



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**BASES ENERGÉTICAS DE LA ORGANIZACIÓN ESTRUCTURAL MULTIDOMINIO DE
LA AGLUTININA DEL GERMEN DE TRIGO: ESTUDIO DE LOS DOMINIOS.**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

I.B.Q. Jorge Luis Medrano Cerano

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Enrique García Hernández, Instituto de Química UNAM

COMITÉ TUTOR

Dr. Andrés Hernández Arana, Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas
Dr. Federico Del Río Portilla, Instituto de Química UNAM

MÉXICO, D. F. Marzo, 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



A Sofía,
mis padres y
Ekatherína

El presente trabajo fue realizado 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 IN205712, así como del proyecto CONACyT 129239. Se recibió beca para realizar los estudios de maestría por parte de CONACyT (becario 243346).

Agradecimientos

A mi Asesor Dr. Enrique García Hernández y miembros de mi comité tutorial, Dr. Andrés Hernández Arana y Dr. Federico Del Río Portilla, por su apoyo total, asesoría y consejos para la realización de esta tesis.

Al Dr. Miguel Costas Basín por permitir el uso del VP-DSC MicroCal Capillary Cell System.

A las Técnicas Académicas Dra. Patricia Cano Sánchez (Laboratorio de Biología Molecular), Quím. Eréndira García Ríos (Laboratorio de Cromatografía) por su apoyo en sus respectivos laboratorios.

ÍNDICE

<i>Agradecimientos</i>	IV
<i>Índice</i>	V
<i>Índice de tablas y figuras</i>	VII
<i>Abreviaturas y acrónimos</i>	VIII
Resumen	10
1. ANTECEDENTES	12
1.1 Lectinas.....	12
1.2 Historia de las lectinas.....	12
1.3 Usos y aplicaciones de lectinas.....	14
1.4 Aglutinina de germen de trigo.....	15
1.5 Algunas aplicaciones de la aglutinina del germen de trigo.....	17
1.6 Plegamiento y homodimerización de la aglutinina de germen de trigo.....	18
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	21
3. HIPOTESIS	22
4. OBJETIVO GENERAL	23
4.1 Objetivos particulares.....	23
5. ESTRATEGIAS EXPERIMENTALES	24
5.1 Clonación del gen de AGT.....	24
5.2 Diseño de oligonucleótidos cebadores.....	24
5.3 Clonación de los insertos amplificados en el vector de expresión pET 32 a...	24
5.4 Expresión de dominios.....	25
5.5 Purificación de dominios.....	26
5.6 Corte enzimático con enteroquinasa.....	26
5.7 Purificación de dominios por FPLC en fase reversa.....	26
5.8 Espectrometría de masas.....	27
5.9 Determinación de la concentración de dominios por espectrofotometría.....	27
5.10 Dicroísmo circular.....	27
5.11 Calorimetría diferencial de barrido.....	28
6. RESULTADOS Y DISCUSION	31
6.1 Amplificación por PCR de los genes de los dominios de AGT.....	31
6.2 Ligación de los insertos en el vector de expresión pET32a.....	31
6.3 Expresión de los dominios.....	32
6.4 Purificación de los dominios.....	33
6.5 Contenido de estructura secundaria	36
6.6 Desplegamiento térmico de los dominios.....	38
7. CONCLUSIONES	44
8. PERSPECTIVAS	45

9. REFERENCIAS	46
10. ANEXO	50
10.1 Secuencia de nucleótidos y residuos de AGT.....	50
10.2 Plásmido de clonación GS45510 pBSK AGT y pET32a.....	51
10.3 Cromatogramas de purificación de dominios recombinantes de AGT.....	52
10.4 Espectros MALDI-TOF de dominios.....	54

Índice de tablas y figuras.

Tablas

<i>Tabla 1</i>	Principales Aplicaciones de Lectinas.....	14
<i>Tabla 2</i>	Secuencia de Primers.....	24
<i>Tabla 3</i>	Comparación del peso teórico y experimental de los dominios de AGT	35
<i>Tabla 4</i>	Aminoácidos ionizables presentes en cada dominio.....	38
<i>Tabla 5</i>	Parámetros de desplegamiento para las transiciones de la AGT.....	40

Figuras

<i>Figura 1</i>	Estructura cristalográfica de la AGT.....	16
<i>Figura 2</i>	Representación gráfica de los 8 sitios de unión de la AGT.....	17
<i>Figura 3</i>	Perfiles calorimétricos de la perturbación térmica de AGT.....	19
<i>Figura 4</i>	Espectro de fluorescencia de AGT a diferentes valores de pH.....	20
<i>Figura 5.</i>	Construcciones para la expresión de dominios recombinantes de AGT.....	25
<i>Figura 6.</i>	Curva de capacidad calorífica en función de temperatura para la desnaturalización térmica de una proteína hipotética.....	29
<i>Figura 7.</i>	Amplificación de los dominios del gen de AGT por PCR.....	31
<i>Figura 8.</i>	Análisis por restricción de las clonas obtenidas y digeridas con <i>XmnI</i> .	32
<i>Figura 9.</i>	Expresión de proteínas de fusión con los dominios recombinantes en fracción soluble.....	33
<i>Figura 10.</i>	Purificación de proteína de fusión por columna de afinidad HisTrap FF.....	34
<i>Figura 11.</i>	Corte enzimático con Enteroquinasa.....	35
<i>Figura 12.</i>	Espectros de Dicroísmo circular de dominios de AGT a pH 2.....	36
<i>Figura 13</i>	Espectros de Dicroísmo circular de dominios de AGT a pH 6.....	37
<i>Figura 14.</i>	Curvas de perturbación térmica de los dominios de AGT.....	38
<i>Figura 15.</i>	Perfiles calorimétricos de la perturbación térmica de dominios recombinantes de AGT.....	39
<i>Figura 16.</i>	Perfiles calorimétricos de la perturbación térmica de AGT por DSC a pH 2.....	41
<i>Figura 17.</i>	Representación esquemática de los dominios A, B y C de AGT.....	42

Abreviaturas y acrónimos

AGT.1	Aglutinina de Germen de Trigo, Isoforma 1.
cADN	Cadena Complementaria de Ácido Desoxiribonucleico.
°C	Grados centígrados o Celsius
Da	Dalton, unidad de masa equivalente a la doceava parte de un átomo de carbono 12.
DC	Dicroísmo circular.
DSC	Differential scanning calorimetry
EK	Enteroquinasa.
f_N	Fracción de proteína con estructura nativa
GlcNAc	N-acetil-glucosamina.
IPTG	Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranósido.
LB	Luria Broth.
MALDI-TOF	Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight
M	Molar
mM	Milimolar
mL	Mililitros
mg/mL	Miligramos por mililitro.
nm	Nanómetros.
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDB	Protein Data Bank
pH	Potencial de hidrógeno
PMSF	Phenylmethylsulfonyl fluoride, inhibidor de proteasas de serina
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
Trp	Triptófano

Trx	Tiorredoxina.
T_m	Temperatura a la cual ocurre la mitad de la transición.
UV	Ultravioleta.
μL	Microlitros
$\mu\text{g/mL}$	Microgramos por mililitro.
ΔH_m	Diferencia de entalpía a la T_m .
ΔH_{cal}	Entalpía calorimétrica (área bajo la curva)
ΔH_{VH}	Entalpía de van't Hoff

Resumen

El estudio de proteínas que son capaces de reconocer con alta especificidad glicoconjugados de membranas celulares, ha sido de gran valor en el desarrollo de tratamientos contra un amplio número de enfermedades, incluyendo infecciones, cáncer, diabetes, y desórdenes autoinmunes. La aglutinina del germen de trigo (AGT) es una lectina emblemática que reconoce preferentemente residuos de N-acetilglucosamina y ácido siálico. Fue la primera proteína reportada con capacidad para discriminar entre células normales y células malignas (Aub *et al.* 1963, 1965). Desde entonces, la AGT ha sido utilizada ampliamente en investigación bioquímica y biomédica, y recientemente ha sido considerada como un candidato para la entrega específica de fármacos vía oral, gracias a su notable habilidad de selectivamente adherirse, invadir y realizar transcitosis de enterocitos.

A pesar de los numerosos estudios realizados sobre la AGT, la estabilidad estructural y el mecanismo de ensamblaje de esta lectina siguen siendo poco comprendidos. En los últimos años, nuestro grupo de trabajo se ha enfocado al estudio de la disociación y desplegamiento de esta lectina en función del pH y temperatura, mediante técnicas calorimétricas de alta precisión. La AGT posee un mecanismo de plegamiento y auto-asociación complejo, que depende fuertemente de las condiciones de solución (Portillo-Téllez *et al.*, 2011). A valores de pH cercanos a la neutralidad, la lectina forma homodímeros débiles no obligados, es decir, las subunidades realizan una auto-asociación tipo cuerpo rígido. El dímero se debilita progresivamente al aumentar la acidez del medio. A pH de 2, la proteína se encuentra completamente disociada. Análisis espectroscópicos y calorimétricos sugieren que bajo esas condiciones, uno de los cuatro dominios tipo heveína de la AGT se encuentra desplegado. De hecho, se propone que el desplegamiento de este dominio es la principal causa de la monomerización total de la lectina (Portillo-Téllez *et al.*, 2011).

En el presente estudio, nuestro objetivo fue elucidar con mayor detalle el mecanismo de ensamblaje de la AGT. Dada la compleja organización estructural de esta lectina, ha resultado complicado realizar una adecuada desconvolución de los perfiles de desplegamiento térmico. Por otro lado, se desconoce aún la correspondencia entre las

distintas transiciones de desplegamiento térmico observadas y cada uno de los dominios isoestructurales. Para resolver estas interrogantes, planteamos la estrategia de obtener de manera recombinante los cuatro dominios individuales de la AGT, para proceder a su caracterización tanto espectroscópica como calorimétrica. Nuestros resultados muestran que el dominio D es el que se encuentra desplegado a pH muy ácido. Por otro lado, la comparación entre los parámetros de desplegamiento de cada dominio aislado con los parámetros resueltos previamente para el desplegamiento multi-etapa de la proteína completa, nos permitió arrojar luz sobre la correspondencia dominio-transición.

1. ANTECEDENTES

1.1 Lectinas

Las lectinas son un grupo de proteínas especializadas en el reconocimiento de carbohidratos con alta especificidad y afinidad. Se encuentran presentes en todo tipo de organismos, desde virus y bacterias hasta plantas y animales (Lis y Sharon, 1998; Sinha, 2007; Sharon, 2008).

1.2 Historia

Hacia finales del S. XIX, se tenía la evidencia de la existencia de proteínas que poseen la capacidad de aglutinar eritrocitos, referidas como fitohemaglutininas, por haber sido encontradas originalmente en extractos de plantas. La primera descripción de una hemaglutinina fue dada por Peter Hermann Stillmark, quién aisló a la ricina, una hemaglutinina altamente tóxica de semillas del árbol de ricino (Franz, 1988). Los primeros resultados obtenidos por Stillmark indicaron cierta selectividad en la aglutinación de la ricina inducida en células rojas de animales diferentes. Esta observación fue corroborada y ampliada por Karl Landsteiner, el descubridor de los grupos sanguíneos A, B y O, en 1900. En 1919, James B. Sumner fue el primero en obtener una hemaglutinina pura, la concanavalina A, que aisló de una vaina de frijol. Sumner y Howell, en 1936, demostraron que la hemaglutinación por concanavalina A era inhibida por la sacarosa, lo que reveló por primera vez la especificidad de las lectinas por azúcares.

Las hemaglutininas específicas al tipo de sangre jugaron un papel crucial en las primeras investigaciones sobre la base estructural de la especificidad de los antígenos asociados con los grupos sanguíneos ABO. En la década de 1950, Walter J. T. Morgan y Winifred M. Watkins encontraron que la aglutinación de las células rojas de tipo A por la lectina de haba, era inhibida por N-acetil-D-galactosamina, mientras que la de las células de tipo O por la lectina de *L. tetragonolobus* era inhibida por L-fucosa. Llegaron así a la conclusión de que los carbohidratos α -N-acetil-D galactosamina y α -L-fucosa son los que confieren especificidad a los grupos sanguíneos A y O, respectivamente. Este trabajo de Watkins y

Morgan fue una de las primeras evidencias de la presencia de azúcares en las superficies celulares y su papel potencial como marcadores de identidad, un tema aún estudiado ampliamente en la Glicobiología moderna.

La capacidad de las aglutininas vegetales para distinguir entre los eritrocitos de los diferentes tipos de sangre condujo a Boyd y Shapleigh (1954) a proponer para ellas el nombre de la lectinas, del latín "*legere*", escoger o elegir. Este término fue generalizado por Sharon y Lis, en 1972, para abarcar todas las aglutininas específicas de azúcar de origen no inmune, independientemente de la fuente y el tipo específico de sangre que reconocieran.

Dos importantes descubrimientos realizados en la década de 1960 jugaron un papel decisivo para llevar las lectinas a un plano de alto interés científico y biomédico. El primero de éstos fue realizado por Peter C. Nowell (1960), quien encontró que la lectina de frijol rojo (PHA) es mitogénica, es decir, que posee la capacidad de estimular a los linfocitos a someterse a la mitosis. Este descubrimiento tuvo un impacto revolucionario en la inmunología, en que destrozó el punto de vista, que hasta entonces dominaba, de que los linfocitos son células incapaces de dividirse o diferenciarse. En un lapso relativamente corto de tiempo, se demostró para varias otras lectinas la capacidad de ser mitogénicas. Este tipo de lectinas pronto se convirtieron en herramientas para el estudio de transmisión de señales en células y para el análisis de los eventos bioquímicos que se producen durante la estimulación de linfocitos *in vitro*. Igual de valioso fue el descubrimiento, en la década de 1970, por Robert C. Gallo y sus colaboradores, del factor de crecimiento de las células T, ahora conocida como la interleucina-2, en medio condicionado de linfocitos humanos normales estimulados por PHA.

El segundo descubrimiento fue hecho por José C. Aub y colaboradores (Aub *et al.* 1963, 1965). Ellos encontraron que la aglutinina del germen de trigo (AGT) tiene la capacidad para aglutinar preferentemente células malignas. Esto fue seguido por los informes de Max M. Burger, Leo Sachs y Michael Inbar de que la concanavalina A exhibe una capacidad similar. Poco después se encontró que la aglutinina de soya (SBA) también posee esta propiedad. Tales investigaciones proporcionaron evidencia que cambios en los azúcares de la superficie celular están asociados con el desarrollo del cáncer, y

condujo a la suposición de que la mayor susceptibilidad a la aglutinación por cierto tipo de lectinas era una característica compartida por todas las células malignas.

1.3 Usos y aplicaciones de las lectinas

En un sentido más amplio, las lectinas poseen la capacidad de actuar como moléculas de reconocimiento dentro de las células, en las superficies celulares, y en los fluidos fisiológicos. Por lo tanto, son herramientas muy útiles para la investigación médica y biotecnológica, así como en la investigación de los carbohidratos en las superficies celulares, en particular de los cambios que éstos sufren en la malignidad. Las lectinas también han resultado ser herramientas muy efectivas para el aislamiento y caracterización de glicoproteínas, entre otras muchas aplicaciones. (Tabla 1)

Tabla 1. Principales Aplicaciones de Lectinas

-
- Identificación y Separación celular
 - Detección, aislamiento y estudios estructurales de glicoproteínas.
 - Mapeo de vías neuronales.
 - Estimulación mitogénica de linfocitos.
 - Estudios de la biosíntesis de glicoproteínas.
 - Selección de mutantes resistentes a lectinas.
 - Purga de la médula ósea para trasplantes.
 - Investigación de los carbohidratos en las células y orgánulos subcelulares, histoquímica y citoquímica.

En años recientes, numerosas lectinas han sido aisladas a partir de plantas, así como a partir de microorganismos y animales, y durante las últimas dos décadas las estructuras de cientos de ellas han sido establecidas. Se ha demostrado que las lectinas funcionan como moléculas de reconocimiento en interacciones célula-molécula y célula-célula en una amplia variedad de sistemas biológicos.

1.4 Aglutinina del germen de trigo

La AGT es una lectina abundante en el embrión de las semillas de *Triticum vulgare*. Presenta 3 isoformas (AGT1, AGT2 y AGT3), con una identidad entre ellas 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). La AGT pertenece a la familia altamente conservada de lectinas unidoras de quitina, siendo también una de las lectinas más ampliamente estudiadas y mejor caracterizadas. Debido a su especificidad por N-acetilglucosamina (GlcNAc), monómero de la quitina, la AGT juega un papel importante en la defensa innata del cereal, ya que es capaz de aglutinar e inactivar bacterias y hongos microscópicos patogénicos. Se ha observado también que la AGT resulta tóxica a organismos depredadores como hongos y artrópodos.

Esta proteína forma un homodímero de 34 kDa, aunque se ha visto que la especie monomérica es la más estable a valores de pH ácidos (Nagata y Burger, 1974; Chavelas *et al.*, 2004). Cada subunidad está compuesta de cuatro dominios homólogos tipo heveína (de 42 a 43 aminoácidos cada uno), etiquetados con las letras A, B, C y D. Cada dominio está formado por dos hebras β y una pequeña hélice α izquierda, y presenta 4 puentes disulfuro. Por tanto, cada monómero posee un total de 16 puentes disulfuro, lo que contribuye a la elevada resistencia a la desnaturalización de esta proteína, ya sea por agentes caotrópicos, pH o temperaturas extremas (Rodríguez-Romero *et al.*, 1989).

Se han resuelto las estructuras tridimensionales de las tres isoformas de AGT mediante cristalografía de rayos X, existiendo 13 estructuras depositadas en el Protein Data Bank, 8 de las cuales pertenecen a la isoforma 1 (AGT1). En el cristal, siempre se le ha encontrado como un homodímero (Figura 1), tanto en presencia como en ausencia de ligando (Wright 1974, 1977, 1980, 1984, 1987, 1990, 1993).

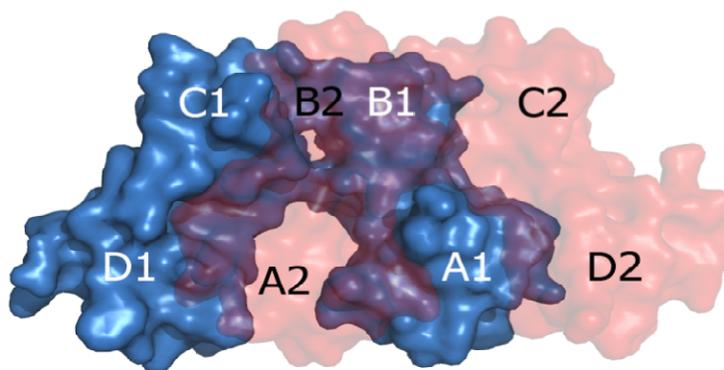


Figura 1. Estructura cristalográfica de la AGT1 (PDB ID: 2UWG) Se observa el arreglo cabeza-cola de las dos subunidades. Las letras indican el dominio, mientras que los números indican la subunidad a la que corresponden.

La AGT es única en comparación con otras lectinas en cuanto al número y arquitectura de sitios de reconocimiento de carbohidratos (Raikhel y Wilkins, 1984; Wright, 1987, 1992). Esta lectina posee ocho sitios de unión dispuestos en la interface dimérica (Figura 2). Seis de estos sitios están formados por el contacto intercatenario de dos diferentes dominios tipo heveína. En un dominio se encuentra una región principal conservada, compuesta por tres residuos aromáticos y una serina; uno de los residuos aromáticos se encarga de interactuar con el carbohidrato por apilamiento (Nagahora *et al.*, 1995). El dominio adyacente de la subunidad opuesta aporta residuos polares que permiten la formación de puentes de hidrógeno con el ligando, siendo esta una región secundaria no conservada. Los dos sitios de unión restantes se encuentran formados únicamente por residuos de los dominios principales A1 y A2. Esto se debe a que el dominio adyacente D carece de los residuos polares secundarios. Por tanto, podemos enlistar a los sitios de unión a carbohidratos como: A1, B1/C2, C1/B2, D1/A2, A2, B2/C1, C2/B1 y D2/A1. Una consecuencia presumible de la carencia de residuos polares en los dominios D, es que los sitios A1 y A2 posean una afinidad por el ligando menor a la de los otros sitios. Razón por la cual se han denominado tradicionalmente a los sitios B1/C2, C1/B2, B2/C1, C2/B1, D1/A2 y D2/A1 como sitios de unión “primarios”, y a los sitios A1, A2 como sitios de unión “secundarios”(Schwefel *et al.*, 2010). Recientemente se obtuvo un cristal que muestra la ocupación simultánea de los ocho sitios, demostrando por primera vez que todos los sitios de unión del dímero de la AGT1 son funcionales (Schwefel *et al.*, 2010).

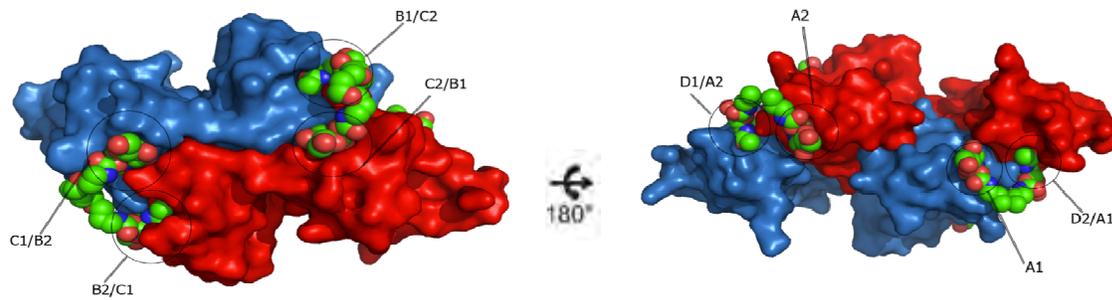


Figura 2. Representación esquemática de la AGT donde se resalta la ubicación de los 8 sitios de unión a carbohidrato. Los sitios primarios B1/C2, C2/B1, C1/B2, B2/C1, D1/A2 y D2/A1 están formados por residuos provenientes de dos dominios, mientras que los sitios secundarios A1 y A2 están formados únicamente por residuos de un solo dominio.

1.5 Algunas aplicaciones de la aglutinina del germen de trigo

La aglutinina de germen de trigo, por ser unidora de GlcNAc, es de gran utilidad para estudiar células que poseen este carbohidrato en su superficie celular. 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, 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, citoinvasión y translocación con enterocitos (Wood *et al.*, 2008; Gabor *et al.*, 2004).

La AGT es capaz de inducir apoptosis de células cancerígenas, desencadenando en la célula mecanismos de 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 lectina, donde la AGT provoca apoptosis vía mitocondrial, aunque el mecanismo molecular de este efecto sigue siendo desconocido (Gastman *et al.*, 2005).

Los estudios de la AGT han avanzado hasta un punto donde se está encontrando su efectividad contra enfermedades como el asma, diabetes, celiaquía, herpes, Parkinson, Alzheimer, etc. (Liu *et al.*, 2011; Wood *et al.*, 2006; Surti *et al.*, 2008; Isegawa *et al.*, 2008; Sollid *et al.*, 1986).

1.6 Plegamiento y homodimerización de la aglutinina de germen de trigo

Debido a la falta de conocimiento sobre el mecanismo de ensamblaje y estabilidad estructural de la AGT, nuestro grupo de investigación se dio a la tarea de caracterizar la energética del desplegamiento y la disociación de la AGT1 como función del pH y temperatura por técnicas calorimétricas de alta precisión (Portillo-Téllez *et al.*, 2011).

Como se muestra en la Figura 3A, los resultados de calorimetría diferencial de barrido (DSC) a pH 2 muestran un solo pico independiente de la concentración de proteína, indicando que la AGT se encuentra predominantemente en estado monomérico. Bajo tales condiciones, la aglutinina exhibe una total reversibilidad térmica. La forma del pico es consistente con tres transiciones independientes de dos estados (Figura 3D), 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.

A valores mayores de pH, las trazas de DSC muestran la aparición de un pico adicional a bajas temperaturas, que aumenta progresivamente de tamaño y temperatura conforme el pH es incrementado (Figura 3A). Este segundo pico depende de la concentración de proteína (Figura 3C), por lo que se concluye que corresponde a la disociación del dímero, el cual se vuelve más estable al disminuir la acidez del medio. Experimentos de calorimetría de dilución isotérmica revelaron una constante de dimerización para la AGT de aproximadamente $50,000 \text{ M}^{-1}$ a valores de $\text{pH} > 5$. Es decir, el estudio reveló por primera vez que la AGT forma dímeros débiles, en contraposición con la mayoría de lectinas oligoméricas estudiadas, que muestran constantes de auto-asociación de entre 10^{10} y 10^{40} M^{-1} . Dependiendo del pH y la temperatura, la dimerización puede proceder acoplada o no a importantes cambios conformacionales de las subunidades libres, es decir, puede proceder como una asociación tipo cuerpo rígido (las subunidades libres tienen los cuatro dominios propiamente plegados) o similar a un evento de plegamiento inducido por unión (el desplegamiento de alguno de los dominios de la AGT, inducido por pH o temperatura, se opone eficazmente a la formación del dímero, pero los contactos intermoleculares son capaces de compensar el costo energético del replegamiento del dominio). Este comportamiento híbrido no se ve en otras lectinas vegetales, las cuales forman oligómeros fuertes obligados, indicando una base molecular diferente para la función de AGT.

El comportamiento distintivo de la AGT podría implicar que la homodimerización no es tan crucial para su función, como lo es para otras lectinas de planta. De hecho, se ha demostrado que el dominio B aislado de la AGT es capaz de reconocer al ligando sacarídico (Espinosa *et al.*, 2000), por lo que es de presumir que el monómero libre, debido a su composición tetradominio, sea capaz de realizar unión multivalente, requisito básico para ejercer actividad aglutinante.

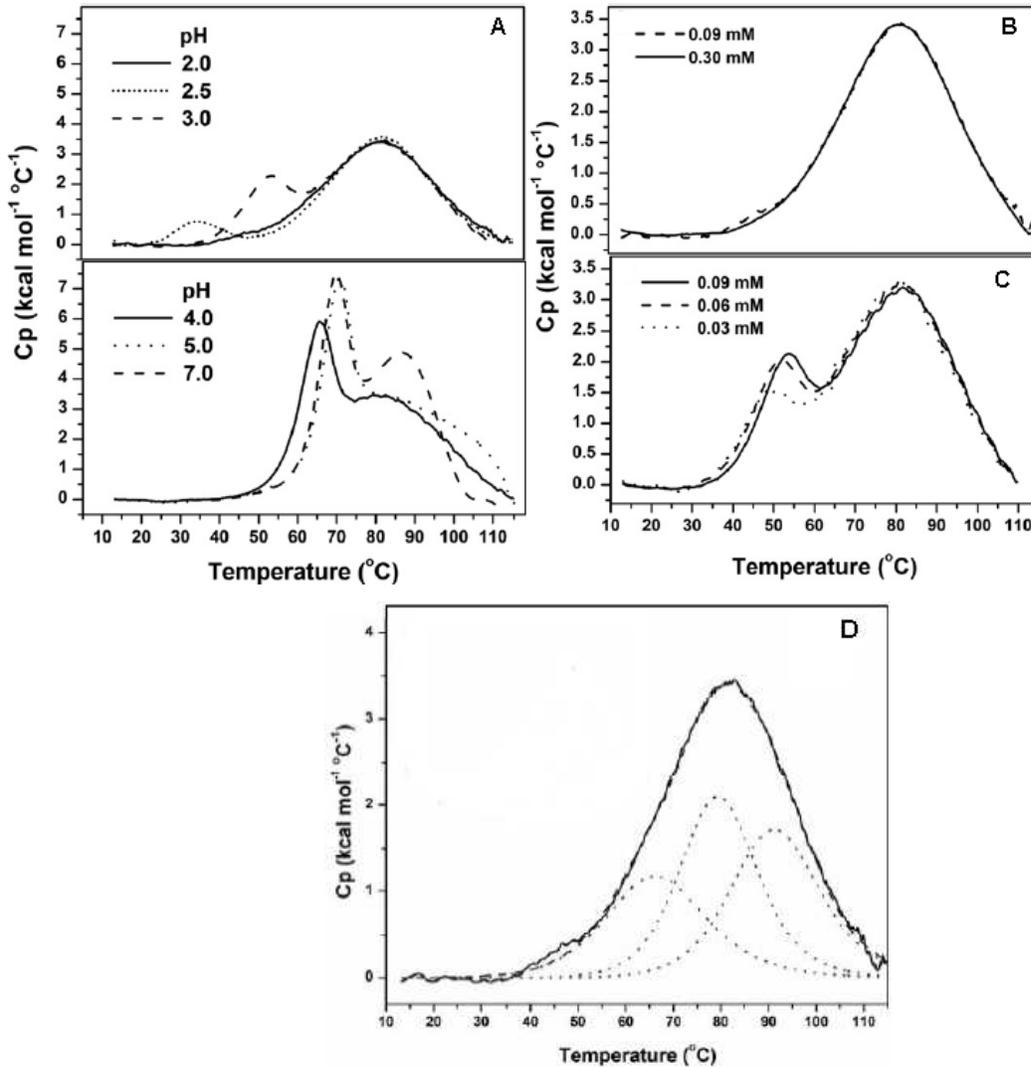


Figura 3. Perfiles calorimétricos de la perturbación térmica de AGT por DSC. A) en función del pH, B) y C) en función de la concentración de proteína a pH 2 y 3, respectivamente. D) Análisis de desconvolución de la traza calorimétrica a pH 2.

Como mencionamos, la AGT es monomérica a pH 2. El hecho de haberse observado tan solo tres transiciones en las trazas calorimétricas puede explicarse bajo diferentes escenarios. Uno de ellos es que uno de los dominios es extremadamente estable, ocurriendo su desplegamiento a temperaturas mayores de 110 °C, por lo que no fue posible su medición con el equipo de DSC. No obstante, desplegamientos térmicos realizados en concentraciones variables de cloruro de guanidinio disminuyeron drásticamente las temperaturas y entalpías de desplegamiento de las tres transiciones, sin observarse evidencia alguna de una cuarta transición. Otra posibilidad es que a pH 2 uno de los cuatro dominios está desplegado a temperatura ambiente, razón por la cual no se observa su transición. Resultados de fluorescencia en función del pH, y usando bajas concentraciones para favorecer el estado monomérico de la proteína, indicaron la pérdida de intensidad en el máximo al aumentar la acidez del medio, lo cual pudiera ser indicativo del desplegamiento de uno de los dominios (Figura 4). Se puede anticipar que el dominio B se mantiene plegado a pH 2, ya que este dominio, a diferencia de los otros tres, es el único que no cuenta con Trp, por lo que no contribuye a los cambios observados en la intensidad de fluorescencia. Además, cálculos basados en la secuencia de aminoácidos mediante el programa *Protein Calculator* (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 los otros dominios (C de +2.2, A de +3.2 y D de +4.2). Así, la estabilidad del dominio B está presumiblemente menos comprometida que la de los otros 3 dominios al disminuir el pH.

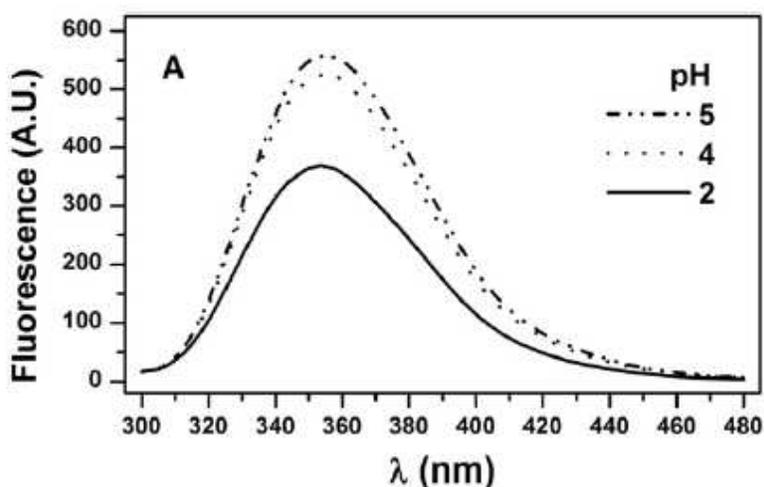


Figura 4. Espectro de Fluorescencia de AGT a diferentes valores de pH ($\lambda_{exc} = 290$ nm). Se registraron los espectros utilizando una baja concentración de proteína (3 μ M), por lo que sólo una pequeña fracción de proteína (<6%) se encuentra en forma dimérica a pH 4-5.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Desde hace tiempo, es sabido que la AGT es altamente resistente a la desnaturalización ácida. Los estudios practicados en nuestro grupo de trabajo han mostrado algunas de las bases moleculares de esta estabilidad. En soluciones cercanas a la neutralidad o moderadamente ácidas ($\text{pH} > 3$) y temperaturas no muy elevadas ($T \leq 37 \text{ }^\circ\text{C}$), la aglutinina se encuentra en conformación nativa, en un equilibrio donde coexisten las subunidades libres y auto-asociadas. Al disminuir el pH, la estabilidad del dímero se ve fuertemente comprometida, debido al desplegamiento de uno de los cuatro dominios tipo heveína. Tanto el desplegamiento parcial del monómero como la disociación del dímero son completamente revertidos con el incremento de pH. Este comportamiento confiere a la AGT una propiedad altamente deseable para transportar medicamentos vía oral, ya que es capaz de atravesar el tracto digestivo resistiendo la acidez estomacal, y llegar a una zona óptima en el duodeno para volver a su conformación dimérica (Gabor *et al.*, 2004).

El presente proyecto tiene como objetivo elucidar con mayor detalle la vía de ensamblaje y la estabilidad de la AGT. Para ello, se propuso expresar de manera recombinante los cuatro dominios de la AGT, con el fin de caracterizar la energética de desplegamiento de cada uno de ellos por separado. Con esta información, se buscó establecer la correspondencia entre los dominios estructurales y cada una de las transiciones observadas en las trazas calorimétricas de la proteína silvestre. Además, se logró un primer acercamiento para evaluar la posible existencia de efectos cooperativos interdominio en la estabilidad global de la aglutinina.

3. HIPÓTESIS

A partir del estudio del desplegamiento de los dominios aislados de la AGT, será posible determinar la correspondencia dominio-transición de la vía de plegamiento de esta lectina, así como evaluar la ocurrencia de efectos cooperativos de estabilidad interdominio.

4. OBJETIVO GENERAL

Elucidar el mecanismo del ensamblaje y estabilidad estructural de la AGT.

4.1 OBJETIVOS PARTICULARES

- 1.- Clonar los cuatro dominios de la aglutinina de germen de trigo isoforma 1.
- 2.- Sobre-expresar los dominios en *Escherichia coli*.
- 3.- Purificar a homogeneidad los productos recombinantes.
- 4.- Corroborar mediante dicroísmo circular el contenido de estructura secundaria de los cuatro dominios recombinantes.
- 5.- Caracterizar termodinámicamente el desplegamiento térmico de los dominios mediante calorimetría diferencial de barrido.

5. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

5.1 Clonación del gen de AGT

La secuencia del gen que codifica para la aglutinina del germen de trigo isoforma 1, se tomó del GenBank con número de acceso M25536.1. Esta secuencia se mandó a sintetizar a la compañía EPOCH-Life Sciences. La secuencia del gen sintético fue verificada antes de ser clonado en el plásmido de clonación GS 45510 pBSK AGT1 (ver Anexo 10.1).

5.2 Diseño de oligonucleótidos cebadores

El diseño de los primers para obtener los insertos correspondientes de cada dominio se llevó a cabo de acuerdo a la secuencia de nucleótidos correspondiente a cada dominio (ver anexo 10.1). La amplificación del gen correspondiente a cada dominio se hizo mediante PCR, usando 1 μ L. de cDNA y los cebadores específicos para cada dominio (Tabla 2). La reacción se llevo a cabo en 20 μ L de la mezcla Master Mix con 30 ciclos de amplificación (95°C/30segundos, 60°C/30 segundos y 72°C/15 segundos) en un termociclador TC-512 TECHNE.

Tabla 2. Secuencia de primers utilizados para clonar cada construcción recombinante.

Dominio	Foward	Reverse
A	ATCCATGGACGACGACGACAAGGCGGCC GCCGCGCAAAGGTGCGGCGAGCAGGGCA GCAACATGGAGTGC	ATAAGCTTTCAGGTCCAGCACGCGCCTT
B	ATCCATGGCTAGCAAGCGGTGTGGCAGC	ATAAGCTTTCAGGCGCGGCAGGGGCCGCC
C	ATCCATGGACATCAAGTGCGGCAGC	TAAAGCTTTCAGGTGCTGCAAGCGCCGGA
D	ATCCATGGACAAGCCGTGTGGCAAG	ATAAGCTTTC AACCATCGCAGACGCCGCT

5.3 Clonación de los insertos amplificados en el Vector de expresión pET 32 a.

El gen amplificado por PCR se purificó utilizando el kit QIAquick PCR purification (Qiagen) siguiendo las indicaciones del proveedor. Posteriormente, el inserto correspondiente a

cada dominio de AGT y el vector pET32a (EMD Biosciences) se cortaron con las enzimas de restricción *NcoI* y *HindIII*. En un siguiente paso, el inserto cortado y purificado se ligó al vector utilizando la enzima ligasa de T4.

El producto de la reacción de ligación se utilizó para transformar células competentes DH5 α . Los plásmidos purificados de las clonas obtenidas se analizaron por reacciones de restricción. La construcción para cada dominio de AGT se digirió con la enzima *XmnI* y se enviaron a secuenciar a la compañía Laragen. Los dominios clonados se produjeron como proteína de fusión con tiorredoxina, la cual ayuda a plegar a las proteínas que van unidas a ella. Las respectivas construcciones esperadas para cada dominio y construcciones recombinantes de AGT en el plásmido de expresión pET32a se muestran en la Figura 5.



Fig. 5. Esquema de las construcciones para la expresión de dominios recombinantes de AGT1 (X= dominios A, B, C, D).

5.4 Expresión de dominios

Se inoculó una colonia aislada de la cepa de expresión Rosetta-gami(DE3)pLysS, transformada con el plásmido pET32a-AGT1.X, a 37°C toda la noche en medio Luria Broth (LB) con ampicilina (100 mg/ml), kanamicina (25 mg/ml), tetraciclina (15 mg/ml) y cloranfenicol (34 mg/ml). Este cultivo se diluyó 1:100 en medio fresco LB (1L) con ampicilina, kanamicina, tetraciclina y cloranfenicol 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 disminuyó la temperatura del cultivo a 30°C. Con el fin de establecer el tiempo óptimo de expresión de la proteína recombinante, se tomaron alícuotas del cultivo a diferentes tiempos. El paquete celular se obtuvo por centrifugación (10 min a 6,000 rpm, 4°C) y se lisó por sonicación (Misonix 3000) con amortiguador de lisis (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 300 mM NaCl, 1 mM PMSF). La fracción soluble se separó de la insoluble por centrifugación (35 min a 17,000 rpm, 4°C). La presencia de la proteína recombinante se siguió mediante geles de SDS-PAGE tanto en la fracción soluble como en la insoluble, encontrándose en la primera.

5.5 Purificación de dominios

El extracto celular soluble 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 afinidad HisTrap FF (GE Healthcare), a un flujo de 1 ml/min, previamente equilibrada con el amortiguador de unión (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 300 mM NaCl, 30 mM imidazol). La columna se lavó con 4 volúmenes del amortiguador de unión y se eluyó con dos volúmenes del amortiguador de elución (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 300 mM NaCl, 300 mM imidazol).

5.6 Corte enzimático con enteroquinasa

Las proteínas de fusión purificadas por columna de afinidad HisTrap FF se dializaron para eliminar el imidazol y el NaCl contra amortiguador (50mM Tris-HCl pH 8.0). A la proteína dializada se le agregó CaCl_2 a una concentración final de 1 mM, 0.1 % de Tween-20 y enteroquinasa EKMax (Invitrogen) en una proporción de 0.001 U de enteroquinasa por cada 20 mg de proteína de fusión, y se incubó a 37°C durante 16 h. Al término de la incubación, se filtró a través de una membrana de 0.22 μm y se realizó otra purificación por columna de afinidad HisTrap FF para que en este paso se retenga la Trx en la columna y los dominios de AGT fueran obtenidos en la fracción no retenida.

5.7 Purificación de dominios por FPLC en fase reversa.

La fracción no retenida de la segunda columna HisTrap FF se filtró a través de una membrana de 0.22 μm de poro (Millipore), y se inyectó en una columna analítica de fase reversa C18 (Zorbax 300A Agilent) en un equipo FPLC (GE, Healthcare). La separación se hizo con un gradiente de 0 a 100% de agua/acetonitrilo a un flujo de 1 ml/min, durante 60 min a temperatura ambiente. La detección se realizó a 280 nm. Se concentró la fracción colectada utilizando un concentrador centrífugo a vacío (speed vac) con la finalidad de disminuir la concentración de acetonitrilo.

5.8 Espectrometría de masas

Se obtuvo el espectro masas de los dominios de AGT1.X puros, utilizando la técnica de MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization-Time Of Flight). Esta técnica se basa en pulsos cortos de láser en alto vacío aplicados sobre una muestra mezclada con una matriz que evita la destrucción de la muestra y facilita su vaporización y ionización. Cuando la proteína con la matriz adecuada es irradiada con el láser, la energía es convertida en energía de excitación y en transferencia de H^+ a la muestra (ionización) formando especies cargadas positivamente. 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 (Vorm *et al.*, 1994).

5.9 Determinación de la concentración de dominios por espectrofotometría

Para los estudios de caracterización, dicroísmo circular y calorimetría diferencial de barrido, la concentración de proteína fue determinada de la absorbencia a 280 nm, en un espectrofotómetro UV-1800 (Shimadzu).

El coeficiente de extinción molar para cada dominio se calculó con base en la secuencia de aminoácidos mediante el servidor <http://web.expasy.org/protparam/>, obteniéndose los siguientes coeficientes de extinción molar: dominio A: $10470 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$; dominio B: $4970 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$; dominio C: $6000 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ y dominio D: $8980 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

5.10 Dicroísmo circular

Esta técnica se basa en la absorción diferencial de luz circularmente polarizada (izquierda y derecha). Este fenómeno lo presentan las moléculas quirales como las proteínas. En este estudio, esta técnica se utilizó para evaluar el contenido de estructura secundaria en la región del UV lejano (Kelly *et al* 2005). Cada dominio se llevó a dos condiciones: una en amortiguador de 10 mM de Glicina-HCl a pH 2 y la segunda en amortiguador de 10 mM de citratos a pH 6. La medición se realizó en un espectropolarímetro JASCO J-720, en el intervalo del UV lejano de 195 a 250 nm, a intervalos de 1 nm y con un tiempo de integración de 16 s a 25°C , en una celda de cuarzo de 0.1 cm de paso óptico. Los

espectros se expresaron en elipticidad por residuo, θ_{mrw} , en unidades de $\text{grado.cm}^2.\text{dmol}^{-1}$ (ecuación 1):

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

Donde MRW es la masa molar promedio por residuo, [P] es la concentración de proteína en mg/ml, y d el recorrido óptico de la celda. Para cada dominio fue calculada la MRW de acuerdo con la ecuación 2, obteniéndose para los dominios A, B, C y D masas promedio de 105.8 g/mol, 101.1 g/mol, 100.9 g/mol y 99.9 g/mol, respectivamente.

$$\text{MRW} = \frac{\text{P. M. proteína}}{\# \text{residuos proteína} - 1} \dots\dots\dots (2)$$

Para los dominios recombinantes que en un determinado pH mostraron el espectro típico esperado para una proteína con patrón de plegamiento tipo heveína, se efectuó un barrido por temperatura de 20 a 90 °C, tomándose nuevamente un espectro tanto a 90 °C como de regreso a 20 °C para evaluar la reversibilidad de cada dominio recombinante.

5.11 Calorimetría diferencial de barrido

Es una técnica que permite realizar una caracterización completa del proceso de desplegamiento inducido por la temperatura de proteínas y otras macromoléculas biológicas (Freire, 1995; Sanchez-Ruiz, 1995; Privalov, 1995). Un perfil típico de DSC para una solución de proteína se muestra en la Figura 6. Por lo general, el perfil muestra un pico “de transición”, que se atribuye a la absorción de calor asociado con la desnaturalización de la proteína, mientras que los valores de la pre-transición y de post-transición en la señal de salida reflejan las capacidades caloríficas parciales de los estados nativo y desplegado de la proteína, respectivamente.

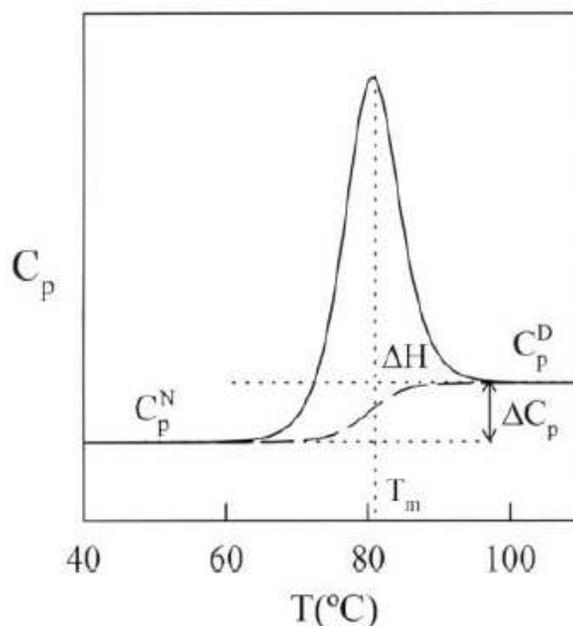


Figura 6. Curva de capacidad calorífica (trazo continuo) en función de temperatura para la desnaturalización térmica de una proteína hipotética. C_p^N representa la capacidad calorífica del estado nativo y C_p^D la del estado desplegado. En trazos horizontales discontinuos se representan las extrapolaciones de las capacidades caloríficas de estos estados. El área encerrada entre las dos curvas equivale a la entalpía de desnaturalización, ΔH . T_m es la temperatura donde ocurre la mitad de la transición y ΔC_p es la diferencia de capacidad calorífica entre el estado nativo y el desplegado.

Las mediciones del desplegamiento térmico de los dominios recombinantes de AGT se llevaron a cabo en un equipo MicroCal VP-Capillary DSC System. Las muestras proteicas se prepararon en amortiguador de 10 mM Glicina-HCl a pH 2.0, se dializó la proteína con este amortiguador toda una noche y posteriormente se filtraron por membrana de 0.22 μm de tamaño de poro (Millipore). Los termogramas se obtuvieron a una velocidad de barrido de $1^\circ\text{C}/\text{min}$ en un intervalo de temperatura de 10 a 110°C .

Para el análisis de datos se utilizó el programa MicroCal DSC Origin 7; para cada termograma obtenido se le restó la línea base correspondiente (amortiguador vs amortiguador) y se normalizaron los datos por concentración. Las curvas calorimétricas se ajustaron mediante un modelo de transiciones independientes. La entalpía de van't Hoff se calculó de los endotermas calorimétricas de acuerdo a la ecuación:

$$\Delta H_{vH} = 4RT_{1/2}^2 \frac{C_{exc/2}}{\Delta H_{cal}} \quad (3)$$

Donde R es la constante universal de los gases, $T_{1/2}$ es la temperatura a la que ocurre la mitad del área bajo la endoterma, $C_{exc1/2}$ es el exceso de la capacidad calorífica a dicha temperatura y ΔH_{cal} es la entalpía calorimétrica.

6. RESULTADOS Y DISCUSION

6.1 Amplificación por PCR de los genes de los dominios de AGT

Las amplificaciones realizadas bajo las condiciones descritas en la metodología, rindieron productos para cada dominio que corrieron intermedios entre las bandas correspondientes a 100 y 200 pb del marcador de peso molecular (Figura 7). Este corrimiento corresponde al tamaño esperado para cada dominio (129 pb para los dominios B, C y D y 138 pb de bases para el dominio A).

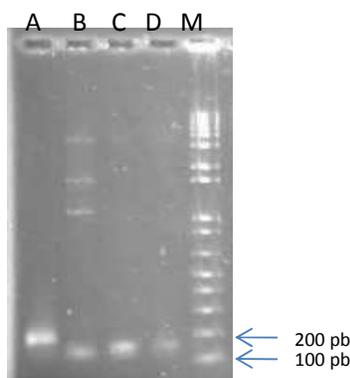


Figura 7. Amplificación de los dominios del gen de AGT, por reacción de PCR, utilizando como molde cDNA. Los productos de PCR se verificaron en un gel de agarosa al 1%. En los carriles 1 al 4 se muestran los productos para los genes de los dominios A al D, respectivamente. El carril M corresponde a los marcadores de peso molecular.

6.2 Ligación de los insertos en el vector de expresión pET32a

Después de realizarse la ligación de los genes en el plásmido pET32a, se realizó un análisis de restricción con la enzima *XmnI* para verificar la correcta inserción de los mismos. Si el plásmido pET32a tiene el inserto correspondiente a cada dominio al digerirse con la enzima *XmnI* se obtiene varios fragmentos del plásmido, en la Figura 8 se muestra las clonas que tienen al gen ligado digeridas con *XmnI*. Para el dominio A se observan tres bandas: una de 2792 pb, otra de 1934 bp y otra de 1296 pb, que corresponden con las esperadas. Para los dominios B, C y D se observan las mismas dos bandas de peso mayor observadas con el dominio A, más una tercera banda de 1272 pb, que contiene los genes de interés; para el plásmido pET32a sin insertos se observan tres

bandas a 2792 pb, 1934 pb y 1174 pb. Las clonas positivas obtenidas para cada dominio fueron seleccionadas y se enviaron a secuenciar. Las secuencias determinadas experimentalmente por Laragen Inc. concordaron 100% con las secuencias teóricas esperadas para cada dominio.

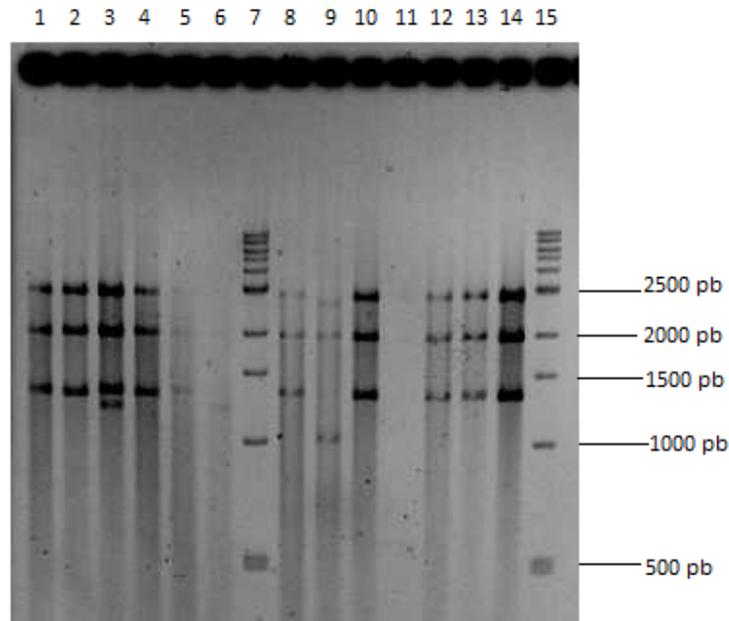


Figura 8. Análisis por restricción de las clonas obtenidas y digeridas con *XmnI*, en gel de agarosa al 1%. Carriles 1-3: clonas 1-3 del dominio A, carriles 4 y 5: clonas 1 y 2 del dominio B, carril 6: control pET32a, carril 7: marcador de peso molecular, carriles 8-10: clonas 1-3 del dominio C, carril 11: vacío, carriles 12-14: clona 1-3 del dominio D y carril 15: marcador de peso molecular.

6.3 Expresión de los dominios

La expresión de los dominios se hizo en la cepa *Rosseta Gamii* (DE3) pLysS. Esta cepa contiene el lisógeno DE3 y el plásmido pLysS que, de manera constitutiva, expresa niveles bajos de lisozima, la cual inhibe la expresión basal de la polimerasa T7, mientras no haya agente inductor (Guan *et al.*, 1988), y aumenta la expresión de proteínas con codones raros usados en *E. coli*, con mutantes *trxB/gor*, que son enzimas clave en las dos vías principales reductivas (Dubendorff, 1991). Estas características representan una ventaja significativa para el correcto plegado de proteínas que contienen puentes disulfuro.

Se observó la producción máxima de los dominios en la fracción soluble alrededor de las 16 horas después de la inducción con IPTG (Figura 9A). El corrimiento electroforético de las proteínas de fusión en geles SDS-PAGE (Figura 9B) resultó intermedio entre las bandas de 21 a 25 kDa de marcadores de peso molecular, en concordancia con los pesos esperados a partir de las secuencias respectivas (Trx-AGT1.A de 22610.3 Da, Trx-AGT1.B de 21536.2 Da, Trx-AGT1.C de 21487.2 Da y Trx-AGT1.D de 21453.1 Da).

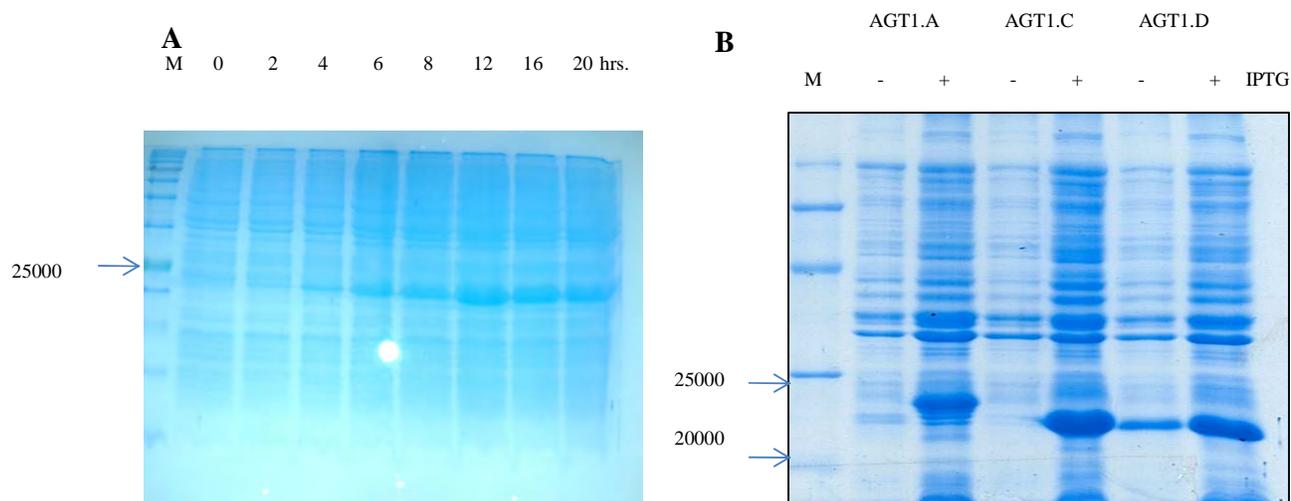


Fig. 9. Expresión de proteínas de fusión obtenidas en la fracción soluble, seguidas por gel SDS-PAGE al 12%. A) Cinética de expresión de la proteína de fusión Trx-AGT1.B. B) Inducción de proteínas recombinantes por IPTG. M es marcador de peso molecular. -/+ indica ausencia/presencia de IPTG en células transformadas con los respectivos dominios.

6.4 Purificación de dominios

Los extractos solubles obtenidos para las cuatro construcciones Trx-AGT.X se purificaron mediante una columna de afinidad HisTrap FF (GE, Healthcare) previamente equilibrada con amortiguador de unión. La elución se realizó con amortiguador de elución en el cual la concentración de imidazol se incrementó a 300 mM.

La purificación de las cuatro construcciones recombinantes se verificó por SDS-PAGE al 12% (Figura 10).

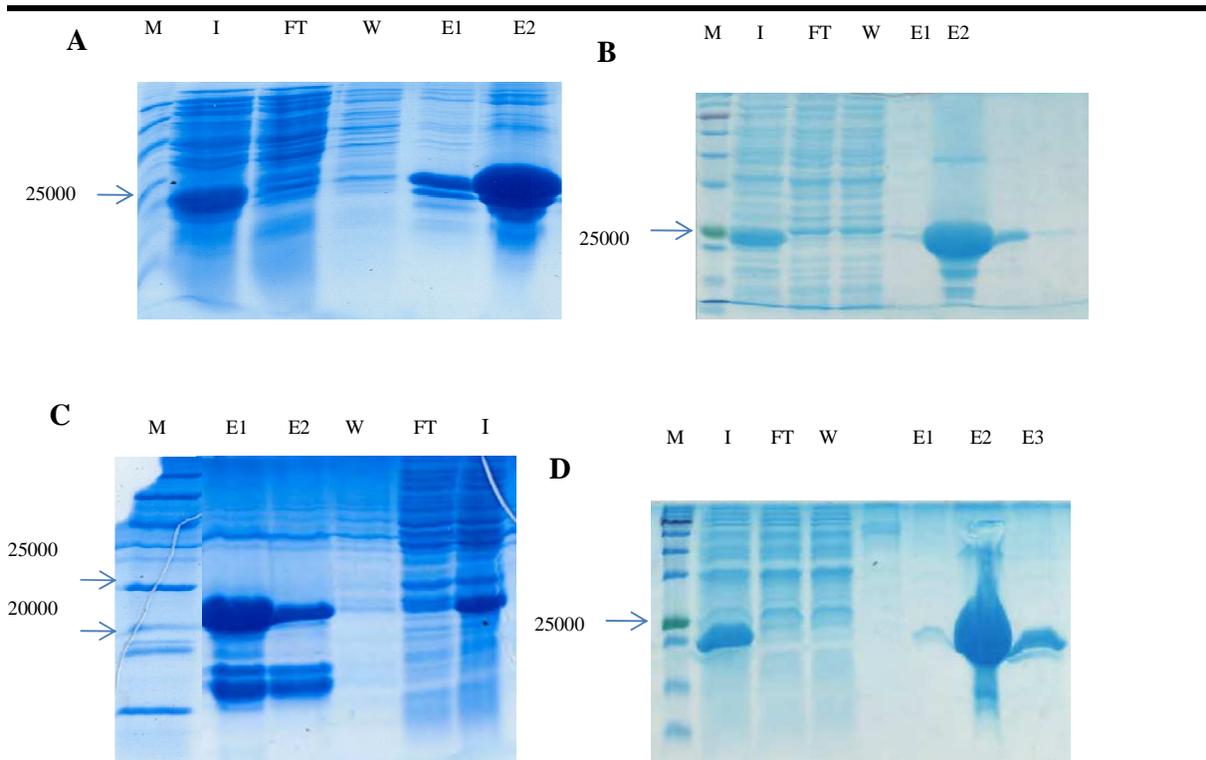


Figura 10. Resultados de la purificación de las proteínas de fusión por columna de afinidad HisTrap FF, seguidos en gel SDS-PAGE 12%. A) Trx-AGT.A, B) Trx-AGT.B, C) Trx-AGT.C y D) Trx-AGT.D. M=marcador de peso molecular, I=lisado celular, FT (no retenido), W=lavado, E=eluciones con imidazol.

El rendimiento se estimó en aproximadamente 10 mg de proteína de fusión por litro de cultivo por cada dominio de AGT. La concentración de proteína se determinó al medir la absorbencia de la elución a una longitud de onda a 280 nm. Obtenidas las cuatro construcciones, se dializaron en membrana de diálisis 6,000 – 8,000 MW (Spectrapor) contra amortiguador de diálisis (50 mM Tris-HCl pH 8.0) y se procedió a cortar enzimáticamente con enteroquinasa. Se realizó una cinética de corte para optimizar los tiempos de proteólisis (Figura 11). Se observó un corte eficiente con una concentración de enzima de 0.001 U (una unidad de enteroquinasa corresponde a 190 unidades de activación de tripsinógeno a 37°C/16 h).

La proteína se sometió nuevamente a una purificación de afinidad HisTrap FF para retirar a la proteína de fusión que no se digirió, así como los fragmentos de tiorredoxina que se obtuvieron después de la digestión enzimática. Finalmente, la fracción no retenida a la columna por afinidad se purificó por RPC-FPLC. Los cuatro dominios eluyeron a una

concentración entre el 27 y 28 % de acetonitrilo. Los perfiles de elución para cada dominio se muestran en el anexo 10.3.

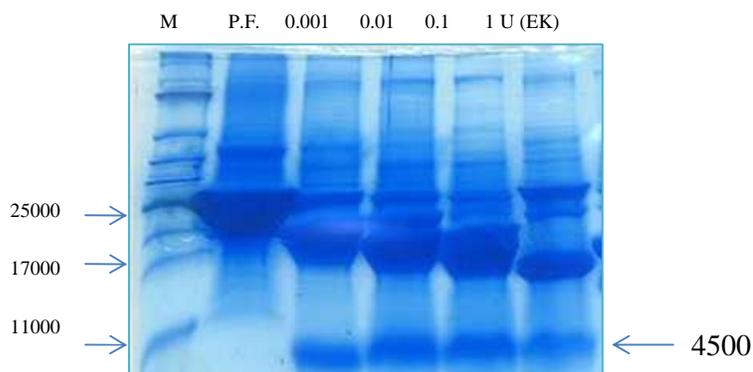


Figura 11. Corte enzimático con enteroquinasa, para la construcción Trx-AGT.A, seguida en gel SDS PAGE al 15%. El resultado es representativo de las cuatro construcciones. M=marcador de peso molecular, P.F. proteína de fusión. Los carriles subsiguientes muestran la cantidad progresiva de enterocinasa (EK) ocupada en cada caso.

Las fracciones enriquecidas con dominios se colectaron y concentraron. La masa molecular se determinó por espectrometría de masas MALDI-TOF. El espectro correspondiente a cada dominio se muestra en el anexo 10.4. En la Tabla 3, se comparan los pesos esperados y los obtenidos mediante espectrometría de masas para cada uno de los dominios, observándose una excelente correspondencia entre ellos.

Tabla 3. Comparación del peso molecular teórico y experimental (por MALDI-TOF) de los cuatro dominios de la AGT.

Dominio/Peso	Teórico	MALDI-TOF
A	4754.2	4753.9
B	4550.0	4550.9
C	4430.0	4431.5
D	4395.9	4391.13

6.5 Contenido de Estructura Secundaria

Con el fin de 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 (195-250 nm). En la Figura 12 se muestran los espectros a un pH 2 y temperatura de 25 °C. Bajo estas condiciones de acidez, los espectros de los dominios A, B y C muestran un máximo positivo a una longitud de onda de aproximadamente 225 nm y un mínimo negativo a una longitud de onda entre 200 a 205 nm. Este patrón es típico de proteínas plegadas constituidas por dominios tipo heveína (Rodríguez-Romero *et al.*, 1989). En cambio, con el dominio D se observa un espectro característico de proteína desplegada, evidenciándose que no se encuentra estructurado a este valor de pH. Estos resultados dan soporte experimental directo a la propuesta de que tres de los cuatro dominios de la AGT silvestre se encuentran plegados a pH de 2. Además, revelan que el dominio que se encuentra desplegado corresponde al dominio D.

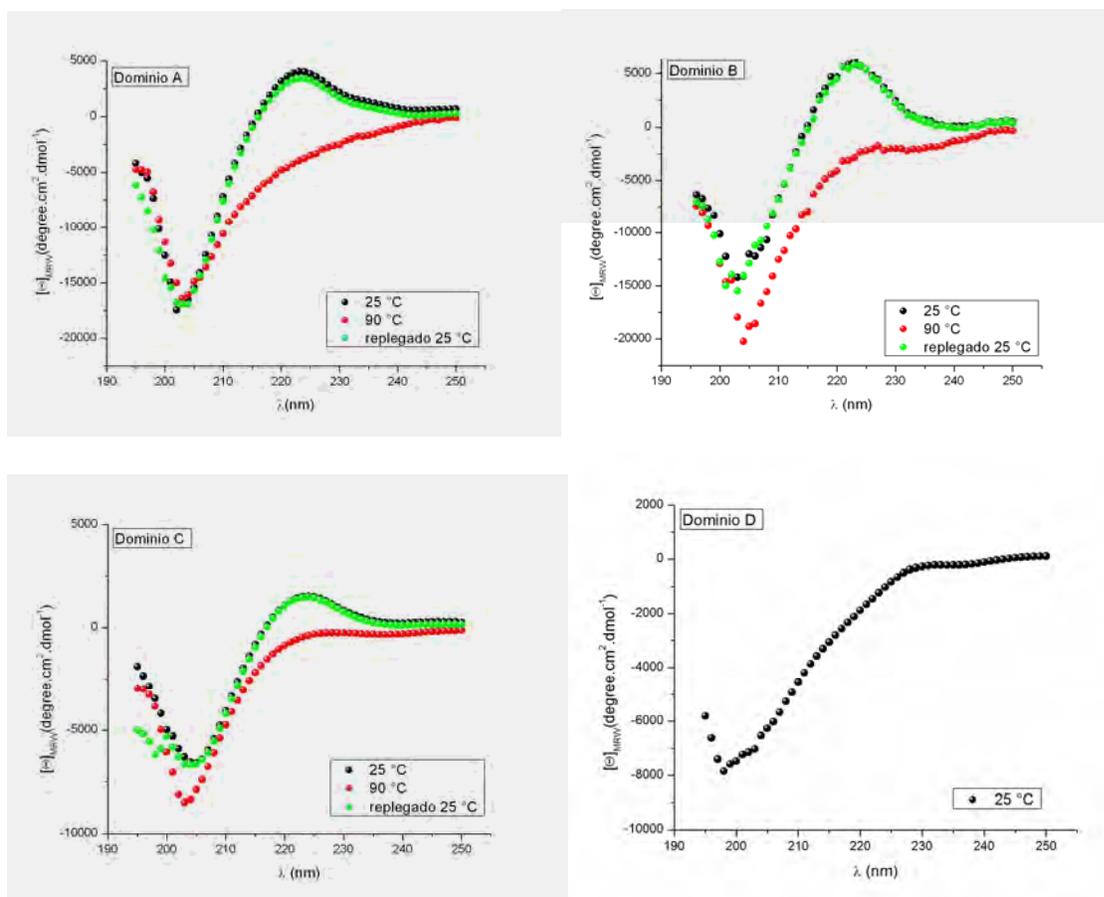


Figura 12. Espectros de DC de los dominios recombinantes de AGT a pH 2, en 10 mM Glicina-HCl. Las concentraciones para los dominios A, B, C y D fueron de 0.04 mM, 0.03 mM, 0.07 mM y 0.07 mM, respectivamente.

En la Figura 12 también se muestran los espectros obtenidos a 90 °C para los dominios A, B y C, así como los espectros tomados nuevamente a 25 °C, después de haberlos sometido a un ciclo de calentamiento-enfriamiento. A juzgar por la total recuperación de la señal nativa, los tres dominios muestran una completa reversibilidad en su desplegamiento térmico en condiciones de alta acidez, lo cual concuerda con lo observado para la AGT completa (Portillo-Téllez *et al.*, 2011).

La Figura 13 muestra los espectros de DC de los dominios A y D a pH 6. Como puede observarse, en estas condiciones el dominio D muestra una forma más cercana a la típica de un dominio plegado. Nuevamente, este resultado concuerda con los datos para la AGT completa, que evidenciaban que a pH cercano a la neutralidad los cuatro dominios están plegados.

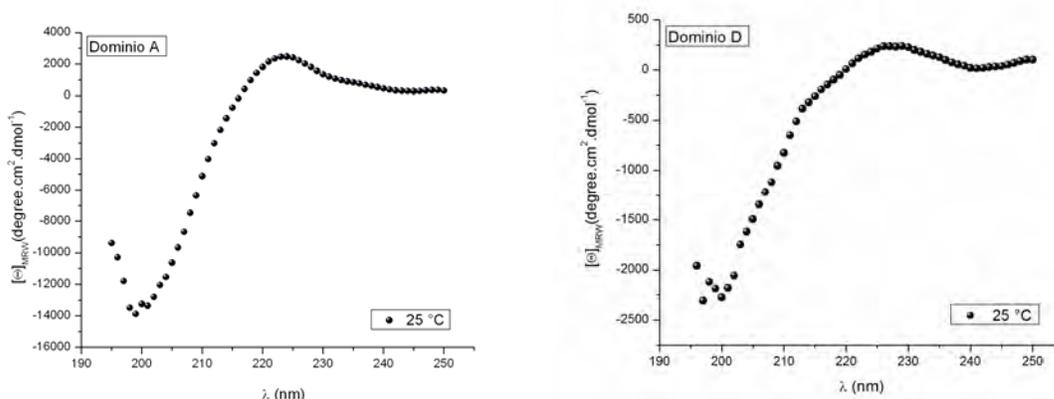


Figura 13. Espectros de DC de los dominios recombinantes A y D de AGT a pH 6 en 10 mM citratos. Las concentraciones para los dominios A y D fueron de 0.04 mM y 0.01 mM, respectivamente.

En el estudio realizado con la lectina completa, habíamos anticipado que el dominio B no era el que se encontraba desplegado a pH 2, debido a que no tiene ningún Trp, por lo que no podía ser responsable del apagamiento de fluorescencia observado (Figura 4). Aunado a esto, el dominio B presenta el menor número de grupos ionizables ácidos (ver Tabla 4), por lo que es de esperarse que muestre la menor variación de carga en zonas de pH ácido. De acuerdo al programa *Protein Calculator*, la variación en la carga eléctrica neta del dominio B entre pH 7 y 2 es de tan sólo +1.2, lo cual llevaría a suponer que sería el dominio cuya estabilidad estructural se vería en menor grado comprometida en condiciones de alta acidez. En cambio, el dominio D, al presentar la abundancia más alta de residuos tanto ácidos como básicos, es el que presenta la mayor cantidad de cambio

de carga eléctrica en el mismo intervalo de pH (+4.2), lo cual correlaciona con el hecho de que de manera aislada es el dominio que se encuentra desplegado a pH muy ácido.

Tabla 4. Residuos ionizables presentes en cada dominio

Tipo residuo	A	B	C	D
Básicos	R (2) K (33)	R (45, 83) K (42)	K (87, 95)	R (139) K (130, 134, 149)
Ácidos	D (29) E (5,11)	E (72)	D (85) E (115)	D (129, 135, 170)

6.6 Despliegamiento térmico de los dominios

En la Figura 14, se muestran los trazos de barrido de temperatura seguidos por DC para los dominios A, B y C, los cuales mostraron un patrón de conformación plegada a pH de 2. Se observa que los dominios son muy estables y resistentes a altas temperaturas. Dada la alta estabilidad térmica de los dominios, no fue posible observar el final de la transición de despliegamiento térmico. Por tanto, con estos trazos no fue posible realizar un análisis de van't Hoff para determinar los parámetros termodinámicos de despliegamiento. No obstante, los perfiles observados revelan que existen diferencias significativas en la estabilidad de los dominios, siendo el dominio A el menos estable de los tres, mientras que los dominios B y C muestran perfiles semejantes.

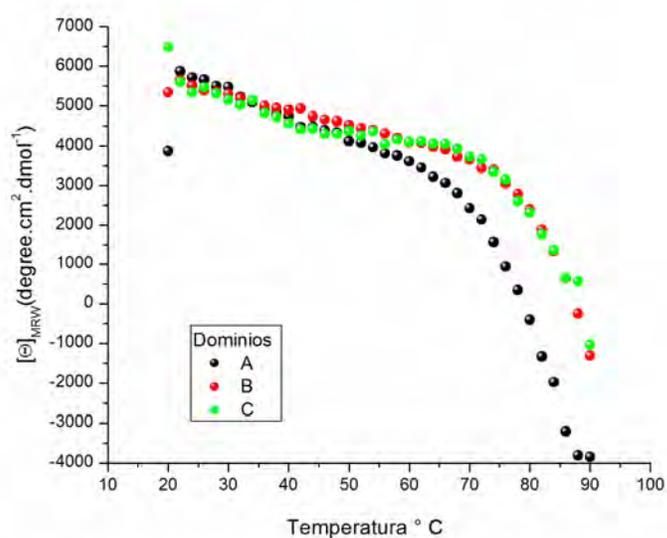


Figura 14. Curvas de perturbación térmica de los dominios de AGT a pH 2, seguidas por DC a 225 nm.

Tradicionalmente, la calorimetría diferencial de barrido ha sido considerada una técnica adecuada para elucidar el mecanismo de desplegamiento térmico de proteínas (Sánchez-Ruiz, 1995; Privalov, 1979). Esto se debe a que con la calorimetría diferencial de barrido es posible medir de forma directa el incremento de entalpía del proceso de desnaturalización. El valor de la entalpía de desnaturalización se refleja no sólo en el área bajo la curva de la endoterma de desplegamiento (Figura 6), sino también en la forma del pico, según se deduce de la ecuación de van't Hoff (ecuación 4), la cual establece la variación de la constante de equilibrio con respecto a la temperatura.

$$\ln(K) = -\frac{\Delta H^\circ}{R} \left[\frac{1}{T} \right] + \frac{\Delta S^\circ}{R} \dots\dots\dots (4).$$

En la Figura 15 se muestran las endotermas para cada dominio determinadas por DSC. Los dominios A, B y C muestran un pico correspondiente a una transición de desplegamiento. En cambio; el dominio D no exhibe ningún pico, es decir; a pH 2 el dominio D está desplegado.

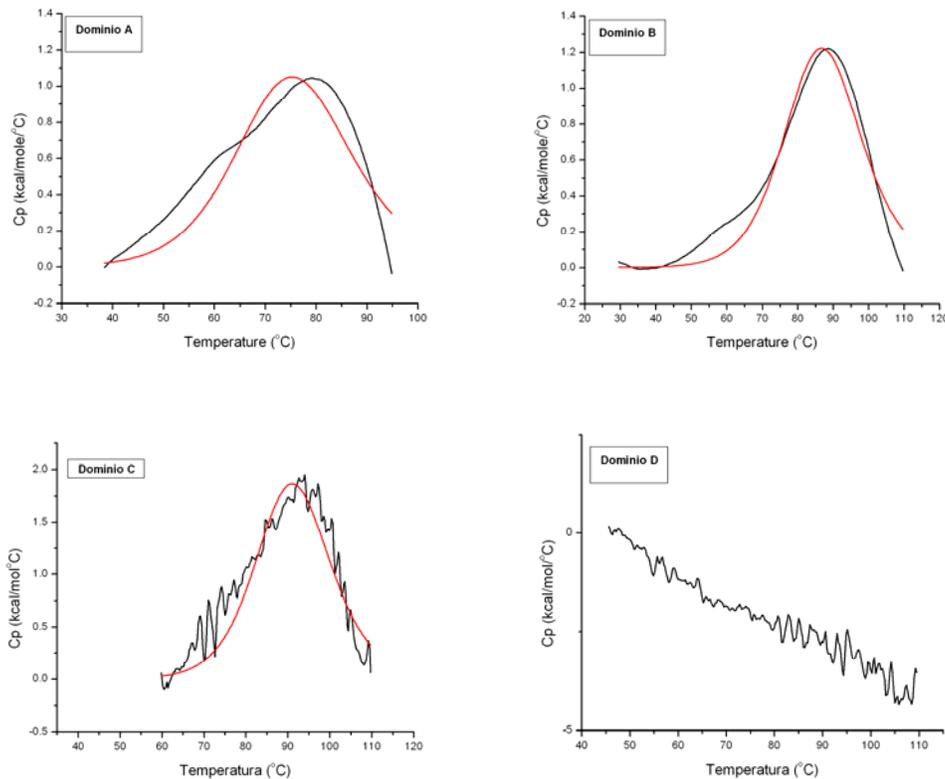


Figura 15, Perfiles calorimétricos de la perturbación térmica de dominios recombinantes de AGT a pH 2, a una velocidad de calentamiento de 1 °C/min. La línea negra en cada recuadro corresponde a la curva experimental, mientras que la línea roja corresponde al mejor ajuste con un modelo de 2 estados.

La Tabla 5 muestra en resumen los resultados de los parámetros de transición obtenidos para los tres dominios aislados. Realizando un análisis de deconvolución de cada endoterma, se determinaron los valores de T_m y ΔH_m para cada dominio. El área de la endoterma proporciona la entalpía global del proceso, la así llamada entalpía calorimétrica (ΔH_{cal}). De la forma de la curva, es posible calcular la entalpía de van't Hoff (ΔH_{vH}) de acuerdo con la ecuación 3.

El *criterio calorimétrico* para establecer si una transición es de dos estados, consiste en la coincidencia entre los valores de ΔH_{cal} y ΔH_{vH} . Para un cierto número de proteínas globulares pequeñas, Privalov y colaboradores encontraron que la relación entre estas entalpías es de 1.05 ± 0.03 , lo que indica una baja proporción de estados intermedios y, por tanto, una buena concordancia con el modelo de dos estados.

La Tabla 5 muestra que para los tres dominios, la relación $\Delta H_{vH}/\Delta H_{cal}$ es cercana a 1. Por tanto, se evidencia la naturaleza de dos estados para cada uno de los dominios, lo cual concuerda con las transiciones independientes de dos estados determinadas para el desplegamiento de la AGT silvestre.

Tabla 5. Parámetros de desplegamiento para las transiciones de la AGT nativa y de dominios aislados, determinadas por DSC a pH 2

	T_m (°C)	ΔH_m (kcal/mol)	ΔH_{cal} (kcal/mol)	$\Delta H_{vH}/\Delta H_{cal}$
Transiciones				
<i>(AGT completa)</i>				
1	68 ± 0.7	31 ± 2	-	-
2	79 ± 0.6	43 ± 3	-	-
3	91 ± 0.4	42 ± 1	-	-
Dominios				
A	75.9 ± 0.3	31.8 ± 0.2	32.4	0.98
B	87.2 ± 0.1	35.5 ± 0.2	35.9	0.99
C	91.4 ± 0.2	44.4 ± 0.4	46.1	0.96

Los parámetros obtenidos para los dominios aislados fueron comparados con las transiciones observadas previamente con la AGT nativa (Figura 16). Como se observa en la Tabla 5, existe una plena concordancia entre los valores de T_m y ΔH_m del dominio C aislado y los de la transición de mayor temperatura observada en la AGT silvestre, por lo que asumimos la plena correspondencia dominio-transición. En cambio, no existe plena coincidencia entre las otras dos transiciones y los comportamientos exhibidos por los dominios A y B, por lo que no es posible hasta este punto de la investigación asignar las correspondencias dominio-transición. Los datos indican que los dos dominios poseen una mayor estabilidad de manera aislada que formando parte de la subunidad tetradominio.

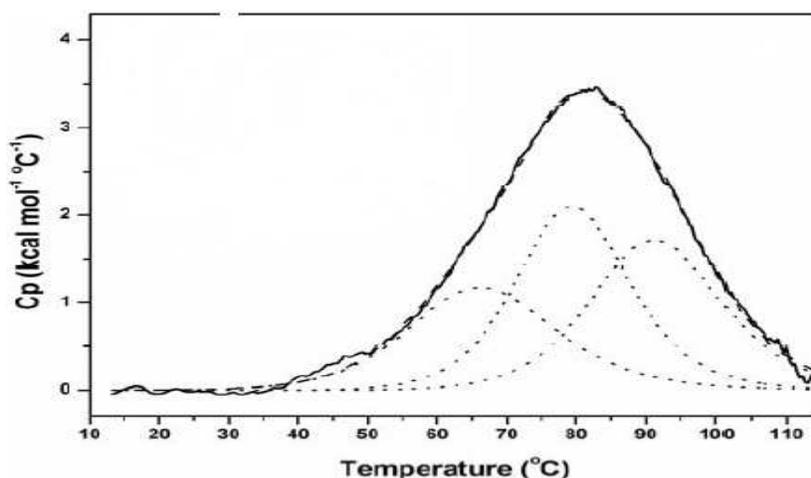


Figura 16. Perfiles calorimétricos de la perturbación térmica de AGT por DSC a pH 2 (Tomado de Portill-Téllez *et al.*, 2011).

Un escenario probable que podría explicar el porqué de la mayor estabilidad de los dominios aislados en relación a cuando forman parte de la subunidad completa sería que en condiciones muy ácidas, los contactos interdominio se vuelven desfavorables por un aumento en la repulsión electrostática. Al protonarse los grupos ácidos, los dominios van ganando carga neta positiva. Este efecto repulsivo incrementado sería minimizado al desplegarse el dominio, con el consecuente debilitamiento de la conformación plegada.

Como se observa en la Figura 17, en efecto existen diversos residuos ionizables que forman parte de las intercaras dominio-dominio. En el caso del dominio A, presenta el residuos básicos lisina(33), mientras que el dominio B posee a los residuos básicos lisina(42) y arginina(45). Estos residuos podrían estar ejerciendo una considerable repulsión electrostática entre ellos. Esto se reflejaría en una menor estabilidad del dominio

A cuando se encuentra en la subunidad completa, por ser el residuo que primero se despliega. En la intercara de los dominios B-C se observan los residuos arginina(83), del dominio B, que se encuentra próximo a la lisina(87), del dominio C. Nuevamente, una repulsión entre residuos básicos podría ser causante de desestabilizar preferentemente al dominio con menor estabilidad térmica, en este caso al dominio B. Con respecto al dominio C, este no presentaría un efecto importante de estabilidad disminuida al formar parte de la lectina completa, ya que cuando se inicia su desplegamiento, los dominios A y B ya están desplegados. Por otro lado, a pH de 2 el dominio D también se encuentra desplegado. Esta situación permitiría explicar la excelente correspondencia del dominio C con respecto a la transición 3. Por otro lado, el hecho de que los dominios A y B presenten una menor estabilidad cuando se encuentran en la lectina completa, nos indica la ocurrencia de una cooperatividad interdominio negativa en las condiciones de estudio.

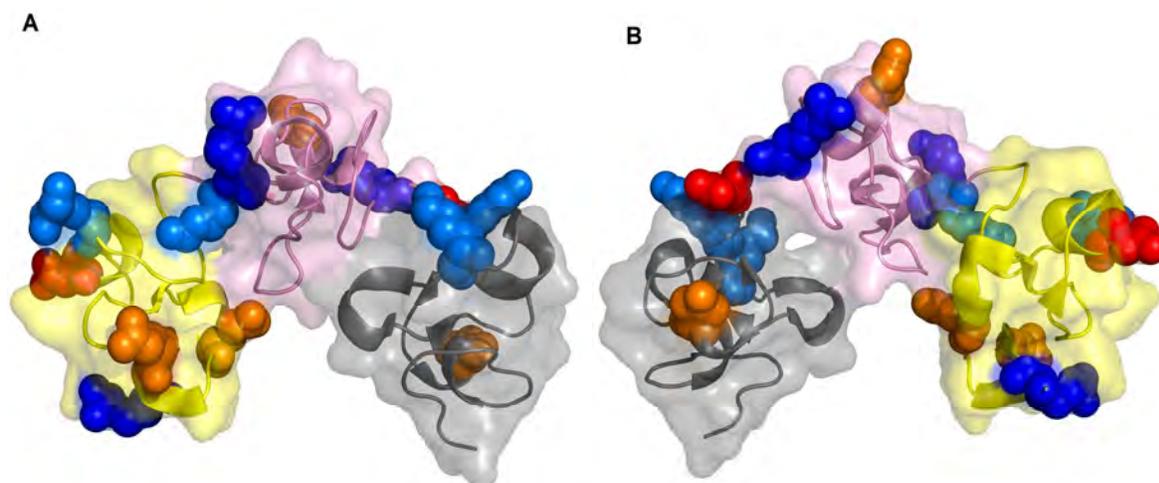


Figura 17. Representación esquemática de los dominios A, B y C de AGT. El dominio D no se presenta para simplificar la imagen. A) Vista anterior, arreglo A – C. B) Vista posterior, arreglo C – A. Residuos básicos: Arginina (azul fuerte) y Lisina (azul claro). Residuos ácidos: Ácido aspártico (rojo) y Ácido glutámico (naranja); dominio A (amarillo), dominio B (rosa) y dominio C (gris).

Existen otros escenarios moleculares que pudieran explicar los valores de los parámetros de desplegamiento mostrados en la Tabla 5. Por ejemplo, que la transición 2 corresponda al dominio A, dado la cercanía de las T_m (aunque los valores de ΔH_m difieren significativamente), y que la transición 1 corresponda al dominio B, en cuyo caso la diferencia de T_m entre el dominio aislado y en su forma silvestre sería de 19°C. En este

escenario, el dominio B sería el más desfavorecido en términos de sentir la repulsión electrostática de los dominios adyacentes.

Para tener una imagen más detallada de los efectos de cooperatividad interdominio, así como para lograr una elucidación más precisa de qué dominios son responsables de cada transición, se tiene planeado seguir con el estudio de los dominios aislados a diferentes valores de pH, así como de las diferentes construcciones bidominio y tridominio. De ser correcta la existencia de fuertes efectos repulsivos causantes de cooperatividad negativa interdominio, sería de esperarse que a cierto valor de pH menos ácido los efectos repulsivos se minimicen, por lo que la cooperatividad negativa debería desaparecer.

7. CONCLUSIONES

El vector pET 32a y la cepa *E. coli Rosseta Gamii* (DE3) pLysS resultaron apropiados para la sobre-expresión de los cuatro dominios de AGT. Las proteínas de fusión fueron encontradas en la fracción soluble, con un rendimiento de aproximadamente 10 mg por litro de cultivo.

Se logró purificar a los cuatro dominios de AGT mediante técnicas cromatográficas y liberarlos de la proteína de fusión con la enzima EK, verificándose mediante espectrometría de masas que la masa molecular de los cuatro dominios de AGT coincide con el valor teórico esperado. El rendimiento aproximado de cada dominio puro de AGT por litro de cultivo fue de 0.5 mg - 1 mg.

Mediante dicroísmo circular se observó que los dominios A, B y C se encuentran plegados a pH de 2 y 6, observándose el espectro característico tipo heveína de la AGT nativa con un máximo positivo a 225 nm y un mínimo negativo a 205 nm. El espectro de dicroísmo circular del dominio D a pH 2 mostró un patrón de una proteína desplegada, respondiendo por tanto a la pregunta de cuál es el dominio en la proteína silvestre que se encuentra desplegado a pH 2 y temperatura ambiente. Este dominio muestra espectro de conformación plegada a pH de 6, indicando que también es capaz de plegarse por sí mismo, sin requerir la asistencia del dominio C adyacente en la subunidad tetradominio.

Se logró identificar parcialmente la correspondencia entre los dominios aislados y cada una de las transiciones observadas en la AGT silvestre. Es claro que el dominio desplegado observado en esta última corresponde al dominio D. Al parecer, el dominio C es el responsable de la transición observada a mayor temperatura. En cambio, es necesario realizar más experimentos para poder discernir la correspondencia para los dominios A y B.

Los datos sugieren que a pH de 2 existe una cooperatividad negativa (desestabilizante) entre al menos los dominios A y B. No obstante, al parecer el dominio C no exhibe efectos de esta cooperatividad negativa, probablemente por el hecho de que los otros tres dominios ya se encuentran desplegados previamente.

8. PERSPECTIVAS

Clonar, expresar y purificar las tres construcciones bidominios (AB, BC y CD) y dos tridominios (ABC y BCD).

Corroborar mediante dicróismo circular el contenido de estructura secundaria de las diferentes proteínas recombinantes.

Determinar mediante experimentos de perturbación térmica seguidos por dicróismo circular el perfil de desplegamiento de los bidominios y tridominios a diferentes condiciones de pH.

Caracterizar termodinámicamente el desplegamiento térmico de los tres bidominios y los dos tridominios de AGT por DSC.

Caracterizar estructuralmente las diferentes proteínas recombinante mediante resonancia magnética nuclear.

9. REFERENCIAS

- 1) Aub, J. C.; Tieslau, C. y Lankester, A. 1963. Reactions of Normal and Tumor Cell Surfaces to Encimes, I Wheat-Germ Lipasa and Associated Mucopolysacarides. *Physiol.* 50: 613 - 619.
- 2) 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.
- 3) Aub, J. C. Sanford, H. y Cote, M. N. 1965. Studies on reactivity of tumor and normal cells to a wheat germ agglutinin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 54:396–399
- 4) 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.
- 5) Bies, C; Lehr, C-M. y Woodley, J. F. 2004. Lectin-mediated drug targeting: history and applications. *Adv. Drug Del.* 56: 425-435.
- 6) Bjellqvist, B., G. J. Hughes, Ch. Pasquali, N. Paquet, F. Ravier, J. Ch. Sánchez, 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.
- 7) Chavelas, E.A.; Beltrán, A.P., Pérez-Hernández, G. y E. García-Hernández. 2004. Spectroscopic characterization of the thermal unfolding of wheat germ agglutinin. *J. Mex. Chem. Soc.* 48:257–260.
- 8) Dubendorff, J. W. Studier, F. W. 1991. Controlling basal expression in an inducible T7 expression system by blocking the target T7 promoter with lac repressor. *J. Mol. Biol.* 219(1):45-59.
- 9) Espinosa, J.F; Asensio, J. L; García, 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.
- 10) Franz, 1988. The ricin store. *Adv. Lectin Res.* 1:10-25.
- 11) Freire, E. 1995. Differential scanning calorimetry. *Methods Mol. Biol.* 40:191-218.
- 12) Gabor, F; E. Bogner; 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

-
- 13) 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.* 121:156-157.
 - 14) Gastman, B. Wang, K. Han, J. Zhu, Z. Huang, X. Wang, G-Q. Rabinowich, H. y Gorelik, E. 2005. A novel apoptotic pathways as defined by lectin cellular initiation. *B. B. Ress. Comm.* 316:263-271.
 - 15) 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 Heroesvirus 6 U69 Gene Product and Identification of its Nuclear Localization Signal. *J. Virol.* 82:710-718.
 - 16) Kelly, S. M. Jess, T. J. Price, N. C. 2005. How to study proteins by circular dichroism. *Biochim. Biophys Acta.* 1751(2):119-139.
 - 17) Lis, H y Sharon, N. 1998. Lectins: Carbohydrate-Specific Proteins That Mediate Cellular Recognition. *Chem. Rev.* 98:637-674.
 - 18) 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 wheat germ agglutinin conjugated poly (ethylene glycol)-ply(lactid acid) nanoparticles for intranasal delivery to the brain.
 - 19) Mistry, A. S. Stolnik, and L. Illum. 2009. Nanoparticles for directed nose-to-brain delivery of drugs. *Int. J. Pharm.* 379:146-157.
 - 20) Nagahora, H. Harata, K. Muraki, M. y Jigami, Y. 1995. Site-directed mutagenesis and sugar-binding properties of the wheat germ agglutinin muants Tyr73Phe and Phe116Qr. *Eur. J. Biochem.* 233:27-34.
 - 21) Nagata, Y. y Burger, M. M. 1974. Wheat Germ Agglutinin. Isolation and Crystallization. *J. Biol. Mol.* 247:2248-2250.
 - 22) Nagata, Y. y Burger, M. M. 1974. Wheat Germ Agglutinin. Molecular Characteristics and Specificity for Sugar Binding. *J. Biol. Mol.* 249 10:3116-3122.
 - 23) Portillo Téllez M del C; Bello, M. Salcedo, Gutiérrez, G. Gómez-Vidales, V. y García Hernández E. 2011. Folding and Homodimerization of Wheat Germ Agglutinin. *Biophys. J.* 101:1-9.
 - 24) Privalov, P. L. 1979. Stability of proteins: small globular proteins. *Adv. Protein Chem.* 33: 167-241.
 - 25) Privalov, P. L. *et al*, 1995. Precise scanning calorimeter for studying thermal properties of biological macromolecules in dilute solution. *Anal. Biochem.* 232:79-85.

-
- 26). Rodríguez-Romero, A. Arreguín, B. y Hernández Arana. 1989. Unusual far-Ultraviolet circular dichroism of wheat germ agglutinin and hevein originated from cystine residues. *BBA*. 998: 21-24.
- 27) Sánchez-Ruiz, J. M. 1995. Differential Scanning Calorimetry of proteins. *Subcell Biochem*. 24: 133-176.
- 28) Schaeffer, H. E. Breittfeller, 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.
- 29) 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.
- 30) Sharon, N. and Lis, H. 2004. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. *Glycobiology*. 14:11,53–62.
- 31) Sharon M. Kelly, Thomas J. Jess, Nicholas C. Price, 2005. How to study proteins by circular dichroism. *BBA*. 1751:119-139.
- 32) Sharon, N. 2008. Lectins: Past, Present and Future. 23 rd Int. Lectin Meeting. (Interlec-23).
- 33) 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.
- 34) Sinha, S. Gupta, G; Vijayan, M. y A. Surolia. 2007. Subunit Assembly of plant lectins. *Curr. Op. Struc. Biol*. 17:498-505.
- 35) 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.
- 36) Summer, J. B. y Howel, S. F. 1936. The Identification of the Hemagglutinin of the jack bean with concanavalin A. *J. Bacteriol*. 32:227-237.
- 37) Surti, N. Naik, S. Bagch, T. Dwarkanath, B. S. y Misra, A. 2008. Intracellular Delivery of Nanoparticles of an Antiasthmatic Drug. *Pharm. Sci*. 9 (1):217-223.
- 38) Vorm, O y Roepstorff, P. 1994. Peptide sequence information derived by partial acid hydrolysis and matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Biol. Mass Spectrom*. 23 (12):734-740.
- 39) Wood, K. M. Stone, G. y Peppas, N. A. 2006. Lectin Funtionalized Complexation Hydrogels for Oral Protein Delivery. *J. Control Release*. 116(2):66-8.

-
- 40) Wood, K. M. Stone, G. y Peppas, N. A. 2008. Wheat Germ Agglutinin Functionalized Complexation Hydrogels for oral Insulin Delivery. *Biomacromol.* 9:1293-1298.
- 41) 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.
- 42) Wright, C. S. 1977. The Crystal Structure of Wheat Germ Agglutinin at 2.2 Å Resolution. *J. Mol. Biol.* 111:439-457.
- 43) 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.
- 44) 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.
- 45) 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.
- 46) Wright, C. S. 1990. 2.2 Å Resolution Structural Analysis of two Refined N-acetylneuraminyl-lactose- Wheat Germ Agglutinin Isolectin Complexes. *J. Mol. Biol.* 215:635-651.
- 47) Wright, C. S. 1992. Crystal Structure of a Wheat Germ Agglutinin/Glycophorin sialoglycopeptide Receptor Complex. *J. of Biol. Chem.* 267, 20:14345-14352.
- 48) Wright, C. S. 1993. Crystallographic Refinement and Structure of the Complex of Wheat Germ Agglutinin with a Bivalent Sialoglycopeptide from Glycophorin A. *J. Mol. Biol.* 232:620-638.
- 49) 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.

10. ANEXO

10.1 Secuencia de nucleótidos y de residuos de AGT

Gen Bank M25536.1

```
1 accagcacca agaaaacaaa aagcatgaag atgatgagca ccagggccct cgcgctcggc
61 gcggtcgccg tcctcgcctt cgccgcggcg accgctcagg cccagagggtg cggcgagcaa
121 ggcagcaaca tggagtgccc caacaacctc tgctgcagcc agtacgggta ctgcgggatg
181 ggcggcgact actgcggcaa gggctgccag aacggcgctt gctggaccag caagcgctgc
241 ggcagccagg ccggcggcgc gacgtgcacc aacaaccagt gctgcagcca gtacgggtac
301 tgcggcttcg gcgccagta ctgcggcgcc ggctgccagg gcggcccctg ccgcgccgac
361 atcaagtgcg gcagccaggc cggcggcaag ctgtgcccgga acaacctctg ctgcagccag
421 tggggattct gcggcctcgg ttccgagttc tgcggcggcg gctgccagag cgggtgcttg
481 agcaccgaca aaccgtgcgg caaggacgcc ggcggcagag tttgcactaa caactactgt
541 ttagcaagt ggggatcctg tggcatcggc ccgggctatt gcggtgcagg ctgccagagt
601 ggcggctgcg atggtgtcct cgccgaggcc atcaccgcca actccactct tctccaagaa
661 tgatgatcaa tcttgctatg gcagtattgc aacgacgaat aatccgtggc aatctcattg
721 ccacctacgg tttcccttga cttactttta gactactagt ccttaataat tctctagtt
781 gcaatatgat gtgcaggta ctgcagcaga acaaaaatat tgctgtcgtg catgcatgga
841 aatattgcag tgagaaagta ctgtgtggca atataggggtg tgctattgtt gccgcaaatt
901 agttttcttg ttatgacctg ttgtcaggat gcatgcatgg ctggtgtaat gttggagtac
961 ttcgtgattt cgttgcaata tattaccatg gttctcac
```

Uniprot P10968

```
10      20      30      40      50      60
MKMMSTRALA LGAAAVLAF AATAQAQRCG EQGSNMECPN NLCCSQYGYC GMGGDYCGKG
70      80      90     100     110     120
CQNGACWTSK RCGSQAGGAT CTNNQCCSQY GYCGFGAEYC GAGCQGGPCR ADIKCGSQAG
130     140     150     160     170     180
GKLCPNLCC SQWGFCLGS EFCGGGCQSG ACSTDKPCGK DAGGRVCTNN YCCSKWGS CG
190     200     210
IGPGYCGAGC QSGGCDGVFA EAITANSTLL QE
```

Dominio A; posición aminoácidos 27 – 68.

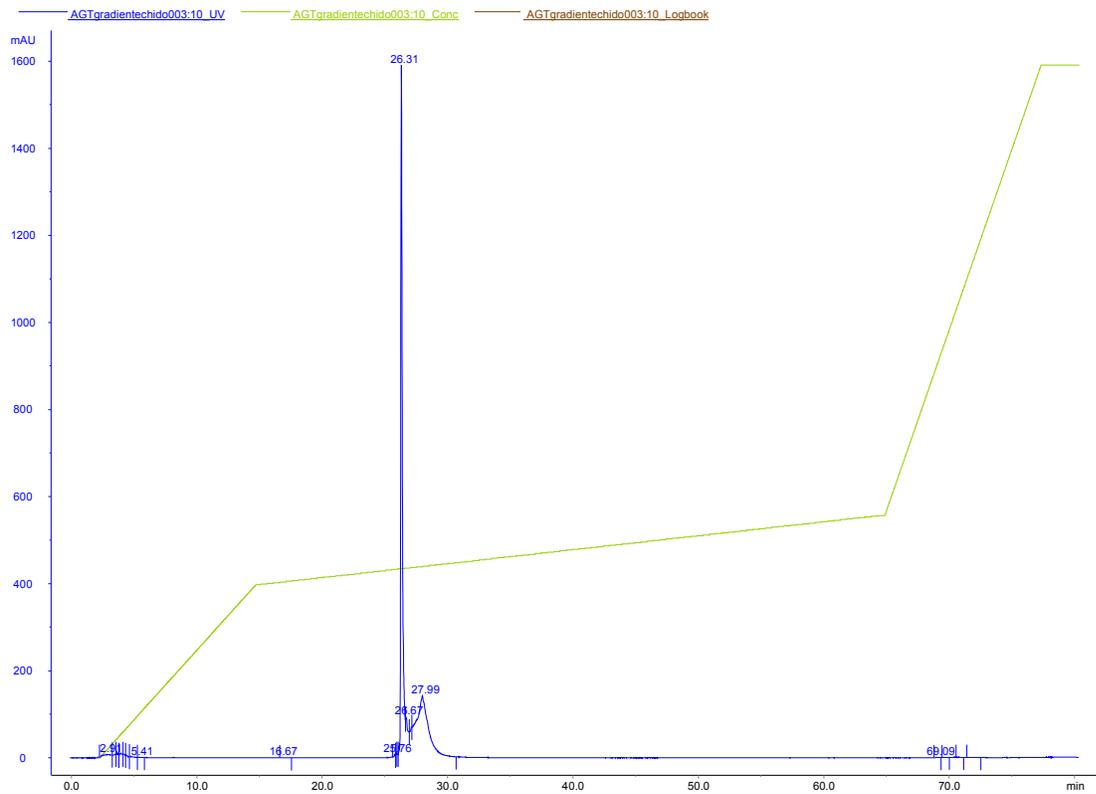
Dominio B; posición aminoácidos 69 – 111.

Dominio C; posición aminoácidos 112 – 154.

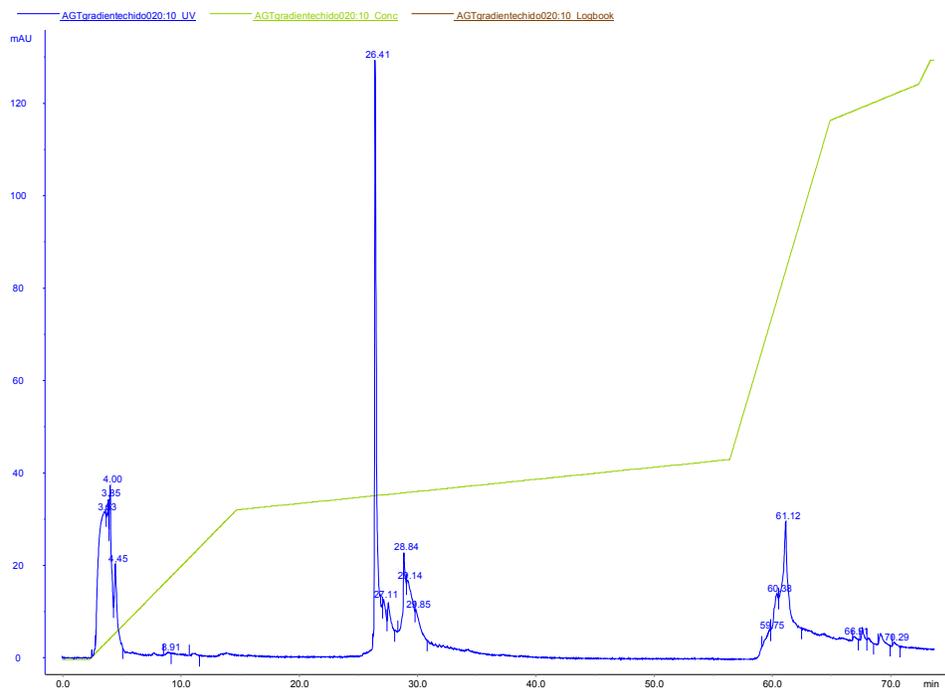
Dominio D; posición aminoácidos 155 – 197.

10.3 Cromatogramas de purificación de dominios mediante fase reversa

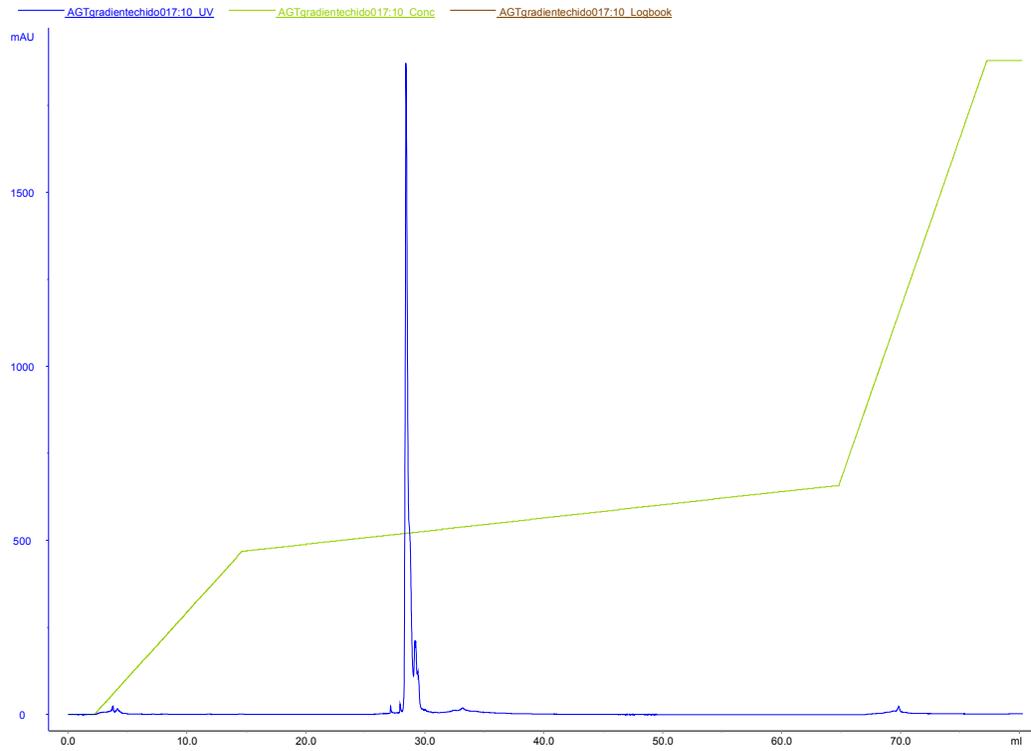
Dominio A



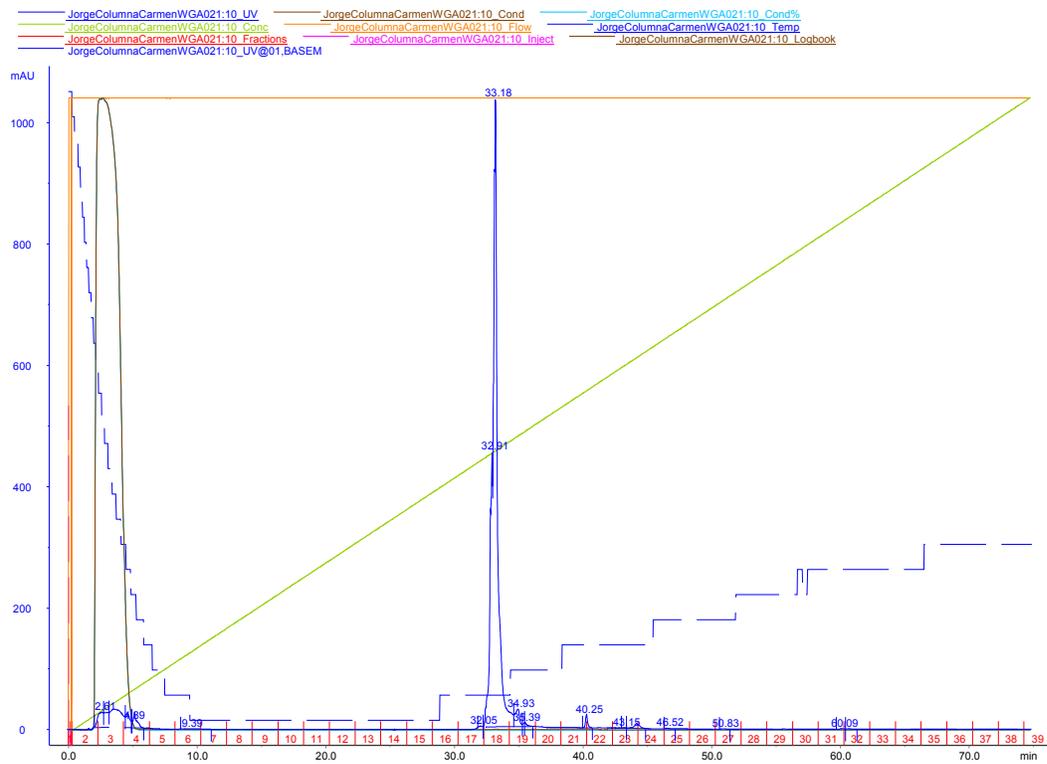
Dominio B



Dominio C

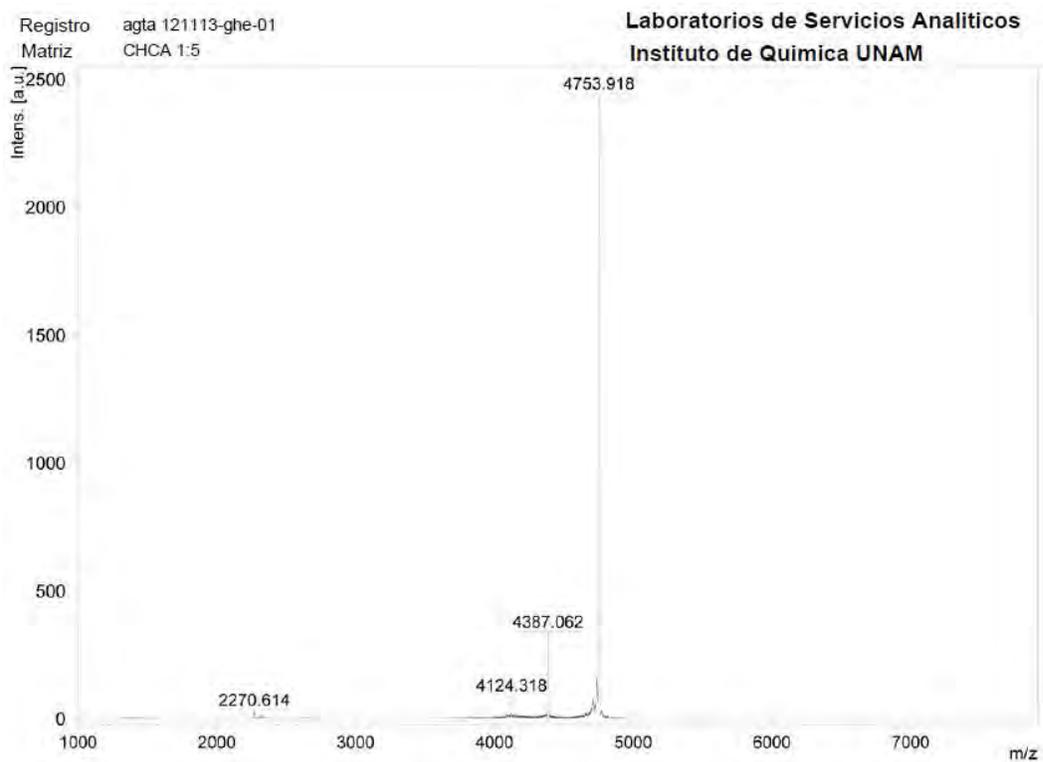


Dominio D

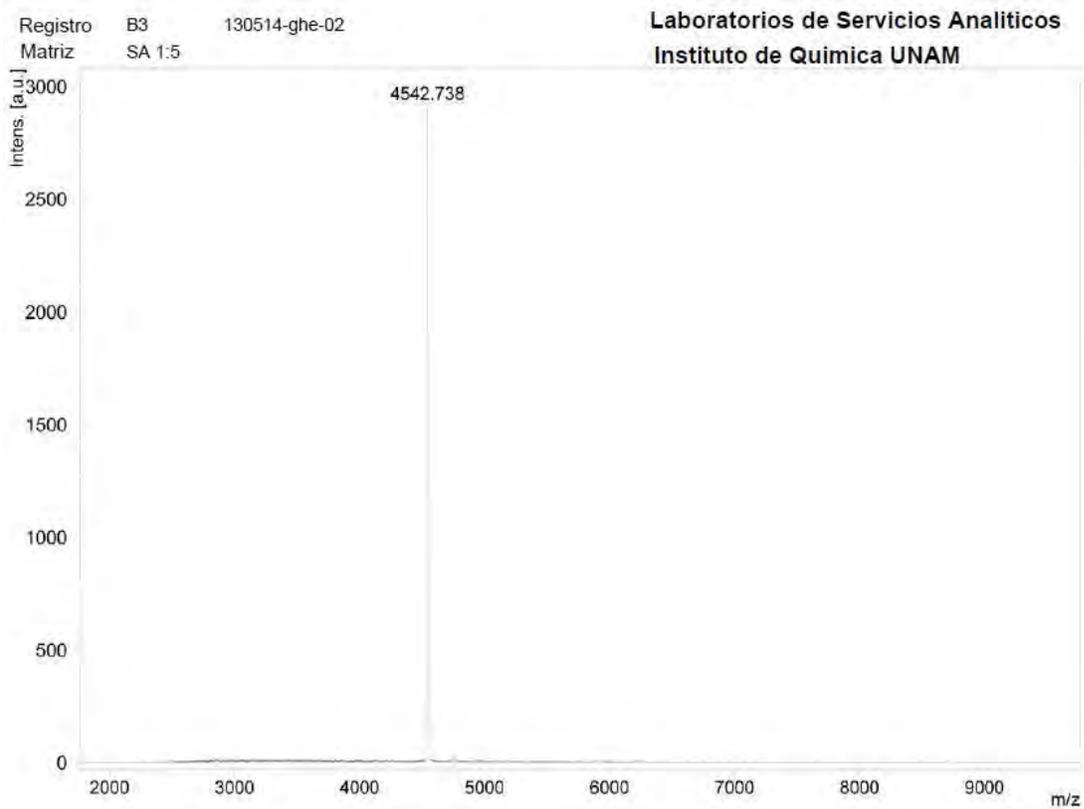


10.4 Espectros de MALDI-TOF de dominios

Dominio A



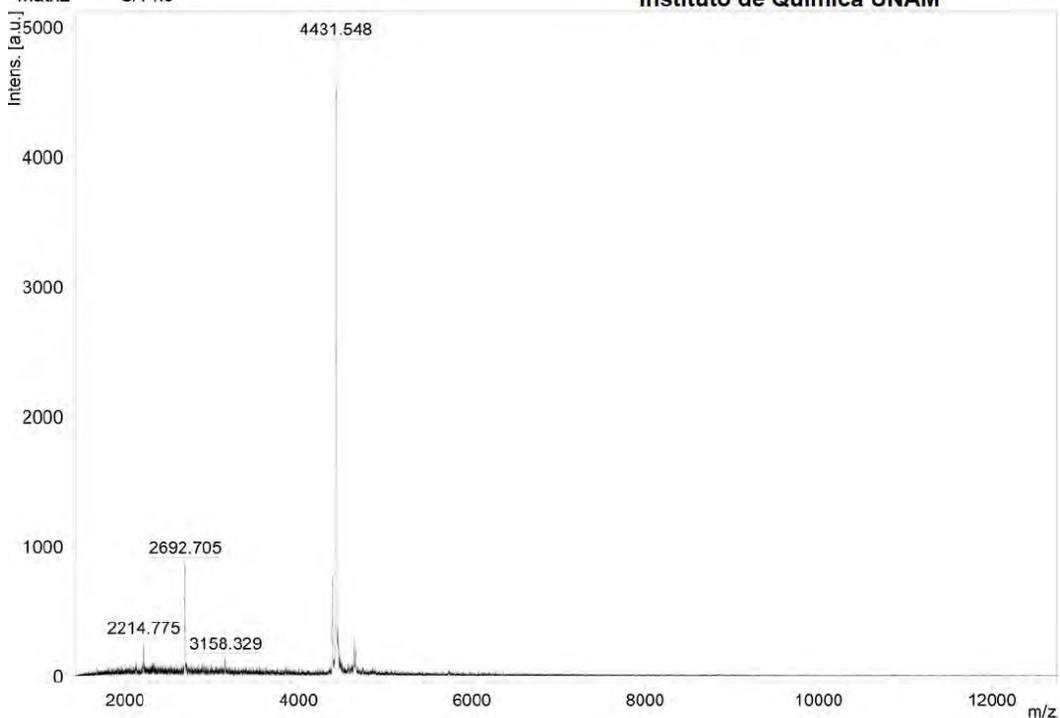
Dominio B



Dominio C

Registro C4 130429-ghe-04
Matriz SA 1:5

Laboratorios de Servicios Analíticos
Instituto de Química UNAM



Dominio D

Registro D6 130425-ghe-06
Matriz SA 1:5

Laboratorios de Servicios Analíticos
Instituto de Química UNAM

