITINASA TIPO I <i>Gossypium mexicanum</i>
24	EQCGSQAGGALCPGGLCCSQFGWCGSNNDYCGP-GCQSQC	62	QUITINASA <i>Leucaena leucocephala</i>
20	EQCGRQAGGALCPGGQCCSQYGWCGTTNEYCG-GCQSQC	58	QUITINASA <i>Euonymus europaeus</i>
19	EQCGRQAGGAACANNLCCSQFGWCGNTAEYCGA-GCQSQC	57	ENDOQUITINASA Ib <i>Castanea sativa</i>
28	EQCGRQAGGALCPGGNCCSQFGWCGSTTDYCGP-GCQSQC	66	Precursor de ENDOQUITINASA <i>Phaseolus vulgaris</i>
22	QQCGRQAGNRRCNNLCCSQFGYCGRTNEYCCTGFGCQSNCR	63	Peptido antimicrobiano <i>Euonymus europaeus</i>
25	EQCGSQAGGALCPGGLCCSQFGWCGSTDDYCG-KGCQSQC	63	QUITINASA TIPO I <i>Vigna unguiculata</i>
33	EQCGRQAGGARCPNRLCCSRWGWCGLTDDYCKG-GCQSQCR	72	QUITINASA <i>Oryza sativa subsp. indica</i>
21	EQCGRQANGALCPNNLCCSQFGCGDTDYCG-KNGCQSQC	60	ENDOQUITINASA <i>Cucumis melo</i>
33	EQCGRQAGGARCPNRLCCSRWGWCGLTDDYCKG-GCQSQCR	72	QUITINASA <i>Oryza sativa subsp. japonica</i>
26	QQCGRQASGRLCGNGLCCSQWGYCGSTAAYCGA-GCQSQCK	65	Proteína antifúngica <i>Ipomoea nil</i>
21	EQCGRQAGGALCPNGLCCSEFGWCGDTEAYCK-QPGCQSQC	60	Precursor de ENDOQUITINASA <i>Brassica napus</i>
20	EQCGRQAGGALCPNGLCCSEFGWCGNTEPYCK-QPGCQSQC	59	QUITINASA TIPO I <i>Arabis glabra</i>
27	EQCGRQASGALCPGGLCCSKWGWCGNTEAHCQ-QDCQSQC	65	Sin caracterizar <i>Picea sitchensis</i>
24	EQCGSQAGGALCPNCLCCSQFGWCGSTSDYCGS-GCQSQC	62	QUITINASA <i>Zea mays subsp. parviglumis</i>
23	EQCGSQAGGALCPNCLCCSQFGWCGSTSDYCGS-GCQSQC	61	QUITINASA <i>Zea diploperennis</i>
39	QCGQQAGGALCHSGLCCSQWGWCGTTSDYCG-NGCQSQC	76	QUITINASA <i>Nepenthes khasiana</i>
13	EQCGRQANGALCPNNLCCSQFGLCGDTDYCG-KNGCQSQC	52	ENDOQUITINASA <i>Cucumis sativus</i>
3	EQCGRQAGGALCPNGLCCSEFGWCGDTEPYCK-QPGCQSQC	42	QUITINASA TIPO I <i>Boechera drummondii</i>
23	EQCGRQAGGALCPNGLCCSEFGWCGDTEPYCK-QPGCQSQC	62	QUITINASA TIPO I <i>Arabis fecunda</i>
4	EQCGRQAGGALCPNGLCCSEFGWCGDTEPYCK-QPGCQSQC	43	QUITINASA TIPO I <i>Arabis lignifera</i>
10	EQCGRQAGGALCPNGLCCSEFGWCGDTEPYCK-QPGCQSQC	49	QUITINASA TIPO I <i>Boechera parishii</i>
27	EQCGRQAGGALCPGGLCCSKFGWCGSTGDYCG-DGCQSQC	65	QUITINASA TIPO Ia <i>Galega orientalis</i>
22	EQCGSQAGGAVCPGGLCCSQFGWCGSTNDYCG-NGCQSQC	60	Sin caracterizar <i>Populus jackii</i>
1	QCGSQAGGALCPGGLCCSQFGWCGSTDDYCG-KGCQSQC	38	QUITINASA TIPO I <i>Vigna unguiculata subsp. sesquipedalis</i>
1	EQCGRQAGGALCPGGLCCSQYGCANTPEYCGS-GCQSQC	39	QUITINASA TIPO I <i>Hevea brasiliensis</i>
24	EQCGKQAGGALCPGGLCCSKFGWCGSTGEYCG-DGCQSQC	62	QUITINASA TIPO I <i>Medicago sativa</i>
17	EQCGRQAGGALCPGGLCCSEFGWCGDTPYCK-QPGCQSQC	56	QUITINASA TIPO I <i>Arabis blepharophylla</i>

Apéndice D

Análisis de TrpGly

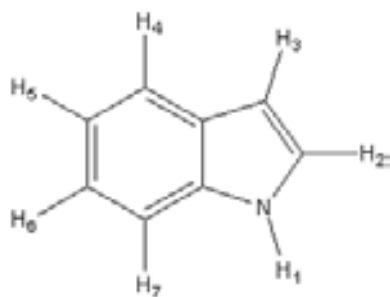


Figura D.1: Numeración del indol

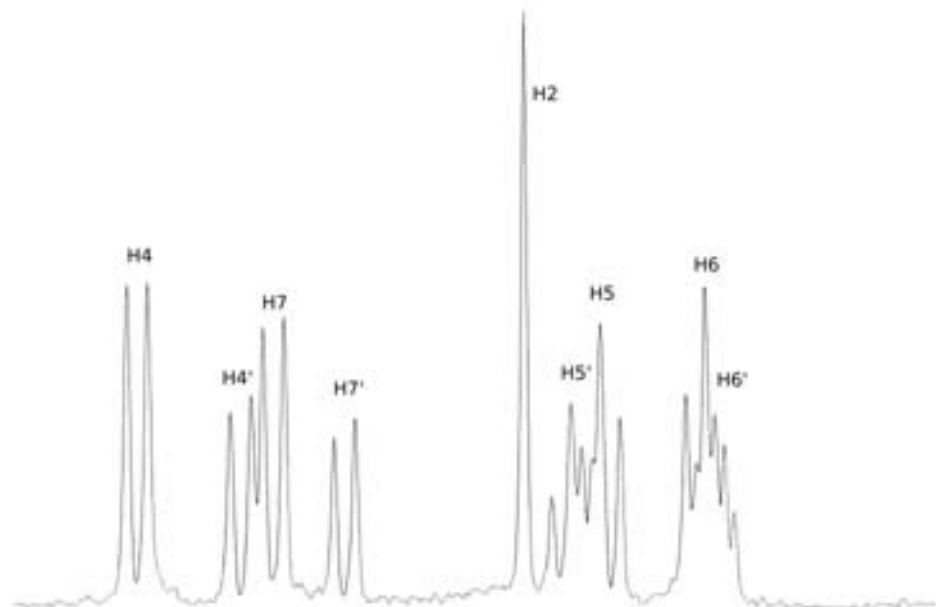


Figura D.2: Espectro monodimensional de la mezcla del dipéptido con el dipéptido modificado. Sección de las señales aromáticas de indol.

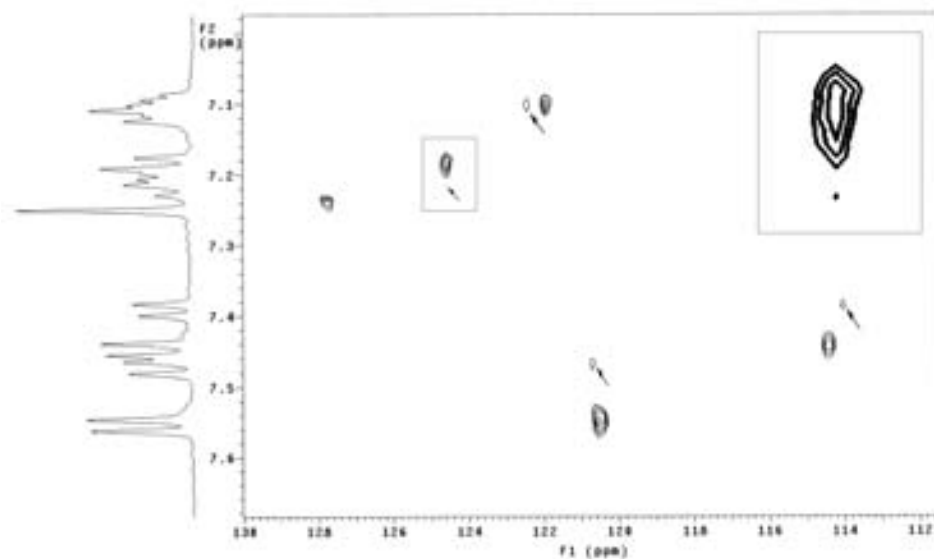


Figura D.3: Espectro HSQC del dipéptido modificado.

Bibliografía

- [1] Reyes-López C. A., Hernández-Santoyo A., Pedraza-Escalona M., Mendoza Guillermo, Hernández-Arana A., and Rodríguez-Romero A. Insights into a conformational epitope of hev b 6.02 (hevein). *BBRC*, 314:123–130, 2004.
- [2] Finley E.L., Dillon J., Crouch R.K., and Schey K.L. Identification of tryptophan oxidation products in bovine α -crystallin. *Protein ScienceBBRC*, 7:2391–2397, 1998.
- [3] Omenn G.S., Fontana A., and Anfinsen C.B. Modification of the single tryptophan residue of staphylococcal nuclease by a new mild oxidizing agent. *J. Biol. Chem.*, 245(8):1895–1902, 1970.
- [4] Beintema Jaap J. Structural features of plant chitinases and chitin-binding proteins. *FEBS Letters*, 350:159–164, 1994.
- [5] Wüthrich K. *NMR of Proteins and Nucleic Acids*. John Wiley & Sons, 1986.
- [6] Archer B. L. The proteins of hevea brasiliensis latex. *Biochem. J.*, 75:236–240, 1960.
- [7] Pedraza-Escalona Martha, Becerril-Luján Baltazar, Agundis Concepción, Domínguez-Ramírez Lenin, Pereyra Ali, Riaño-Umbarila Lidia, and Rodríguez-Romero A. Analysis of b-cell epitopes from the allergen hev b 6.02 revealed by using blocking antibodies. *Molecular Immunology*, 46:668–676, 2008.
- [8] Vestling M.M., Kelly M.A., and Fenselau C. Optimization by mass spectroscopy of a tryptophan-specific protein cleavage reaction. *Rapid Communucations in Mass Spectrometry*, 8:786–790, 1994.

- [9] Aboitiz N., Vila-Perelló M., Groves P., Asensio J.L., Andreu D., Cañada F. Javier, and Jiménez-Barbero J. Nmr and modeling studies of protein–carbohydrate interactions: Synthesis, three-dimensional structure, and recognition properties of a minimum hevein domain with binding affinity for chitooligosaccharideshevein: Nmr assignment and assessment of solution-state folding for the agglutinin-toxin motif. *ChemBioChem*, 5:1245–1255, 2004.
- [10] Andersen N.H., Cao B., Rodríguez-Romero A., and Arreguín B. Hevein: Nmr assignment and assessment of solution-state folding for the agglutinin-toxin motif. *Biochemistry*, 32:1407–1422, 1993.
- [11] Zagalsky P., Eliopoulos E., and Findlay J.B. The lobster carapace carotenoprotein, α -crustacyanin. *Biochem. J.*, 274:79–83, 1991.
- [12] Martenson R.E., Deibler, and Kramer A.J. Reacion of peptide 89-169 of bovine myelin basic protein with 2-(2-nitrophenylsulfenyl)-3-methyl-3-bromoindolenine. *Biochemistry*, 16:216–221, 1977.
- [13] Wright C. S. Structural comparison of the two distinct sugar binding sites in wheat germ agglutinin isolectin ii. *J. Mol. Biol.*, 178:91–104, 1984.
- [14] Hamelryck T., Loris R., Bouckaert J., and Wyns L. Legume lectin structure. *Biochim Biophys. Acta*, 1383:9–36, 1998.
- [15] Rahali V. and Gueguen J. Chemical cleavage of bovine β -lactoglobulin by bnps-skatole for preparative purposes: Comparative study of hydrolytic procedures and peptide characterization. *Journal of Protein Chemistry*, 18:1–12, 1999.