



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**CARACTERIZACIÓN ESPECTROSCÓPICA Y
FUNCIONAL DE LOS BIDOMINIOS DE LA
AGLUTININA DE GERMEN DE TRIGO**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

ANA CAROLINA ANZURES MENDOZA



**DIRECTOR DE TESIS:
DR. ENRIQUE GARCÍA HERNÁNDEZ
2017**

CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX



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 los datos del jurado

1. Datos del alumno

Anzures
Mendoza
Ana Carolina
55 65 40 81 12
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
409061475

2. Datos del tutor

Dr.
Enrique
García
Hernández

3. Datos del sinodal 1

Dr.
Roberto Alejandro
Arreguín
Espinosa de los Monteros

4. Datos del sinodal 2

Dra.
Patricia
Cano
Sánchez

5. Datos del sinodal 3

Dr.
José Eduardo
Rodríguez
Bustamante

6. Datos del sinodal 4

M. en C.
Eduardo
Leyva
Hernández

7. Datos del trabajo escrito

Caracterización espectroscópica y funcional de los bidominios de la aglutinina de germen de trigo
61 p
2017

Agradecimientos

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

A los miembros de mi comité tutorial, el Dr. Roberto Alejandro Arreguín Espinosa de los Monteros, el Dr. Dr. José Eduardo Rodríguez Bustamante y la Dra. Patricia Cano Sánchez por todos sus consejos y su apoyo con las correcciones de este trabajo.

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

A Eduardo Leyva, por siempre estar ahí para brindarme su apoyo, pero sobre todo por su infinita paciencia. Muchas gracias por todo.

A Itzel, por ser mi compañera de laboratorio y mi amiga durante casi una década desde el inicio de la carrera hasta el presente. Espero que sigamos siendo amigas durante muchos años más.

A mi mamá y a mi hermana por motivarme, apoyarme y soportarme todos estos años en mis altas y bajas. Especialmente en las bajas.

Índice

Hoja de los datos del jurado	1
Índice de figuras	5
Índice de tablas.....	7
Abreviaturas y acrónimos.....	8
Resumen	11
1. Introducción.....	13
1.1 Las lectinas	13
1.2 Antecedentes históricos	14
1.3 Clasificación de las lectinas.....	18
1.3.1 Lectinas de plantas.....	20
1.4 Aplicaciones de las lectinas.....	25
1.5 Aglutinina de germen de trigo	26
1.5.1 Aplicaciones de la AGT	30
2. Antecedentes directos.....	31
3. Planteamiento del problema.....	35
4. Objetivos.....	36
4.1 Objetivo general.....	36
4.2 Objetivos particulares.....	36
5. Hipótesis	37
6. Metodología	38
6.1 Clonación y expresión de los bidominos recombinantes de la AGT1.....	38
6.2 Escalamiento de la producción de bidominios	39
6.3 Purificación de los bidominios recombinantes.....	40
6.4 Corte enzimático con enteroquinasa.....	40
6.5 Espectrometría de masas.....	40
6.6 Cuantificación de los bidominios recombinantes.....	41

6.7 Dicroísmo circular	41
6.8	42
Calorimetría de titulación isotérmica	42
7. Resultados y discusión	45
7.1 Clonación y expresión de los bidominios.....	45
7.2 Purificación de los bidominios	46
7.3 Espectrometría de masas.....	48
7.4 Dicroísmo circular	50
7.5 ITC	52
8. Conclusiones	56
9. Bibliografía	57

Índice de figuras

Figura 1. Estructura cristalográfica de la RCA, aglutinina de ricino, la cual fue descubierta en 1888. Código pdb, 2AAI.	15
Figura 2. Representación esquemática de la estructura 3D de la Concanavalina A. Código pdb, 1TEI.	15
Figura 3. Representaciones tridimensionales de las estructuras cristalográficas de las lectinas de varios organismos.	17
Figura 4. Lectina de tipo jacalina, proveniente de la planta <i>Artocarpus integrifolia</i> . Se observa el arreglo tetramérico de láminas β . Código pdb, 1UGW.	21
Figura 5. Estructura cristalográfica de la aglutinina de <i>Amaranthus caudatus</i> unida a un antígeno-T (azul). Se observan en rojo las láminas β características que forman cada dominio. Código pdb, 1JLY.	21
Figura 6. Estructura cristalográfica de la lectina de <i>Galanthus nivalis</i> . Se pueden observar las láminas β antiparalelas características del dominio de este grupo de lectinas. Código pdb, 1MSA.	22
Figura 7. Estructura cristalográfica de la Cianovirina-N homóloga, encontrada en el helecho <i>Ceratopteris richardii</i> . Código pdb, 2JZJ.	23
Figura 8. Estructura cristalográfica de la lectina de <i>Erythrina corallodendron</i> en complejo con D-Galactosa (en color azul). Código pdb, 1AXZ.	23
Figura 9. Estructura cristalográfica de Hev b 6.02 (Heveína). Código pdb, 1Q9B.....	24
Figura 10. Estructura cristalográfica del homodímero de la AGT. Cada subunidad es mostrada en diferente color. Código PDB, 2UVO.	26
Figura 11. Estructura cristalográfica de la AGT 1 en donde se muestra su asociación de tipo cabeza-cola, cada dominio pertenece a una subunidad diferente. Código PDB, 2UVO.....	28
Figura 12. Se muestran los 8 sitios de unión de la AGT1. El ligando está representando como esferas verdes. En el primer panel se pueden observar los sitios B1/C2, C1/B2, B2/C1 y C2/B1. En el segundo panel la molécula ha sido rotada 180° en el eje de las x, por lo que ahora se pueden observar los sitios de unión A1/D2 y D1/A2; además, se observan los sitios de unión A1 y A2, los cuales están conformados únicamente por un solo dominio..	29
Figura 13. Perfiles calorimétricos. A) Se observa un pico independiente de la concentración, a un pH 2. B) Análisis de desconvolución de la traza calorimétrica a pH 2. Modificado de Portillo-Téllez et al., 2011.....	31
Figura 14. Perfiles calorimétricos de la perturbación térmica de la AGT en función del pH. Modificada de Portillo-Téllez et al., 2011.....	32
Figura 15. Espectro de dicroísmo circular obtenidos durante un ciclo de calentamiento y enfriamiento para los dominios independientes de la AGT1. Tomado de Medrano-Cerano, 2014.	33

Figura 16. Trazos de barrido de temperature seguidos por DC para los dominios A, B y C. Tomado de Medrano-Cerano, 2014.....	34
Figura 17. A) El vector de expresión pET-32a(+) todavía sin el gen de la AGT1. B) Construcción esperada para la AGT1 en el pET-32a(+). Se muestra la estructura de la proteína de fusión	38
Figura 18. Diagrama de un típico experimento de ITC. En el panel izquierdo, los picos observados son el resultado de un cambio de calor, mientras que el área debajo de cada uno es el calor (μcal) asociado con la inyección del ligando. El recuadro en la parte inferior izquierda muestra la configuración de una celda de reacción (Tomada de Leavitt & Freire, 2001). En el panel derecho se muestra una curva de unión (Modificada de Bronowska, 2011).	43
Figura 19. Simulaciones isotérmicas para el parámetro C o de Wiseman.....	44
Figura 20. Ensayo de expresión de la proteína de fusión Trx-AGT11.AB, con 0.5mM de IPTG a 30°C de 0 hasta 16 horas. M es el marcador de peso molecular.	45
Figura 21. Resultados de la purificación de proteínas para el bidominio AB por columna de níquel Ni-NTA Superflow Cartridges (QIAGEN), seguidos en gel SDS-PAGE 12%. El resultado de la segunda columna está señalado con la flecha roja.	46
Figura 22. Resultados de la purificación de proteínas para el bidominio CD por columna de níquel Ni-NTA Superflow Cartridges (QIAGEN), seguidos en gel SDS-PAGE 12%. El resultado de la segunda columna está señalado con la flecha roja.	47
Figura 23. MALDI-TOF de la muestra obtenida en la purificación del bidominio recombinante AB. Se observan dos picos significativos a 3648.096 Da y a 9005.862 Da. .	48
Figura 24. MALDI-TOF de la muestra obtenida en la purificación del bidominio recombinante CD. Se observan dos picos significativos a 4297.739 Da y a 8591.954 Da. .	49
Figura 25. Espectros de dicroísmo circular obtenidos durante un ciclo de calentamiento y enfriamiento para el bidominio 1) AB y 2) CD.....	50
Figura 26. Curva de perturbación térmica del bidominio AB a pH 4.7, seguida por DC a 225 nm.....	51
Figura 27. Curvas obtenidas para la unión del bidominio CD de la AGT con su ligando N-Acetilquitotriosa. A) Ajustada a dos sitios y B) Ajustada a un sitio.	52
Figura 28. Termograma del bidominio CD de la AGT con su ligando N-Acetilquitotriosa...	53

Índice de tablas

Tabla 1. Clasificación moderna de las lectinas utilizando su estructura tridimensional obtenida de la base de datos http://glyco3d.cermav.cnrs.fr	19
Tabla 2. Posiciones en las que existen diferencias entre las secuencias de las tres isoformas de la aglutinina de germen de trigo.	27
Tabla 3. Pesos moleculares y coeficientes de extinción de los cuatro bidominios de la AGT1. No se toma en cuenta la formación de enlaces disulfuro.	41
Tabla 4. Comparación del peso molecular teórico y experimental (por MALDI-TOF) de los dos bidominios recombinantes de la AGT1, sin tomar en cuenta la formación de puentes disulfuro.....	49
Tabla 5. Parámetros termodinámicos de unión a quitotriosa obtenidos para el bidominio CD mediante calorimetría de titulación isotérmica.	54
Tabla 6. Parámetros termodinámicos reportados para la AGT nativa y recombinante, y para los cuatro dominios independientes (Leyva et al., 2017).	54

Abreviaturas y acrónimos

°C	Grados Celcius
µg	Microgramos
µg/ml	Microgramos por mililitro
µl	Microlitro
µM	Micromolar
ABA	Aglutinina de <i>Agaricus bisporus</i>
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
CRA	Aglutininas relacionadas a la quitinasa
CRD	Carbohydrate Recognition Domain (Dominio de reconocimiento a carbohidratos)
Da	Dalton, unidad equivalente a una doceava parte de un átomo de Carbono
DC	Dicroísmo circular
EEA	Aglutinina de <i>Euonymus europaeus</i>
EUL	Familia de lectinas <i>Euonymus</i>
EK	Enteroquinasa
GNA	Aglutinina de <i>Galanthus nivalis</i>
IPTG	Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido
ITC	Isothermal titration calorimetry (Calorimetría de titulación isotérmica)
Ka	Constante de asociación

LB	Luria Broth
MALDI-TOF	Matrix-Assited Laser Desoption/Ionization – Time of Flight
mg	Miligramo
mg/ml	Miligramo por mililitro
ml	Mililitro
mM	Milimolar
MW	Molecular weight (peso molecular)
NAG	N-acetilglucosamina
NANA	N-acetilneuraminico
nm	Nanómetro
PDB	Protein Data Bank
pH	Potencial de Hidrógeno
PMSF	Phenylmethylsulfonyl fluoride (Fluoruro de fenilmetilsulfonilo)
rpm	Revolución por minuto
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate- polyacrilamide gel electrophoresis
SBA	Aglutinina de soya
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

Se sabe que las membranas celulares contienen glicoconjugados expuestos al solvente extracelular, los cuales son denominados glicocáliz. El glicocáliz le brinda identidad a la célula, por lo que resulta trascendente para la discriminación entre lo propio y lo ajeno; su composición varía dependiendo de los tipos celulares, y de las etapas de diferenciación (Sharon, 2008).

Las lectinas son un grupo de proteínas que no presentan actividad catalítica, y que tienden a formar homooligómeros. Su importancia radica en su capacidad de interactuar, y de reconocer de forma específica, ciertas porciones glicánicas de la membrana celular. (Sharon & Lis, 1998, 2004). Es esta capacidad la que las convierte en un potencial sistema de entrega de fármacos dirigida de manera particular hacia determinadas poblaciones celulares, incluyendo células cancerosas. Por otro lado, se ha demostrado que las lectinas son excelentes acarreadoras de fármacos cuya estructura molecular es muy grande o que presentan una baja lipofiliidad como para poder ser absorbidos eficientemente por el epitelio intestinal.

La aglutinina del germen de trigo (AGT) es una lectina con la capacidad de reconocer residuos de N-acetilglucosamina y ácido siálico; además, posee una notable habilidad de adherirse de forma selectiva, invadir, y realizar tanscitosis de enterocitos. Fue la primera proteína reportada con capacidad para discriminar entre células normales y células malignas (Aub *et al.*, 1963, 1965); actualmente es utilizada en investigaciones bioquímicas y biomédicas, aunque también se ha comenzado a considerar como candidato para la entrega de fármacos por vía oral. La AGT es abundante en el embrión de las semillas de *Triticum vulgare*; esta proteína presenta 3 isoformas (AGT1, AGT2 y AGT3), con una identidad entre ellas del 95-97% (Wright *et al.*, 1984, 1986). La estructura de esta proteína es la de un homodímero con un peso de 34 kDa. Cada subunidad consta de 4 dominios homólogos a la heveína: A, B, C y D, los cuales poseen 4 enlaces disulfuro en posiciones estructuralmente equivalentes, sumando un total de 16 por subunidad.

En los últimos años, nuestro grupo de trabajo se ha enfocado al estudio de la disociación y desplegamiento de la AGT, en función del pH y temperatura, mediante técnicas calorimétricas de alta precisión. Se sabe que la AGT posee un mecanismo de plegamiento y autoasociación complejo, que depende fuertemente de las condiciones de solución (Portillo-Téllez *et al.*, 2011). A valores de pH neutros, o cercanos a la neutralidad, la lectina forma homodímeros débiles no obligados. Este dímero se debilita progresivamente al aumentar la acidez del medio. A pH 2, la proteína se encuentra completamente disociada. Análisis espectroscópicos y calorimétricos sugieren que, bajo estas condiciones, uno de los cuatro dominios tipo heveína de la AGT se encuentra desplegado, por lo que se ha

propuesto que el desplegamiento de este dominio es la principal causa de la monomerización total de la proteína (Portillo-Téllez *et al.*, 2011).

Para resolver las interrogantes que todavía existen sobre los mecanismos de ensamblaje y función de la AGT, el presente proyecto se trazó la meta de la expresión de los bidominios de la AGT1 (AB, BC y CD) de manera recombinante en *Escherichia coli*. Además, se comprobó su funcionalidad por medio de pruebas de unión de azúcares seguidas por calorimetría de titulación isotérmica (ITC) usando el ligando N-N'-N''-triacetilquitotriosa a un pH 4.7 y a 25°C. Nuestros resultados muestran que los bidominios expresados de manera independiente mantienen su estructura y función.

1. Introducción

1.1 Las lectinas

Los carbohidratos son una familia de biomoléculas implicadas en una enorme variedad de procesos biológicos y bioquímicos, especialmente en aquellos que involucran el reconocimiento y función celular. Por ejemplo, actúan como elementos estructurales de la célula; como elementos de protección en las paredes celular de bacterias, plantas y tejidos conjuntivos; lubrican las articulaciones óseas; y participan en el reconocimiento y en el tránsito de proteínas dentro y fuera de la célula. Los carbohidratos forman parte del glicocáliz, una zona periférica que cubre a la célula y la comunica con el exterior, y que es rica en oligosacáridos capaces de unirse a lípidos y proteínas, formando glicolípidos y glicoproteínas. La importancia del estudio de estos procesos y de las proteínas que interactúan en ellos ha aumentado considerablemente durante las últimas décadas (Sharon & Lis, 2004; Hernández Cruz, *et al.*, 2005; De Hoff *et al.*, 2009).

Dentro del gran conjunto de proteínas que interaccionan con carbohidratos específicos se encuentran las lectinas. Las lectinas son proteínas de origen no inmune y no presentan actividad enzimática. Pueden ser encontradas en las células, las membranas y los secretomas de diversos organismos, como lo son las plantas, los animales, los virus, los protozoarios, los hongos y las bacterias. Los dominios que unen a carbohidratos han sido más estudiados en el reino de las plantas (Sharon & Lis, 1998; Sinha *et al.*, 2007; Sharon, 2008; De Hoff *et al.*, 2009). Debido a sus características, son ampliamente utilizadas como herramientas en los estudios de interacción proteína-carbohidrato. La importancia de las lectinas radica en su capacidad de interactuar y reconocer de forma específica ciertas combinaciones glicánicas de la membrana celular, uniéndose a los carbohidratos que forman parte de ésta (Sharon & Lis, 1998, 2004). Estas proteínas también median una amplia variedad de procesos de reconocimiento intracelular y extracelular, incluyendo eventos de señalización y adhesión (Castillo, 2005).

Todas las lectinas están compuestas por una cadena polipeptídica, a la cual pueden estar unidos uno o más carbohidatos. En este caso se les conoce como lectinas glicosiladas; normalmente se observan de 2 a 15 monosacáridos residuales, que pueden estar constituidos principalmente por dos o más azúcares, por ejemplo: D-manosa, D-galactosa, D-glucosa, L-fucosa, N-acetil-D-glucosamina, N-acetil-D-galactosamina, ácido siálico, glucosamina y galactosamina (Roldós, 2011).

Las lectinas tienden a formar homooligómeros, y son capaces de reconocer monosacáridos u oligosacáridos de forma muy específica y unirlos de manera reversible, pero sin ejercer actividad catalítica sobre ellos (Sharon & Lis, 1998, 2004). Estas proteínas desempeñan

varias funciones muy importantes y variadas dentro de las plantas. Algunas lectinas presentan dos o más sitios de unión, lo cual les permite aglutinar células y así actuar como una barrera protectora contra organismo patógenos que pueden dañar a la planta; este tipo de lectinas se conocen comúnmente como aglutininas. También se ha encontrado que las lectinas poseen actividad mitogénica, participan en el almacenamiento de proteínas y en el transporte de carbohidratos (Peumans & Van Damme, 1995; Lis & Sharon, 2004). Se ha reportado que, en diversas especies animales, las lectinas participan en el reconocimiento y la eliminación celular del sistema circulatorio, así como de células envejecidas, tumorales y microorganismos.

Es gracias a esta especificidad que presentan las lectinas por diversos carbohidratos, lo que ha hecho que se conviertan en una herramienta valiosa en la biotecnología (Gómez, 2012).

1.2 Antecedentes históricos

Desde los comienzos del Siglo XIX, existían evidencias de la existencia de proteínas en la naturaleza que eran capaces de aglutinar eritrocitos. A estas proteínas se las llamó hemaglutininas o fitoaglutininas, ya que fueron descubiertas por primera vez en extractos vegetales (Sharon & Lis, 1998, 2004).

Se considera que la ricina fue la primera hemaglutinina descubierta, la cual fue descrita por Peter Hermann Stillmark en 1888. Éste logró aislarla de las semillas de ricino y posteriormente observó la actividad aglutinante que ésta ejercía sobre las células rojas de distintos animales. A esta proteína, que resultó ser altamente tóxica, se le llamó «aglutinina de ricino», o RCA (Figura 1), por sus siglas en inglés (Franz, 1988). Esta observación fue después corroborada y ampliada por Karl Landsteiner, quien descubrió los grupos sanguíneos A, B y O, en el año 1900.

Posteriormente, H. Hellin demostró la presencia de otra hemaglutinina tóxica, la abrina aglutinina, o APA por sus siglas en inglés, la cual aisló de extractos de semillas de regaliz americano (*Abrus precatorius*). Encontró que ésta también provoca la aglutinación de eritrocitos (Franz, 1988). Debido a su gran disponibilidad comercial, el científico Paul Ehrlich comenzó a realizar experimentos inmunológicos tanto con la ricina como con la abrina, utilizando éstas como antígenos. Sus estudios demostraron la especificidad de la respuesta de los anticuerpos.

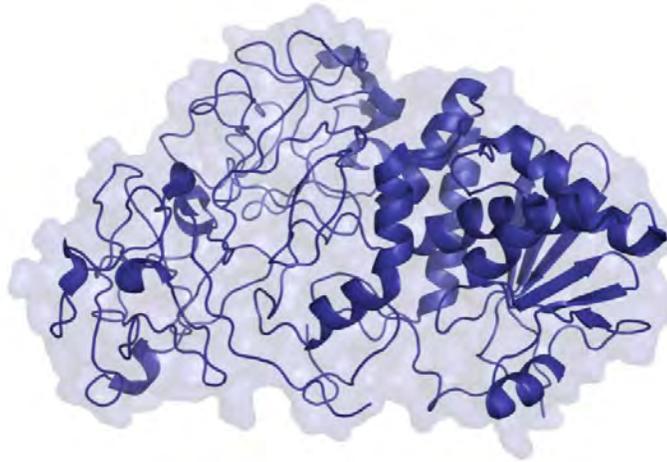


Figura 1. Estructura cristalográfica de la RCA, aglutinina de ricino, la cual fue descubierta en 1888. Código pdb, 2AAI.

Para 1919, James B. Sumner, en la Universidad de Cornell, obtuvo la primera lectina en forma cristalina, la concavalina A (Figura 2), la cual aisló de la semilla de la leguminosa *Canavalia ensiformis*. Fue en 1936 que Sumner y Howel demostraron que la hemaglutinación por concavalina A era inhibida por la sacarosa; esto reveló la especificidad que poseían las lectinas hacia los azúcares (Sumner & Howel, 1936).

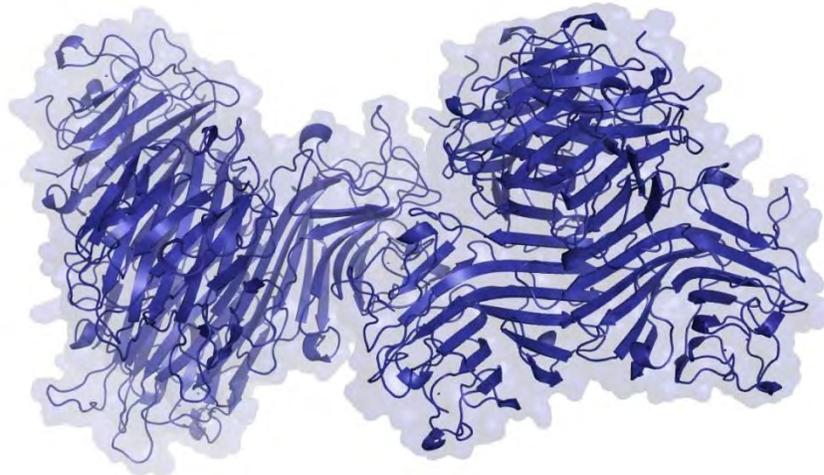


Figura 2. Representación esquemática de la estructura 3D de la Concanavalina A. Código pdb, 1TEI.

Las hemaglutininas específicas al tipo de sangre jugaron un papel importante en las primeras investigaciones sobre la base estructural de la especificidad de los antígenos asociados con los grupos sanguíneos ABO. Para 1950, Walter J. T. Morgan y Winifred M Watkins encontraron que la aglutinación de las células rojas 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 a su vez inhibida por L-fucosa. Con estas observaciones concluyeron que, de los carbohidratos, α - N-acetil-D-galactosamina y α -L-fucosa son los responsables de darle especificidad a los grupos sanguíneos A y O.

En 1954, Boyd y Shapleigh plantearon por primera vez el término «lectina», el cual proviene del latín *legere*, que significa «escoger» o «elegir». Se les dio este nombre a las aglutininas vegetales obtenidas de semillas de plantas debido a la capacidad de reconocer eritrocitos de un grupo sanguíneo específico y aglutinarlo (Boyd, 1954). Para 1972, este término fue generalizado por Sharon y Lis, abarcando a todas las aglutininas específicas de azúcar que eran de origen no inmune, independientemente de donde provinieran o del grupo sanguíneo que reconocieran. Fue en 1995 cuando Peumans and Van Damme extendieron la definición previa de «lectina» para incluir a cualquier dominio capaz de unirse de forma reversible a un carbohidrato específico (De Hoff *et al.*, 2009).

Fue hasta 1960, que el estudio de las lectinas comenzó a cobrar una mayor importancia, estudiándose de manera exhaustiva y empleándose para la investigación de la estructura y el funcionamiento de los carbohidratos; a pesar de lo anterior, muy pocas lectinas habían sido aisladas para 1970 (Sharon & Lis, 2004; Sharon, 2008). Dos importantes descubrimientos realizados en la década de 1960 jugaron un papel decisivo, y llevaron a las lectinas a un plano de alto interés científico y biomédico durante las siguientes décadas.

El primero de éstos fue realizado por Peter C. Nowell, justo en 1960, quien encontró que la lectina de frijol rojo (PHA, por sus siglas en inglés) 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, cambiando el paradigma que por esas fechas era aceptado, de que los linfocitos son células incapaces de dividirse o diferenciarse. El segundo descubrimiento importante fue hecho por José C. Aub y colaboradores. Ellos encontraron que la aglutinina del germen de trigo, o AGT, tiene la capacidad para aglutinar preferentemente células malignas (Aub *et al.*, 1963, 1965). Este último descubrimiento fue seguido por los informes de Max M. Burger, Leo Sachs y Michael Inbar, quienes encontraron que la concavalina A es también capaz de diferenciar entre células malignas y células sanas. Estudios posteriores demostraron que la aglutinina de soya (SBA, por sus siglas en inglés) también poseía esta capacidad.

A principios de 1970, ya se conocía la presencia de hemaglutininas en distintos organismos, principalmente plantas, pero no todas habían logrado ser purificadas. Fue en esta década cuando se intensificaron los estudios de las propiedades moleculares de cada lectina de forma individual, así como su estructura tridimensional (Figura 3). La velocidad con la que se aislaban las lectinas para su estudio, se incrementó gracias a la introducción del método de purificación por cromatografía de afinidad (Sharon & Lis, 1998, 2004). Para finales de esta década, apenas se conocían las secuencias completas de alrededor de seis lectinas, todas ellas provenientes de plantas. La secuencia completa de la concavalina A fue una de las primeras en ser establecida (Edelman *et al.*, 1972). Actualmente se han descrito poco más de 500 lectinas tan solo en el reino de las plantas, siendo las lectinas de leguminosas las más estudiadas (Sharon & Lis, 2004).

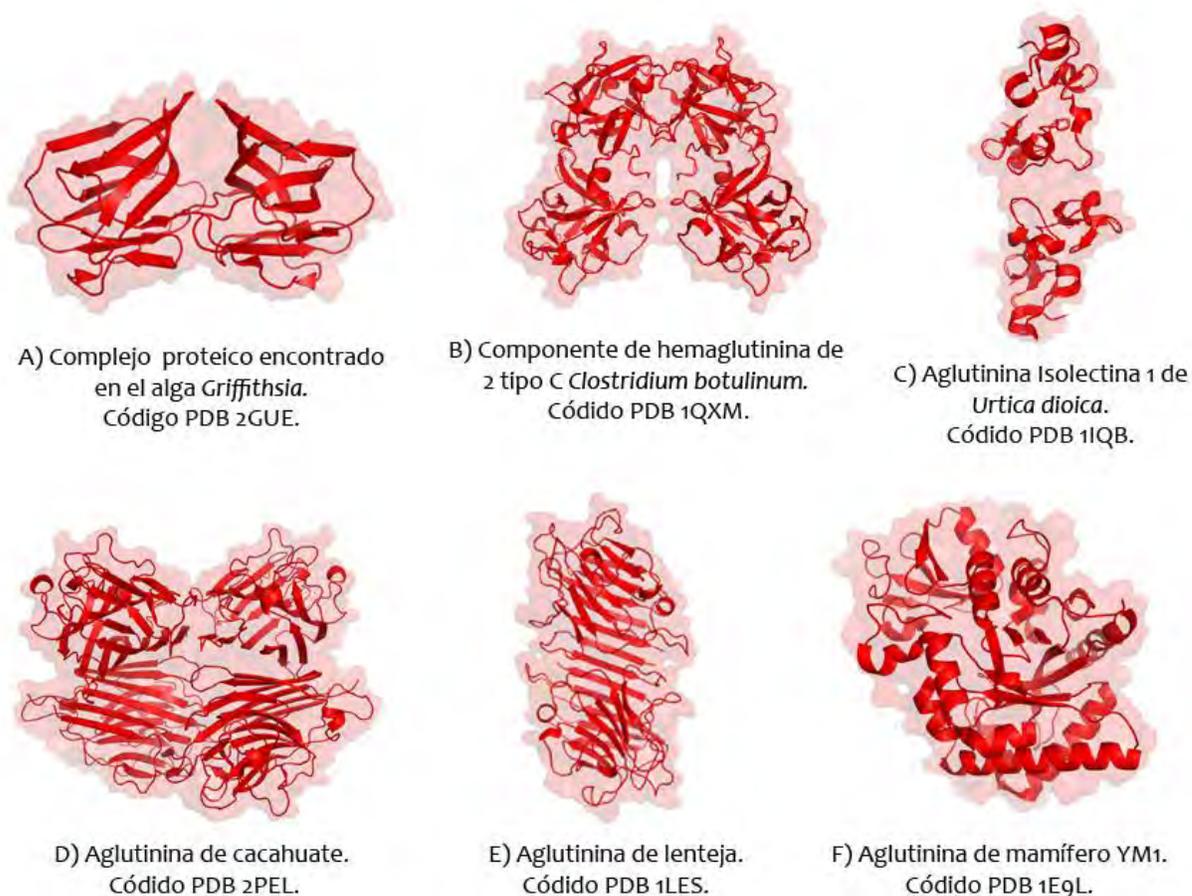


Figura 3. Representaciones tridimensionales de las estructuras cristalográficas de las lectinas de varios organismos.

Para 1980, ya se había obtenido considerable información sobre los grupos que conformaban las lectinas y los carbohidratos que reconocen, además del tipo de interacciones observables. Basándose en las secuencias obtenidas para algunas lectinas de animales, en 1988, Kurt Drickamer propuso que la unión a carbohidratos de estas proteínas se encontraba en un segmento polipeptídico específico, al cual nombró dominio de reconocimiento a carbohidratos (CRD, por sus siglas en inglés) (Sharon & Lis, 2004). En ese mismo año, Woodel y Naisbett propusieron la lectina de tomate (TL) para la administración de fármacos a través del intestino delgado. Esta lectina en particular fue escogida por su resistencia a la degradación intestinal, su capacidad de unión a la mucosa intestinal, su simple purificación, y el de que no aparentaba toxicidad cuando se realizaron los experimentos en ratas de laboratorio (Bies *et al.*, 2004).

1.3 Clasificación de las lectinas

Una de las primeras clasificaciones que se les asignó fue por ser específicas a determinado carbohidrato (Sharon & Lis, 1998), clasificándolas como lectinas unidoras a residuos de:

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

Debido a la complejidad de éstas, la clasificación está constantemente siendo actualizada, por lo que actualmente no existe un consenso en una sola clasificación universal. Por medio de estudios recientes, se ha encontrado que las afinidades a carbohidratos previamente reportadas no son específicas (De Hoff *et al.*, 2009) por lo que los métodos tradicionales de clasificación han comenzado a ser remplazados por sistemas basados en la homología entre las secuencias de los dominios que reconoce los carbohidratos.

Tabla 1. Clasificación moderna de las lectinas utilizando su estructura tridimensional obtenida de la base de datos <http://glyco3d.cermav.cnrs.fr>

Lectinas de algas	Lectinas de hongos y levaduras	Lectinas de bacterias	Lectinas de Animales	Lectinas de virus	Lectinas de plantas
β -prisma	6 hojas β -hélice	1-Ca-b	5 hojas β -hélice	Bacteriófago RBP	β -prisma de plantas
	7 hojas β -hélice	2-Ca-b	Tipo C	Proteína Tailspike de bacteriófago	β -trébol
	Actinoporina	Toxina de ribosilación de ADP	Similares a Tipo C	Proteína de la cubierta	Monocotiledóneas
	Dominio β -trébol	β -hélice enrollada	Calnexina-calreticulina	Proteína spike Coronavirus	Homóloga a Cianovirina-N
	Cianovirina-N	β -trébol	De unión a quitina	Perilla de fibra	Leguminosas
	Galectina	Neurotoxina bacteriana	Fibrinógeno	Hemaglutinina	
	Ig	Cianobacterias	Fuculectina	Proteína de la cápside Norovirus	Dominio tipo heveína
	Tipo-L	Cianobacterias scytovirin	Galectina	Proteína de la cápside Polyomavirus	
	Adhesina de levadura	Citolisina	Tipo H	Rotavirus VP4	
		Aglutinina oscilatoria	Tipo I		
		Pili adhesina	De unión a L-ramnosa		
		Toxina estafilocócica	Tipo L (ERGIC, VIP)		
		TNFa	Malectina		
		Toxina con dominio repetitivo	Micronemal		
			Tipo P		
			Pentraxina		
			Tipo R		
			Toxina de araña		
			TIM		

1.3.1 Lectinas de plantas

Se ha encontrado que las plantas contienen lectinas expresadas tanto en altas como en bajas cantidades, y cada una cumple con diferentes funciones.

La mayor parte de las lectinas se han encontrado principalmente en las semillas y en los tejidos de almacenamiento, y se cree que participan en roles de defensa y de almacenamiento de otras proteínas; el segundo tipo de lectinas se encuentra en el núcleo y el citoplasma de las células vegetales, siendo expresadas en respuesta a condiciones de estrés e interactuando con los carbohidratos encontrados dentro de las células vegetales (Van Holle & Van Damme, 2016).

El componente principal de la mayoría de las lectinas de plantas son las láminas β . La orientación de las láminas β presentes en las subunidades de las lectinas es lo que contribuye a la orientación de los residuos en el sitio de unión para que el reconocimiento sea específico (Sinha *et al.*, 2007). Además, muchas lectinas vegetales tienen la capacidad de actuar como proteínas de defensa y, debido a su naturaleza oligomérica, son también capaces de unir patógenos simultáneamente, lo cual provoca la precipitación y consecuente inactivación de los microorganismos intrusos.

Las lectinas de plantas forman un diverso grupo de proteínas con diferentes especificidades hacia carbohidratos. Anteriormente, las lectinas de plantas eran clasificadas considerando sus propiedades de unión a carbohidratos o sus propiedades estructurales (Lis & Sharon, 1998; Peumans & Van Damme, 1995). La clasificación moderna está basada en los dominios de reconocimiento de carbohidratos, la similitud entre secuencias y su historia evolutiva; mediante este sistema las lectinas de plantas estaban subdivididas en siete familias (De Hoff *et al.*, 2009). La nueva clasificación abarca casi todas las lectinas de plantas que han sido bien caracterizadas hasta el presente (Van Damme *et al.*, 2008; Jiang *et al.*, 2010).

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). Se trata de lectinas tetraméricas glicosiladas, donde cada subunidad contiene una cadena pesada (α) y una cadena ligera (β); están constituidas por tres láminas β antiparalelas arregladas de manera de un prisma triangular como se muestra en la Figura 4. (Sinha *et al.*, 2007).

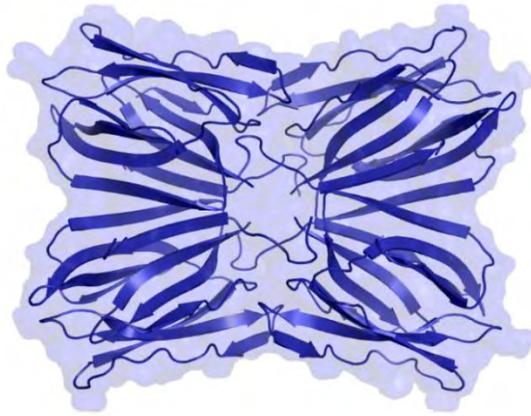


Figura 4. Lectina de tipo jacalina, proveniente de la planta *Artocarpus integrifolia*. Se observa el arreglo tetramérico de láminas β . Código pdb, 1UGW.

β -trébol

El motivo β -trébol es uno de los más comunes que existe. Cada una de estas proteínas se encuentra formada por dos monómeros a su vez constituidos por dos dominios unidos por una pequeña hélice (Figura 5). Cada dominio consiste en láminas β conformadas por cuatro hebras antiparalelas. Estos subdominios son estructuralmente similares en secuencia, y juntos forman una estructura globular con la simetría interna repetida tres veces (Loris, 2002).

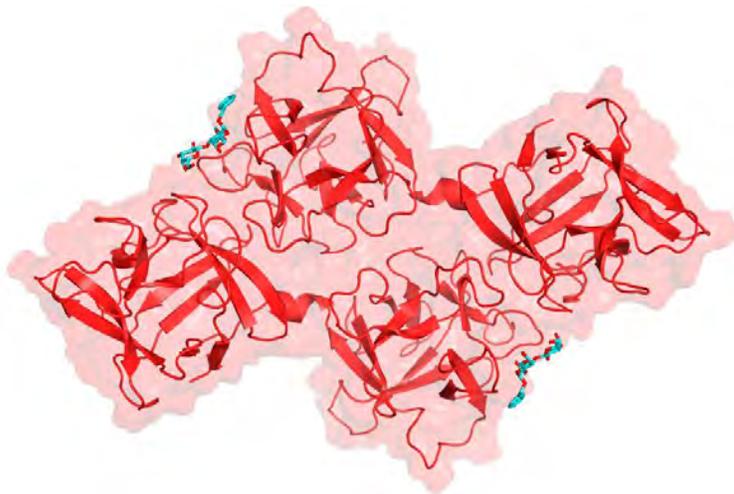


Figura 5. Estructura cristalográfica de la aglutinina de *Amaranthus caudatus* unida a un antígeno-T (azul). Se observan en rojo las láminas β características que forman cada dominio. Código pdb, 1JLY.

Monocotiledóneas específicas a Manosa

Estas lectinas poseen una secuencia de aminoácidos altamente conservada. Cada monómero tiene un peso molecular de 12kDa, y presentan una secuencia de 36 aminoácidos repetidos tres veces. Su sitio de reconocimiento a carbohidratos está constituido por cuatro láminas β antiparalelas unidas entre sí por giros; tienden a asociarse de manera que forman una corana aplanada (Figura 6) (Loris, 2002).

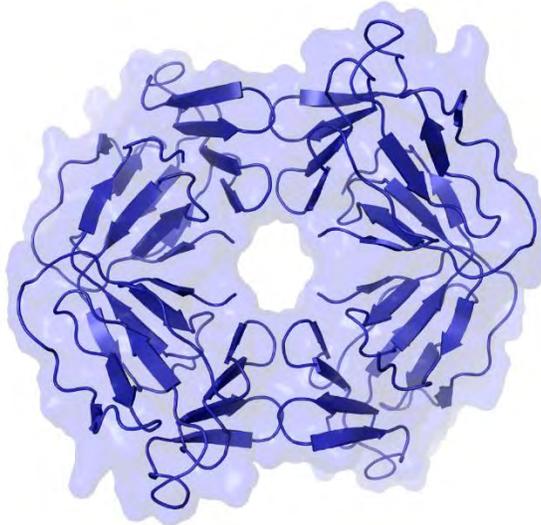


Figura 6. Estructura cristalográfica de la lectina de *Galanthus nivalis*. Se pueden observar las láminas β antiparalelas características del dominio de este grupo de lectinas. Código pdb, 1MSA.

Homólogos a la Cianovirina-N

Esta familia de lectinas es homóloga a la cianovirina-N, presente en los virus. Se trata de lectinas. La cianovirina-N presenta plegamiento complejo compuesto de una repetición en tándem de dos motivos estructurales homólogos formados por tres láminas- β y horquillas- β (Figura 7). Su homólogo en plantas se ha encontrado hasta ahora en una especie de helechos, el *Ceratopteris richardii* (Koharudin, 2008).

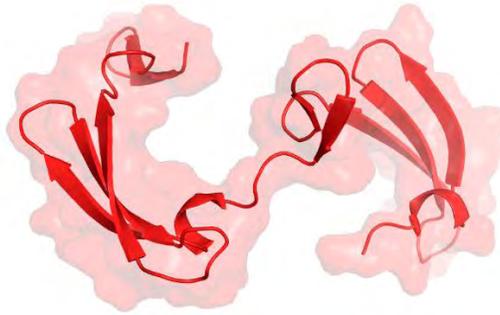


Figura 7. Estructura cristalográfica de la Cianovirina-N homóloga, encontrada en el helecho *Ceratopteris richardii*. Código pdb, 2JZJ.

Leguminosas

Este grupo es el más estudiado de todos. Consta de dos o cuatro subunidades idénticas, que pesan de 25 a 30kDa, cada una contiene un sitio de unión para iones metálicos (Ca^{+2} , Mn^{+2} , Mg^{+2}). Una subunidad de estas proteínas contiene aproximadamente 250 aminoácidos, y está constituida por doce láminas β antiparalelas conectadas entre sí mediante bucles (Figura 8), lo cual genera una estructura aplanada con forma de domo; cuatro bucles que se localizan en la parte superior del monómero son los que forman el sitio de reconocimiento a carbohidratos (Loris, 2002).



Figura 8. Estructura cristalográfica de la lectina de *Erythrina corallodendron* en complejo con D-Galactosa (en color azul). Código pdb, 1AXZ.

Dominio tipo heveína

También conocida como «Dominio de unión a quitina», su nombre proviene de la planta *Hevea brasiliensis* (árbol de látex), y fue descrita por primera vez en la estructura purificada de la aglutinina de germen de trigo (AGT).

Se trata de un motivo estructural común, el cual ha sido encontrado no solamente en las plantas, sino también en los animales y los hongos. Se caracteriza por su tamaño reducido de tan solo 36 a 45 residuos; por ser rico en cisteínas; por poseer residuos de glicina en un 16-20% y por su capacidad de unión a la quitina (Figura 9). Los miembros de este dominio presentan, por lo general, una alta abundancia de enlaces disulfuros (Loris, 2002; Jiménez-Barbero *et al.*, 2006).

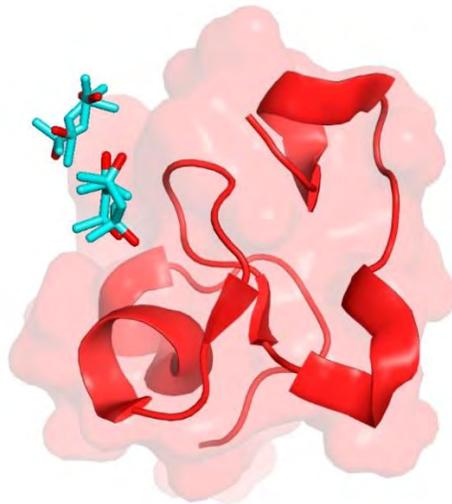


Figura 9. Estructura cristalográfica de Hev b 6.02 (Heveína). Código pdb, 1Q9B

1.4 Aplicaciones de las lectinas

Si bien el rol biológico de las lectinas aún no ha sido completamente elucidado, en las últimas décadas, las lectinas han encontrado un gran número de aplicaciones en campos como lo son la histoquímica, la genética, la inmunología, y la biomedicina (Kumar *et al.*, 2012).

Tanto las lectinas animales como las vegetales presentan actividad mitogénica, es decir, que favorece la mitosis, que son capaces de actuar como agentes inmunosupresores *in vivo*. Uno de los usos más comunes de las lectinas radica en utilizar la especificidad de los dominios unidores de carbohidratos para identificar los serotipos sanguíneos y células madres cultivadas *in vitro* (Sharon & Lis, 2004).

Dentro del campo de la medicina y la inmunología, las lectinas son utilizadas tanto para el diagnóstico médico como para la terapia; algunas de estas aplicaciones incluyen (Hernández *et al.*, 1999):

1. Lectinas como agentes policlonales.
2. Lectinas como marcadores tumorales.
3. Lectinas utilizadas como reactivos capaces de identificar las células del sistema inmune.
4. Lectinas que son utilizadas como sistemas de entrega de fármacos
5. Las lectinas endógenas, las cuales actúan como mediadores de la comunicación celular con el sistema inmune.
6. Lectinas para el mapeo de vías neuronales.

Algunas otras aplicaciones de las lectinas incluyen: el mapeo de vías neuronales, los estudios de la biosíntesis de glicoproteínas, la purga de la médula ósea para trasplantes, y en la investigación de los carbohidratos en las células (Sharon, 2008).

A partir de investigaciones de muchos complejos lectina-carbohidrato, se ha demostrado que los aminoácidos que preferentemente forman enlaces con los carbohidratos son Asp, Asn, Glu, Arg, His, Trp, Lys, Tyr, Gln, Ser y Thr (Lütteke & Von der Lieth, 2009). Las interacciones proteína-carbohidrato (incluyendo interacciones lectina-lectina de tipo receptor) ocurren al mismo tiempo que muchos procesos bioquímicos, debido a esto, son consideradas como una característica importante de la respuesta inmune.

Una manera de estudiar el complejo lectina-carbohidrato es empleando cristalografía de rayos-X, con la cual es posible identificar los grupos funcionales de las proteínas que interactúan con los carbohidratos y qué tipo de enlace se forma.

1.5 Aglutinina de germen de trigo

Se ha visto que después de que una célula sufre una transformación maligna, como parte del proceso de diferenciación, el glicocáliz cambia su composición. En la década de los sesenta, Aub *et al* describieron a la Aglutinina de germen de trigo (AGT) por primera vez, después de observar que el glicocáliz de las células neoplásicas o tumorales era diferente al de las células normales. Al comparar las respuestas entre ambas células utilizando lipasa de germen de trigo, se dieron cuenta de que esta tendía a aglutinar las células tumorales (Aub *et al.*, 1963, 1965). Debido a estos descubrimientos, la AGT es considerada como una lectina emblemática, siendo la primera lectina con la capacidad de discriminar entre células normales y células tumorales en ser descrita; posteriores estudios realizados con la AGT demostraron que las células malignas poseen una glicosilación «aberrante», que les diferencia de las células normales. Desde entonces, la AGT es utilizada en numerosas investigaciones bioquímicas y biomédicas (Wright, 1974; Nagata & Burger, 1974; Privat, 1974).

La AGT es única en comparación con lectinas de otras familias, debido a que posee múltiples sitios de unión a carbohidratos en una sola subunidad, esto gracias a la estructura de sus cuatro dominos que son de tipo heveína. Esta lectina es específica para el ácido N-acetilneuramínico (NANA) y N-acetilglucosamina (NAG), pertenece a una familia conservada de lectinas unidoras a quitina, siendo también una de las lectinas más ampliamente estudiadas y mejor caracterizadas (Lis & Sharon, 1981; Raikhel & Wilkins, 1984; Goldstein & Poretz, 1986; Wright, 1987).

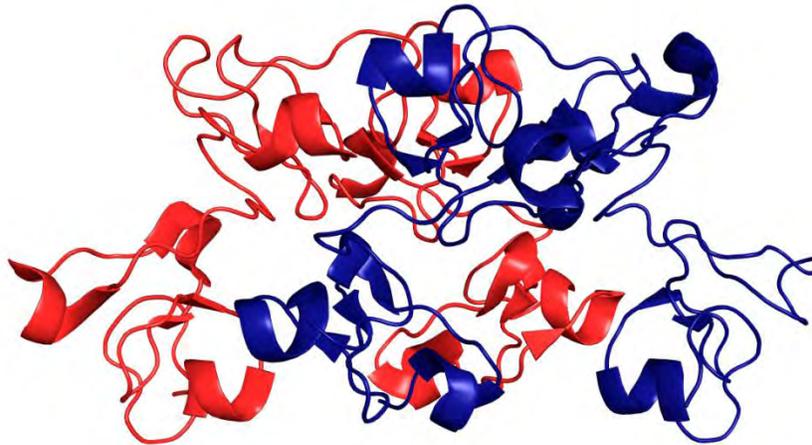


Figura 10. Estructura cristalográfica del homodímero de la AGT. Cada subunidad es mostrada en diferente color. Código PDB, 2UVO.

La AGT es abundante en las semillas de *Triticum vulgare*, presentando 3 isoformas (AGT1, AGT2 y AGT3), con una identidad entre ellas del 95-97% (Wright *et al.*, 1984, 1986). Las diferencias se localizan en las posiciones 9, 53, 56, 59, 66, 93, 109, 119, 123 y 171, de acuerdo a lo que se detalla en la Tabla 2.

Tabla 2. Posiciones en las que existen diferencias entre las secuencias de las tres isoformas de la aglutinina de germen de trigo.

Isoforma 1 Residuo	Isoforma 2 Residuo	Isoforma 3 Residuo
N9	N9	G9
A53	A53	K53
T56	P56	P56
Q59	H59	H59
Y66	H66	H66
A93	S93	A93
F109	F109	Y109
G119	G119	E119
S123	S123	N123
G171	A171	G171

Esta proteína forma un homodímero estable de 34k Da, además, se ha observado que forma monómeros a valores de pH ácidos (Nagata & Burger, 1974; Chavelas *et al.*, 2004); cada subunidad está compuesta por 4 dominios de tipo heveína denominados A, B, C y D, conformados de 42 a 43 aminoácidos. Cada dominio posee cuatro enlaces disulfuro en posiciones estructuralmente equivalentes, sumando un total de 16 puentes por subunidad. Estos puentes son los que contribuyen a la elevada resistencia a la desnaturalización de esta proteína, ya sea por agentes caotrópicos, pH o temperaturas extremas (Rodríguez-Romero *et al.*, 1989). Cada uno de los 4 dominios que constituye el monómero tiene un sitio de unión a carbohidrato; cada sitio de reconocimiento a carbohidrato está localizado en la interface dimérica (Wright & Kellog, 1996).

Debido a su especificidad por N-acetilglucosamina (NAG), 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, por lo que protege al trigo contra microorganismos patógenos e inhibe la esporulación de hongos. En

el cristal, siempre se le ha encontrado como un homodímero tanto en presencia como en ausencia de ligando (Wright 1974, 1977, 1980, 1984, 1987, 1990, 1993).

En el dímero, las subunidades se asocian de forma cabeza-cola (Figura 11), dando como resultado parejas de dominios (A-D y B-C) donde cada miembro pertenece a una subunidad diferente. Antiguamente se describió a la AGT como una proteína con cuatro sitios de unión a carbohidratos (Wright, 1987). Análisis estructurales recientes, encontraron evidencias de que la AGT puede presentar hasta ocho sitios de unión a carbohidratos por dímero (Wright & Kellogg, 1996).

Las subunidades tienen cuatro sitios de unión únicos, uno por cada dominio, por lo tanto, el dímero presenta ocho sitios de unión independientes, aunque debido al doble eje de simetría, sólo se forman cuatro tipos de sitio (B/C, C/B, A y D/A) que no son equivalentes (Figura 12). Estudios recientes han reportado la funcionalidad de los ocho sitios (Sharon & Lis, 1998; Portillo-Téllez *et al.*, 2011).

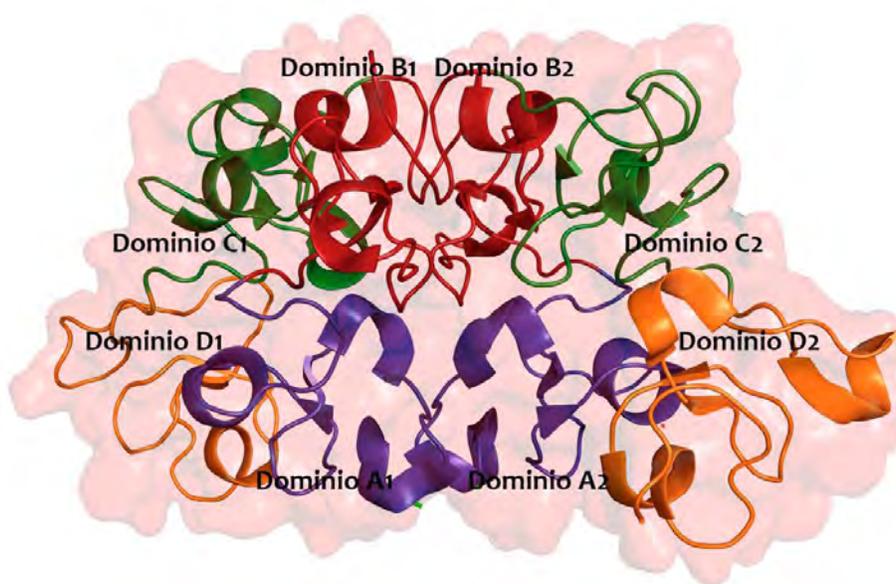


Figura 11. Estructura cristalográfica de la AGT 1 en donde se muestra su asociación de tipo cabeza-cola, cada dominio pertenece a una subunidad diferente. Código PDB, 2UVO.

Mientras que el dominio de heveína adyacente de la subunidad opuesta aporta los residuos polares que permiten la formación de puentes de hidrógeno con el ligando. Los restantes 2 sitios de unión, se encuentran formados únicamente por un dominio de heveína y se encuentran en cada uno de los dominios A, respectivamente. Esto se debe a que el dominio adyacente D carece en su estructura de los residuos polares. En total, 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. Como consecuencia de la carencia de residuos polares en los dominios D, los sitios en los que están involucrados los dominios B y C tienden a mostrar una mayor afinidad por carbohidratos que los sitios en los que están involucrados A y D. Razón por la cual se han denominado tradicionalmente a los sitios B1/C2, C1/B2, B2/C1 y C2/B1 como sitios de unión «primarios» y a los sitios A1, D1/A2, A2 y D2/A1 como sitios de unión «secundarios» como se observa en la Figura 11 (Schwefel *et al.*, 2010). Los aminoácidos que interactúan de forma directa con los carbohidratos son: Ser¹⁹, His, el ácido aspártico, el ácido glutámico, Tyr^{21,23}, arginina, asparagina y Trp³⁰. El dominio B carece de este último residuo aromático.

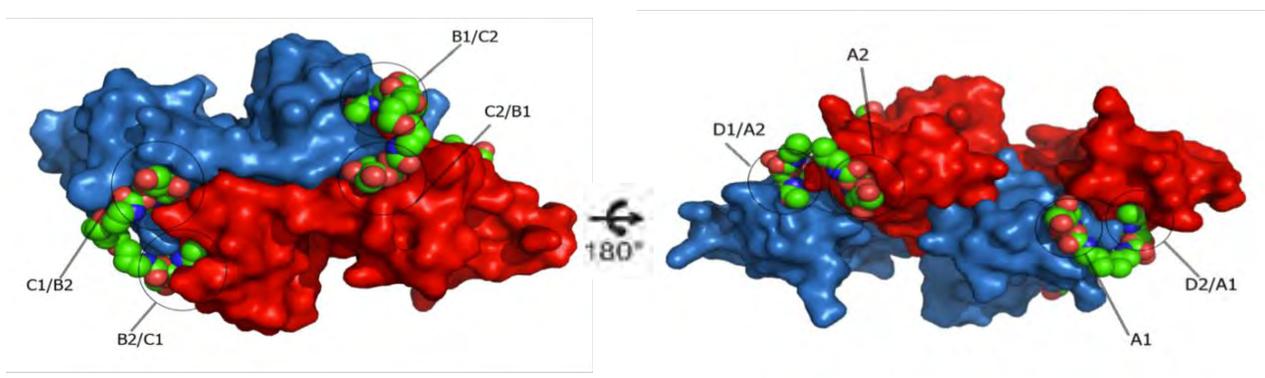


Figura 12. Se muestran los 8 sitios de unión de la AGT1. El ligando está representando como esferas verdas. En el primer panel se pueden observar los sitios B1/C2, C1/B2, B2/C1 y C2/B1. En el segundo panel la molécula ha sido rotada 180° en el eje de las x, por lo que ahora se pueden observar los sitios de union A1/D2 y D1/A2; además, se observan los sitios de union A1 y A2, los cuales están conformados únicamente por un solo dominio.

Se ha encontrado que, a valores de pH neutros, o cercanos a la neutralidad, la lectina forma homodímeros débiles no obligados. Este dímero se debilita progresivamente al aumentar la acidez del medio. A pH 2, la proteína se encuentra completamente disociada. Análisis espectroscópicos y calorimétricos sugerían que, bajo esas condiciones, uno de los cuatro dominios tipo heveína de la AGT se encontraba desplegado (Portillo-Téllez *et al.*, 2011).

Posteriores estudios realizados sobre los dominios independientes han encontrado que los cuatro dominios mantienen su capacidad de unión al ligando; sin embargo, el dominio D presenta una menor afinidad al ligando, pero una entalpía favorable de interacción. Además, este dominio tiende a encontrarse desplegado a un pH 2, y plegado conforme el pH se acerca a la neutralidad.

1.5.1 Aplicaciones de la AGT

La AGT tiene la capacidad de estimular o inhibir la proliferación de linfocitos y promover la secreción de citocinas proinflamatorias por los leucocitos. Además, 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 es aún desconocido (Gastman *et al.*, 2005). Ha mostrado tener propiedades insecticidas, al mismo tiempo que protege al trigo contra microorganismos patógenos e inhibe la esporulación de hongos.

Debido a su alta afinidad por NAG, es extremadamente útil para el estudio de células que poseen este carbohidrato en su superficie. Es considerada buena portadora vía oral y una eficiente transportadora de fármacos, ya que posee propiedades de mucoadhesión, citoadhesión, citoinvasión y transcitosis con enterocitos (Wood *et al.*, 2008; Gabor *et al.*, 2004) y a su capacidad de atravesar la mucosa nasal, pulmones, ojos y la barrera hematoencefálica (Mistry *et al.*, 2009; Gao *et al.*, 2007; Bies *et al.*, 2004; Schaeffer *et al.*, 1982).

2. Antecedentes directos

El mecanismo de ensamblaje y desplegamiento, así como la estabilidad estructural de la AGT, aún no han sido completamente elucidados hasta el momento; por lo que en años recientes nuestro grupo de trabajo se ha dado a la tarea de realizar la caracterización de energética del desplegamiento y disociación de la isoforma 1 de la AGT (AGT1) y sus dominios independientes, en función del pH y la temperatura, utilizando técnicas calorimétricas de alta precisión.

En la figura 13A se muestran los resultados obtenidos por medio de la calorimetría diferencial de barrido (DSC, por sus siglas en inglés) a pH 2 y utilizando una concentración de Gly/HCl de 30mM, y una concentración de proteína de 0.09 mM y 0.30 mM. Se puede observar un solo pico independiente de la concentración de la proteína, lo que nos indica que, a ese pH, la AGT se encuentra en estado monomérico. En estas condiciones la AGT muestra un desplegamiento térmico reversible, y la forma del pico es consistente con tres transiciones independientes de dos estados; esto nos indica que el plegamiento de la subunidad libre es un proceso de múltiples pasos (Figura 13B).

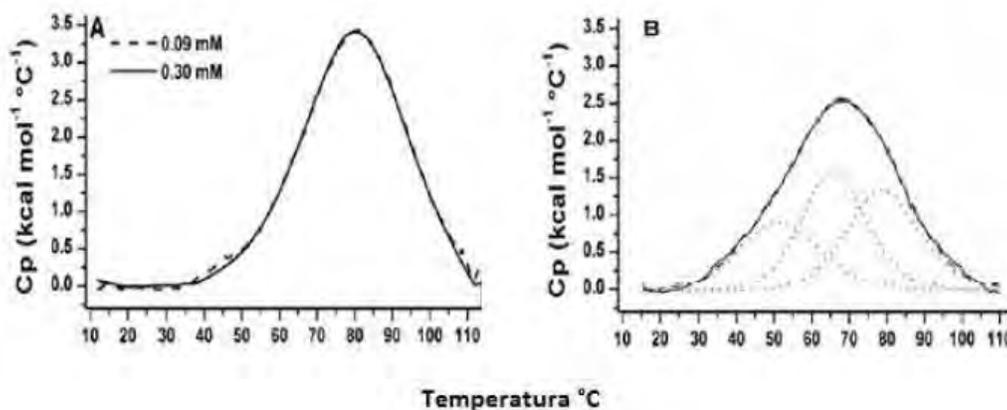


Figura 13. Perfiles calorimétricos. A) Se observa un pico independiente de la concentración, a un pH 2. B) Análisis de desconvolución de la traza calorimétrica a pH 2. Modificado de Portillo-Téllez *et al.*, 2011

Los experimentos de calorimetría de dilución isotérmica demostraron que la AGT tiende a formar homodímeros transitorios débiles. De acuerdo a las condiciones de la solución, es decir, a valores diferentes de pH y temperatura, la dimerización puede proceder de manera acoplada o no a cambios conformacionales significativos de las subunidades libres, es decir, puede tratarse de una asociación de tipo cuerpo rígido (donde las subunidades presentan los cuatro dominios plegados) o ser similar a un evento de plegamiento inducido por unión.

El comportamiento observado en la AGT podría implicar que la homodimerización no es crucial para el funcionamiento de la proteína como se observa en otras lectinas de plantas. Si bien se esperaría que, al desplegarse por medio de perturbación térmica, la proteína presentara cuatro transiciones (una por cada dominio), el hecho de que presente tres nos llevó a plantear que quizá uno de los dominios se encontraba desplegado a ese pH.

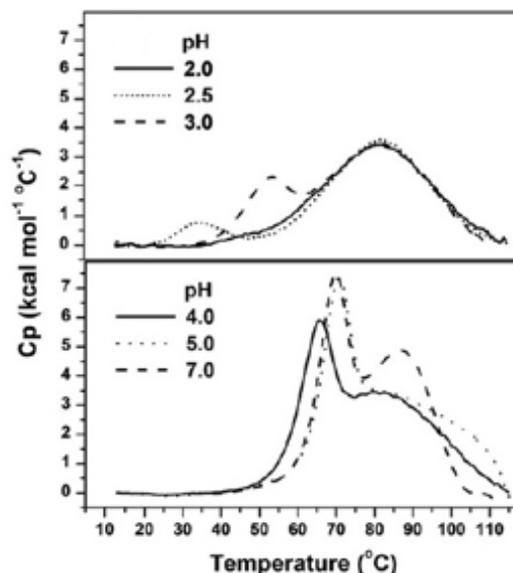


Figura 14. Perfiles calorimétricos de la perturbación térmica de la AGT en función del pH. Modificada de Portillo-Téllez *et al.*, 2011.

La Figura 14 muestra las trazas calorimétricas obtenidas a partir de experimentos realizados a valores de pH distintos. A pH 2.5 se utilizó una baja concentración de proteína (0.09mM) y se produjo un solo pico. Se observa que el proceso de desnaturalización es completamente reversible; además, se observó que a valores mayores aparece un pico adicional a bajas temperaturas el cual indica que el dímero se comienza a disociar, volviéndose más estable al disminuir la acidez del medio (Portillo-Téllez *et al.*, 2011).

Los experimentos de calorimetría y espectroscopia realizados por nuestro grupo de trabajo a los cuatro dominios aislados, mostraron que estos mantienen su capacidad de unión a los carbohidratos de manera independiente. Anteriormente, ya se había demostrado que el dominio B aislado es capaz de reconocer al ligando sacarídico (Espinosa *et al.*, 2000).

Los datos obtenidos en los experimentos de dicroísmo circular, revelaron que los cuatro dominios independientes (A, B, C y D) mantienen su estructura secundaria tanto a pH 2, pH

4.7 como a pH 6, a una temperatura de 25°C; sin embargo, el dominio D se encuentra desplegado a pH 2 (Figura 15) a diferencia de los otros dominios, pero plegado conforme el pH se acerca la neutralidad (Medrano-Cerano, 2014; López-González, 2015).

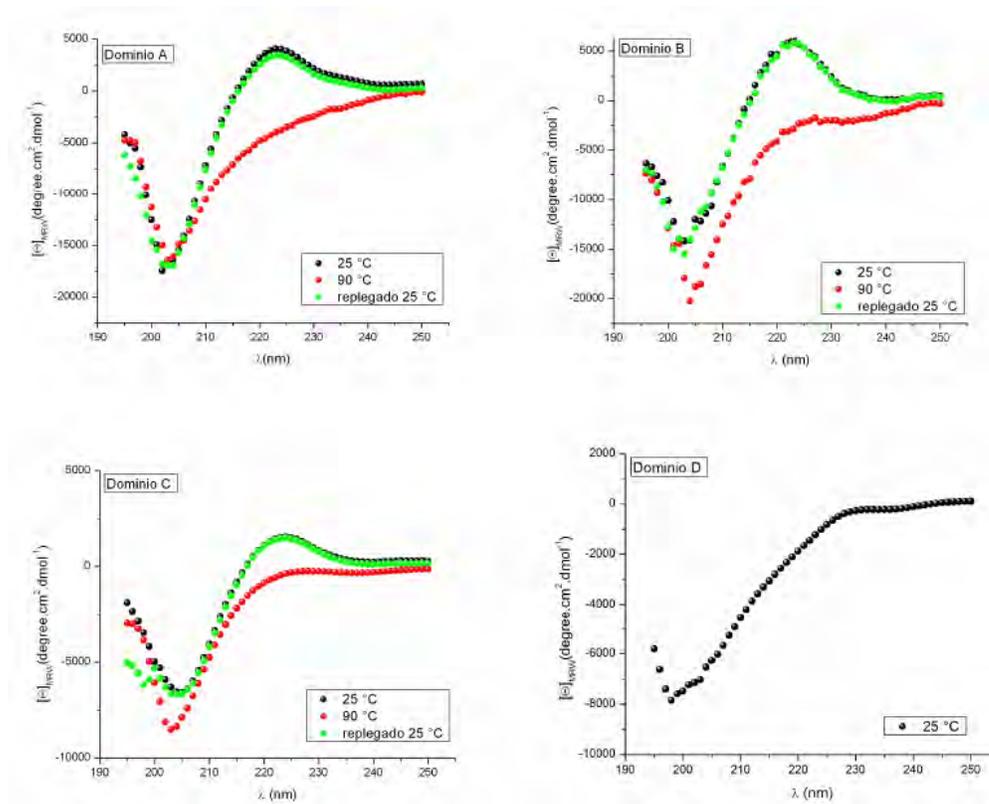


Figura 15. Espectro de dicroísmo circular obtenidos durante un ciclo de calentamiento y enfriamiento para los dominios independientes de la AGT1. Tomado de Medrano-Cerano, 2014.

Así mismo, los experimentos mostraron que tres de los dominios son capaces de recuperar totalmente su señal nativa después de un ciclo de calentamiento y enfriamientos (25°C-90°C-25°C). Esta reversibilidad del desplagamiento térmico en condiciones de alta acidez ya se había observado con anterioridad en la AGT completa (Portillo-Téllez *et al.*, 2011).

El experimento de barrido térmico para los dominios A, B y C (Figura 16) mostró que estos dominios presentan un patrón de conformación plegada a pH 2. Esto nos indica que los tres dominios son altamente estables y muy resistentes incluso a altas temperaturas, aunque existen diferencias significativas en la estabilidad de los dominios, siendo el dominio A el menos estable de los tres (Medrano-Cerano, 2014).

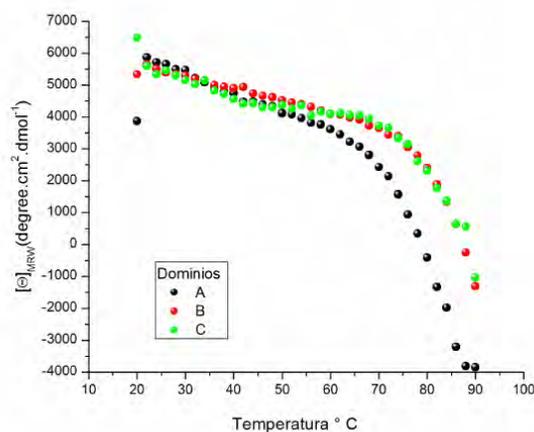


Figura 16. Trazos de barrido de temperature seguidos por DC para los dominios A, B y C. Tomado de Medrano-Cerano, 2014.

Por otra parte, los datos obtenidos a partir de los experimentos de ITC indican que los cuatro dominios independientes, son capaces unir *N-N'-N''*-triacetilquitotriosa, derivado trisacárido de la NAG. Los valores de K_a y ΔG muestran que este proceso de unión es exotérmico y espontáneo; en general, ambos valores para los cuatro dominios se encontraron dentro del mismo orden, aunque una comparación de las firmas termodinámicas mostró que los dominios A, B y C son los que presentan una mayor similitud. Se observó que el dominio A es el más afín al ligando, con un K_a de 1050 M^{-1} , mientras que el dominio D fue el que presentó una menor afinidad (236 M^{-1}) (López-González, 2015).

Los resultados obtenidos hasta ahora revelan la importancia de los residuos encontrados en la interfase del homodímero, y la interacción que presentan estos con el ligando.

3. Planteamiento del problema

El epitelio intestinal, que es justo la región del tracto digestivo donde se lleva a cabo la absorción de la gran mayoría de los nutrientes, presenta una capa de mucosa que contiene una gran cantidad de moléculas glicoconjugadas, siendo la mucina una de las más abundantes (Forstner & Forstner, 1994; Allen, 1984). Se sabe que la entrega de fármacos resulta mucho más eficiente si se realiza por la vía intestinal, tanto desde el punto de vista fisiológico como del económico; el costo de la terapia oral es mucho menor que el de la terapia parenteral, y el tracto gastrointestinal ofrece una amplia zona de absorción. Lo anterior ha abierto la opción de explotar las características mucoadhesivas de las lectinas de plantas como sistemas de entrega de fármacos.

En la actualidad, se busca mejorar la administración oral de fármacos utilizando un sistema de lectinas y de estructuras glicosiladas. La AGT es una proteína altamente resistente a la desnaturalización ácida, y los estudios realizados por nuestro grupo de trabajo han demostrado algunas de las bases moleculares de esta estabilidad. Cuando la AGT se encuentra dentro de un intervalo de $\text{pH} > 3 \leq 7$ y a temperaturas no muy elevadas ($T \leq 37^\circ\text{C}$), se encuentra en su conformación nativa, es decir, existe un equilibrio entre las concentraciones de las estructuras del monómero y el dímero. Las características de la AGT la hacen una excelente lectina para el transporte de fármacos por vía oral, ya que es capaz de resistir la acidez estomacal y llegar hasta el tracto digestivo, volviendo a una zona óptima en el duodeno y regresar a su conformación dimérica (Gabor *et al.*, 2004), por lo que es necesario caracterizarla mediante técnicas calorimétricas y espectrofotométricas, con la finalidad de conocer su desempeño y aplicación.

El presente trabajo plantea la obtención de manera recombinante de construcciones bidominio de la AGT para así poder complementar a detalle el modelo de las bases energéticas de cada uno de los sitios de unión de la proteína al reconocimiento y unión a ligandos, especialmente a N-acetil glucosamina (NAG).

4. Objetivos

4.1 Objetivo general

Establecer las condiciones de purificación de los bidominios recombinantes de la AGT que nos permita obtenerlos estructuralmente estables y funcionales, para así complementar el modelo del proceso de unión a ligandos de la AGT.

4.2 Objetivos particulares

1. Realizar los ensayos de expresión de las tres construcciones de los bidominios de la AGT1 (AB, BC y CD).
2. Escalar los cultivos para probar y establecer un método de purificación que se pueda utilizar para las tres construcciones.
3. Analizar las muestras purificadas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS.
4. Comparar su peso teórico con el experimental, para identificar si los bidominios pueden ser purificados eficientemente mediante este método.
5. Analizar su contenido de estructura secundaria mediante dicroísmo circular.
6. Probar su capacidad de unión de azúcares termodinámicamente con calorimetría de titulación isotérmica usando el ligando *N-N'-N''*-triacetilquitotriosa.

5. Hipótesis

Si los dos bidominios aislados de la AGT retienen su capacidad de unir y reconocer carbohidratos, entonces nos será posible establecer las diferencias entre los sitios de unión; lo cual nos ayudarán en la construcción de un modelo complejo de la unión de la AGT con su ligando, así como determinar si esta proteína es un buen candidato para el transporte de fármacos.

Por lo que la construcción que se espera tener una vez que se logre transferir el gen de la AGT1 al pET-32^a(+) sería tal y como se muestra en la Figura 17B.

Para expresar las construcciones, se inoculó una colonia aislada de la cepa de expresión Rosetta-gami (DE3) pLysS, transformada con el plásmido de expresión pET-32a(+) y su respectivo bidominio. Esta cepa contiene el lisógeno DE3 y el plásmido pLysS que, de manera constitutiva, expresan niveles bajos de lisozima, la cual inhibe la expresión basal de la polimerasa T7, mientras no haya agente inductor (Guan *et al.*, 1988).

La colonia se incubó a 37°C en agitación durante toda la noche utilizando 5 ml de medio Luria-Bertani (LB) con ampicilina (100 mg/ml), kanamicina (25 mg/ml), tetraciclina (15 mg/ml) y cloranfenicol (34 mg/ml).

Se utilizó 1ml de este cultivo para inocular uno de 20 ml, el cual se dejó crecer hasta alcanzar una densidad óptica (DO) de 0.6, midiéndose a 600nm. Una vez alcanzada esta DO se indujo utilizando IPTG a una concentración final de 0.5 mM, disminuyéndose la temperatura de incubación a 30°C durante 16 horas. Se tomaron alícuotas de 2 ml antes de llevar a cabo la inducción, y luego a 1 hora, 2 horas, 4 horas, 8 horas y 12 horas después de la inducción. Estas muestras se procesaron por medio de centrifugación (10 min a 6,500 rpm, 4°C), para posteriormente resuspender en 50 ul de amortiguador lisis (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 300 mM NaCl) y 1 mM de fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) y lisar las células por medio del sonicador (Misonix 3000) con pulsos de 10 segundos con 50 segundos de intermedio entre pulsos durante un total de 10 minutos. Al lisado celular se le agregó amortiguador de carga para luego llevar a cabo el análisis por SDS-PAGE.

6.2 Escalamiento de la producción de bidominios

Se crecieron 1500 ml de cultivo en medio, añadiendo el preinóculo en proporción 1:100 además de los 4 antibióticos mencionados con anterioridad, para luego incubarse

a 37°C con constante agitación, hasta que el medio alcanzó una densidad óptica (DO) a 600 m de 0.6. Después, se indujo la expresión de la proteína utilizando IPTG 0.5 mM, disminuyéndose la temperatura de incubación a 30°C durante 16 horas.

Una vez terminado el tiempo de incubación, el paquete celular se obtuvo por medio de centrifugación (10 min a 6,500 rpm, 4°C), para posteriormente resuspender las células en 50 ml de amortiguador de lisis (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 300 mM NaCl) y 1 mM de fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) y lisar las células y obtener la proteína por medio de sonicación (Misonix 3000) utilizando el mismo tiempo que se usó durante las pruebas de expresión. La fracción soluble se separó de la insoluble por medio de centrifugación (45 min

a 16,500 rpm, 4°C). La presencia de la proteína recombinante se siguió mediante geles de SDS-PAGE al 12%.

6.3 Purificación de los bidominios recombinantes

El lisado celular se centrifugó a 16,500 rpm durante 45 minutos. La fracción soluble obtenida por centrifugación del lisado celular se filtró a través de una membrana de 0.22 µm (tamaño de poro, marca Millipore), para posteriormente pasarse a través de una columna de níquel Ni-NTA Superflow Cartridges (QIAGEN) de 5 ml, a un flujo de 1ml por minuto.

La columna se equilibró previamente con 4 volúmenes (1 volumen = 5 ml) de amortiguador 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 amortiguador de unión y se eluyó con 4 volúmenes de amortiguador 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 amortiguador de elución, para dejar la columna limpia.

6.4 Corte enzimático con enteroquinasa

Después de haber realizado la primera purificación por medio de la columna de afinidad, las eluciones obtenidas se dializaron en amortiguador de diálisis (50 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, pH 8.0) para eliminar el imidazol. Se utilizó una membrana de diálisis de Spectrapor, con un tamaño de poro de 12,000 and 14,000 MW. A la proteína ya dializada se le agregaron CaCl₂ 0.5 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. Se realizó una segunda purificación por medio de una columna de afinidad de níquel con las mismas condiciones que se utilizaron durante la primer purificación; en esta segunda purificación se retiene la Trx y los bidominios aparecen en la fracción no retenida.

Los bidominios purificados se dializaron contra amortiguador de acetatos (30 mM acetato de sodio, pH 4.7) y contra agua destilada. Para confirmar la presencia de nuestros bidominios se obtuvo el espectro de masas, utilizando la técnica de MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight).

6.5 Espectrometría de masas

Se obtuvo el espectro de masas de los bidominios por medio de la técnica de MALDI-TOF. Se trata de una técnica de ionización suave que permite el análisis de biomoléculas y moléculas orgánicas grandes que tienden a fragmentarse con métodos diferentes de ionización. La muestra se mezcla con la matriz en exceso sobre una superficie de metal de tal forma que

ambas se cristalizan cuando el solvente se evapora. La precipitación resultante es sometida a pulsos cortos de láser en alto vacío lo que ocasiona que la absorción de energía de la matriz se convierta en energía de excitación y en transferencia de H⁺ a la muestra (ionización) formando especies monocargadas positivamente que son analizadas mediante TOF (analizador de tiempo de vuelo). Todos estos análisis fueron llevados a cabo por el Laboratorio de masas del Instituto de Química, a cargo de la Dra. María del Carmen García González.

6.6 Cuantificación de los bidominios recombinantes

Para realizar los estudios de dicroísmo circular y calorimetría de titulación isotérmica, la concentración de los bidominios se determinó midiendo su absorbancia a 280 nm en un espectrofotómetro UV-1800 (ShimadzuUV-VIS). El coeficiente de extinción molar para cada bidominio se calculó con base en la secuencia de aminoácidos mediante el servidor <http://web.expasy.org/protparam/>, obteniéndose los siguientes coeficientes de extinción molar:

Tabla 3. Pesos moleculares y coeficientes de extinción de los cuatro bidominios de la AGT1. No se toma en cuenta la formación de enlaces disulfuro.

Bidominio	Peso (Da)	Coefficiente de extinción molar A _{280nm} M ⁻¹ cm ⁻¹
AB	9020.9	15440
BC	8825.8	10970
CD	8613.6	14980

6.7 Dicroísmo circular

El dicroísmo circular (DC) es una técnica que se basa en la absorción diferencial de la luz circularmente polarizada. Esta técnica es ampliamente utilizada para estudiar las moléculas quirales, de todos tipos y tamaños, en especial cuando se trata del estudio de moléculas biológicas de gran tamaño. Su principal uso radica en el análisis de la estructura secundaria y terciaria de proteínas. El uso de esta técnica se basa en que la estructura secundaria de las proteínas es sensible al medio ambiente, principalmente a cambios en la temperatura, pH, salinidad y agentes químicos.

Las diferentes formas de estructura secundaria que presentan péptidos y proteínas plegadas exhiben distintivos espectros de DC en la región del UV-lejano. 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.

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 & Price; 2005, 2009).

Se llevaron a cabo experimentos de dicroísmo circular de UV-lejano para comprobar la presencia de estructura secundaria de los bidominios. La medición se llevó a cabo en un espectropolarímetro (JASCO J-720) en el intervalo UV lejano 195 a 250nm, a intervalos de 1 nm y con un tiempo de 1s a 25 °C utilizando una celda de cuarzo de 0.1 cm. Cada espectro se expresa en valores de elipticidad molar ($\text{grado.cm}^2.\text{mol}^{-1}$) utilizando la ecuación (1). Para calcular la masa molar promedio de cada bidominio se utilizó la ecuación (2).

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

$$\text{MRW} = \frac{\text{PM proteína}}{\#\text{residuos proteína}-1} \quad (2)$$

Dónde:

MRW = masa molar promedio por residuo

[P] = concentración de proteína en mg/ml

d = recorrido óptico de la celda en cm

6.8 Calorimetría de titulación isotérmica

En un experimento de calorimetría de titulación isotérmica (ITC), la solución del ligando es titulada contra una solución que contiene pequeños volúmenes de proteína, durante un determinado lapso de tiempo; los cambios de calor resultantes de la interacción proteína-ligando son monitoreados. Cada pico representa un cambio de calor, y está asociado con la inyección de una muestra de ligando en la solución que contiene la proteína, la cual se encuentra dentro de la celda de reacción (Leavitt & Freire, 2001; Bronowska, 2011).

Cuando el sistema proteína-ligando alcanza su punto de saturación, los cambios de calor relacionados con la unión al ligando disminuyen, siendo solamente observables los calores de dilución (Figura 18a). Tras realizar varias inyecciones del ligando a la celda de reacción, y de medir los calores obtenidos a partir de la interacción proteína-ligando, se obtiene una curva de unión (Figura 18b) (Bronowska, 2011).

Antes de realizar la primera inyección, se aplica una pequeña potencia constante a la celda de referencia. Esta potencia activa la alimentación a la celda de muestreo, obligándola a mantenerse bajo un régimen de microcalentamiento, siempre y cuando no haya liberación o requerimientos de calor por efecto de una reacción; esta señal constituye la línea base. Una vez que se cuenta con una línea base estable, la inyección del ligando provocará que la reacción libere o absorba calor, dependiendo si la asociación proteína-ligando es un proceso exotérmico o endotérmico. Para una reacción exotérmica, la temperatura en la celda de muestreo aumentará de forma diferencial, provocando que su alimentación de potencia sea desactivada, manteniendo así la temperatura constante. Por otra parte, para una reacción endotérmica, la alimentación a la celda de muestreo se incrementará para mantener la temperatura constante (Leavitt & Freire, 2001).

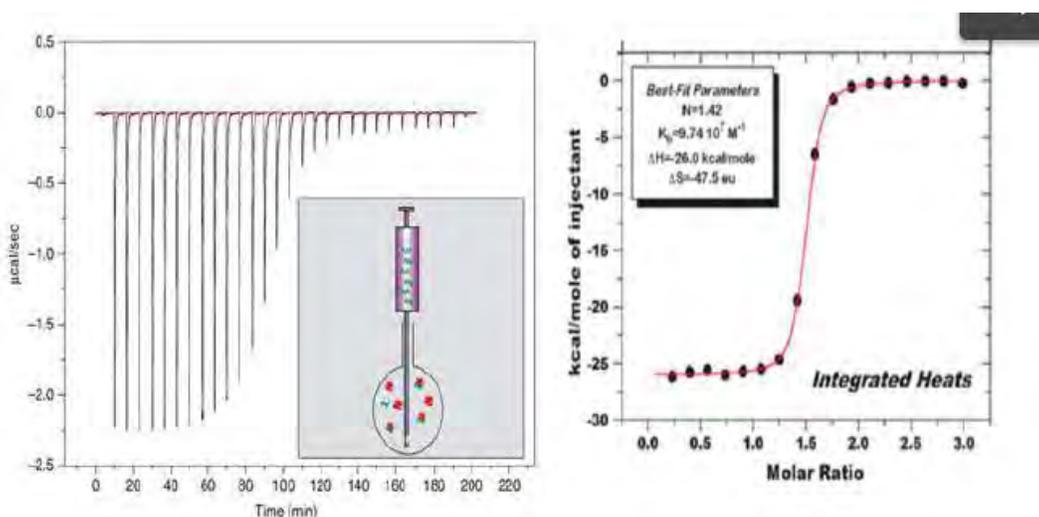


Figura 18. Diagrama de un típico experimento de ITC. En el panel izquierdo, los picos observados son el resultado de un cambio de calor, mientras que el área debajo de cada uno es el calor (μcal) asociado con la inyección del ligando. El recuadro en la parte inferior izquierda muestra la configuración de una celda de reacción (Tomada de Leavitt & Freire, 2001). En el panel derecho se muestra una curva de unión (Modificada de Bronowska, 2011).

El análisis ITC se llevó a cabo utilizando un equipo MicroCal ITC200 de GE Healthcare. Todo el estudio se llevó a cabo a 25°C , y los volúmenes de las celdas de referencia y de la muestra fueron de $200 \mu\text{l}$. La jeringa realizó inyecciones periódicas de $1.5 \mu\text{l}$. Se registraron los picos exotérmicos para que posteriormente fueran integrados y, de acuerdo a la concentración de proteína, se obtuviera el valor de ΔH , la constante de unión (K_a) y el ΔG de la reacción. A partir de estos datos se calculó el ΔS y así se obtuvo la firma termodinámica de la reacción. El ajuste de los datos se llevó a cabo con el programa de Origin Pro 8.1.

En la figura 19 se muestran varias simulaciones de isotermas de unión para un sistema con estequiometría 1:1 y con un ΔH constante de -50 kcal/mol. Para cada simulación se utilizaron diferentes valores del parámetro C, también conocido como parámetro de Wiseman. Este parámetro está determinado por el producto de la concentración de la proteína por la constante de unión (K_a) como se muestra en la ecuación 5:

$$C = [\text{proteína}] * K_a \quad (5)$$

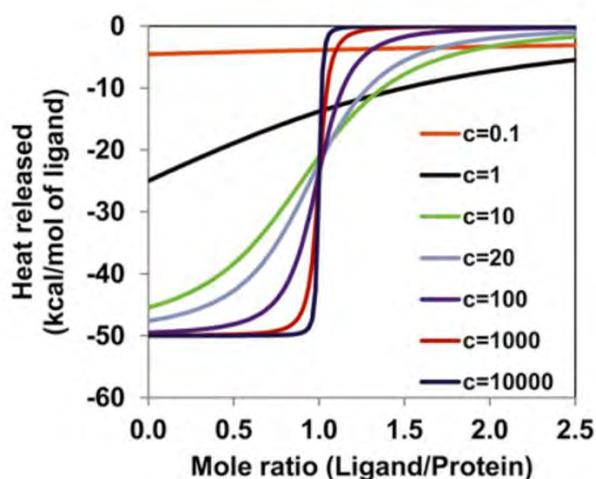


Figura 19. Simulaciones isotérmicas para el parámetro C o de Wiseman.

Como se puede notar en la figura anterior, a valores pequeños (por debajo de 10) del parámetro C, la gráfica tiende a tomar la forma de una línea recta ligeramente curva. Mientras que a valores grandes por arriba de 1000 la gráfica adopta un aspecto escalonado. En cualquiera de estos dos casos ($C < 10$ o $C > 1000$), el ajuste de las gráficas no se puede usar para determinar la estequiometría con exactitud y la K_a solamente se puede determinar si se toman algunas consideraciones adicionales, como conocer previamente el valor de estequiometría y saber con certeza la concentración de ligando y proteína.

Es precisamente por estas complicaciones, que se prefieren obtener isotermas de unión con valores del parámetro C dentro del intervalo de 10 a 1000. Dentro de este intervalo, las isotermas suelen adoptar una forma sigmoide, mediante la cual es más fácil obtener valores más precisos de estequiometría y K_a .

7. Resultados y discusión

7.1 Clonación y expresión de los bidominios

La clonación de los bidominios fue realizada con la colaboración con la Dra. Patricia Cano. La expresión de los dominios se hizo en la cepa Rosetta-gami (DE3) pLysS. De momento se ha estado trabajando con el bidominio AB y el bidominio CD. El bidominio BC no se ha logrado expresar hasta ahora.

En la Figura 20 se muestran los resultados de las pruebas de expresión para el bidominio AB en función del tiempo post-inducción, seguidos a través de un gel SDS-PAGE al 12%. El corrimiento electroforético de las proteínas de fusión, como se indica en la banda señalada, resultó intermedio entre las bandas de 25 a 35 kDa de marcadores de peso molecular, en concordancia con los pesos esperados a partir de la secuencia respectiva (Trx-AGT11.AB con un peso estimado de 26,868.93 Da, y Trx-AGT11.CD con un peso estimado de 25,670.9 Da). La mayor expresión de las proteínas de fusión de cada uno de los bidominios se logró a las 16 horas después de realizada la inducción, a una temperatura de 30°C. En todas las expresiones realizadas, fue precisamente bajo estas condiciones que se obtuvo a la mayor proporción de la proteína en la fracción soluble.

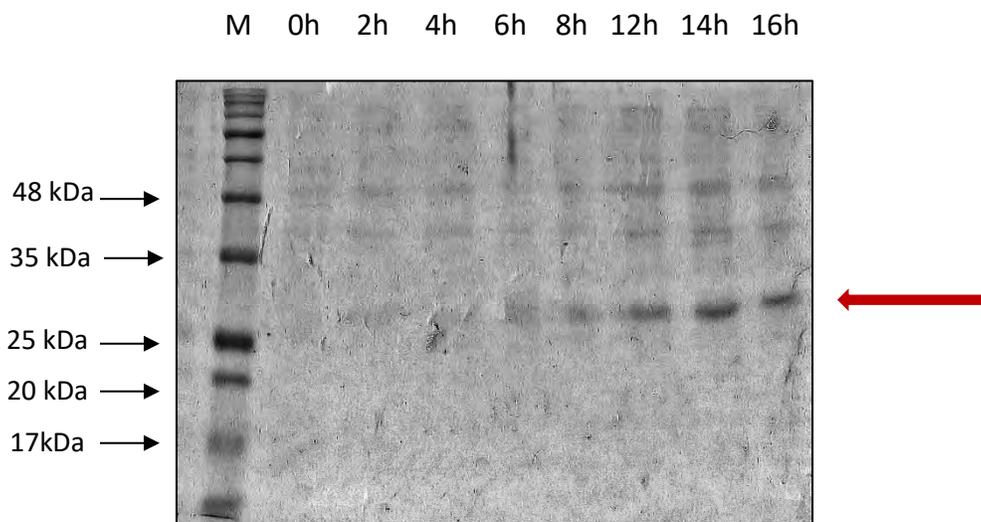


Figura 20. Ensayo de expresión de la proteína de fusión Trx-AGT11.AB, con 0.5mM de IPTG a 30°C de 0 hasta 16 horas. M es el marcador de peso molecular.

7.2 Purificación de los bidominios

Las fracciones solubles de las construcciones Trx-AGT11.AB y Trx-AGT11.CD se purificaron por medio de una columna de afinidad Ni-NTA Superflow Cartridges (QIAGEN) previamente equilibrada con un amortiguador de unión. La elución fue realizada con amortiguador de elución con una concentración de imidazol al 300mM. El resultado de la purificación fue verificado mediante un gel SDS-PAGE al 12% como se muestra en las Figura 21 y 22. Los pesos esperados para la fracción no retenida de la segunda columna son 9020.9 Da para el bidominio AB, y de 8613.6 para el bidominio CD.

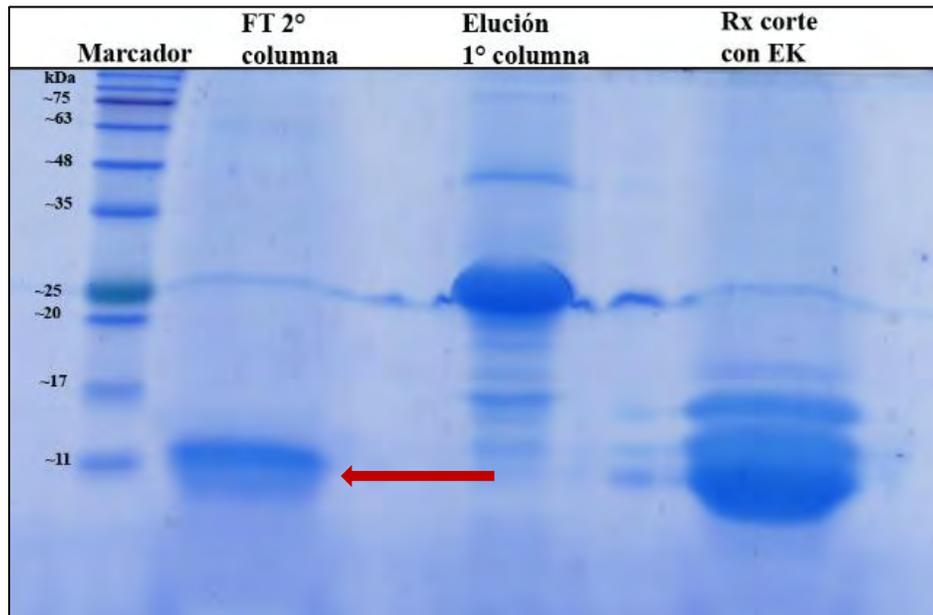


Figura 21. Resultados de la purificación de proteínas para el bidominio AB por columna de níquel Ni-NTA Superflow Cartridges (QIAGEN), seguidos en gel SDS-PAGE 12%. El resultado de la segunda columna está señalado con la flecha roja.

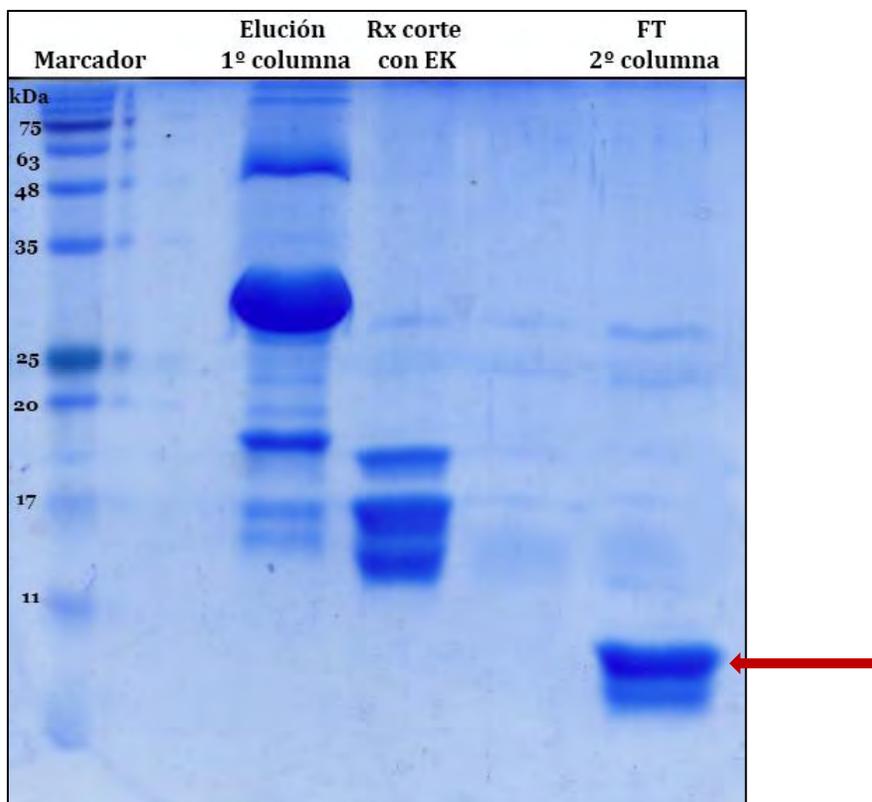


Figura 22. Resultados de la purificación de proteínas para el bidominio CD por columna de níquel Ni-NTA Superflow Cartridges (QIAGEN), seguidos en gel SDS-PAGE 12%. El resultado de la segunda columna está señalado con la flecha roja.

El rendimiento de la proteína de fusión para cada bidominio fue aproximadamente de 3 mg por cada litro de cultivo. La concentración de proteína fue determinada espectrofotométricamente a una longitud de onda de 280 nm.

Las fracciones obtenidas para ambas construcciones junto con su proteína de fusión fueron entonces dializadas en membrana de diálisis de 12,000 a 14,000 MW (Spectrapor) contra amortiguador de diálisis (50 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, pH 8.0) para eliminar el imidazol. Después de esto, se realizó un corte enzimático con enterocinasa durante 16 horas (Figura 19), en una proporción de 0.001 U de enterocinasa (una unidad de enteroquinasa corresponde a 190 unidades de activación de tripsinógeno a 37°C/16 h) por cada 20 µg de proteína de fusión.

Una vez realizado el corte enzimático, la proteína se volvió a pasar a través de una columna de níquel, para eliminar la Trx. Los bidominios se obtienen en la fracción no retenida de esta segunda columna, para después ser dializados contra amortiguador de acetatos (30mM

acetato de sodio a pH 4.7); en esta diálisis se utilizó una membrana de diálisis con un tamaño de poro de 3500 MW (Spectrapor).

7.3 Espectrometría de masas

Una pequeña cantidad de la muestra obtenida de la segunda columna se dializó en agua y fue enviada al Laboratorio de masas del Instituto de Química. El análisis de MALDI-TOF (Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization-Time Of Flight) para el bidominio AB mostró principalmente dos picos, uno de 3648.096 Da y otro de 9005.862 Da que corresponde al peso esperado para la proteína recombinante (Figura 23). De acuerdo al programa Proteincalculator v3.3 la proteína recombinante presenta un peso aproximado de 9020.9 Da, valor que coincide con el análisis obtenido en este estudio.

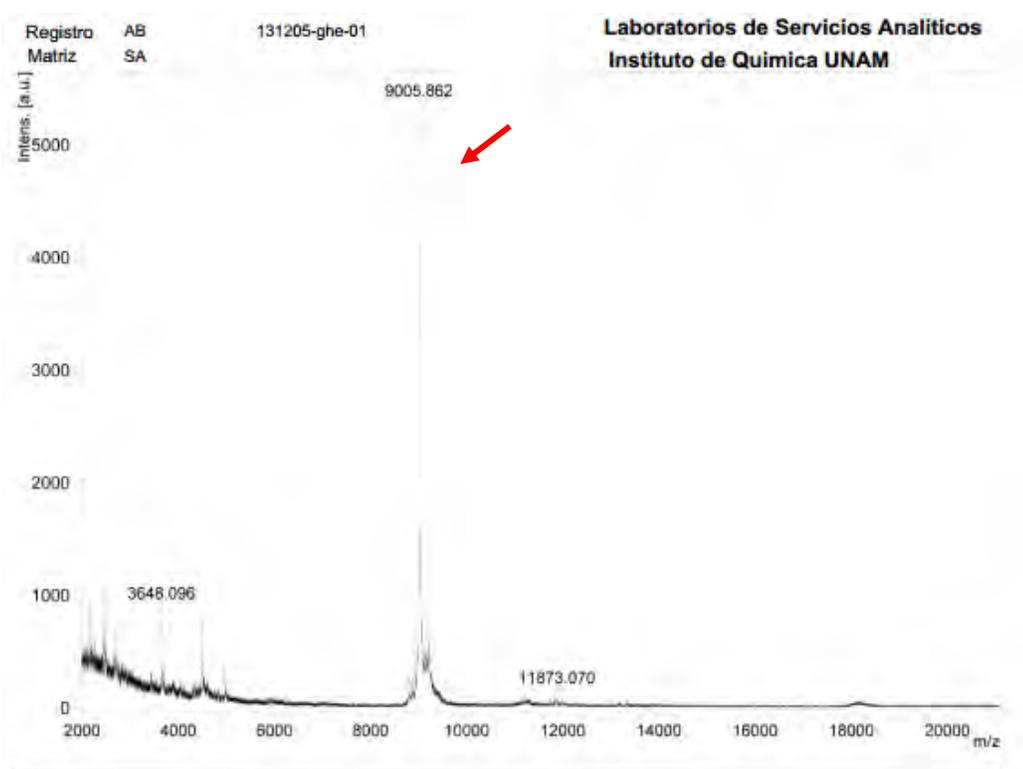


Figura 23. MALDI-TOF de la muestra obtenida en la purificación del bidominio recombinante AB. Se observan dos picos significativos a 3648.096 Da y a 9005.862 Da.

Por otra parte, el análisis MALDI-TOF para el bidominio recombinante CD mostró dos picos significativos (Figura 24), uno a 4297.739 Da y otro a 8591.954 Da., el cual corresponde con el peso esperado para este bidominio (8613.6 Da) y demuestra que la proteína se encuentra por lo menos 90% pura y funcional.

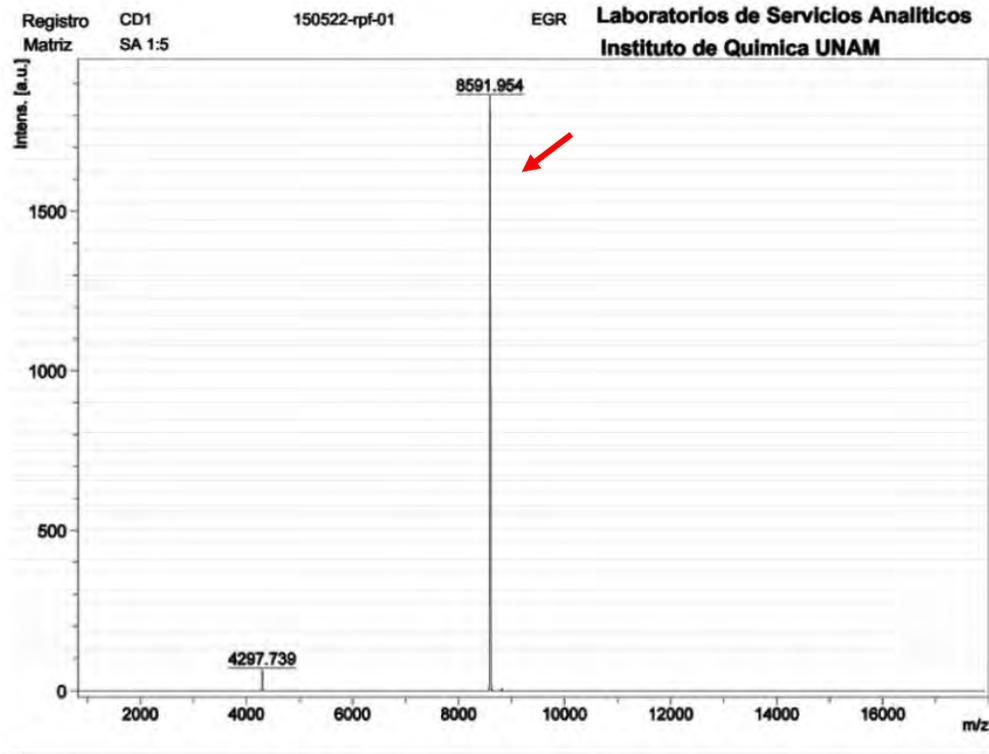


Figura 24. MALDI-TOF de la muestra obtenida en la purificación del bidominio recombinante CD. Se observan dos picos significativos a 4297.739 Da y a 8591.954 Da.

En la Tabla 4, se comparan los pesos esperados y los obtenidos mediante espectrometría de masas para cada uno de los dominios. Se observa una correspondencia de casi el 100% entre ellos, con solamente alrededor de 15 Da de diferencia.

Tabla 4. Comparación del peso molecular teórico y experimental (por MALDI-TOF) de los dos bidominios recombinantes de la AGT1, sin tomar en cuenta la formación de puentes disulfuro.

Bidominio	Peso teórico (Da)	Peso obtenido (Da)
AB	9020.9	9005.862
CD	8613.6	8591.954

7.4 Dicroísmo circular

Para verificar el contenido de la estructura secundaria de los bidominios, se obtuvieron los espectros de dicroísmo circular de cada uno de ellos, en la región del UV-lejano (200-250nm). El espectro fue

En la figura 25, la línea en negro muestra el espectro de los bidominios AB y CD a pH 4.7, y a una temperatura de 25°C. En estas condiciones de acidez, el espectro muestra un pico máximo a una longitud de onda alrededor de 225nm y un mínimo negativo a una longitud de onda de 205 nm. Previamente, se ha reportado que este patrón es típico de proteínas plegadas constituidas por dominios tipo heveína (Rodríguez-Romero *et al.*, 1989).

En rojo, se puede observar el espectro obtenido a 90°C para los bidominios AB y CD, el cual muestra que a esta temperatura se ha perdido la mayor parte de la estructura secundaria. Así mismo, en verde, se muestra el espectro de la muestra cuando esta se enfría nuevamente a 25°C, permitiendo que la proteína se repliegue tras el ciclo de calentamiento-enfriamiento.

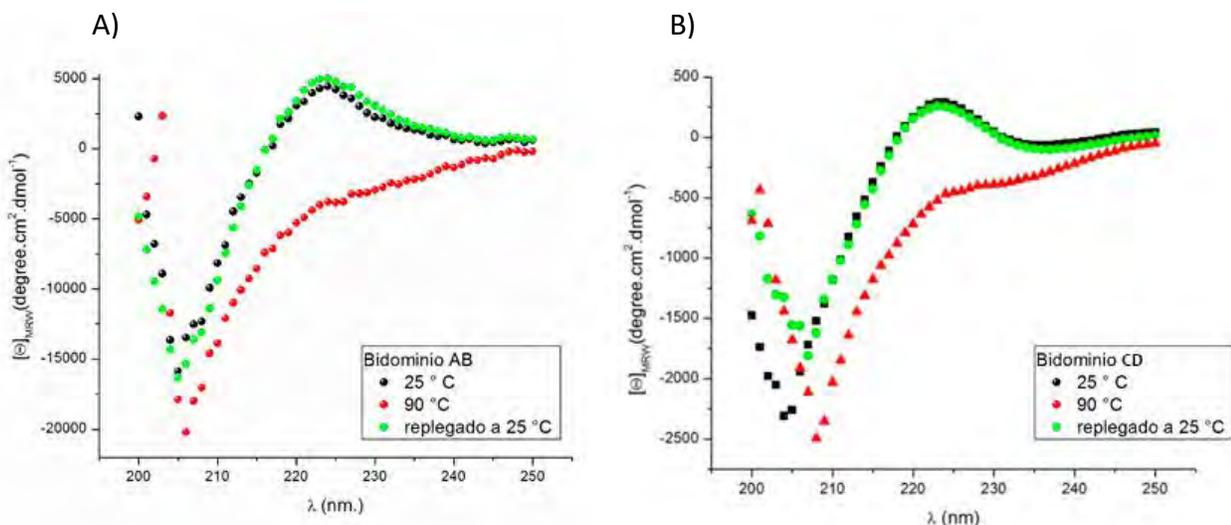


Figura 25. Espectros de dicroísmo circular obtenidos durante un ciclo de calentamiento y enfriamiento para el bidominio 1) AB y 2) CD.

Tanto el bidominio AB como el CD muestran una completa reversibilidad en su desplegamiento térmico en altas condiciones de acidez, lo que concuerda con lo observado para la AGT completa, y para los dominios A, B y C, aislados anteriormente por nuestro grupo de trabajo. Por otra parte, aunque el bidominio CD muestra reversibilidad, estudios anteriores han demostrado que el dominio D por sí solo tiende desplegarse a pH 2 (Figura 15), pero muestra una forma más cercana a la típica de un dominio plegado a un pH de 4.7 (Portillo-Téllez *et al.*, 2011; Medrano-Cerano, 2014; López-González, 2015). Lo anterior

podría explicar por qué las unidades de dicroísmo para el bidominio CD se encuentren dentro de un orden mucho más pequeño que las observadas para el bidominio AB.

Estos resultados concuerdan con los anteriores encontrados por nuestro grupo de trabajo, en el que se observa que los cuatro dominios tienden a mantenerse plegados a un pH que se acerque a la neutralidad.

Posteriormente se realizó un barrido térmico (Figura 26) en el que se incrementó la temperatura 1 °C por min, partiendo de 20°C a 90 °C. Este barrido se realizó para perturbar el plegamiento de la proteína y comprobar que el patrón observado correspondía al de los bidominios plegados de la AGT1. Durante este proceso se sigue únicamente la señal 225 nm, con el fin de observar la mayor cantidad de cambios en la estructura secundaria generados por el incremento de la temperatura. Los resultados obtenidos para el bidominio AB concuerdan con lo reportado anteriormente para los dominios A y B (Figura 16).

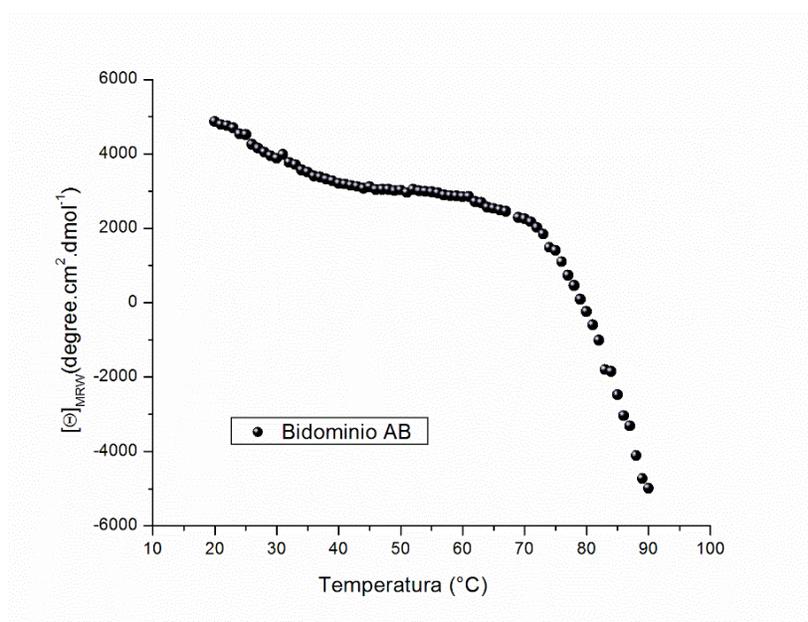


Figura 26. Curva de perturbación térmica del bidominio AB a pH 4.7, seguida por DC a 225 nm.

7.5 ITC

Para probar que el protocolo de expresión y purificación implementado conduce a la producción de bidominios que conservan su función de reconocimiento, se realizó una prueba de calorimetría de titulación isotérmica con uno de los bidominios y el ligando *N-N'-N''*-triacetilquitotriosa. Los experimentos se realizaron a un pH de 4.7, temperatura de 25 °C, en agitación constante de 800 rpm.

Para esta prueba se utilizó el bidominio CD, a una concentración de proteína de 1 mM. No fue posible utilizar el bidominio AB ya que no se contaba con suficiente concentración de proteína. Los datos obtenidos se ajustaron con el programa Origin Pro 8.1, utilizando un modelo de dos sitios independientes (Figura 27A) y de un sitio independiente (Figura 27B).

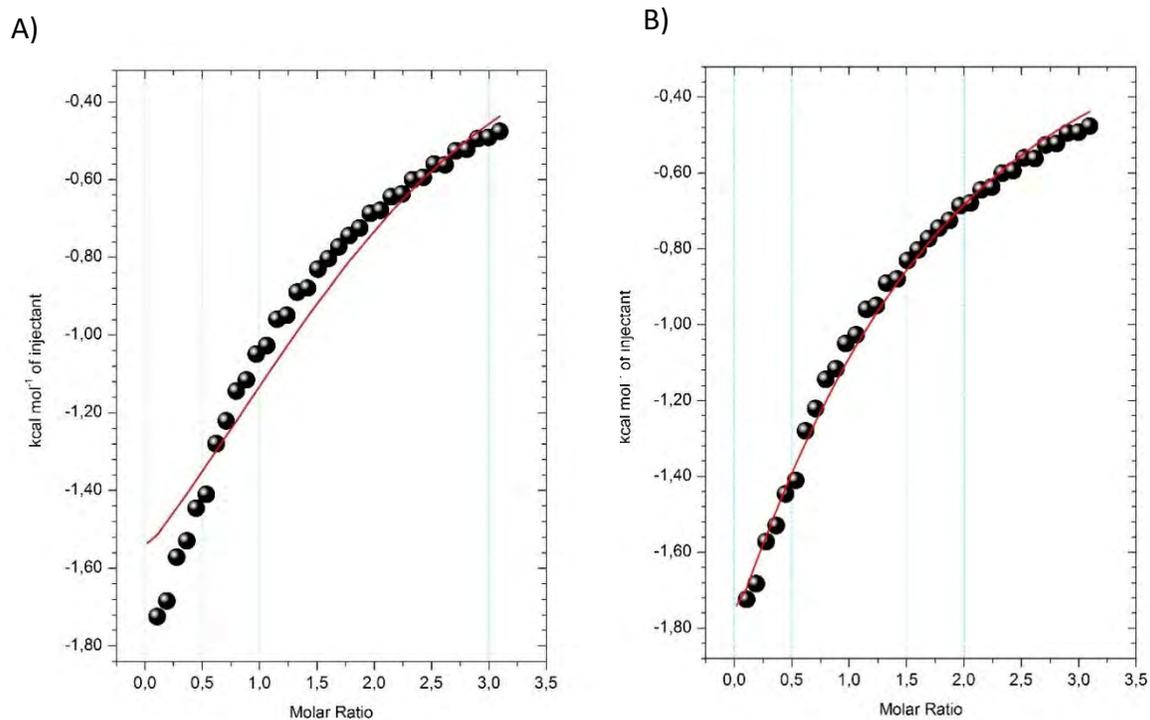


Figura 27. Curvas obtenidas para la unión del bidominio CD de la AGT con su ligando *N*-Acetilquitotriosa. A) Ajustada a dos sitios y B) Ajustada a un sitio.

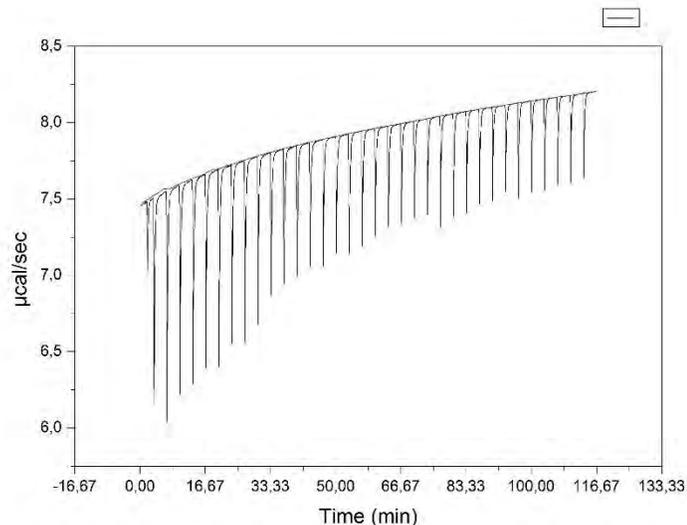


Figura 28. Termograma del bidominio CD de la AGT con su ligando N-Acetilquitotriosa

Los parámetros de unión

Como se puede ver en la (Figura 27A), la isoterma de unión obtenida para el bidominio CD no se ajusta a un modelo de dos sitios; sin embargo, ajustada a un solo sitio (Figura 27B) se asemeja más a la forma de una gráfica con un parámetro C pequeño que a una gráfica sigmoide. Esto nos indica que posiblemente uno de los dominios no se encuentre plegado y no esté contribuyendo al proceso de unión al ligando. Aunque los datos demuestran que el bidominio puede unir *N-N'-N''*-triacetilquitotriosa, es necesario aumentar la concentración de la proteína para así obtener datos más robustos de acuerdo con el parámetro C.

El bidominio mostró un termograma exotérmico (Figura 28), de acuerdo con los picos observados y con los valores obtenidos de ΔH . Para cuantificar la energía del proceso de unión a *N-N'-N''*-triacetilquitotriosa, se tomaron en cuenta los datos obtenidos en el ajuste a un solo sitio. Este ajuste nos dio los cambios termodinámicos de 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 por medio de las ecuaciones 6 y 7, respectivamente.

$$\Delta G = -RT \ln K_a \quad (6)$$

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.

$$\Delta S = \frac{\Delta G - \Delta H}{-T} \quad (7)$$

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

Los resultados obtenidos por medio de estos cálculos se muestran en la tabla 5.

Tabla 5. Parámetros termodinámicos de unión a quitotriosa obtenidos para el bidominio CD mediante calorimetría de titulación isotérmica.

Bidominio	K_a (mM ⁻¹)	ΔG (Kcal/mol)	ΔH (Kcal/mol)	$-T\Delta S$ (cal/molK)
AGT-CD	0.4 ± 0.1	-3.6	-5.5 ± 1.3	-6.32

El valor de ΔG nos indica que el proceso es espontáneo. A partir de estos resultados, podemos deducir que la unión del bidominio CD a la quitotriosa es un sistema de baja afinidad de unión.

Tabla 6. Parámetros termodinámicos reportados para la AGT nativa y recombinante, y para los cuatro dominios independientes (Leyva *et al.*, 2017).

Proteína	K_a (mM ⁻¹)	ΔG (Kcal/mol)	ΔH (Kcal/mol)	$T\Delta S$ (cal/molK)
AGT nativa	13.2 ± 0.6	-5.7	-9.4 ± 0.1	-3.7
AGT recombinante	12.5 ± 0.6	-5.7	-9.9 ± 0.2	-4.2
AGT-A	1.1 ± 0.1	-4.1	-9.1 ± 0.3	-5.0
AGT-B	1.1 ± 0.1	-4.1	-10.1 ± 0.7	-6.0
AGT-C	0.5 ± 0.1	-3.7	-7.6 ± 0.8	-3.9
AGT-D	0.3 ± 0.1	-3.5	-9.9 ± 1.3	-6.4
AGT-CD	0.4 ± 0.1	-3.6	-5.5 ± 1.3	-6.32

Como se puede observar, los valores obtenidos para el bidominio CD se encuentran dentro del mismo orden que los obtenidos para los dominios individuales; el valor de K_a se encuentra entre los valores de los dominios independientes C y D.

Si nos referimos al dicroísmo para el bidominio CD, podemos observar que los resultados, aunque positivos, se encuentran en un orden mucho más pequeño que los resultados

obtenidos para el bidominio AB, por lo que es probable que solamente un dominio esté contribuyendo a esta medición.

El dominio D no solo presenta la menor afinidad a ligando, sino que también ha demostrado ser el menos estable de los cuatro dominios independientes en anteriores experimentos. Si se analiza el sitio de unión del monodominio D, podemos ver que este es en el que se encuentra una mayor carencia de aminoácidos que puedan interactuar con el azúcar. Este dominio no presenta la tirosina que normalmente se encuentra en la posición 23 de cada monodominio y que es la encargada de interactuar por apilamiento con el azúcar, aunque están presentes la serina de la posición 19 y la tirosina de la posición 30, encargados normalmente de establecer los puentes de hidrógeno con el oxígeno y el contacto hidrofóbico con los carbonos del grupo acetilo respectivamente. Lo más probable es que el dominio C sea el que esté aportando el sitio de unión al ligando.

8. Conclusiones

El vector pET-32^a (+) y la cepa *E. coli* Rosetta-gami (DE3) pLysS resultaron apropiados para la expresión de dos de los tres bidominios de AGT1. Las proteínas de fusión fueron encontradas en la fracción soluble del lisado.

Se lograron purificar dos de los bidominios de la AGT1 (AB y CD) mediante técnicas cromatográficas, con un rendimiento de aproximadamente 3 mg de proteína por litro de cultivo. La separación de la proteína de fusión se llevó a cabo por medio de un corte enzimático con la enzima EK y una segunda columna de afinidad. La purificación fue verificada mediante espectrometría de masas; se encontró que la masa molecular de los dos bidominios de la AGT1 coincide con el valor teórico esperado.

Los resultados del dicroísmo circular demostraron que a pH 4.7 y a una temperatura de 25°C los bidominios se encuentran plegados, apreciándose el espectro característico de la AGT nativa, un pico máximo positivo alrededor de los 225 nm y un pico mínimo negativo alrededor de 205 nm. Posteriores ensayos de barrido térmico demostraron que su desplegamiento es reversible a este pH.

La prueba de calorimetría de titulación isotérmica mostró que los bidominios aislados todavía mantienen su capacidad de unión a *N-N'-N''*-triacetilquitotriosa, un derivado de la NAG; se observó que el proceso de unión del ligando es exotérmico y espontáneo. El ajuste obtenido para los resultados de ITC y los valores obtenidos de estequiometría (K_a , ΔH y ΔG) están ajustados a un sitio, en lugar de a dos sitios, como era de esperarse, por lo que sería necesario realizar más estudios calorimétricos sobre el bidominio CD, y sobre los bidominios AB y BC.

Los resultados demostraron que el bidominio CD independiente mantiene tanto su estructura como su funcionalidad. Esto concuerda con previos estudios realizados sobre los cuatro dominios independientes, los cuales demostraron que estos mantenían su capacidad de unión a *N-N'-N''*-triacetilquitotriosa.

Con el fin de elucidar todos los elementos presentes en el proceso de unión, se debe continuar con los estudios a los tres bidominios y a los dos tridominios con el fin de construir un modelo más robusto que contribuya a mejorar el uso de esta proteína en los sistemas de entrega de fármacos.

9. Bibliografía

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 Mucopolysacharides. *Physiol.* 50: 613 - 619.
2. 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
3. Bies, C., Lehr, C-M. y Woodley, J. F. 2004. Lectin-mediated drug targeting: history and applications. *Adv. Drug Del.* 56: 425-435.
4. Bronowska, A.K. 2011. Thermodynamics of Ligand-Protein Interactions: Implication for Molecular Design. En Moreno-Pirajan, editor. *Thermodynamics – Interaction studies – solids liquids and gases.* Pp 1-17.
5. Bo Liu, He-jiao Bian y Jin-ku Bao. 2010. Plant lectins: Potential antineoplastic drugs from bench to clinic. *Cancer Letters.* 287:1-12.
6. Bourne Y., Astoul C.H., Zamboni V., Peumans Willy J., Menu-Bouaouiche L, Van Damme Els J. M., Barre A. y Rouge P. 2002. Structural basis for the unusual carbohydrate-binding specificity of jacalin towards galactose and mannose. *Biochem. J.* 364:173-180.
7. Boyd, W. C. y Shapleigh, E. 1954. Antigenic relations of blood group antigens as suggested by tests with lectins. *J Immunol.* 73:226-231.
8. Castillo-Villanueva A. y Abdullaev F. 2005. Lectinas vegetales y sus efectos en el cáncer. *Revista de investigación clínica.* 57:55-64.
9. 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.
10. De Hoff Peter L.; Brill Laurence M. y Hirsch Ann M. 2009. Plant Lectins: the ties that bind in root symbiosis and plant defense. *Mol Genet Genomics.* 282(1): 1–15
11. Edelman, G.M., Cunningham, B.A., Reeke, G.N. Jr., Becker, J.W., Waxdal, M.J., and Wang, J.L. (1972) The covalent and threedimensional structure of concanavalin A. *Proc. Natl Acad. Sci. USA,* 69, 2580–2584.
12. 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''- tricetylchitotriose. *Eur. J. Biochem.* 267:3965-3978.
13. Franz. 1988. The ricin store. *Adv. Lectin Res.* 1:10-25.

14. Gabor Franz, Bogner Elisabeth, Weissenboeck Andrea, Wirth Michael. 2004. The Lectine-cell interaction and its implications to intestinal lectin-mediated drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 56:459-480.
15. 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.
16. 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. Res. Comm.* 316:263-271.
17. Goldstein I.J., Poretz R.D. 1986. Isolation, physicochemical characterization, and carbohydrate-binding specificity of lectins. In IE Liener, N Sharon, IJ Goldstein, eds, *The Lectins: Properties, 129: 135-138 Functions, and Applications in Biology and Medicine.* Academic Press, New York, pp 33-245
18. Gómez-Olivares J.L, Valencia Q R., Ortiz-Muñiz A.R. 2012. Las lectinas en el estudio de la glicosilación de las proteínas. Editorial académica española. Pp 12-20.
19. Hernández Cruz P. Pérez Campos E., Martínez Martínez L, Ortiz B. y Martínez G.. 2005. Las lectinas vegetales como modelo de estudio de las interacciones proteína-carbohidrato. *REB24 (1): 21-27.*
20. Hernández P., Odalys M., Rodríguez Y. y Ganem Felix A. 1999. Aplicaciones de las Lectinas. *Rev cubana Hematol Inmunol Hemoter.* 15(2):91-5.
21. Koharudin, L. M. I., Furey, W., & Gronenborn, A. M. 2009. A Designed Chimeric Cyanovirin-N Homolog Lectin: Structure and Molecular Basis of Sucrose Binding. *Proteins*, 77(4), 904–915.
22. Lannoo, N., & Van Damme, E. J. M. 2014. Lectin domains at the frontiers of plant defense. *Frontiers in Plant Science.* 5, 397.
23. Lis, H. y Sharon, N. 1998. Lectins: Carbohydrate-Specific Proteins That Mediate Cellular Recognition. *Chem. Rev.* 98:637-674.
24. Leavitt, S. y Freire, E. 2001. Direct measurement of protein binding energetics by isothermal titration calorimetry. *Curr Opin Struct Biol.* 11(5): 560-566
25. López-González, I. 2015. Bases energéticas de la unión de los dominios de la aglutinina de germen de trigo a carbohidratos. *TESIUNAM.*
26. Loris Remy. 2002. Principles of structures of animal and plant lectins. *Biochim Biophys Acta.* 1572:198-208.

27. Lütteke T. y Von der Lieth Claus-W. 2009. Data Mining the PDB for Glyco-Related Data. *Methods Mol. Biol.* 534:293-310.
28. Medrano-Cerano, J.L. 2014. Bases energéticas de la organización estructural multidominio de la aglutinina del germen de trigo: estudio de los dominios. *TESIUNAM*.
29. Meynier Christophe, Feracci Mikael, Espeli Marion, Chaspoul Florence, Gallice Philippe, Schiff Claudine, Guerlesquin Françoise and Roche Philippe. 2009. NMR and MD Investigations of Human Galectin-1/Oligosaccharide Complexes. *Biophys. J.* 97: 3168–3177.
30. Mistry, A. S. Stolnik, and L. Illum. 2009. Nanoparticles for directed nose-to-brain delivery of drugs. *Int. J. Pharm.* 379:146-157.
31. Nagata Y. and Burger M. 1974. Wheat germ agglutinin. Molecular characteristics and specificity for sugar binding. *J. Bio. Mol.* 249, 10:3116-3122.
32. Peel Sandra and Bulmer Judith. N. 1996. Lectin histochemistry of pregnant rat uterine tissues. *J. Anat.* 188:197-205.
33. Peumans, W.J and Van Damme, E.J. 1995. Lectins as plant defense proteins. *Plant Physiology.* 109(2): 347-352.
34. Peumans, W. J., Fouquaert, E., Jauneau, A., Rougé, P., Lannoo, N., Hamada, H., Van Damme, E. J. M. 2007. The Liverwort *Marchantia polymorpha* Expresses Orthologs of the Fungal *Agaricus bisporus* Agglutinin Family. *Plant Physiology*, 144(2), 637–647.
35. Portillo-Téllez, M. C, *et al.*, 2011. Folding and Homodimerization of Wheat Germ Agglutinin. *Biophysical Journal* 101(6) 1423–1431
36. Privat J.P., Delmatte F., Mialonier G., Bouchard P. y Monsigny M. 1974. Fluorescence studies of saccharide binding to wheat-germ agglutinin (Lectin). *Eur. J. Biochem.* 47: 5.
37. Jiang, S.-Y., Ma, Z., & Ramachandran, S. 2010. Evolutionary history and stress regulation of the lectin superfamily in higher plants. *BMC Evolutionary Biology*, 10, 79.
38. 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.
39. Raikhel N.V., Wilkins T.A. 1984. Isolation and characterization of a cDNA clone encoding wheat germ agglutinin. *Proc Nutl Acad Sci USA* 84: 6745-6749.
40. 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.

41. Roldós V; Cañada F. Javier y Jiménez-Barbero J. 2011. Carbohydrate-Protein Interactions: A 3D View by NMR. *Chem Bio Chem*. 12:990-1005.
42. 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.
43. 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.
44. Sharon, N., and H. Lis. 1998. Lectins: Carbohydrate-Specific Proteins That Mediate Cellular Recognition. *Chem. Rev*. 1998, 98, 637–674
45. Sharon, N., and H. Lis. 2004. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. *Glycobiology*. 14:53R–62R.
46. Sharon M. Kelly, Thomas J. Jess, Nicholas C. Price, 2005. How to study proteins by circular dichroism. *BBA*. 1751:119-139.
47. Sharon, N. Carbohydrate-specific reagents and biological recognition molecules. 2007. *J. Biol. Chem*. 282 2753–2764.
48. Sharon, N. 2008. Lectins: past, present and future. *Biochem. Soc. Trans*. 36:1457–1460.
49. Sinha, S. Gupta, G; Vijayan, M. y A. Surolia. 2007. Subunit Assembly of plant lectins. *Curr. Op. Struc. Biol*. 17:498-505.
50. 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.
51. Transue Thomas R., Smith Alexander K., Mo Hanqing, Goldstein Irwin J. and Saper Mark. A. 1997. Structure of benzyl T-antigen disaccharide bound to *Amaranthus caudatus* agglutinin. *Nat. Struct. Biol*. 4, 10.
52. Van Damme E.J., Barre A, Rougé P, Peumans W.J. 2004. Cytoplasmic/nuclear plant lectins: a new story. *Trends Plant Sci*. 9:484–489
53. Van Damme E.J., Nausicaa L, Peumans W.J. 2008. Plant Lectins. In: Kader JC, Delseny M., editors. *Advances in botanical research*, vol 48. Elsevier Ltd, San Diego. Pp 107–209.
54. Van Holle S, Smagghe G, Van Damme EJM. Overexpression of *Nictaba*-Like Lectin Genes from *Glycine max* Confers Tolerance toward *Pseudomonas syringae* Infection, Aphid Infestation and Salt Stress in Transgenic Arabidopsis Plants. *Frontiers in Plant Science*. 2016;7:1590. doi:10.3389/fpls.2016.01590.

55. Wood, K. M. Stone, G. y Peppas, N. A. 2008. Wheat Germ Agglutinin Functionalized Complexation Hydrogels for oral Insulin Delivery. *Biomacromol.* 9:1293-1298.
56. 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.
57. Wright C.S. 1974. Non-crystallographic Symmetry in the crystal dimer of wheat germ agglutinin. *J. Mol. Bio.* 87:835-841.
58. Wright, C. S. 1977. The Crystal Structure of Wheat Germ Agglutinin at 2.2 Å Resolution. *J. Mol. Biol.* 111:439-457.
59. 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.
60. 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.
61. 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.
62. 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.
63. Wright C.S.1992. Crystal structure of a wheat germ Agglutinin/Glycophorin-Sialoglycopeptide Receptor Complex. *J. of Biol. Chem.* 267. 20: 14345-14352.
64. Wright C.S., Gavalines F. y Peterson D.L.1984. Primary structure of wheat germ agglutinin isolectine 2. Peptide order deduced from X-Ray structure. *Biochem.* 23:280-287.
65. 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.
66. Wright C.S., Olafsdottir S. 1986. Structural differences in the two major wheat germ agglutinin isolectins. *J. of Biol. Chem.* 261, 16:7191-7195.
67. Xia B, Kowar ZS, Ju T, Alvarez RA, Sachdev GP, Cummings RD. 2005. Versatile Fluorescent derivatization of glycans for glycomic analysis. *Nat Methods* 2:845–850