



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE QUÍMICA**

**PLEGAMIENTO Y HOMODIMERIZACIÓN
DE LA AGLUTININA DE GERMÉNE DE TRIGO.**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:
DOCTORA EN CIENCIAS**

P R E S E N T A:

M. EN C. MARÍA DEL CARMEN PORTILLO TÉLLEZ

DIRECTOR DE TESIS: DR. ENRIQUE GARCIA HERNANDEZ



MÉXICO, D.F.

SEPTIEMBRE 2011



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.



INSTITUTO DE QUÍMICA



PDCB/grad/052Jur/2011

DR. ISIDRO ÁVILA MARTÍNEZ
DIRECTOR GENERAL DE ADMINISTRACIÓN
ESCOLAR, UNAM
Presente.

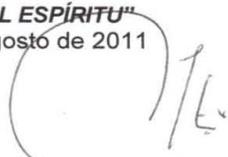
Nos permitimos informarle que el Comité Académico de **DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**, en su reunión **285** del 17 de agosto de 2011, designó el siguiente jurado para examen de **DOCTORA EN CIENCIAS** de **MARÍA DEL CARMEN PORTILLO TÉLLEZ**, con número de cuenta **87234864**, con la tesis titulada **"PLEGAMIENTO Y HOMODIMERIZACIÓN DE LA AGLUTININA DE GERMÉN DE TRIGO"**, dirigida por el Dr. Enrique García Hernández.

Presidente: Dr. Roberto Alejandro Arreguín Espinosa de los Monteros
Secretario Dr. Enrique García Hernández
Vocal: Dr. Andrés Hernández Arana
Vocal: Dr. Alejandro Sosa Peinado
Vocal: Dr. Juan Xicohtencatl Cortés

El Comité Académico, aprobó que la integración del jurado se realizará a solicitud del alumno, **con cinco sinodales**, en apego a la nueva normatividad, acogiéndose al artículo **QUINTO TRANSITORIO**, con base a lo establecido en el **Artículo 31** del Reglamento General de Estudios de Posgrado.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, a 17 de agosto de 2011


DR. RAFAEL CAMACHO CARRANZA
COORDINADOR


DR. MARIANO MARTÍNEZ VÁZQUEZ
RESPONSABLE DE ENTIDAD

c.c.p. Expediente alumno

Teléfono 5623 0171 5623 0170 <http://www.pdcB.unam.mx> E-mail: pdcB@servidor.unam.mx

AGRADECIMIENTOS

A mi hija la superayudante que ha estado a mi lado en todo momento.

A mis padres que me dieron la vida María del Carmen Téllez (+) y Francisco Portillo.

A mis hermanos, Francisco, Verónica, Laura y Eduardo.

A mi tutor, Enrique García, por todo su apoyo, paciencia y guía para realizar este trabajo.

A todos mis compañeros de laboratorio, por coincidir en este momento de mi vida.

A los Drs. Alejandro Fernández y Mario Calcagño por su acertada cotutoría en este trabajo.

Al los Dr. Gómez Puyou, la Dra. Marieta Tuena, el Dr. Miguel Costas y el Dr. Horacio Reyes por sus comentarios y trabajo en su laboratorio.

Al Dr. José Manuel Sánchez Ruiz, por haberme autorizado realizar las estancias de investigación en su laboratorio.

A CONACYT por las becas otorgadas con número de registro 204674 y 129239.

A la Dirección General de Asuntos del Personal Académico, (PAPIIT-UNAM IN204609 y IN205712).

ABREVIATURAS.

AGT	Aglutinina de Gérmen de Trigo
PDB	Protein Data Bank
GlcNAc	N-Acetil-glucosamina
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución.
FPLC	Cromatografía líquida rápida de proteínas
M	Molar
LiCl	Cloruro de litio.
GndHCl	Hidrocloreuro de guanidina.
kDa	Kilo Daltones.
PM	Peso molecular.
DSC	Calorimetría de barrido diferencial.
ITC	Calorimetría de titulación isotérmica.
IDC	Calorimetría de dilución isotérmica.
ΔH	Cambio de entalpía.
ΔS	Cambio de entropía
ΔC_p	Cambio en la capacidad calorífica
ΔT	Cambio en la temperatura.
kcal/mol	Kilocalorias por mol.
K	Kelvin
min	Minuto
°C	Grado Centígrado o Celcius
Å	Angstrom.
mL	Mililitro.
pH	Potencial Hidrógeno.
mM	Milimolar.
T_m	Temperatura a la cual ocurre la mitad de la transición.
ΔH_U	Cambio total de entalpía debido a la desnaturalización.
ΔH_{vH}	Entalpía de van 't Hoff.
ΔH_{cal}	Entalpía calorimétrica.

ΔH_A	Entalpía de asociación.
ΔG_A	Cambio en la energía libre de Gibbs de asociación.
ΔC_{pD}	Cambio en la capacidad calorífica de disociación.
ΔC_{pA}	Cambio en la capacidad calorífica de asociación.
ΔA_p	Cambio en el área polar.
ΔA_t	Cambio en el área total.
°C/min	Grados centígrados por minuto.
K_d	Constante de disociación.
K_a	Constante de asociación
$T_{p,dis}$	Temperatura del pico de disociación.
$T_{p,U}$	Temperatura del pico de desplegamiento.
μl	Microlitros.
CD	Dicroísmo circular.
UV	Ultravioleta.
nm.	Nanometros.
mg/mL	Miligramos por mililitro.
DLS	Dispersión de luz dinámica.
F	Fluorescencia.
$\mu g/mL$	Microgramos por mililitro.
CNBr	Bromuro de cianogeno.
Trp	Triptófano.
Met	Metionina.
Asp	Ácido aspártico.
Glu	Ácido glutámico.
Tyr	Tirosina.
Arg	Arginina
pKa	Constante de disociación.
U	Estado desplegado.
N	Estado nativo.
I	Intermediarios.
UDA	Aglutinina de <i>Urtica dioica</i>

ÍNDICE.

AGRADECIMIENTOS	0
ABREVIATURAS	3
ÍNDICE	5
ÍNDICE DE FIGURAS	6
ÍNDICE DE TABLAS	6
ABSTRACT	7
RESUMEN	8
INTRODUCCIÓN	9
ANTECEDENTES	10
LECTINAS	10
LA AGLUTININA DE GERMEN DE TRIGO	12
CARACTERÍSTICAS Y ESTRUCTURA DE LA AGLUTININA DE GERMEN DE TRIGO	12
ESPECIFICIDAD DE LA AGLUTININA DE GERMEN DE TRIGO A CARBOHIDRATOS.....	16
ALGUNAS APLICACIONES DE LA AGLUTININA DE GERMEN DE TRIGO.....	17
MÉTODOS CALORIMÉTRICOS.....	19
MÉTODOS ESPECTROSCÓPICOS.....	22
HIPÓTESIS	24
OBJETIVOS	24
OBJETIVO GENERAL	24
OBJETIVOS PARTICULARES	24
MATERIALES Y MÉTODOS	25
CALORIMETRÍA DE BARRIDO DIFERENCIAL (DSC).....	25
CALORIMETRÍA DE DILUCIÓN ISOTÉRMICA (IDC).....	27
DICROISMO CIRCULAR (CD).....	28
DISPERSIÓN DE LUZ DINÁMICA (DLS).....	28
FLUORESCENCIA (F).....	29
CAMBIOS EN EL ÁREA SUPERFICIAL ACCESIBLE AL SOLVENTE Y ESTIMACIÓN DE EL CAMBIO EN LA CAPACIDAD CALORÍFICA.....	29
RESULTADOS	30
DESPLIEGAMIENTO DE LA AGT MONOMÉRICA	35
DESPLIEGAMIENTO Y DISOCIACIÓN DEL DÍMERO DE AGT	44
DISCUSIÓN	51
BIBLIOGRAFÍA	55
ARTÍCULO PUBLICADO	63

ÍNDICE DE FIGURAS.

<u>FIGURA 1.</u> DOMINIO B DE LA AGT	15
<u>FIGURA 2.</u> DÍMERO DE LA AGT (2UVO)	15
<u>FIGURA 3</u> ESQUEMA DEL MICROCALORÍMETRO DIFERENCIAL DE BARRIDO.	21
<u>FIGURA 4.</u> ESQUEMA DEL CALORÍMETRO DE TITULACIÓN ISOTÉRMICA.	22
<u>FIGURA 5.</u> PERFIL DE ELUCIÓN DE LA AGT.	30
<u>FIGURA 6.</u> ESPECTROS DE CD DE AGT EN EL ULTRAVIOLETA LEJANO	31
<u>FIGURA 7.</u> ESPECTROS Y BARRIDOS DE AGT OBTENIDOS CON CD	32
<u>FIGURA 8.</u> PERFILES CALORIMÉTRICOS DE LA PERTURBACIÓN TÉRMICA DE AGT EN FUNCIÓN DEL PH.....	33
<u>FIGURA 9.</u> PERFILES CALORIMÉTRICOS DE LA PERTURBACIÓN TÉRMICA DE LA AGT EN FUNCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA	34
<u>FIGURA 10.</u> BARRIDOS TÉRMICOS CD VS CONCENTRACIÓN PROTEÍNA.....	35
<u>FIGURA 11.</u> ANÁLISIS DE DECONVOLUCIÓN DE LOS ENDOTERMAS DE AGT.....	36
<u>FIGURA 12.</u> ANÁLISIS DE DECONVOLUCIÓN DE LAS ENDOTERMAS DE AGT CON GUANIDINA 2 M	38
<u>FIGURA 13.</u> ENTALPÍAS DE DESPLEGAMIENTO Y TEMPERATURAS MÁXIMAS DEL PICO	39
<u>FIGURA 14.</u> ESPECTROS DE FLUORESCENCIA DE LA AGT CON DIFERENTES VALORES DE PH ..	41
<u>FIGURA 15.</u> RADIO HIDRODINÁMICO Y APARENTE PESO MOLECULAR DE LA AGT	42
<u>FIGURA 16.</u> ESPECTROS DE DC EN EL UV LEJANO DE LA AGT.....	43
<u>FIGURA 17.</u> TEMPERATURA DEL MÁXIMO DEL PICO DE DISOCIACIÓN Y DEL PICO DEL DESPLEGAMIENTO	44
<u>FIGURA 18.</u> ISOTERMAS DE DILUCIÓN DE AGT A PH 3 EN FUNCIÓN DE LA TEMPERATURA.....	46
<u>FIGURA 19.</u> ENTALPIA DE DIMERIZACIÓN DE AGT A PH 3	48
<u>FIGURA 20.</u> ESTABILIDAD DE LA AGT EN FUNCIÓN DEL PH.....	49
<u>FIGURA 21.</u> INTERFASE ENTRE LAS DOS SUBUNIDADES DE LA AGT (2UVO)	50

ÍNDICE DE TABLAS.

T

TABLA 1. ESTRUCTURAS 3D DE LA AGT DISPONIBLES EN EL PDB.....	14
TABLA 2. COMPARACIÓN DE LAS CONSTANTES DE ASOCIACIÓN DE AGT-GlcNAc	17
TABLA 3. AMORTIGUADORES EMPLEADOS CON LA AGT	26
TABLA 4. COMPARACIÓN DE LOS PARÁMETROS DE DESPLEGAMIENTO PARA LAS TRANSICIONES SECUENCIALES E INDEPENDIENTES DEL MONÓMERO DE AGT A PH 2	37
TABLA 5. PARÁMETROS DE DESPLEGAMIENTO PARA LAS TRANSICIONES CALORIMÉTRICAS DEL MONÓMERO DE AGT A PH 2 Y DISTINTAS CONCENTRACIONES DE GNDHCL	37
TABLA 6. ENERGÉTICA DE DIMERIZACIÓN DE AGT OBTENIDA POR IDC	
A. A pH 3, en función de la temperatura.....	46
B. A 37 °C, en función del pH.....	47
TABLA 7. MECANISMOS Y ENERGÉTICA DE FORMACIÓN DE HOMOOLOGÓMEROS DE ALGUNAS LECTINAS DE PLANTAS.....	52

ABSTRACT.

Wheat germ agglutinin (WGA) is emblematic among proteins specialized in the recognition of carbohydrates. It was the first lectin reported with a capacity for discriminating between normal and malignant cells. Since then, it has become a preferred model for basic research, as well as being considered recurrently in the development of biomedical and biotechnological applications. In spite of that, the molecular basis for the structural stability of this homodimeric lectin remains largely unknown, a situation that limits the rational manipulation and modification of its function. Herein, we present a thermodynamic characterization of WGA folding and self-association processes as a function of pH and temperature, by using differential scanning and isothermal dilution calorimetry. WGA is monomeric at pH 2, with one of its four hevein-like domains unfolded at room temperature. Under such conditions, the agglutinin exhibits a fully reversible thermal unfolding, composed of three two-state transitions. At higher pH values, the protein forms weak non-obligate dimers. This behavior contrasts with that observed for the other plant lectins studied so far, which form strong obligate oligomers, indicating a distinctly different molecular basis for WGA function. For dimer formation, the four domains must be properly folded. Nevertheless, depending on the solution conditions, self-association may be coupled with folding of the labile domain. Therefore, dimerization may proceed as a rigid-body-like association or as a folding-by-binding event. This hybrid behavior is unseen in other plant lectins. The emerging molecular picture for the WGA assembly calls for the need for a re-examination of existing ligand-binding data in the literature.

RESUMEN.

La aglutinina de germen de trigo (AGT) es emblemática entre las proteínas especializadas en reconocer carbohidratos. Fue la primera lectina reportada con la capacidad de discriminar entre células normales y “malignas”. Desde entonces, ha sido usada como modelo para investigaciones básicas, así como se le ha considerado para aplicaciones biomédicas y biotecnológicas. Aunque es una proteína muy estudiada, las bases moleculares de la estabilidad estructural de esta lectina homodimérica siguen sin conocerse. Esto es una situación que limita la manipulación racional y modificación de su función. En este trabajo nosotros mostramos una caracterización termodinámica del plegamiento de la AGT y su proceso de asociación en función del pH y temperatura, usando calorimetría de barrido diferencial (DSC) y calorimetría de dilución isotérmica (IDC). La AGT es monomérica a pH 2, con uno de sus cuatro dominios tipo heveína desplegado a temperatura ambiente. En tales condiciones, la proteína exhibe un proceso de desplegamiento térmico totalmente reversible, compuesto de tres transiciones de dos estados cada una. Con valores muy ácidos de pH, la proteína forma un dímero débil no obligado. Este desarrollo contrasta con lo observado para otras lectinas de plantas estudiadas, que forman fuertes oligómeros obligados. Lo cual indica muy diferentes bases moleculares para la AGT funcional. Para la formación del dímero, los cuatro dominios deben estar debidamente plegados. No obstante, dependiendo de las condiciones de la solución, la asociación puede estar acoplada con el plegamiento del dominio menos estable. Por lo tanto, la dimerización puede proceder como una asociación tipo cuerpo rígido o como un evento de plegamiento inducido por unión. Este desarrollo híbrido no ha sido visto en otras lectinas de plantas. La reciente visión molecular para el ensamblaje de la AGT nos revela que se debe hacer una reexaminación de los datos de unión al ligando ya existentes en la literatura.

INTRODUCCIÓN

En las membranas celulares de metazoarios hay una gran cantidad de glicoconjugados expuestos al solvente, denominada conjuntamente como glicocáliz, el cual, entre sus múltiples funciones, sirve como un aparato muy sofisticado de identidad celular, que permite al organismo diferenciar entre lo propio y lo no propio (Sharon, 2008). Ejemplos notables de ello son los grupos sanguíneos o los determinantes de histocompatibilidad, los cuales poseen estructuras oligosacáricas que permiten al organismo reconocer a sus propias células y diferenciarlas de agentes extraños (Gabiús, 2002 y 2000). Asimismo, algunos agentes patógenos aprovechan esta interacción creando etiquetas moleculares tales que les permiten entrar en las células; como es el caso del virus de la influenza, que reconoce glicoconjugados de células epiteliales de los bronquios (Schwefel, 2010; Less, 1994).

La información asignada por los carbohidratos ha sido denominada como el “código azucarado”. Esta información es “descodificada” en la naturaleza a través de la interacción no covalente de las lectinas, un grupo amplio y estructuralmente diverso (Sharon y Lis, 2004).

ANTECEDENTES

LECTINAS

Las lectinas son un grupo de proteínas no enzimáticas especializadas en reconocer carbohidratos con alta especificidad y afinidad. Lectina es una palabra derivada del latín, que significa “escoger” o “seleccionar”. Estas proteínas interactúan con los carbohidratos de una manera no covalente. Las lectinas se encuentran presentes en todo tipo de organismos, desde virus o bacterias hasta plantas o animales (Lis y Sharon, 1998; Sharon y Lis, 2004; Sinha, 2007; Sharon, 2008). Las primeras lectinas estudiadas se encontraron en extractos de plantas (Lis y Sharon, 1998; Sharon y Lis, 2004). La ricina fue la primera lectina descubierta, cuando Stillmark en 1888 observó actividad aglutinante de células en extractos de la planta *Ricinus communis* (Franz, 1988). La primera lectina en ser purificada a homogeneidad y cristalizada fue la concanavalina A (aislada de *Canavalia ensiformis*), por Summer, en 1936. Fue en la primera hemaglutinina que se demostró la inhibición por sacarosa, observándose así la especificidad de las lectinas por estructuras sacarídicas (Sharon y Lis, 2004).

Las lectinas tienden a formar homooligómeros. Cada subunidad posee al menos un sitio de reconocimiento de carbohidratos. De esta manera, las lectinas tienen una capacidad multivalente, que les permite servir como puentes de entrecruzamiento entre glicoconjugados. Esta característica es la base molecular para que las lectinas sean capaces de aglutinar poblaciones celulares, razón por la cual también se les conoce como aglutininas. (Lis y Sharon, 1998; Sharon y Lis, 2004; Chavelas et al., 2004; Hai-Yan et al., 2007, Sinha, 2007, Sharon, 2008.).

En el caso de lectinas de plantas, se han detectado funciones biológicas de diversa índole, como son: regulación fisiológica, defensa contra el ataque de microorganismos, almacenamiento de proteínas, transporte de carbohidratos,

estimulación mitogénica, simbiosis entre plantas leguminosas y sus bacterias fijadoras de nitrógeno (*Rhizobium*) (Lis y Sharon, 1998; Sharon y Lis, 2004).

Las lectinas pueden ser de tipos y formas muy variadas. Han sido agrupadas con base en diferentes propiedades. Una clasificación ahora en desuso consideraba la especificidad a carbohidratos por parte de las lectinas (Sharon y Lis, 2004). Recientemente, las clasificaciones se han basado preferentemente en propiedades estructurales y filogenéticas. La base de datos LECTINES (www.cermav.cnrs.fr/lectines) hace una primera división de las lectinas en función del organismo, y luego subdivide considerando el “motif” estructural (Sharon y Lis, 2004).

Hasta el momento, la lectina más pequeña caracterizada es la heveína del árbol del hule (*Hevea brasiliensis*), que tiene 43 aminoácidos y forma 4 puentes disulfuro. Esta lectina es producida en abundancia por las células laticíferas, y es uno de los principales agentes alérgicos en productos derivados del látex (Rodríguez et al., 1988). Entre las lectinas de plantas, la estructura secundaria más frecuente es la hebra beta. Dentro de los diferentes tipos de arquitecturas se encuentra el β -prisma, jelly roll y con dominio tipo heveína (Sinha et al., 2007).

Las lectinas han resultado ser herramientas moleculares de inmenso valor en la investigación médica y otras aplicaciones biotecnológicas. En pacientes con enfermedades por deficiencia de lectinas, hay una perspectiva para una terapia por reemplazamiento de lectinas. Entre otros usos terapéuticos están los medicamentos antivirales por lectinas, los tratamientos antiadhesión de microbios causantes de enfermedades, la elaboración de tratamientos contra condiciones patológicas mediadas por leucocitos como asma, choques sépticos, golpes e infartos; asimismo hay otras lectinas que se han observado involucradas en la metástasis. También se realiza el diagnóstico de enfermedades con algunas lectinas (Sharon, 2008).

LA AGLUTININA DE GERMEN DE TRIGO.

En 1963, cuando se estudiaban las propiedades de membrana de algunas poblaciones celulares, se sospechaba que una célula “maligna” (tumoral) debía presentar alteraciones en su membrana celular con respecto a células normales. Al compararse la respuesta de células sanas con células de tumor murino hacia extractos de lipasas de germen de trigo, se observó una aglutinación preferencial de las células tumorales (Aub et al., 1963). Estos experimentos condujeron al descubrimiento de la Aglutinina de Germen de Trigo (AGT). Posteriormente, se observó aglutinación de AGT con células de pacientes con leucemia (Aub, 1965). Indagando sobre la composición molecular del extracto de germen de trigo, se identificó por cromatografía líquida una impureza en el extracto de lipasas de germen de trigo. Descubrieron una proteína elongada de aproximadamente 26 kDa, responsable de la aglutinación, con especificidad hacia la N-Acetilglucosamina (GlcNAc) (Burger y Goldberg, 1967).

A partir de los años setentas, se estudió arduamente la AGT. Se investigaron sus características fisicoquímicas, se cristalizó y se realizaron pruebas para buscar su función biológica, así como su potencial uso clínico y biomédico (Wright, 1974; Nagata y Burger, 1974; Privat et al., 1974)

CARACTERÍSTICAS Y ESTRUCTURA DE LA AGLUTININA DE GERMEN DE TRIGO.

La AGT se purifica mayoritariamente del embrión de la semilla, aunque también está presente con menor abundancia en el tallo y la raíz de la planta (Miller y Bowles, 1982). También se ha expresado de manera recombinante en *Saccharomyces cerevisiae* (Nagahora et al., 1992).

Hasta ahora se han caracterizado tres variedades de AGT, nombradas como isoformas 1, 2 y 3. La identidad entre estas tres isolectinas es del 95-97%. Las diferencias en secuencia se encuentran en las posiciones 9, 53, 56, 59, 66, 93, 109, 119, 123 y 171 (Wright et al., 1984, 1986; Wright, 1981).

En estudios tempranos, se determinó el peso molecular de esta lectina por sedimentación. En una solución de pH neutro, se observó que la proteína tiene un masa molecular de $35,000 \pm 1,000$ Da (Nagata y Burger, 1974), mientras que en 0.05 N de HCl (pH 1.3) la masa es de $17,000 \pm 1000$. A la AGT se le ha caracterizado conformacionalmente con diversas técnicas espectroscópicas. Se ha reportado que en valores de pH de 3.5 a 9, se obtienen espectros de fluorescencia muy semejantes entre ellos, indicando que la proteína es estable en todo ese intervalo de pH. La longitud de onda máxima para todos los pH se reporta alrededor de 348 nm (Privat et al., 1974). Por otro lado, el espectro de dicroísmo circular se caracteriza por la presencia de un pico máximo alrededor de 225 nm. Este pico "anómalo" en un principio fue atribuido a la presencia de los numerosos puentes disulfuro encontrados en la AGT. Sin embargo, ahora se sabe que resulta de las cuatro hélices α izquierdas que cada monómero posee en su conformación nativa (Rodríguez-Romero et al., 1989).

Se han resuelto las estructuras tridimensionales de las tres isoformas de AGT mediante cristalografía de rayos X. Actualmente hay 13 estructuras depositadas en el Protein Data Bank de las cuales 8 pertenecen a la isoforma 1 (Tabla 1). En todas estas estructuras, la AGT ha sido encontrada como un homodímero, tanto en presencia como en ausencia de su ligando (Wright, 1974; 1977; 1980; 1984; 1987; 1989; 1990; 1992; 1993; Wright et al., 1974; 1984; 1986; 1989; Muraki et al., 2002; Sinha et al., 2007; Schwefel, 2010).

TABLA 1. ESTRUCTURAS 3D DE LA AGT DISPONIBLES EN EL PDB				
PDB	RESOLUCIÓN (Å)	AUTOR	AÑO	ISOFORMA
2X3T	2.75	Schwefel et al.	2010	1
2X52	1.7	Schwefel et al.	2010	3
2UVO	1.4	Schwefel et al.	2008	1
2UWG	1.6	Schwefel et al.	2007	1
1K7T	2.4	Muraki et al.	2001	3
1K7U	2.2	Muraki et al.	2001	3
1K7V	2.2	Muraki et al.	2001	3
1WGT	1.9	Harata et al.	1995	3
2CWG	2.0	Wright y Jaeger	1993	1
9WGA	1.8	Wright.	2009	1 y 2
7WGA	2.2	Wright.	1990	1
2WGC	2.2	Wright.	1990	1 y 2
1WGC	2.2	Wright.	1990	1

El monómero de AGT tiene 171 residuos aminoácidos y masa molecular de 17.1 kDa. Cada subunidad consta de cuatro dominios (A, B, C y D), de 42-43 residuos de aminoácidos, los cuales son muy parecidos a la heveína, es por eso que se le agrupa dentro de la familia de lectinas con dominio tipo heveína (Sinha et al., 2007; Espinosa et al., 2000; Wright, 1992). Cada dominio está formado por dos hebras β y una pequeña hélice α izquierda y está estabilizado por cuatro puentes disulfuro (figura. 1), dando un total de 16 puentes disulfuro por monómero y 32 por dímero. Como se muestra en la figura 2, los monómeros se asocian de forma antiparalela, originándose los contactos entre dominios A1-D2, B1-C2, C1-B2 y D1-A2 (Wright y Kellog, 1996; Wright, 1987).

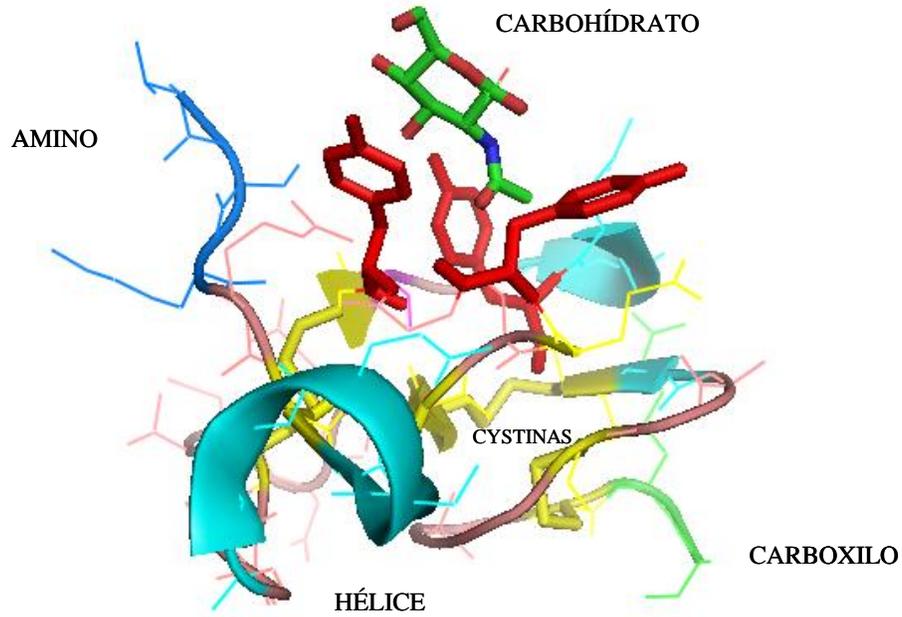


FIGURA 1. Dominio B de la AGT. Se muestra la hélice izquierda en azul y las dos hebras β en amarillo. El sitio de unión al carbohidrato está formado por un cúmulo de tres residuos aromáticos (Tyr). Generado a partir de PDB 2UVO.

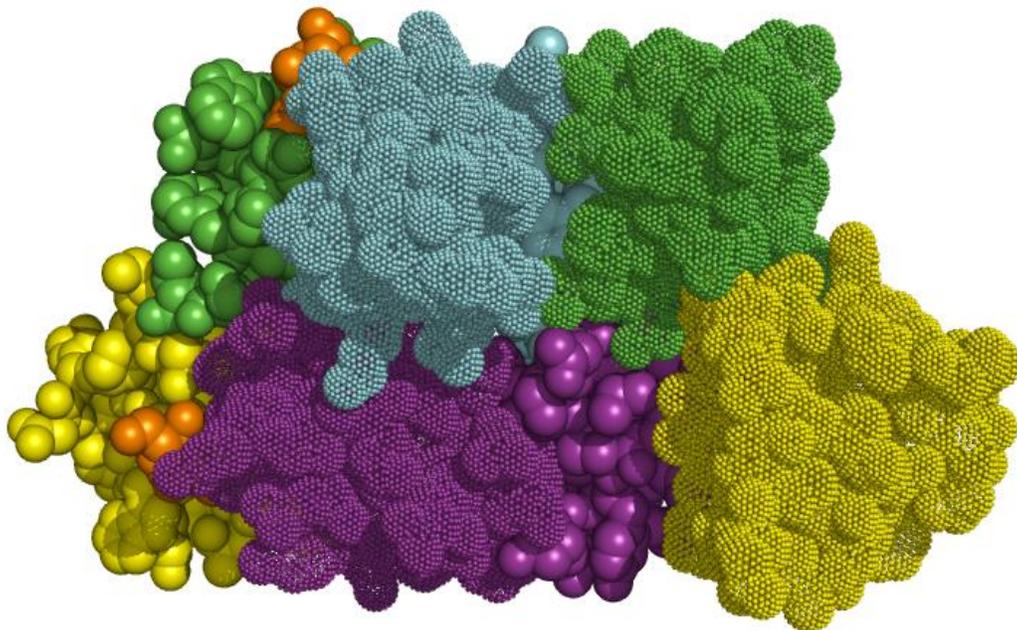


FIGURA 2. Dímero de la Aglutinina de Germen de Trigo (PDB 2UVO). Se aprecian los cuatro dominios en cada monómero (A, púrpura; B, azul; C, verde; D, amarillo). Se observa la forma de asociación homodimérica antiparalela, así como su unión al carbohidrato (naranja) entre dos dominios intercatenarios.

La AGT muestra un patrón estructural semejante al de algunas neurotoxinas de venenos de víbora, por lo que también se le ha agrupado en la familia con un motivo tipo toxina-aglutinina. En este tipo de proteínas está altamente conservado el número, conectividad y posición de sus puentes disulfuro, aunque los tamaños de las asas varían (Drenth et al., 1980).

Cada uno de los cuatro dominios que constituyen el monómero tiene un sitio de unión a carbohidrato. Se ha visto que los aminoácidos que interactúan directamente con el carbohidrato son Ser, His, Asp, Glu, Tyr, Arg, Asn y Trp, aunque el dominio B carece de este último residuo aromático. El anillo aromático de una Tyr forma contactos hidrofóbicos con la cara hidrofóbica del carbohidrato, mientras que los otros residuos proveen donadores y aceptores de puentes de hidrógeno que se enlazan con los grupos hidroxilo y N-acetilo del carbohidrato. Cada sitio de reconocimiento de carbohidratos está localizado en la interfase dimérica, conformado por tanto por dos dominios intercatenarios (Wright y Kellogg, 1996). Los sitios están compuestos por dos regiones, una primaria, compuesta por los tres residuos aromáticos y una Ser altamente conservados, provenientes de un dominio y otra región secundaria, no conservada, que consiste de uno o dos residuos polares que pertenecen al dominio de la otra subunidad.

ESPECIFICIDAD DE LA AGLUTININA DE GERMEN DE TRIGO A CARBOHIDRATOS.

En los primeros estudios de unión a carbohidratos de la AGT, se observó su especificidad por la GlcNAc. También se sugirió que esta lectina podría tener dos sitios de unión a este carbohidrato, ubicados uno a cada extremo de la proteína, los cuales sirven como puentes de unión entre células durante el proceso de aglutinación (Nagata y Burger, 1974; 1972). Posteriormente, se vio que la AGT es específica a la quitina, es decir, por el polímero lineal $\beta 1 \rightarrow 4$ de GlcNAc. La afinidad de la AGT por el di y trisacárido de la GlcNAc es progresivamente mayor que por la del monosacárido. Las constantes de unión han sido determinadas mediante diversos métodos, reportándose valores que varían significativamente de un estudio a otro. La tabla 2 muestra algunos ejemplos de estos valores,

determinados usando diferentes técnicas. En cambio, la afinidad por el tetrasacárido u oligómeros más largos es similar a la del trisacárido, sugiriendo que el sitio de unión de la AGT está compuesto por tres subsitios. Posteriormente, se reportó que la AGT, además de reconocer oligosacáridos $\beta(1-4)$ de la N-acetilglucosamina, también reconoce otros carbohidratos como a la N-acetil-D-glucosamina- $\beta(1,6)$ -D-galactopiranososa (GlcNAc $\beta(1,6)$ Gal) y al ácido siálico (Muraki, 2002).

Solamente se había mostrado evidencia de que la AGT tiene la capacidad de unir cuatro moléculas de carbohidrato por dímero (Wrgiht y Kellog, 1996; Wright, 1992; Van Landschoot et al., 1977; Kronis, 1985; Bains et al, 1992). Actualmente existen evidencias de que los 8 sitios de unión pueden estar ocupados con el carbohidrato simultáneamente (Schwefel, 2010)

TABLA 2. Comparación de las constantes de asociación de AGT-GlcNac obtenidas por distintos métodos ^a

Método	Fluorimetrí a	Diálisis al equilibrio	Fluorimetría	NMR	Espectroscopia UV	ITC
Ligando	Ka *10 ⁻³ (M ⁻¹)					
GlcNac		1.3	0.7	0.2		0.4
(GlcNac) ₂	13	20	4.5		10	5.0
(GlcNac) ₃	22	83	20			12
(GlcNac) ₄	66		23			12.1
(GlcNac) ₅						19

^a Tomada de Bains et al., 1992.

ALGUNAS APLICACIONES DE LA AGLUTININA DE GERMEN DE TRIGO

Desde el hallazgo de las lectinas y su alta especificidad a carbohidratos, estas proteínas han sido usadas en diversas investigaciones bioquímicas y biomédicas (García et al., 1995; Leick et al., 1997; Kilpatrick, 1999; Sharon y Lis, 2004).

En aplicaciones biomédicas ha sido muy estudiado el concepto de bioadhesión por lectinas, donde el objetivo es utilizar a estas proteínas para transportar medicamentos (Pellegrina et al., 2005; Bies et al., 2004). La AGT, por ser unidora de GlcNAc, es de gran utilidad para estudiar células que poseen este carbohidrato en su superficie. En especial, se sabe que las células “enfermas” aumentan su contenido de este carbohidrato en su superficie. La AGT ha resultado ser una eficiente transportadora de fármacos. Se ha estudiado su capacidad acarreadora por varias rutas en mamíferos, pues tiene la capacidad de atravesar mucosa nasal, pulmones, los ojos y la barrera hematoencefálica (Mistry et al., 2009; Gao et al., 2007; Bies et al., 2004; Schaeffer et al., 1982). También es considerada buena portadora vía oral por sus propiedades de mucoadhesión, citoadhesión, citoinvación y transitisión con enterocitos. (Wood et al., 2008; Gabor et al., 2004).

La AGT es capaz de inducir la apoptosis de células cancerígenas, provocándole a la célula pérdida de potencial transmembranal, disrupción de la membrana interna mitocondrial y pérdida de citocromo C, así como activación de la caspasa 9. Este es un patrón único descubierto para una lectinas, donde la AGT provoca apoptosis vía mitocondrial. Aunque el mecanismo molecular de este efecto sigue siendo desconocido (Gastman et al., 2005).

Asimismo los estudios de la AGT han avanzado al estudiarse su efectividad contra enfermedades específicas como el asma, la diabetes, la celiasis, el herpes, el Parkinson, Alzheimer entre otras (Liu et al., 2011; Wood et al., 2006; Surti et al., 2008; Isegawa et al., 2008; Sollid et al., 1986).

Como se ha mencionado anteriormente, la AGT es un sistema comúnmente utilizado en múltiples pruebas de laboratorio, y se le ha visualizado como un prometedor acarreador de fármacos, dada su afinidad por células cancerígenas. A pesar de su significativa importancia como herramienta biotecnológica y biomédica, hasta el momento prácticamente no se sabe nada sobre la forma en que se ensambla esta lectina dimérica y cómo llega a la formación de sus sitios de unión intracatenarios, por lo que en el presente estudio se planteó la caracterización detallada de su plegamiento y auto-asociación mediante técnicas espectroscópicas y calorimétricas que se explican brevemente a continuación.

MÉTODOS CALORIMÉTRICOS.

Para obtener una descripción termodinámica completa del equilibrio de desnaturalización de una proteína se utiliza la calorimetría diferencial de barrido de alta sensibilidad (DSC) (Sánchez-Ruiz, 1995). El método calorimétrico es el único que no necesita suponer *a priori* los mecanismos de estos procesos (Privalov, 1979). Esta técnica proporciona el método más eficiente para la determinación de valores de ΔG correspondientes al desplegamiento de proteínas

Los estudios de DSC sobre la desnaturalización térmica de proteínas han jugado un papel fundamental en el desarrollo de los actuales puntos de vista acerca de los factores que determinan la estabilidad de las proteínas (Freire et al., 1990; Sánchez-Ruiz, 1995).

Mediante un experimento de DSC, es posible obtener la capacidad calorífica (C_p) de una disolución de proteína en función de su temperatura. El perfil de C_p frente a la temperatura (termograma) suele mostrar un pico o transición correspondiente al desplegamiento de la proteína, a partir del cual los parámetros energéticos básicos del proceso de desnaturalización (temperatura de desnaturalización, ΔH y ΔC_p) pueden obtenerse en forma directa.

El análisis de esta dependencia nos dará una caracterización termodinámica completa de la transición que ha tenido lugar por efecto de la temperatura (ΔG , ΔH , ΔS y ΔC_p). En un termograma típico de DSC, la transición se manifiesta por un pico que corresponde a un proceso endotérmico. En general, los experimentos de DSC analizados nos dan información a cerca de la capacidad calorífica absoluta de una molécula, así como el conjunto de parámetros termodinámicos (cambio de entalpía ΔH , cambio de entropía ΔS y cambio en la capacidad calorífica ΔC_p) asociados a la transición inducida por la temperatura (Freire et al., 1990; Sánchez-Ruiz, 1995).

Un microcalorímetro de DSC consiste básicamente en dos celdas idénticas, una de referencia y otra de muestra. Al comenzar un barrido se suministra a las resistencias eléctricas, que se encuentran asociadas íntimamente a la superficie de cada celda, la misma intensidad de corriente cuyo valor está fijado por la velocidad de barrido seleccionada. Para medir la diferencia en capacidad calorífica de las celdas se utiliza el modo de compensación, de manera que cuando se produce algún efecto térmico (desnaturalización de una proteína...), la termopila, que se encuentra en contacto con las celdas, detecta una diferencia de temperatura entre éstas y suministra una señal eléctrica proporcional que va a servir para incrementar mediante un sistema regulador, la potencia recibida por la celda de menor temperatura. La diferencia de temperatura entre la celda de muestra y de referencia se mantiene de esta manera igual a cero por un mecanismo de retroalimentación, a medida que la temperatura aumenta o disminuye a velocidad de barrido constante. La diferencia de potencia que necesita ser aplicada a la celda de muestra para mantener ΔT igual a cero es seguida continuamente en función de la temperatura (figura 3). Esta potencia eléctrica diferencial (generalmente dada en $\mu W/s$, $\mu J/s$ o en $\mu cal/s$) es directamente proporcional a la diferencia de capacidad calorífica entre ambas celdas ($\mu J/grado$ o $\mu cal/deg$) y constituye la magnitud fundamental medida en este instrumento. La adiabaticidad del sistema se consigue rodeando ambas celdas de corazas concéntricas que las separan del medio. La temperatura de estas corazas se controla a través de termosensores y efectores apropiados para que en todo momento la temperatura de las celdas este igual (figura 3). El VP-DSC opera en un intervalo de temperaturas que van desde -10 hasta 120 °C, usando un mecanismo Peltier, de manera que no se requieren mecanismos externos de calentamiento o enfriamiento. Las velocidades de barrido pueden ser seleccionadas por el usuario del rango de 0 a 1.5 K/min. Tiene un sistema mecánico de presurización que alcanza 2 atmósferas (Plotnikov, 1997).

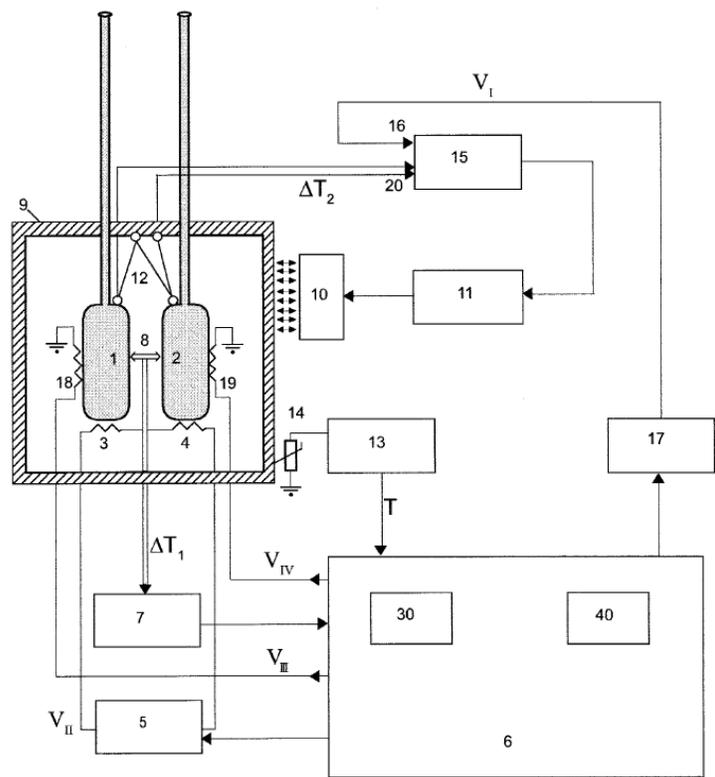


Figura 3 Esquema del microcalorímetro diferencial de barrido. Donde 1 y 2. Celdas de referencia. 3 y 4. resistencias eléctricas. 5. Suministro de poder. 6. Computadora. 7 y 8 Sensor para medir ΔT_1 . 9. Coraza térmica. 10. Sensor para medir ΔT_2 .

La calorimetría de dilución isotérmica (IDC, por sus siglas en inglés) es una técnica que permite estudiar el calor de interacción entre dos moléculas idénticas. En este caso, cuando las dos moléculas se disocian, se puede absorber o generar calor. La medición de este calor permite una determinación precisa de la constante de disociación-asociación (K_d o K_a) entre las moléculas.

Para realizar los experimentos de IDC, se utilizó un microcalorímetro de titulación isotérmica VP-ITC equipo (MicroCal[®]) (Isothermal Titration Calorimetry) (figura 4).

Un instrumento de ITC consiste en dos celdas idénticas rodeadas por una cubierta adiabática (figura 4). Los termopares que rodean a las celdas detectan

diferencias de temperatura entre las dos celdas y entre las celdas y la chaqueta. Los calentadores localizados en ambas celdas y en la chaqueta son activados cuando es necesario mantener temperaturas idénticas entre todos los componentes (Pierce, et al, 1999).

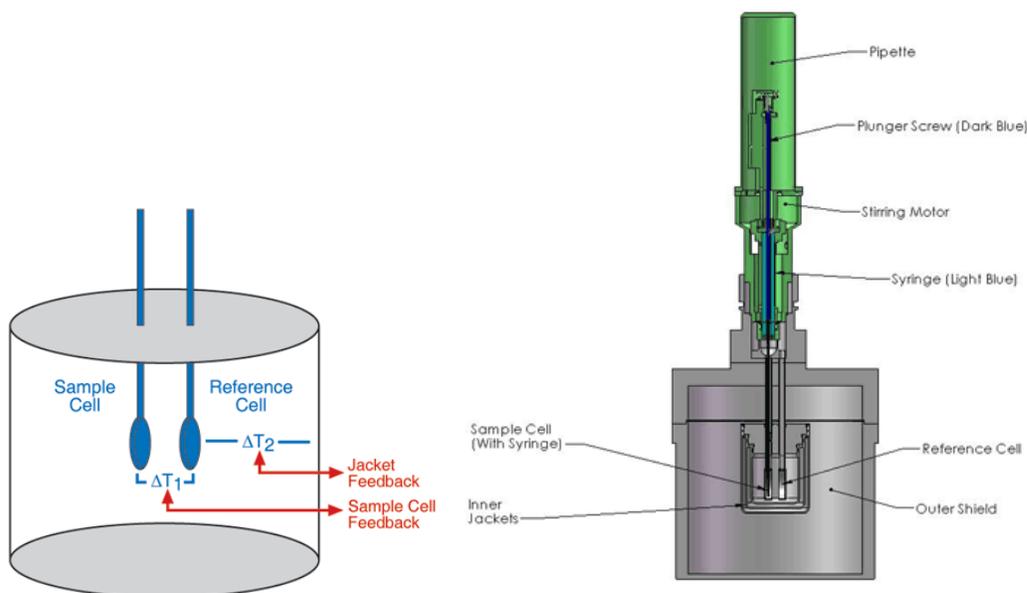


Figura 4. Esquema del calorímetro de titulación isotérmica.

MÉTODOS ESPECTROSCÓPICOS.

El dicroísmo circular es uno de los métodos más adecuados para detectar cambios conformacionales en una proteína en disolución, debido a que son moléculas asimétricas que interactúan de distinta manera con la luz circularmente polarizada derecha e izquierda (Mohammed y Woody, 1985).

Los espectros de dicroísmo en la región del ultravioleta lejano, se deben principalmente a los enlaces amida que unen los residuos de los aminoácidos entre sí. La asimetría de estos cromóforos se debe al arreglo espacial de la cadena principal de la proteína, por lo cual, las señales de dicroísmo circular se pueden interpretar en términos del contenido de estructura secundaria presentes,

es decir, del porcentaje de residuos que se encuentran en alguna conformación estructural (hélices- α , hojas- β , giros y otros tipos estructurales) (Manalavan y Johnson, 1983).

Para detectar la estructura secundaria de una proteína, se toma el espectro de CD en el ultravioleta (UV) lejano, que es por debajo de la longitud de onda de luz ultravioleta desde 250 hasta 190 nm. El espectro de una estructura de α -hélice presenta dos mínimos, uno alrededor de 222 y de 208 nm. La intensidad de las bandas da una idea del contenido de estructura que tiene la proteína. La estructura β sólo presenta un pico negativo alrededor de 210 nm. (Manalavan y Johnson, 1983).

La dispersión de luz dinámica (DLS), es una técnica que a través de la dispersión de luz mide el tamaño hidrodinámico de proteínas y nanopartículas, para así proporcionar la caracterización del tamaño y el peso molecular de las partículas en solución.

La fluorescencia intrínseca de proteínas se usa comúnmente para detectar y seguir cambios conformacionales a través de cambios en el ambiente de los fluoróforos.

HIPÓTESIS.

A través de la caracterización calorimétrica y espectroscópica de los procesos de desplegamiento y disociación de la aglutina de germen de trigo, será posible inferir las bases moleculares que dictan la estabilidad de esta lectina con sitios de unión ubicados en la intercara del homodímero, información que permitirá derivar conocimiento nuevo sobre su mecanismo de acción.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Estudiar el ensamblaje de la AGT determinando la energética del plegamiento de las subunidades y su asociación para llegar al estado dimérico funcional.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Definir las condiciones de pH en donde la desnaturalización térmica de la AGT sea reversible.
2. Caracterizar el patrón de desplegamiento térmico al equilibrio de la AGT.
3. Encontrar las condiciones experimentales que permitan caracterizar la disociación del dímero de AGT, y caracterizar el proceso mediante calorimetría de dilución isotérmica.
4. Obtener los parámetros termodinámicos globales de estabilidad de la conformación dimérica funcional de la AGT.

MATERIALES Y MÉTODOS

La aglutinina de germen de trigo se obtuvo de Sigma Chemical Co (L9640). Esta proteína viene en mezcla de tres isoformas. Se utilizó la isoforma 1, ya que es la más abundante. Se separó con una columna de intercambio catiónico Mono S HR 16/10, conectada a un sistema de HPLC o FPLC. Se equilibró la columna con un amortiguador de ácido fórmico 0.02M, pH 4. La separación de la matriz se realizó con un gradiente lineal de 0 a 40% de LiCl 0.75M, con un flujo de 1 ml/min.

Las fracciones purificadas de la isoforma 1 fueron equilibradas en amortiguador y concentradas en un Amicon Ultra 10 K (cutoff 10 kD, PM10).

La concentración de la AGT se determinó leyendo su absorbancia a 280 nm en un espectrofotómetro ultrospec 3000 de Pharmacia Biotech, usando un coeficiente de extinción $A_{280nm} = 1.27 \text{ mg}^{-1}\text{cm}^2$. La masa molecular del monómero es de 17.1 kDa. (Muraki et al., 2002).

CALORIMETRIA DE BARRIDO DIFERENCIAL (DSC)

La muestra de proteína para el experimento calorimétrico se preparó de manera muy cuidadosa. La concentración de la AGT debe estar determinada de manera precisa, ya que un error en la concentración se vería reflejado en la medida de los parámetros termodinámicos que se derivan del termograma.

Se realizaron mediciones del desplegamiento térmico de la AGT mediante el equipo antes descrito. Se usaron varios amortiguadores (tabla 3) en el intervalo de temperatura de 10 a 115 °C a velocidades de barrido de 60 y 90 °C/min. Mediciones adicionales fueron realizadas en presencia de guanidina-HCl con diferentes concentraciones. Las disoluciones con las que se llenaron las celdas del calorímetro son previamente equilibradas con la solución amortiguadora, filtradas y desgasificadas al vacío. Para asegurar un fácil y adecuado llenado de las celdas, se prepararon 1.5 mL de muestra de proteína.

Idealmente, si las dos celdas del calorímetro fuesen idénticas, bastaría un solo barrido para determinar la diferencia de capacidad calorífica entre las soluciones de muestra y de referencia. Sin embargo, dado que no son iguales, es necesario registrar la señal con solución amortiguadora en ambas celdas, para lograr una historia térmica constante de las celdas. Después esta línea base se le restará al perfil proteína-amortiguador.

Tabla 3. Amortiguadores empleados con la AGT	
AMORTIGUADOR	pH
H2SO4-Na2SO4 50 mM	1.3
Glicina-HCl 50 mM	2 a 3.5
Acetatos 50 mM	4 a 5
Fosfatos 50 mM	6 a 7
TRIS	8.5

Los termogramas obtenidos se importan al programa MicroCal Origin para DSC 7. Se les resta la línea base y se normalizan los datos por concentración.

El ajuste de los parámetros de desplegamiento para las transiciones calorimétricas se realizó con los modelos del mismo programa (MicroCal Origin para DSC 7), con el modelo de transiciones independientes y de transiciones secuenciales.

Los parámetros obtenidos fueron: T_m , que se define como la temperatura a la cual ocurre la mitad de la transición y el ΔH_U , que es el cambio total de entalpía debido al proceso de desnaturalización, que se calcula directamente del perfil de DSC como el área bajo la curva.

La entalpía de van't Hoff (ΔH_{vH}), fue calculada desde las trazas calorimétricas, de acuerdo a:

$$\Delta H_{vH} = 4RT_{1/2} \frac{C_{exc}}{\Delta H_{cal}} \quad (1)$$

Donde R es la constante de los gases, $T_{1/2}$ es la transición media de temperatura, $C_{exc1/2}$ es el exceso de capacidad calorífica a está temperatura y ΔH_{cal} es la entalpía calorimétrica.

CALORIMETRÍA DE DILUCIÓN ISOTÉRMICA (IDC).

Se ensayó la disociación de la AGT con IDC, para obtener su constante de asociación K_a . Se concentró la proteína para obtener un concentrado de proteína entre 0.7 y 1.2 mM, mismo que se colocó en la jeringa del equipo. Se calibró el equipo con el mismo amortiguador del ensayo, hasta tener una línea base constante. La proteína en la jeringa se fue inyectando en cantidades de 10 μ l con intervalos de 400 segundos. La curva resultante se ajustó con un modelo de disociación simple (Bello, et al. 2011), el cual programamos en ORIGIN, para obtener la constante y la entalpía de disociación del dímero mediante el calor medido en la adición de la inyección i^{th} de un volumen dV_i en la celda del calorímetro:

$$q_i = \Delta H_{disc} [P_2]_{syr} dV_i - \Delta H_{disc} ([P_2]_i - [P_2]_{i-1}) \left(V_0 + \frac{dV_i}{2} \right) + q_{dil} \quad (2)$$

Donde ΔH_{disc} es la entalpía de disociación del dímero, $[P]$ y $[P_2]$ son las concentraciones molares de monómero y dímero respectivamente y q_{dil} es el calor de dilución de la proteína. La concentración de dímero en la celda de reacción $[P_2]_i$ y en la jeringa $[P_2]_{syr}$, están relacionadas a la concentración de monómero equivalente, $[P_T]$, a través de la constante de disociación:

$$[P_T] = [P] + 2[P_2] = K_{disc}^{1/2} [P_2]^{1/2} + 2[P_2] \quad (3)$$

Donde K_{disc} es la constante de equilibrio de disociación. ΔH_{disc} y K_{disc} fueron determinadas a través de una regresión no lineal obtenida con las ecuaciones 2 y 3.

DICROISMO CIRCULAR (CD).

La desnaturalización/renaturalización de la AGT se siguió por dicroísmo circular en distintos amortiguadores modificando su pH, como se muestra en la tabla 3. Los espectros de dicroísmo circular en el ultravioleta lejano se hicieron por triplicado, con una concentración de 0.02 mM de proteína (300 µg/ml). Se hizo un barrido desde 250 hasta 200 nm, en una celda de cuarzo de 0.2 cm de paso de luz, en los distintos valores de pH a 25°C.

Para seguir la desnaturalización por temperatura, se tomó el punto de máxima señal del espectro (225 nm) y se realizó un barrido variando la temperatura entre 25 y 100°C, aumentando 1 °C por minuto. Al llegar a 90°C se hizo nuevamente la medición del espectro de 250 a 200 nm. Finalmente, la muestra fue enfriada también a una velocidad de 1 °C por minuto, y se le tomó el espectro nuevamente a 25 °C.

Para todas las mediciones se usó un espectropolarímetro de dicroísmo circular JASCO J-720, acoplado a un peltiere termoeléctrico con control de temperatura.

DISPERSIÓN DE LUZ DINÁMICA (DLS).

Se llevaron a cabo experimentos de dispersión de luz dinámica (DLS, por sus siglas en inglés) para determinar los radios hidrodinámicos de la AGT con un equipo Zetasizer Nano-S de Malvern Instruments en una celda de 45 µl. Se midieron concentraciones distintas de proteína: 2, 4 y 7.7 mg/mL, en el respectivo amortiguador (ver Tabla 3). Con pH de 3, 4 y 5, se midió la AGT a una concentración de 1 mg/ml. Se desnaturalizaron 2 mg/mL de la proteína en hidrocloreuro de guanidina 6 M y DTT 10 mM a pH 2, para determinar su diámetro. También se obtuvo el diámetro de la AGT en presencia de N-acetilglucosamina 5 mM a pH de 2.

FLUORESCENCIA (F).

Se hicieron ensayos de fluorescencia de la AGT, con una λ_{exc} 290 nm, correspondiente a la excitación de residuos de triptófano, y se midió la emisión en el intervalo de 300 a 480 nm. Se usó una concentración de proteína de 50 $\mu\text{g/ml}$ en pH de 2, 3, 4 y 5 (tabla 3).

CAMBIOS EN EL ÁREA SUPERFICIAL ACCESIBLE AL SOLVENTE Y ESTIMACIÓN DE EL CAMBIO EN LA CAPACIDAD CALORÍFICA.

Los cálculos de área superficial fueron llevados a cabo con el programa NACCESS (S.J. Hubbard, J.M. Thornton, NACCESS. Computer program, Department of Biochemistry and Molecular Biology, University College, London, 1993), usando un radio de prueba de 1.4 Å y un ancho de rodaja de 0.1 Å. Las coordenadas atómicas del dímero de AGT fueron tomadas del pdb 2UVO. Las coordenadas atómicas de las subunidades libres de la AGT fueron generadas borrando una de las subunidades del mismo pdb, asumiendo una asociación tipo cuerpo rígido. Los cambios en el área superficial accesible al solvente (ΔA) fueron estimados entre la diferencia del dímero y las dos subunidades libres. Los cambios de área polar (ΔA_p) y apolar (ΔA_{ap}), fueron obtenidos a partir del cambio en áreas accesibles de los átomos de nitrógeno/oxygeno y carbono/azufre respectivamente. Los cálculos estructurales de la capacidad calorífica de dimerización fueron generados usando el modelo empírico:

$$\Delta C_p = 0.45(\pm 0.03) \Delta A_p - 0.26(\pm 0.02) \Delta A_{ap} \quad (4)$$

Donde el coeficiente proporcional en $\text{cal mol}^{-1} \text{K}^{-1} \text{Å}^{-2}$ fue obtenido desde los datos de dilución de dipeptidos cíclicos (Murphy y Freire, 1992)

RESULTADOS

Para trabajar con la lectina, primero se hizo la separación de las tres isoformas de la aglutinina de germen de trigo (AGT) se realizó mediante cromatografía líquida de intercambio catiónico (ver materiales y métodos). Todos los estudios fueron realizados con la isoforma 1, que es la más abundante de las tres (figura 5).

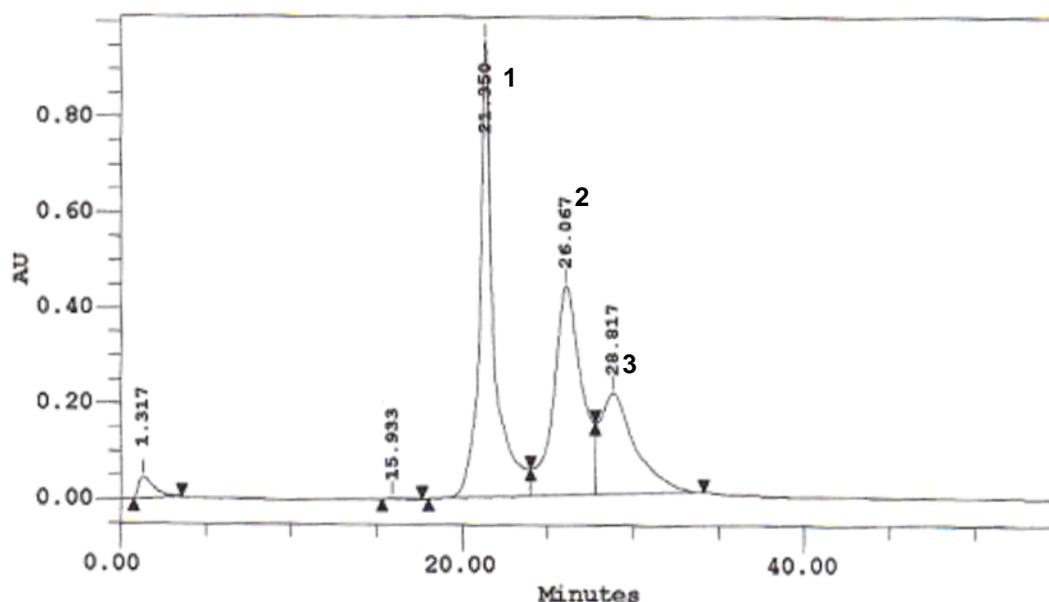


Figura 5. Perfil de elución de la AGT. Fue aplicada a una columna de intercambio catiónico Mono S HR 16/10 y eluida con Los tres picos del perfil cromatográfico corresponden a las tres isoformas, **1**, **2** y **3** respectivamente.

Como primer paso en este trabajo, se probó la estabilidad estructural de la proteína (AGT) a diferentes valores de pH. El objetivo fue establecer el intervalo de pH en que la forma nativa de la proteína es estable, así como las condiciones en las que fuera posible estudiar el proceso de desplegamiento de manera reversible. Se probaron valores de pH de 1.3, 2, 3, 4, 5, 6 y 8.5 (tabla 3), usando amortiguadores de pKa pertinente para disolver la proteína. Se compararon los espectros de dicroísmo circular en el ultravioleta lejano (CD). El espectro de CD de

AGT consiste básicamente de dos bandas, una positiva centrada alrededor de los 225 nm, y otra negativa, que aparece por debajo de 210 nm. Este patrón espectral es característico de proteínas constituidas exclusivamente por dominios tipo heveína (Rodríguez-Romero et al., 1989). Como se pueda observar en la figura 6, la banda positiva permanece prácticamente sin variación en todo el intervalo de pH estudiado, en tanto que la banda negativa muestra un claro incremento conforme se disminuye el pH.

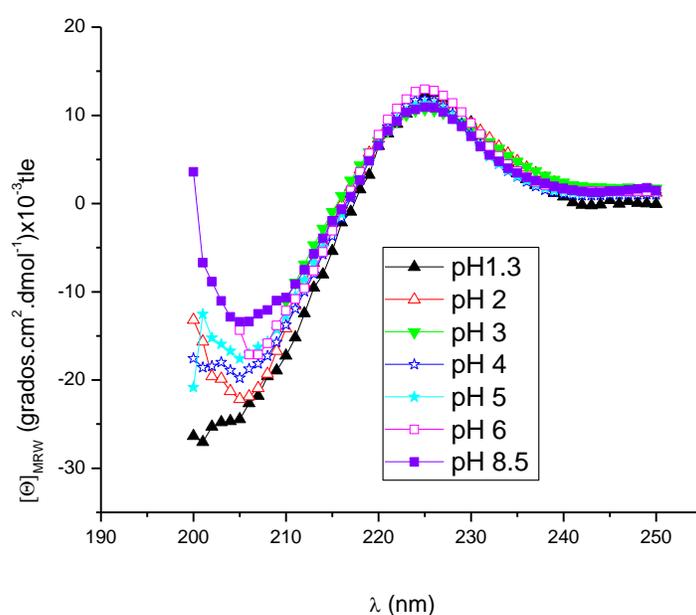


Figura 6. Espectros de CD de AGT en el ultravioleta lejano, en diferentes pH usando una concentración de proteína de 6 μ M.

Posteriormente, se estudió la desnaturalización térmica de la AGT, para lo cual se varió la temperatura desde 20 °C hasta 100°C, siguiendo la transición por CD a 225 nm, a una velocidad de calentamiento de 1 °C/min. Al aumentar la temperatura, se observó una leve baja de señal hasta llegar a 70°C, donde la señal cae abruptamente, pero sin llegarse a verse el fin de la transición (figura 7A). Se tomó el espectro con la proteína nativa a 25 °C, después del barrido de térmico hasta 90 °C, se tomó un espectro a alta temperatura, posteriormente se regresó la proteína paulatinamente a 25°C. El espectro a 90°C muestra la pérdida total del

pico a 225 nm (Figura 7B). Entre pH 1.3 y 4, el proceso térmico de desplegamiento resultó reversible, a juzgar por una completa recuperación de la señal de CD en una muestra previamente sometida a un ciclo de calentamiento-enfriamiento (figura 7C). En contraste, a pH 5 la reversibilidad decreció a 60% y arriba de pH 6 la recuperación de la señal fue casi nula, debido a una marcada tendencia de agregación de la proteína (figura 7D).

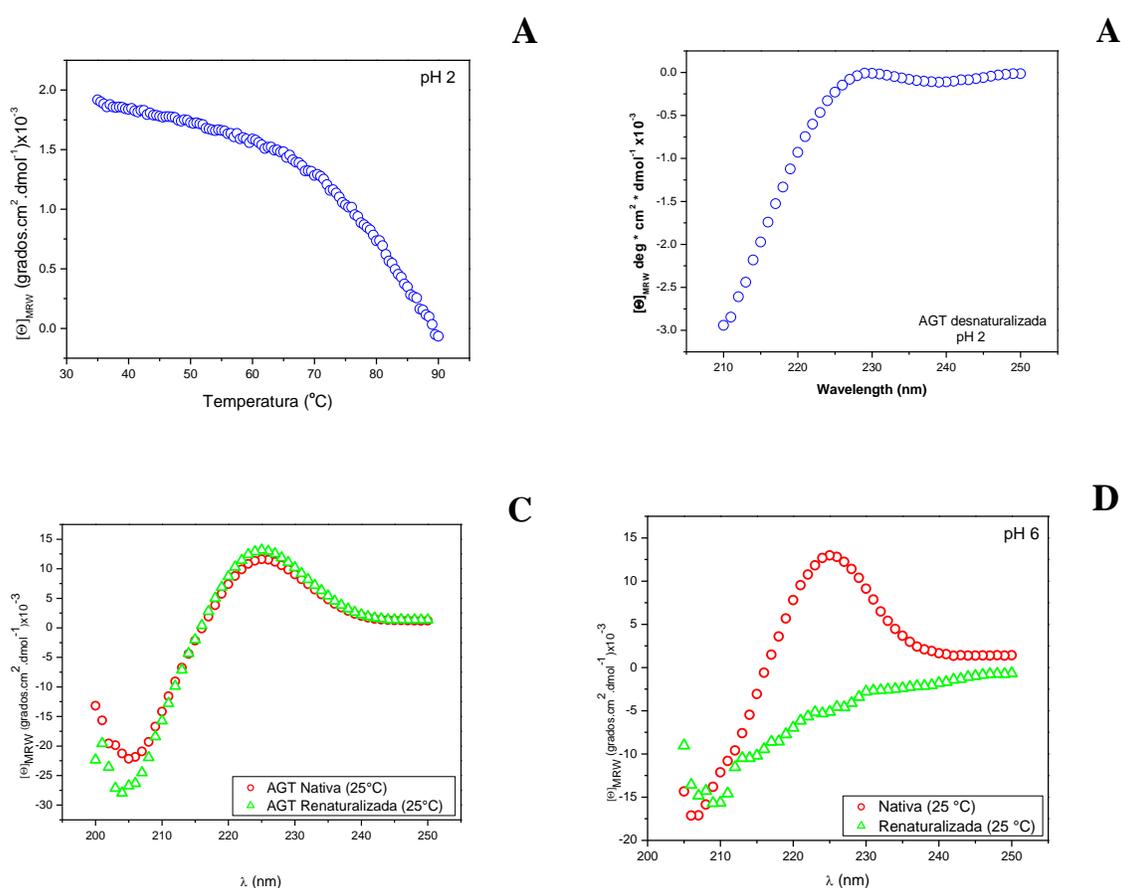


Figura 7. Espectros y barridos de AGT obtenidos con CD. **(A)** Barrido de temperatura de 30 a 90 °C, de la AGT a pH 2 en 225 nm. **(B)** Espectro de CD de la AGT a pH 2 en el ultravioleta lejano a 90 °C. **(C)** Espectros de DC a pH 2, en círculos la proteína nativa y en triángulos la renaturalizada. **(D)** DC de AGT en el UV lejano a pH 6, en círculos la nativa y triángulos la renaturalizada.

La figura 8 muestra endotermas de desplegamiento térmico obtenidas mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC), en el intervalo de pH de 2 a 7. Al igual que lo observado con DC, entre pH 2 y 4, el desplegamiento térmico resultó altamente reversible, a juzgar por la recuperación de al menos 90% de señal endotérmica (ver materiales y métodos), en tanto que la reversibilidad disminuyó drásticamente en tanto se aumentaba aun más el pH de la solución.

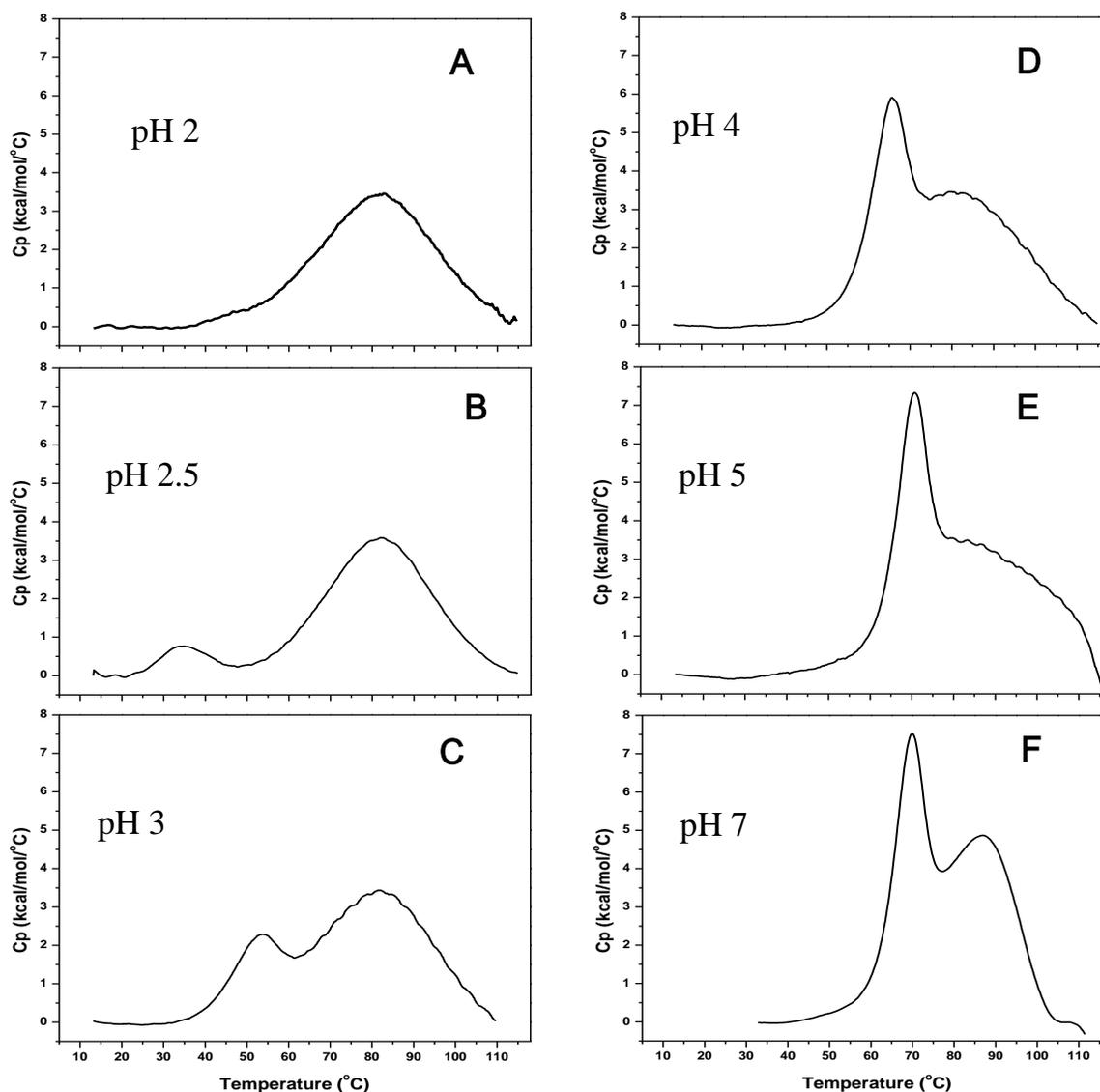


Figura 8. Perfiles calorimétricos de la perturbación térmica de AGT en función del pH. Todas los endotermas fueron obtenidos usando una concentración de 0.09 mM, excepto a pH 2.5 (B), dónde hay una concentración de 0.22 mM. Se uso una velocidad de calentamiento de 1 °C/mínuto en todos los endotermas. Por debajo de pH 4 hay reversibilidad de la proteína (A, B, C). La reversibilidad va decreciendo en pH 4 y 5 (D y E) y a pH 7 (F) se hace nula.

A pH 2, se observa un solo pico en el traza calorimétrica (figura 8A), el cual resultó ser independiente de la concentración de proteína (figura 9A), lo cual concuerda con estudios previos de sedimentación que indican que a ese pH la AGT es predominantemente monomérica (Chavelas et al., 2004; Nagata y Burger, 1974; Rice y Etzler, 1974). Por otro lado, al monitorearse el desplegamiento térmico de la AGT a pH 2 mediante DC a 225 nm, tampoco se observó dependencia con la concentración de proteína (figura 10), lo cual concuerda con los resultados de DSC. Conforme el pH se aumentó, fue apareciendo otro pico endotérmico a bajas temperaturas (figura 8B-F). Este pico (entre 40 y 65°C) resultó dependiente de la concentración de proteína (figura 9B), por lo tanto, corresponde a la disociación del dímero. A pH 2.5, el uso de baja concentración de proteína (por ejemplo, 0.09 mM) produjo un solo pico, similar al obtenido a pH 2, mientras que a mayor concentración (por ejemplo, 0.22 mM), se observa el segundo pico a baja temperatura (figura 8B).

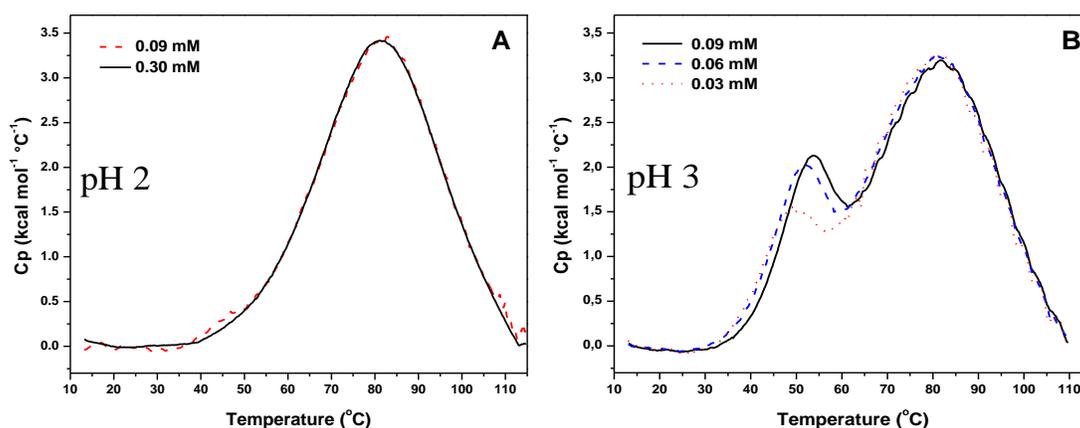


Figura 9. Perfiles calorimétricos de la perturbación térmica de la AGT en función de la concentración de proteína (A) pH 2 y (B) pH 3, en glicina-HCl 50 mM.

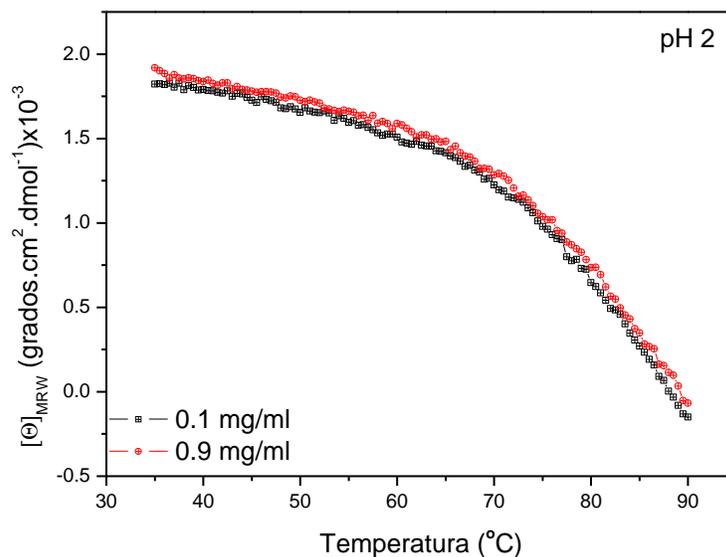


Figura 10. Barridos térmicos CD vs concentración proteína. AGT a pH 2 en 225 nm con diferentes concentraciones de proteína (6 μ M y 54 μ M).

DESPLÉGAMIENTO DE LA AGT MONOMÉRICA

El pico del termograma obtenido a pH 2 por DSC, es mas ancho que el de los otros pH ensayados y se extiende sobre un intervalo amplio de temperatura, lo que sugiere la presencia de intermediarios estables durante el proceso de desplegamiento de la AGT monomérica ($\Delta H_{vH}/\Delta H_{cal} = 0.3$). Un análisis de deconvolución del pico nos reveló que puede ser ajustado satisfactoriamente por un modelo de tres transiciones independientes de dos estados. En contraste, modelos del mismo programa (ver materiales y métodos) con cualquier otro número de transiciones que tienen un pobre ajuste o no convergen (figura 11).

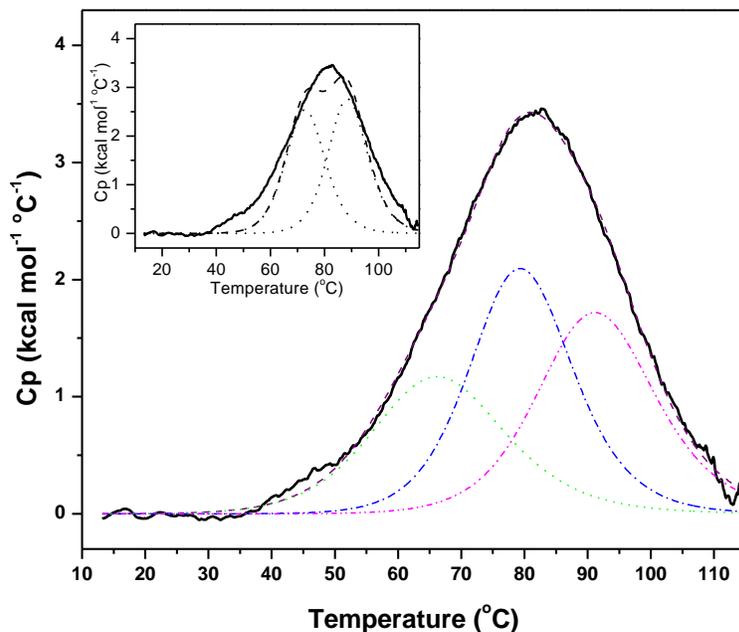


Figura 11. Análisis de deconvolución de los endotermas de AGT (0.09 mM) a pH 2. En el inserto del panel **A**, se muestra un ajuste con dos transiciones independientes.

Por otro lado, no se observaron diferencias significativas en los parámetros de desplegamiento entre los modelos de transiciones secuenciales e independientes (tabla 4). Este resultado es convincente por el hecho de que los tres valores de T_{mi} tienen una separación significativa entre ellos, lo cual implica el carácter independiente de cada dominio para su desplegamiento como evento independiente. En la tabla 5 se muestran los resultados de los parámetros obtenidos basados en un mecanismo de transiciones independientes.

Tabla 4. Comparación de los parámetros de desplegamiento para las transiciones secuenciales e independientes del monómero de AGT a pH 2.

	1	2	3
Transiciones independientes			
T_{mi} (°C)	68.0 ± 0.7	79.0 ± 0.6	91.1 ± 0.4
ΔH_{U_i} (kcal/mol)	31 ± 2	43 ± 3	42 ± 1
Transiciones secuenciales			
T_{mi} (°C)	66.3 ± 0.1	79.6 ± 0.1	92.5 ± 0.1
ΔH_{U_i} (kcal/mol)	34 ± 2	44 ± 2	43 ± 1

Tabla 5. Parámetros de desplegamiento para las transiciones calorimétricas del monómero de AGT a pH 2 y distintas concentraciones de GndHCl.

	Transiciones		
	1	2	3
<i>0 M GndHCl</i>			
T_{mi} (°C)	68.0 ± 0.7	79.0 ± 0.6	91.1 ± 0.4
ΔH_{U_i} (kcal/mol)	31 ± 2	43 ± 3	42 ± 1
<i>1.5 M GndHCl</i>			
T_{mi} (°C)	55.2 ± 0.2	69.4 ± 0.1	86.0 ± 0.3
ΔH_{U_i} (kcal/mol)	29 ± 1	40 ± 2	39 ± 1
<i>2 M GndHCl</i>			
T_{mi} (°C)	52.6 ± 0.5	67.9 ± 0.3	81.9 ± 0.3
ΔH_{U_i} (kcal/mol)	28 ± 1	38 ± 1	36 ± 1

El haberse obtenido sólo tres transiciones calorimétricas, en lugar de cuatro, teniendo en cuenta que la AGT es de cuatro dominios, puede ser explicado basándonos en escenarios moleculares diferentes. Una posibilidad es que a pH 2, un dominio de los cuatro sea muy estable, y que por lo tanto no se alcanza su

desplegamiento a las temperaturas más altas alcanzadas por el calorímetro. Para verificar esta posibilidad, se hicieron escaneos térmicos en presencia de guanidina. Los análisis de los endotermas son muy similares a los realizados con la proteína en ausencia del agente caotrópico (figura 8), aunque con los valores correspondientes de T_m and ΔH_U significativamente más bajos para las tres transiciones (tabla 5). No hay ninguna evidencia de cuatro transiciones.

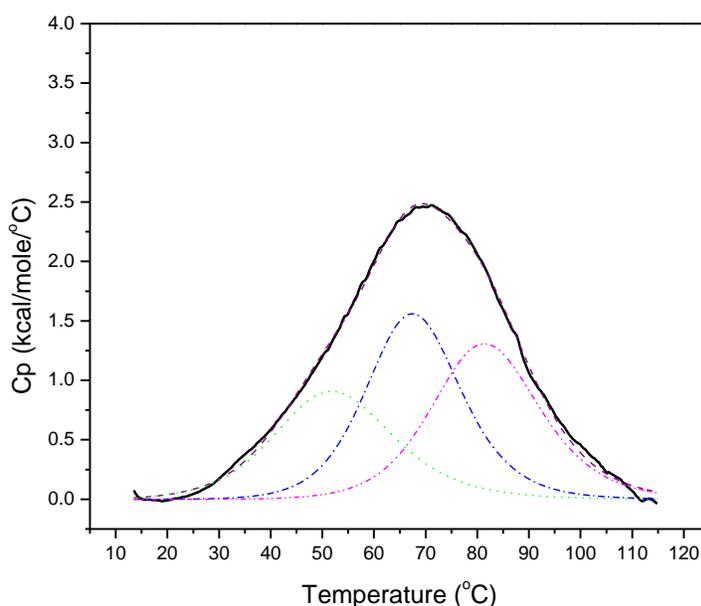


Figura 12. Análisis de deconvolución de las endotermas de AGT con guanidina 2 M, con una concentración de proteína de 0.09 mM a pH 2.

Otro escenario es que en condiciones muy ácidas, un dominio se vuelve inestable, pero el contacto con otro dominio es suficiente para conservarlo plegado. En este escenario de acoplamiento dominio-dominio, una transición debería exhibir un valor de entalpía que fuera la suma de los dos dominios acoplados, resultando mucho más alto que las otras dos transiciones. Al usar los valores de ΔC_p experimentales reportados para heveína ($= 0.56 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$) (Hernández-Arana et al., 1995), las entalpías de desplegamiento a 79 °C (T_m para la transición 2) nos dan 37.2 y 35.2 kcal mol^{-1} para las transiciones 1 y 3

respectivamente. Estos dos valores son comparables a los de la transición 2 ($\Delta H_{U1} \approx \Delta H_{U3} \approx 0.85\Delta H_{U2}$). Además, los parámetros de desplegamiento de cada una de las tres transiciones calorimétricas son comparables a las reportadas para la heveína monomérica en condiciones ácidas muy similares ($T_m = 74 \text{ }^\circ\text{C}$, $\Delta H_U = 29 \text{ kcal mol}^{-1}$, $\text{pH} = 2.1$ (Hernández-Arana et al., 1995). Por lo que, sería de esperarse que el acoplamiento entre dominios fuera afectado diferencialmente por el agente caotrópico, por lo que el efecto de este último debería conducir a la pérdida del acoplamiento. En contraste, como puede ser observado en la Figura 13, tanto ΔH_U y T_m para cada transición muestran una dependencia lineal en diferentes concentraciones de guanidina. En suma, en los datos no encontramos evidencia alguna de que dos dominios tipo heveína de la AGT tengan un desplegamiento cooperativo.

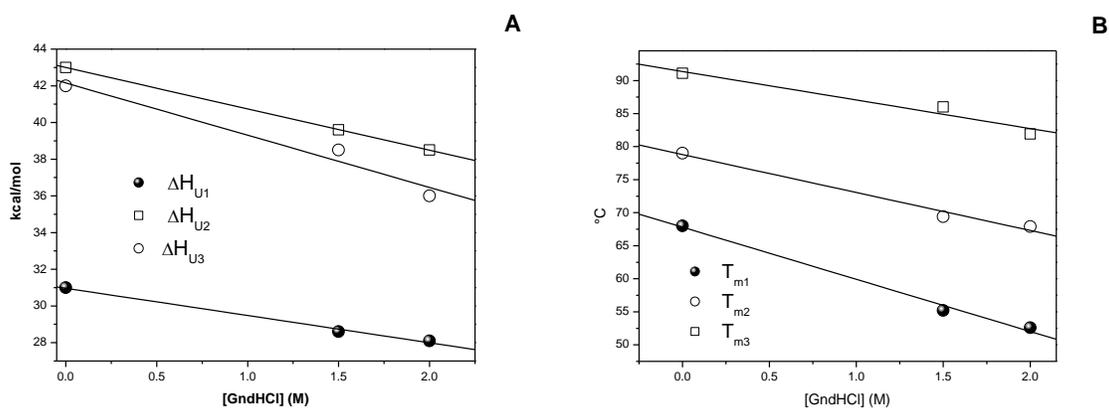


Figura 13. Entalpías de desplegamiento (A) y temperaturas máximas del pico (B) en función de la concentración de guanidina para cada una de las transiciones mostradas por el monómero de la AGT a pH 2 (Tabla 5).

Un tercer escenario para explicar la existencia de solo tres transiciones de desplegamiento, es que uno de los dominios es inestable y está desplegado a pH 2. La figura 14 nos muestra los espectros de fluorescencia de AGT en distintos valores de pH. A pesar de que la proteína dimeriza arriba de pH 2, el espectro se obtuvo con baja concentración de proteína ($3 \mu\text{M}$), así es que sólo una pequeña fracción de monómeros forman dímeros a pH 4 y 5 (alrededor de 6%, ver más

adelante). La intensidad de fluorescencia del monómero a pH 2 es notoriamente más baja comparada con la mostrada a pH 4 y 5. Si bien la diferencia entre los espectros de fluorescencia pudiera indicar estados conformacionales distintos de la proteína en función del pH, esta diferencia también podría deberse a cambios simples inducidos por el solvente, por ejemplo, al cambio en el estado de protonación de algún grupo ionizable cercano a un residuo de triptófano. No obstante, en este punto es conveniente mencionar un estudio de la AGT donde fue químicamente tratada CNBr (Balasubramaniam et al., 1991). Este tratamiento provocó un corte en la cadena polipeptídica en la Met²⁶, es decir, justo en la parte media del dominio A. Esta especie de AGT resultó ser monomérica a pH neutral y mostró un decremento del 30% de la intensidad en el espectro de fluorescencia. El monómero a pH 2 mostró un efecto similar al descrito anteriormente incubado en CNBr con un dominio roto. La AGT tiene tres residuos Trp por subunidad, en las posiciones 41, 107 y 150, pertenecientes a los dominios A, C y D, respectivamente. De esta manera, el apagamiento observado en la proteína nativa a pH 2 está asociado también con un cambio conformacional en uno de los tres dominios que tienen Trp.

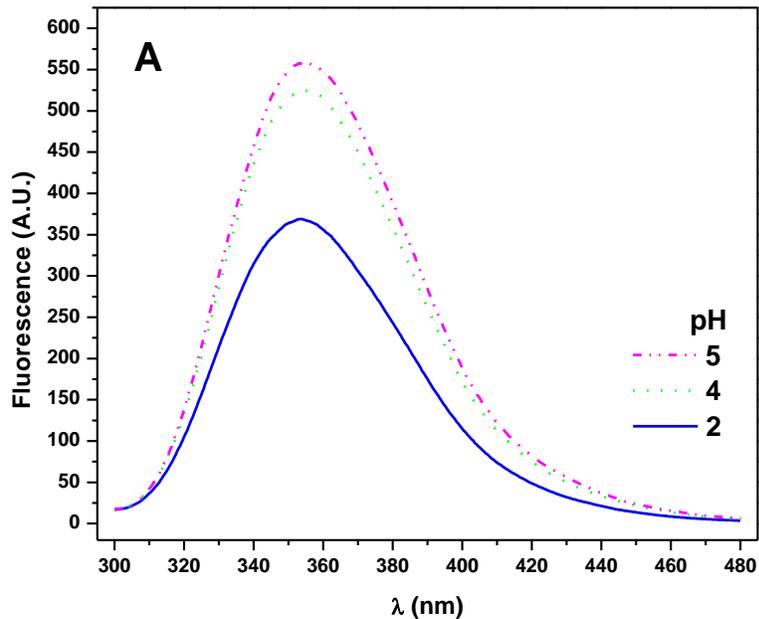


Figura 14. Espectros de fluorescencia de la AGT ($\lambda_{exc} = 290$ nm), con diferentes valores de pH y 25 °C, obtenidos usando una concentración de proteína de 3 μ M.

La conclusión anterior fue respaldada con resultados del radio hidrodinámico de la AGT, obtenidos con DLS (figura 15), donde observamos que el monómero en pH ácido está un poco expandido, mostrando un peso molecular aparente de 22 ± 2 kDa (lo esperado es 17.1 kDa), mientras que el valor para el dímero en pH menos ácido nos da en promedio 33.7 kDa.

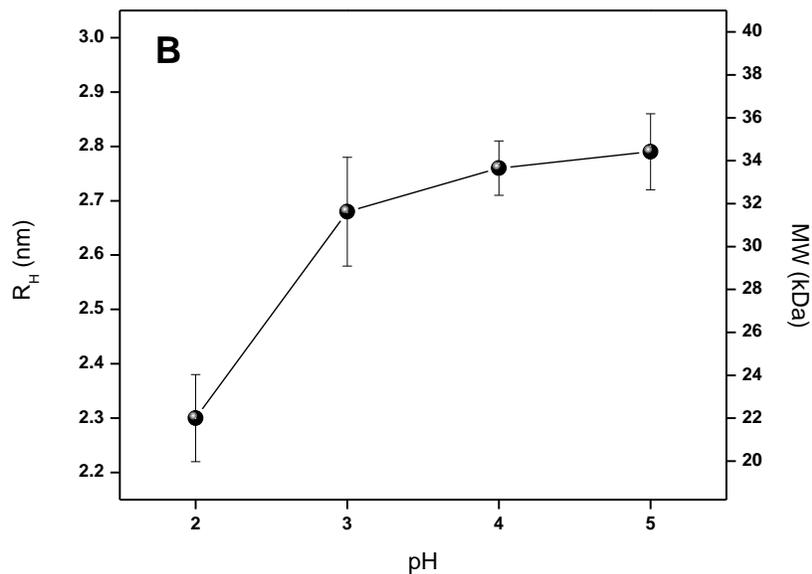


Figura 15. Radio hidrodinámico y aparente peso molecular de la AGT determinados por DLS, usando una concentración de proteína de 410 μ M

Por otro lado, en el espectro de dicroísmo circular notamos una pequeña variación en la banda negativa alrededor de los 205 nm (figura 16), muy similar a la observada en la AGT con el dominio A roto (Balasubramaniam et al., 1991). Asimismo, en la figura 16 se puede observar que esta variación se hace más pronunciada en pH 1.3, confirmando que es un factor característico de la forma monomérica en pH ácido de la AGT.

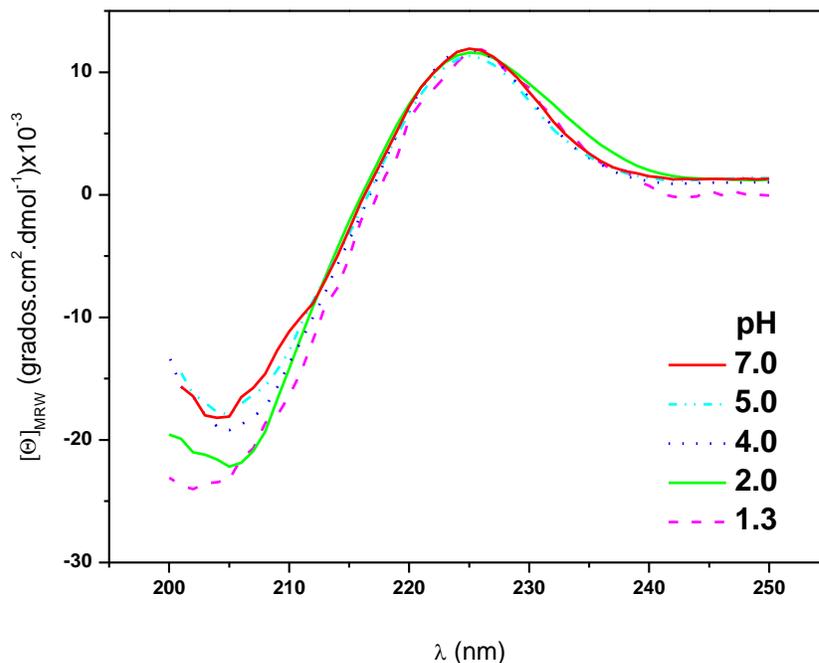


Figura 16. Espectros de DC en el UV lejano de la AGT en función del pH y 25 °C, obtenidos usando una concentración de proteína de 18 μ M.

En resumen, la consideración simultánea de los datos espectroscópicos y calorimétricos nos sugiere que la AGT en pH ácido presenta un dominio parcialmente desplegado que preserva contenido nativo de estructura secundaria pero estructura terciaria perturbada. Además, este rearrreglo estructural es totalmente reversible, ya que al cambiar de pH una muestra de proteína previamente incubada a pH 2, alcanza de nuevo la misma intensidad de fluorescencia vista en la figura 14 para pH 4 y 5.

DESPLEGAMIENTO Y DISOCIACIÓN DEL DÍMERO DE AGT.

Como se indicó, las mediciones de DSC a $\text{pH} > 2$ revelan la presencia de un pico endotérmico que involucra la disociación del dímero. La Figura 17 muestra que la temperatura del máximo del pico de disociación ($T_{p,\text{dis}}$) incrementa notoriamente conforme se incrementa el pH. Es decir, el dímero se estabiliza conforme el pH se mueve hacia el punto isoeléctrico de la proteína ($\text{pI} = 7.3$), aunque pareciera que entre $\text{pH} 5$ y 7 la estabilidad se mantiene constante. En contraste, la temperatura del máximo para el pico de desplegamiento del monómero ($T_{p,U}$) varía sólo ligeramente a $\text{pH} \leq 4$, mientras que se mueve claramente a mayor temperatura al aumentar el pH, con un incremento significativo en el área bajo la curva de los termogramas de DSC (figura 8 B-F). No obstante, a pH neutral el pico cae abruptamente a mayor temperatura debido al efecto exotérmico que acompaña la precipitación irreversible de la proteína (figura 8 E-F).

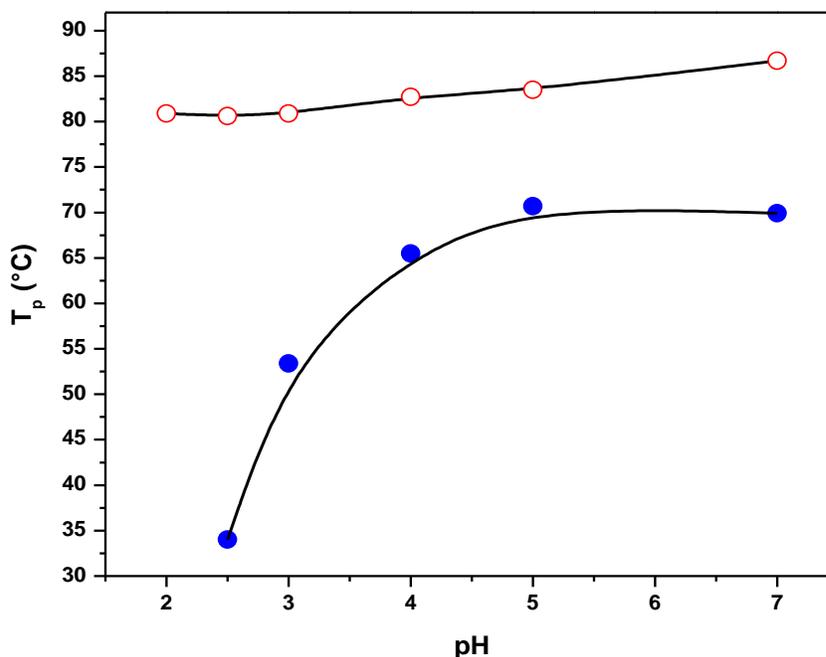


Figura 17. Temperatura del máximo del pico de disociación (símbolos sólidos) y del pico del desplegamiento del monómero (símbolos abiertos) de la AGT en función del pH, determinados por DSC.

Para cuantificar con precisión la energética de dimerización de la AGT, se llevaron a cabo mediciones de calorimetría de dilución isotérmica (IDC) en función de la temperatura y pH. Pequeñas alícuotas de una solución altamente concentrada de proteína fueron añadidas secuencialmente a la celda del calorímetro cargada con solución amortiguadora. Las señales de calor registradas son proporcionales a la entalpía de disociación y al número de moles de dímero que son disociadas en la dilución, lo cual a su vez depende de la constante de disociación y de la concentración total de proteína en la jeringa y en la celda de reacción (ecuaciones 2 y 3 en materiales y métodos). Como puede ser observado en la figura 18, los datos calorimétricos se describen satisfactoriamente usando un modelo simple de disociación de dímero, el cual incluye el calor de dilución de la proteína como parámetro ajustable. En la tabla 6A, se muestran los resultados de las determinaciones de IDC a pH 3 con diferentes temperaturas, en términos de formación del dímero. La dimerización fue entálpicamente dirigida en el intervalo de temperatura estudiado. Esta contribución favorable fue parcialmente cancelada por un decremento de la entropía, con excepción de 30 °C, que fue la temperatura más baja estudiada, donde la entropía fue favorable.

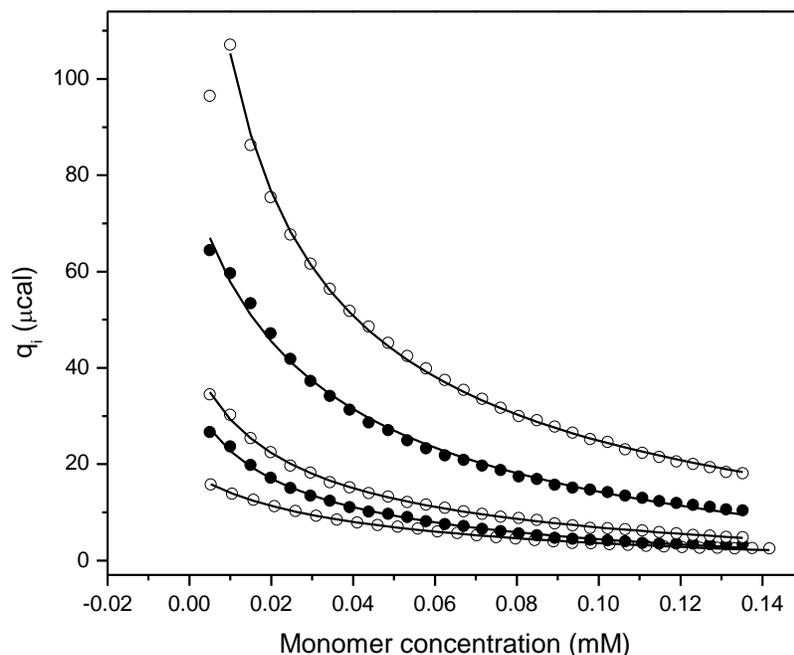


Figura 18. Isotermas de dilución de AGT a pH 3 en función de la temperatura (30, 33, 35, 40 y 43 °C) obtenidas por IDC. 30 alícuotas consecutivas de 10 μ l de solución de proteína (0.7 a 0.9 mM) se diluyeron en 1.44 mL de solución amortiguadora (glicina-HCl 50 mM). Las líneas sólidas representan el mejor ajuste por regresión no lineal de un modelo de disociación del dímero (ver ecuaciones 2 y 3).

Tabla 6. Energética de dimerización de AGT obtenida por IDC.

A. A pH 3, en función de la temperatura				
T	K_A	ΔG_A	ΔH_A	$T\Delta S_A$
(°C)	($M^{-1} \times 10^{-3}$)	(kcal mol $^{-1}$)	(kcal mol $^{-1}$)	(kcal mol $^{-1}$)
30	12.1 ± 0.2	-5.7	-3.4 ± 0.2	2.3
33	8.3 ± 0.5	-5.5	-5.8 ± 0.2	-0.3
35	7.3 ± 0.4	-5.5	-7.4 ± 0.4	-1.9
37	6.5 ± 0.3	-5.4	-9.6 ± 0.5	-4.2
40	6.2 ± 0.4	-5.4	-14.8 ± 0.2	-9.2
43	3.5 ± 0.7	-5.1	-23.6 ± 0.3	-18.5
46	0.8 ± 0.1	-4.3	-34.2 ± 3.1	-29.9

B. A 37 °C, en función del pH				
pH	K_A	ΔG_A	ΔH_A	$T\Delta S_A$
	$(M^{-1} \times 10^{-3})$	$(kcal \text{ mol}^{-1})$	$(kcal \text{ mol}^{-1})$	$(kcal \text{ mol}^{-1})$
3.0	6.5 ± 0.3	-5.4	-9.6 ± 0.5	-4.2
3.5	12.5 ± 1.6	-5.8	-2.7 ± 0.1	3.1
4.0	33.3 ± 0.9	-6.4	-1.9 ± 0.1	4.5
4.5	44.0 ± 1.7	-6.6	-0.9 ± 0.1	5.7

La figura 19 muestra la entalpía de dimerización (ΔH_A) en función de la temperatura. Dos tendencias diferentes se pueden distinguir en el gráfico. A bajas temperaturas ($T \leq 35 \text{ }^\circ\text{C}$), el ΔH_A varía linealmente. En contraste, a altas temperaturas fue observado un ΔC_{pD} cada vez más negativo. Si consideramos solo los puntos entre 30 y 35 $^\circ\text{C}$, el cambio de capacidad calorífica (ΔC_{pD}) que se obtiene es de $-794 \pm 8 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$. Los cálculos de área superficial usando la estructura de rayos X de la AGT arrojan un área interfacial dimérica polar y apolar de -1670 y -2630 \AA^2 , respectivamente. Esta composición de áreas nos da un índice de hidropatía ($\Delta A_p/\Delta A_t$) de 0.39, que es comparable al valor promedio observado para otros homodímeros de proteínas (García-Hernández et al., 2000). De acuerdo a la ecuación 4, estos cambios son consistentes con un valor esperado de ΔC_{pA} de $-750 \pm 57 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$. Es de hacerse notar que los cálculos de área superficial fueron realizados asumiendo una asociación tipo cuerpo rígido. Por lo tanto, la excelente concordancia entre los valores de ΔC_{pA} calculado y experimental indica que debajo de 35 $^\circ\text{C}$, la asociación de las subunidades de la AGT se lleva a cabo sin grandes cambios conformacionales.

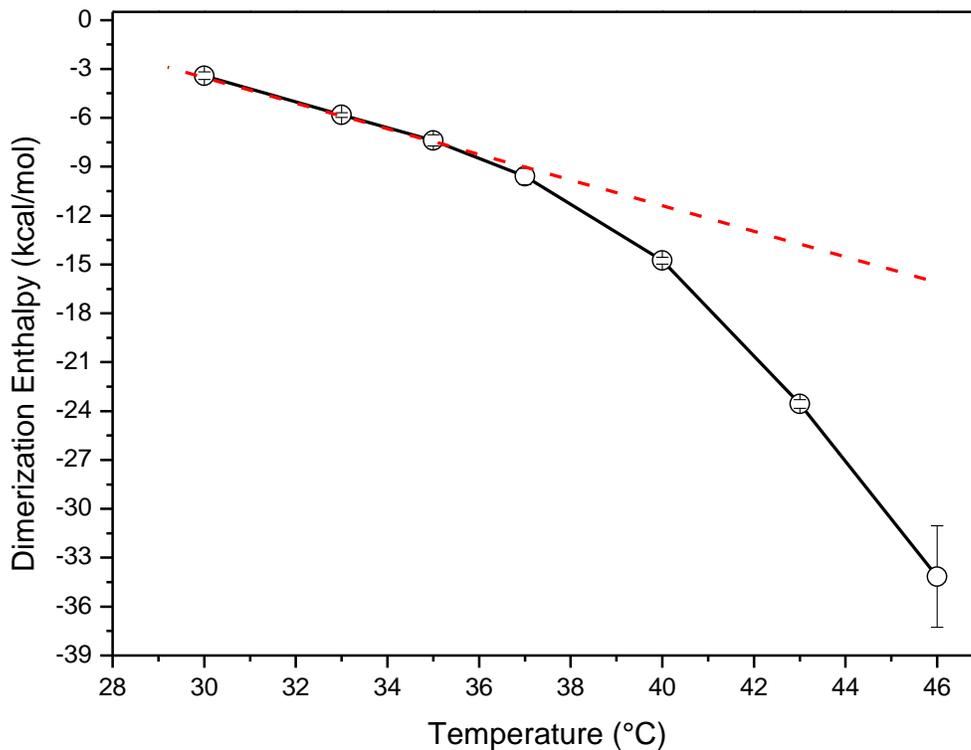


Figura 19. Entalpia de dimerización de AGT a pH 3 (50 mM Glicina/HCl, 0.03 M) en función de la temperatura. La línea continua representa el mejor ajuste de un polinomial de tercer orden, el cual nos muestra un incremento de ΔC_{pA} desde $-0.8 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ a 33 °C hasta $-5.5 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ a 46 °C. La línea punteada representa el mejor ajuste de una línea recta entre 30 y 35 °C, con un $\Delta C_{pA} = -0.8 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$.

Por otro lado, el incremento del valor negativo de ΔC_{pA} observado arriba de 35 °C es un comportamiento que ha sido observado en proteínas complejas, donde al menos una de las moléculas interactuantes se pliega al producirse el evento de unión (Abian et al., 2009; Ladbury y Williams, 2004; Freiburger et al., 2011). En estos casos, la energética observada es resultado de la unión más la contribución del plegamiento. Conforme la temperatura va incrementando, una fracción mayor de las moléculas libres se despliega, por lo que la contribución del replegamiento cada vez es mayor. Como el ΔC_p de plegamiento de una proteína globular siempre es negativo, se explica el por qué se aprecia un notable incremento en el ΔC_{pA} en sistemas acoplados de plegamiento/unión. Al considerar

conjuntamente los datos de IDC y DSC, podemos concluir que un comportamiento similar ocurre con la AGT. Como se ve en la figura 9B, el inicio de la endoterma de desplegamiento ocurre alrededor de la temperatura donde la dependencia térmica del ΔC_{pA} ya no es lineal (figura 19). Por tanto, podemos concluir que en el pico observado en los termogramas de DSC a bajas temperaturas y $\text{pH} > 2.5$, ocurren de manera acoplada efectos del calor de disociación y del desplegamiento parcial de las subunidades de la proteína.

Mediciones adicionales de IDC en función del pH fueron llevadas a cabo a temperatura constante (37°C). Se obtuvieron resultados sólo para el intervalo de pH entre 3.0 y 4.5 (tabla 6B). Por debajo de este intervalo, la interacción es demasiado débil para ser medida por IDC, mientras que arriba de pH 4.5, las mediciones no fueron posibles ya que la solubilidad de la proteína es muy baja y las señales de calor muy pequeñas. Mientras el dímero fue entálpicamente favorecido a pH 3, con valores más altos de pH la contribución entrópica se vuelve favorable y predominante. Como se observa en la figura 20, la variación de K_A con el pH se asemeja al de $T_{p,\text{dis}}$. Por lo tanto, DSC puede ser usado como una herramienta conveniente para verificar el estado de dimerización de la AGT.

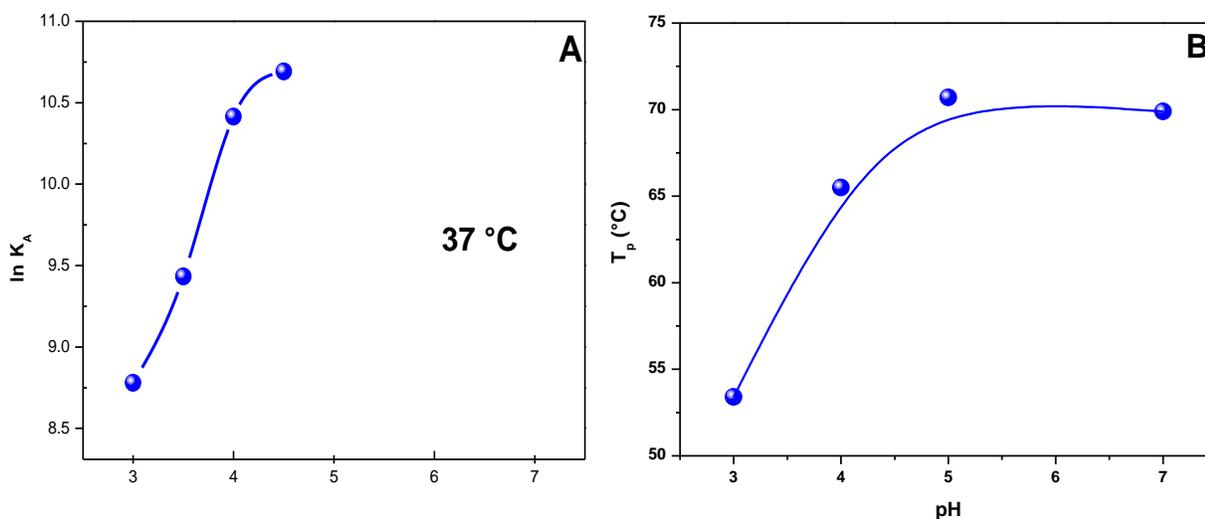


Figura 20. Se muestra el ln de las constantes de asociación en función del pH obtenidas por IDC (A). Temperatura del máximo del pico de disociación en función del pH obtenidas por DSC (B)

La curva de la figura 20A tiene la forma típica sigmoideal de valoración ácido-base, con un punto medio aparente entre 3.5 y 4.0. Los grupos carboxilato libres en proteínas usualmente tienen valores de pKa en este intervalo de pH. Al revisar la estructura cristalina de la AGT (pdb 2UVO), se aprecian dos pares de residuos ácidos equivalentes (dos residuos por subunidad) cuyos grupos cargados forman parte de la interfase del dímero: Asp⁸⁶ y Glu¹¹⁵. Cada Glu¹¹⁵ forma un puente de hidrógeno con el grupo hidroxilo de la Tyr⁷³ de la otra subunidad, formando parte de un sitio de unión al carbohidrato. En el caso de Asp⁸⁶, cada residuo forma un puente salino intercatenario con la Arg⁸⁴ (figura 21). Curiosamente, los dos pares de interacciones intermoleculares están expuestas al solvente. De este modo, se esperaría una pequeña variación de pKa en los correspondientes grupos carboxilato, consistente con el valor aparente de pKa observado en la figura 20B.

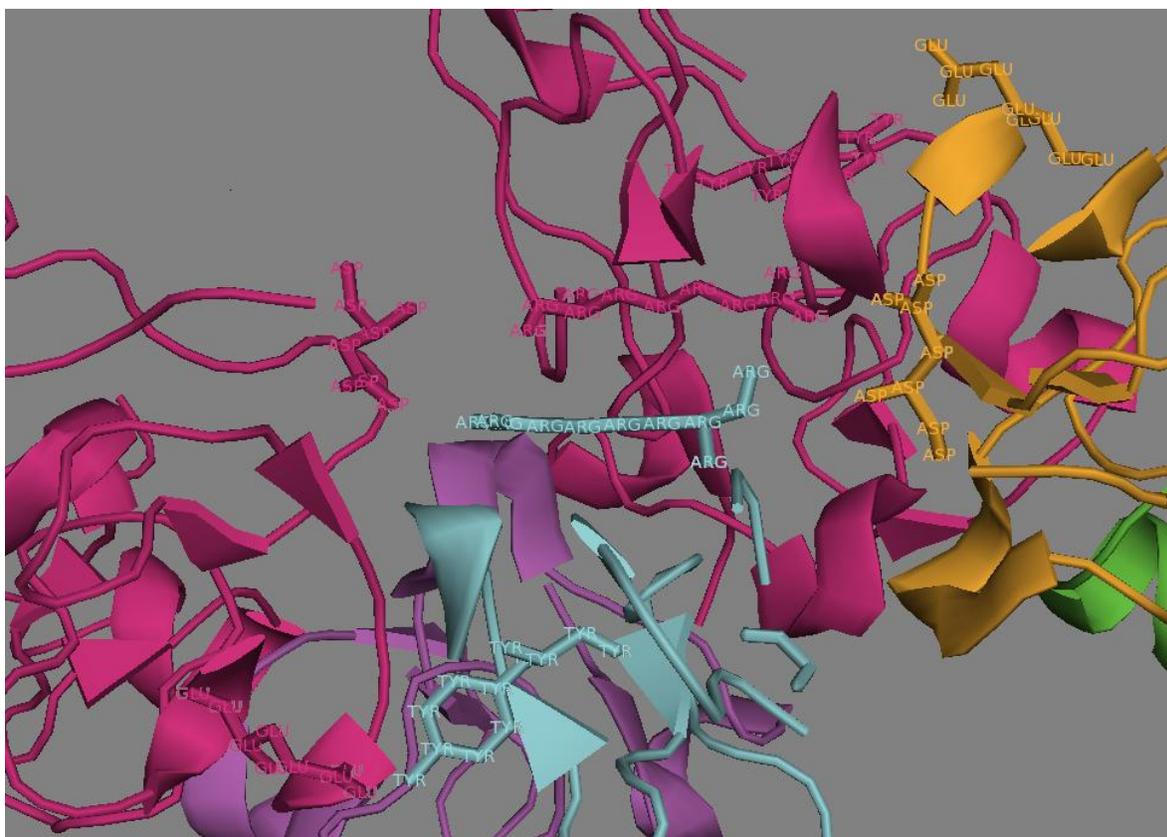


Figura 21. Cristal de AGT (2UVO) donde se muestra la interfase entre las dos subunidades en el sitio del puente salino entre la Arg 84 y la Asp 86. También se observa la interacción entre la tirosina 73 y el ácido glutámico 115.

DISCUSIÓN

Hemos usado en este trabajo técnicas calorimétricas de alta precisión para caracterizar la estabilidad y mecanismo de ensamblaje de la isoforma 1 de la AGT. Los datos aquí presentados indican que la formación del dímero es un proceso complejo que varía dependiendo de las condiciones de pH de la solución. Las subunidades se pliegan en un proceso de varios pasos, en el cual cada uno de los cuatro dominios tipo heveína de la AGT, experimenta una transición de dos estados ($N \Leftrightarrow D$). En ciertas condiciones de pH y temperatura, bajo las cuales las subunidades libres tienen los cuatro dominios propiamente plegados, el proceso de dimerización sigue una asociación tipo cuerpo rígido. El desplegamiento de alguno de los dominios de la AGT, inducido por acidez o por temperatura, se opone eficazmente a la formación del dímero. Sin embargo, hay ciertas condiciones moderadas de desnaturalización donde la subunidad libre tiene un dominio de los cuatro, parcialmente desplegado, pero los contactos intermoleculares son capaces de compensar el costo energético del replegamiento del dominio. Bajo tales circunstancias tiene lugar un evento de plegamiento inducido por unión.

La autoasociación es una característica recurrente en numerosas lectinas de plantas (Shina et al., 2007). En la inmensa mayoría de casos, cada protómero acarrea un solo sitio de unión a carbohidratos. Por tanto, en esas lectinas la homooligomerización es obligatoria ya que es la única forma que tienen para crear el andamiaje multivalente que hace posible la capacidad de aglutinación celular, uno de los mecanismos mayores de defensa en plantas (Sharon y Lis, 2004). El proceso de disociación-desplegamiento de varias lectinas homooligoméricas de plantas ha sido caracterizado, principalmente a través de estudios de desnaturalización química. La tabla 7 muestra y compara las propiedades de formación de la estructura cuaternaria de algunas lectinas. La mayoría de ellas son oligómeros obligados, es decir, que las subunidades requieren de la formación de la estructura cuaternaria para adquirir su conformación nativa. En cierto

sentido, la lectina de cacahuate es una excepción a esta tendencia. Este tetrámero se disocia en monómeros compactos (Dev et al., 2006). Sin embargo, las subunidades adoptan una conformación de glóbulo fundido, con una capacidad reducida de unir a su ligando sacarídico (Reddy et al., 1999). Las lectinas en la tabla 4 pueden ser consideradas como poseedoras de una alta estabilidad estructural, con energías libres de Gibbs acopladas entre plegamiento y oligomerización en un rango de -12 hasta -59 kcal mol⁻¹ (o en términos de constante de oligomerización, de ¡10⁸ a 10⁴¹!) Este mecanismo de formación y alta estabilidad estructural no es sorprendente para proteínas que requieren del estado oligomérico para llevar a cabo su actividad biológica.

Tabla 7. Mecanismos y energética de formación de homooligómeros de algunas lectinas de plantas.

Lectina	Ensamblaje cuaternario ^b	ΔG_A (kcal mol ⁻¹)	K_A	T (°C)	pH	Ref
<i>Lectin de Leguminosa</i>						
Lectina ácida de frijol II	2U → N ₂	-13	1x10 ⁹	35	5.0	(Mitra et al., 2002)
Lectina <i>E. corallodendron</i>	2U → N ₂	-16	2x10 ¹¹	37	7.4	(Mitra et al., 2003)
Chícharo	2U → N ₂	-18	4x10 ¹²	37	7.2	(Ahmad et al., 1998)
Lectina <i>Erythrina indica</i>	2U → N ₂	-23	1x10 ¹⁶	40	7.2	(Ghosh y Mandal, 2006)
Concanavalina A	4U → N ₄	-30	2x10 ²⁰	39	7.4	(Sinha et al., 2005)
Cacahuate	4I → N ₄	-30	2x10 ²⁰	37	7.4	(Dev et al., 2006)
Aglutinina de soya	4U → N ₄	-59	2x10 ⁴¹	37	7.4	(Sinha et al., 2005)
<i>Tipo Jacalina</i>						
Frutalina	4U → N ₄	-12	1x10 ⁸	20	7.4	(Campana et al., 2002)
Plátano	2U → N ₂	-18	4x10 ¹²	25	7.0	(Gupta et al., 2008)
<i>Tipo Heveína</i>						
AGT	2N → N ₂	-7	5x10 ⁴	37	4.5	Este trabajo

^a Todos los datos están determinados por ensayos de desnaturalización química.

^b U: estado desplegado; N: estado nativo. I: intermediarios.

En relación a todas las lectinas antes descritas (tabla 7), la AGT se comporta como un homodímero débil no obligado. Aunque no es posible determinar la estabilidad del dímero de la AGT a pH neutral (como fue el caso para la mayoría de lectinas en la tabla 7), las tendencias observadas en la figura 20 claramente sugieren que el valor del ΔG_A a ese pH estaría cerca de 7 kcal mol⁻¹. Este comportamiento distintivo podría implicar que para la función de la AGT, la auto-oligomerización no es tan esencial como lo es para las lectinas de otras plantas. En este contexto, es relevante mencionar el comportamiento observado con la aglutinina de *Urtica dioica* (AUD). Esta pequeña proteína está compuesta de dos dominios tipo heveína, cada uno posee un sitio de unión a carbohidrato (Harata y Muraki, 2000). A pesar de ser monomérica, la UDA es capaz de aglutinar eritrocitos, debido a su constitución bi-dominio. La AGT bien podría tener un comportamiento parecido. Ha sido mostrado que el dominio B aislado de la AGT es capaz de reconocer al ligando sacarídico (Espinosa et al., 2000). De este modo, a pesar de que la autoasociación es fundamental para que la AGT tenga un máximo de afinidad por su ligando, los monómeros libres pueden también tener una actividad significativa. Esta situación podría hacer que la dimerización fuera menos obligatoria para la AGT en comparación con otras lectinas oligoméricas que tienen sitios de unión a carbohidrato uncatenarios. Por otro lado, vale la pena mencionar algunos estudios que se han realizado de la interacción de la AGT con su carbohidrato. En tales investigaciones, típicamente se han usado concentraciones relativamente bajas de proteína. Por ejemplo, Bains en 1992, utilizó 30 μ M de AGT durante sus mediciones de ITC a pH de 4.7. De acuerdo a las constantes de dimerización de la tabla 6B, en dichos experimentos las fracciones de proteína que encontramos en estado dimérico y monomérico pueden ser alrededor de 50 y 50%. Bajo tales condiciones, toma lugar un equilibrio complejo entre la unión del ligando y la dimerización de la lectina. Otros estudios de unión realizados con AGT han usado cantidades similares o incluso más pequeñas de proteína que las empleadas por Bains. (Van Landschoot et al., 1977; Privat y Monsigny, 1975; Thomas et al., 1977; Clegg et al., 1983; Nagahora et al., 1995; Kristiansen et al., 1999; Muraki et al., 2002; Bogoeva et al., 2004). Por

consiguiente, sería conveniente un nuevo análisis de las propiedades de unión de la AGT a su azúcar.

A pH 2, donde la AGT es monomérica, uno de los dominios está desplegado a temperatura ambiente. Aún tenemos que experimentar más para identificar el dominio que se encuentra desplegado, así como para determinar qué dominio corresponde a cada transición encontrada en los trazos de DSC. Para resolver estas cuestiones, nos encontramos en el proceso de expresar los dominios de la AGT aislados, con el fin de caracterizar la energética de desplegamiento de cada uno por separado. Este estudio también podría ayudar a determinar si los efectos cooperativos en el plegamiento son importantes o no. Mientras tanto, se puede anticipar que el dominio B de la AGT es uno de los que se mantiene plegados a pH 2. A diferencia los otros tres, el dominio B es el único que no tiene Trp. Por lo tanto, es menos probable que sea el responsable del apagamiento de fluorescencia registrado a pH 2. Además, cálculos basados en la secuencia de aminoácidos (Bjellqvist et al., 1993) revelan que de pH 7 a pH 2, el dominio B tiene menos cambio en su carga eléctrica neta (+1.2) en comparación con el dominio C (+2.2), A (+3.2) y D (+4.2). De este modo, la estabilidad del dominio B está presumiblemente menos comprometida que las de los otros tres dominios conforme el pH disminuye.

A pesar de que un dominio se despliega a pH bajo, el presente estudio muestra que la AGT no sólo consta de un monómero altamente resistente a la acidez, si no que también los cambios conformacionales de la lectina se revierten al incrementar el pH. Esta propiedad hace a la AGT altamente apropiada para transportar medicamentos vía oral, ya que se especula que una vez que la AGT alcance el intestino, puede llegar a una zona óptima para volver a su conformación dimérica totalmente activa (Gabor et al., 2004).

BIBLIOGRAFÍA

- 1) Abian, O., J. L. Neira, y A. Velazquez-Campoy. 2009. Thermodynamics of zinc binding to hepatitis C virus NS3 protease: A folding by binding event. *Proteins: Struct., Funct., Bioinf.* 77:624-636.
- 2) Ahmad, N., Srinivas, V. R., Reddy, G. B., y A. Surolia. 1998. Thermodynamic characterization of the conformational stability of the homodimeric protein, pea lectin. *Biochemistry* 37:16765-16772.
- 3) Aub, J. C; Tieslau, C. y Lankester, A. 1963. Reactions of Normal and Tumor Cell Surfaces to Encimes, I Wheat-Germ Lipasa and Associated Mucopolysaccharides. *Physiol.* 50: 613-619. Privat, J. P; Delmotte, F; Mialonier, G; Bouchard, P. and Monsigny, M. 1974. Fluorescence Studies of Saccharide Binding to Wheat-Germ Agglutinin (Lectin). *Eur. J. Biochem.* 47: 5-14.
- 4) Aub, J. C.; Sanford, B.H. y Wang, L.H. 1965. Reactions of Normal and Leukemic Cell Surfaces to a Wheat Germ Agglutinin. *Proc.Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 54; 400-402.
- 5) Bains, G; Lee, R.T.; Lee, Y.C. y Freire, E. 1992. Microcalorimetric Study of Wheat Germ Agglutinin Binding to N-Acetylglucosamine and Its Oligomers. *Biochem.* 31: 12624-12628.
- 6) Balasubramaniam, N. K., T. H. Czaplá, y A. G. Rao. 1991. Structural and functional changes associated with cyanogen bromide treatment of wheat germ agglutinin. *Arch. Biochem. Biophys.* 288:374-379.
- 7) Bello, M., M. C. Portillo-Téllez, y E. García-Hernández. 2011. Energetics of ligand recognition and self-association of bovine β -lactoglobulin: Differences between variants A and B. *Biochemistry* 50:151-161.
- 8) Bies, C; Lehr, C-M. y Woodley, J. F. 2004. Lectin-mediated drug targeting: history and applications. *Adv. Drug Del.* 56: 425-435.
- 9) Bjellqvist, B., G. J. Hughes, Ch. Pasquali, N. Paquet, F. Ravier, J.-Ch. Sanchez, S. Frutiger, y D. F. Hochstrasser. 1993. The focusing positions of polypeptides in immobilized pH gradients can be predicted from their amino acid sequences. *Electrophoresis* 14:1023-1031.

- 10) Bogoeva, V. P., M. A. Radeva, L. Y. Atanasova, S. R. Stoitsova, y R. N. Boteva. 2004. Fluorescence analysis of hormone binding activities of wheat germ agglutinin. *Biochim. Biophys. Acta* 1698:213-218
- 11) Burger, M.M y Goldberg. 1967. Identification of a Tumors Specific Determinant on Neoplastic Cell Surfaces. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 57: 359–366.
- 12) Chavelas, E.A.; Beltrán, A.P.; Pérez-Hernández, G. y García-Hernández, E. 2004. Spectroscopic Characterization of the Thermal Unfolding of Wheat Germ Agglutinin. *Rev. Soc. Quim. Méx.* 48, 257-260.
- 13) Campana, P. T., D. I. Moraes, A. C. O. Monteiro-Moreira y L. M. Beltramini. 2002. Unfolding and refolding studies of frutalin, a tetrameric D-galactose binding lectin. *Eur. J. Biochem.* 269:753-758
- 14) Clegg, R. M., F. G. Loontjens, N. Sharon, y T. M. Jovin. 1983. Dynamic evidence for an extended subsite structure of the ligand combining site on wheat germ agglutinin: temperature- jump relaxation with fluorescence detection. *Biochemistry* 22:4797-4804
- 15) Dennis, J.W. 1986. Different Metastatic Phenotypes in Two Genetic Classes of Wheat Germ Agglutinin-Resistant Tumor Cell Mutants. *Cancer Research.* 46: 4594-4600.
- 16) Dev, S., K. N. Devi, S. Sinha, y A. Surolia. 2006. Thermodynamic analysis of three state denaturation of peanut agglutinin. *IUBMB Life* 58:549 - 555
- 17) Drenth, J; Low, B. W; Richardson, S. J. y Wright, C. S. 1980. The Toxin-Agglutinin Fold. A New Group of Small Protein Structures Organized Around a Four-Disulfide Core. *J. Biol. Chem.* 255: 2652-2655.
- 18) Espinosa, J. F; Asensio, J. L; Garcia, J. L; Laynez, J; Bruix, M; Wright, C; Siebert, H-C; Gabius, H-J; Canada, F. J. y Jimenez-Barbero, J. (2000). NMR investigations of protein-carbohydrate interactions. Binding studies and refined three-dimensional solution structure of the complex between the B domain of wheat germ agglutinin and N, N', N''-triacetylchitotriose. *Eur. J. Biochem.* 267:3965-3978.
- 19) Franz, 1988. The ricin store. *Adv. Lectin Res.* 1: 10-25.
- 20) Freiburger, L. A., O. M. Baettig, T. Sprules, A. M. Berghuis, K. Auclair, y A. K. Mittermaier. 2011. Competing allosteric mechanisms modulate substrate binding in a dimeric enzyme. *Nature Struct. Mol. Biol.* 18:288-295
- 21) Freire, E. **1995**. Differential scanning calorimetry. *Methods Mol. Biol.* 40: 191-218.

- 22) Gabius, H. J. 2000. Biological Information Transfer Beyond the Genetic Code: The Sugar Code. *Naturwissenschaften*. 87: 108-121.
- 23) Gabius, H. J. 2002. The Sugar Code: Functional Lectinomics. *B.B.Acta*. 1572: 165-177.
- 24) Gabor, F., E. Bogner, A. Weissenboeck, y M. Wirth. 2004. The lectin–cell interaction and its implications to intestinal lectin-mediated drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **56**:459- 480.
- 25) García-Hernández, E., R. A. Zubillaga, A. Rodríguez-Romero, and A. Hernández-Arana. 2000. Stereochemical metrics of lectin-carbohydrate interactions: Comparison with protein-protein interfaces. *Glycobiology* 10:993-1000.
- 26) García, R. R.; Rodríguez, R. Montesino, V. Besada, J. González, y J. A. Cremata. 1995. Concanavalin A- and wheat germ agglutinin-conjugated lectins as a tool for the identification of multiple N-glycosylation sites in heterologous protein expressed in yeast. *Anal. Biochem.* **231**:342-348
- 27) Gastman, B; Wang, K; Han, J; Zhu, Z; Huang, X; Wang, G-Q; Rabinowich, H. y Gorelik, E. (2005). A novel apoptotic pathway as defined by lectin cellular initiation. *B.B. Res. Comm.* 316, 1: 263-271.
- 28) Gao, X; Wu, B; Zhang, Q; Chen, J; Zhu, J; Zhang, W; Rong, Z; Chen, H. y Jiang, X. 2007. Brain Delivery of Vasoactive Intestinal Peptide Enhanced with the Nanoparticles Conjugated with Wheat Germ Agglutinin Following Intranasal Administration. *J. Contro. Rel.* 121: 156-167.
- 29) Ghosh, S., y D. K. Mandal. 2006. Kinetic stability plays a dominant role in the denaturant-induced unfolding of *Erythrina indica* lectin. *Biochim. Biophys. Acta* 1764:1021-1028.
- 30) Gupta, G., S. Sinha, y A. Surolia. 2008. Unfolding energetics and stability of banana lectin. *Proteins: Struct., Funct., Bioinf.* 72:754-760.
- 31) Harata, K., y M. Muraki. 2000. Crystal structures of *Urtica dioica* agglutinin and its complex with tri-N-acetylchitotriose . *J. Mol. Biol.* 297:673-681
- 32) Harata, K, Nagahora H. y Jigami Y. **1995**. X-ray structure of wheat germ agglutinin isolectin 3. *Acta Crystallogr. D.* 51: 1013-1019.
- 33) Hernández-Arana, A., A. Rojo-Domínguez, M. Soriano-García, y A. Rodríguez-Romero. 1995. The thermal unfolding of hevein, a small disulfide-rich protein. *Eur. J. Biochem.* 228:649-652.

- 34) Irache, J.M., C. Durrer, D. Duchêne, y G. Ponchel. 1994. In vitro study of lectin– latex conjugates for specific bioadhesion. *J. Control. Release* 31:181-188
- 35) Isegawa, Y; Miyamoto, Y; Yasuda, Y; Semi, K; Tsujimura, K; Fukunaga, R; Ohshima, A; Horiguchi, Y; Yoneda, Y. y Sugimoto, N. 2008. Characterization of the Human Herpesvirus 6 U69 Gene Product and Identification of Its Nuclear Localization Signal. *J. Virol.* 710-718.
- 36) Kilpatrick, D. C. 1999. Mechanisms and assessment of lectin-mediated mitogenesis. *Mol. Biotech. Mol Biotech* 11:55-65.
- 37) Kristiansen, A., Å. Nysæter, H. Grasdalen, y K. M. Vårum. 1999. Quantitative studies of the binding of wheat germ agglutinin (WGA) to chitin-oligosaccharides and partially N-acetylated chitosans suggest inequivalence of binding sites. *Carbohydrate Polymers* 38:23-32
- 38) Kronis, K. A., y J. P. Carver. 1985. Wheat germ agglutinin dimers bind sialyloligosaccharides at four sites in solution: Proton nuclear magnetic resonance temperature studies at 360 MHz. *Biochemistry* 24: 826-833.
- 39) Ladbury, J. E., y M. A. Williams. 2004. The extended interface: measuring non-local effects in biomolecular interactions. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 14:562-569
- 40) Leickt, L., M. Bergström, D. Zopf, and S. Ohlson. 1997. Bioaffinity chromatography in the 10 mM range of K_d . *Anal. Biochem.* 253:135-136.
- 41) Less, W. J.; Spaltenstein, A.; Kingery-Wood, J. E. y Whitesides, G. M. 1994. Polyacrylamides bearing pendant alpha-sialoside groups strongly inhibit agglutination of erythrocytes by influenza A virus: multivalency and steric stabilization of particulate biological systems. *J. Med. Chem.* 37: 3419-3433.
- 42) Liu, Q.; Shao, X.; Chen, J.; Shen, Y; Feng, C.; Gao, X.; Zhao. Y.; Li, J.; Zhang, Q. y Jiang, X. 2011. In vivo toxicity and immunogenicity of whet germ agglutinin conjugated poly (ethylene glycol)-ply(lactic acid) nanoparticles for intranasal delivery to the brain.
- 43) Lis, H y Sharon, N. 1998. Lectins: Carbohydrate-Specific Proteins That Mediate Cellular Recognition. *Chem. Rev.* 98: 637-674.
- 44) Maierhofer, C; Rohmer, K. y Wittmann, V. 2007. Probing Multivalent Carbohydrate-Lectin Interactions by Enzyme-Linked Lectin Assay Employing Covalently Immobilized Carbohydrates. *Bioorg. Med. Chem.* 15: 7661-7676.
- 45) Manalavan, P. y Johnson, C. Jr. 1983. Sensitivity of circular dichroism to protein tertiary structure class. *Lett. Nat.* 305, 27: 831-832

- 46) Miller, R. C. y Bowles, D. J. 1982. A comparative Study of the Localization of Wheat-Germ Agglutinin and its Potential Receptors in Wheat Grains.
- 47) Mistry, A., S. Stolnik, and L. Illum. 2009. Nanoparticles for direct nose-to-brain delivery of drugs. *Int. J. Pharm.* **379**:146-157.
- 48) Mitra, N., V. R. Srinivas, T. N. Ramya, N. Ahmad, G. B. Reddy, y A. Surolia. 2002. Conformational stability of legume lectins reflect their different modes of quaternary association: solvent denaturation studies on Concanavalin A and winged bean acidic agglutinin. *Biochemistry* 41:9256-9263.
- 49) Mitra, N., N. Sharon, and A. Surolia. 2003. Role of N-linked glycan in the unfolding pathway of Erythrina corallodendron lectin. *Biochemistry* 42:12208-12216
- 50) Mohammed, D. B. y Woody, R. W. **1985**. Oriented secondary structure in integral membrane proteins. *Biophys. J.* 48: 957-966.
- 51) Muraki, M.; Ishimura, M. y Harata, K. 2002. Interactions of Wheat-Germ Agglutinin with GlcNAc beta 1,6 Gal sequence. *Biochem. Biophys. Acta.* 1569, 10-20.
- 52) Murphy, K. P., y E. Freire. 1992. Thermodynamics of structural stability and cooperative folding behavior in proteins. *Adv. Prot. Chem.* 43:313-361
- 53) Nagahora, H., Harata, K., Muraki, M. y Jigami, Y. 1995. Site-directed mutagenesis and sugar-binding properties of the wheat germ agglutinin mutants Tyr73Phe and Phe116Qr. *Eur. J. Biochem.* 233:27-34
- 54) Nagahora, H; Ishikawa, Y; Niwa, Y; Muraki, M. Y Jigami, Y. 1992. Expresión and Secretion of Wheat Germ Agglutinin by *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.* 210: 989-997.
- 55) Nagata, Y. y Burger, M. M. 1972. Wheat Germ Agglutinin. Isolation and Crystallization. *J. Biol. Mol.* 247: 2248-2250.
- 56) Nagata, Y. y Burger, M. M. 1974. Wheat Germ Agglutinin. Molecular Characteristics and Specificity for Sugar Binding. *J. Biol. Mol.* 249, 10: 3116-3122.
- 57) Pellegrina, C.D; Rizzi, C; Mosconi, S; Zoccatelli, G; Peruffo, A. y Chignola, R. 2005. Plant Lectins as Carriers for Oral Drugs: Is Wheat Germ Agglutinin a Suitable Candidate? *Toxicol. Appli. Pharm.* 207: 170-178.
- 58) Pierce, M. M.; Raman C. S., Nall B. T. **1999**. Isothermal Titration Calorimetry of Protein-Protein Interactions. *Methods* 19: 213-221.
- 59) Plotnikov, V. V.; Brandts, J. M.; Liu, L. N. y Brandts, J. F. **1997**. A new ultrasensitive scanning calorimeter. *Anal. Biochem.* 250 (2): 237-244.

- 60) Privat, J. P; Delmotte, F; Mialonier, G; Bouchard, P. y Monsigny, M. 1974. Fluorescence Studies of Saccharide Binding to Wheat-Germ Agglutinin (Lectin). *Eur. J. Biochem.* 47: 5-14.
- 61) Privat, J.-P., y M. Monsigny. 1975. Luminescence studies of saccharide binding to wheat germ agglutinin (lectin). *Eur. J. Biochem.* 60:555-567
- 62) Reddy, G. B., V. R. Srinivas, N- Ahmad, y A. Surolia. 1999. Molten globule-like state of peanut lectin monomer retains its carbohydrate specificity implications in protein folding and legume lectin oligomerization. *J. Biol. Chem.* 274:4500-4503
- 63) Rice, R. H. y M. E. Etzler. 1974. Subunit structure of wheat germ agglutinin. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 59:414-419
- 64) Rodriguez-Romero, A; Arreguin, B. y Hernandez-Arana. 1989. Unusual far-ultraviolet circular dichroism of wheat germ agglutinin and hevein originated from cystine residues. *B.B.Acta.* 998: 21-24.
- 65) Rodríguez, A; Tablero, M; Arreguín, B; Hernández, A; Arreguín, R; Soriano-García, M; Tulinsky, A; Park, C. H. y Seshadri, T. P. 1988. Preliminary X-ray Investigation of an Ortorombic Crystal of Hevein. *J. Biol. Chem.* 263: 4047-4048.
- 66) Sánchez-Ruiz, J. M. **1995**. Differential scanning calorimetry of proteins. *Subcell Biochem.* 24: 133-176.
- 67) Schaeffer, H. E.; Breitfeller, D. L. y Krohn, D. L. **1982**. Lectoin – mediated attachment of liposomes to cornea: influence of transcorneal drug flux. *Inves. Ophthalmol. Vis. Sci.* 23: 530-533.
- 68) Schwefel, D., C. Maierhofer, J. G. Beck, S. Seeberger, K. Diederichs, H. M. Möller, W. Welte, V. y Wittmann. 2010. Structural basis of multivalent binding to wheat germ agglutinin. *J. Am. Chem. Soc.* 132:8704-8719
- 69) Sharon, N. y Lis, H. 2004. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. *Glycobiology.* 14: 11, 53-62.
- 70) Sharon, N. 2008. Lectins: Past, Present and Future. 23rd Int. Lectin Meeting. (Interlec-23).
- 71) Sinha, S., N. Mitra, G. Kumar, K. Bajaj, y A. Surolia. 2005. Unfolding studies on soybean agglutinin and Concanavalin-A tetramers: a comparative account. *Biophys. J.* 88:1300-1310
- 72) Sinha, S; Gupta, G; Vijayan, M y Surolia, A. 2007. Subunit Assembly of plant lectins. *Curr. Op. Struc. Biol.* 17: 498-505.

- 73) Sollid, L.M; Kolberg, J; Scott, H; Ek, J; Fausa, O. y Brandtzaeg, P. 1986. Antibodies to Wheat Germ Agglutinin in celiac disease. *Clin. Exp. Immunol.* 63: 95-100.
- 74) Sugawara, K; Terauchi, A; Kamiya, N; Hirabayashi, G. y Kuramitz, H. 2008. Voltammetric Behaviors of Wheat-Germ Agglutinin on a Chitin-modified Carbon Paste Electrode. *Anal. Sci.* 24: 583-587.
- 75) Summer, J. B. y Howell, S. F. 1936. The identification of the hemagglutinin of the jack bean with concanavalin A. *J. Bacteriol.* 32:227-237.
- 76) Surti, N; Naik, S; Bagchi, T; Dwarkanath, B. S. y Misra, A. 2008. Intracellular Delivery of Nanoparticles of an Antiasthmatic Drug. *Pharm. Sci.* 9 (1): 217-223.
- 77) Thomas, M. W., E. F. Walborg, y B. Jirgensons. 1977. Circular dichroism and saccharide-induced conformational transitions of wheat germ agglutinin. *Arch. Biochem. Biophys.* 178:625-630
- 78) Van Landschoot, A.; loontjens, F. G.; Clegg, R. M.; Sharon, N. y De Bruyne, C. K. **1977.** *Eur. J. Biochem.* 210: 275-283.
- 79) Wood, K. M; Stone, G. y Peppas, N. A. 2006. Lectin Functionalized Complexation Hydrogels for Oral Protein Delivery. *J. Control Release.* 116 (2): e66-8.
- 80) Wood, K. M; Stone, G. y Peppas, N. A. 2008. Wheat Germ Agglutinin Functionalized Complexation Hydrogels for oral Insulin Delivery. *Biomacromol.* 9: 1293-1298.
- 81) Wright, C. S. 1974. Non-crystallographic Symmetry in the Crystal Dimer of Wheat Germ Agglutinin. *J. Mol. Biol.* 87:835-841.
- 82) Wright, C. S; Keith, C; Nagata, Y; Burger, M. M. y Langridge, R. 1974. A Preliminary Crystallographic Study of Wheat Germ Agglutinin. *J. Mol. Biol.* 87: 843-846.
- 83) Wright, C. S. 1977. The Crystal Structure of Wheat Germ Agglutinin at 2.2 Å Resolution. *J. Mol. Biol.* 111: 439-457.
- 84) Wright, C. S. 1980. Crystallographic Elucidation of the Saccharide Binding Mode in Wheat Germ Agglutinin and its Biological Significance. *J. Mol. Biol.* 141: 267-291.
- 85) Wright, C. S. 1980. Location of the N-acetyl-D-neuraminic Acid Binding Site in Wheat Germ Agglutinin. A Crystallographic Study at 2.8 Å Resolution. *J. Mol. Biol.* 139: 53-60.
- 86) Wright, C. S. 1981. Histidine Determination in Wheat Germ Agglutinin Isolectin by X-ray Diffraction Analysis. *J. Mol. Biol.* 145: 453-461.

- 87) Wright, C. S.; Gavilanes, F. Y Peterson, D.L. 1984. Primary Structure of Wheat Germ Agglutinin Isolectin 2. Peptide Order Deduced from X-Ray Structure. *Biochem.* 23: 280-287.
- 88) Wright, C. S. 1984. Structural Comparison of the Two Distinct Sugar Binding Sites in Wheat Germ Agglutinin Isolectin II. *J. Mol. Biol.* 178: 91-104.
- 89) Wright, C. S. y Olafsdottir, S. 1986. Structural Differences in the Two Major Wheat Germ Agglutinin Isolectins. *J. Biol. Chem.* 261. 16: 7191-7195.
- 90) Wright, C. S. 1987. Preliminary X-Ray Diffraction Results on Co-Crystals of Wheat Germ Agglutinin with a Sialoglycopeptide from the Red Cell Receptor Glycophorin A. *J. Mol. Biol.* 194: 353-355.
- 91) Wright, C. S. 1987. Refinement of the Crystal Structure of Wheat Germ Agglutinin Isolectin 2 at 1.8 Å Resolution. *J. Mol. Biol.* 194: 501-529.
- 92) Wright, C. S. 1989. Comparison of the Refined Crystal Structures of Two Wheat Germ Isolectins. *J. Mol. Biol.* 209: 475-487.
- 93) Wright, C. S. y Raikhel, N. 1989. Sequence Variability in Three Wheat Germ Agglutinin Isolectins: Products of Multiple Genes in Polyploid Wheat. *J. Mol. Evol.* 28: 327-336.
- 94) Wright, C. S. 1990. 2.2 Å Resolution Structure Analysis of Two Refined N-acetylneuraminyllactose-Wheat Germ Agglutinin Isolectin Complexes. *J. Mol. Biol.* 215, 635-651.
- 95) Wright, C. S. 1992. Crystal Structure of a Wheat Germ Agglutinin/Glycophorin-Sialoglycopeptide Receptor Complex. *J. of Biol. Chem.* 267, 20: 14345-14352.
- 96) Wright, C. S. 1993. Crystallographic Refinement and Structure Analysis of the Complex of Wheat Germ Agglutinin with a Bivalent Sialoglycopeptide from Glycophorin A. *J. Mol. Biol.* 232: 620-638.
- 97) Wright, C. S. y Kellog, G. E. 1996. Differences in Hydrophobic Properties of Ligand Binding at four Independent Sites In Wheat Germ Agglutinin-oligosaccharide Crystal Complexes. *Prot. Sci.* 5: 1466-1476.
- 98) Van Landschoot, A.; Lootiens, F. G; Clegg, R. M.; Sharon, N. y De Bruine, C. K. **1977.** *Eur. J. Biochem.* 79: 275-283.

ARTÍCULO PUBLICADO.

Folding and Homodimerization of Wheat Germ Agglutinin

María del Carmen Portillo-Télez,[†] Martiniano Bello,[‡] Guillermo Salgado,[†] Gabriel Gutiérrez,[†] Virginia Gómez-Vidales,[†] and Enrique García-Hernández^{†*}

[†]Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior, Ciudad Universitaria, México, D.F., México; and [‡]Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, México

ABSTRACT Wheat germ agglutinin (WGA) is emblematic of proteins that specialize in the recognition of carbohydrates. It was the first lectin reported to have a capacity for discriminating between normal and malignant cells. Since then, it has become a preferred model for basic research and is frequently considered in the development of biomedical and biotechnological applications. However, the molecular basis for the structural stability of this homodimeric lectin remains largely unknown, a situation that limits the rational manipulation and modification of its function. In this work we performed a thermodynamic characterization of WGA folding and self-association processes as a function of pH and temperature by using differential scanning and isothermal dilution calorimetry. WGA is monomeric at pH2, and one of its four hevein-like domains is unfolded at room temperature. Under such conditions, the agglutinin exhibits a fully reversible thermal unfolding that consists of three two-state transitions. At higher pH values, the protein forms weak, nonobligate dimers. This behavior contrasts with that observed for the other plant lectins studied thus far, which form strong, obligate dimers, indicating a distinctly different molecular basis for WGA function. For dimer formation, the four domains must be properly folded. Nevertheless, depending on the solution conditions, self-association may be coupled with folding of the labile domain. Therefore, dimerization may proceed as a rigid-body-like association or a folding-by-binding event. This hybrid behavior is not seen in other plant lectins. The emerging molecular picture for the WGA assembly highlights the need for a reexamination of existing ligand-binding data in the literature.

INTRODUCTION

Metazoan cellular membranes are highly abundant in solvent-exposed glycoconjugates, collectively termed the glycocalyx. One of the glycocalyx's major roles is to serve as a sophisticated device for establishing cellular identity, and thus it is crucial for the discrimination between self and nonself. Additionally, the glycocalyx's composition varies significantly among different cell types and stages of differentiation. Thus, the study of proteins that are able to recognize membrane glycoconjugates with high specificity has proved invaluable for the development of drugs aimed at treating a wide number of diseases, including pathogenic infections, cancer, diabetes, and autoimmune disorders (1). Wheat germ agglutinin (WGA) was the first protein reported to have a capacity to discriminate between malignant and normal cells (2). Since then, this chitin-binding lectin has been used widely in biochemical and biomedical research (3–6). It is currently being considered as a candidate for peroral lectin-mediated drug delivery due to its mucoadhesion, cytoadhesion, cytotoxic, and transcytosis properties with enterocytes (7,8). Promising results have also been obtained by using WGA in the direct delivery of drugs to the brain (9).

WGA forms homodimers at neutral pH that dissociate into compact monomers at low pH (10–12). Each subunit is composed of four domains (domains A–D) with a hevein-like fold. X-ray structures show the two subunits asso-

ciated in a head-to-tail manner (13). Each subunit has four unique binding sites, one per domain. Hence, eight independent binding sites are present in the dimer, although because of the twofold symmetry axis, there are only four unique sites (14,15). Early solution-binding data indicated an occupancy of four sites per dimer (16–18). However, recent high-resolution structures have demonstrated that the eight binding sites are functional (19), as previously anticipated (15). It is worth noting that the existence of intercalary binding sites in the WGA dimer contrasts markedly with the great majority of oligomeric lectins, whose binding sites are formed by residues coming from a single subunit.

Despite the numerous studies undertaken on WGA, the molecular basis for its stability and assembly is still largely unknown. It is recognized that this lectin, with 16 sulfide bridges per subunit, is very resistant to high temperature, osmotic agents, and acidic conditions (12,20). Nevertheless, its folding mechanism and energetics have not yet been determined. A quantitative description of the monomer/dimer equilibrium of WGA is also lacking (10,11). An understanding of the folding and homodimerization energetics as a function of pH would aid in guiding glyco-targeting efforts with WGA. Furthermore, such information is crucial to clarify whether ligand binding is coupled to changes in the distribution of WGA monomers and dimers. In this study, we characterized the unfolding and dissociation energetics of WGA as a function of pH and temperature using high-precision differential scanning calorimetry (DSC) and isothermal dilution calorimetry (IDC). The results show that the folding of the free subunit is a multistep

Submitted June 5, 2011, and accepted for publication July 25, 2011.

*Correspondence: egarciah@unam.mx

Editor: Doug Barrick

© 2011 by the Biophysical Society
0006-3495/11/091423-09 \$2.00

doi: 10.1016/j.bpj.2011.07.037

process, a behavior that correlates with the multidomain composition of the lectin. Furthermore, WGA forms weak transient homodimers. Depending on the solution conditions, dimerization may proceed (coupled or not) to significant conformational changes of the free subunits. This hybrid behavior is not seen in other plant lectins, indicating a different molecular basis for the function of WGA. Finally, we argue for the need to reexamine the carbohydrate-binding parameters reported for WGA, because the occurrence of coupled equilibria among dimerization and ligand binding to the free and dimeric subunits must be taken into account.

MATERIALS AND METHODS

Materials

WGA was purchased as a mixture of three isoforms (isoforms 1–3) from Sigma Chemical (L9640; St. Louis, MO). We separated the WGA isoforms by cationic exchange using high-performance liquid chromatography equipment as previously described (12). All experiments were carried out using variant 1. All other reagents were of analytical quality. For measurements performed at pH values of 1.3, 2–3, 4–5, and 7, we used 30 mM buffer solutions of sulfite, glycine/HCl, acetate, and phosphate, respectively.

Fractions of purified WGA isoform 1 were concentrated and dialyzed extensively in an Amicon-stirred-cell-through polyethersulfone ultrafiltration dialyzer (cutoff 10 kD, PM10). Solutions were degassed exhaustively before the calorimetric experiments. Protein concentrations were determined spectrophotometrically with an absorption coefficient of $1.27 \text{ ml/mg cm}^{-1}$ at 280 nm. The molecular mass of the WGA monomer was taken as 17.1 kDa.

Differential scanning calorimetry

DSC measurements were carried out with VP-DSC equipment (MicroCal, GE Health Bio-Sciences, Taconic, NJ). All results presented were obtained at a scan rate of 80°C/h, although completely superimposable endotherms were obtained using a scan rate of 90°C/h. Buffer-buffer baselines were obtained under the same experimental conditions and subtracted from sample traces. We acquired several buffer-buffer baselines before each run with protein solution to obtain a proper thermal history of the instrument. Reheating runs were carried out to determine the calorimetric reversibility of the denaturation process. We fit the theoretical models to the heat capacity profiles using independent or sequential transition-unfolding models programmed in the MicroCal Origin v5 software package.

The van 't Hoff enthalpy (ΔH_{vdH}) was calculated from calorimetric traces according to

$$\Delta H_{\text{vdH}} = 4RT_{1/2}^2 \frac{C_p \Delta C_{p,1/2}}{\Delta H_{\text{cal}}} \quad (1)$$

where R is the gas constant, $T_{1/2}$ is the mid-transition temperature, $C_p \Delta C_{p,1/2}$ is the heat capacity excess at this temperature, and ΔH_{cal} is the calorimetric enthalpy.

Isothermal dilution calorimetry

The dissociation of the WGA homodimer was characterized by IDC with VP-ITC equipment (MicroCal). Stepwise additions of small aliquots of a solution with a high protein concentration (0.7–1.2 mM of monomer equivalent) were applied to the calorimetric reaction cell loaded with buffer

solution. According to a simple dimer dissociation model (21), the heat measured upon addition of the i^{th} injection of volume dV_i into the cell calorimeter would be

$$q_i = \Delta H_{\text{diss}} [P_2]_{\text{eq},i} dV_i - \Delta H_{\text{dil}} ([P_2]_{\text{eq},i} - [P_2]_{\text{eq},i-1}) \times \left(V_0 + \frac{dV_i}{2} \right) + q_{\text{dil}} \quad (2)$$

where ΔH_{diss} is the dissociation enthalpy of the dimer; $[P]$ and $[P_2]$ are the molar concentrations of the free monomer and dimer, respectively; and q_{dil} is the dilution heat of the protein. The dimer concentration in the reaction cell, $[P_2]_{\text{eq}}$, and the syringe, $[P_2]_{\text{eq},i}$, are in turn related to the corresponding equivalent monomer concentrations, $[P]_{\text{eq},i}$, through the dissociation constant:

$$[P]_{\text{eq},i} = [P] + 2[P_2] = K_{\text{diss}}^{-1/2} [P_2]^{1/2} + 2[P_2] \quad (3)$$

where K_{diss} is the equilibrium dissociation constant. ΔH_{diss} and K_{diss} were determined through a non-linear regression fitting of Eqs. 2 and 3.

Fluorescence

Fluorescence spectra were recorded at 25°C in a FCI spectrofluorometer equipped with a Peltier thermoelectric device (ESS, Chicago, IL) for temperature control. Protein samples of 3 μM of monomer were excited at 290 nm, and emission was collected from 310 to 410 nm.

Circular dichroism

Far-UV circular dichroism (CD) spectra were recorded on a JASCO J-720 spectropolarimeter (Jasco, Easton, MD) equipped with a Peltier thermoelectric device for temperature control. The instrument was calibrated with (+)-10-camphorsulfonic acid. Three scanning acquisitions were accumulated and averaged to yield the final spectrum. CD signals are reported as mean residue ellipticity $[\theta]_{\text{res},\text{ave}}$, using a value of 100 for the molecular weight of a mean residue.

Dynamic light scattering

DLS experiments were performed with a DynaPro-801 molecular sizing instrument (Protein Solutions, Chicago, IL) as described previously (22), using protein concentrations in the 0.1–0.4 mM range. The hydrodynamic radius (R_h) and the apparent molecular mass were estimated on the basis of an autocorrelation analysis of scattered light intensity data.

Changes in solvent-accessible surface area and structure-based estimation of heat capacity change

We carried out surface area calculations with the NACCESS program (S. I. Hubbard and I. M. Thornton, Department of Biochemistry and Molecular Biology, University College, London, 1993), using a probe radius of 1.4 Å and a slice width of 0.1 Å. Atomic coordinates of the WGA dimer isoform 1 were taken from the PDB file 2UWG (19). We generated the coordinates for the free subunits by simply erasing the coordinates of the other subunit, i.e., assuming a rigid-body-like association. Changes in solvent-accessible surface areas (ΔA) were estimated from the difference between the dimer and the sum of the free subunits. Changes in polar (ΔA_p) and apolar (ΔA_{np}) surface areas were obtained from the change in accessible area of nitrogen/oxygen and carbon/sulfur atoms, respectively. We performed a structure-based calculation of the dimerization heat capacity using the empirical model:

$$\Delta C_p = 0.45(\pm 0.03) \Delta A_p - 0.26(\pm 0.02) \Delta A_d \quad (4)$$

where the proportional coefficients, in $\text{cal mol}^{-1} \text{K}^{-1} \text{\AA}^{-2}$, were obtained from dilution data of cyclic dipeptides (23).

RESULTS

Fig. 1 shows DSC endotherms of WGA obtained in the 2–7 pH range. Between pH 2 and 4, the unfolding process was reversible, as judged by the recovery of the endothermic signal ($\geq 90\%$) in protein samples previously submitted to a heating/cooling cycle. Similar results were observed by monitoring the far-UV CD signal (data not shown). The reversibility decreased to $\sim 60\%$ at pH 5, whereas no recovery of the calorimetric trace was observed at pH ≥ 6 . Only one peak was evident at pH 2. This peak proved independent of protein concentration (Fig. 2 A), in agreement with previous sedimentation and spectroscopic results indicating that WGA is predominantly monomeric at that pH (10,12). As the pH was raised, an additional endothermic peak was observed at the lower temperatures. This peak was dependent on protein concentration (Fig. 2 B), therefore, it corresponds to the dissociation of the dimer. At pH 2.5, the use of low protein concentrations (e.g., 0.09 mM) yielded calorimetric traces that completely overlapped those obtained at pH 2, whereas the second peak became evident with the use of higher protein concentrations (e.g., 0.22 mM), as in Fig. 1).

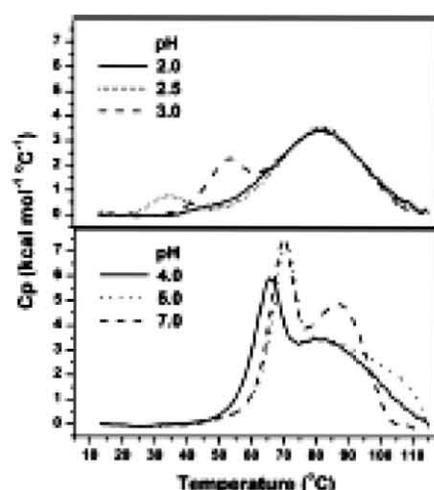


FIGURE 1 Calorimetric profiles of the thermal perturbation of WGA as a function of pH. All endotherms were obtained using a monomer equivalent concentration of 0.09 mM, except at pH 2.5, where a concentration of 0.22 mM was used. A heating rate of $1^\circ\text{C}/\text{min}$ was used in all measurements. Complete recovery of the calorimetric traces was observed in the reannealing of a previously heated/cooled protein sample in solutions with pH ≤ 4 . Reversibility at pH values of 5 and 7 was 60% and 0%, respectively.

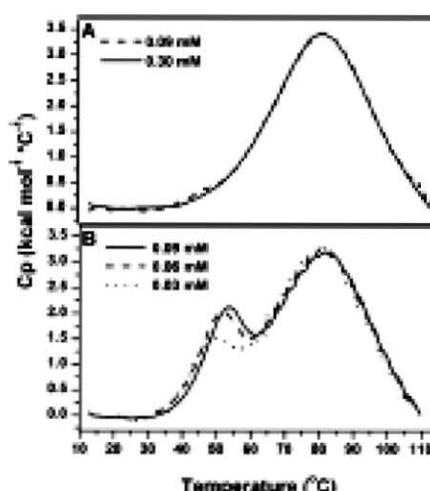


FIGURE 2 Calorimetric profiles of the thermal perturbation of WGA as a function of protein concentration at (A) pH 2 and (B) pH 3, 30 mM GlyTACl.

Unfolding of monomeric WGA

The single endothermic peak obtained at pH 2 extended over a wide temperature range, suggesting the occurrence of stable intermediates in the unfolding process of monomeric WGA ($\Delta H_{\text{obs}}/\Delta H_{\text{cal}} = 0.3$). A deconvolution analysis revealed that the calorimetric traces can be fitted satisfactorily with a model of three independent two-state transitions. In contrast, models with any other number of transitions yielded poor fittings or failed to converge (see Fig. S1 in the Supporting Material). On the other hand, no significant differences in the unfolding parameters were obtained using a model of either sequential or independent unfolding transitions (Table S1). This result is most likely due to the fact that T_{mid} values are significantly separated from each other, implying, in practice, an independent character for the unfolding transitions. Consequently, Table 1 shows results for the unfolding parameters based on a mechanism of independent transitions.

The observation of only three calorimetric transitions, instead of the four expected according to the WGA domain composition, might be rationalized on the basis of different molecular scenarios. One possibility is that at pH 2, one domain is very stable and unfolds at temperatures higher than those reached in the calorimetric measurements. To explore this possibility, we carried out thermal scans in the presence of guanidine hydrochloride (GndHCl). Deconvolution analyses of these data yielded profiles that closely resembled that observed in the absence of the chaotropic agent (Fig. S1), although the corresponding T_{mid} and ΔH_{D} values were significantly decreased for the three transitions (Table 1). Again, no evidence of the fourth transition was

TABLE 1 Unfolding parameters for the calorimetric transitions of monomeric WGA, at pH 2 and varying concentrations of GndHCl

	Transition		
	1	2	3
T_m (°C)	68.0 ± 0.7	79.0 ± 0.6	91.1 ± 0.4
ΔH_{12} (kcal/mol)	31 ± 2	43 ± 3	42 ± 1
		1.5 M GndHCl	
T_m (°C)	55.2 ± 0.2	69.4 ± 0.1	86.0 ± 0.3
ΔH_{12} (kcal/mol)	29 ± 1	40 ± 2	39 ± 1
		2 M GndHCl	
T_m (°C)	52.6 ± 0.5	67.9 ± 0.3	81.9 ± 0.3
ΔH_{12} (kcal/mol)	28 ± 1	38 ± 1	36 ± 1

observed. Another scenario is that in highly acidic conditions, one domain becomes unstable but the contact with another domain suffices to keep it folded. Under this domain-domain coupling scenario, one transition would exhibit an unfolding enthalpy significantly higher than the other two transitions. When we use the reported experimental ΔC_p value ($-0.56 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$) for hevein (24), extrapolation of unfolding enthalpies at 79°C (T_m for transition 2) yields 37.2 and 35.2 kcal mol⁻¹ for transitions 1 and 3, respectively. These last values are comparable to that of transition 2 ($\Delta H_{D1} = \Delta H_{D3} = 0.85\Delta H_{D2}$). Furthermore, the unfolding parameters of each of the three calorimetric transitions are comparable to those reported for monomeric hevein under similar acidity conditions ($T_m = 74^\circ\text{C}$, $\Delta H_{D1} = 29 \text{ kcal mol}^{-1}$, pH = 2.1 (24)). Finally, interdomain coupling would be more readily affected by the chaotropic agent. In contrast, both ΔH_{D1} and T_m for each transition showed a linear dependence on GndHCl concentration (Fig. S2). Overall, the data do not seem to support the possibility that two of the hevein-like domains fold as a cooperative unit.

A third scenario for explaining the existence of only three unfolding transitions is that one of the domains is unstable and unfolded at pH 2. Fig. 3 A shows the fluorescence spectra of WGA measured in this study at different pH values. Although the protein dimerizes above pH 2, we recorded the spectra using a low protein concentration (3 μM), so only a minor fraction of monomers formed dimers at pH 4–5 (<6%, see below). The fluorescence intensity of the monomer at pH 2 is seen to be significantly lower than that exhibited at higher pH values. In this regard, it is relevant to recall an early study on CNBr-treated WGA (25). In that study, a WGA form cleaved at Met²⁶, i.e., near the middle of domain A, was obtained. This species was monomeric at neutral pH, exhibiting a decrease of ~30% in the fluorescence intensity. Of note, the acid monomer shows a quenching effect very similar to that observed in CNBr-treated WGA, with one domain disrupted. WGA has three Trp residues per subunit, at positions 41, 107, and 150, belonging to domains A, C, and D, respectively.

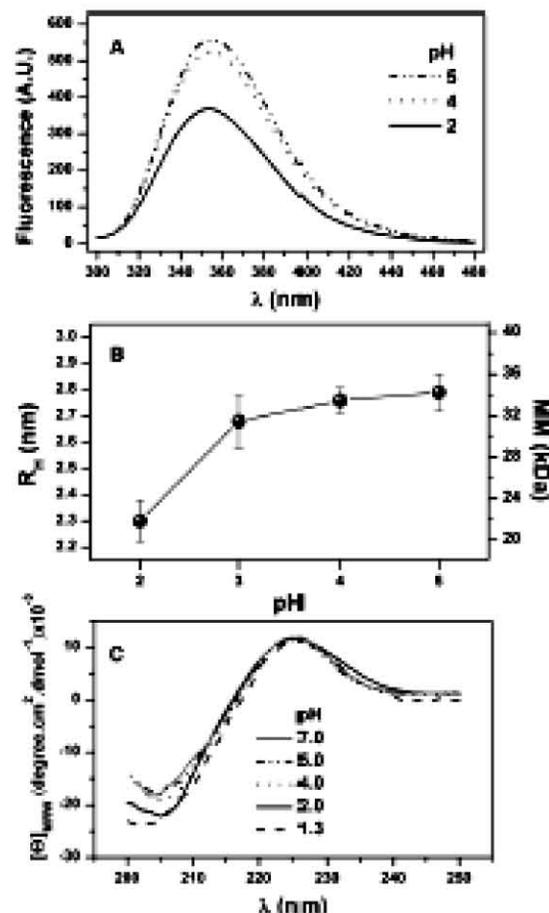


FIGURE 3 Spectroscopic properties of WGA at different pH values, 25°C. (A) Fluorescence spectra ($\lambda_{max} = 290 \text{ nm}$) obtained using a protein concentration of 3 μM . (B) Hydrodynamic radius and apparent molecular mass determined by DLS, using a protein concentration of 410 μM . (C) Far-UV CD spectra, recorded using protein concentration of 6 μM .

Thus, it seems likely that the quenching observed in intact WGA at pH 2 is also associated with a significant conformational change of one of the three Trp-containing domains. This conclusion is further supported by DLS results. As shown in Fig. 3 B, the acid monomer is somewhat expanded, showing an apparent molecular mass of $22 \pm 2 \text{ kDa}$ (versus the expected 17.1 kDa), whereas the corresponding value for the dimer at higher pH values averaged 33.7 kDa. On the other hand, the far-UV CD spectrum varied somewhat in the negative band centered at ~205 nm, as similarly observed in cleaved WGA (25). As can be seen in Fig. 3 C, this variation becomes more pronounced at pH 1.3, confirming that it is a distinguishing feature of the acid monomeric form of WGA. In summary, a global consideration of calorimetric and spectroscopic data suggests that the acid form of

WGA contains a partially unfolded domain that preserves a native-like content of secondary structure but a perturbed tertiary structure. Furthermore, this structural rearrangement was fully reversible, as evidenced by the fact that a sample previously incubated at pH 2 again attained the fluorescence enhancement seen in Fig. 3 A upon pH increase.

Unfolding and dissociation of dimeric WGA

As indicated above, DSC measurements taken at pH > 2 revealed the presence of an endothermic peak evolved from the dissociation of the dimer. As shown in Fig. 4 A, the temperature at which the dissociation peak reached its maximum ($T_{p,d}$) increased significantly as pH was augmented. Thus, the dimer stabilizes as pH moves toward the isoelectric point of the lectin ($pI = 7.3$), although the stability seems to remain almost constant between pH 5 and 7. In contrast, the temperature at which the monomer unfolding peak reached its maximum ($T_{p,u}$) varied only slightly at pH ≤ 4 , whereas it moved to higher temperatures at higher pH values, with a significant increase in the area under the peak, particularly at neutral pH. Nevertheless, under such conditions, the right side of the peak drops abruptly due to the exothermic effect accompanying the irreversible precipitation of the protein (Fig. 1).

To quantify WGA dimerization energetics, we carried out IDC measurements as a function of temperature and pH. Small aliquots of a high-concentration protein solution were added stepwise to the calorimeter cell loaded with buffer solution. The evolved heat signals are proportional to the dissociation enthalpy and the number of moles of dimers that dissociate upon dilution, which in turn depends on the dissociation constant and the total protein concentrations in the calorimeter syringe and reaction cell (Eqs. 2 and 3). The calorimetric data are well described with a dimer dissociation model, which includes the dilution heat of the protein as a fitting parameter (Fig. S3). Table 2 A summarizes the results of the IDC determinations at pH 3 as a function of temperature, in terms of dimer formation.

Dimerization was enthalpically driven throughout the spanned temperature range. This favorable contribution was partially canceled out by an entropy decrease, except at 30°C (the lowest temperature assayed), where the entropy was favorable.

Fig. 5 shows the self-association enthalpy (ΔH_A) as a function of temperature. Two different trends can be distinguished in the plot. At lower temperatures ($T \leq 35^\circ\text{C}$), ΔH_A varied linearly. In contrast, an increasingly more negative $\Delta C_{p,D}$ was observed at higher temperatures. Considering only data between 30°C and 35°C, a heat capacity change ($\Delta C_{p,A}$) of $-794 \pm 8 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ is obtained. Surface area-based calculations using the x-ray structure of WGA yielded dimeric interfacial polar and apolar areas of -1670 and -2630 \AA^2 , respectively. This area composition yields an interface hydrophathy index ($\Delta A_p/\Delta A_t$) of 0.39, which is comparable to the average value observed in protein homodimers (26). According to Eq. 4, these changes are consistent with an expected $\Delta C_{p,A}$ of $-750 \pm 57 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$. It is worth noting that in the surface-area calculations, a rigid-body-like association behavior was assumed. Therefore, the good agreement between experimental and calculated $\Delta C_{p,A}$ values indicates that below 35°C, WGA subunits self-associate without undergoing significant conformational changes. In contrast, the behavior observed above 35°C, in which an increasingly more negative $\Delta C_{p,A}$ is apparent, typically is observed in protein complexes where at least one of the interacting molecules folds upon binding (27–29). In such cases, the observed energetics is a result of the pure binding plus the folding contributions. As temperature increases, a larger fraction of the free molecule becomes unfolded, thus yielding a larger apparent $\Delta C_{p,A}$. Indeed, consideration of both IDC and DSC results confirms that this is the case for WGA. As shown in Fig. 2B, the onset of the unfolding processes occurs at approximately the temperature where thermal dependence of $\Delta C_{p,A}$ is no longer linear. Therefore, it can be concluded that the low-temperature peak evident in DSC traces at pH ≥ 2.5 evolves from coupled dissociation and partial subunit unfolding heat effects.

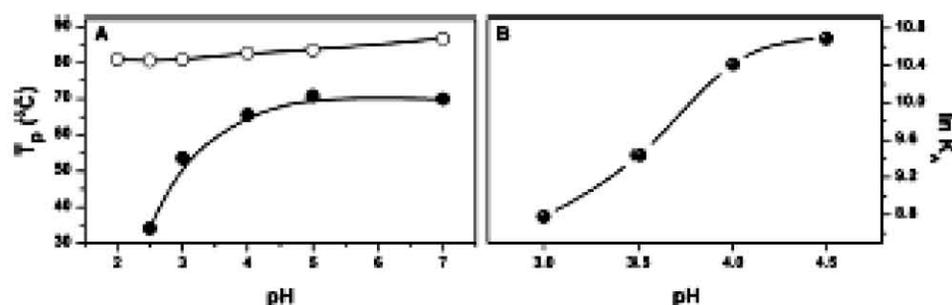


FIGURE 4 Stability of WGA as a function of pH. (A) Temperature at which the dissociation peak (solid symbols) and the monomer unfolding peak (open symbols) reach the maximum, as determined by DSC. (B) Dimerization equilibrium constant at 37°C, determined by IDC.

TABLE 2 Dimerization energetics of WGA measured by IDC

A. At pH 3, as a function of temperature

T (°C)	K_A ($M^{-1} \times 10^{-3}$)	ΔG_D (kcal mol $^{-1}$)	ΔH_D (kcal mol $^{-1}$)	$T\Delta S_D$ (kcal mol $^{-1}$)
30	12.1 ± 0.2	-5.7	-3.4 ± 0.2	2.3
33	8.3 ± 0.5	-5.5	-3.8 ± 0.2	-0.3
35	7.3 ± 0.4	-5.5	-7.4 ± 0.4	-1.9
37	6.5 ± 0.3	-5.4	-9.6 ± 0.5	-4.2
40	6.2 ± 0.4	-5.4	-14.8 ± 0.2	-9.2
43	3.5 ± 0.7	-5.1	-23.6 ± 0.3	-18.5
46	0.8 ± 0.1	-4.3	-34.2 ± 3.1	-29.9

B. At 37°C, as a function of pH

pH	K_A ($M^{-1} \times 10^{-3}$)	ΔG_D (kcal mol $^{-1}$)	ΔH_D (kcal mol $^{-1}$)	$T\Delta S_D$ (kcal mol $^{-1}$)
3.0	6.5 ± 0.3	-5.4	-9.6 ± 0.5	-4.2
3.5	12.5 ± 1.6	-5.8	-2.7 ± 0.1	3.1
4.0	33.3 ± 0.9	-6.4	-1.9 ± 0.1	4.5
4.5	44.0 ± 1.7	-6.6	-0.9 ± 0.1	5.7

IDC measurements were also carried out at a constant temperature (37°C) as a function of pH. Results for only the 3.0–4.5 pH range are presented (Table 2 B). Below this range, the interaction was too weak to be measured by IDC, whereas above pH 4.5, measurements were precluded due to low protein solubility and small heat signals. Although the dimer was enthalpically driven at pH 3, at higher pH values the entropic contribution became favorable and predominant. As shown in Fig. 4, the variation of K_A versus pH resembles that of $T_{p,disc}$. Therefore, DSC may be used as a convenient way to check the dimerization state of WGA. The curve shown in Fig. 4 B has a typical acid-base titration sigmoidal shape, with an apparent midpoint between pH 3.5 and 4.0. Free carboxylate groups in proteins usually have pKa values in this pH range. Inspection of the crystal structure of WGA (PDB 2JVD) reveals two pairs of equivalent acid residues (two residues per subunit) whose charged groups form part of the dimer interface: Asp⁸⁶ and Glu¹¹⁵. Each Glu¹¹⁵ is hydrogen-bonded to the hydroxyl group of Tyr³⁷ at the other subunit, and forms part of a carbohydrate-binding site. In the case of Asp⁸⁶, each residue forms an intercatenary salt bridge with Arg⁸⁶. Of interest, the two pairs of intermolecular interactions are highly solvent-exposed. Thus, small pKa shifts may be expected for the corresponding carboxylate groups, consistent with the apparent pKa value observed in Fig. 4 B.

DISCUSSION

In this work, we used high-precision calorimetric techniques to characterize the stability and assembly mechanism of WGA isoform 1. The body of experimental data presented here indicates that dimer formation is a complex process that varies depending on the solution conditions. Subunit folding is a multistep process in which each of the four

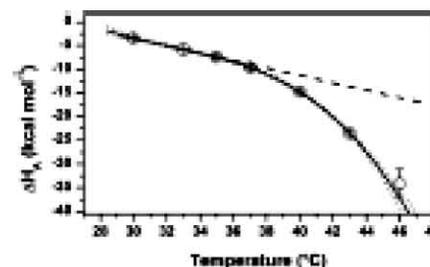


FIGURE 5 Dimerization enthalpy of WGA at pH 3 (50 mM GlyTAC, 0.1 M NaCl) as a function of temperature. The solid line represents the best fitting of a third-order polynomial, which yields increasing $\Delta C_{p,D}$ from -0.8 kcal mol $^{-1}$ K $^{-1}$ at 33°C to -5.5 kcal mol $^{-1}$ K $^{-1}$ at 46°C. The dotted line represents the best fitting of a straight line to data in the 30–37°C temperature range, with $\Delta C_{p,D} = -0.8$ kcal mol $^{-1}$ K $^{-1}$.

hevin-like domains undergoes a two-state transition. Under conditions in which the free subunits have the four domains properly folded, dimerization proceeds following a rigid-body-like association. Acid- or thermal-induced unfolding of WGA domains efficiently opposes dimer formation. Nevertheless, there are some mild denaturation conditions in which the free subunit has a labile domain unfolded but the intermolecular contact is able to offset the energetic cost of the domain's folding. Under such circumstances, a folding-by-binding event takes place.

Self-association is a recurrent characteristic in a large number of plant lectins (30). In most cases, each protomer carries a single carbohydrate-recognition site. Therefore, homo-oligomerization is mandatory in these lectins to create the multisite scaffold that gives them the capacity for cell agglutination, a major defense mechanism in plants (6). The unfolding/dissociation processes of several homo-oligomeric plant lectins have been characterized thus far, mainly through chemical denaturation studies. Table 3 summarizes and compares the quaternary formation properties of these lectins. Most of these lectins have proven obligate oligomers, i.e., the subunits require quaternary structure formation to acquire the native conformation. In a sense, peanut lectin is an exception to this trend. This tetramer dissociates into compact monomers (31). Nevertheless, the free subunits adopt a molten-globule-like conformation, with reduced carbohydrate binding capacity (32). The lectins shown in Table 3 have considerably high structural stability, with coupled folding/oligomerization free energies of Gibbs ranging from -13 to -30 kcal mol $^{-1}$ (dimer units). An exception to this is the case of fufalin, which shows a ΔG_D of only -6 kcal mol $^{-1}$ (dimer units). Nonetheless, the actual stability of fufalin corresponds to that of the tetramer, as this oligomer forms from the unfolded free subunits in an all-or-none process (39). In fact, this formation mechanism and high structural stability are not surprising for proteins that require the oligomeric state to perform their biological activity.

TABLE 3 Formation mechanism and energetics of homo-oligomeric plant lectins

Lectin	Quaternary assembly*	$\Delta G_{\text{fold}}^{\ddagger}$ (kcal mol ⁻¹)	Temperature (°C)	pH	Ref.
Legume lectins					
Concanavalin A	4U → N ₄	-15	39	7.4	(33)
Concanavalin A	2U → N ₂	-16	35	5.0	(34)
<i>Erythrina corallodendron</i> lectin	2U → N ₂	-16	37	7.4	(35)
Erythrina indica lectins					
<i>Erythrina indica</i> lectin	2U → N ₂	-23	40	7.2	(36)
Pea lectin	2U → N ₂	-18	37	7.2	(37)
Peanut lectin	4I → N ₄	-15	37	7.4	(31)
Soybean agglutinin	4U → N ₄	-30	37	7.4	(33)
Winged bean acid lectin II	2U → N ₂	-13	35	5.0	(34)
Jacinth-related lectins					
Banana lectin	2U → N ₂	-18	25	7.0	(38)
Protinin	4U → N ₄	-6	20	7.4	(39)

All data were determined from chemical denaturation assays.

* U, unfolded state; N, native state; I, folding intermediate state.

[‡] Expressed in terms of mol of dimer.

At variance with the above lectins, WGA behaves as a weak, nonobligate homodimer. Although it was not possible to determine the dimer stability of WGA at neutral pH (as in most instances in Table 3), an inspection of Fig. 4 suggests a ΔG_{A} value close to -7 kcal mol⁻¹. This distinct behavior may imply that for the function of WGA, oligomerization is not as essential as it is for other plant lectins. In this context, it is relevant to mention the behavior observed for *Urtica dioica* agglutinin. This small protein is composed of two hevein-like domains, each of which possesses a carbohydrate-binding site (40). Thus, in spite of being monomeric, *U. dioica* agglutinin is able to agglutinate erythrocytes because its bidomain constitution. WGA could well behave likewise. Individual WGA domains have been shown to be binding competent (41). Thus, although self-association is crucial for WGA to attain maximum ligand affinity, the free monomers could also have significant activity. This situation would make dimerization less mandatory for WGA than for other oligomeric lectins with unidentifiable recognition sites. On the other hand, it is worth recalling that several solution studies on the interaction of WGA with carbohydrates were carried out using relatively low protein concentrations. For instance, Bains et al. (18) used 30 μ M WGA, pH 4.7, in their ITC measurements. According to dimerization constants in Table 2, in such experiments the fractions of subunits in monomeric and dimeric state could be similar to each other. Under such conditions, a complex equilibrium is taking place between ligand binding and lectin dimerization. Other binding studies on WGA (16,42–48) used lectin concentrations similar to or even smaller than those used by Bains et al. It follows then that a reexamination of the sugar-binding properties of WGA is needed.

At pH 2, where the agglutinin is monomeric, one of the domains is unfolded at room temperature. Further data are

still required to identify which domain is unfolded, as well as to determine which structural domain corresponds to each transition detected in the DSC traces. To address this issue, we are currently in the process of expressing the isolated domains of WGA to characterize the individual folding energetics. This study will also help us ascertain whether interdomain folding cooperative effects are significant. In the meantime, it can be anticipated that domain B is one of the domains folded at pH 2. At variance with the other three domains, domain B is the only one that does not have any Trp residue. Therefore, it is less likely to be responsible for the fluorescence quenching observed at pH 2. Furthermore, sequence-based estimations (49) reveal that in going from pH 7 to pH 2, domain B has a smaller increase in its net electric charge (+1.2) as compared with domains C (+2.2), A (+3.2), and D (+4.2). Thus, the stability of domain B is presumably less compromised than that of the other three domains as the pH diminishes.

Regardless of which domain unfolds at low pH, this study shows that not only is the WGA monomer highly resistant to acidity, but that the conformational changes undergone by the lectin can be reversed by increasing pH. This property makes WGA highly suitable for peroral lectin-mediated drug delivery (7). In the stomach, the lectin would be present as a partially unfolded monomer. Binding experiments have shown that under such conditions, WGA binds poorly to pig gastric mucus (50). Thus, it is expected that the drug's vehicle will not be absorbed preferentially at this part of the gastrointestinal route. Once it reaches the intestine, an optimal zone for drug absorption, WGA will again attain its fully active conformation.

SUPPORTING MATERIAL

Three figures and one table are available at [http://www.biophysj.org/biophysj/supplemental/S0006-3495\(11\)01895-2](http://www.biophysj.org/biophysj/supplemental/S0006-3495(11)01895-2).

We thank Drs. Miguel Cosma Bains (Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), México, D.F., México) and José Manuel Sánchez Ruiz (Facultad de Ciencias, Universidad de Granada, Granada, España) for the use of the VP-DSC calorimeter.

M.C.P.-E. received fellowships from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología and Dirección General de Asuntos del Personal Académico during her graduate studies in the Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, UNAM. This work was supported in part by the Dirección General de Asuntos del Personal Académico, UNAM (PAPIIT, grant IN304609) and Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (grant 129239).

REFERENCES

- Sharon, N. 2008. Lectins: past, present and future. *Biochem. Soc. Trans.* 36:1457–1460.
- Ash, J. C., B. H. Sanford, and M. N. Cole. 1965. Studies on reactivity of tumor and normal cells to a wheat germ agglutinin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 54:396–399.

3. Garcia, E., E. Rodríguez, ..., J. A. Cremata. 1995. Concanavalin A- and wheat germ agglutinin-conjugated lectins as a tool for the identification of multiple N-glycosylation sites in heterologous protein expressed in yeast. *Anal. Biochem.* 231:343-348.
4. Laisle, L., M. Bergström, ..., S. Ohlson. 1997. Isoaffinity chromatography in the 10 mM range of K_d . *Anal. Biochem.* 253:133-136.
5. Kilpatrick, D. C. 1999. Mechanism and assessment of lectin-mediated targeting. *Mol. Biotechnol.* 11:53-63.
6. Sharon, N., and H. Li. 2004. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. *Glycobiology* 14:538-628.
7. Cahor, F., E. Bogner, ..., M. Wirth. 2004. The lectin-cell interaction and its implications to intestinal lectin-mediated drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 56:499-490.
8. Wood, K. M., G. M. Stone, and N. A. Peppas. 2008. Wheat germ agglutinin functionalized chitosan hydrogels for oral insulin delivery. *Biomacromolecules* 9:1293-1298.
9. Misra, A., S. Stohik, and I. Elum. 2009. Nanoparticles for direct nose-to-brain delivery of drugs. *Int. J. Pharm.* 379:146-157.
10. Nagata, Y., and M. M. Burger. 1974. Wheat germ agglutinin. Molecular characteristics and specificity for sugar binding. *J. Biol. Chem.* 249:3116-3122.
11. Rice, R. H., and M. E. Hilder. 1974. Subunit structure of wheat germ agglutinin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 59:414-419.
12. Chavez, E. A., A. P. Beltrán, ..., E. García-Hernández. 2004. Spectroscopic characterization of the thermal unfolding of wheat germ agglutinin. *J. Mex. Chem. Soc.* 48:257-260.
13. Wright, C. S. 1987. Refinement of the crystal structure of wheat germ agglutinin subunit 2 at 1.8 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 194:501-529.
14. Wright, C. S. 1992. Crystal structure of a wheat germ agglutinin/glycophorin-sialoglycopeptide receptor complex. Structural basis for cooperative lectin-cell binding. *J. Biol. Chem.* 267:14343-14352.
15. Wright, C. S., and G. E. Kelllogg. 1996. Differences in hydrophobic properties of ligand binding at four independent sites in wheat germ agglutinin-oligosaccharide crystal complexes. *Protein Sci.* 5:1466-1476.
16. Van Landschoot, A., E. G. Loomans, ..., C. K. De Bruyne. 1977. Binding of 4-methylumbelliferyl α -acetyl-dihexosyloligosaccharides to wheat-germ agglutinin. A reinvestigation of equilibrium studies. *Eur. J. Biochem.* 79:275-283.
17. Krona, K. A., and J. P. Carver. 1985. Wheat germ agglutinin directly binds sialyloligosaccharides at four sites in solution: proton nuclear magnetic resonance temperature studies at 360 MHz. *Biochemistry* 24:826-833.
18. Bains, G., E. T. Lee, ..., E. Frazer. 1992. Microcalorimetric study of wheat germ agglutinin binding to N-acetylglucosamine and its oligomers. *Biochemistry* 31:12624-12628.
19. Schwefel, D., C. Maierhofer, ..., V. Wittmann. 2010. Structural basis of multivalent binding to wheat germ agglutinin. *J. Am. Chem. Soc.* 132:8704-8719.
20. Rodríguez-Romero, A., B. Arregui, and A. Hernández-Arana. 1989. Unusual far-ultraviolet circular dichroism of wheat germ agglutinin and bovine originated from cysteine residues. *Biochim. Biophys. Acta* 998:21-24.
21. Balb, M., M. D. Pentillo-Teller, and E. García-Hernández. 2010. Energetics of ligand recognition and self-association of bovine β -lactoglobulin: differences between variants A and B. *Biochemistry* 49:151-161.
22. Aragón-Espinosa, R., B. Pinton, ..., E. García-Hernández. 2001. β 7A, a novel milk agglutinin, is structurally related to the ribosome-inactivating protein superfamily. *Arch. Biochem. Biophys.* 394:151-155.
23. Murphy, K. P., and E. Frazer. 1992. Thermodynamics of structural stability and cooperative folding behavior in proteins. *Adv. Protein Chem.* 43:313-361.
24. Hernández-Arana, A., A. Rop-Domínguez, ..., A. Rodríguez-Romero. 1993. The thermal unfolding of bovine, a small dihydroxybenzoyl protein. *Eur. J. Biochem.* 228:649-652.
25. Balambrañam, N. K., T. H. Cui, and A. G. Rao. 1991. Structural and functional changes associated with cyanogen bromide treatment of wheat germ agglutinin. *Arch. Biochem. Biophys.* 288:374-379.
26. García-Hernández, E., E. A. Zabillaga, ..., A. Hernández-Arana. 2000. Stereochemical matrix of lectin-carbohydrate interaction: comparison with protein-protein interfaces. *Glycobiology* 10:993-1000.
27. Abian, G., J. L. Neira, and A. Velázquez-Campoy. 2009. Thermodynamics of zinc binding to hepatitis C virus NS3 protease: a folding by binding event. *Protein* 77:624-636.
28. Ladbury, J. E., and M. A. Williams. 2004. The extended interface: measuring non-local effects in biomolecular interactions. *Curr. Opin. Struct. Mol. Biol.* 14:362-369.
29. Prehberger, L. A., G. M. Basting, ..., A. K. Mittelman. 2011. Competing allosteric mechanisms modulate substrate binding in a dimeric enzyme. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 18:288-294.
30. Sinha, S., G. Gupta, ..., A. Suroia. 2007. Subunit assembly of plant lectins. *Curr. Opin. Struct. Mol. Biol.* 17:498-505.
31. Das, S., N. D. K., ..., A. Suroia. 2006. Thermodynamic analysis of three state denaturation of peanut agglutinin. *Biopolymers* 58:549-555.
32. Raddy, G. B., V. R. Srinivas, ..., A. Suroia. 1999. Molten globule-like state of peanut lectin monomer retains its carbohydrate specificity. Implications in protein folding and ligand lectin oligomerization. *J. Biol. Chem.* 274:4500-4503.
33. Sinha, S., N. Mitra, ..., A. Suroia. 2005. Unfolding studies on soybean agglutinin and concanavalin A structure: a comparative account. *Biophys. J.* 88:1300-1310.
34. Mitra, N., V. R. Srinivas, ..., A. Suroia. 2002. Conformational stability of legume lectins reflect their different modes of quaternary association: solvent denaturation studies on concanavalin A and winged bean acidic agglutinin. *Biochemistry* 41:9256-9263.
35. Mitra, N., N. Sharon, and A. Suroia. 2003. Role of N-linked glycan in the unfolding pathway of *Hydrilla ovalifoliodendron* lectin. *Biochemistry* 42:12208-12216.
36. Ghosh, S., and D. K. Mandal. 2006. Kinetic stability plays a dominant role in the denaturation-induced unfolding of *Erythrina indica* lectin. *Biochim. Biophys. Acta* 1764:1021-1028.
37. Ahmad, N., V. R. Srinivas, ..., A. Suroia. 1998. Thermodynamic characterization of the conformational stability of the homodimeric protein, pea lectin. *Biochemistry* 37:16765-16772.
38. Gupta, G., S. Sinha, and A. Suroia. 2008. Unfolding energetics and stability of banana lectin. *Protein* 72:754-760.
39. Campana, F. T., D. I. Moraza, ..., L. M. Beltrami. 2002. Unfolding and refolding studies of frutalin, a tetrameric D-galactose binding lectin. *Eur. J. Biochem.* 269:753-758.
40. Harata, K., and M. Muraki. 2000. Crystal structure of *Urtica dioica* agglutinin and its complex with tri-N-acetylchitotriose. *J. Mol. Biol.* 297:673-681.
41. Espinosa, J. F., J. L. Auzio, ..., J. Jiménez-Barbero. 2000. NMR investigations of protein-carbohydrate interactions binding studies and refined three-dimensional solution structure of the complex between the B domain of wheat germ agglutinin and N,N', N''-tri-N-acetylchitotriose. *Eur. J. Biochem.* 267:3965-3978.
42. Fritat, I.-F., and M. Montigny. 1975. Luminescence studies of saccharide binding to wheat germ agglutinin (lectin). *Eur. J. Biochem.* 60:553-567.
43. Thomas, M. W., E. F. Walborg, Jr., and B. Argenson. 1977. Circular dichroism and saccharide-induced conformational transitions of wheat germ agglutinin. *Arch. Biochem. Biophys.* 178:625-630.
44. Clegg, R. M., F. G. Loomans, ..., T. M. Jovin. 1983. Dynamic evidence for an extended subunit structure of the ligand combining site on wheat germ agglutinin: temperature-jump relaxation with fluorescence detection. *Biochemistry* 22:4797-4804.

45. Nagahara, H., K. Harata, ..., Y. Igami. 1995. Site-directed mutagenesis and sugar-binding properties of the wheat germ agglutinin mutants Tyr73Phe and Phe116Tyr. *Mol. J. Biochem.* 233:27-34.
46. Kristiansen, A., Å. Nyman, ..., E. M. Vinner. 1999. Quantitative studies of the binding of wheat germ agglutinin (WGA) to chitin-oligosaccharides and partially *N*-acetylated chitosans suggest inequivalence of binding sites. *Carbohydr. Polym.* 38:23-32.
47. Muraki, M., M. Ishimura, and K. Harata. 2002. Interactions of wheat-germ agglutinin with GlcNAc β 1,6Gal sequences. *Biochim. Biophys. Acta* 1569:10-20.
48. Ilievska, V. P., M. A. Eadeva, ..., E. N. Boneva. 2004. Fluorescence analysis of hormone binding activity of wheat germ agglutinin. *Biochim. Biophys. Acta* 1698:213-218.
49. Bjellqvist, B., G. J. Hughes, ..., D. Hochstrasser. 1993. The forming positions of polypeptides in immobilized pH gradients can be predicted from their amino acid sequences. *Electrophoresis* 14:1023-1031.
50. Tracht, J. M., C. Duran, ..., G. Paschel. 1994. In vitro study of lectin-latex conjugates for specific bioadsorption. *J. Control. Release* 31:181-188.