



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**BASES ENERGÉTICAS DE LA UNIÓN DE LOS
DOMINIOS DE LA AGLUTININA DE GERMEN DE
TRIGO A CARBOHIDRATOS**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

ITZEL LÓPEZ GONZÁLEZ



**DIRECTOR DE TESIS:
DR. ENRIQUE GARCÍA HERNÁNDEZ
2015**

Ciudad Universitaria, D. F.



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.

Hoja de Datos del Jurado

1. Datos del alumno

López

González

Itzel

57 15 19 78

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

Biología

306292514

2. Datos del tutor

Dr.

Enrique

García

Hernández

3. Datos del sinodal 1

Dr.

Daniel Alejandro

Fernández

Velasco

4. Datos del sinodal 2

Dra.

Patricia

Cano

Sánchez

5. Datos del sinodal 3

Dra.

Ángela Victoria

Forero

Forero

6. Datos del sinodal 4

M. en C.

Lorena

De Anda

Aguilar

7. Datos del trabajo escrito

Bases energéticas de la unión de los dominios de la Aglutinina de germen de trigo a carbohidratos.

54 p

2015

La presente tesis fue realizada en el Departamento de Química de Biomacromoléculas del Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección del Dr. Enrique García Hernández. Durante la realización de este trabajo, se contó con el apoyo económico de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA-UNAM) a través del Proyecto PAPIIT IN200115, así como del Consejo Nacional de la Ciencia y la Tecnología (CONACyT), proyectos 235831 y 166472.

A Evan,

César

y mis abuelos.

Agradecimientos

A mi asesor, el Dr. Enrique García Hernández, por todo el apoyo, paciencia, enseñanzas y consejos brindados durante la realización de esta tesis.

Al Dr. Fernández, la Dra. Cano, la Dra. Forero y la M. en C. Lorena de Anda, por formar parte del jurado, por apoyarme con las correcciones de este trabajo y por sus valiosos consejos.

A la Q.F.B María del Rocío Patiño Maya, Técnico Académico de Espectroscopia y Polarimetría, por el apoyo en su laboratorio.

A Eduardo Leyva, 'Lalo', por ser mi *sensei*. Gracias por todo el apoyo para realizar esta tesis, tanto en la parte académica como en la práctica. Por tu dedicación, preocupación, amistad, paciencia, pero sobre todo, por confiar en mí.

A Ana, por ser mi amiga y compañera de laboratorio y estar a mi lado desde el inicio de la carrera hasta la finalización de este proyecto.

A mis amigos y compañeros de laboratorio, en especial a Homero, Jorge y Fernando, por resolver siempre las mil y un dudas que me surgieran y no chistar al momento de ayudarme a realizar algún experimento.

A mi familia, por apoyarme en las decisiones que he tomado y corregirme cuando he errado. Por la constante motivación en mi formación académica. Por ser el motor más grande que tengo.

A César, por ser mi compañero de vida durante estos años, por ser mi maravilloso apoyo y estar conmigo en las buenas, las malas y las aún peores.

Y, finalmente, a la UNAM, por ser mi segunda casa y permitirme desarrollarme libremente durante todos estos años en sus aulas e instalaciones.

Contenido

Índice de Figuras	III
Tablas	IV
Abreviaturas y acrónimos	V
Resumen.....	VII
1. Introducción.....	1
1.1 Lectinas.....	1
1.2 Aplicaciones de la lectinas.....	2
1.3 Tipos de lectinas	2
1.3.1 Lectinas de plantas.....	4
1.4 Aglutinina de germen de trigo	6
1.5 Aplicaciones de la AGT	8
1.6 Interacción proteína-ligando: parámetros termodinámicos.....	9
1.6.1 Calorimetría de titulación isotérmica (ITC)	9
1.7 Técnicas Espectroscópicas	11
1.7.1 Dicroísmo circular.....	11
1.7.2 Espectrofotometría de fluorescencia.....	13
1.8 Espectrometría de masas.....	13
2. Antecedentes directos.....	14
3. Planteamiento del problema	16
4. Objetivos	17
4.1 General.....	17
4.2 Particulares.....	17
5. Hipótesis	18
6. Metodología	19
6.1 Purificación y aislamiento de la isoforma 1 de la AGT.....	19
6.2 Expresión de los dominios recombinantes de la AGT1	19
6.3 Purificación por columna de afinidad de los dominios recombinantes.....	21
6.4 Corte con enterocinasa.....	21
6.5 Cuantificación de los dominios recombinantes	21
6.6 Dicroísmo circular.....	22
6.7 Fluorescencia.....	22
6.8 Calorimetría de titulación isotérmica.....	23

7. Resultados y discusión	24
7.1 Purificación y aislamiento AGT1.....	24
7.2 Purificación dominios recombinantes.....	24
7.3 Dicroísmo circular.....	26
7.4 Fluorescencia.....	27
7.5 ITC.....	29
8. Conclusiones	36
9. Bibliografía	37

Índice de Figuras

Figura 1. Clasificación moderna de las lectinas.....	3
Figura 2. Lectinas vegetales..	5
Figura 3. Homodímero de AGT.....	7
Figura 4. Asociación de los dominios en forma cabeza-cola.....	7
Figura 5. Sitios de reconocimiento de carbohidratos del dímero de la AGT.	8
Figura 6. Experimento típico de ITC.	10
Figura 7. Niveles energéticos que son perturbados durante un experimento espectroscópico	11
Figura 8. Espectros de DC en la región del UV-lejano	12
Figura 9. Espectro de CD en la región del UV cercano	12
Figura 10. Perfiles calorimétricos.....	14
Figura 11. Trazas calorimétricas en función del pH	15
Figura 12. Construcción de los dominios como proteína de fusión.....	20
Figura 13. Perfil de elución de la AGT	24
Figura 14. Gel de SDS-PAGE	25
Figura 15. Espectros de DC en el UV-lejano de los dominios recombinantes y de la AGT1	27
Figura 16. Espectros de fluorescencia de la AGT1 y de los dominios	28
Figura 17. Isotherma y estructura cristalográfica del dominio A	29
Figura 18. Isotherma y estructura cristalográfica del dominio B	30
Figura 19. Isotherma y estructura cristalográfica del dominio C	30
Figura 20. Isotherma y estructura cristalográfica del dominio D.....	31
Figura 21. Firmas termodinámicas de los dominios de la AGT.	32
Figura 22. Alineamiento de los dominios de la AGT resaltando los sitios de unión	34

Tablas

Tabla 1. Posiciones que presentan cambios de residuos entre las tres isoformas de AGT.	14
Tabla 2. Pesos moleculares y coeficientes de extinción de los cuatro dominios de la AGT1	25
Tabla 3. Comparación de los pesos teóricos de los dominios recombinantes y los obtenidos por MALDI-TOF.	29
Tabla 4. Parámetros termodinámicos obtenidos para los cuatro dominios de la AGT	35
Tabla 5. Comparación de los parámetros termodinámicos reportados contra los obtenidos.	36
Tabla 6. Parámetros termodinámicos de los dominios de la AGT y la heveína	36

Abreviaturas y acrónimos

°C	Grados Celsius o centígrados
µg	Microgramos
µg/ml	Microgramos por mililitro
µl	Microlitro
µM	Micromolar
AGT	Aglutinina de Germen de Trigo
AGT 1	Aglutinina de Germen de Trigo isoforma 1
AGT 2	Aglutinina de Germen de Trigo isoforma 2
AGT 3	Aglutinina de Germen de Trigo isoforma 3
Da	Dalton
IPTG	Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido
ITC	<i>Isothermal titration</i> calorimetry (Calorimetría de titulación isotérmica)
Ka	Constante de asociación
LB	<i>Luria Broth</i> (Medio de cultivo Luria)
MALDI-TOF	<i>Matrix-Assited Laser Desoption/Ionization – Time of Fligh</i> (Desorción/ Ionización Láser Asistida por matriz con tiempo de vuelo)
mg	Miligramo
mg/ml	Miligramo por mililitro
ml	Mililitro
mM	Milimolar
MW	<i>Molecular weight</i> (peso molecular)
NAG	<i>N</i> -acetilglucosamina
NANA	<i>N</i> -acetilneuraminico
nm	Nanómetro
PDB	<i>Protein Data Bank</i>

pH	Potencial de Hidrógeno
Phe	Fenilalanina
PMSF	<i>Phenylmethylsulfonyl fluoride</i> (Fluoruro de fenilmetilsulfonilo)
rmp	Revolución por minuto
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulfate- polyacrilamide gel electrophoresis</i> (Electroforesis en gel de poliacrilamida con Dodecil sulfato de sodio)
Ser	Serina
Trp	Triptófano
Trx	Tiorredoxina
Tyr	Tirosina
UFC	Unidad formadora de colonias
UV	Ultravioleta
ΔG	Cambio en la energía libre de Gibbs
ΔH	Cambio en la entalpía
ΔS	Cambio en la entropía

Resumen

Las membranas celulares son muy abundantes en glicoconjugados expuestos al solvente extracelular, los cuales, de manera colectiva, son denominados glicocáliz. Una de las funciones primordiales del glicocáliz es brindarle identidad a la célula, por lo que resulta trascendente para la discriminación entre lo propio y lo ajeno. Además, su composición varía de manera significativa entre los tipos celulares, así como en las distintas etapas de diferenciación, por consiguiente, el estudio de proteínas que sean capaces de reconocer dichos glicoconjugados membranales de forma altamente específica, es de gran importancia para el desarrollo de fármacos dirigidos a un gran número de enfermedades, tales como cáncer, diabetes, enfermedades autoinmunes e incluso infecciones causadas por patógenos (Sharon, 2008).

En los últimos años, un grupo de proteínas ha despertado gran interés debido a su actividad biológica: las lectinas, las cuales reconocen monosacáridos y oligosacáridos, uniéndose a éstos de forma reversible con una alta especificidad, sin ejercer ningún tipo de actividad catalítica (Sharon & Lis, 1998).

La aglutinina del germen de trigo (AGT) es una lectina de arquitectura molecular compleja. Su cadena polipeptídica consta de cuatro dominios isoestructurales homólogos a la heveína, la lectina más pequeña conocida hasta el momento (Jiménez-Barbero *et al.*, 2006). La AGT es una lectina emblemática, ya que fue la primera proteína descrita con capacidad de discriminar entre células malignas y normales (Aub *et al.*, 1965). Es capaz de reconocer y unirse específicamente a residuos N-acetilneuramínico y N-acetilglucosamina. Desde entonces, la AGT ha sido empleada como modelo de múltiples investigaciones en el campo biomédico y biotecnológico. Recientemente, ha sido considerada como un eficaz transportador de fármacos que son administrados por vía oral, ya que exhibe la capacidad de adherirse, invadir y realizar transitocis de enterocitos (Gabor *et al.*, 2004). Aunque es una proteína muy estudiada, las bases moleculares de su estabilidad estructural y su capacidad para la unión a carbohidratos aún no están bien determinadas.

Nuestro grupo de trabajo ha realizado en años recientes estudios dirigidos al estudio del desplegamiento y la disociación de la AGT en función de la temperatura y pH, empleando técnicas calorimétricas y espectroscópicas (Chavelas *et al.*, 2004; Portillo-Téllez *et al.*, 2011). Esta lectina presenta un mecanismo de plegamiento y autoasociación fuertemente influido por las condiciones de la disolución. Bajo condiciones neutras o cercanas a la neutralidad, forma homodímeros débiles no obligados, mientras que a pH bajo se disocia, formando monómeros. Los resultados de los estudios calorimétricos y espectroscópicos sugirieron que en valores de pH < 3, uno de los cuatro dominios que componen a la AGT se encuentra desplegado.

Con el fin de profundizar nuestro conocimiento sobre el mecanismo de ensamblaje y función de la AGT, el presente proyecto tiene como objetivo caracterizar termodinámicamente la unión de cada uno de los dominios de la AGT con *N-N'-N''-*

triacetilquitotriosa a pH 4.7 y a 25°C, mediante calorimetría de titulación isotérmica (ITC). Para ello, se procedió a la expresión y purificación de los dominios de manera recombinante en *E. coli*. Además, para corroborar la integridad estructural de los productos, se evaluó el contenido de estructura secundaria mediante técnicas espectroscópicas.

1. Introducción

1.1 Lectinas

En la naturaleza, existen una gran cantidad de proteínas que interactúan de manera no covalente con carbohidratos, como enzimas carbohidrato-específicas o anticuerpos anticarbohidratos. En los últimos años, un grupo de proteínas ha despertado gran interés debido a su actividad biológica: las lectinas (Sharon & Lis, 2004; Sharon, 2008).

A finales del siglo XIX se comenzaron a acumular evidencias de proteínas que poseían la capacidad de aglutinar eritrocitos. Estas proteínas fueron llamadas hemaglutininas o fitoaglutinas, ya que primero fueron descubiertas en extractos vegetales (Sharon, 2004). En 1888 se descubrió la primera lectina, la ricina, cuando Peter Hermann Stillmark observó actividad hemaglutinante de células en extractos de *Ricinus communis*. Desde entonces, centenas de lectinas han sido aisladas y caracterizadas con respecto a su especificidad para unirse a carbohidratos, estructura molecular y propiedades bioquímicas. En general, las lectinas de diferentes especies de plantas difieren con respecto a su estructura molecular y especificidad (Peumans & Van Damme, 1995).

Las lectinas reconocen monosacáridos y oligosacáridos, uniéndose a éstos de forma reversible y con una alta especificidad, sin ejercer sobre ellos actividad catalítica. Están presentes en todo tipo de entidades biológicas: bacterias, plantas, hongos, animales, algas, protozoos e inclusive en virus (Lis & Sharon, 1998; Sharon, 2008; Sinha *et al*, 2007; Peumans & Van Damme, 1995).

Las lectinas son proteínas que tienden a formar homooligómeros. Típicamente poseen 2 o más sitios de unión a carbohidratos por molécula, es decir, son divalentes o polivalentes. Por consiguiente, cuando interactúan con células no sólo reconocen los carbohidratos de la superficie membranal, sino que pueden causar una unión cruzada de células y su subsecuente precipitación. Este fenómeno se conoce como aglutinación y es una de las principales características de dichas proteínas. También pueden formar uniones cruzadas con glicoproteínas o polisacáridos en solución, induciendo su precipitación. Tanto la aglutinación como la precipitación pueden ser inhibidas bajo la presencia de los azúcares que sean los ligandos específicos de dichas lectinas (Sharon & Lis, 1998, Lis & Sharon, 2004; Sinha *et al*, 2007).

Estas proteínas desempeñan una gran variedad de roles dentro de las plantas: participan en las simbiosis entre las bacterias fijadoras de nitrógeno con la raíz de la planta, poseen actividades mitogénicas, almacenan proteínas, transportan carbohidratos, actúan como una barrera protectora contra la acción patogénica de ciertos organismos, como bacterias, virus, hongos, insectos e incluso nemátodos. En diversas especies animales se ha reportado que las lectinas participan en el reconocimiento y la eliminación celular del sistema circulatorio, así como de células envejecidas, células tumorales y microorganismos, mediante un proceso de opsonización y la participación de células con

actividad fagocítica (Peumans & Van Damme, 1995; Lis & Sharon, 2004; Sharon & Lis, 1998).

1.2 Aplicaciones de la lectinas

Las lectinas han resultado de gran utilidad en el campo biotecnológico y en la investigación biomédica. Varias lectinas que son extraídas de su fuente natural son empleadas en reacciones de precipitación, hemaglutinación y para estimulaciones mitogénicas de linfocitos. Unidas a pigmentos fluorescentes o enzimas son utilizadas como agentes citoquímicos o histoquímicos para la detección de glicoconjugados en tejidos, células, organelos celulares, rutas metabólicas y glicosilación de proteínas. Han sido indispensables para la purificación y aislamiento de glicoproteínas, glicopéptidos y oligosacáridos, por cromatografía de afinidad. La unión a lectinas ha sido usada para demostrar que los receptores de membrana para hormonas, factores de crecimiento, neurotransmisores y toxinas, son en su mayoría, glicoconjugados. En cuanto al campo clínico, fueron clave para la tipificación de los diferentes grupos sanguíneos, se han utilizado como auxiliares en el transplante de médula ósea en pacientes con inmunodeficiencias severas; además de ser empleadas para la elaboración de tratamientos contra condiciones patogénicas mediadas por leucocitos y tratamientos anti-adhesión de bacterias patógenas (Sharon & Lis, 2004; Sharon, 2008).

1.3 Tipos de lectinas

Existe una gran variedad de lectinas, y han sido agrupadas con base en diferentes características.

Una de las primeras clasificaciones se realizó basándose en la especificidad hacia un determinado carbohidrato (Lis & Sharon, 1998). De acuerdo a esta clasificación se organizaron como lectinas unidoras de:

- Manosa
- Galactosa/ N-acetilgalactosamina
- N-acetilglucosamina
- Fructosa
- N-acetilneuramínico

La clasificación moderna de lectinas utiliza como primer criterio de división el tipo de organismo del cual proviene y posteriormente los subdivide considerando el motivo estructural. Sin embargo, como se puede observar en la Fig. 1, el segundo criterio no siempre es un motivo estructural y se remite a algún grupo específico, como en el caso de las lectinas de plantas, las cuales se describen a continuación. (3D LectinDatabase <http://lectin3d.cermav.cnrs.fr>)

CLASIFICACIÓN DE LAS LECTINAS



Figura 1. Clasificación moderna de las lectinas. Emplea como primer criterio el tipo de organismo del cual procede la lectina y, posteriormente, subdivide considerando el motivo estructural (Algas, código PDB 2GUE. Hongos y levaduras, código PDB 2IHO. Bacterias, código PDB 1QXM. Animales, código PDB 1E9L. Virus, código PDB 1HAO. Plantas, código PDB 1IQB).

1.3.1 Lectinas de plantas

El componente principal de la mayoría de las lectinas vegetales son láminas β . La orientación que éstas presenten dentro las subunidades de la lectina es clave para que el reconocimiento hacia carbohidratos sea específico (Sinha *et al.*, 2007). En la figura 2 se muestran ejemplos de cada uno de los tipos de lectinas de plantas con sus respectivos sitios de unión.

β - Prisma o de tipo Jacalina

En este grupo se encuentran las lectinas vegetales que presentan una estructura tridimensional muy similar a la de *Artocarpus integrifolia* (Jacalina). Son lectinas tetraméricas glicosiladas, donde cada subunidad contiene una cadena pesada (α) y una cadena ligera (β), y están constituidas por tres láminas β antiparalelas arregladas de manera de un prisma triangular (Sinha *et al.*, 2007).

β - trébol

El motivo β - trébol es bastante común. Estas lectinas están formadas por dos monómeros, cada uno de los cuales presentan dos dominios, un dominio N y un dominio C unidos por una pequeña hélice 3_{10} . Cada dominio está formado por una repetición de tres subdominios, donde cada uno consta de láminas β formadas por 4 hebras antiparalelas. Estos subdominios son estructuralmente similares en secuencia uno del otro y juntos forman una estructura globular con la simetría interna repetida 3 veces (Loris, 2002).

Monocotiledóneas

Presentan una secuencia de aminoácidos altamente conservada. Son lectinas tetraméricas, donde cada monómero tiene un peso molecular de ~ 12 kDa. El sitio de reconocimiento a carbohidratos está formado por cuatro hojas β antiparalelas unidas entre sí por giros. El conjunto se asocia de manera que forma una corona aplanada, dejando aparecer un gran túnel central (Loris, 2002).

Leguminosas

Es la familia de lectinas vegetales más estudiada. Generalmente constan de dos o cuatro subunidades idénticas, donde cada subunidad contiene un sitio de unión a iones metálicos (Ca^{+2} , Mn^{+2} y Mg^{+2}). Están constituidas por 12 hebras β antiparalelas conectadas entre sí por bucles, lo que genera una estructura aplanada en forma de domo. Cuatro bucles localizados en la parte superior del monómero forman el sitio de reconocimiento a carbohidratos (Fig. 5) (Loris, 2002).

Dominios tipo heveína.

También llamados dominios de unión a quitina, los dominios tipo heveína son de tamaño pequeño, constan de 30 a 45 residuos ricos en glicina y cisteína, los cuales presentan posiciones altamente conservadas y se encuentran organizados en torno a un núcleo de cuatro enlaces disulfuro, lo cual propicia que no existan estructuras secundarias regulares a excepción de un pequeña α hélice de cinco residuos. Los miembros de esta familia presentan, generalmente, dos subunidades idénticas. Cada subunidad está constituida por cuatro dominios tipo heveína. Cada dominio presenta un sitio de reconocimiento a carbohidratos (Fig. 6) (Loris, 2002. Jiménez-Barbero, *et al.*, 2006).

Este tipo de dominio fue descrito por primera vez en la estructura de la Aglutinina de Germen de Trigo (AGT) (Loris, 2002, Jiménez-Barbero, *et al.*, 2006).

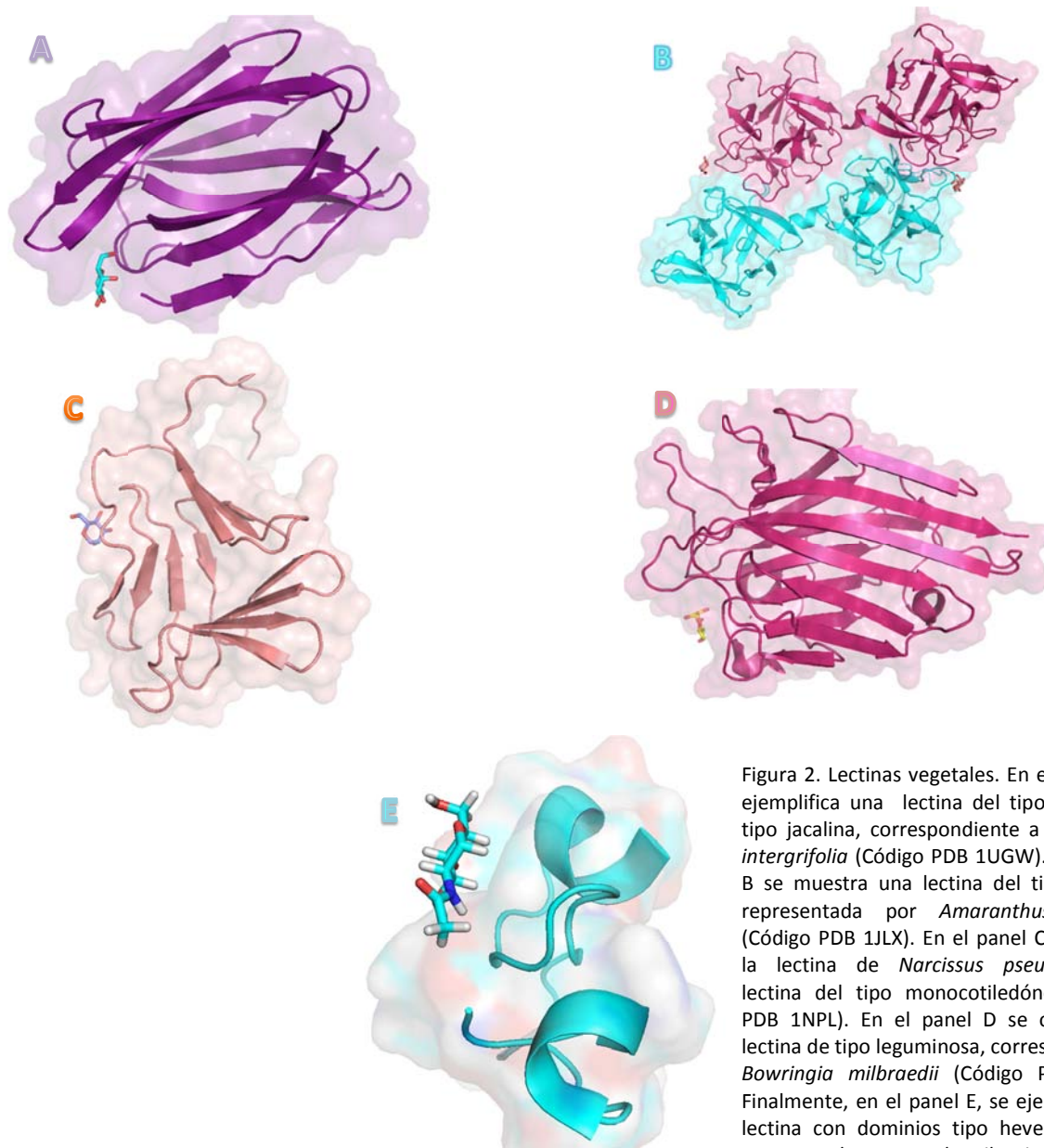


Figura 2. Lectinas vegetales. En el panel A se ejemplifica una lectina del tipo β -prisma o tipo jacalina, correspondiente a *Artocarpus intergrifolia* (Código PDB 1UGW). En el panel B se muestra una lectina del tipo β -trébol, representada por *Amaranthus caudatus* (Código PDB 1JLX). En el panel C se muestra la lectina de *Narcissus pseudonarcissus*, lectina del tipo monocotiledóneas (Código PDB 1NPL). En el panel D se observa una lectina de tipo leguminosa, correspondiente a *Bowringia milbraedii* (Código PDB 2FMD). Finalmente, en el panel E, se ejemplifica una lectina con dominios tipo heveína. La cual corresponde a *Hevea brasiliensis* (Código PDB 1TOW).

1.4 Aglutinina de germen de trigo

En los años 60 se observó que células neoplásicas diferían de células normales con respecto a la composición del glicocáliz, lo cual indicaba que la superficie celular era un factor determinante en el estado neoplásico (Aub *et al.*, 1963). Al compararse la respuesta entre células normales y células de tumor murino con lipasa de germen de trigo, se observó una aglutinación preferente por las células tumorales. Estos experimentos condujeron al descubrimiento de la AGT (Aub *et al.*, 1965). El aislamiento y purificación de la AGT se realizó años después. Además, se demostró que el sitio tumor-específico que interactúa con la aglutinina contiene *N*-acetilglucosamina (NAG) (Burger & Goldberg, 1967). Por tanto, la AGT es una lectina emblemática por haber sido la primera proteína descrita con capacidad de discriminar entre células malignas y normales. Es una lectina que se encuentra en abundancia en las semillas de *Triticum vulgare*. Existen 3 isoformas (AGT 1, ATG 2 y ATG 3) y sus secuencias presentan identidad de 95%-97%. Como se detalla en la Tabla 1, presentan variaciones de residuos en 10 posiciones (Wright & Raikhel, 1989).

Isoforma 1	Isoforma 2	Isoforma 3
<u>Residuo</u>	<u>Residuo</u>	<u>Residuo</u>
Asn ⁹	Asn ⁹	Gly ⁹
Ala ⁵³	Ala ⁵³	Lys ⁵³
Thr ⁵⁶	Pro ⁵⁶	Pro ⁵⁶
Gln ⁵⁹	His ⁵⁹	His ⁵⁹
Tyr ⁶⁶	His ⁶⁶	His ⁶⁶
Ala ⁹³	Ser ⁹³	Ala ⁹³
Phe ¹⁰⁹	Phe ¹⁰⁹	Tyr ¹⁰⁹
Gly ¹¹⁹	Gly ¹¹⁹	Glu ¹¹⁹
Ser ¹²³	Ser ¹²³	Asn ¹²³
Gly ¹⁷¹	Ala ¹⁷¹	Gly ¹⁷¹

Tabla 1. Posiciones que presentan cambios de residuos entre las tres isoformas de AGT.

La AGT, además de pertenecer al grupo de las lectinas con dominios tipo heveína, forma parte de la familia de lectinas unidoras de quitina. Es capaz de reconocer y unirse específicamente a residuos *N*-acetilneuramínico (NANA) y *N*-acetilglucosamina (NAG), este último monómero de la quitina. Debido a esto, desempeña un rol importante en el mecanismo de defensa de la planta contra agentes patógenos, pues es capaz de aglutinar e inactivar bacterias y hongos (Nagata & Burger, 1974; Wright *et al.* 1984, 1986).

La AGT es un homodímero de 34 kDa. Cada subunidad consta de 4 dominios homólogos tipo heveína (denominados dominios A, B, C y D) de 42 a 43 residuos de aminoácidos cada uno (Fig. 3). Cada dominio está conformado por dos pequeñas hebras β y una pequeña hélice α izquierda, y presenta 4 puentes disulfuro en posiciones estructuralmente equivalentes. Por lo que cada monómero posee un total de 16 puentes disulfuro, lo que le brinda una alta estabilidad y una elevada resistencia a la

desnaturalización tanto térmica como química (Rodríguez-Romero *et al.*, 1989; Portillo-Téllez *et al.*, 2011).

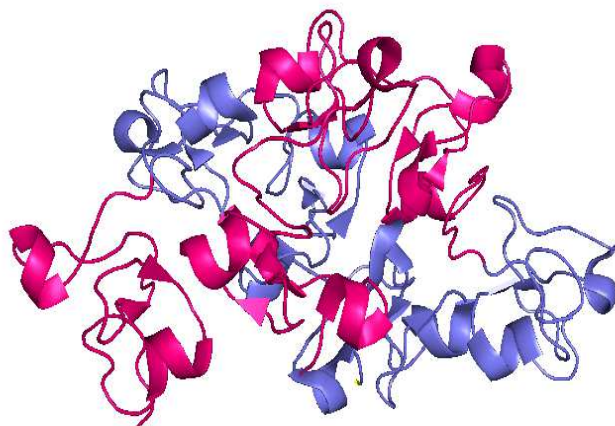


Figura 3. Homodímero de AGT. Las dos subunidades se resaltan en diferentes colores. Código PDB 2UVO

En el dímero, las subunidades se asocian de forma cabeza-cola, dando como resultado parejas de dominios (A-D y B-C,) donde cada miembro pertenece a una subunidad diferente (Fig. 4). Cada subunidad presenta 4 sitios de unión únicos, uno por cada dominio. En el dímero, estos sitios de reconocimiento a carbohidratos están localizados en la interfase de contacto entre las dos subunidades, conformado por dos dominios intercatenarios (Wright & Kellogg, 1996).

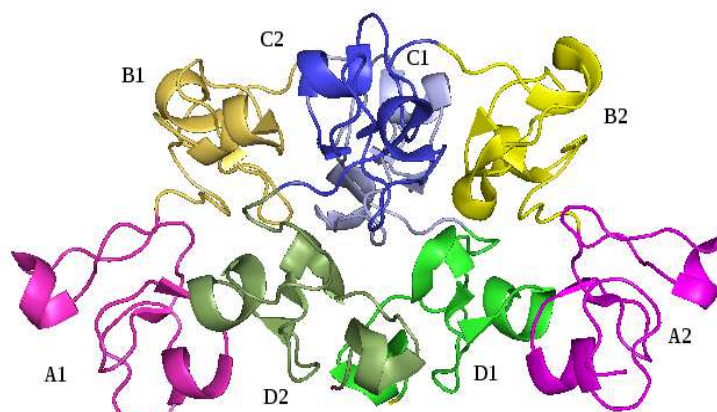


Figura 4. Asociación de los dominios en forma cabeza-cola, cada dominio pertenece a una subunidad diferente. Código PDB 2UVO

Los sitios de unión en el dímero están compuestos por dos regiones, una región primaria, que proviene de uno de los dos dominios, compuesta por tres residuos aromáticos encargados de realizar las interacciones de apilamiento con la parte cíclica del azúcar, y una serina altamente conservada, y otra región secundaria, que es aportada por el dominio complementario, la cual no se encuentra conservada y que consiste de uno o dos residuos polares (Sharon & Lis, 1998; Wright & Kellogg, 1996). Por tanto, el dímero

presenta 8 sitios de unión extendidos a lo largo de toda la molécula. Estudios recientes han reportado la funcionalidad de los 8 sitios (Fig. 5) (Schwefel *et al.*, 2010). Los aminoácidos que interactúan de forma directa con los carbohidratos son Ser¹⁹, His, ácido aspártico, ácido glutámico, Tyr^{21,23}, arginina, asparagina y Trp³⁰. El dominio B no presenta este último residuo aromático.



Figura 5. Sitios de reconocimiento de carbohidratos del dímero de la AGT. El ligando se presenta en esferas verdes. En el panel A, se pueden observar los sitios B1/C2, C1/B2, B2/C1 y C2/B1. El Panel B corresponde a una rotación de 180 ° con respecto al panel A en el eje de las x, donde se observan los sitios de unión A1/D2, D1/A2; además, es posible observar los sitios de unión A1 y A2, que están conformados únicamente por un solo dominio.

La AGT forma homodímeros transitorios débiles bajo condiciones neutras, y se disocia a pH ácido, formando monómeros compactos (Nagata & Burger, 1974; Chavelas, *et al.*, 2004). El grupo de Balasubramaniam encontró que cuando la AGT es tratada con bromuro de cianógeno, el cual corta entre la Met²⁶ y Gly²⁷ de la región N-terminal (Dominio A), la proteína se disocia completamente. Esto significa que la integridad del dominio N-terminal es esencial para la formación del dímero (Balasubramaniam *et al.*, 1991). Recientemente, se reportó que el plegamiento de las subunidades libres de la AGT ocurre en múltiples etapas, comportamiento que es correlacionado con la composición multidominio de dicha lectina (Portillo-Téllez *et al.*, 2011). Según las condiciones de la solución, la dimerización puede proceder de manera acoplada, o no, a cambios conformacionales significativos de las subunidades libres. Este comportamiento no se ha observado en otras lectinas vegetales, lo cual implica una base molecular diferente para la función de la aglutinina del germen de trigo (Portillo-Téllez *et al.*, 2011).

1.5 Aplicaciones de la AGT

La AGT, al presentar una alta afinidad por NAG, resulta de gran utilidad para estudiar células que poseen dicho carbohidrato en su superficie celular. Por otro lado, ha resultado ser una eficaz acarreadora de fármacos, lo cual ha tenido un gran impacto en el campo médico. Se ha demostrado que la AGT puede traspasar la barrera hemato-encefálica, la mucosa nasal, ojos (córnea), pulmones y el epitelio intestinal (Schaeffer *et al.*, 1982; Bies *et al.*, 2003; Gabor *et al.*, 2004; Gao *et al.*, 2007; Surti *et al.*, 2008). Por lo tanto, es una excelente candidata como transportadora de fármacos que son administrados vía oral, ya

que además de soportar un amplio intervalo de valores de pH, exhibe propiedades de mucoadhesión, citoadhesión, citoinvasión y trancitosis con enterocitos (Wood *et al.*, 2008; Gabor *et al.*, 2004).

Una de las aplicaciones con mayor impacto desde su descubrimiento, es el reconocimiento de células cancerígenas (Gastman *et al.*, 2005). Estudios recientes han comprobado que la AGT es capaz de inducir apoptosis de células tumorales mediante una ruta mitocondrial, produciendo cambios en la membrana celular que se traducen a una pérdida de potencial transmembranal. Además, provoca una ruptura de la membrana interna mitocondrial, la pérdida del citocromo C y la activación de la caspasa 9. Se desconoce el mecanismo preciso por el cual la AGT induce la apoptosis; sin embargo, es sabido que la unión a los carbohidratos de la superficie celular es crucial para que ocurra la muerte celular.

1.6 Interacción proteína-ligando: parámetros termodinámicos.

Macromoléculas biológicamente relevantes, como las proteínas, no actúan como entidades estáticas y aisladas; por el contrario, se encuentran involucradas en numerosas interacciones con otras moléculas, como ácidos nucleicos, lípidos, carbohidratos, solventes e incluso, con otras proteínas. Estas interacciones, a menudo, muestran una alta afinidad y una gran especificidad (Bronowska, 2011). Para una mejor comprensión de los procesos de reconocimiento molecular de macromoléculas y sus ligandos, es necesaria una caracterización de la energética de unión, así como una correlación de datos termodinámicos de las estructuras interactuantes que se encuentran involucradas. Una descripción cuantitativa de las fuerzas que rigen las asociaciones moleculares, requiere la determinación de los cambios de todos los parámetros termodinámicos, incluidos el cambio en la energía libre de Gibbs (ΔG), la entalpía (ΔH) y la entropía (ΔS) (Perozzo *et al.*, 2004).

El único método directo para medir el cambio de calor durante la formación del complejo proteína-ligando, a temperatura constante, es la calorimetría de titulación isotérmica (ITC). En esta técnica, el ligando se titula en una solución que contiene la proteína, generando o absorbiendo calor, el cuál puede ser cuantificado por el calorímetro (Bronowska, 2011; Perozzo *et al.*, 2004).

1.6.1 Calorimetría de titulación isotérmica (ITC)

En un experimento típico de ITC, una solución de ligando es titulada en una solución que contiene proteína, en pequeños volúmenes, durante un determinado lapso de tiempo. En este tiempo, los cambios de calor resultantes de la interacción proteína-ligando son monitoreados. Cada pico representa un cambio de calor, el cual está asociado con la

inyección de una muestra del ligando en la solución que contiene a la proteína, dentro de la celda de reacción. Las concentraciones totales de ligando y proteína, en sus respectivas soluciones, son conocidas. Cuando el sistema proteína-ligando alcanza la saturación, los cambios de calor relacionados con la unión del ligando, disminuyen y sólo son observables los calores de dilución (Fig. 6a) (Leavitt & Freire, 2001; Bronowska, 2011). Una curva de unión se obtiene tras realizar varias inyecciones del ligando a la celda de reacción y medir los calores que se obtienen de la interacción del ligando con la proteína dentro de la celda (Fig. 6b) (Bronowska, 2011).

Antes de que ocurra la primera inyección, se aplica una pequeña potencia constante a la celda de referencia. Esto se hace con el fin de que la potencia aplicada a la celda de referencia active la alimentación a la celda de muestreo, y esta última se mantenga bajo un régimen de microcalentamiento, mientras no haya liberación o requerimientos de calor por efecto de una reacción. Dicha señal constituirá la línea base, y es importante que esta se mantenga constante a lo largo de todo el experimento. Una vez estabilizada la línea base, la inyección del ligando a la solución de macromoléculas provocará que la reacción libere o absorba calor, dependiendo de si la asociación es un proceso exotérmico o endotérmico. Para una reacción exotérmica, la temperatura en la celda de muestreo aumentará de forma diferencial, provocando que se desactive su alimentación de potencia, de forma tal que el arreglo mantenga la misma temperatura con respecto a la celda de referencia. En el caso de una reacción endotérmica, la alimentación a la celda de muestreo se incrementará para mantener la temperatura constante (Leavitt & Freire, 2001).

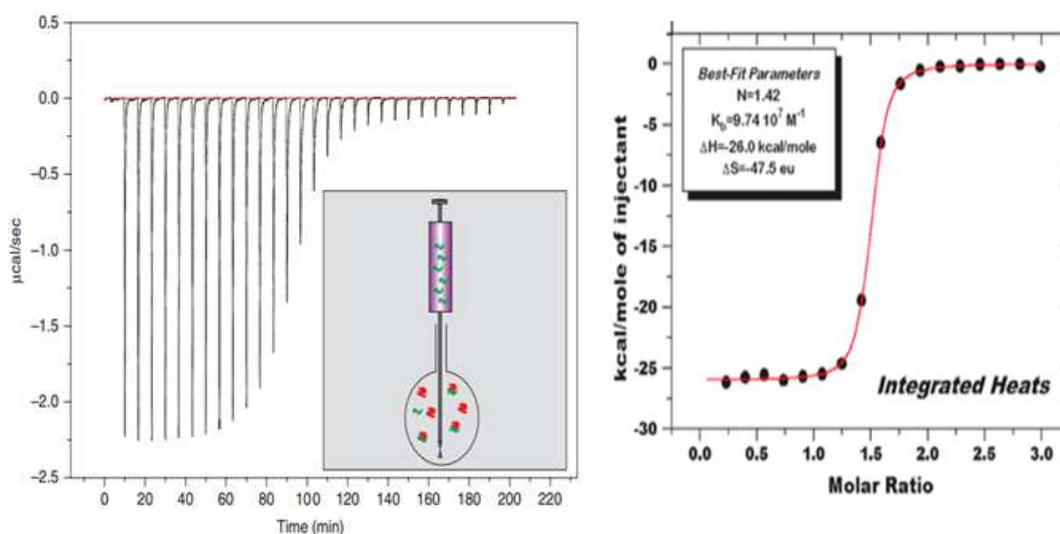


Figura 6. . En el panel de la izquierda se muestra un experimento típico de ITC. Los picos observados son resultado de un cambio de calor, el área debajo de cada uno, es el calor (μcal) asociado a la inyección del ligando. En el recuadro se muestra la configuración de una celda de reacción. La celda se llena con la proteína en disolución (rojo). La jeringa de inyección se llena con el ligando (verde), además, agita la solución para asegurar una mezcla homogénea (imagen tomada de Leavitt & Freire, 2001). En el panel de la derecha, se observa una curva de unión (modificada de Bronowska, 2011).

1.7 Técnicas Espectroscópicas

Diferentes técnicas espectroscópicas han sido relevantes en esclarecer propiedades físicas y conformacionales de biomoléculas. Al variar la escala de tiempo y longitudes de onda, se puede obtener información para determinar concentraciones y pesos moleculares, así como información acerca de la estructura secundaria y terciaria de proteínas. Estas técnicas se emplean para detectar cambios estructurales en biomacromoléculas (Dyson, 2010).

Todas las formas de espectroscopía toman ventaja de la diferencia en los niveles energéticos que se producen de forma normal en una molécula o compuesto, o tras la aplicación de una fuerza externa, como un campo magnético. Las líneas individuales en un espectro resultan de la energía que es absorbida o emitida como un cambio en el nivel energético. Las distintas formas de espectroscopía se utilizan ampliamente en diferentes rangos de frecuencia (Fig. 7) (Dyson, 2010).

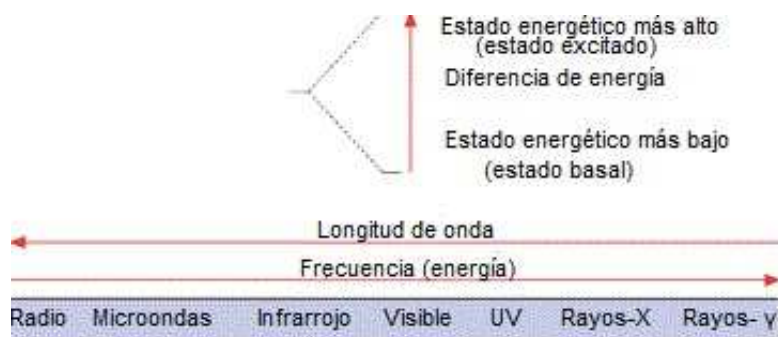


Figura 7. Niveles energéticos que son perturbados durante un experimento espectroscópico. Modificado de Dyson, 2010.

1.7.1 Dicroísmo circular

El dicroísmo circular (DC) es una técnica que se basa en la absorción diferencial de la luz circularmente polarizada. Este efecto se produce cuando un cromóforo es quiral. Puede proporcionar información acerca de la estructura de biomacromoléculas, en particular de proteínas (Sharon & Priece, 2005, 2009).

El espectro de DC en la región de UV-lejano (típicamente de 180nm – 250nm) se puede utilizar para proporcionar estimaciones cuantitativas del contenido de estructura secundaria de una proteína. En esta región, el cromóforo de absorción es, principalmente, el enlace peptídico. En esta región, existen dos transiciones, una se centra alrededor de 220 nm y es débil pero amplia, la siguiente es intensa y ocurre alrededor de 190 nm. Tanto los aminoácidos aromáticos, en especial el Trp, como los enlaces disulfuro, pueden

contribuir minoritariamente al espectro de DC en el UV-lejano (Sharon & Priece, 2005, 2009).

Las diferentes formas de estructura secundaria regular de péptidos y proteínas plegadas exhiben espectros distintivos DC en la región del UV-lejano (Fig. 8)

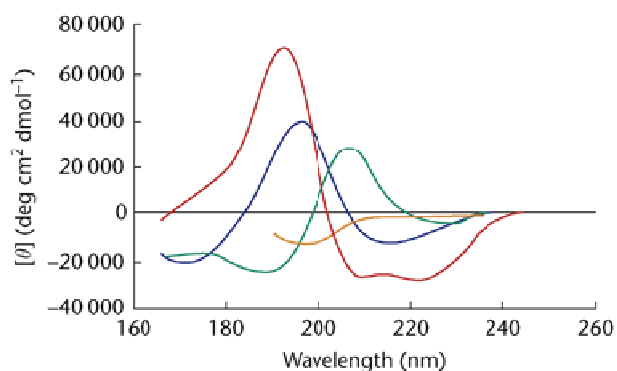


Figura 8. Espectros de DC en la región del UV-lejano, con varios tipos de estructura secundaria. En rojo, α -hélice; en azul, láminas β antiparalelas; en verde, giros β tipo I; en naranja, estructura irregular. (Tomado de Sharon & Priece, 2009)

El espectro de DC en la región del UV-cercano (típicamente de 260 nm-320 nm) deriva de los aminoácidos aromáticos en cadenas laterales, de las posibles contribuciones de los enlaces disulfuro o de cofactores no proteicos que pueden absorben en esta región del espectro. Cada aminoácido aromático tiende a presentar un perfil de longitud de onda característico: el Trp tiene un pico cercano a 290 nm con una estructura fina entre 290 nm y 305 nm; Tyr exhibe un pico entre 275 nm y 282 nm, con un desnivel, a longitudes de onda más largas, generalmente oscurecido por bandas debido al triptófano; Phe muestra bandas más débiles pero nítidas con estructura fina entre 255 y 270 nm (Fig. 9). La forma real y la magnitud del espectro de CD de una proteína, dependerá del número de cada tipo de aminoácidos aromáticos que contenga, de la movilidad que éstos tengan, la naturaleza de su ambiente (puentes de hidrógeno, grupos polares y polarizabilidad) y su disposición espacial en la proteína (Sharon & Priece, 2005).

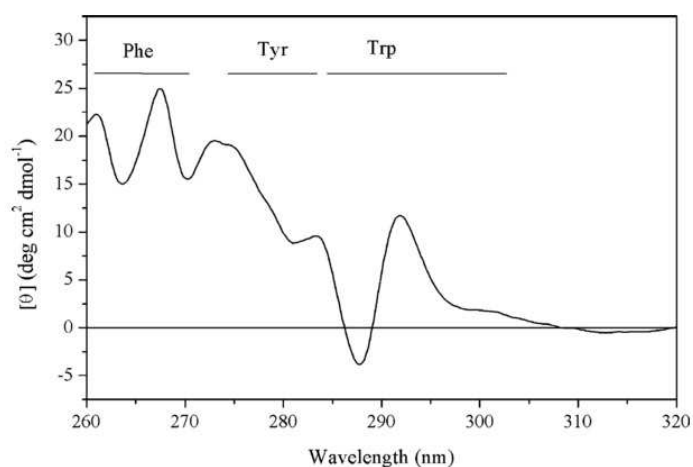


Figura 9. Espectro de CD en la región del UV cercano de la deshidrogenasa tipo II de *Streptomyces coelicolor*. Los rangos de longitud de onda corresponden a las señales de Phe, Tyr y Trp en cadenas laterales. (Imagen tomada de Sharon & Priece, 2005).

1.7.2 Espectrofotometría de fluorescencia

La espectrofotometría de fluorescencia es una técnica que se fundamenta en la emisión de fotones durante la relajación molecular de estados electrónicos excitados. Este proceso fotónico implica transiciones entre los estados electrónicos y vibracionales de moléculas fluorescentes (fluoróforos) (So & Dong, 2001).

El espectro de excitación se define como la intensidad de fluorescencia medida como función de una longitud de onda de excitación a una longitud de emisión constante; por el contrario, el espectro de emisión es la intensidad de fluorescencia medida en función de una longitud de onda de emisión a una longitud de onda de excitación constante (So & Dong, 2011).

La fluorescencia es un excelente método para el estudio de la estructura de biomoléculas como las proteínas, pues es muy sensible al ambiente bioquímico en el que se encuentra el fluoróforo. Los cambios en el espectro de fluorescencia resultan del relajamiento de aminoácidos fluorescentes, tales como triptófano y tirosina, los cuales son reporteros cruciales de la estructura proteína así como de su plegamiento (So & Dong, 2001).

1.8 Espectrometría de masas

La espectrometría de masas de desorción/ionización láser asistida por matriz (MALDI), se ha convertido en una herramienta analítica común para péptidos, proteínas y otras biomoléculas. En el análisis de MALDI, la muestra de interés se co-cristaliza con una matriz, la cual evita la destrucción de la misma. La matriz usualmente es un ácido orgánico que absorbe en la región UV. Posteriormente, la mezcla matriz-muestra, es irradiada con láser, lo que resulta en la vaporización de la matriz. La matriz juega un papel importante al absorber fuertemente la energía de la luz láser, causando, de manera indirecta, que la muestra se vaporice. La matriz también funciona como un aceptor y donador de protones, ionizando la muestra. La transferencia de energía dirigida durante un evento de desorción inducida por láser asistida por matriz, proporciona que los iones de la muestra permanezcan elevados e intactos, permitiendo la medición de compuestos con una alta precisión y sensibilidad por debajo de los picomoles. El analizador de tiempo de vuelo (TOF) se basa en la medición del período de tiempo desde la aceleración de los iones en la fuente hasta su impacto en el detector. La capacidad de generar información tan precisa, resulta sumamente útil para la identificación y caracterización de proteínas. (Lewis, Wei & Siuzdak, 2000).

2. Antecedentes directos

Recientemente, nuestro grupo de investigación realizó la caracterización energética del desplegamiento y la disociación de la isoforma 1 de la AGT (AGT1), en función del pH y la temperatura, mediante técnicas calorimétricas de alta precisión (Portillo-Téllez *et al.*, 2011).

Los resultados obtenidos de la calorimetría diferencial de barrido (DSC, por sus siglas en inglés) a pH 2 muestran un solo pico independiente de la concentración de proteína, lo cual indica que la AGT, a ese pH, se encuentra predominantemente en un estado monomérico (Fig. 10 A). En estas condiciones, la AGT muestra un desplegamiento térmico totalmente reversible, el cual es consistente con tres transiciones independientes de dos estados, lo que indica que el plegamiento de la subunidad libre es un proceso de múltiples pasos, un comportamiento que se correlaciona con su composición multidominio (Fig. 10 B).

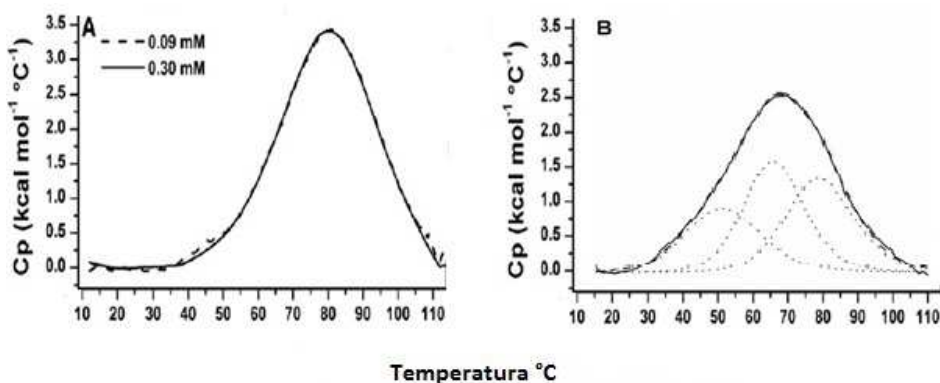


Figura 10. Perfiles calorimétricos. A) a pH 2 se observa un solo pico independiente de la concentración de proteína. B) Análisis de desconvolución de la traza calorimétrica a pH 2. Imagen modificada de Portillo-Téllez, *et al.*, 2011.

Por otro lado, conforme el pH aumenta, las trazas de DSC mostraron la aparición de otro pico a temperaturas bajas. A pH 2.5, se empleó una baja concentración de proteína (0.09 mM) y se produjo un solo pico; en cambio, a una mayor concentración (0.22 mM), se observó un segundo pico, el cual resultó dependiente de la concentración de proteína, por lo que corresponde a la disociación del dímero (Fig. 11).

Experimentos de calorimetría de dilución isotérmica revelaron que la AGT forma homodímeros transitorios débiles. Según las condiciones de la solución (diferentes valores de pH y temperatura), la dimerización puede proceder de manera acoplada o no a cambios conformacionales significativos de las subunidades libres, es decir, puede proceder como una asociación tipo cuerpo rígido, donde las subunidades tienen los cuatro dominios plegados, o similar a un evento de plegamiento inducido por unión. Este comportamiento no se ha observado en otras lectinas vegetales, las cuales forman oligómeros fuertes obligados, lo cual implica una base molecular diferente para la función de la aglutinina del germen de trigo.

Como se mencionó anteriormente, a pH 2 la AGT es monomérica y su desplegamiento inducido por perturbación térmica sólo presenta tres transiciones. El hecho de que sólo se hayan observado esa cantidad de transiciones, cuando se esperaban cuatro debido al número de dominios que tiene la AGT, llevó a plantear diferentes escenarios moleculares del desplegamiento de la lectina. Uno de ellos era que uno de los dominios se encontraba desplegado a ese pH.

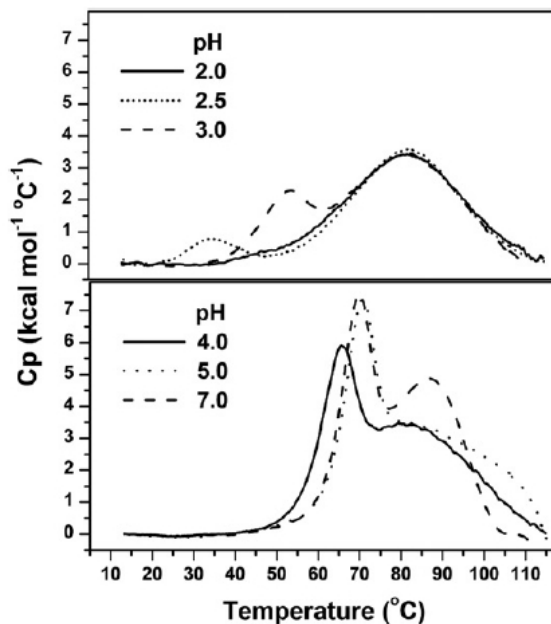


Figura 11. Trazas calorimétricas en función del pH. Mientras el pH aumenta, se observa la aparición de un segundo pico. Modificada de Portillo-Téllez, *et al.*, 2011).

Nuestro mismo grupo de investigación realizó un nuevo estudio, en el cual se caracterizó el desplegamiento de los dominios de manera independiente en función al pH y temperatura mediante técnicas calorimétricas y espectroscópicas. (Medrano-Cerano, 2014). Estos dominios fueron expresados de manera aislada en células bacterianas. Los espectros de dicroísmo circular mostraron que todos los dominios se encuentran plegados a pH 6, exhibiendo el patrón característico tipo heveína de la AGT nativa, con un máximo positivo a 225 nm y un mínimo negativo a 205 nm. Sin embargo a pH 2, el dominio D, a diferencia de los otros dominios, mostró un patrón de proteína desplegada. Además, las endotermas para cada dominio a pH 2, determinadas por DSC, mostraron un pico correspondiente a una sola transición de desplegamiento; en cambio, el dominio D no presentó ningún pico, es decir, a pH 2 este dominio se encuentra desplegado. Estos resultados dieron soporte experimental directo a la propuesta de que uno de los dominios se encontraba desplegado.

3. Planteamiento del problema

Es sabido que la AGT es una proteína altamente resistente a la perturbación térmica y la desnaturalización ácida. Los estudios que han sido llevados a cabo en nuestro grupo de investigación han mostrado algunas bases moleculares para comprender dicha estabilidad.

Cuando la AGT se encuentra dentro de un intervalo de valores de pH $>3 \leq 7$ y a temperaturas iguales o menores a la temperatura corporal humana, la encontramos en su conformación nativa, es decir que existe un equilibrio entre las concentraciones del monómero y del dímero. Al disminuir el pH, la estabilidad del dímero se ve comprometida posiblemente porque uno de los dominios (el dominio D) se encuentra desplegado. Este fenómeno en el cual el desplegamiento parcial del monómero así como la disociación del dímero, puede ser revertido al incrementar los valores de pH. Por tanto, le proporciona a la AGT la posibilidad de atravesar el tracto digestivo y actuar como un eficaz transportador de medicamentos por vía oral, pues es capaz de soportar la acidez del estómago, y llegar al duodeno, tomando nuevamente su conformación dimérica (Gabor *et al.*, 2004).

El presente proyecto tiene como objetivo dilucidar y complementar, con mayor detalle, las bases energéticas del proceso de unión de ligandos a la AGT, pues se trata de un mecanismo muy complejo que involucra 8 sitios diméricos y por otra parte, 4 monoméricos que no necesariamente presentan constantes de unión iguales. Los sitios de unión dentro del dímero se encuentran en la interfase, lo cual implica que la unión al ligando provocará un cambio en la fracción de subunidades monoméricas y diméricas. Un modelo de esta complejidad requiere, para ser resuelto, fragmentar al sistema e irlo reconstruyendo progresivamente. Para ello, se realizó calorimetría de titulación isotérmica (ITC) de los cuatro dominios expresados de manera recombinante de la AGT, todo ello con la finalidad de caracterizar termodinámicamente su interacción con *N-N'-N''*-triacetilquitotriosa.

4. Objetivos

4.1 General.

Comprobar la funcionalidad estructural y caracterizar energéticamente la capacidad de unión a carbohidratos de cada uno de los dominios de la AGT de manera independiente.

4.2 Particulares.

- Sobreexpresar y purificar los 4 dominios recombinantes de la AGT1.
- Comparar la estructura de los dominios aislados con respecto a la de la proteína completa (AGT 1), mediante dicroísmo circular y fluorescencia.
- Caracterizar termodinámicamente el mecanismo de unión de los dominios recombinantes de la AGT1 con *N-N'-N''*-triacetilquitotriosa mediante calorimetría de titulación isotérmica y establecer la firma termodinámica para cada proceso.
- Correlacionar las diferencias estructurales de los distintos sitios de unión con los parámetros de unión a la *N-N'-N''*-triacetilquitotriosa.

5. Hipótesis

Si los cuatro dominios de la AGT son capaces de unir y reconocer carbohidratos de forma independiente, será posible establecer si existen diferencias entre los sitios de unión, lo cual ayudará en la posterior construcción de un modelo completo de unión de la AGT con su ligando, así como determinar el mecanismo complejo de unión que presenta esta lectina.

6. Metodología

6.1 Purificación y aislamiento de la isoforma 1 de la AGT.

La aglutinina de germen de trigo se obtuvo de Sigma Chemical Co., la cual presenta una mezcla de las tres isoformas. Se utilizó la isoforma 1, ya que es la más abundante. La separación de las isoformas se llevó a cabo empleando una columna de intercambio catiónico HTRAP SP de 5 ml, conectada a un equipo de FPLC (GE, Healthcare). La columna se equilibró con buffer de ácido fórmico (20mM ácido fórmico, pH 4). La separación de la matriz se realizó con un gradiente lineal de 0 a 100 % de 750 mM LiCl, pH4, con un flujo de 1ml/min durante 120 minutos a temperatura ambiente. La detección se realizó a 280 nm.

La concentración de la AGT se determinó midiendo su absorbancia a 280 nm en un espectrofotómetro UV-1800 (Shimadzu) y usando el coeficiente de extinción molar A_{280nm} 30420 l/mol*cm, el cual se calculó, con base en la secuencia de aminoácidos, mediante el servidor <http://web.expasy.org/protparam>.

Las fracciones purificadas se dializaron en 30 mM acetato sodio, pH 4.7, para su posterior uso.

6.2 Expresión de los dominios recombinantes de la AGT1

Las construcciones para la expresión de los dominios recombinantes de la AGT1 (Fig. 12) fueron una donación por parte de Jorge Luis Medrano-Cerano, estudiante de doctorado del Dr. Enrique García. La construcción de la proteína de fusión recombinante en el plásmido de expresión pET32(a+) se muestra en la figura 16.

La proteína de fusión contiene tiorredoxina (Trx), la cual tiene la capacidad de actuar como antioxidante, facilitando el plegamiento previo a la formación de los enlaces disulfuro. Esta característica es relevante en la construcción, pues los dominios de la AGT presentan 4 enlaces disulfuro. Además posee una etiqueta de histidinas la cual es crucial para la purificación de los dominios, ya que se emplea una columna de níquel. Presenta también dos sitios de corte, uno para trombina y otro para enterocinasa. Este último importante en la purificación, pues permite eliminar la sección de la proteína que contiene la Trx y la cola de His. AGT1-X corresponde a cada uno de los cuatro dominios individuales de la AGT isoforma 1 (X= A, B, C o D).

Para la expresión de los dominios recombinantes, se inoculó una unidad formadora de colonias (UFC) aislada de la cepa de expresión *E. coli* Rosetta-gami (DE3) pLysS (la cual presenta el genotipo $\Delta(\text{ara-leu})7697 \Delta\text{lacX74} \Delta\text{phoA}$ Pvull por araD139 ahpC galE galK rpsL (DE3) F'[lac⁺ lacI^q pro] gor522::Tn10 trxB pLysSRARE (Cam^R, Str^R, Tet^R)), transformada con el plásmido pET-32(a+)-AGT1-X, en 20 ml de medio Luria Broth (LB) con los antibióticos

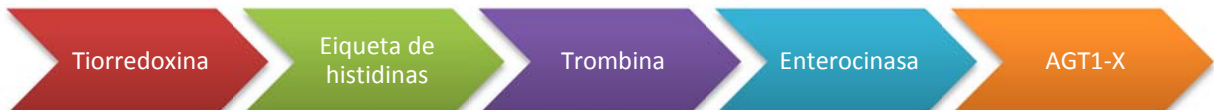
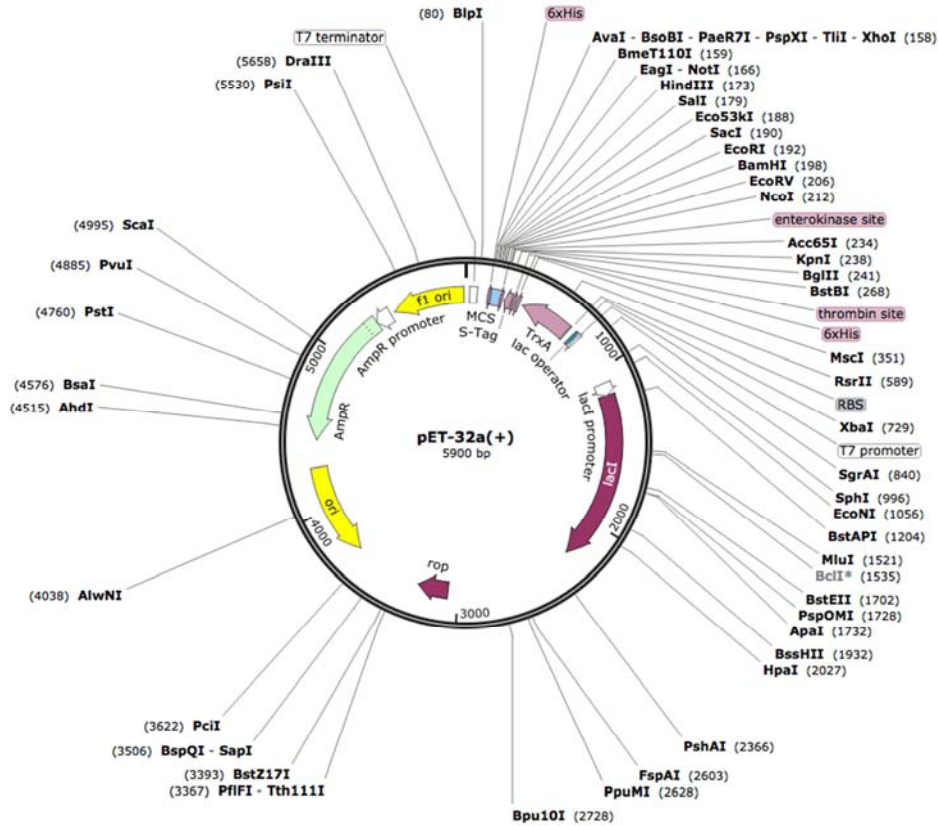


Figura 12. El parte superior de muestra el plásmido de expresión pET-32 (a+). En la parte inferior se muestra la construcción de los dominios como proteína de fusión.

ampicilina (100 µg/ml), kanamicina (15 µg/ml), tetraciclina (15 µg/ml) y cloranfenicol (34 µg/ml). Se incubó en agitación a 37°C durante 12 horas.

Posteriormente, se tomaron 15 ml del preinóculo y se agregaron a 1500 ml de medio LB con los 4 antibióticos mencionados anteriormente y se dejó en agitación continua a 37°C hasta alcanzar una densidad óptica (DO) a 600 nm de 0.6. Se indujo la expresión de la proteína con IPTG 0.5 mM y se incubó a 30°C por 16 horas. Una vez concluido el tiempo de incubación, el paquete celular se obtuvo por centrifugación (7,000 rpm/10', 4°C) y se lisó por sonicación (Misonix 3000) con buffer de lisis (50 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, a pH 8.0) y 1 mM de fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), el cual es un inhibidor de proteasas.

La fracción soluble se separó de la insoluble por centrifugación (14,500 rpm/40', 4°C). La presencia de la proteína recombinante se determinó mediante geles de

poliacrilamida con detergente aniónico dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) tanto para la fracción soluble como para la insoluble, encontrándose en la primera.

6.3 Purificación por columna de afinidad de los dominios recombinantes.

La fracción soluble obtenida por centrifugación se filtró a través de una membrana de 0.22 μm de tamaño de poro (Millipore) y se hizo pasar a través de una columna de níquel Ni-NTA Superflow Cartridges (QIAGEN) de 5 ml, a un flujo de 1ml/min.

La columna se equilibró con 4 volúmenes (1 volumen = 5 ml) de buffer de unión (50 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl pH 8.0). Posteriormente se pasó la fracción soluble con 30 mM de imidazol, se lavó con 4 volúmenes de buffer de unión y se eluyó con 4 volúmenes de buffer de elución (50 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, 300 mM imidazol, pH 8.0). Finalmente se realizó un segundo lavado con 4 volúmenes de buffer de elución.

6.4 Corte con enterocinasa.

Una vez realizada la purificación de las proteínas de fusión por columna de afinidad, se dializaron los eluidos en buffer de diálisis (50 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, pH 8.0) para eliminar el imidazol. A la proteína ya dializada se le agregaron CaCl_2 1 mM, 0.1% de Tween-20 y enterocinasa EKMax (Invitrogen) en una proporción de 0.001 U de enterocinasa por cada 20 μg de proteína de fusión. Se incubó a 37°C durante 16 horas. Al finalizar la incubación, se filtró nuevamente a través de una membrana de 0.22 μm y se volvió a purificar por columna de níquel, ya que en una segunda purificación, se retiene la Trx y los dominios se obtienen en la fracción no retenida. Se confirmó mediante MALDI-TOF la presencia de los dominios purificados.

6.5 Cuantificación de los dominios recombinantes

Los dominios purificados se dializaron contra buffer de acetatos (30 mM acetato de sodio, pH 4.7). La concentración de los dominios se determinó midiendo su absorbancia a 280 nm en un espectrofotómetro UV-1800 (Shimadzu) y usando los coeficientes de extinción molar $A_{280\text{nm}}$ que se muestran en la tabla 2.

Dominio	Peso molecular (Da)	Coefficiente de extinción molar $A_{280\text{nm}}$ (l/mol*cm)
A	4762.2	10470
B	4550	4970
C	4438	6000
D	4395.9	8980

Tabla 2. Pesos moleculares y coeficientes de extinción de los cuatro dominios de la AGT1

Todos los coeficientes se calcularon basándose en la secuencia de aminoácidos, con el servidor <http://web.expasy.org/protparam>.

6.6 Dicroísmo circular

Se realizaron mediciones de los dominios y de la AGT1 a pH 4.7 para evaluar el contenido de estructura secundaria. Las mediciones se realizaron en un espectropolarímetro JASCO J-720, acoplado a un peltier termoeléctrico. Cada espectro de DC se realizó por duplicado. El barrido se hizo en el UV lejano de 250 nm a 200 nm, en una celda de cuarzo 0.1 cm de paso óptico, a una velocidad de 20 nm/min y con un tiempo de integración de 16 s. Los espectros se expresaron en elipticidad molar por residuo, θ_{MRW} , en unidades de grado*cm²/dmol (ecuación 1):

$$\theta_{MRW} = \frac{MRW * \theta_{obs}}{[P] * d * 10} \quad (1)$$

Dónde:

MRW = masa molar promedio por residuo

[P] = concentración de proteína en mg/ml

d = recorrido óptico de la celda en cm

Para cada dominio fue calculada la MRW acorde a la ecuación 2, obteniéndose para los dominios A, B, C y D, y para la AGT1 masas promedio de 105.8 g/mol, 101.1 g/mol, 100.9 g/mol, 99.9 g/mol y 101.83 g/mol, respectivamente.

$$MRW = \frac{PM_{proteína}}{residuos - 1} \quad (2)$$

6.7 Fluorescencia

Se realizaron ensayos de los dominios recombinantes y de la AGT1 a pH 4.7 La AGT1 y los dominios A, C y D se excitaron con una λ_{exc} 280 nm, correspondiente a la excitación de residuos de triptófano, y se midió la emisión en un intervalo de 290 nm a 400 nm.

Se usó un fluorímetro Olis DM 45 y una celda de cuarzo de 1cm de paso óptico. Los datos se analizaron con el software Origin.

6.8 Calorimetría de titulación isotérmica

Una vez purificados y dializados los dominios, se centrifugaron (14,500 rpm/10 min) y se filtraron a través de una membrana de 0.22 μm .

Posteriormente se determinó su concentración midiendo su absorbancia a 280 nm y usando los coeficientes de extinción anteriormente mencionados. El ligando empleado fue *N-N'-N''*-triacetilquitotriosa, un derivado trisacárido de la NAG, el cual se pesó en una microbalanza y se disolvió en buffer de acetatos (30 mM acetato de sodio, pH 4.7). Al igual que los dominios, se centrifugó y filtró para eliminar impurezas. Tanto los dominios como el ligando se degasificaron durante 20 minutos. La concentración final del ligando en la jeringa de inyección varió para cada dominio, 1.82 mM, 30 mM, 20 mM y 10.5 mM para los dominios A, B, C y D, respectivamente.

Las inyecciones realizadas durante la titulación se hicieron a un volumen constante de 1.5 μl . Se realizaron en promedio 25 con un espacio de 200 s entre cada inyección. Como blanco se midieron los calores de dilución resultantes de inyectar el ligando a la celda de reacción que sólo contenía buffer. Para realizar los experimentos se usó un microcalorímetro MicroCal ITC200 (GE Healthcare).

Los datos se analizaron con el software MCS-ORIGIN y se ajustaron a un modelo de un solo sitio de unión al ligando. De tal modo se obtuvo la constante de unión (K_a) así como el cambio en la entalpía (ΔH).

7. Resultados y discusión

7.1 Purificación y aislamiento AGT1

Para los experimentos de espectrofotometría se empleó la AGT1 como control positivo, pues es la isoforma más abundante. La separación de las isoformas se realizó por cromatografía líquida de intercambio catiónico (Fig. 13).

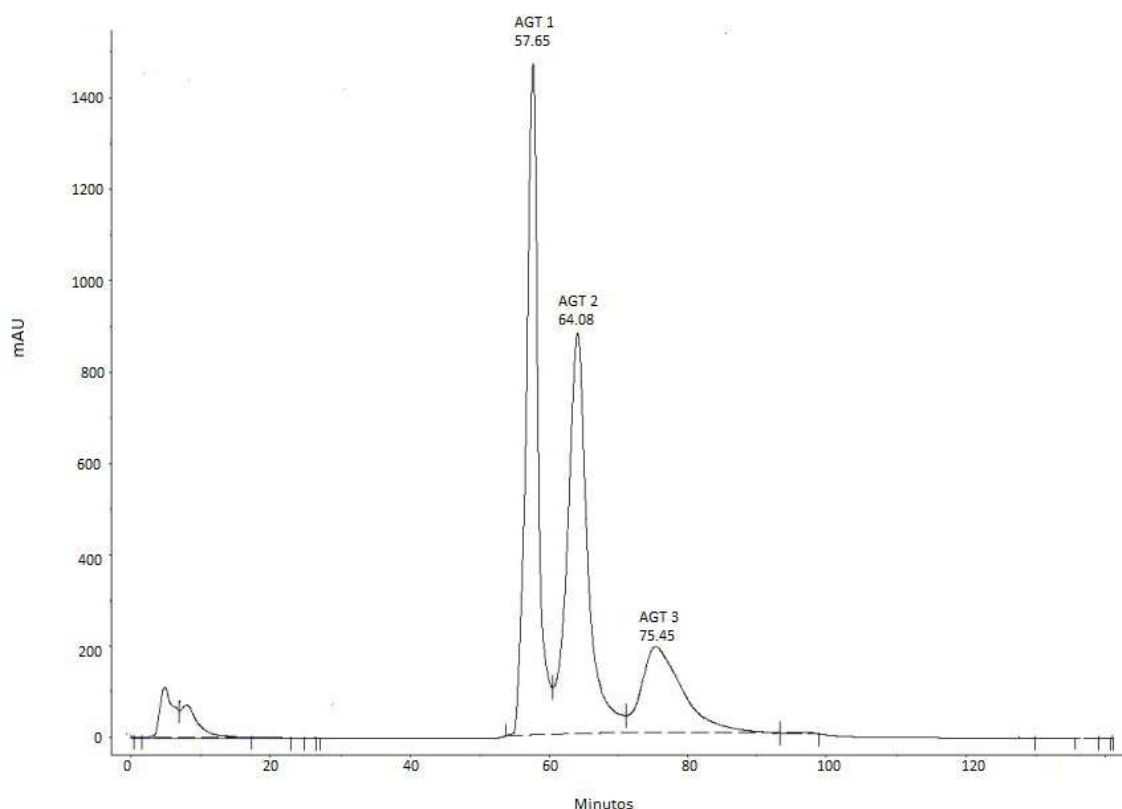


Figura 13. Perfil de elución de la AGT. Se utilizó una columna de intercambio catiónico HITRAP SP 5 mL, la cual se eluyó con buffer de LiCl 750 mM + Ácido fórmico 20 mM, pH 4. Los tres picos corresponden a las 3 isoformas: AGT1, AGT2 y AGT3

7.2 Purificación dominios recombinantes.

Una vez obtenidas las fracciones solubles de los cuatro dominios (AGT-X), se purificaron mediante una columna de afinidad Ni-NTA Superflow Cartridges (QIAGEN), previamente equilibrada con buffer de unión. La elución se realizó con buffer de elución, en 6 ml. La purificación de los dominios como proteínas de fusión se verificó mediante SDS-PAGE (Fig. 14).

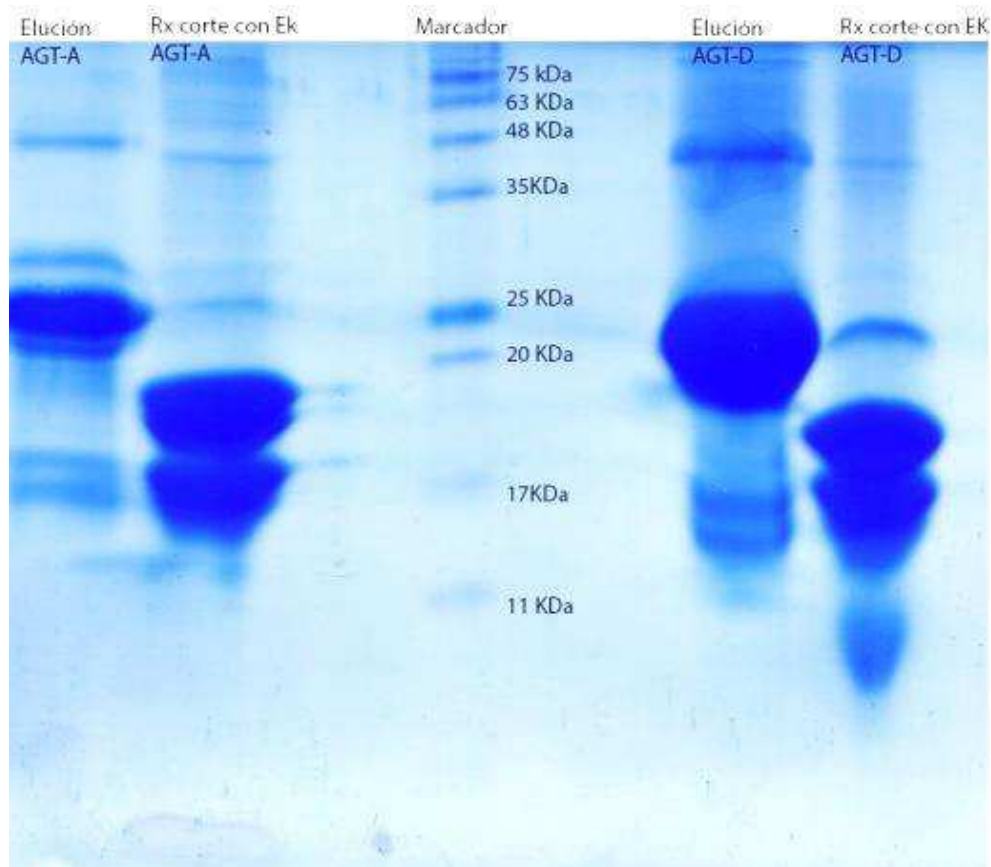


Figura 14. Gel de SDS-PAGE donde se muestran las eluciones de la primera columna de níquel de los dominios A y D, así como su respectivo corte enzimático con enterocinas

El rendimiento de proteína de fusión para cada dominio recombinante se estimó en aproximadamente 15 mg por cada litro de cultivo. La concentración de las fracciones se determinó midiendo la absorbancia a 280 nm.

Una vez que se obtuvieron las fracciones de las cuatro construcciones como proteínas de fusión, se dializaron en membrana de diálisis 12,000- 14,000 MW (Spectrapor) contra buffer de diálisis (50 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, pH 8.0) para eliminar el imidazol y se realizó un corte enzimático con enterocinas durante 16 horas, en una proporción de 0.001 U de enterocinas por cada 20 µg de proteína de fusión.

Al finalizar la incubación, se volvió a purificar por columna de níquel, ya que en una segunda purificación, se retiene la Trx y los dominios se obtienen en la fracción no retenida. La masa molecular se determinó por espectrometría de masas MALDI-TOF (Anexo 10.1). En la Tabla 3 se comparan los pesos teóricos contra los obtenidos. Dichos resultados no consideran la formación de los puentes disulfuro. El rendimiento de los dominios puros se estimó en aproximadamente 0.5 mg – 1 mg por litro de cultivo.

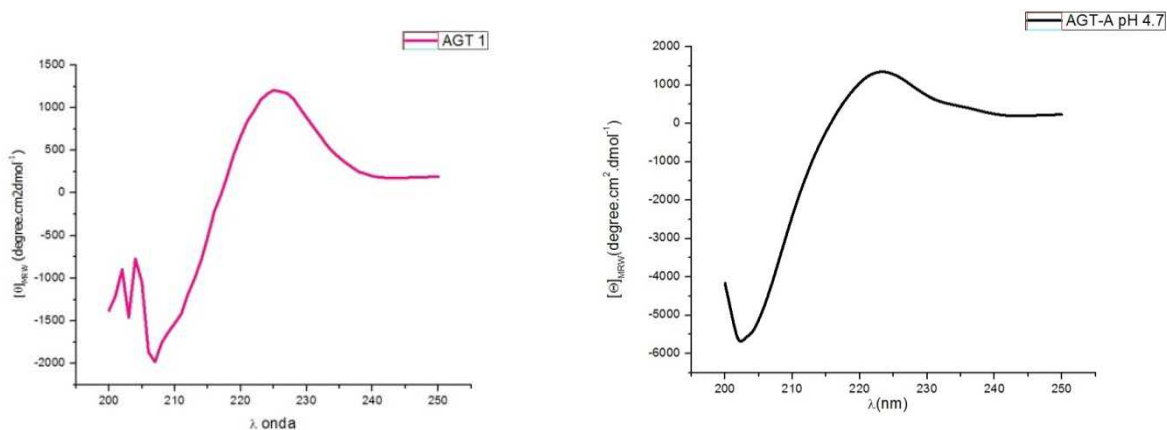
Dominio	Peso teórico (Da)	Peso obtenido (Da)
A	4762	4759
B	4550	4550
C	4438	4431
D	4396	4391

Tabla 3. Comparación de los pesos teóricos de los dominios recombinantes y los obtenidos por MALDI-TOF.

Una vez que se obtuvieron los dominios en la fracción no retenida de la segunda columna, se dializaron en membrana de diálisis con un tamaño de poro de 3,500 MW (Spectrapor) contra buffer de acetatos (30 mM acetato de sodio, pH 4.7) para realizar un cambio de pH.

7.3 Dicroísmo circular

Para verificar el contenido de estructura secundaria, se obtuvieron los espectros de dicroísmo circular de los dominios purificados de la AGT en la región del UV-lejano (200-250 nm). En la Figura 15 se muestran los espectros de los dominios y de la AGT1 a pH 4.7, a una temperatura de 20°C. En dichas condiciones de acidez, todos los espectros muestran un pico máximo a una longitud de onda alrededor de 225 nm y un mínimo negativo a una longitud de onda de 205 nm. Este patrón es típico de proteínas plegadas constituidas por dominios tipo heveína (Rodríguez-Romero *et al.*, 1989)



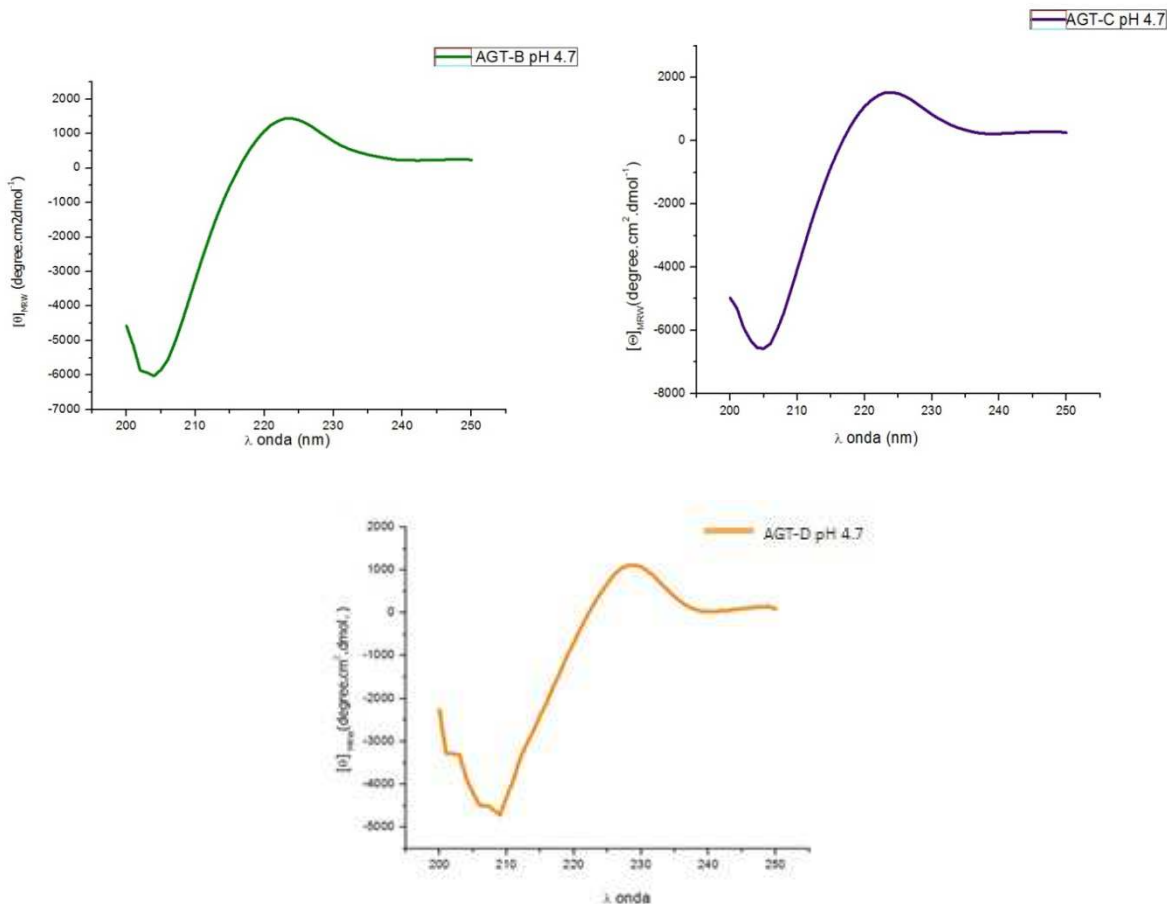


Figura 15. Espectros de DC en el UV-lejano de los dominios recombinantes y de la AGT1 a pH 4.7. Las concentraciones para los dominios A, B, C y D y para la AGT1, fueron 0.10 mM, 0.28 mM, 0.11 mM, 0.11mM y 0.02 mM, respectivamente.

7.4 Fluorescencia

Las muestras de la AGT1 y los dominios se excitaron a una longitud de onda de 280 nm, la cual corresponde a los Trp y Tyr. Se emplearon las mismas condiciones experimentales que en DC, a pH 4.7 y a 25 °C. Las mediciones se realizaron por duplicado. El pico máximo positivo para la AGT1 y los dominios aislados se observó alrededor de 350 nm, la cual corresponde con la longitud de onda de emisión de los Trp y Tyr expuestos al medio acuoso. Este resultado está en concordancia con la estructura tridimensional de la AGT, en la que se observan todos sus triptófanos y tirosinas mayoritariamente expuestos al solvente (Fig. 16)

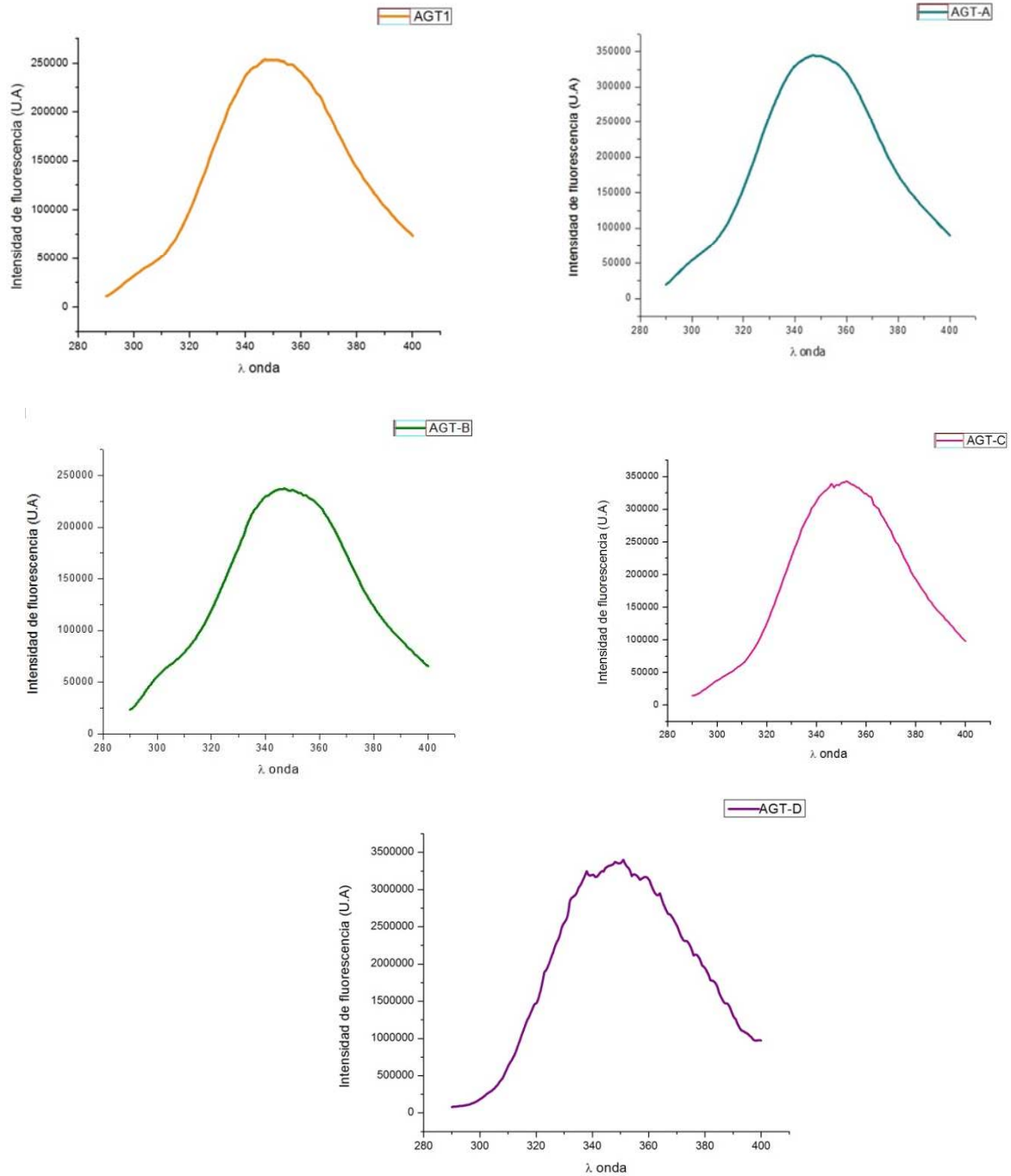


Figura 16. Espectros de fluorescencia de la AGT1 y de los dominios a 25 ° C, pH 4.7. Las concentraciones utilizadas fueron de 0.02 mM, 0.10 mM, 0.28 mM, 0.11 mM, 0.11mM y respectivamente.

7.5 ITC

Para cuantificar la energía del proceso de unión con *N-N'-N''*-triacetilquitotriosa se realizaron experimentos de ITC, a pH 4.7, a una temperatura de 25 °C y en agitación constante de 800 rpm. La concentración de proteína se manejó en un intervalo de 0.1 a 0.7 mM. Las isothermas obtenidas para cada dominio se muestran en las Figuras 17-20, al igual que representaciones esquemáticas de los residuos de cada sitio de unión, generadas a partir de la estructura cristalográfica del dímero mediante el software PyMOL. Los picos obtenidos exhiben que dichos procesos son exotérmicos.

El ajuste de los datos con un modelo de un sitio único permitió calcular los parámetros termodinámicos entalpía (ΔH) y la constante de asociación (K_a). El cambio en la energía libre de Gibbs (ΔG) y el cambio en la entropía (ΔS) se obtuvieron con las ecuaciones 3 y 4 respectivamente.

$$\Delta G = -RT \ln K_a \quad (3)$$

Dónde R es la constante de los gases ideales (1.9871 cal/Kmol), T es la temperatura en K, y K_a es la constante de unión.

$$\Delta S = \frac{\Delta G - \Delta H}{-T} \quad (4)$$

Donde ΔG es el cambio de energía libre de Gibbs, ΔH el cambio de entalpía y ΔS el cambio de entropía.

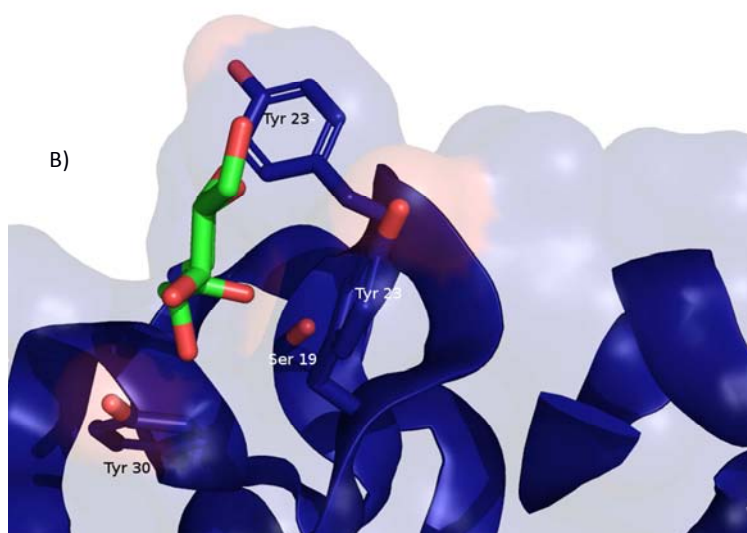
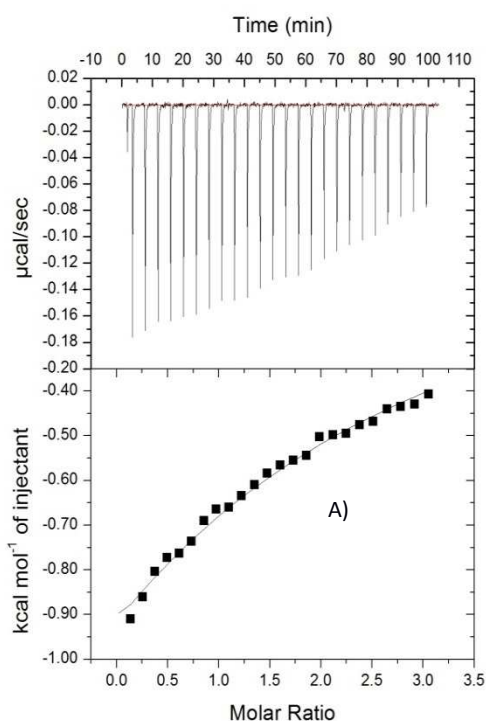


Figura 17. En el panel A) se muestra la isoterma obtenida para el dominio A a una concentración de 0.118 mM y 1.82 mM de ligando. En el B) se observa la estructura cristalográfica del sitio de unión

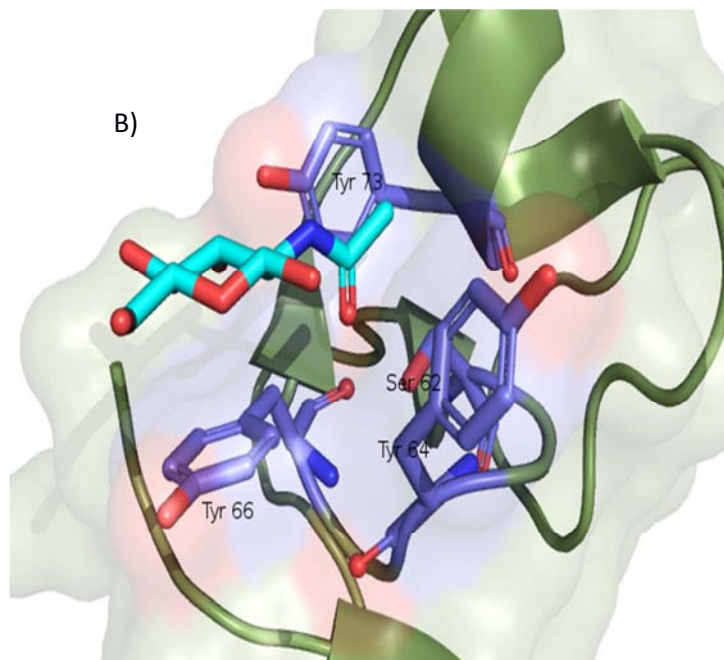
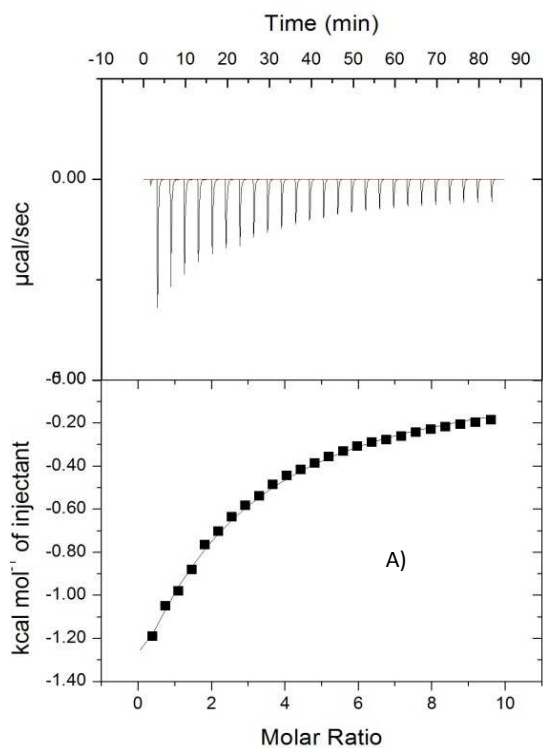


Figura 19 . En el panel A) se muestra la isoterma obtenida para el dominio B a una concentración de 0.68 mM y 30 mM de ligando. En el B) se observa la estructura cristalográfica del sitio de unión

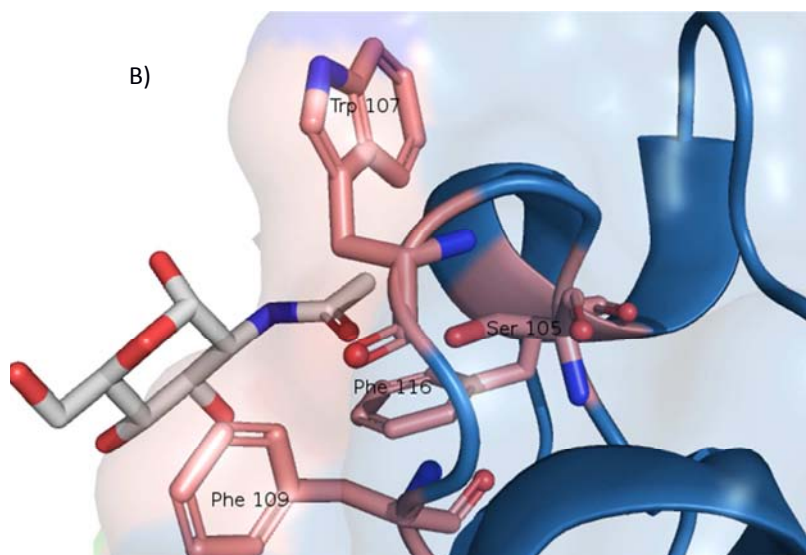
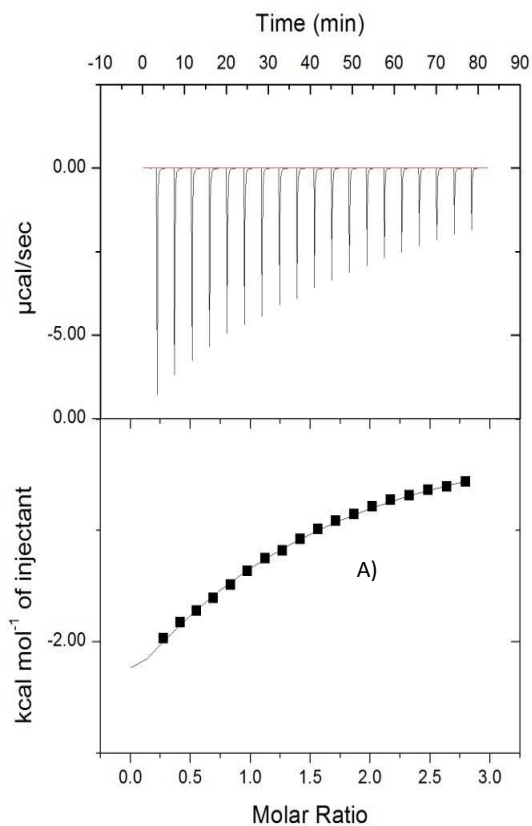


Figura 18. . En el panel A) se muestra la isoterma obtenida para el dominio C a una concentración de 1.5 mM y 30 mM de ligando. En el B) se observa la estructura cristalográfica del sitio de unión.

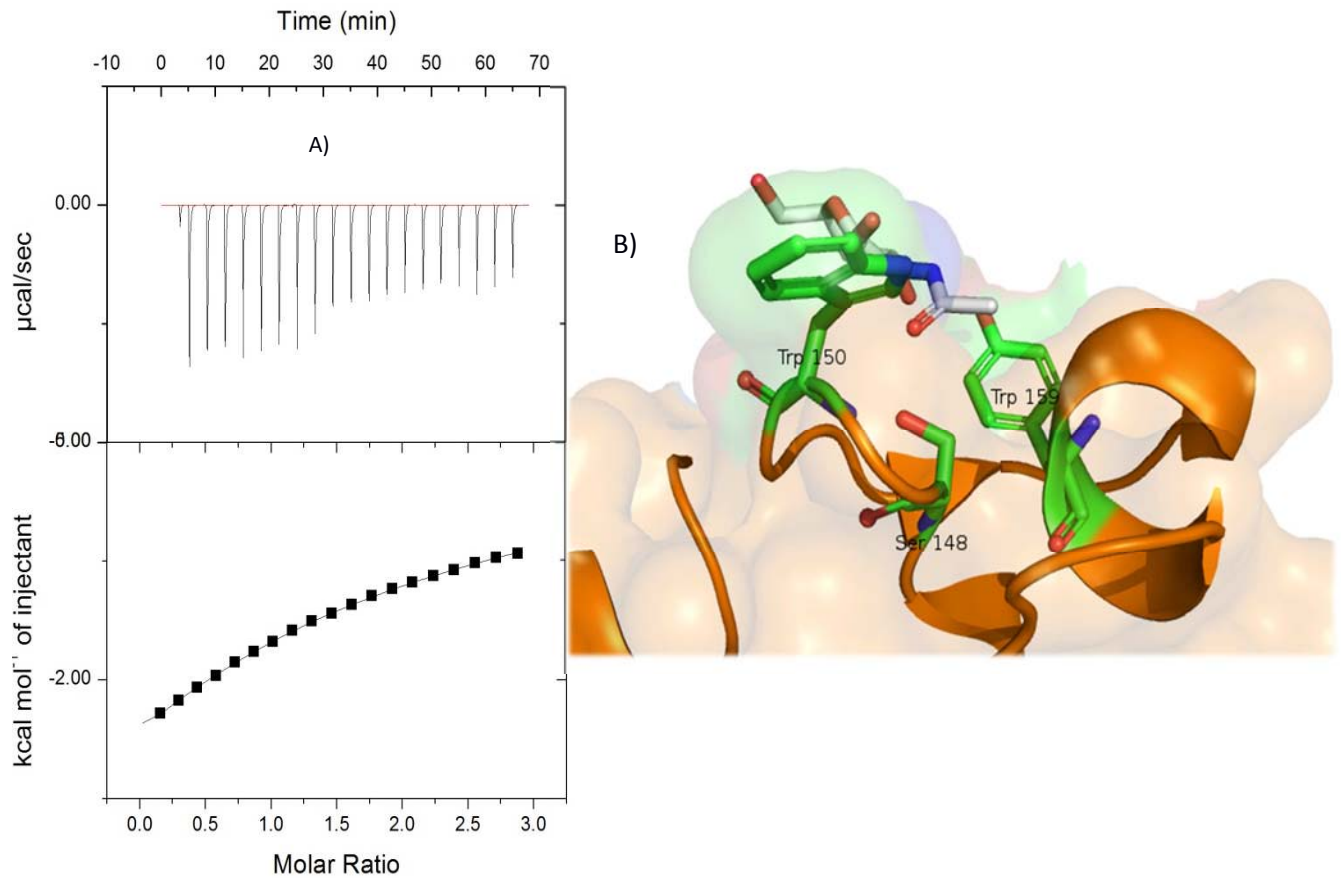


Figura 20. En el panel A) se muestra la isoterma obtenida para el dominio D a una concentración de 0.77 mM y 10.5 mM de ligando. En el B) se observa la estructura cristalográfica del sitio de unión.

Los valores obtenidos para K_a , ΔH , $-T\Delta S$ y ΔG de todos los dominios se muestran en la Tabla 4. Además, las firmas termodinámicas de cada uno de los dominios se muestran de manera gráfica en la figura 21.

Dominio	K_a (M^{-1})	ΔH (Kcal/mol)	$-T\Delta S$ obtenido (Kcal/mol)	ΔG (Kcal/mol)
A	1050	-8.11	3.99	-4.12
B	323	-7.50	4.07	-3.42
C	340	-6.63	3.17	3.45
D	236	-16.15	12.91	-3.24

Tabla 4. Parámetros termodinámicos de unión a quitotriosa obtenidos para los cuatro dominios de la AGT mediante calorimetría de titulación isotérmica.

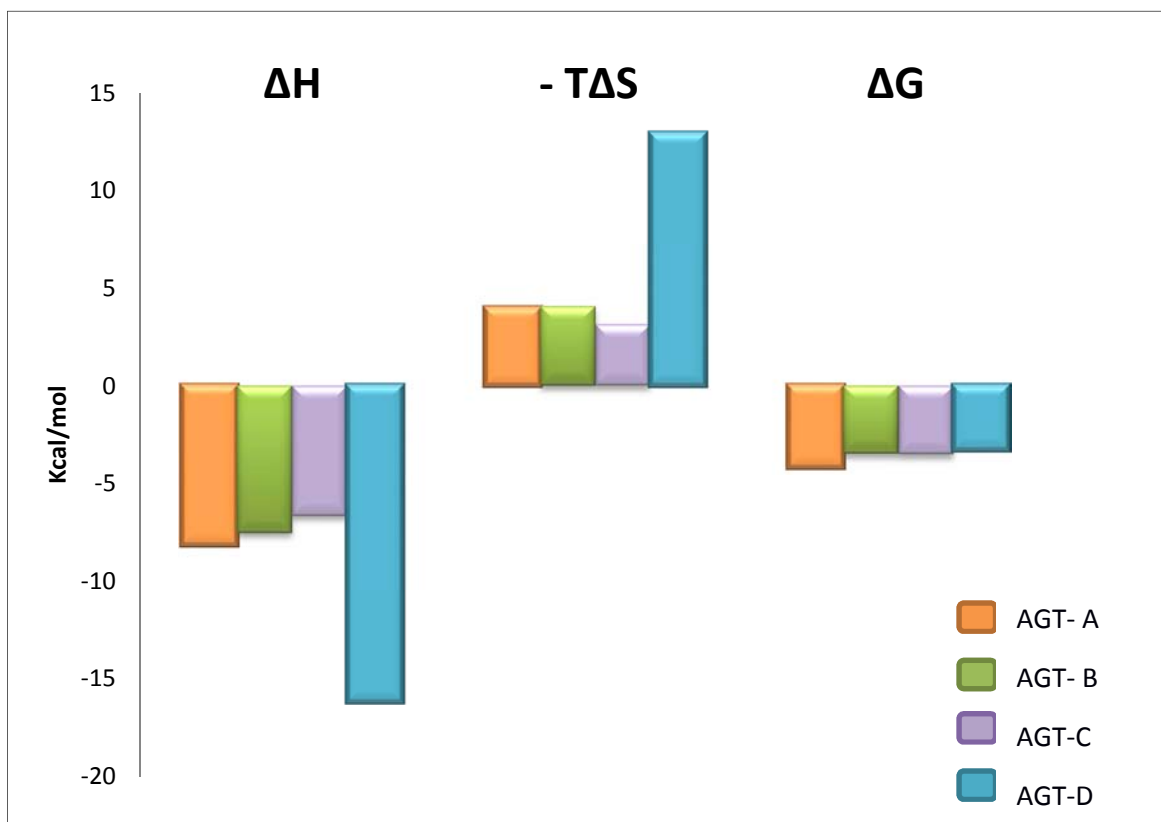


Figura 21. Firmas termodinámicas de los dominios de la AGT.

Aunque las isotermas obtenidas no presentan una forma sigmoide, sino una parecida a una hipérbola, los datos demuestran que los dominios pueden unir $N-N'-N''$ -triacetilquitotriosa. Para obtener datos más robustos y de acuerdo con el parámetro c , es necesario aumentar la concentración de la proteína. Los valores obtenidos de K_a para todos los dominios se encuentran dentro del mismo orden, al igual que los calculados para ΔG . Éstos últimos nos indican que la unión de los dominios de la AGT con su ligando procede de manera espontánea. Además, se trata de una reacción exotérmica, de acuerdo al signo negativo de ΔH mostrado por cada dominio.

Los únicos valores reportados para los dominios de la AGT corresponden a los del dominio B (Espinosa *et al.*, 2000). Los valores de K_a son distintos a los que obtuvimos; sin embargo los valores para la entalpía y entropía son semejantes. Además, el mismo grupo de investigación de Espinosa, caracterizó mediante ITC a la heveína. Los resultados que obtuvieron son similares a los de los dominios de la AGT, excepto en la K_a (Tabla 5).

En cuanto a los resultados obtenidos, se observó que el dominio A es el más afín al ligando, con una K_a de 1050 M^{-1} , el dominio D exhibió la menor afinidad (236 M^{-1}). Se

determinaron, además, las firmas termodinámicas de cada uno de los dominios para definir las contribuciones entálpicas y entrópicas sobre el ΔG . Para todos los dominios, el ΔG se encuentra dirigido, mayormente, por el ΔH . Sin embargo, al comparar las firmas termodinámicas de los cuatro dominios, es posible observar que la del dominio D, el cual presentó la menor afinidad, se ve más favorecido por las interacciones entálpicas, pero es a la vez el que paga el mayor costo entrópico en la asociación.

Proteína	Referencia	Ka (M ⁻¹)	ΔH (Kcal/mol)	ΔS (cal/molK)
AGT-A	Este trabajo	1,050	-8.11	-13.38
AGT-B	Este trabajo	323	-7.49	-13.66
AGT-B	Espinosa <i>et al.</i> , 2000	908	-8.07	-13.62
AGT-C	Este trabajo	340	-6.62	-10.63
AGT-D	Este trabajo	236	-16.15	-43.30
AGT	Espinosa <i>et al.</i> , 2000	11,100	-19.38	-46.60
Heveína	Espinosa <i>et al.</i> , 2000	8,400	-8.12	-13.62

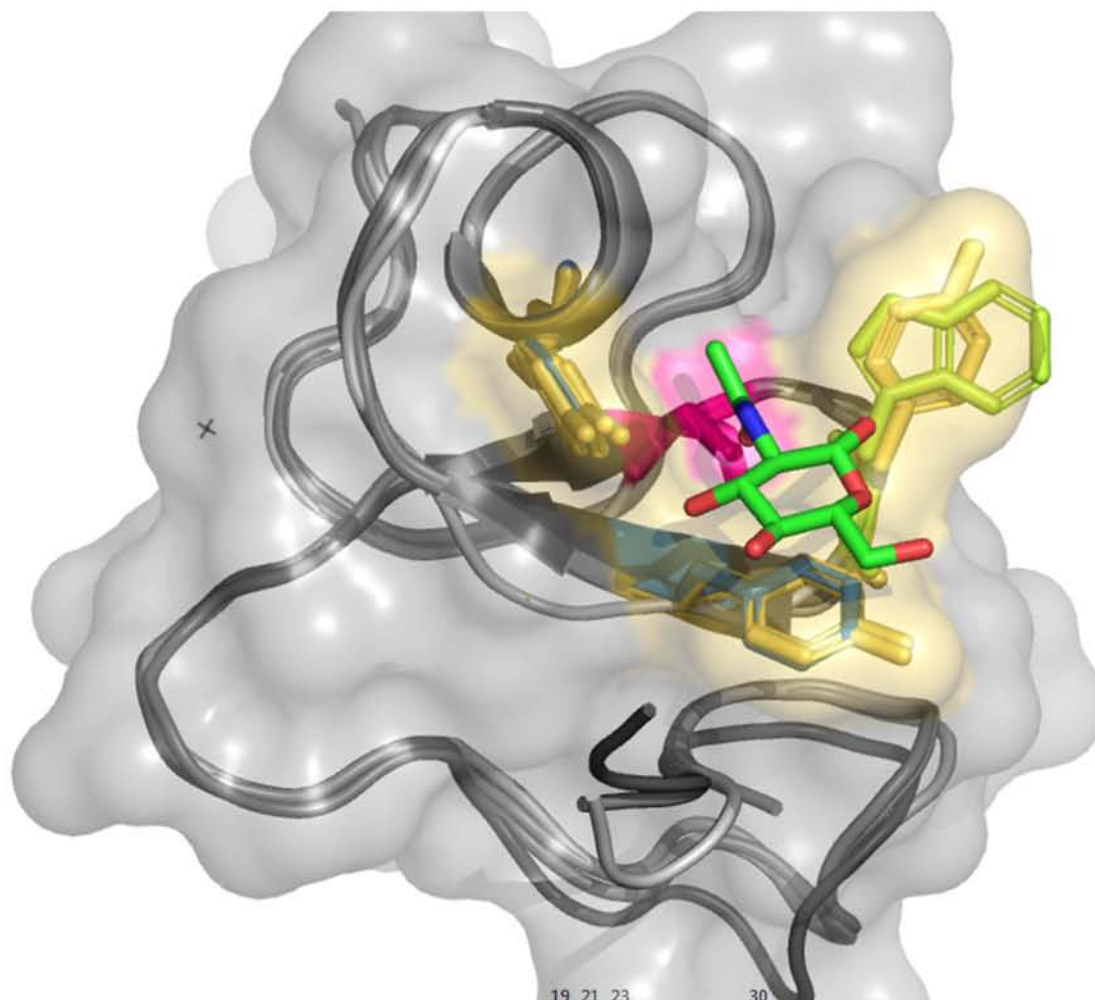
Tabla 5. Parámetros termodinámicos de los dominios de la AGT, la AGT y la heveína

En general, los valores de ΔG para todos los dominios se encuentran dentro del mismo orden y son muy similares. Sin embargo sólo se podrían considerar a los sitios de unión de los dominios A, B y C como equivalentes termodinámicamente, pues son los que muestran la mayor similitud en sus firmas termodinámicas. En cuanto a equivalencias estructurales en el sitio de unión, las serinas y los aminoácidos aromáticos se encuentran en posiciones equivalentes en todos los sitios de unión, con excepción del dominio D que carece de un aminoácido aromático en la posición 23. No obstante, se podrían considerar como sitios de unión equivalentes estructuralmente, como se muestra en la figura 26.

El dominio A presenta los residuos aromáticos Tyr^{21, 23,30}, además de una Ser¹⁹. El dominio B presenta 3 Tyr en las posiciones 64, 66 y 73, y una Ser en la posición 62. El dominio C exhibe un Trp¹⁰⁷, Phe^{109,116} y la Ser¹⁰⁵. El dominio D es el que presenta una mayor carencia de aminoácidos que puedan interactuar con el azúcar, sólo tiene un Trp¹⁵⁰ y una Tyr¹⁵⁹, además de la Ser que se encuentra conservada en todos los sitios de unión.

Al comparar los datos con la composición estructural de los sitios de unión de cada uno de los dominios, encontramos que los grupos N-acetil del ligando juegan un rol importante en la unión, pues se unen mediante puentes de hidrógeno con los hidroxilos de las Tyr y de las Ser. Además de estas interacciones polares, están involucradas interacciones de apilamiento entre la región cíclica de los aminoácidos aromáticos y el azúcar en cuestión. Las contribuciones entálpicas corresponden tanto a la interacción directa entre la proteína y el ligando, como al costo por deshidratar las superficies de

contacto. En cuanto a las contribuciones entrópicas, pueden derivar de los cambios en los grados de libertad conformacional del ligando y de la proteína, y de la liberación de moléculas de agua durante la interacción.



AGT A QRCGEQGSNMECPNNLCCSQYGYCGMGGDYCGKGCQNGACWT
 AGT B SKRCGSQAGGATCTNNQCCSQYGYCGFGAEYCGAGCQGGPCRA
 AGT C DIKCGSQAGGKLCPPNNLCCSQWGFGLGSEFCGGGCQSGACST
 AGT D DKPCGKDAGGRVCTNNYCCSKWGSCGIGPGYCGAGCQSGGCDG

Figura 22. Alineamiento de los dominios de la AGT resaltando los sitios de unión. En rosa se muestran las Ser, en amarillo Tyr, en azul Phe y en verde Trp. En la parte inferior, se muestra el alineamiento de las secuencias de cada uno de los dominios.

El hecho de que el dominio D presente la entalpía más favorable de interacción se puede explicar en función de las diferencias estructurales de los sitios de unión, pues como se mencionó, es el dominio con mayor carencia de residuos que interactúan con el ligando. Además, a pH de 4.7, el dominio D puede encontrarse parcialmente desplegado. Para que se lleve al cabo la unión, el dominio tendría que plegarse, en este caso asistido por la energía de unión favorable. Esto explicaría el por qué presenta la menor afinidad hacia su ligando. Por otro lado, el plegamiento del dominio generaría una entalpía adicional; a su vez, el plegamiento y consecuente rigidización de la estructura generaría una entropía desfavorable, todo ello en relación a un dominio plegado que se une al carbohidrato de forma similar a un cuerpo rígido.

8. Conclusiones

Se logró purificar y aislar la isoforma 1 de la AGT mediante cromatografía de intercambio catiónico, la cual fue empleada como un control positivo para las pruebas espectrofotométricas.

El vector pET-32 (a+), así como la cepa de *E. coli* Rosetta-gami (DE3) pLysS resultaron adecuados para la sobreexpresión de los cuatro dominios recombinantes de la AGT. Los dominios, como proteínas de fusión, se encontraron en la fracción soluble del lisado.

Conseguimos purificar mediante cromatografía de afinidad todos los dominios recombinantes de la AGT. Se obtuvo un rendimiento de aproximadamente 15 mg de proteína de fusión por litro de cultivo. La separación de la proteína de fusión se realizó por medio de un corte enzimático con enterocinasa y una segunda columna de afinidad. La purificación se verificó mediante espectrometría de masas, donde se demostró que la masa molecular obtenida de los dominios recombinantes coincidía con los valores teóricos esperados. El rendimiento aproximado de cada dominio puro se estimó en 1 mg por litro de cultivo.

Por medio de dicroísmo circular se observó que a pH de 4.7 y a 25 °C se encuentran plegados todos los dominios, apreciándose el espectro característico tipo heveína de la AGT nativa, con un pico máximo positivo alrededor de 225 nm y un mínimo negativo alrededor de 205 nm. Se observó un pico máximo de fluorescencia alrededor de los 350 nm para todos los dominios.

Los datos obtenidos de ITC demuestran que los dominios por sí solos son capaces de unir *N-N'-N''*-triacetilquitotriosa, derivado trisacárido de la NAG. Los valores de K_a obtenidos para todos los dominios se encuentran dentro del mismo orden, al igual que los valores de ΔG . El proceso de unión es exotérmico y espontáneo.

Estos resultados, además de demostrar la independencia funcional de cada uno de los dominios, nos permiten establecer nuevas perspectivas en el estudio de la unión de la AGT a carbohidratos. Con el fin de desglosar todos los elementos sinérgicos presentes en el proceso de unión, se procederá a estudiar la unión de los bidominios y tridominios de la AGT a la *N-N'-N''*-triacetilquitotriosa con miras de construir un modelo más robusto que contribuya a mejorar el uso aplicado de esta proteína en los sistemas de entrega de fármacos. Observar

9. Bibliografía

1. Aboitiz, N., *et al.* (2004). NMR and modeling studies of protein-carbohydrate interactions: synthesis, three-dimensional structure, and recognition properties of a minimum hevein domain with binding affinity for chitooligosaccharides. *Chembiochem*. 5: 1245-1255
2. Aub, J. C, *et al.* (1965). Studies on reactivity of tumor and normal cells to a wheat germ agglutinin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 54:396-399.
3. Aub, J.C, *et al.* (1963). Reactions of normal and tumor cell surfaces to enzymes, I. Wheat –Germ Lipase and associated mucopolysaccharides. *Proc, Natl. Acad. Sci. USA* 50 (4): 613-619.
4. Balasubramaniam N.K., *et al.* (1991). Structural and functional changes associated with cyanogen bromide treatment of wheat germ agglutinin. *Arch Biochem Biophys*. 288(2):374-9.
5. Bies, C., *et al.* (2004). Lectin-mediated drug targeting: history and applications. *Adv. Drug Del.* 56: 425-435
6. Bronowska, A.K. (2011). Thermodynamics of Ligand-Protein Interactions: Implications for Molecular Desing. En Moreno-Pirajan (editor), *Thermodynamics. Interaction Studies .Solid, Liquids and Gases*. Pp 1-17
7. Burger, M.M & Goldberg, A.R (1967).Identification of a tumor-specific determinant on neoplastic cell surfaces. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 57 (2): 359-366.
8. Buts, L., *et al.* (2006). Structural basis of carbohydrate recognition by a Man(α 1-2)Man-specific lectin from *Bowringia milbraedii*. *Glycobiology* 16: 635-340
9. Chavelas, E.A, *et al.* (2004). Spectroscopic characterization of the thermal unfolding of wheat germ agglutinin. *J. Mex. Chem. Soc.* 48:257–260.
10. Chen, J., *et al.* (1998).Structure of the hemagglutinin precursor cleavage site, a determinant of influenza pathogenicity and the origin of the labiale conformation. *Cell*, 95: 409-417
11. Dyson, H.J (2010). Spectroscopic Techniques. En *Encyclopedia of Life Sciences* .Jhon Wiley & Sons Ltd, Chichester.
12. Gabor, F; *et al.* (2004).The lectin-cell interaction and its implications to intestinal lectin-mediated drug delivery.*Adv. Drug Deliv. Rev.* 56:459–480
13. Gao, X, *et al.* (2007). Brain Delivery of Vasoactive Intestinal Peptide Enhanced with the Nanoparticles Conjugated with Wheat Germ Agglutinin Following Intranasal Administration. *J. Contro. Rel.* 121:156-157.
14. Gastman, B., *et al.*, (2005).A novel apoptotic pathways as defined by lectin cellular initiation. *B. B. Res. Comm.* 316:263-271.
15. Grahn, E., *et al.* (2007). Crystal structure of the *Marasmus oreades* mushroom lectin in complex with a xenotransplantation epitope. *J. Mol. Biol.*, 369: 710-721

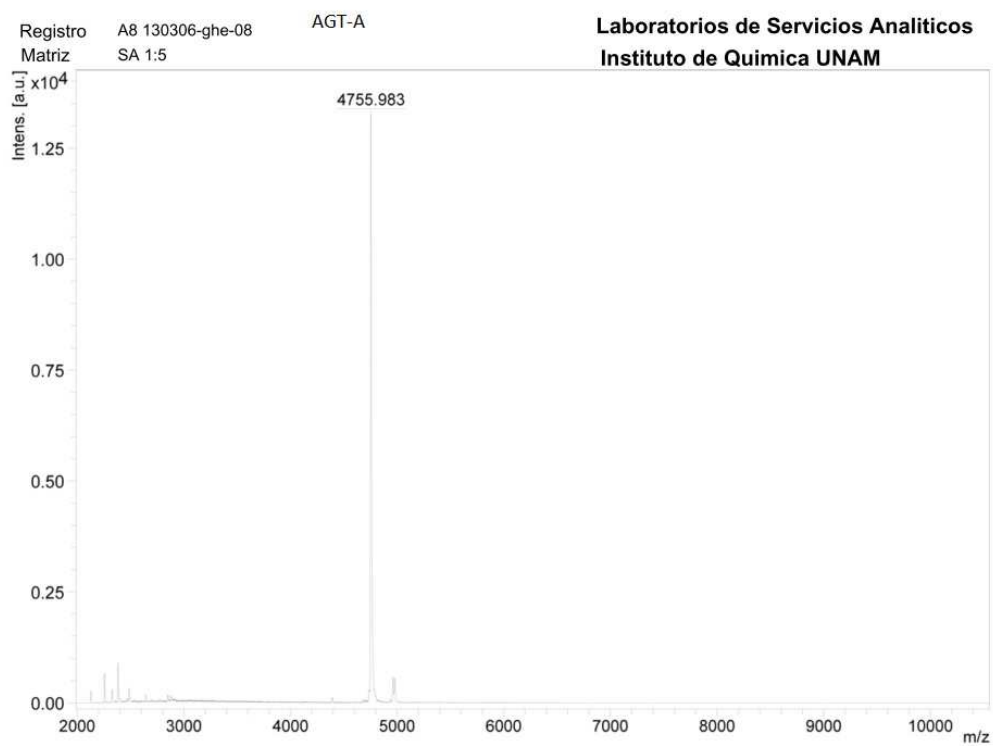
16. Inoue, K., et al. (2003). Structural analysis by X-ray crystallography and calorimetry of a hemagglutinin component (HA1) of the progenitor toxin from *Clostridium botulinum*. *Microbiology*, 149: 3361-3370
17. Jeyaprakash, A.A, *et al.* (2003). Structural basis of the carbohydrate specificities of jacalin: an X-ray and modeling study. *J. Mol. Biol.* 332: 217-228.
18. Jiménez-Barbero, J., et al. (2006). Hevein domains: an attractive model to study carbohydrate-protein interactions at atomic resolution. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* 60:303-354.
19. Leavitt, S. & Freire, E. (2001). Direct measurement of protein binding energetics by isothermal titration calorimetry. *Curr Opin Struct Biol.* 11(5): 560-566
20. Lewis, J.K., Wei, J. & Siuzdak, G. (2000). Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry in Peptide and Protein Analysis. *En Encyclopedis of Analytical Chemistry*. Pp 5580-5894
21. Lis, H & Sharon, N. (1998). Lectins: Carbohydrate-specific proteins that mediate cellular recognition. *Chem. Rev.* 98: 637-674.
22. Loris, R. (2002) Principles of structures of animal and plant lectins. *Biochim. Biophys. Acta.* 1572(2-3): 198-208.
23. Nagata Y. & Burger M. (1974). Wheat germ agglutinin. Molecular characteristics and specificity for sugar binding. *J. Bio. Mol.* 249, 10:3116-3122.
24. Perozzo, R., et al. (2004). Thermodynamics of protein-ligand interactions: history, presence, and future aspects. *J. Recept. Signal Transduct Res.* 24 (1-2):1-52
25. Peumans, W.J & Van Damme, E. J (1995). Lectins as plant defense proteins. *Plant Physiol.* 109 (2): 347-352.
26. Portillo Téllez M del C, et al. (2011). Folding and Homodimerization of Wheat Germ Agglutinin. *Biophys. J.* 101:1-9.
27. Rodríguez-Romero, A., et al. (1989). Unusual far-Ultraviolet circular dichroism of wheat germ agglutinin and hevein originated from cystine residues. *BBA.* 998: 21-24.
28. Sauerborn, M. K., *et al.* (1999). Insights into carbohydrate recognition by *Narcissus pseudonarcissus* lectin: the crystal structure at 2 Å resolution in complex with alpha1-3 manno-oligosaccharide. *J. Mol. Biol.* 290: 185-199.
29. Schaeffer, H. E. Breitfeller, D. L. y Krohn, D. L. (1982). Lectin-mediated attachment of liposomes to cornea: influence of transcorneal drug flux. *Inves. Ophthalmol. Vis. Sci.* 23:530-533.
30. Schwefel, D., et al. (2010). Structural Basis of Multivalent Binding to Wheat Germ Agglutinin. *J. Am. Chem. Soc.* 132: 8704–8719
31. Sharon M. & Nicholas C. Price. (2005). How to study proteins by circular dichroism. *BBA.* 1751:119-139.
32. Sharon, N. & Lis, H (2004). History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. *Glycobiology* 14 (11): 53R-62R.
33. Sharon, N. (2008). Lectins: past, present and future. *Biochem. Soc. Trans.* 36: 1457-1460.

34. Sinha, S. et al. (2007). Subunit assembly of plant lectin. *Curr Opin Struct Biol.* 17:498-505.
35. So, P.T.C. & Dong, C.Y (2001). Fluorescence Spectrophotometry. En *Encyclopedia of Life Sciences*
36. Sun, Y.J., et al. (2001). The crystal structure of a novel mammalian lectin Ym1 suggests a saccharide binding site. *J. Biol.Chem,* 276: (17) 507-514
37. Surti, N.et al. (2008). Intracellular Delivery of Nanoparticles of an Antiasthmatic Drug. *Pharm. Sci.* 9 (1):217-223.
38. Transue, T. R., et al. (1997). Structure of benzyl T-antigen disaccharide bound to *Amaranrthus caudatus* agglutinin. *Nat .Struct. Biol.* 4: 779-783
39. Transue, T.R., et al. (1997). Structure of benzyl T-antigen disaccharide bound to *Amaranthus caudatus* agglutinin. *Nat.Struct.Biol.* 4: 779-783
40. Wood, K. M., et al. (2008). Wheat Germ Agglutinin Functionalited Complexation Hydrogels for oral Insulin Delivery. *Biomacromol.* 9:1293-1298.
41. Wright, C. S. & Kellog, G. E. 1(996). Differences in Hydropathic Properties of Ligand Binding at four independent Sites in Wheat Germ Agglutinin-oligosaccharide Crystal complexes. *Prot. Sci.* 5:1466-1476.
42. Wright, C. S. & Olafsdottir, S. (1986). Structural differences in the two major wheat germ agglutinin isolectins. *J. Biol. Chem.* 261. 16: 7191-7195
43. Wright, C.S & Raikhel, N. (1989). Sequence variability in three wheat germ agglutinin isolectins: products of multiple genes in polyploid wheat. *J. Mol. Evo.* 28(4):327-336
44. Wrigth C.S., et al. (1984). Primary structure of wheat germ agglutinin isolectine 2. Peptide order deduced from X-Ray structure. *Biochem.* 23:280-287.

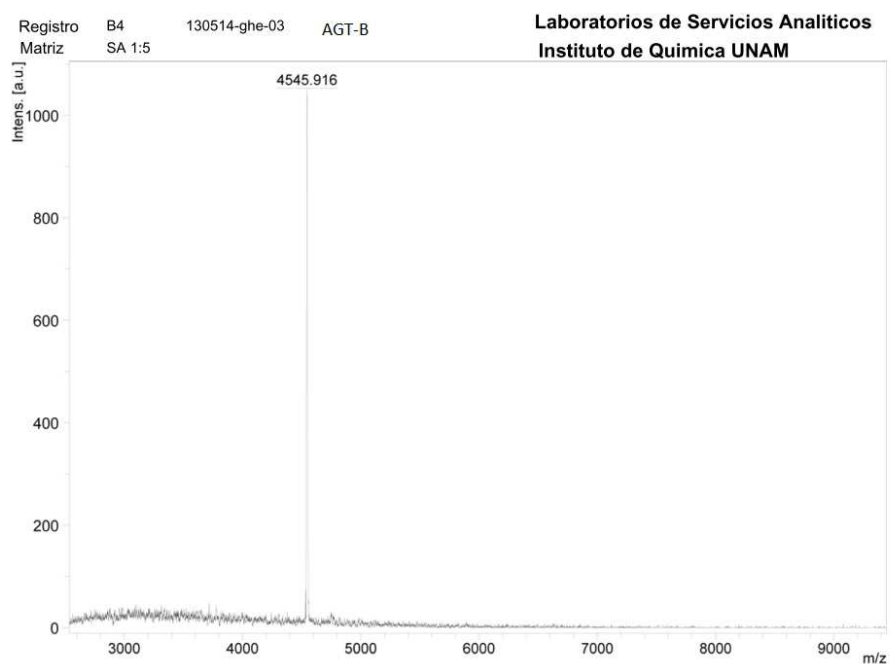
10. Anexo

10.1 Espectros de MALDI-TOF de los dominios

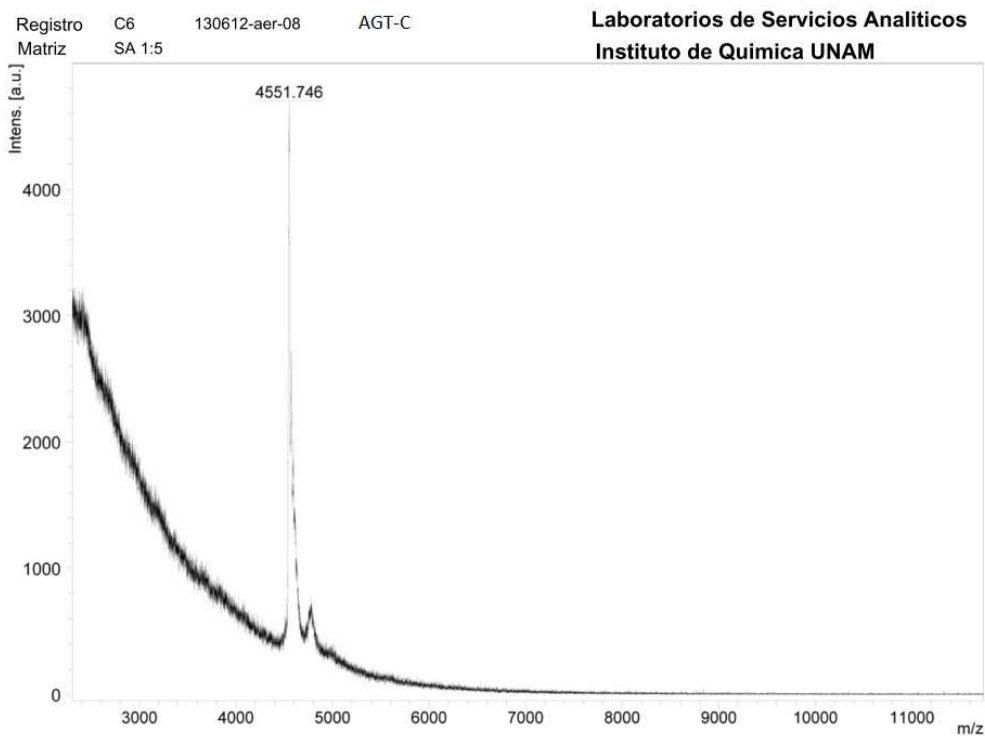
Dominio A



Dominio B



Dominio C



Dominio D

