

03081



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

**ANÁLISIS BIOQUÍMICO Y ESTRUCTURAL DE UNA  
PROTEÍNA DE TRANSFERENCIA DE LÍPIDOS AISLADA  
DE SEMILLAS DE AMARANTO**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTOR EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA BÁSICA**

**P R E S E N T A**

**MARÍA DEL CARMEN RAMÍREZ MEDELES**

**ASESOR: DR. MANUEL SORIANO GARCÍA  
INSTITUTO DE QUÍMICA, UNAM**



**INSTITUTO  
DE QUÍMICA**

**MÉXICO D.F.**

**ENERO 2004**



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

## DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMEDICAS

pdcb/grad/121Jur/2003

### INSTITUTO DE QUÍMICA

ING. LEOPOLDO SILVA GUTIERREZ  
Director General de Administración  
Escolar, U.N.A.M.  
Presente

Por medio de la presente me permito informar a usted que en la reunión del Subcomité Académico del Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas que tuvo lugar el 18 de junio de 2003, se acordó designar el siguiente jurado para examen de Doctorado en Investigación Biomédica Básica de la M. en C. **MARÍA DEL CARMEN RAMÍREZ MEDELES** con N° de cuenta 9580049-9 y N° de expediente 30951133, con la tesis titulada: "**Caracterización Bioquímica y Estructural de una Proteína de Transferencia de Lípidos Aislada de Semillas de Amaranto**", dirigida por el Dr. Manuel Soriano García.

Presidente: Dr. José Edgardo Escamilla Marván  
Secretario: Dr. Jaime Mas Oliva  
Vocal: Dr. Manuel Soriano García  
Vocal: Dr. Alejandro Fernández Velasco  
Vocal: Dr. Roberto A. Arreguín Espinosa  
Suplente: Dr. Alejandro Sosa Peinado  
Suplente: Dr. Enrique García Hernández

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: María del Carmen

Ramírez Medeles

FECHA: 29/07/2004

FIRMA: [Firma]

Atentamente

**"Por mi raza hablará el espíritu"**

Cd., Universitaria, D. F. 17 de noviembre de 2003

Coordinador

Dr. Jesús Javier Espinosa Aguirre

## RECONOCIMIENTOS

Esta tesis es producto no sólo del trabajo personal sino también del esfuerzo y contribuciones de varias personas, a quienes expreso mi sincero agradecimiento

Agradezco el apoyo genuino de los doctores Manuel Soriano y Abel Moreno para lograr este proyecto. ¡Muchas gracias!

Agradezco a la Dra. Nora Vasco, entrañable compañera del laboratorio, por haber compartido conmigo sus conocimientos sobre las proteínas de amaranto.

Mi agradecimiento especial al Dr. Manuel Aguilar, del Instituto de Neurobiología de la UNAM, quien hizo un minucioso y excelente trabajo para obtener la secuencia de la nsLTP1 de amaranto. Agradezco también su gentileza y experta asesoría en las técnicas de purificación por HPLC.

Agradezco el apoyo generoso del Dr. Víctor M. Bolaños García para llevar a cabo los experimentos de fluorescencia y dicroísmo circular en las instalaciones del Medical Research Council, en Cambridge, Reino Unido. Agradezco también sus valiosos comentarios y el entusiasmo que siempre mostró por este trabajo.

El Dr. Ricardo Nuñez Miguel (del Departamento de Bioquímica de la Universidad de Cambridge, Reino Unido) hizo una valiosa contribución en el modelado de la nsLTP1.

Mi agradecimiento sincero a la M. en C. Alma Rosa Cortés, entrañable compañera y amiga de la UAM, por su paciencia y las interminables sesiones que dedicó en la preparación de muchas de las figuras y en la edición del texto.

Agradezco la gentileza de los doctores Zhiruhi Lian (de la Compañía Shire Biologics, Inc, en MA, EUA) y Len Packman (del Medical Research Council, en Cambridge, Reino Unido), quienes llevaron a cabo los análisis por espectrometría de masas de las proteínas de amaranto.

Agradezco el apoyo y gentileza de los doctores Adela Rodríguez, Roberto Arreguín y Barbarín Arreguín al facilitarme el uso de equipo para purificar las proteínas de amaranto. Mi agradecimiento especial a las doctoras Adela Rodríguez y Alejandra Hernández por su asesoría en las técnicas de purificación por HPLC.

Agradezco a la Dra. Cristina Mapez, especialista en amaranto e investigadora del Jardín Botánico de la UNAM, por haber identificado la especie de amaranto y proporcionarme valiosa información sobre esta planta ¡Muchas gracias por su gentileza!

Agradezco los valiosos comentarios de los integrantes del jurado de esta tesis, así como la asesoría y contribuciones del Dr. Enrique García en el análisis de DC.

Mi agradecimiento especial a la Universidad Autónoma Metropolitana por apoyarme siempre para realizar el posgrado, especialmente el M. en C. Norberto Manjarrez, actual rector de la Unidad Xochimilco, ¡Muchas gracias!

Mi agradecimiento sincero a la Dra. Esperanza García, amiga de siempre.

Finalmente, ¡muchas gracias! a los amigos y compañeros de laboratorio: César Reyes, David Jaúregui, Pablo Reyes, Carmen Oliver y Eduardo, con los que compartí muchas horas gratas de trabajo en el laboratorio.

**Para mi hijo Rodrigo**

*But propt on beds of amaranth and moly,  
How sweet . . . .  
To watch the long bright river drawing slowly  
His waters from the purple hill -  
(Tennyson, 'Song of the Lotos-eaters')*

## ABREVIATURAS

AcN	acetonitrilo
C-terminal	carboxilo terminal
CAPS	ácido 3-[ciclohexilamino]-1-propano sulfónico
DC	dicroísmo circular
3D	tridimensional
IEF	enfoque isoelectrico
ESI-MS	electrospray ionization mass spectrometry
MALDIT-TOF	matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight
MS	espectrometría de masas
nsLTPs	non specific lipid transfer proteins
nsLTPs1	nsLTPs tipo 1
nsLTPs2	nsLTPs tipo 2
N-terminal	amino terminal
PMSF	fluoruro de fenil metil sulfonilo
<i>pI</i>	punto isoelectrico
1-Pyr-C12	ácido 1-pireno-dodecanoico
RMN	resonancia magnética nuclear
RP-HPLC	cromatografía de alta resolución en columna de fase reversa
SDS	dodecil sulfato de sodio
SDS-PAGE	electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS
TFA	ácido trifluoroacético
PVDF	difluoruro de polivinilideno

## RESUMEN

Las plantas superiores utilizan complejos mecanismos de defensa para resistir el ataque por patógenos y herbívoros predadores y adaptarse a las condiciones ambientales adversas. Dentro del arsenal de péptidos y proteínas de defensa de las plantas, las nsLTPs (por sus siglas en inglés, nonspecific Lipid Transfer Protein) tienen un lugar especial debido a su función potencial en la protección de las plantas a las condiciones de estrés físico y biológico.

Las nsLTPs de plantas se distinguen por su capacidad de unir y transferir entre membranas una amplia gama de ligandos hidrófobos *in vitro*. Se cree que estas proteínas transportan compuestos lipídicos para la síntesis de cutina, un componente de la cubierta hidrofóbica que protege las superficies de plantas y semillas. Algunas nsLTPs exhiben alta eficacia contra hongos y bacterias *in vitro*, y otras son sobreexpresadas tras la exposición de la planta a condiciones ambientales adversas como sequía, frío, metales pesados y alta salinidad. Estas posibles funciones aún no han sido demostradas *in vivo*. La relación de la actividad antimicrobiana y antifúngica de las nsLTPs de plantas con su función de transferencia de lípidos es, sin embargo, uno de los mayores enigmas de estas proteínas.

Se ha estudiado un número importante de nsLTPs de varias especies de plantas. En el genoma de *Arabidopsis thaliana* se han identificado más de 40 genes que codifican nsLTPs y un número menor en otras plantas. Se conocen alrededor de diez estructuras 3D de nsLTPs aisladas de arroz, maíz, trigo y cebada y más de 150 secuencias de esta familia de proteínas; sin embargo, sólo se han aislado unas pocas nsLTPs de fuentes naturales.

La magnífica adaptación de la planta de amaranto a las condiciones climáticas adversas, además de la alta resistencia a patógenos de algunos cultivos para grano ofrece una oportunidad para investigar las posibles funciones de las nsLTPs en la defensa de la planta. En este trabajo se aisló y caracterizó una nsLTP de semillas de amaranto de la especie *Amaranthus hypochondriacus*, un cultivo originario de México. La proteína tiene una masa de 9.747 kDa, medida por espectrometría de masas. El análisis de la secuencia completa<sup>1</sup>, determinada por degradación de Edman automática, reveló que la proteína aislada se compone de una cadena polipeptídica de 94 residuos de aminoácidos. La secuencia tiene la

---

<sup>1</sup> La secuencia se ha depositado en el banco de datos de proteínas (No. de acceso en SwissProt: P83167).

firma que distingue a la familia nsLTP de plantas del banco de dominios de PROSITE, es idéntica a la de una nsLTP1 de *Amaranthus caudatus* (LTP\_AMACA) y comparte una identidad de secuencia de 22 a 57 % con nsLTPs y proteínas relacionadas de otras especies de plantas. Los espectros de dicroísmo circular de la proteína corresponden a una estructura secundaria predominantemente  $\alpha$  helicoidal. Los ensayos de unión y desplazamiento de un lípido fluorescente indicaron que la proteína es capaz de unir ácidos grasos de 12 a 18 átomos de C. Los modelos 3D de la proteína libre y unida con estearato sugieren un plegamiento global similar al de la familia nsLTP tipo 1.

La nsLTP1 estudiada aquí es la primera proteína de su tipo identificada en la especie *Amaranthus hypochondriacus*, y se añade al listado de otras proteínas de defensa aisladas de amaranto que exhiben actividad inhibidora de proteasas y  $\alpha$  amilasas de insectos. La información obtenida en este trabajo será útil en las investigaciones de la estructura 3D y actividad biológica de esta proteína.

El presente manuscrito comienza con un breve relato del cultivo, uso y orígenes del amaranto. El capítulo 2 introduce al tema central de este trabajo: la función de la cutícula hidrofóbica de las plantas y la posible contribución de las nsLTPs en el transporte de lípidos para la síntesis de esta estructura. Después se presenta un breve panorama de la posible función de estas y otras proteínas pequeñas en los mecanismos de defensa de la planta. La última parte del capítulo destaca las características de la familia nsLTPs de plantas y concluye con los objetivos del trabajo. El capítulo 3 describe los procedimientos experimentales. En el capítulo 4 se presentan los resultados con una discusión breve de los residuos que influyen en el plegamiento global de las nsLTPs y los que participan en la unión de ligandos. El capítulo concluye con una discusión general. En el último capítulo se exponen brevemente algunas perspectivas futuras del presente tema de investigación.



## CONTENIDO

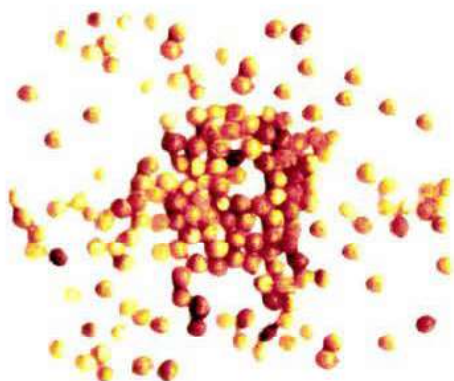
<b>RECONOCIMIENTOS</b> .....	<i>i</i>
<b>ABREVIATURAS</b> .....	<i>iv</i>
<b>RESUMEN</b> .....	<i>v</i>
<b>CAPÍTULO 1: CULTIVO DE AMARANTO (HUAHUTLI)</b> .....	1
<b>CAPÍTULO 2: PROTECCIÓN Y DEFENSA DE LAS PLANTAS</b> .....	7
2.1 Funciones de los lípidos en el desarrollo y protección de las plantas .....	7
2.2 Función de las nsLTPs y otras proteínas en la defensa de las plantas .....	10
2.3 La familia nsLTP de plantas .....	15
<b>OBJETIVOS</b> .....	18
<b>CAPÍTULO 3: MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	19
3.1 Materiales .....	19
3.2 Obtención de harina de semillas de amaranto y de extractos acuosos de proteínas .....	20
3.3 Separación electroforética de proteínas por SDS-PAGE .....	21
3.4 Purificación parcial de proteínas por filtración en gel .....	23
3.5 Purificación de la nsLTP1 de amaranto por RP-HPLC .....	24
3.6 Análisis de secuencia de la nsLTP1 de amaranto .....	25
3.7 Análisis de la nsLTP1 de amaranto por espectrometría de masas .....	26
3.8 Experimentos de dicroísmo circular .....	26
3.9 Ensayo de unión de lípidos .....	27
3.10 Alineación de secuencias de nsLTPs de plantas .....	28
3.11 Modelado de la estructura 3D de la nsLTP1 de amaranto .....	28
<b>CAPÍTULO 4: RESULTADOS</b> .....	29
4.1 Extracción y purificación parcial de proteínas de semillas de amaranto solubles en agua .....	29
4.2 Identificación de la proteína de 10 kDa y purificación hasta homogeneidad electroforética .....	32
4.3 Análisis de la nsLTP1 de amaranto por espectrometría de masas .....	35
4.4 Análisis de la secuencia completa de la nsLTP1 de amaranto .....	36
4.5 Comparación de la nsLTP1 de <i>A. hypochondriacus</i> con proteínas homólogas .....	39
4.6 Secuencia distintiva de la familia nsLTPs de plantas .....	42
4.7 Análisis de la estructura secundaria de la nsLTP1 de amaranto por dicroísmo circular .....	44
4.8 Plegamiento global de la familia nsLTP de plantas y unión de lípidos .....	47

4.9 Ensayo de unión de lípidos por espectroscopia de fluorescencia .....	49
4.10. Modelos 3D de la nsLTP1 de amaranto .....	51
4.11. Discusión .....	62
Posible identidad de la proteína de 9.9 kDa detectada por espectrometría de masas .....	66
Isoformas de nsLTPs de plantas.....	67
Rendimiento de la nsLTP1 de amaranto .....	69
Experimentos futuros para investigar las características estructurales de la nsLTP1 de amaranto y de unión con ligandos hidrófobos.....	70
Experimentos preliminares de purificación de proteínas de amaranto por intercambio iónico .....	71
<b>CAPÍTULO 5: PERSPECTIVAS EN LA INVESTIGACIÓN DE LAS FUNCIONES DE nsLTPs DE PLANTAS .....</b>	<b>73</b>
5.1 La familia de las elicinas .....	75
5.2 Unión de nsLTPs y elicinas con receptores comunes .....	77
5.3 Posible interacción de elicinas y nsLTPs en la defensa de las plantas .....	78
5.4 Posible participación de las nsLTPs en la interacción de patógenos con plantas .....	80
<b>REFERENCIAS .....</b>	<b>82</b>
<b>ANEXOS DE PUBLICACIONES .....</b>	<b>92</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS</b>	
Tabla 1.1 Composición aproximada de granos y vegetales crudos de amaranto .....	5
Tabla 3.1 Composición de geles de tricina (15% de acrilamida) .....	22
Tabla 4.1 Composición de aminoácidos de la nsLTP1 de amaranto derivada de la secuencia .....	39
Tabla 4.2 Predicción de la estructura secundaria de la nsLTP1 de amaranto .....	46
Fig. 1.1 Relación filogenética de la familia de plantas del orden <i>Caryophyllales</i> .....	2
Fig. 2.1 Representación de una sección transversal de células epidérmicas secretoras de cera .....	7
Fig. 2.2 Rutas fotosintéticas de la cera en la célula epidérmica .....	8
Fig. 2.3 Estructuras representativas de defensinas de insectos, plantas y mamíferos .....	11
Fig. 2. 4 Superposición de las coordenadas del esqueleto de criptogeína y de una nsLTP1 de trigo .....	13
Fig. 2.5 Componentes principales y estructuras modelo de polímeros de cutina y suberina .....	16
Fig. 2.6 Representación del patrón de apareamiento de puentes disulfuro entre residuos de cisteína de nsLTPs 1 y 2.....	17
Fig. 2.7 Estructura 3D de una nsLTP2 de trigo unida con una molécula de fosfolípido .....	17
Fig. 4.1 Patrón electroforético de proteínas de semilla de amaranto solubles en agua .....	29
Fig. 4.2 Cromatograma de filtración en gel del extracto de proteínas de amaranto.....	30

Fig. 4.3 Perfil de elución de estándares de proteína en Sephacryl S200 HR .....	31
Fig. 4.4 Patrón electroforético en gel de poliacrilamida (15%) de proteínas pequeñas de semilla de amaranto, separadas por filtración en gel. ....	31
Fig. 4.5 Separación por RP-HPLC de proteínas pequeñas parcialmente purificadas por filtración en gel .....	33
Fig. 4.6 Patrón de elución por RP-HPLC de proteínas pequeñas purificadas en Sephacryl S200 HR .....	34
Fig. 4.7 Perfil de elución de la nsLTP1 de amaranto en columna C4 de RP-HPLC .....	34
Fig. 4.8 Purificación de la nsLTP1 de amaranto hasta homogeneidad electroforética .....	35
Fig. 4.9 Espectro de masas de la nsLTP1 de amaranto .....	36
Fig. 4.10 Separación por RP-HPLC de proteínas pequeñas con un gradiente no lineal de acetonitrilo .....	36
Fig. 4.11 Separación de los péptidos tripticos de la nsLTP1 reducida y alquilada, en columna C18 de RP-HPLC.....	37
Fig. 4.12 Estrategia para determinar la estructura primaria de la nsLTP1 de <i>A. hypochondriacus</i> .....	38
Fig. 4.13 Alineación de secuencias de nsLTPs maduras .....	41
Fig. 4.14 Alineación de secuencias que distinguen a la familia nsLTP de plantas del banco de dominios de PROSITE .....	43
Fig. 4.15 Estructura 3D de una nsLTP1 de maíz en solución .....	42
Fig. 4.16 Representación de las conexiones de cisteínas en los cuatro puentes disulfuro de nsLTPs1 de plantas .....	44
Fig. 4.17 Alineación de secuencias de estructuras de nsLTPs de maíz, arroz y amaranto en formato de JOY .....	45
Fig. 4.18 Espectro de dicroísmo circular de la nsLTP1 de amaranto .....	45
Fig. 4.19 Vista transversal de la cavidad hidrofóbica de una nsLTP1 de trigo .....	48
Fig. 4.20 Unión de 1-Pyr-C12 con la nsLTP1 de amaranto determinada por fluorescencia .....	49
Fig. 4.21 Desplazamiento de 1-Pyr-C12 por ácido esteárico del sitio de unión de la nsLTP1 de amaranto .....	50
Fig. 4.22 Representación de las coordenadas del esqueleto de C- $\alpha$ del modelo 3D de la nsLTP1 de amaranto .....	51
Fig. 4.23 Comparación de estructuras de nsLTPs de amaranto y arroz .....	52
Fig. 4.24 Superposición de las coordenadas del esqueleto del modelo de la nsLTP1 de amaranto y de la estructura 3D de una nsLTP1 de arroz .....	53
Fig. 4.25 Representación del modelo 3D de la nsLTP1 de amaranto unida con estearato .....	54
Fig. 4.26 Residuos que delimitan los extremos de las cavidades de nsLTPs de arroz y amaranto .....	56
Fig. 4.27 Vista transversal de las cavidades de nsLTPs1 de arroz y maíz .....	57
Fig. 4.28 Representación de las cavidades hidrofóbicas de nsLTPs1 de plantas .....	58
Fig. 4.29 Vista parcial de la cavidad del modelo de la nsLTP1 de amaranto y posiciones relativas de otros elementos de estructura secundaria .....	60

Fig. 4.30 Interacciones potenciales entre una molécula ordenada de agua y residuos de Tyr 82 y Lys 38 en la cavidad de la nsLTP1 de amaranto.....	61
Fig. 4.31 Interacciones potenciales entre una molécula ordenada de agua y residuos de Ser 83 y Cys 51 en la cavidad de la nsLTP1 de amaranto .....	62
Fig. 4.32 Diagrama de la estructura del ácido 1-pireno-dodecanoico .....	64
Fig. 4.33 Espectro de masas de proteínas de amaranto de 7 kDa .....	68
Fig. 4.34. Patrón electroforético de extractos acuosos de proteínas de amaranto dializados con soluciones buffer de pH 6.5 y 5 .....	72
Fig. 5.1 Rutas de señalización inducidas por elicitinas .....	74
Fig. 5.2 Eventos iniciales en la señalización de elicitinas .....	75
Fig. 5.3 Esquema de un modelo que explica la interacción cooperativa del complejo elicitina-esterol con el receptor de elicitinas .....	77
Fig. 5.4 Representación de la estructura 3D del complejo elicitina-ergosterol .....	78
Fig. 5.5 Posibles eventos en el diálogo entre plantas con oomicetos y hongos .....	79
Fig. 5.6 Posible participación de las nsLTPs en la interacción entre hongos patógenos y plantas .....	81

## CAPÍTULO 1



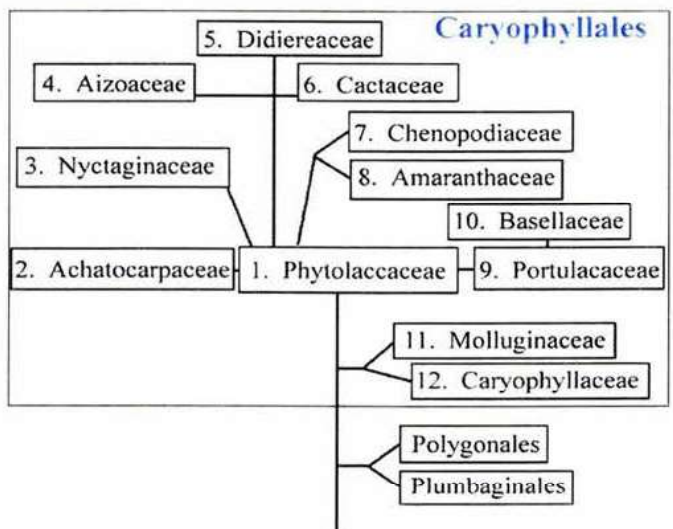
### CULTIVO DE AMARANTO (HUAUHTLI)

La expansión de la agricultura prehistórica en Mesoamérica, basada principalmente en la domesticación de maíz y frijol, coincidió con la dispersión de los antiguos pobladores de esta región hace unos 3000 a 1500 años AP [1]. El cultivo y domesticación del amaranto fue también fundamental en la agricultura de los antiguos pobladores mayas, aztecas e incas. Los hallazgos arqueológicos de semillas de *A. cruentus* en Tehuacan, Puebla, con antigüedad de unos 4000 a 6000 años AP, y de semillas de *A. hypochondriacus* de unos 1500 a 2000 años de antigüedad, dan evidencia del origen de estos cultivos en México [revisado en ref. 2].

Además de que era una fuente importante de alimento, el grano de amaranto era muy apreciado por los incas, mayas y aztecas, quienes lo consideraban “más valioso que el oro”. Los aztecas consumían el amaranto [ellos lo llamaban *huauhtli*] en atoles, tortillas, tamales y otros alimentos. Mezclaban con miel -y sangre humana- el grano reventado (como se hace ahora con las famosas “alegrías”, pero sólo con miel) y lo moldeaban en forma de pájaros, serpientes, montañas y dioses que consumían durante las ceremonias religiosas y los rituales de sacrificios humanos. Cuando los aztecas celebraban el principal ritual del año, dedicado a Huitzilopochtli (dios de la guerra), el centro de la ceremonia consistía en un enorme ídolo del dios confeccionado con masa de *huauhtli*, miel y sangre humana que

se paseaba por la ciudad y los suburbios en una tarima, para ser finalmente despedazado y comido por la gente con “reverencia, temor y lágrimas”. Las hojas de la planta también tenían un lugar importante en las ceremonias religiosas. Con ellas se elaboraban tamales denominados *huauhquiltamalli* para ofrecerlos al dios del fuego. Estas costumbres motivaron la prohibición del cultivo de amaranto por los españoles durante la conquista, como una forma más de dominación y exterminio de su cultura. Sin embargo, la magnífica adaptación del amaranto al clima de México, su gran resistencia a las heladas y plagas y el sentido tradicionalista del pueblo impidieron su extinción. Actualmente, el cultivo de amaranto ha vuelto a ser valorado en México y otros países en desarrollo, así como en potencias económicas como los EUA.

La familia *Amaranthaceae* está constituida por especies que conforman una de las líneas de evolución que sucedieron dentro del orden *Caryophyllales*, al que pertenece esta familia. Se considera que su posible antecesor directo podría haber sido algún miembro de la familia *Phytolaccaceae*, pasando luego por características similares a las de la actual *Chenopodiaceae*, hasta alcanzar el grado evolutivo que actualmente presenta [Fig. 1.1]. La familia *Amaranthaceae* (dicotiledóneas) está compuesta de cerca de 60 géneros y unas 800 especies distribuidas en prácticamente todo el mundo. Son plantas herbáceas anuales, la mayoría de origen tropical, pero se adaptan bien a los climas templados y algunas especies se han adaptado para soportar climas extremos y suelos alcalinos y erosionados, mientras que otras especies soportan altitudes considerables.



**Figura 1.1.** Relación filogenética de la familia de plantas del orden *Caryophyllales*. [Tomado de: *The tree of life*, suplemento especial de *Science* en la red, julio de 2003].

Dentro del género *Amaranthus*, constituido por unas 60 especies distribuidas por todo el mundo, se incluyen las especies productoras de grano, de colorantes y las especies consumidas como vegetales y las de ornato. Las especies productoras de grano son fácilmente reconocidas por su alta producción de semilla, mayor tamaño de la inflorescencia y de la planta (algunas sobrepasan los 2 m) y por la semilla de color claro. A nivel mundial, se consideran tres especies cultivadas para la producción de grano: *A. hypochondriacus*, *A. cruentus* y *A. caudatus*, cada una de ellas con su especie silvestre más relacionada: *A. powellii*, *A. hybridus* y *A. quitensis*, respectivamente [revisado en ref. 3].



Cosecha de Amaranto en Pátzcuaro

*A. hypochondriacus* llega a alcanzar hasta 3 m de altura. La inflorescencia es de gran tamaño, con espigas y panículas laterales, es muy densa, erecta y espinosa. Las semillas son de color blanco, dorado, café y negro; las de coloración clara son las que se emplean para grano. *A. cruentus* es de menor tamaño que *A. hypochondriacus*, llega a alcanzar unos 2 m de altura. La inflorescencia, menos espinosa que la de *A. hypochondriacus*, presenta espigas suaves y laxas en la parte inferior y panículas en la parte superior. Las semillas pueden ser negras, cafés, blancas o amarillas [3]. La planta de *A. caudatus* presenta -como las otras especies de grano- un amplio espectro de forma y color. Sin embargo, muestra variaciones en la estructura de la inflorescencia y color de la semilla que no se observan en las otras especies, como la inflorescencia en forma de cauda y las semillas color marfil con los bordes rojos [3].



*A. caudatus*



*A. hybridus*

Tomando como base la distribución geográfica y las características morfológicas de los cultivos de grano de amaranto, Sauer propuso, en 1967 [4], dos hipótesis alternativas para el origen de estas especies [revisado en ref. 2]. La hipótesis polifilética supone que los tres cultivos de amaranto se originaron independientemente de ancestros separados en diferentes partes del mundo. La hipótesis alternativa presupone que un solo ancestro progenitor originó a las demás especies. En ambas hipótesis, los progenitores

implicados en la evolución de los tres cultivos son *A. hybridus*, *A. powellii* y *A. quitensis*. Según la hipótesis monofilética, *A. hybridus* originó a *A. cruentus* en América Central; esta especie migra hacia el norte y se cruza repetidamente con *A. powellii* dando origen a *A. hypochondriacus*. La migración de *A. cruentus* hacia el sur y cruzamientos reiterados con *A. quitensis* daría origen a *A. caudatus*. La hipótesis de un antecesor remoto común explicaría la presencia de caracteres comunes en las tres especies cultivadas. Los estudios recientes de variación isoenzimática entre especies silvestres y cultivadas [5] muestran que, en general, las especies cultivadas están más relacionadas entre sí (identidad genética,  $I = 86\%$ ) y con *A. hybridus* ( $I = 78\%$ ) que con sus presuntos progenitores silvestres *A. powellii*



y *A. quitensis*, con los que tienen identidad genética de 56 y 71%, respectivamente. Esto implicaría un solo evento de domesticación con *A. hybridus* como antecesor común [4,5; revisado en ref. 2]. La hipótesis del origen monofilético de las tres especies de amaranto productoras de granos se apoya también en los hallazgos arqueológicos realizados por MacNeish en el Valle de Tehuacán. Las excavaciones realizadas en la cueva de Coxcatlán, Puebla, indican una antigüedad aproximada de 6000 años AP para *A. cruentus* y alrededor de 1500 años para *A. hypochondriacus* [revisado en ref. 2]. Sin embargo, se desconoce si *A. powelli* y *A. quitensis* fueron originados también por migración de *A. hybridus* hacia el norte y sur, respectivamente, del Continente Americano.

El amaranto tiene la ruta fotosintética C4 (igual que las plantas de maíz y sorgo), que le permite utilizar eficientemente la luz solar y los nutrientes a altas temperaturas. El rendimiento de grano es comparable al de arroz y maíz, pero el amaranto resiste la sequía mejor que el maíz. El valor nutritivo del grano de amaranto (véase Tabla 1.1) es uno de los más altos comparado con el de los cereales de la dieta común [2]. Por su alto contenido de proteínas con un balance de aminoácidos que se acerca mucho al estándar ideal de 100% establecido por la FAO/OMS, el cultivo de este grano ha vuelto a ser considerado como una fuente importante para la dieta humana [2,3].

**Tabla 1.1.** Composición aproximada de granos y vegetales crudos de amaranto (porciones de 100 g)\*

Componente	Vegetal	Grano
Humedad	86.9	9.0
Proteína	3.5	15.0 g
Grasa	0.5	7.0 g
Carbohidratos totales	6.5	63.0 g
Fibra	1.3	2.9 g
Calorías	36	391 g
Fósforo	67 mg	477 mg
Hierro	3.9 mg	---
Potasio	411 mg	---
Vitamina A	6 100 u.i	0
Riboflavina	0.16 mg	0.32 mg
Niacina	1.4 mg	1.0 mg
Ácido ascórbico	80 mg	3.0 mg
Tiamina (vit. B <sub>1</sub> )	0.08 mg	0.14 mg
Ceniza	2.6 g	6 mg
Calcio	267 mg	490 mg

\*Compilación de J.N. Cole, *Amaranth: from the Past, for the Future*, Rodale Press, Emmaus PA, 1979.

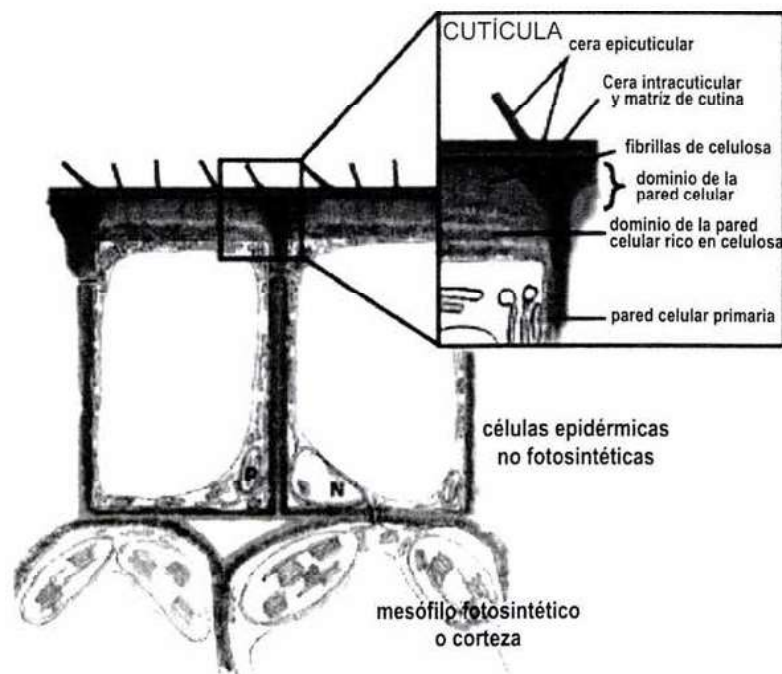
El valor nutritivo de los granos, estimado por el contenido de proteína, se establece como la relación entre los aminoácidos esenciales y los aminoácidos recomendados por la FAO/OMS, multiplicada por 100. De esta forma, con excepción de la soya (valor nutritivo 68-89%, con 37% de proteína), el valor nutritivo del amaranto (68-87%) supera al del trigo (47%, con 14% de proteína), arroz (69%, 7% de proteína) y maíz (35% con 9% de proteína) [6].

## CAPÍTULO 2

### PROTECCIÓN Y DEFENSA DE LAS PLANTAS

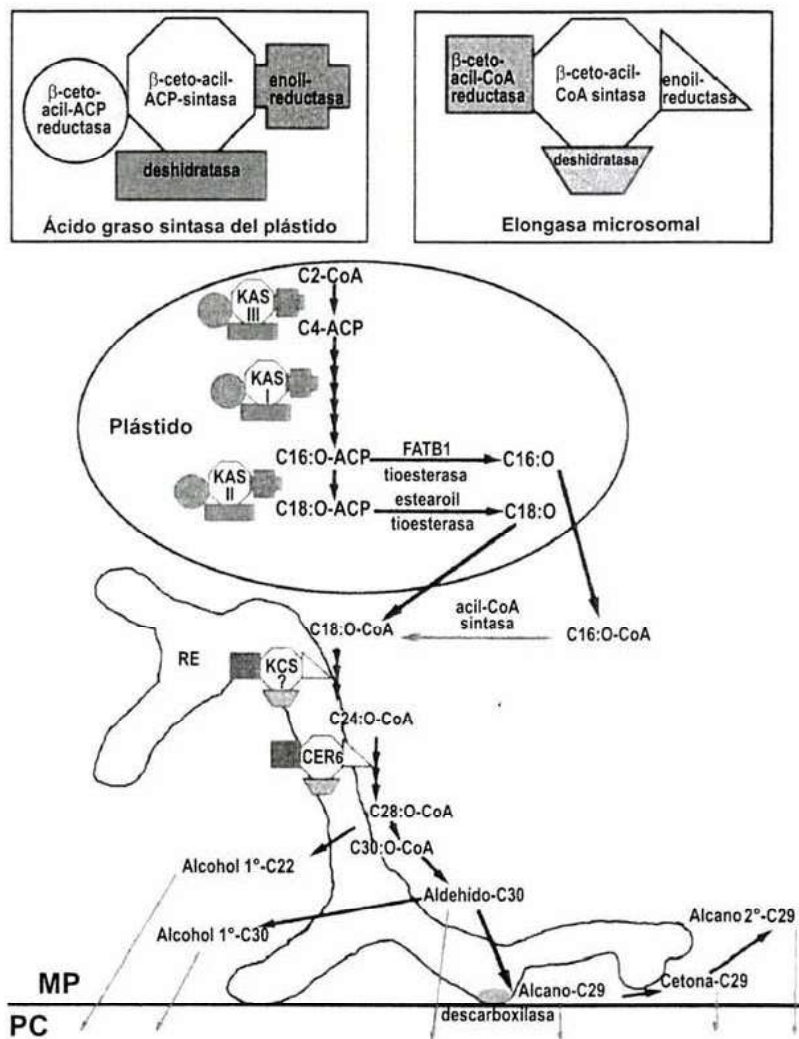
#### 2.1 Funciones de los lípidos en el desarrollo y protección de las plantas

Los ácidos grasos de cadena muy larga ( $>C_{20}$ ) son los componentes principales de la cutícula cerosa que cubre las semillas y protege las partes aéreas de las plantas de agresiones físicas como radiación UV, ventiscas, heladas y altas temperaturas [7]. Además de restringir la pérdida de agua, disminuir la retención de agua de la superficie, la acumulación de polen y contaminantes, la cutícula constituye una barrera de defensa contra microorganismos patógenos [8] y participa en las complejas interacciones de la planta con insectos [9]. La membrana cuticular se compone de la cera intracuticular amorfa embebida en polímeros de cutina, la cutícula propiamente dicha así como de cristaloides epicuticulares de cera que forman la película externa de esta cubierta (Fig.2.1).



**Figura 2.1** Representación de una sección transversal de células epidérmicas secretoras de cera. El diagrama muestra los componentes de la cutícula, los dominios de la pared celular, así como las células epidérmicas no fotosintéticas. [Adaptado de Kunst y Samuels, 2003; ref. 7].

La cera cuticular está formada de compuestos alifáticos de cadena larga ( $C_{12}$ - $C_{18}$ ) derivados de ácidos grasos de cadena muy larga ( $>C_{20}$ ) [7]. La biosíntesis de la cera comienza con la de los ácidos grasos en los apoplastos, de ahí son transportados hacia la membrana plasmática para ser exportados fuera de la célula hacia los sitios de la biosíntesis de la cutícula (Fig.2.2).



**Figura 2.2.** Rutas fotosintéticas de la cera en la célula epidérmica. La síntesis de ácidos grasos de hasta  $C_{18}$  se lleva a cabo en el plástido. La elongación de éstos en ácidos grasos de cadena muy larga toma lugar en asociación con las membranas del retículo endoplásmico (RE). Cuatro enzimas actúan secuencialmente para llevar a cabo la adición de 2 unidades de C en la sintasa de ácidos grasos del plástido y la elongasa de ácidos grasos del RE. Las reacciones de reducción y descarboxilación de acilo pueden llevarse a cabo en los dominios del RE estrechamente asociados con la membrana plasmática (MP) y la pared celular (PC). [Adaptado de Kunst y Samuels, 2003; ref. 7].

Los mecanismos precisos y los componentes moleculares implicados en el transporte de lípidos para la síntesis de la cutícula son un enigma. La presencia de proteínas intracelulares que unen lípidos y fosfolípidos en células de mamíferos, llevó a la búsqueda de proteínas con función similar en las plantas (revisado en ref. 10). La ubicuidad de las llamadas proteínas de transferencia de lípidos (nsLTPs) en el reino vegetal, sugería una posible función de estas proteínas en el transporte intracelular de lípidos para la síntesis de membranas de organelos intracelulares [11]. Sin embargo, varias evidencias experimentales han descartado esta hipótesis y apuntan más bien hacia una posible función de las nsLTPs en la síntesis de la cutícula y en los mecanismos de defensa de la planta. La primera evidencia provino del descubrimiento de un péptido señal de 27 aminoácidos en el N-terminal de una nsLTP de maíz [12], lo cual sugería que las nsLTPs eran sintetizadas como precursores para ser secretadas fuera de la célula [13]. El análisis del patrón de expresión de un gen que codifica una nsLTP en las primeras etapas de la embriogénesis somática y zigótica en la zanahoria, así como la presencia de la proteína codificada (llamada EP2 por *extracellular protein 2*) en la pared celular y el medio de cultivo de células embriogénicas, llevaron a Sterk y col. [14] a proponer que las nsLTPs podrían transportar monómeros hidrófobos como ácidos grasos, alcoholes grasos e hidroxiácidos grasos -los principales componentes de la cera y el poliéster de cutina- hacia la superficie externa de las células epidérmicas para la síntesis de cutina. Aunque no se ha demostrado aún esta función *in vivo*, esta hipótesis se sustenta con las siguientes evidencias:

1) Varias nsLTPs son capaces de unir diversos lípidos monoacilados con afinidad semejante [15-17].

2) Las nsLTPs se expresan de manera específica en los tejidos epidérmicos de las plantas, especialmente en los órganos que tienen una producción activa de cutina, como hojas, tallos y flores en desarrollo [18-21]. Por ejemplo, en las hojas de brócoli, la principal proteína asociada a la superficie cerosa es una nsLTP [22].

3) El aumento en la expresión de las nsLTPs por exposición de la planta a estrés físico [20] o a metales pesados [23] –condiciones que también estimulan la síntesis de cera- es compatible con su posible función en la formación de las capas hidrófobas protectoras en la superficie de la planta.

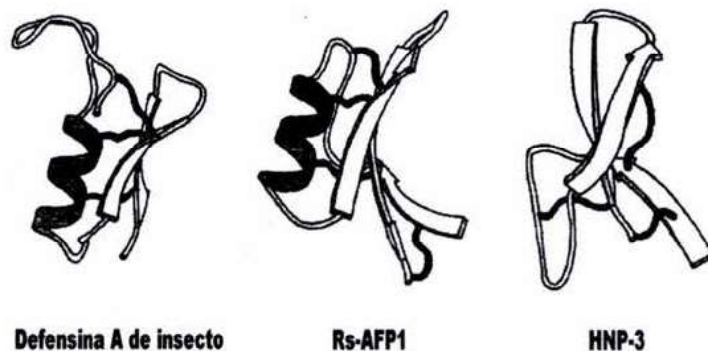
4) Los estudios estructurales y de unión y/o transferencia de lípidos entre membranas *in vitro* indican que las nsLTPs tienen una cavidad hidrófoba suficientemente plástica para acomodar ligandos de longitud y estructura variables como ácidos grasos [17, 24, 25], prostaglandinas [26] y fosfolípidos [17, 24, 27]. Esta baja especificidad por ligandos hidrófobos y la formación de complejos poco estables con ellos, permitiría a las nsLTPs transferir rápidamente los lípidos necesarios para una determinada función en la planta.



## 2.2 Función de las nsLTPs y otras proteínas en la defensa de las plantas

Se ha propuesto que las nsLTPs tienen también una función importante en la defensa de la planta contra patógenos [28, 29] y estrés físico como déficit de agua, salinidad y frío [20, 30, 31]. La sobreexpresión de genes de nsLTPs inducida por estas condiciones se restringe a las partes aéreas de la planta. Esta función es compatible con su supuesta función principal en la síntesis de la cubierta hidrófoba externa de las plantas (Sección 2.1). Las LTPs de mamíferos son sintetizadas también como precursores de mayor peso molecular, sin embargo, muestran más especificidad por tipos de ligandos hidrófobos y exhiben diferencias estructurales notables con las nsLTPs de plantas [32]. La forma madura de las nsLTPs de plantas contiene ocho residuos de cisteína altamente conservados que forman cuatro puentes disulfuro [33], mientras que las LTPs de mamíferos tienen por lo regular un solo residuo de cisteína y son poco frecuentes los residuos de tirosina [32]. En cambio, para la unión de ligandos hidrófobos en las nsLTPs de plantas es fundamental un residuo de tirosina altamente conservado en la región C-terminal [34, 35].

A diferencia de las LTPs, los péptidos antifungales y antimicrobianos conocidos como defensinas, presentes en organismos tan diversos como moluscos [36, 30], plantas [29, 37, 38], insectos y mamíferos [39, 40], comparten características estructurales y funcionales, lo que sugiere un origen ancestral conservado [41]. Estos pequeños péptidos (3 a 5 kDa) catiónicos tienen 6 u 8 residuos de cisteína conectados por 3 ó 4 enlaces disulfuro intramoleculares, pero no están relacionados estructuralmente con las nsLTPs de las plantas. En las defensinas de insectos se distinguen tres regiones distintas: un asa (loop) N-terminal, una hélice  $\alpha$  y una lámina  $\beta$  antiparalela en el C-terminal. En las defensinas de animales predominan las láminas  $\beta$  estabilizadas por tres puentes disulfuro y no contienen hélices. Por su parte, la estructura de las defensinas de las plantas está dominada por una lámina  $\beta$  antiparalela triple y una hélice  $\alpha$  paralela a la estructura  $\beta$  [41]. La figura 2.3 ilustra tres estructuras representativas de las defensinas de insectos, plantas y mamíferos. Las defensinas de las plantas abundan en las capas epidérmicas de la planta y, a semejanza de las nsLTPs, se expresan constitutivamente en las semillas, hojas, tallos y órganos de las flores [41]. Algunos de estos péptidos son inhibidores de  $\alpha$  amilasas de insectos y mamíferos y, posiblemente, evolucionaron para la defensa de la planta contra herbívoros [41].



**Figura 2.3.** Estructuras representativas de defensinas de insectos (defensina A), plantas (Rs-AFPI) y mamíferos (HNP-3). Los tubos sólidos representan los puentes disulfuro: 4 en las defensinas de plantas y 3 en las de insectos y mamíferos. Las defensinas de mamíferos carecen de la hélice alfa. [Adaptado de Broekaert y col. 1995; ref. 41].

La actividad antimicrobiana de las defensinas de insectos y mamíferos se ha explicado por interacción directa de estos péptidos catiónicos con componentes lipídicos de

membranas y subsecuente formación de canales iónicos dependientes de voltaje [39, 40, 42-44]. A diferencia de las defensinas de insectos y mamíferos, las defensinas de plantas no forman poros en membranas artificiales. Los cambios en la permeabilidad iónica que producen estos péptidos en membranas de hongos (p. e. *Neurospora crasa*) podrían estar mediados por su interacción con receptores de la membrana plasmática acoplados a canales iónicos endógenos [45, 46].

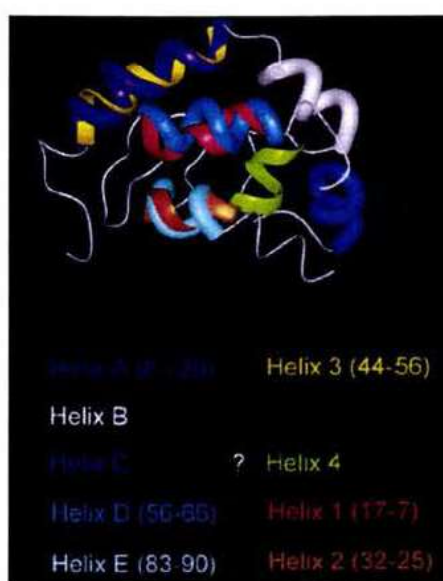
A pesar de que las defensinas y las nsLTPs de plantas no comparten una estructura global, su modo de interacción con células blanco podría tener algunas características afines. Recientemente se ha demostrado que las nsLTPs de plantas interactúan con receptores de membranas plasmáticas que también son receptores de elicitinias [47], un tipo de proteínas pequeñas (~10 kDa) ricas en cisteína, secretadas por oomicetos patógenos de los géneros *Phytophthora* y *Phytium*, que comparten ciertas características estructurales y funcionales con las nsLTPs de plantas [48]. Las elicitinias exhiben una estructura  $\alpha$  helicoidal estabilizada por tres puentes disulfuro que envuelve una cavidad hidrofóbica capaz de unir y acarrear esteroides con alta afinidad; aunque también son capaces de unir fosfolípidos y ácidos grasos [48-50]. Estas proteínas inducen fuertes respuestas de hipersensibilidad (p. e., necrosis de las hojas) asociadas a la inducción de resistencia sistémica no específica en la planta. Las rutas de señales implicadas en las primeras etapas de este proceso involucran el reconocimiento de estos péptidos por proteínas receptoras de membrana [50], lo que da lugar a cambios en la permeabilidad de la membrana a iones  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{H}^+$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{Cl}^-$  y a la producción de especies reactivas de  $\text{O}_2$  [revisado en ref. 47 y 50].

Aunque las elicitinias no tienen una estructura global semejante a la de las nsLTPs, la similitud en la topología de las hélices de ambas familias de proteínas (véase Fig. 2. 4) podría explicar su afinidad semejante por receptores específicos de membrana, los cuales podrían funcionar como detectores de organismos exógenos en la planta para disparar respuestas de defensa [47]. La estructura de la elicitina superpuesta con la de una nsLTP1 de trigo en la figura 2.4 es de la criptogeína producida por *Phytophthora cryptogea*, y se distingue por su alta eficiencia para intercambiar esteroles entre liposomas y micelas [48] e inducir fuertes respuestas de hipersensibilidad en la planta (p. e., muerte celular y resistencia sistémica no específica). Estas características indican que la capacidad de estos



ptidos de unir esteroides está asociada con su actividad natural para inducir respuestas de defensa en la planta [50].

La relación de la actividad antimicrobiana y antifúngica de las nsLTPs de plantas [51,52] con su función de transferencia de lípidos es uno de los mayores enigmas de estas proteínas. Las investigaciones futuras de las acciones aparentemente antagonistas de las nsLTPs y las elicinas en los mecanismos de defensa de la planta (Cap. 5) podrían aportar información valiosa para esclarecer este misterio.



**Figura 2.4.** Superposición de las coordenadas del esqueleto de criptogeína (código PDB: 1bxm) y de una nsLTP1 de trigo (código PDB: 1gh1). Las hélices redondas representan la estructura de la criptogeína, las hélices planas corresponden a la nsLTP1. Abajo se indican las posiciones equivalentes de los residuos de las hélices superpuestas o de los dominios de éstas. Las hélices D y E de la criptogeína (al lado izquierdo) corresponden a las hélices 1 y 2 de la nsLTP1 de trigo en la orientación contraria. [Tomado de Buhot y col. 2001; ref. 47].

Las nsLTPs podrían conferir resistencia a la planta mediante dos mecanismos principales: 1) indirectamente al participar en la formación de la barrera mecánica de cutina y 2) directamente por su actividad antifúngica y antimicrobiana intrínseca después de transportar monómeros de cutina [33]. Sin embargo, como se discute más adelante, algunas nsLTPs tienen actividad contra patógenos pero no transportan lípidos. Asimismo, no todas las proteínas de esta familia exhiben actividad contra patógenos. También es factible que las plantas utilicen los lípidos transportados por las nsLTPs como moléculas de señal, p. e.,

como moléculas de adhesión en la polinización [21]. Otra posibilidad es que las nsLTPs desempeñen varias funciones en las plantas que no necesariamente requieran de la actividad de transferencia de lípidos. Se ha especulado que la actividad de defensa contra patógenos puede ser una función secundaria de las nsLTPs. Así, por ejemplo, una proteína extraída de semillas de cebolla con potente actividad antimicrobiana y antifúngica y estructuralmente relacionada con la familia nsLTP1, interactúa con membranas fosfolipídicas e induce cambios en la permeabilidad iónica pero es incapaz de unir lípidos [53, 54]. Esta proteína es sintetizada con una extensión de 12 residuos entre el péptido señal y la proteína madura. Su plegamiento global es similar al de las nsLTPs, con cuatro segmentos helicoidales conectados por tres asas cortas y una región C-terminal con estructura secundaria irregular. Sin embargo, esta proteína carece de una verdadera cavidad hidrófoba, ya que se encuentra interrumpida por residuos de triptofano y fenilalanina [54]. Se ha sugerido que al perder esta estructura, algunas nsLTPs pudieron evolucionar para retener únicamente la función secundaria de defensa contra patógenos [33].

Las plantas y los animales comparten mecanismos de inmunidad innata -la primera línea de defensa del huésped para limitar la infección en las primeras horas de exposición a microorganismos [29, 41, 55-57]. Sin embargo, a diferencia de los vertebrados superiores -que también poseen inmunidad adaptativa- las plantas sólo cuentan con un sistema inmune innato que depende básicamente de la síntesis de péptidos y proteínas de defensa [29, 37, 58] y de metabolitos secundarios no proteicos que participan en complejas interacciones entre las plantas y sus agresores -p.e., patógenos e insectos [58, 59-61]. Muchos de estos metabolitos son compuestos volátiles que libera la planta al ser atacada por insectos herbívoros para atraer predadores de insectos y repeler el ataque de otros herbívoros [60, 61].

Las investigaciones de las funciones de las nsLTPs en las plantas y los mecanismos de acción implicados en su actividad contra patógenos podrían contribuir al conocimiento de la relación evolutiva de los mecanismos de defensa en los organismos superiores [56, 57] y de las complejas interacciones entre patógenos y huéspedes [56, 58, 60-63].

### 2.3 La familia nsLTP de plantas

Esta familia se clasifica actualmente en dos tipos o familias de proteínas (según su masa molecular) conocidas como nsLTPs tipo 1 (~10kDa) y nsLTPs tipo 2 (~7 kDa) [33-27]. Ambas familias se distinguen por tener un *pI* básico (>8.0) y una estructura predominantemente  $\alpha$  helicoidal, con ocho residuos de cisteína altamente conservados que forman cuatro puentes disulfuro (revisado en ref. 10 y 34).

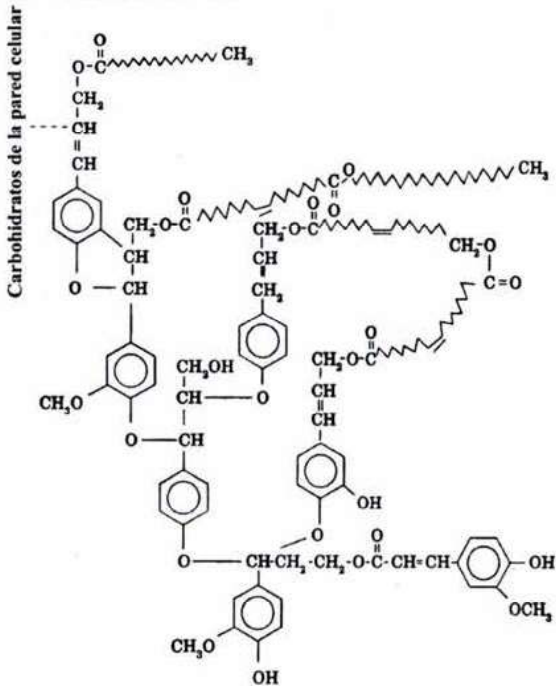
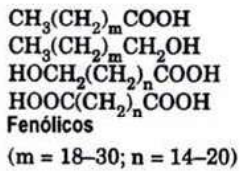
La expresión de las nsLTPs1 se restringe a las partes aéreas de la planta [20, 64], mientras que las nsLTPs2 se localizan preferentemente en las raíces [65]. Sin embargo, las dos familias de nsLTPs se encuentran en las semillas [27, 66-69], donde se sintetizan monómeros de cutina de C<sub>16</sub> a C<sub>18</sub> y de suberina -un polímero hidrófobo complejo constituido por compuestos fenólicos dicarboxílicos, ácidos e hidroxiacidos grasos de cadena larga (Fig. 2.5). Estas evidencias sugieren que las nsLTPs1 transportan *in vivo* monómeros hidrófobos de cutina mientras que las nsLTPs2 transportan monómeros hidrófobos de suberina -no obstante que, *in vitro*, muestran afinidades similares por lípidos [33].

Del análisis de los espectros de dicroísmo circular de una nsLTP2 de trigo, Douliez y col. [68] propusieron que las dos familias de nsLTPs tienen una proporción semejante de hélices  $\alpha$ , láminas  $\beta$  y elementos de estructura secundaria irregular. Sin embargo, estos autores observaron diferencias notables en el patrón de apareamiento de puentes disulfuro entre las dos familias. La primera estructura 3D conocida de una nsLTP2 aislada de arroz [27] corroboró el distinto patrón de puentes disulfuro entre las dos familias de nsLTPs (Fig. 2.6). Sin embargo, la estructura reciente -a alta resolución- de una nsLTP2 de trigo unida con L- $\alpha$ -palmitoil fosfatidilglicerol [70] reveló que, a diferencia de las nsLTPs1, la nsLTP2 de trigo presenta una estructura de cinco hélices que forman una superhélice derecha (Fig. 2.7).

La familia nsLTP1 de plantas ha sido la más estudiada hasta ahora. De hecho, la primera nsLTP, del tipo 1, se aisló de hojas de espinaca. Se conocen las estructuras 3D de nsLTPs1 libres o unidas con ligandos aisladas de cebada, arroz, maíz y trigo, determinadas por cristalografía de rayos X o RMN [24, 26, 35, 66, 67, 71-74]. En el banco de datos de secuencias de proteínas (SwissProt) se han registrado las secuencias de más de 150 nsLTPs

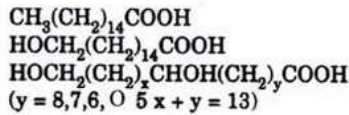
presentes en más de 50 especies de plantas, que incluyen alrededor de 15 proteínas maduras y el resto corresponde a precursores de estas proteínas y posibles miembros de esta familia. Algunas secuencias son de isoformas de nsLTPs de varias especies (p. e. arroz, trigo, sorgo y cebada). En el genoma de *Arabidopsis thaliana* se han identificado más de 40 genes que codifican proteínas de esta familia [75]. En una gran variedad de plantas se ha identificado un número menor de genes de nsLTPs y de proteínas relacionadas [véase p. e., 21, 31,76, 77].

**Monómeros de suberina**

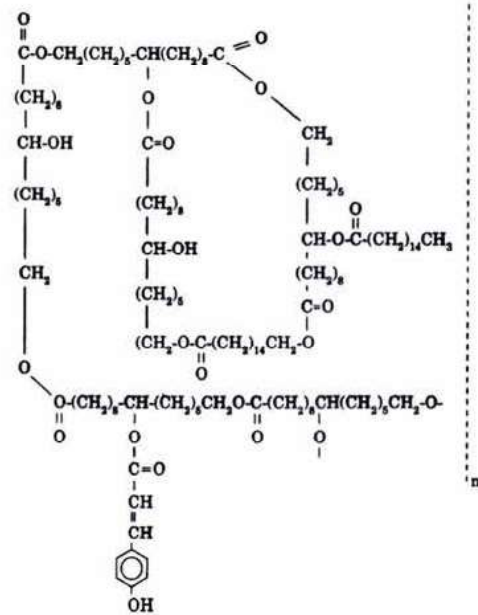
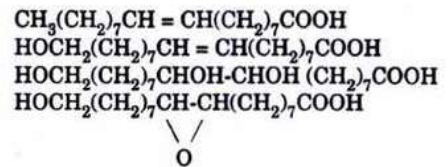


**Monómeros de cutina**

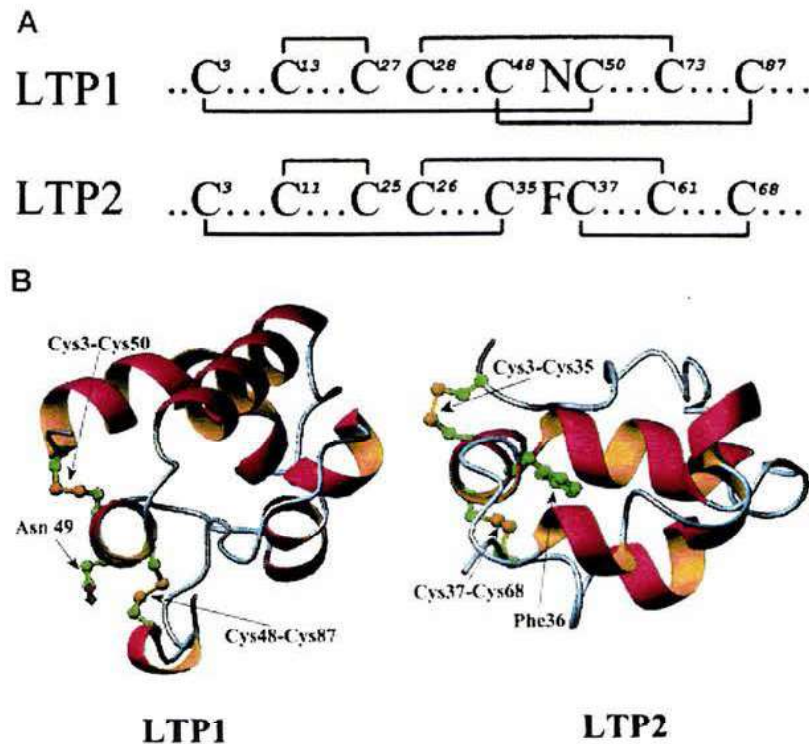
**Familia de C16**



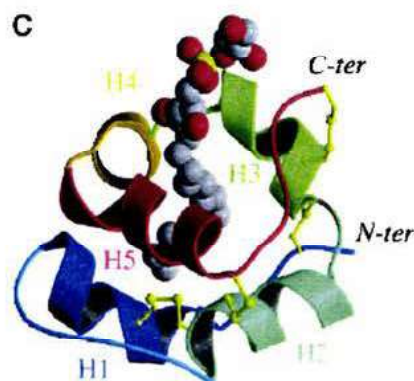
**Familia de C18**



**Figura 2.5.** Componentes principales y estructuras modelo de polímeros de cutina y suberina. [Adaptado de Douliez, y col. 2002; ref. 33].



**Figura 2. 6.** A) Representación del patrón de apareamiento de puentes disulfuro entre residuos de cisteína de nsLTPs 1 y 2. B) Estructuras de los dos tipos de nsLTPs de arroz y orientaciones de la cadena lateral del residuo X en los motivos -CXC- de ambas proteínas. Los residuos hidrofílicos de Asn 49 se orientan hacia la superficie en las nsLTPs1. Los residuos hidrofóbicos de Phe 36 se ocultan en el interior de las nsLTPs2. Esta sustitución influye en el distinto patrón de enlaces de las cisteínas y en el plegamiento global de las dos familias. [Tomado de Samuel y col. 2002; ref. 27].



**Figura 2.7** Estructura 3D de una nsLTP2 de trigo unida con una molécula de fosfolípido. Esta estructura reveló por vez primera que algunas proteínas nsLTPs2 de plantas poseen cinco hélices  $\alpha$ . La estructura difiere de las que presentan las nsLTPs1 en las hélices H3 y H4, el C-terminal y la última vuelta de la hélice H2. [Tomado de Pons y col. 2003; ref. 70].

## OBJETIVOS GENERALES

El propósito inicial del presente trabajo fue establecer la identidad de proteínas pequeñas aisladas de semillas de amaranto, con  $M_r$  de 10 y 7 kDa. Este interés surgió de los estudios preliminares por difracción circular de las proteínas parcialmente purificadas, los cuales sugerían que estas proteínas presentaban un alto contenido de estructura  $\alpha$  helicoidal estable a la desnaturalización térmica. La secuencia de los primeros 20 residuos del N-terminal de la proteína de 10 kDa mostró que ésta es un miembro de la familia de las nsLTPs de plantas. Hasta entonces, sólo se había registrado la secuencia de una nsLTP de *Amaranthus caudatus* (LTP\_AMACA, No. de acceso SwissProt: P80450), pero no se conocía reporte alguno sobre una nsLTP de la especie *A. hypochondriacus*. Dado que hasta ahora se han aislado pocas nsLTPs de plantas, y los estudios de transferencia y/o unión de lípidos *in vitro* son aún más limitados, nos propusimos lograr los siguientes

### Objetivos específicos:

1. Establecer las condiciones adecuadas para el aislamiento y purificación de la proteína de 10 kDa hasta homogeneidad electroforética.
2. Identificar a la proteína de 10 kDa mediante el análisis de sus estructuras primaria y secundaria.
3. Hacer una comparación de la secuencia de la proteína de 10 kDa con las de otras plantas para establecer el grado de homología y conservación de residuos importantes para su función.
4. Una vez identificada la proteína de 10 kDa como una nsLTP tipo 1, determinar si es capaz de unir lípidos.
5. Construir un modelo de la estructura 3D de la nsLTP1 de amaranto que permita inferir una posible semejanza con otras nsLTPs tipo 1 de estructura 3D conocida.

## CAPÍTULO 3

### MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 Materiales

Las semillas de amaranto de la especie *A. hypochondriacus* fueron proporcionadas por el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), Chapingo, México. Con el fin de confirmar la identidad de la especie, algunas semillas se sembraron en invernadero y se prepararon ejemplares de herbario, los cuales fueron identificados por la Dra. Cristina Mapes, especialista en el género e investigadora del Jardín Botánico de la UNAM. Los ejemplares se encuentran depositados en el Herbario Nacional (MEXU).



**Plantas de *A. hypochondriacus* sembradas en invernadero. Foto: M.C. Ramírez.**

Todas las soluciones empleadas en la extracción, diálisis y separación cromatográfica de las proteínas se filtraron en membranas de 0.45  $\mu\text{m}$  (Millipore) y posteriormente en membranas de 0.22  $\mu\text{m}$ . Las soluciones buffer se prepararon con agua destilada grado milliQ (Millipore). Las soluciones para filtración en gel contenían  $\text{NaN}_3$  0.02%. Los reactivos para estas soluciones se obtuvieron de Sigma y Baker de México, grado reactivo. El ácido 1-pireno-dodecanoico (1-Pyr-12C) se adquirió en Molecular Probes (Leiden, The Netherlands). El ácido esteárico se adquirió de Sigma (St. Louis MO, USA). Los

disolventes empleados en la separación de las proteínas por RP-HPLC fueron de calidad HPLC (Sigma). Los soportes de las columnas para filtración en gel se obtuvieron de Amersham Biotech Pharmacia (Piscataway, NJ, USA). Las columnas de fase reversa para HPLC se obtuvieron de Vydac (Hesperia, CA, USA). Las membranas y soportes para ultrafiltración de las proteínas, así como los tubos de ultrafiltración (Ultra free) para dializar y concentrar las proteínas purificadas parcial o totalmente se adquirieron de Millipore. Los reactivos para electroforesis se adquirieron de Bio-Rad, Sigma, Serva y Fluka. Los disolventes para estos experimentos se adquirieron de Sigma y Baker.

En la diálisis y ultrafiltración de las soluciones de proteína se emplearon membranas de 3.5 y 3-5 kDa de corte, respectivamente. La concentración de proteínas se midió con el método de Lowry utilizando un *kit* de Bio-Rad y albúmina sérica bovina como estándar. La separación de proteínas por electroforesis en gel se llevó a cabo en cámaras convencionales (MiniProtean II, Bio-Rad; Mighty small y Mini-VE, Hoefer/Pharmacia) y en un equipo PhastSystem (Amersham Pharmacia). Los estándares de proteína se adquirieron de Gibco (3.4-43 kDa), Amersham Pharmacia (14.4-94 kDa) y Bio-Rad (10-250 kDa; 7.7-244 kDa y 3.5 a 39 kDa).

### **3.2 Obtención de harina de semillas de amaranto y de extractos acuosos de proteínas**

Las semillas de amaranto se muelen con pequeñas porciones de hielo seco en un molino para café. Se mezclan ~100 g de harina con 10 volúmenes de hexano destilado. La mezcla se mantiene en refrigeración con agitación constante durante toda la noche. El sobrenadante se separa por centrifugación a 7 000 g a 4° C durante 45 minutos. Los residuos de disolvente se eliminan por evaporación a temperatura ambiente en una campana de extracción. El harina seca se guarda en congelación (-20° C) hasta la extracción de las proteínas.

Todos los procedimientos de extracción, centrifugación, diálisis y concentración de las proteínas se llevaron a cabo a 4 °C. Las proteínas solubles se extraen con 10 volúmenes de agua destilada y filtrada a la que se añade un cóctel completo de inhibidores de proteasas (Bohering Mannheim). La extracción se realiza en dos etapas con agitación constante de la mezcla durante 12 h. La solución se separa del sólido por centrifugación a 18 000 g durante



50 min. El sobrenadante se centrifuga a 95 000 g durante 35 min, se descarta el precipitado y el homogenado soluble (lo que aquí se llama extracto) se guarda a 4 °C hasta la purificación de las proteínas.

Los extractos se dializaron contra un buffer de Tris 0.05 M, pH 7.5, con NaCl 0.1 M, PMSF 1 mM y EDTA 2 mM. Se hicieron varios cambios de solución (~4 L) hasta obtener un pH similar al del buffer. El precipitado formado durante este paso se eliminó por centrifugación a 95 000 g durante 35 min. El sobrenadante (~600 a 800 mL) se conservó en refrigeración. Durante las etapas de extracción y purificación de las proteínas se tomaron alícuotas de ~1 mL para identificarlas por SDS-PAGE y medir el contenido de proteína.

### **3.3 Separación electroforética de proteínas por SDS-PAGE**

En la mayoría de las separaciones electroforéticas se emplearon geles de tricina (15 % de poliacrilamida) con SDS preparados manualmente. También se emplearon geles prefabricados (Pharmacia y Estratagene) de gradiente (4 a 12 % de poliacrilamida), de densidad homogénea (12.5 %) y de alta densidad (20 %). Las soluciones para preparar los geles de tricina se incluyen en la Tabla 3.1. Las cantidades son las necesarias para preparar dos mini geles de 0.75 mm de espesor.

La solución concentrada de acrilamida/bisacrilamida se conservó en refrigeración. Los geles se prepararon en matraces Kitazato de 25 mL y se desgasificaron al vacío (5-10 min) antes de añadir el persulfato y el TEMED. La solución de persulfato se conservó en refrigeración hasta una semana.

Los geles empleados en la electroforesis de las proteínas para secuenciación se montaron en las cámaras y se dejaron polimerizar durante la noche para disminuir la cantidad de radicales libres atrapados en la matriz de poliacrilamida. En algunos casos, los geles se sometieron a una precorrida (5 mA/4-15 horas) antes de cargar las muestras de proteína, con 2-mercaptoetanol (84 µL/100 mL) en el buffer del cátodo.

Las proteínas se separaron aplicando corriente constante (10 mA) durante el paso por el gel concentrador. Después se aumentó la corriente a 15 ó 20 mA durante la migración de las proteínas en el gel separador. Los geles se tiñeron con azul de Coomassie R-250

(0.025%) durante 3 a 4 horas (o toda la noche). El exceso de colorante se eliminó con solución decolorante.

Las proteínas transferidas a membranas de PVDF para secuenciación se tiñeron con Rojo Ponceau S (0.1%) en 1% de ácido acético; posteriormente se destiñeron con solución de ácido acético al 1%. La transferencia de proteínas se llevó a cabo en medio semiseco con un equipo de Pierce utilizando un buffer de transferencia de la siguiente composición: CAPS 10 mM, pH 11, 2-mercaptoetanol 0.9 mM, metanol al 10% (v/v).

**Tabla 3.1.** Composición de geles de tricina (15% de acrilamida)

Solución concentrada	Gel separador	Gel concentrador	Gel tapón
Acrilamida (30%)-bis acrilamida (0.8%)	10 mL	1.1 mL	4 mL
Tris-Cl/SDS, pH 8.8 (4X)	6.6 mL	—	—
Tris-Cl/SDS, pH 6.8 (4X)	—	2 mL	—
H <sub>2</sub> O	0.68 mL	5 mL	2 mL
Glicerol	2.6g	—	—
Persulfato de amonio (PA) (10%)	66 µL	66 µL	200 µL
TEMED (10%)	60 µL	60µL	100µL

### Reactivos para geles de tricina

**Buffer del cátodo:** Tris-tricina (0.1 M c/u), pH 8.5, con 0.1% de SDS (p/v), 1 mM de ácido 3-mercaptopropánico o 2-mercaptoetanol (84 µL/100 mL).

**Buffer del ánodo:** Tris 0.2 M, pH 8.9.

#### **Buffer de muestra de tricina (2X)**

2 mL de Tris-Cl/SDS, pH 6.8 (4X)

3.0 g de glicerol

0.8 g de SDS

0.2 mL de 2-mercaptoetanol

2 mg de azul de Coomassie G-250

H<sub>2</sub>O cbp 10 mL

***Tris-Cl/SDS, pH 8.8 (4X)***

Tris-base 15.13 g  
Tris-HCl 3.93 g  
H<sub>2</sub>O cbp 100 mL  
2 mL de SDS al 20%

***Tris-Cl/SDS, pH 6.8 (4X)***

Tris-base 0.1447 g  
Tris-HCl 3.71 g  
H<sub>2</sub>O cbp 50 mL  
1 mL de SDS al 20%

**Otras soluciones para electroforesis**

***Solución de tinción de azul brillante de Coomassie***

400 mL de metanol  
2.5 g de azul de Coomassie R-250  
70 mL de ácido acético  
H<sub>2</sub>O 530 mL  
La solución se filtra en papel Whatman No. 1 antes de la tinción de los geles

***Solución decolorante***

30 mL de metanol  
10 mL de ácido acético  
60 mL de H<sub>2</sub>O

**3.4 Purificación parcial de proteínas por filtración en gel**

Los extractos de proteínas de amaranto se separaron en una columna de Sephacryl S200 HR (Pharmacia) de 80 X 1.6 cm con el siguiente buffer de elución: Tris 0.05 M, pH 7.5, PMSF 1 mM, EDTA 1mM y NaCl 0.1 M. La columna se equilibró con el mismo buffer (con flujo de 12 mL/hora), se aplicaron volúmenes máximos de 10 mL del extracto (1.5 a 2 mg·mL<sup>-1</sup> de proteína total) previamente filtrado en membranas de 0.45 µm. Se colectaron las fracciones (1.8 ó 4.5 mL) de proteína que eluyen en el último pico, se filtraron (0.45 µm) y dializaron con al menos 10 volúmenes del mismo buffer, después se concentraron por ultrafiltración (Amicon YM3, Millipore) hasta 1.5 a 2 mg·mL<sup>-1</sup> de proteína total. La solución concentrada de proteínas se conservó en refrigeración hasta la siguiente etapa de purificación.

### 3.5 Purificación de la nsLTP1 de amaranto por RP-HPLC

Las fracciones colectadas en la etapa anterior se fraccionaron por RP-HPLC (Hewlett-Packard) en una columna analítica C4 de fase reversa (Vydac) con un gradiente lineal de acetonitrilo al 60% en TFA acuoso al 0.1% (0-100%, por 60 min con flujo de 1 mL/min). La nsLTP1 se identificó por el tiempo de retención en la columna y por SDS-PAGE. Las fracciones enriquecidas con la proteína se dializaron con agua y se secaron parcialmente al vacío. La solución resultante se concentró por ultrafiltración en tubos con membranas de corte de 3 kDa (Ultrafree, Millipore), se filtró y nuevamente se purificó en estas condiciones hasta obtener un pico homogéneo en RP-HPLC. La muestra de proteína purificada a homogeneidad electroforética se dializó contra agua y se liofilizó hasta sequedad. El procedimiento detallado es el siguiente.

Las proteínas de los extractos se fraccionaron en la columna de Sephacryl S200 HR como se describe en la sección 3.4. Las fracciones enriquecidas con las proteínas pequeñas ( $M_r < 25$  kDa) se reunieron con fracciones similares obtenidas en varias cromatografías y se concentraron por ultrafiltración hasta  $\sim 1.2$  mg·mL<sup>-1</sup> de proteína total. Esta solución se dializó con el mismo buffer empleado en la separación por filtración en gel y nuevamente se concentró por ultrafiltración. La absorbencia de la solución a 280 nm disminuye en menos del 10% después de centrifugarla (a 10 000 rpm) o de filtrarla en membranas de 0.22  $\mu$ m, lo que indica que las proteínas prácticamente no se agregan en estas condiciones. Se aplicaron volúmenes de 0.9 mL de esta solución en una columna analítica C4 de fase reversa (4.6 X 250 mm, Vydac) equilibrada con TFA acuoso (0.1 %) (buffer A). Las proteínas se eluyeron con acetonitrilo al 60 % en TFA 0.1 % (buffer B) utilizando el siguiente gradiente: 0 % de B por 5 min, 0 a 100 % de B por 55 o 60 min, 100 % de B por 10 min, 0 % de B durante 20 min, con flujo de 1 mL/min.

Las fracciones enriquecidas con la proteína de  $\sim 10$  kDa se reunieron, se dializaron con agua y se secaron en liofilizadora después de eliminar el acetonitrilo en una trampa para disolventes. La proteína se purificó en las condiciones ya descritas hasta homogeneidad electroforética y se mantuvo en congelación (-20 °C) antes de emplearla en los experimentos.

### **3.6 Análisis de secuencia de la nsLTP1 de amaranto**

La secuencia de aminoácidos del N-terminal se obtuvo de una muestra intacta de proteína por degradación de Edman automática en un equipo Procise Protein Sequencing System (Applied Biosystems/Perkin Elmer). Para este análisis, la proteína parcialmente purificada por filtración en gel se purificó por RP-HPLC en una columna de Nucleosil C4 (4.6 X 250 mm, Phase Separations/Waters) equipada con una precolumna Delta-Pack C4 (4.6 X 20 mm). La columna se equilibró con solución acuosa de TFA al 0.1% (buffer A). Las proteínas se eluyeron con acetonitrilo al 60% en 0.1% de TFA (buffer B) utilizando el siguiente gradiente: buffer A, 0-5 min; 0-100 % B, 60 min; 100 % B, 5 min; 100 a 0 % B, 2 min; 0 % B, 20 min con flujo de 1 mL/min. Las fracciones enriquecidas con la nsLTP1 (TR: ~33 min) se colectaron, se secaron al vacío y se purificaron en las mismas condiciones.

Los demás residuos de la secuencia completa se identificaron en fragmentos trípticos de muestras de proteína reducida y alquilada con 4-vinilpiridina. La secuencia completa de la nsLTP1 se confirmó con la secuenciación de otros fragmentos trípticos. La proteína empleada para este análisis se purificó en las siguientes condiciones: buffer A: 0.1 % de TFA en agua; buffer B: 0.1 % de TFA en acetonitrilo acuoso al 60 %. Gradiente: 0 a 26 % B en 5 min, 26-35 % B en 15 min, 35-100 % B por 5 min, 100 % B por 10 min; 100-0 % B en 2 min, 0 % B durante 18 min con flujo de 1 mL/min a temperatura ambiente en la misma columna C4. La fracción que eluye alrededor de 18 minutos se mezcló con fracciones similares obtenidas en otras dos cromatografías, la solución de proteína se secó al vacío (Savant Instruments, Farmingdale), se resuspendió en agua y nuevamente se fraccionó en dos cromatografías posteriores (volumenes inyectados: 350 y 700  $\mu$ L c/u) con el mismo gradiente no lineal utilizado para purificar la proteína nativa.

#### **Reducción de puentes disulfuro y alquilación de cisteínas**

La proteína purificada en las condiciones recién descritas se secó al vacío, se redujo con ditioneitol y se sometió a alquilación con 4-vinilpiridina. La proteína reducida y alquilada se purificó en las mismas condiciones que la nativa con un gradiente lineal de

AcN (sección anterior). La fracción que eluye alrededor de 31 min se secó al vacío y se etiquetó como P1-PE. Aproximadamente 1 nmol de esta fracción se disolvió en 200  $\mu$ L de un buffer de bicarbonato de amonio, pH 8.3, y se sometió a digestión con tripsina (2  $\mu$ g en HCl 1 mM) durante 1 h a 37 °C. Los péptidos trípticos de la proteína reducida y alquilada se fraccionaron por RP-HPLC en una columna C18 (Vydac, 4.6 X 25 mm) con el gradiente lineal ya descrito.

### 3.7 Análisis de la nsLTP1 de amaranto por espectrometría de masas

La masa de la proteína se determinó por MALDI-TOF en un equipo Kompact SEQ Mass Spectrometer (Kratos Analytical Ltd, Manchester, UK). Como matriz se empleó ácido sinapínico (10 mg/mL en agua/acetonitrilo (2/1), v/v con 0.1 % de TFA). Se mezclaron 0.5  $\mu$ L de esta solución con 0.5  $\mu$ L de la muestra de proteína (10 pmol) en la placa para la muestra, la mezcla se secó al aire antes de cargarla en el equipo. Se tomaron los datos de 100 pulsos de láser para cada espectro. Como estándares externos se utilizaron las proteínas angiotensina I (1 297.51 Da) y apomioglobina de caballo (1 6951.3 Da).

### 3.8 Experimentos de dicroísmo circular<sup>2</sup>

La identidad de la proteína empleada en los experimentos espectroscópicos se verificó con el análisis de secuencia del N-terminal<sup>3</sup> en una muestra de proteína transferida de geles a membranas de PVDF.

La proteína liofilizada se resuspendió con 10 volúmenes de agua milliQ filtrada en membranas de 0.22  $\mu$ m. La solución se filtró y se concentró por ultrafiltración (Ultrafree, Millipore), después se centrifugó a 10 000 rpm (en microcentrífuga) durante unos minutos y se filtró en membranas de 0.45  $\mu$ m. Se tomaron alícuotas de la solución de proteína (~10  $\mu$ L) y se diluyeron en las respectivas soluciones buffer (acetatos o fosfatos 40 mM, pH 5 a

---

<sup>2</sup> Estos experimentos y los de fluorescencia se llevaron a cabo en el Medical Research Council en Cambridge, Reino Unido.

<sup>3</sup> Este análisis fue realizado por el Dr. Len Packman en la Unidad de Química de Proteínas y Ácidos Nucleicos del Medical Research Council en Cambridge, Reino.

8.0) para obtener una concentración de proteína de  $0.1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ , estimada por absorción a 280 nm ( $A = 0.443, 1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ).

Los espectros de dicroísmo circular (DC) en el UV lejano (187-250 nm) se obtuvieron en un espectropolarímetro Jasco J-720 (Jasco Ltd, UK). La muestra de proteína se mantuvo en una celda de cuarzo de 0.1 cm a temperatura controlada por un peltier. Para cada muestra de proteína o de solución buffer se tomaron alrededor de 8 espectros a 20 °C con incrementos de 0.2 nm. Los espectros del blanco se restaron de los espectros de la solución de proteína. Los valores se expresan como elipticidad media por residuo utilizando una masa media por residuo de 104.7. La predicción de la estructura secundaria derivada de la secuencia se hizo con los programas SELCON y SPAM, disponibles en la red.

### **3.9 Ensayo de unión de lípidos**

La nsLTP1 se diluyó en buffer de fosfatos 0.05 M, pH 6, hasta una concentración de 6.7 a 10  $\mu\text{M}$  (volumen final, 1.5 mL). La concentración de la proteína se estimó por absorción UV a 280 nm. Las soluciones de proteína se depositaron en una celda de cuarzo para fluorescencia (Hellma, Essex, UK) mantenida a 25 °C con baño de circulación externo. Las soluciones de lípido marcado con pireno (ácido 1-pireno-dodecanoico) y de estearato se prepararon en metanol grado HPLC y se diluyeron con el buffer empleado en la proteína hasta 0.5 y 0.7 mM, respectivamente. Las soluciones de proteína se titularon con volúmenes crecientes de la sonda fluorescente. Se fijó una longitud de onda de excitación de 343 nm, entre cada adición de la sonda se midieron los espectros de emisión de 300 a 500 nm (con incrementos de 0.2 nm) en un espectrofluorómetro (Hitachi Ltd, Tokio). Se tomaron los espectros del buffer con la sonda sin proteína (blanco) y se restaron de los respectivos espectros de la proteína titulada con el fluoróforo.

#### **Ensayo de unión de competencia**

Se equilibró una solución de proteína (6.7  $\mu\text{M}$ , 1.5 mL) con 7.5  $\mu\text{M}$  del lípido fluorescente durante 30 min a 25 °C. La solución se tituló con volúmenes crecientes de solución de estearato. Entre cada adición se tomaron los espectros de emisión, como se

indica arriba, hasta que se detectó una disminución considerable de la fluorescencia a 378 nm. Se restaron los espectros del blanco como se indica arriba. La disminución de la emisión de fluorescencia a 378 nm (correspondiente a la emisión del monómero de pireno) se normalizó respecto de la máxima fluorescencia de la solución de proteína con la sonda fluorescente. Los valores de fluorescencia se expresan en unidades arbitrarias (ensayos de unión) y como fracción de la fluorescencia máxima (ensayos de unión de competencia).

### **3.10 Alineación de secuencias de nsLTPs de plantas**

Con la información preliminar de la secuencia del N-terminal de la nsLTP1 de amaranto se hizo una búsqueda en los bancos de datos de secuencias de proteínas para identificar homologías con otras proteínas utilizando el programa BLASTP 2.2.5 [NPS@: Network Protein Sequence Analysis (<http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/>), ref. 78 y 79]. Una vez conocida la secuencia completa de la nsLTP1 de amaranto se hicieron alineaciones de secuencias múltiples con nsLTPs de otras plantas utilizando el programa CLUSTALW [NPS@: Network Protein Sequence Analysis, ref. 80]. En las secuencias mostradas en los resultados se eliminó manualmente la secuencia del péptido señal del N-terminal de los precursores de nsLTPs.

### **3.11 Modelado de la estructura 3D de la nsLTP1 de amaranto**

Se construyó un modelo de la estructura de la nsLTP1 de amaranto tomando como base la estructura 3D de una nsLTP1 de arroz (código PDB:1rzi) obtenida por difracción de rayos X a una resolución de 1.6 Å [66]. Esta estructura se eligió como molde debido a su alta identidad de secuencia (51 %) con la nsLTP1 de amaranto. El modelo se construyó con el programa O [81] por remplazo de los residuos de la nsLTP1 de amaranto no conservados en la nsLTP de arroz y se afinó con CNSSOLVE [<http://cns.csb.yale.edu/vi.1>, ref. 82]. El modelo final se ajustó de manera que los residuos de aminoácidos distintos de glicina no estuvieran en regiones prohibidas en el gráfico de Ramachandran. Con las coordenadas del modelo se generaron las imágenes de las estructuras utilizando los programas RasMol, QUANTA, GRASP y Viwerlite.



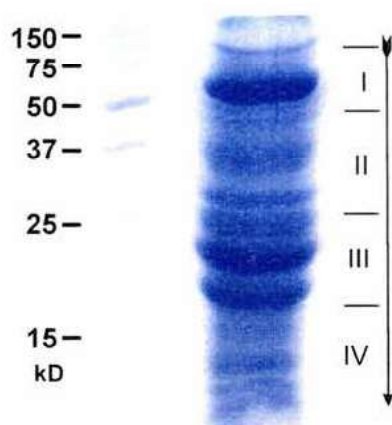
## CAPÍTULO 4

### RESULTADOS

#### 4.1 Extracción y purificación parcial de proteínas de semillas de amaranto solubles en agua

Las proteínas se extrajeron con agua en presencia de inhibidores de proteasas. La separación de las proteínas solubles por centrifugación a 95 000 g fue fundamental para obtener un extracto homogéneo libre de sólidos que precipitan lentamente en los extractos e interfieren con la purificación posterior de las proteínas. La adición de PMSF (1 mM) y EDTA (1-2 mM) durante la diálisis y separación de los extractos evitó la digestión posterior de las proteínas. Esto se verificó con la medición de la absorbencia a 280 nm de los ultrafiltrados de los extractos y de las fracciones colectadas durante las etapas de purificación (la absorbencia promedio no fue mayor de 0.1.)

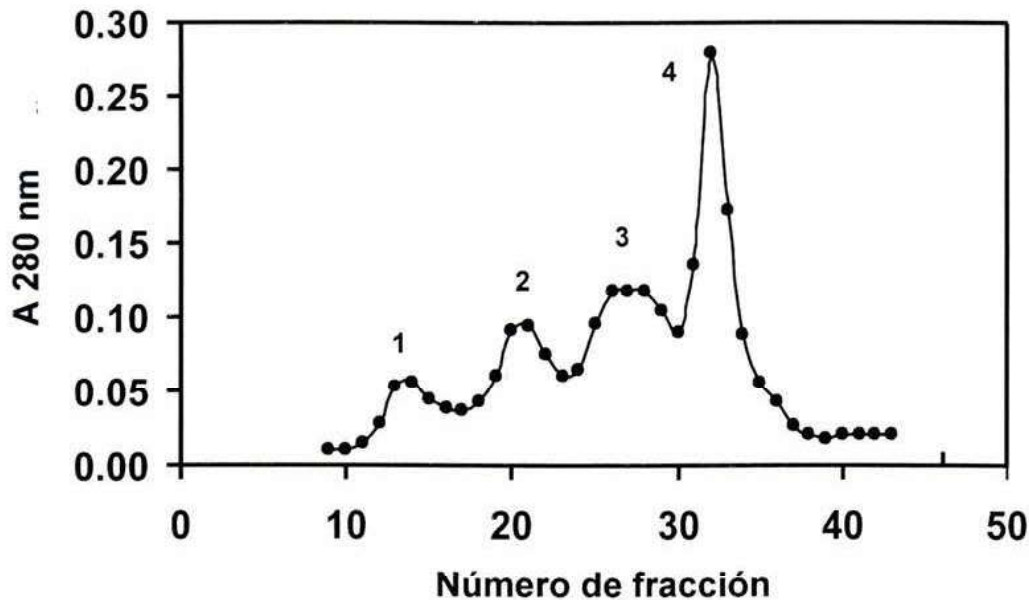
Las proteínas de los extractos tienden a agregarse cuando se concentran a más de 3 mg·mL<sup>-1</sup> de proteína total. La agregación aumenta paulatinamente con el tiempo de almacenamiento a 4 °C. Para evitar esto, los extractos se concentraron hasta un máximo de 2 mg·mL<sup>-1</sup> de proteína total.



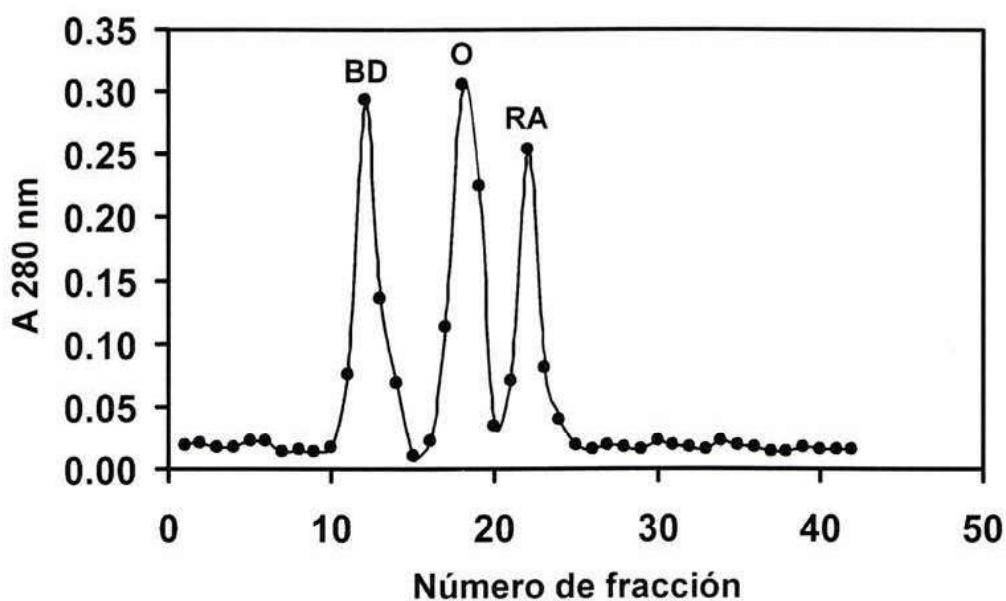
**Figura 4.1.** Patrón electroforético de proteínas de semilla de amaranto solubles en agua. Las proteínas se purificaron parcialmente por precipitación con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (85% de saturación). Se cargaron 100  $\mu\text{g}$  de proteína total en un gel de poliacrilamida al 15% con SDS. Las proteínas se tiñeron con azul de Coomassie. Los estándares de proteína aparecen en el primer carril; los números romanos señalan las zonas de migración de las proteínas.

Los extractos acuosos tienen numerosas proteínas con una gama amplia de P.M. Una muestra del extracto (100  $\mu\text{g}$  de proteína total) se resuelve en unas 20 bandas de proteína de  $\sim 5$  a 100 kDa en geles de poliacrilamida al 15% (Fig. 4.1). En el perfil electroforético se distinguen 4 zonas principales de proteínas con  $M_r$  de 50 a 100 kDa (I), 30 a 43 kDa (II), 18 a 25 kDa (III) y menos de 18 kDa (IV). Además de una banda intensa de  $\sim 60$  kDa, dos proteínas de la zona III son muy abundantes.

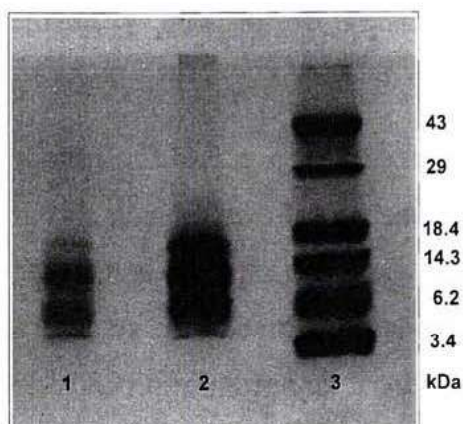
Los extractos se fraccionaron por cromatografía de filtración en gel. La figura 4.2 muestra un cromatograma de las proteínas separadas en una columna de Sephacryl S200 HR (1.6 X 80 cm, con flujo de 12 mL/h) con un buffer de Tris-HCl 0.05 M, pH 7.5, con NaCl 0.100 M,  $\text{NaN}_3$  0.02%, EDTA y PMSF (1 mM). Las proteínas agregadas -y las de alto P.M- eluyen en el primer pico (Fig. 4.2), que corresponde al volumen muerto o de elución del polímero de azul dextrán, BD (Fig. 4.3). Las proteínas de masas intermedias (alrededor de 30 a 43 kDa) se colectan en el segundo pico, donde se encuentra una proteína de reserva de 35 kDa. En el pico mayor (4) se colectan las proteínas pequeñas ( $M_r < 14$  kDa), confirmado por SDS-PAGE (Fig 4.4, carril 1).



**Figura 4.2.** Cromatograma de filtración en gel del extracto de proteínas de amaranto. Se aplicaron 5 mg de proteína total en una columna de Sephacryl S200 HR. En cada fracción se colectaron 4.6 mL del filtrado. Las fracciones del pico mayor (4) contienen principalmente a las proteínas pequeñas.



**Figura 4.3.** Perfil de elución de estándares de proteína (Pharmacia) en Sephacryl S200 HR. Se aplicaron 2 mg de azul dextrán, BD (2000 kDa); 4 mg de ovoalbúmina, O (43 kDa) y 5 mg de ribonucleasa A, RA (13.7 kDa).



**Figura 4.4.** Patrón electroforético en gel de poliacrilamida (15%) de proteínas pequeñas de semilla de amaranto, separadas por filtración en gel (FG). Las proteínas de  $M_r < 14$  kDa se concentran en la fracción principal de FG (carril 1). Carril 2, proteínas colectadas en las fracciones 28-40 de FG. Carril 3, estándares de proteína.

Se aplicaron entre 10 y 20 mg de proteína total del extracto a la columna de filtración en gel. El volumen máximo permitido para una columna de estas dimensiones es de ~8 mL, con una concentración de proteína de  $1.5$  a  $2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  para disminuir la agregación. Con estas cantidades de proteína, los últimos dos picos no siempre se resuelven bien. Por esta

razón, en la mayoría de estos experimentos se colectaron las proteínas que eluyen después de las fracciones 26-28 para la purificación posterior de la proteína de ~10 kDa. En general, estas fracciones contienen el tipo de proteínas mostradas en el carril 2 de la figura 4.4.

La separación posterior de estas fracciones en matrices de Superdex G75 (Pharmacia) o de Biogel P10 (Bio-Rad) no mejora sustancialmente el patrón de elución de las proteínas. Cabe hacer notar que la resolución de la columna de Superdex G75 para separar las proteínas de los extractos no fue superior a la de Sephacryl S200 HR.

En este sistema, es difícil purificar estas proteínas a homogeneidad; el grado de purificación depende principalmente de la cantidad de proteína aplicada a la columna y de la selección cuidadosa de las fracciones que definen el último pico. Sin embargo, cuando se colectan fracciones más puras también se pierde una buena parte de proteína en las fracciones previas y posteriores a los picos. El resultado final es que se recupera una cantidad mínima de proteína sin estar completamente homogénea en SDS-PAGE.

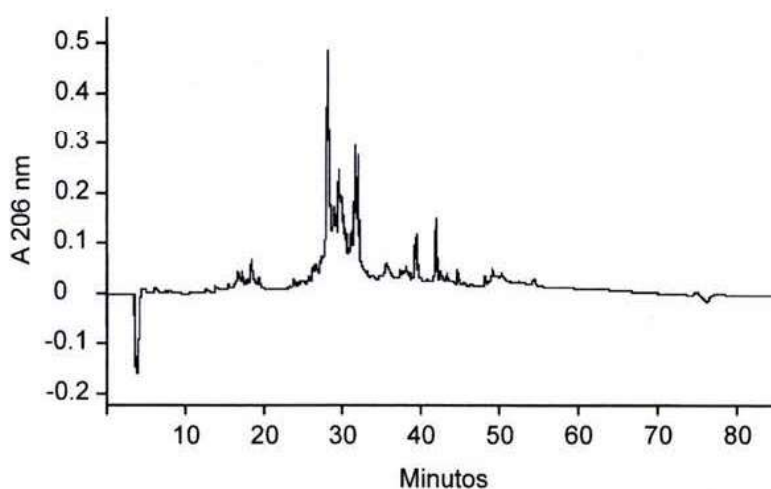
#### **4.2. Identificación de la proteína de 10 kDa y purificación hasta homogeneidad electroforética**

La cromatografía de alta resolución (p. e. HPLC o FPLC) es el procedimiento indicado para purificar las proteínas pequeñas del extracto con alto grado de pureza. Esta etapa es fundamental para identificar a las proteínas por su secuencia. Una muestra de las proteínas pequeñas parcialmente purificada por filtración en gel se fraccionó por RP-HPLC en una columna C4 con un gradiente lineal de acetonitrilo (Cap.3, Sección 3.5). De esta manera, las proteínas pequeñas que migran como 2 bandas anchas en SDS-PAGE (Fig 4.4, carril 1) se resuelven en tres picos principales y un sinnúmero de picos menores (Fig. 4.5). Este cromatograma muestra la necesidad de utilizar siempre un sistema de alta resolución cromatográfica para aislar estas proteínas con alta pureza.

Las fracciones principales separadas por RP-HPLC (Fig. 4.5) se colectaron para la identificación preliminar de las proteínas mediante el análisis de secuencia del N-terminal. Se identificaron 31 residuos de una proteína de ~10 kDa que eluye en el pico mayor (~28 min) y otros residuos de dos proteínas que eluyen en el pico doble (~33 min). Estas últimas

proteínas muestran secuencias similares y comparten regiones con otra proteína pequeña (~5-7 kDa) secuenciada en una muestra de proteína transferida a membranas de PVDF.

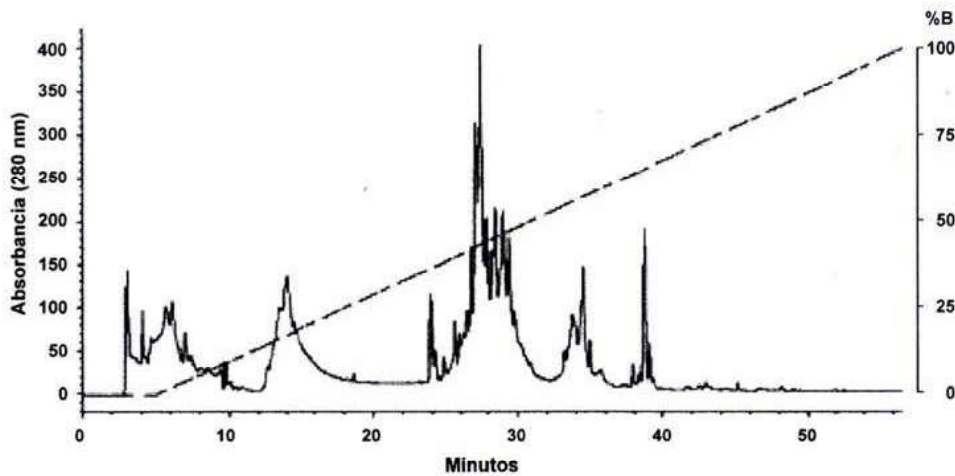
La secuencia con el mayor número de residuos identificados se comparó con las de otras proteínas registradas en SwissProt (Cap. 3, Sección 3.10). Este análisis permitió identificar a la proteína de ~10 kDa que eluye en la fracción principal por RP-HPLC (Fig. 4.5) como un miembro de la familia nsLTP de plantas. El análisis de la secuencia completa se describe más adelante.



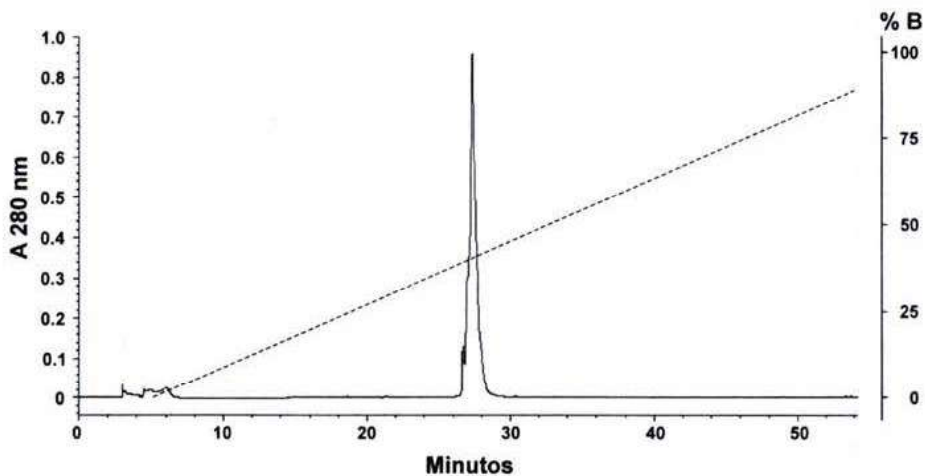
**Figura 4.5.** Separación por RP-HPLC de proteínas pequeñas parcialmente purificadas por filtración en gel. Las proteínas se inyectaron en una columna C4 (Waters) y se eluyeron con un gradiente lineal de acetonitrilo (60 % de AcN en TFA 0.1 %) (0-100 % durante 60 min). La fracción mayoritaria contiene a la proteína de ~10 kDa.

Las fracciones de filtración en gel de varias cromatografías se colectaron y separaron en una columna C4 de fase reversa (Vydac) con acetonitrilo 60 %-TFA 0.1% (buffer B) utilizando el siguiente gradiente: 0 % de B durante 5 min, 0 a 100 % de B durante 55 min, 100 % de B durante 10 min, 0 % de B durante 20 min, con flujo de  $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ . El patrón de elución de las proteínas pequeñas se muestra en la fig. 4.6. El perfil de elución de las fracciones principales es similar al de la fig. 4.5, con fracciones más puras de filtración en gel (Fig. 4.4, carril 1). La proteína identificada como nsLTP se localiza por el tiempo de retención en la columna (~28 min con un gradiente lineal de acetonitrilo). La nsLTP se purificó nuevamente en estas condiciones hasta obtener un pico homogéneo en RP-HPLC

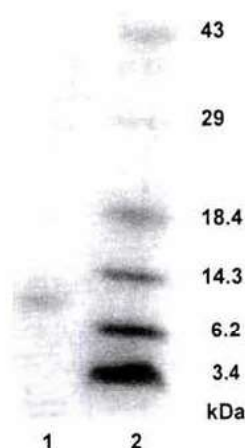
(Fig. 4.7). Las fracciones colectadas en varias cromatografías se reunieron y se secaron al vacío, se resuspendieron con agua y se concentraron por ultrafiltración en tubos de 4 mL con membranas de corte de 5 kDa. La proteína purificada de esta manera migra como una sola banda en geles de poliacrilamida al 15 ó 20% con masa aparente de 10 kDa (Fig. 4.8). La cantidad de proteína obtenida hasta homogeneidad electroforética fue de ~10 mg a partir de 2 g de proteína total en el extracto.



**Figura 4.6.** Patrón de elución por RP-HPLC en columna C4 (Vydac) de proteínas pequeñas purificadas en Sephacryl S200 HR. La línea discontinua señala el gradiente de acetonitrilo (0-100% B, 55 min). La fracción que contiene a la proteína de ~10kDa (~28 min) se purificó hasta homogeneidad electroforética en las mismas condiciones.



**Figura 4.7.** Perfil de elución de la nsLTP1 de amaranto en columna C4 de RP-HPLC. La línea discontinua señala el gradiente de acetonitrilo. Las condiciones de separación son similares a las descritas en la Fig. 4.6.



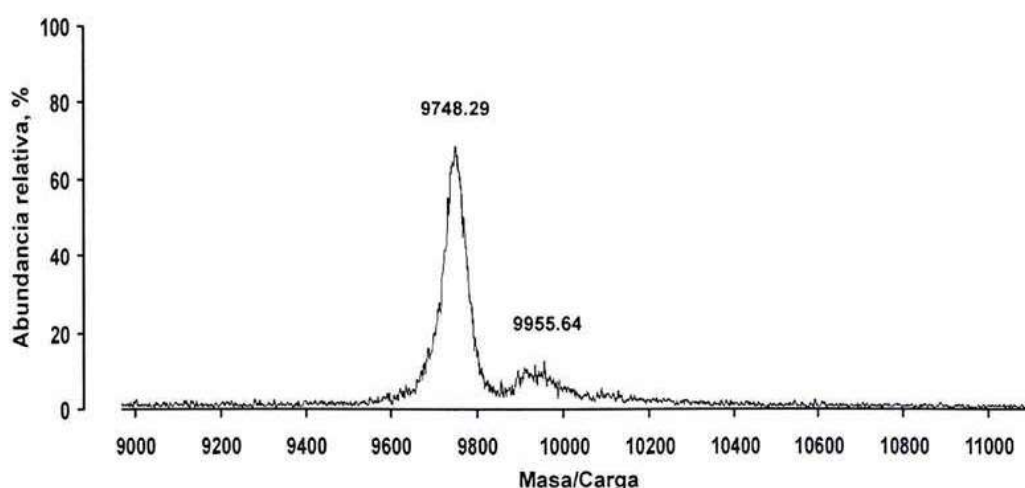
**Figura 4.8.** Purificación de la nsLTP1 de amaranto hasta homogeneidad electroforética. La proteína migra como una sola banda con  $M_r$  de 10 kDa en gel de poliacrilamida al 20 %. Las proteínas fueron teñidas con azul de Coomassie. Los estándares de proteína aparecen en el carril 2.

#### 4.3 Análisis de la nsLTP1 de amaranto por espectrometría de masas<sup>4</sup>

La masa de la nsLTP1 medida con MALDI-TOF fue de 9 744 y 9 747 en dos mediciones independientes. Estos valores dan una diferencia de 4 a 7 Da sobre la masa teórica (9740 Da) estimada de la secuencia completa (Sección 4.4), considerando que los 8 residuos de cisteína forman 4 puentes disulfuro. La diferencia de masas está dentro del error esperado ( $\sim 0.1\%$ ) en la medición con MALDI-TOF [83]. En el espectro de masas de la nsLTP1 (Fig. 4.9) se aprecia un pico de otra proteína con masa de 9 953 Da. La diferencia de masas entre ambas proteínas es de  $\sim 207$  Da, por lo que no pueden ser diferenciadas en SDS-PAGE. Estos resultados muestran que la espectrometría de masas es uno de los métodos más confiables para determinar el grado de pureza de estas proteínas. La posible identidad de la proteína de 9.9 kDa se discute en la Sección 4.

La mayoría de las proteínas de las dos familias de nsLTPs de plantas tienen puntos isoeléctricos básicos ( $>8.0$ ) (revisado en ref. 10). El  $pI$  teórico de la nsLTP1 de amaranto es de  $\sim 9.7$  a  $9.8$ . Este valor está fuera del límite de resolución del sistema que tenemos en el laboratorio para medir  $pI$ . Más adelante se discuten las opciones para determinar este parámetro.

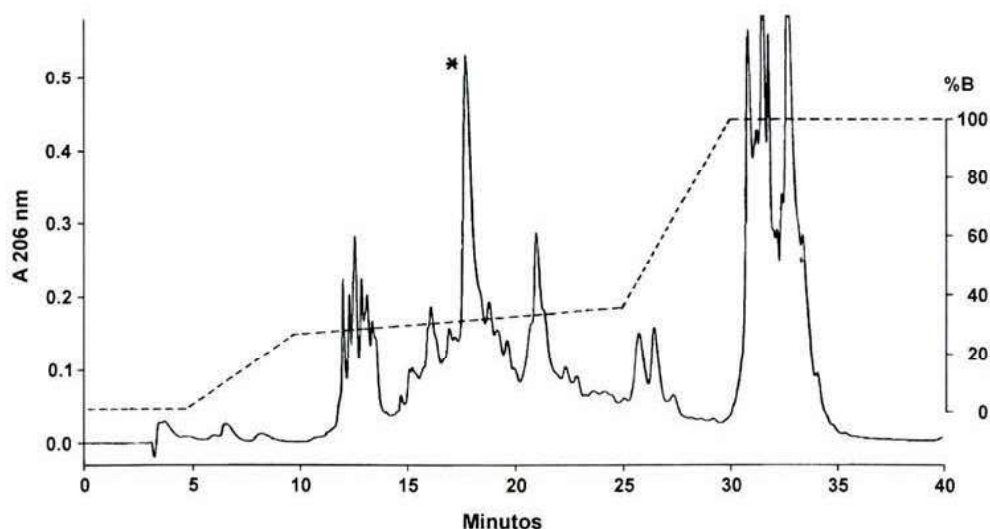
<sup>4</sup> Los espectros de masas de la nsLTP1 fueron obtenidos por el Dr. Lian Zihui en los laboratorios Shire Biologics, Inc., en Northborough, MA.



**Figura 4.9.** Espectro de masas de la nsLTP1 de amaranto. El componente principal corresponde a esta proteína.

#### 4.4 Análisis de la secuencia completa de la nsLTP1 de amaranto<sup>5</sup>

La proteína nativa se purificó por RP-HPLC en una columna C4 con un gradiente no lineal de acetonitrilo después de una separación parcial por filtración en gel (Cap. 3, Sección 3.6). La nsLTP1 eluye en el pico mayor de 18 min (Fig. 4.10).



**Figura 4.10.** Separación por RP-HPLC de proteínas pequeñas con un gradiente no lineal de acetonitrilo (60 % AcN en 0.1 % de TFA acuoso). La fracción que eluye alrededor de 18 min (\*) contiene a la nsLTP1.

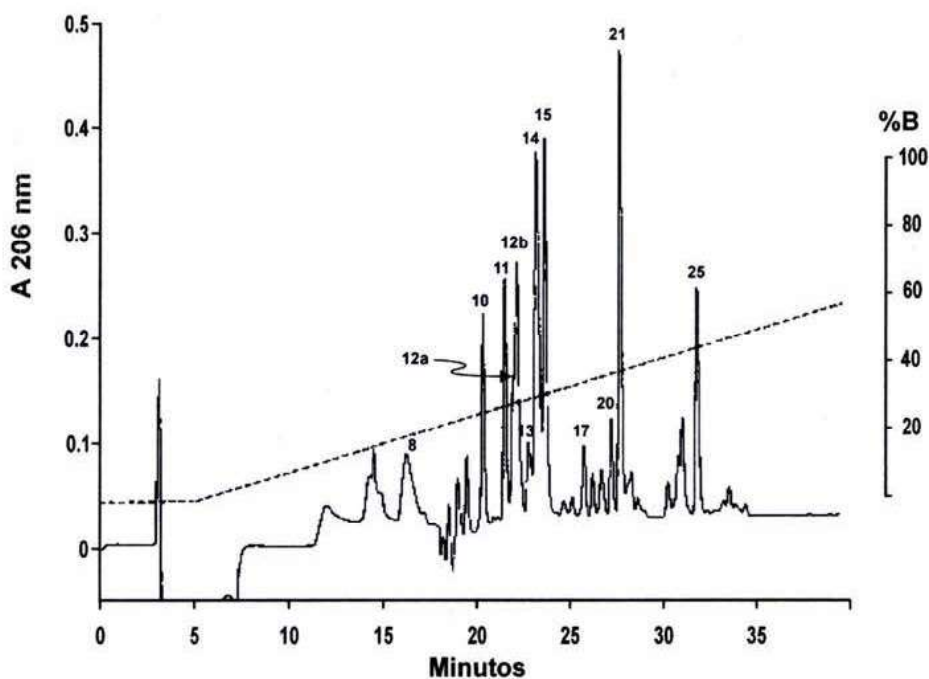
<sup>5</sup> Este análisis lo llevó a cabo el Dr. M. Aguilar en la Unidad de bioquímica analítica del Centro de Neurobiología de la UNAM.



### Reducción de puentes disulfuro y alquilación de cisteínas

Las fracciones colectadas en la etapa anterior fueron secadas al vacío, reducidas con ditioneitol y alquiladas con 4-vinilpiridina. La proteína reducida y alquilada se purificó en las mismas condiciones que la nativa (Sección 4.2) con un gradiente lineal de acetonitrilo. Los péptidos trípticos de la proteína reducida y alquilada (Cap. 3, Sección 3.6) se separaron en 7 picos principales y más de 10 picos menores con un gradiente lineal de acetonitrilo utilizando una columna C18 de RP-HPLC (Fig. 4.11).

La secuencia del N-terminal de la nsLTP1 se determinó en una muestra de proteína intacta (625 pmol) por degradación de Edman automática con un secuenciador Procise 491 (Applied Biosystems/Perkin Elmer). Los demás residuos de la secuencia completa se identificaron en los fragmentos trípticos de muestras de proteína reducida y alquilada (figuras 4.11 y 4.12).

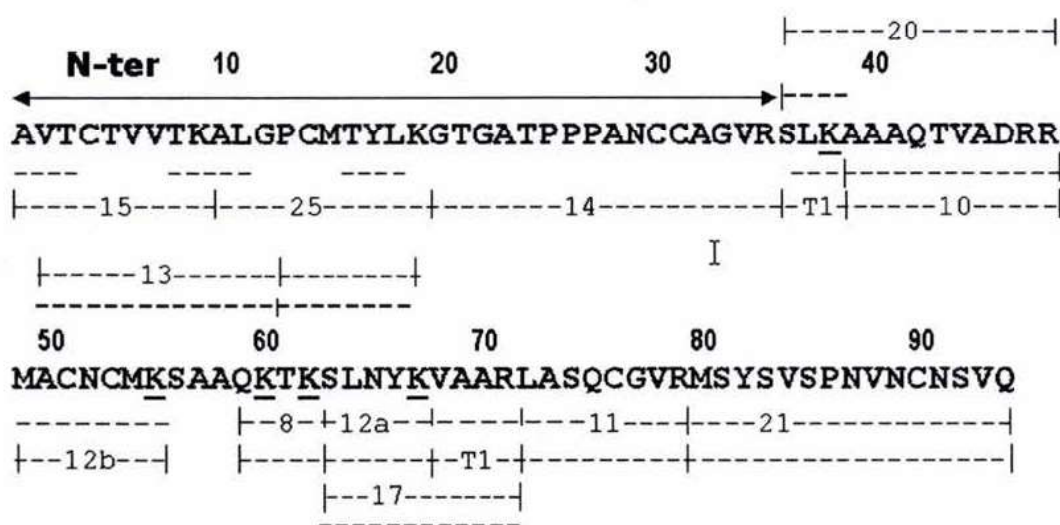


**Figura 4.11.** Separación de los péptidos trípticos de la nsLTP1 reducida y alquilada, en columna C18 de RP-HPLC. La línea discontinua señala el gradiente de acetonitrilo. Los números asignados a los picos corresponden a los fragmentos señalados en la Fig. 4.12.

La secuencia del N-terminal, mostrada abajo, se comparó con las de todas las proteínas registradas en SwissProt utilizando el programa BLASTP [79].

**AVTCTVVTKA LGPCMTYLKG TGATPPPANC CAGVR (35)**

Los residuos subrayados (posiciones 4, 14, 30 y 31) se asignaron tentativamente como cisteínas debido a que no se detectaron derivados de feniltiohidantoína en estas posiciones. Esta asignación se basó en la identidad (100 %) de los demás residuos de esta secuencia con los del N-terminal de la proteína homóloga de *A. caudatus* (LTP\_AMACA). Las posiciones de estos residuos fueron confirmadas con la secuenciación de los fragmentos tripticos de la proteína piridiletalada (Fig. 4.11): Cys 4 en el péptido P15, Cys 14 en P25 y Cys 30 y 31 en P14 (Fig. 4.12). El resto de la secuencia fue idéntica a la de *A. caudatus*



**Figura 4.12.** Estrategia para determinar la estructura primaria de la nsLTP1 de *A. hypochondriacus*. Las asignaciones se basaron en la secuenciación de la proteína intacta (línea sólida) y/o de los péptidos tripticos de la proteína piridiletalada (---). Las posiciones subrayadas corresponden a los derivados PTH-PE de lisina y un derivado desconocido de lisina en distintos péptidos. Toda la secuencia se confirmó con el análisis de varios fragmentos.

Algunos residuos de lisina no fueron cortados con tripsina. Esto podría reflejar algún tipo de modificación (p. e., unión covalente de aductos), o bien, una digestión incompleta del péptido debido al corto tiempo de incubación con tripsina (véase Discusión general). En resumen, la nsLTP1 de *A. hypochondriacus* se compone de 94 residuos, con una secuencia

(Fig. 4.12) idéntica a la que presenta la nsLTP1 de *A. caudatus*. La secuencia se ha depositado en el banco de datos de proteínas (No. de acceso en SwissProt: P83167).

#### 4.5 Comparación de la nsLTP1 de *A. hypochondriacus* con proteínas homólogas

La composición de aminoácidos de la nsLTP1, derivada de la secuencia, se presenta en la tabla 4.1. Esta información se obtuvo con el programa NPS@, disponible en la red (<http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin>). Esta tabla destaca el alto contenido de residuos hidrofóbicos en la proteína (p.e. 16 % de residuos de alanina, 10 % de valina y 5 % de leucina).

**Tabla 4.1** Composición de aminoácidos de la nsLTP1 de amaranto derivada de la secuencia

Residuo	Número	Porcentaje
Ala (A)	15	16.0
Arg (R)	5	5.3
Asn (N)	6	6.4
Asp (D)	1	1.1
Cys (C)	8	8.5
Gln (Q)	4	4.3
Glu (E)	0	0.0
Gly (G)	5	5.3
His (H)	0	0.0
Ile (I)	0	0.0
Leu (L)	5	5.3
Lys (K)	7	7.4
Met (M)	4	4.3
Phe (F)	0	0.0
Pro (P)	5	5.3
Ser (S)	8	8.5
Thr (T)	8	8.5
Trp (W)	0	0.0
Tyr (Y)	3	3.3
Val (V)	10	10.6

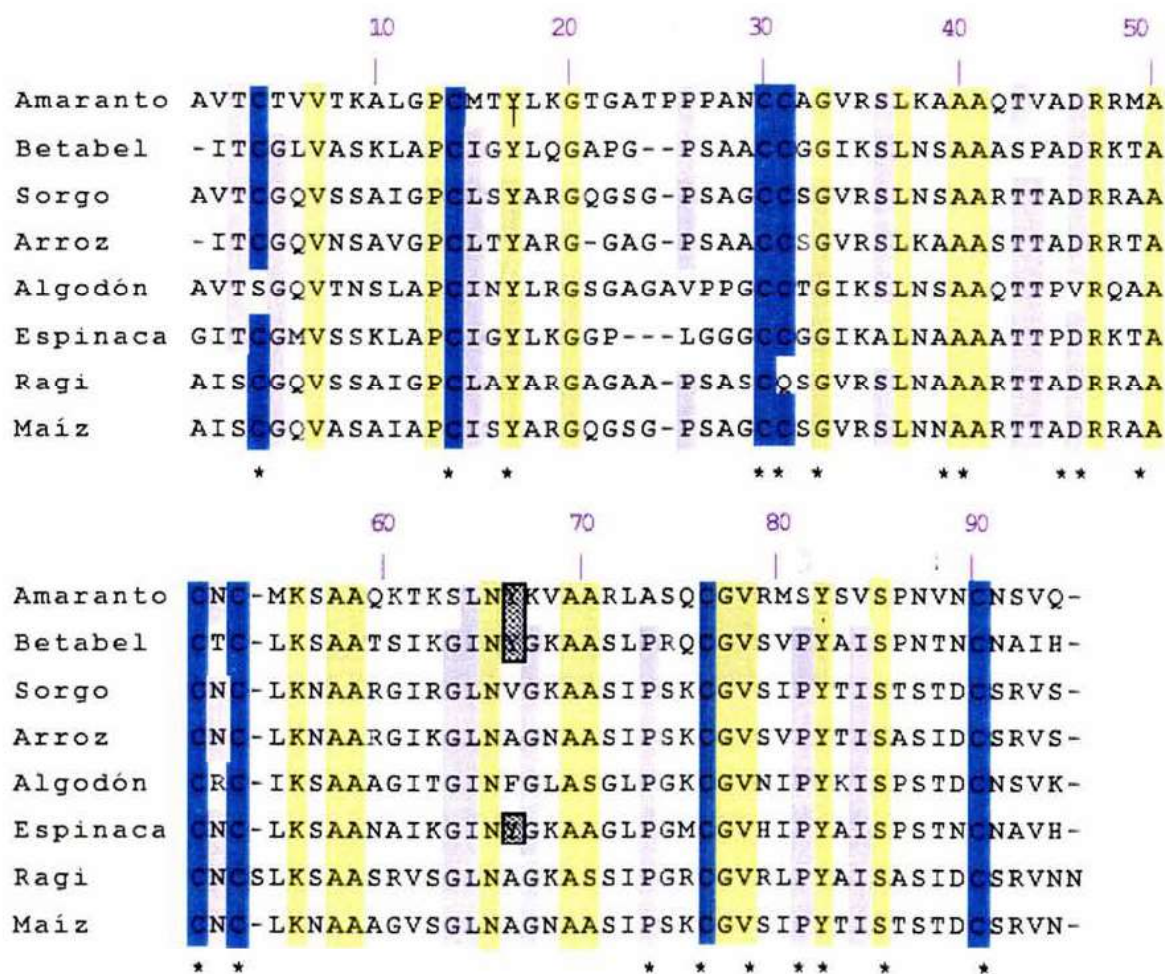
La nsLTP1 de amaranto no contiene residuos de isoleucina (Fig. 4.12), pero han sido reemplazados por sustitución conservada con residuos de valina, leucina y metionina. Igual que otras nsLTPs tipo 1, la proteína de amaranto no contiene residuos de triptofano. Los

residuos de fenilalanina son poco frecuentes en esta familia (p. e. Phe 60 en la isoforma de arroz, NLT4\_ORYSA, y Phe 22 en la isoforma de sorgo, NLT1\_SORVU). En cambio, los residuos de tirosina de los extremos NH<sub>2</sub>- y carboxilo están muy conservados en las nsLTPs. En particular, el residuo de Tyr 82 [la numeración es de la secuencia de la nsLTP1 de amaranto] es fundamental para la unión del grupo carboxilo de ligandos hidrofóbicos en la cavidad de estas proteínas (véase Discusión).

La alineación de secuencias de la nsLTP1 de amaranto con proteínas homólogas registradas en SwissProt mostró una identidad de secuencia de 22 a 57 % con nsLTPs de plantas distintas a la de amaranto. En la alineación de secuencias (Fig. 4.13) se incluyen dos proteínas (de betabel y espinaca) de la familia amarantácea. La nsLTP1 de amaranto comparte 50 % de residuos idénticos con nsLTPs de betabel [84] y sorgo [85], 52 % con una nsLTP de arroz [66], 48 % con nsLTPs de algodón [86] y espinaca, 46 % con el inhibidor de  $\alpha$ -amilasa de finger millet (ragi) [87] y 47 % con una nsLTP de maíz [73]. La nsLTP1 de amaranto tiene tres residuos de metionina (posiciones 15, 54, 80) que corresponden a los residuos de Leu/Ile 15/53 y de Val/Ile/Leu 79, respectivamente, de otras nsLTPs. Estos residuos se encuentran en las hélices H1 y H3 y en una secuencia consenso del C-terminal, respectivamente, lo cual sugiere que en estas regiones los residuos hidrofóbicos son importantes para la función de las nsLTPs.

Los residuos de metionina sustituyen a algunos residuos conservados en las nsLTPs. El residuo de Ala 10 [la numeración es de la nsLTP1 de amaranto] cambia a Met en una isoforma (NLT1\_1 HORVU) presente en semillas de cebada. Los residuos de Tyr 66 y Pro 86 en la nsLTP1 de amaranto cambian por Met 66/85 en la isoforma 3 (NLT\_3 HORVU) de hojas de cebada. Estos residuos se encuentran en posiciones poco conservadas de la hélice H3 y del C-terminal, respectivamente. Asimismo, el residuo de Gln 75 en la nsLTP1 de amaranto cambia a Met 71 en la isoforma 4 (NL41\_HORVU) de hojas de cebada. Este residuo está sustituido por Lys 75 en la mayoría de las nsLTPs de otras especies. En el embrión de semillas de trigo se encuentra una isoforma (NLTB\_WHEAT) que tiene residuos de metionina en las posiciones 18 y 59. Otra isoforma de arroz (NLT4\_ORYSA) tiene tres residuos de metionina en las posiciones 18, 55 y 64 (equivalentes a Leu 18, Met 54 y Ser 63 en la nsLTP1 de amaranto). En la región del asa (loop) 1, que conecta las hélices H1 y H2, hay más sustituciones de residuos entre distintas secuencias de nsLTPs.

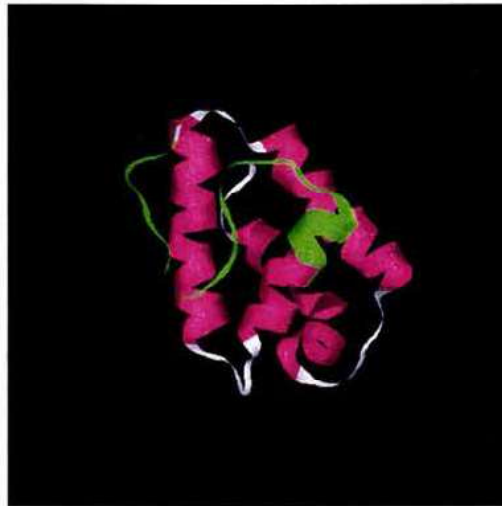
Otras secuencias poco conservadas se encuentran en el asa 3, que conecta las hélices H3 y H4, además de otras secuencias de las hélices H1-H3 y en el C-terminal. En el asa 2 -el más corto de los tres- se conservan los residuos de Ala 40 y Thr 43 en la mayoría de las nsLTPs (Fig. 4.13).



**Figura 4.13** Alineación de secuencias de nsLTPs maduras. Las proteínas son de *Amaranthus hypochondriacus* (P83167), *Beta vulgaris* (Q43748), *Sorghum bicolor* (Q43194), *Oryza sativa* (P23096) [60], *Gossypium hirsutum* (Q43129), *Spinacia oleracea* (P10976), *Eleusine coracana* (Ragi, P23802), y *Zea mays* (P19656) [67]. Los números de acceso en SwissProt se indican entre paréntesis. Los residuos idénticos están en amarillo, los residuos altamente conservados en las nsLTPs se indican con asterisco, otros residuos bien conservados se indican en gris. Los residuos de cisteína se destacan en azul. Los residuos de Tyr 66 se conservan en las tres especies de amarantáceas. La secuencia del péptido señal del N-terminal se ha eliminado manualmente de los precursores de nsLTPs. En la secuencia de la proteína de sorgo se ha eliminado la extensión de residuos ATTSEA, que ocupan las posiciones 24 a 29.

#### 4.6 Secuencia distintiva de la familia nsLTP de plantas

La familia nsLTP de plantas del banco de dominios de PROSITE [Ref. PS00597, PLANT\_LTP] presenta como característica distintiva una secuencia muy conservada situada hacia el extremo C-terminal (Fig. 4.14). Esta región comprende los residuos de Leu 72 a Val 93 en la nsLTP1 de amaranto. La secuencia distintiva de las 49 proteínas que conforman esta familia de PROSITE se muestra en la figura 4.14 y se destaca en la estructura 3D de una nsLTP1 de maíz representada en la figura. 4.15.



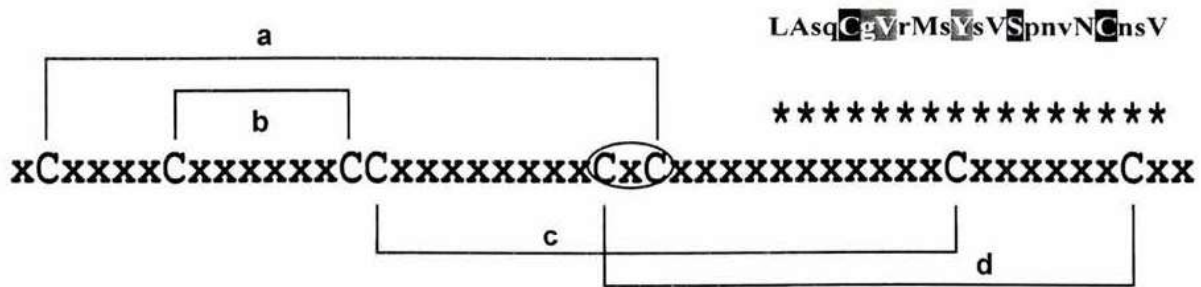
**Figura 4.15.** Estructura 3D de una nsLTP1 de maíz en solución [código PDB:1AFH]. La región en color verde destaca la secuencia distintiva de la familia LTP de plantas del banco de PROSITE [Ref. PS00597], que incluye casi la mitad de los residuos de la hélice H4 y prácticamente todos los residuos del C-terminal. Los extremos NH<sub>2</sub>- y C-terminal están orientados hacia arriba.

#### Puentes disulfuro

Con excepción de unas pocas secuencias de nsLTPs, los ocho residuos de cisteína están altamente conservados en esta familia (Fig. 4.13) y participan en enlaces disulfuro, con conexiones estrictamente conservadas (Fig. 4.16). Por similitud con otras nsLTPs, los puentes disulfuro en la nsLTP1 de amaranto se formarían entre los siguientes residuos: Cys 4-53 (*a*); Cys 14-30 (*b*); Cys 31-76 (*c*) y Cys 51-90 (*d*). Las letras entre paréntesis señalan los puentes en el diagrama de la figura 4.16. La secuencia mostrada arriba de los asteriscos en la Fig. 4.16 corresponde a las posiciones 72-93 en la nsLTP1 de amaranto.

NL41_HORVU/93-114	IPsmCgVsvVpYaaI SasvDcSkI
NL42_HORVU/93-114	IPsmCgVsvVpYaaI SasvDcSkI
NL43_HORVU/93-114	IPsmCgVsvVpYaaI SasvDcSkI
NLT1_ARATH/96-117	IPkaCgVnIpYkaI StstNcKtV
NLT1_BRANA/95-116	LPkaCgVnIpYkaI SkstNcnsV
NLT1_GOSHI/94-115	LPgkCgVnIpYkaI SpstDcnsV
NLT1_HORVU/95-116	IPskCnVnVpYtaI SpdiDcsrI
NLT1_LYCES/92-113	LPgvCgVnIpYkaI SpstDcstV
NLT1_ORYSA/94-115	IPskCgVsvVpYtaI SasiDcsrV
NLT1_PRUAR/69-90	LPgkCgVnIpYkaI SastNcatV
NLT1_PRUDO/69-90	LPgkCgVnVpYkaI SastNcatV
NLT1_PRUDU/95-116	LPgkCgVnIpYkaI SpstNcanV
NLT1_PRUPE/69-90	LPgkCgVhIpYkaI SastNcatV
NLT1_SORBI/96-117	IPskCgVsvVpYtaI StstDcsrV
NLT1_TOBAC/92-113	LPstCgVnIpYkaI SpstDcSkV
NLT2_ARATH/96-117	LPsaCkVnIpYkaI SastNcntV
NLT2_BRANA/95-116	LPkaCgVnIpYkaI SkstNcnsV
NLT2_GOSHI/98-119	LPgkCgVnIpYkaI SpstDcnsV
NLT2_LYCES/92-113	IPsvCkVnIpYkaI SpstDcstV
NLT2_ORYSA/96-117	IPskCgVtIpYtaI SpSiDcssV
NLT2_SORBI/100-121	IPskCgVsvIpYtaI StstDcsrV
NLT2_TOBAC/92-113	LPgaCgVnIpYkaI SpstDcSkV
NLT3_BRANA/95-116	LPkaCgVnIpYkaI SkttNcnsV
NLT3_HORVU/96-117	VPgkCgVsvVpYpaI SmtDcnkV
NLT3_ORYSA/95-116	IPskCgVsvIpYtaI SpSiDcsrV
NLT3_PRUDU/101-122	LPgkCgVnIpYkaI SpstDcksI
NLT4_ORYSA/77-98	IPskCgVsvVpYpaI StsvDcSkI
NLT5_ARATH/96-117	LPgaCrvrIsvpI SartNcntV
NLT5_ORYSA/95-116	IPskCgVnIpYaaI SpstDcsrV
NLT6_GOSHI/98-119	LPgcCnVhIpYkaI SpSiDckrV
NLTA_BRAOL/96-117	IPkaCgVsvVpYpaI StntNcnnV
NLTA_RICCO/70-91	LPkkCgVdInIpI SkttNcqaI
NLTA_WHEAT/92-113	IPpkCgVnIpYtaI SlniDcsrV
NLTB_BRAOL/95-116	LPkaCgVnIpYkaI SkstNcnsV
NLTB_RICCO/70-91	LEykCgVvInVpI SkttNcheI
NLTC_RICCO/94-115	IPaaCnIkVgIpV StntNcetI
NLTD_BRAOL/96-117	LPkaCgVnIpYkaI SkttNcnsV
NLTD_RICCO/94-115	IPaaCnIkVgIpV StatNcetI
NLTP_AMACA/72-93	LAsqCgVrMsVsV SpnvNcnsV
NLTP_BETVU/95-116	LPrcCgVsvVpYaaI SpntNcnaI
NLTP_CICAR/93-114	LPgkCvVnIpYkaI StstNcatI
NLTP_DAUCA/98-119	LParCgVnIpYkaI SpstDcnrV
NLTP_ELECO/72-93	IPgrCgVrIpYaaI SasiDcsrV
NLTP_GERHY/94-115	LPgkCgIsIgYkaI TpnIDcSkI
NLTP_MAIZE/98-119	IPskCgVsvIpYtaI StstDcsrV
NLTP_MALDO/93-114	LPgkCgVnVpYkaI StstNcatV
NLTP_PRUAV/95-116	LPgkCgVnVpYkaI SpstNcatV
NLTP_PYRCO/93-114	LPgkCgVnVpYkaI StstNcatV
NLTP_SPIOL/95-116	LPgmCgVhIpYaaI SpstNcnaV

**Figura 4.14.** Alineación de secuencias que distinguen a la familia nsLTP de plantas del banco de dominios de PROSITE [ref. PS00597]. Los dos residuos de cisteína se conservan en todas las proteínas. Con excepción de la nsLTP de amaranto, el primer residuo de prolina se conserva en todas las proteínas de esta familia. Las secuencias se alinearon con CLUSTALW; los números corresponden a la posición de esta región en la secuencia completa de cada proteína.



**Figura 4.16.** Representación de las conexiones de cisteínas en los cuatro puentes disulfuro de nsLTPs1 de plantas. El residuo hidrofílico Asn 49/52, altamente conservado en el motivo –CXC– de la familia nsLTP1, está sustituido por un residuo hidrofóbico de Phe/Leu 36/37 en la familia nsLTP2. La secuencia representada con asteriscos distingue a la familia nsLTP de plantas del banco de dominios de PROSITE [Ref. PS00597]. Con excepción del residuo X en el motivo C-X-C, el número de residuos entre las cisteínas es sólo una aproximación.

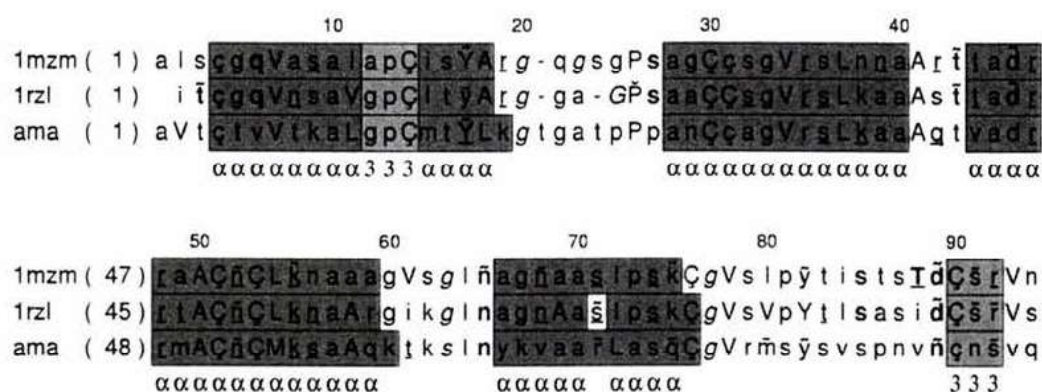
La cisteína 90 del C-terminal se encuentra en una hélice  $3_{10}$  de nsLTPs de maíz y arroz (Fig. 4.17) [la numeración corresponde a la proteína de amaranto]. Este residuo hace conexión (puente *d*) con la Cys 51 de la hélice H3. Ésta se conecta con la hélice H1 a través del puente (*a*), formado entre las Cys 4-53. El puente (*b*) une a la Cys 14 de la hélice  $3_{10}$  interpuesta en la hélice H1 con la Cys 30 de la hélice H2. A su vez, ésta se conecta con la hélice H4 por unión de las cisteínas 31 y 76 (puente *c*). Este último residuo está en el límite de la hélice H4 y el inicio de la región C-terminal. En la nsLTP1 de maíz la Cys 76 ya no forma parte de la hélice H4 [73]. De esta manera, los puentes disulfuro conectan todos los elementos de la estructura secundaria de las nsLTPs, lo que podría explicar la alta estabilidad de estas proteínas.

La alineación de estructuras 3D de nsLTPs1 de maíz y arroz [73,66] con una estructura modelo de la nsLTP1 de amaranto [88] predice que las ocho cisteínas estarían en las regiones helicoidales de esta proteína (Fig. 4.17).

#### 4.7 Análisis de la estructura secundaria de la nsLTP1 de amaranto por dicroísmo circular

El espectro de dicroísmo circular (DC) en el UV lejano de la proteína, a 25 °C, muestra dos mínimos a 222 y 208 nm y un máximo positivo a 190 nm (Fig. 4.18). Este tipo de espectro es característico de las proteínas que presentan un alto contenido de estructura helicoidal.

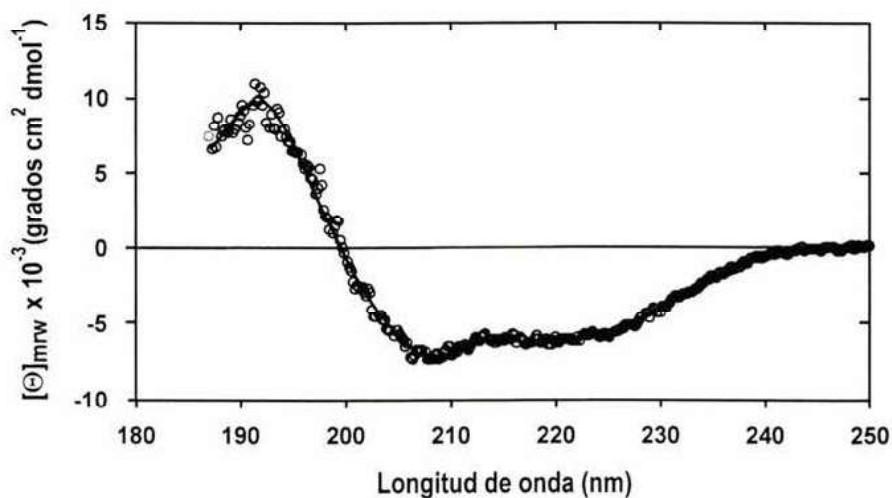




**Claves de JOY**

Inaccesible al solvente	MAYÚSCULA	x
Accesible al solvente	minúscula	x
Hélice alfa	<b>x</b>	x
Hebra beta	<u>x</u>	x
Hélice 3 <sub>10</sub>	<i>x</i>	x
Enlace de H con amida de la cadena principal	<b>negrita</b>	x
Enlace de H con carbonilo de la cadena principal	<u>subrayada</u>	x
Enlace de H con otra cadena lateral	tilde	x
Enlace disulfuro	cedilla	ç
φ Positivo	itálica	x
Péptido cis	breve	˘

**Figura 4.17.** Alineación de secuencias de estructuras de nsLTPs de maíz (código PDB:1mzm), arroz (código PDB:1rzi) y amaranto (ref.88) en formato de JOY [88a]. Los códigos (abajo) representan el ambiente estructural, con especial énfasis en las interacciones de residuos en las proteínas. [Adaptado de la ref. 88].



**Figura 4.18.** Espectro de dicroísmo circular de la nsLTP1 de amaranto en el UV lejano, a 25 °C. La concentración de proteína es de 0.1 mg· mL<sup>-1</sup> en buffer de fosfatos 0.04 M, pH 6.0.

Los resultados de la predicción de la estructura secundaria de la nsLTP1 de amaranto se incluyen en la tabla 4.2. Los valores son porcentajes aproximados del contenido de elementos de estructura secundaria. En la primera columna aparecen los porcentajes estimados a partir de la secuencia con el programa SOPM [89]. El contenido de estructura secundaria estimado de los espectros de DC [88] aparece en la columna 2. La columna 3 resume el contenido de estructura helicoidal y hebras extendidas derivado de la alineación de estructuras 3D de nsLTPs de maíz y arroz de la base de datos de HOMSTRAD [90] (véase ref. 88 y Fig. 4.17). Las predicciones de la estructura secundaria con los tres métodos son consistentes con los espectros de DC y con la estructura secundaria helicoidal predominante que caracteriza a las proteínas nsLTPs de plantas.

**Tabla 4.2** Predicción de la estructura secundaria de la nsLTP1 de amaranto.

<b>Elementos de estructura secundaria</b>	<b>SOPM <sup>89</sup></b>	<b>SELVAR <sup>88</sup></b>	<b>Modelo 3D <sup>88</sup></b>
Hélice $\alpha$	50.0	47	57
Hélice $3_{10}$	0		6
Hebra extendida	20.21	7	
Vuelta $\beta$	9.57		
Estructura irregular	20.21	46	

Los valores son porcentajes del contenido estructural.

Los espectros de la proteína en soluciones buffer, pH 7 y 8 (no mostrados), son similares al que presenta la proteína en un buffer de pH 6 (Fig. 4.18). La estructura secundaria de la proteína parece menos estable en un buffer de pH 5. Los experimentos preliminares de desnaturalización térmica sugieren que la estructura de la nsLTP1 de amaranto no se modifica sustancialmente en el intervalo de 20 a  $\sim$ 70 °C en el buffer de pH 6. Esta medición se hizo únicamente a 222 nm con un gradiente de temperatura de 10 °C por hora.

La sensibilidad de la nsLTP1 de amaranto a la desnaturalización térmica parece ser considerablemente mayor que la de una nsLTP1 de cebada [91], cuya temperatura de fusión está cerca de 100 °C. Esta proteína exhibe además alta resistencia a la acción proteolítica de pepsina y termolisina (a 70 °C). La resistencia de las nsLTPs a condiciones poco favorables podría estar relacionada con su posible participación en las respuestas de la planta a situaciones de estrés. Por otra parte, la resistencia de una nsLTP de plantas a la actividad proteolítica de pepsina podría ser un indicador válido de su potencial alergénico, en concordancia con la hipótesis de que los alérgenos de alimentos por lo general deben resistir la degradación durante la digestión [92]. Dado que algunas nsLTPs son también alérgenos (Sección 5.4), será interesante establecer la estabilidad de la nsLTP1 de amaranto a la acción de esta enzima.

#### **4.8 Plegamiento global de la familia nsLTP de plantas y unión de lípidos**

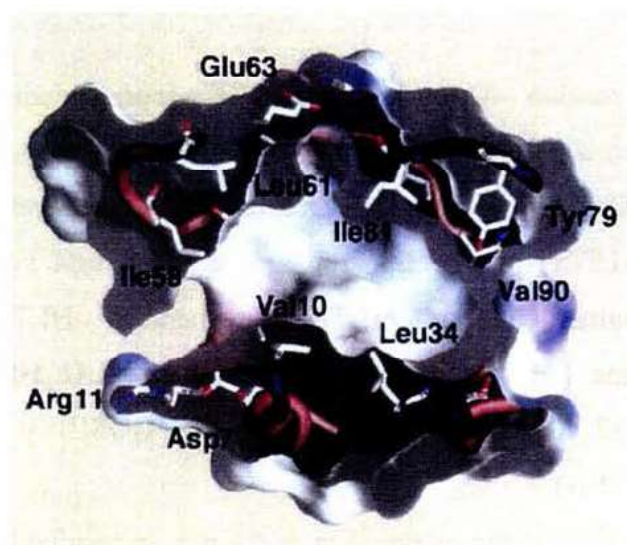
La naturaleza del residuo –X– en la tríada –CXC– [correspondiente a los residuos de Cys51-Asn52-Cys53 en la nsLTP1 de amaranto] influye en el patrón de plegamiento de las dos familias nsLTPs (Cap.2, Sección 2.3). El residuo de Asn 49/52 está muy conservado en la mayoría de las nsLTPs tipo 1. Sin embargo, a veces está sustituido por residuos hidrofílicos de treonina (en las nsLTPs de betabel: NLTP\_BETVU y trigo: NLTB\_WHEAT), lisina (en la isoforma 4 de cebada: NL41\_HORVU), arginina (en isoformas de cebada: NLT3\_HORVU, y algodón: NLT2\_GOSHI) y serina (en la isoforma 4 de arroz: NLT4\_ORYSA).

La sustitución del residuo hidrofílico Asn 49/52 por un residuo hidrofóbico de Phe 36 en las nsLTPs tipo 2 influye en la conformación que adopta el lípido en la cavidad hidrofóbica y en el plegamiento global de estas proteínas. La estructura a alta resolución de una nsLTP2 de trigo unida con L- $\alpha$ -palmitoil fosfatidil glicerol [70] indica que la cavidad de esta proteína ( $\sim 341 \text{ \AA}^3$ ) de 67 residuos y un diámetro de  $30 \text{ \AA}$  tiene dimensiones que se encuentran entre las que presentan las nsLTPs tipo 1. La diferencia más notable entre esta proteína y las nsLTPs tipo 1 es la presencia de cinco hélices  $\alpha$  que forman una superhélice derecha, la cual envuelve la cadena del ácido graso. Otras diferencias importantes se encuentran en las hélices H3 y H4, en el C-terminal y en la última vuelta de la hélice H2.

Como consecuencia, en la nsLTP2 de trigo el fosfolípido se encuentra más compactado en la cavidad y se orienta en dirección ortogonal a la que adopta en la nsLTP1 [70] (véase figuras 2.6-7, Cap.2).

### Residuos hidrofóbicos en las cavidades de nsLTPs de plantas

En la familia nsLTP1 hay varios residuos hidrofóbicos altamente conservados que incluyen Val 17, Leu 37, Ala 40,41,50,69 y Val 78 (Fig. 4.19) [la numeración es de la secuencia de la nsLTP1 de amaranto]. Estos residuos forman parte de la cavidad de estas proteínas. Así, en la estructura cristalina de una nsLTP1 de trigo unida con dos moléculas del fosfolípido liso-miristoil-fosfatidilcolina [67], los principales residuos hidrofóbicos que delimitan la cavidad son: Val 10, Leu 34, Ile 58, Leu 61 Tyr 79, Ile 81 y Val 90 (Fig. 4.19).



**Figura 4.19** Vista transversal de la cavidad hidrofóbica de una nsLTP1 de trigo [código PDB: 1BWO]. [Tomado de Charvolin y col. 1999; ref. 67].

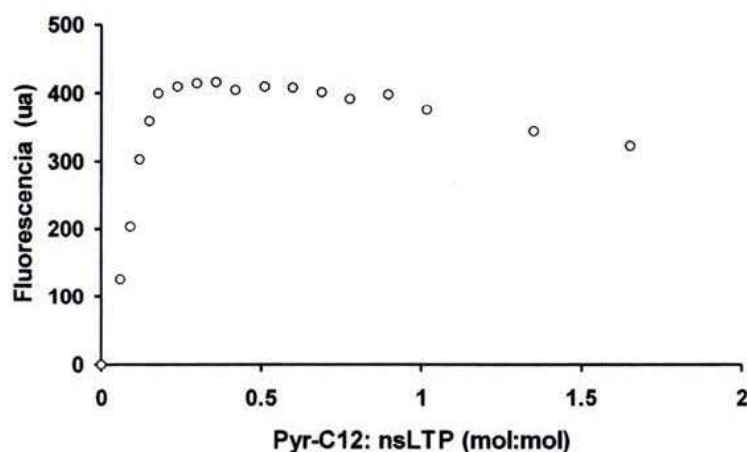
En la nsLTP1 de maíz unida con palmitato, los residuos hidrófobos que contribuyen en la interacción con la cola del lípido son: Ile 15, Ala 18, Val 33, Leu 36, Ala 40, Ala 49, Leu 53, Val 60, Ile 71, Pro 72, Val 77 e Ile 79 [73]. En esta proteína, el residuo estrictamente conservado de Tyr 81 (equivalente a los residuos de Tyr 82 en la nsLTP1 de amaranto y Tyr 79 en las nsLTPs de arroz y trigo) es crítico para la unión de ligandos hidrófobos

mediante la formación de enlaces de H entre el -OH de la cadena lateral y uno de los átomos de O del grupo carboxilato del ligando [74] (Sección 4.12).

#### 4.9 Ensayo de unión de lípidos por espectroscopia de fluorescencia

La emisión de fluorescencia del monómero de pireno (378 nm) excitado a una longitud de onda de 343 nm experimenta apagamiento por oxígeno en medio acuoso o en etanol. El aumento en la fluorescencia medida a 378 nm es, por tanto, un indicador de que el fluoróforo se ha insertado en un medio hidrofóbico, donde no está en contacto con la solución. Esta propiedad del pireno se ha empleado para estudiar la unión de ligandos hidrófobos marcados con el fluoróforo, particularmente el ácido 1-pireno-dodecanoico (1-Pyr-C12), con nsLTPs de plantas y animales [25, 93].

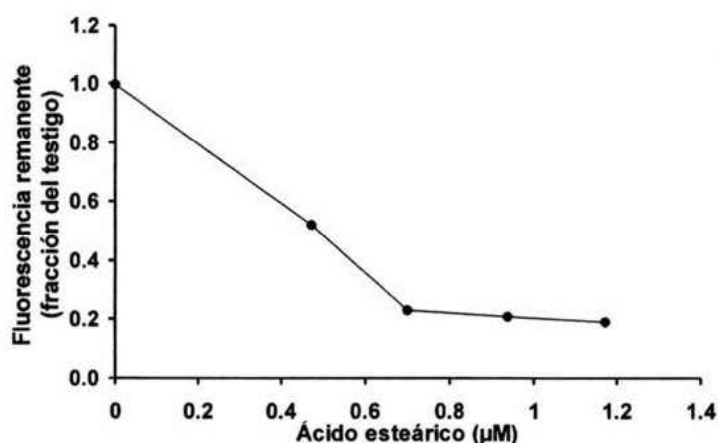
Durante la titulación de una solución de nsLTP1 de amaranto (10  $\mu\text{M}$ ) con 1-Pyr-C12 se observó un aumento en la emisión de fluorescencia del pireno a 378 nm excitado a 343 nm (Fig.4.20), lo cual sugiere que el fluoróforo se ha insertado en la cavidad de la proteína. La intensidad de fluorescencia alcanza una meseta aparente, pero decae significativamente alrededor de una relación lípido/proteína de 0.8. Por esta razón, no fue posible estimar con exactitud razonable la afinidad de esta proteína por el lípido.



**Figura 4.20.** Unión de 1-Pyr-C12 con la nsLTP1 de amaranto determinada por fluorescencia. La emisión del monómero de pireno ( $\lambda_{\text{exc}} = 343 \text{ nm}$ ) se midió a 378 nm tras la adición de concentraciones crecientes del fluoróforo a la proteína (10  $\mu\text{M}$ , en buffer de fosfatos 0.04 M, pH 6). Los valores en las abscisas representan la relación de concentraciones de lípido y proteína.

El apagamiento de la fluorescencia del monómero de pireno a 378 nm se acompañó de un aumento en la emisión de fluorescencia a 488 nm, donde emite principalmente el excímero del pireno (un dímero de pireno en estado excitado). El apagamiento de la fluorescencia del monómero de pireno se ha observado también en experimentos similares de unión de 1-Pyr-C12 con nsLTPs de maíz y trigo [25]. Este comportamiento fue explicado por la unión de dos moléculas del fluoróforo en la cavidad de estas proteínas. La estructura cristalina de la nsLTP1 de trigo unida con liso-miristoil fosfatidilcolina [código PBD:1BWO] confirmó que la proteína puede acomodar dos moléculas de fosfolípido, las cuales se insertan en una orientación cabeza cola dentro de la cavidad [67], (Sección 4.11). Por el contrario, las estructuras cristalinas a alta resolución de la nsLTP1 de maíz han mostrado que esta proteína es capaz de unir una sola molécula de lípido en su cavidad [35].

El 1-Pyr-C12 puede ser desplazado de la cavidad hidrofóbica de las nsLTPs por otro ácido graso no fluorescente, y se manifiesta como una disminución en la fluorescencia del monómero de pireno a 378 nm. La eficiencia del desplazamiento del fluoróforo es, por tanto, un indicador de la afinidad de la proteína por el lípido no fluorescente [93].



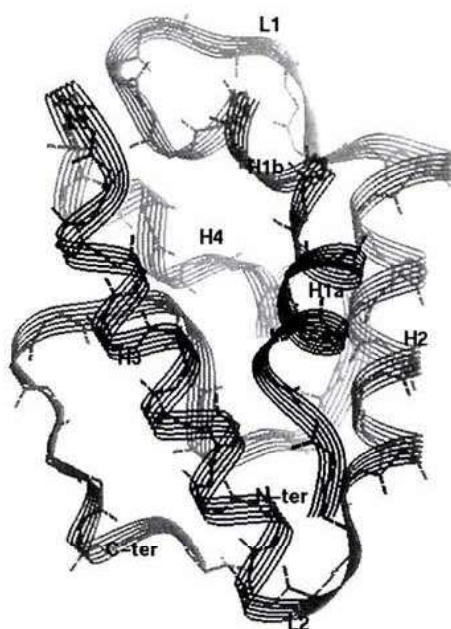
**Figura 4.21** Desplazamiento de 1-Pyr-C12 por ácido esteárico del sitio de unión de la nsLTP1 de amaranto. La proteína (6.7 µM) se equilibró con el fluoróforo (7.5 µM) durante 30 min a 25 °C previo a la titulación con ácido esteárico. Los valores en la ordenada representan la fluorescencia remanente del monómero de pireno a 378 nm.

La eficiencia del desplazamiento de 1-Pyr-C12 (7.5 µM) por ácido esteárico de la cavidad hidrofóbica de la nsLTP1 de amaranto se muestra en la figura 4.21. La

fluorescencia remanente del monómero de pireno decae hasta un 80 % tras la adición de  $\sim 1.2 \mu\text{M}$  de ácido esteárico. Estos resultados sugieren que la cavidad hidrofóbica de la nsLTP1 de amaranto es capaz de acomodar ácidos grasos de cadena larga ( $\text{C}_{12}\text{-C}_{18}$ ) con baja especificidad. Esta propiedad es característica de las nsLTPs, cuyo nombre justamente se refiere a las proteínas capaces de unir y/o transportar lípidos de manera no específica.

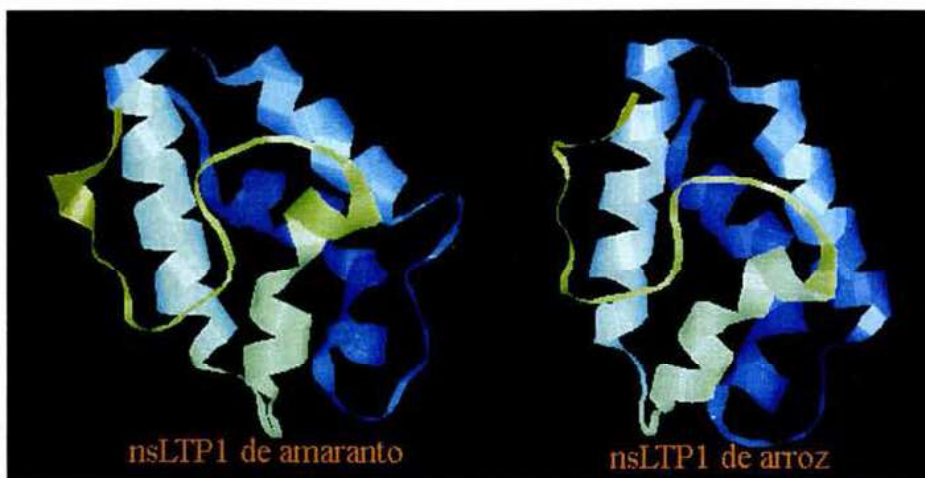
#### 4.10 Modelos 3D de la nsLTP1 de amaranto

El patrón de plegamiento global de la estructura 3D del modelo de la nsLTP1 de amaranto (Fig. 4.22) es semejante al de las estructuras conocidas de nsLTPs tipo 1. La estructura del modelo presenta un solo dominio formado por cuatro hélices  $\alpha$  (H1-H4) conectadas por tres asas (L1, L2 y L3) y un largo segmento C-terminal que rodea parcialmente el haz de hélices adoptando la forma de un saxofón. La hélice H1 está dividida en dos partes (H1a y H1b) por un residuo de prolina (en posición 13) que altera el patrón de enlaces de H  $\alpha$ -helicoidales entre los residuos de Ala 10-Cys 14 y Leu 11-Met 15.



**Figura 4.22.** Representación de las coordenadas del esqueleto de C- $\alpha$  del modelo 3D de la nsLTP1 de amaranto. La hélice H1 (al frente) se divide en dos partes (H1a y H1b) por un residuo de Pro 13, con un ángulo de  $\sim 21^\circ$ . El C-terminal (atrás) envuelve parcialmente el haz de hélices. El modelo se construyó con O [81] a partir de la estructura 3D de una nsLTP1 de arroz [código PDB:1rzt] y se afinó con CNSSOLVE [82]. La imagen se generó con QUANTA.

La figura 4.23 contrasta las estructuras 3D del modelo de la nsLTP1 de amaranto y de la nsLTP1 de arroz (código PDB:1rzl) utilizada para construir el modelo. Las coordenadas del esqueleto de C- $\alpha$  de ambas estructuras se superponen en la figura 4.24. Las diferencias más notables se encuentran en las regiones que conforman el asa L1 (formada por Gly 20, Thr 21, Gly 22, Ala 23, Thr 24, la tríada de Pro 25-27 y los residuos de Ala 28 y Asn 29), especialmente antes del comienzo de la hélice H2 de la nsLTP1 de amaranto.

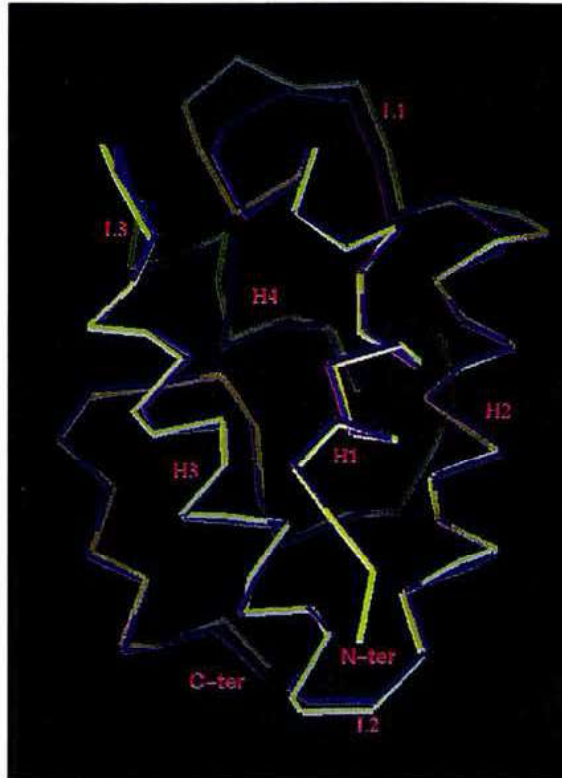


**Figura 4.23.** Comparación de estructuras de nsLTPs de amaranto (modelo 3D) y arroz [código PDB:1rzl]. Ambas proteínas comparten una identidad de secuencia de 51%. La hélice H1 del N-terminal se colorea en azul intenso; la hélice H4 y el C-terminal (al frente) aparecen en color verde. Los extremos N- y C-terminal apuntan hacia arriba. Las imágenes se generaron con RasMol (RasWin Molecular Graphics, Windows, v. 2.76).

La inserción de dos residuos adicionales de treonina (Thr 21, 24) en la estructura de la nsLTP1 de arroz aumenta la longitud del asa L1 en el modelo de la nsLTP1 de amaranto. Además, la sustitución de la secuencia Gly 22-Pro 23-Ser 24 en la proteína de arroz por la tríada de residuos de prolina (Pro 25-27) presentes en la nsLTP1 de amaranto influye notablemente en la conformación de los residuos de Ala 28 y Asn 29. De hecho, estos dos residuos ya forman parte de la hélice H2 en las nsLTPs de arroz, maíz y cebada [33-35, 66] y en el modelo de la estructura 3D de la proteína de amaranto unida con estearato [88]. Cabe señalar que sólo el residuo de Pro 26 (equivalente a Pro 23 en la nsLTP1 de arroz) se conserva en la mayoría de las nsLTPs (Fig. 4.13). Como consecuencia de estas sustituciones, la longitud del asa L1 en el modelo aumenta a expensas del comienzo de la



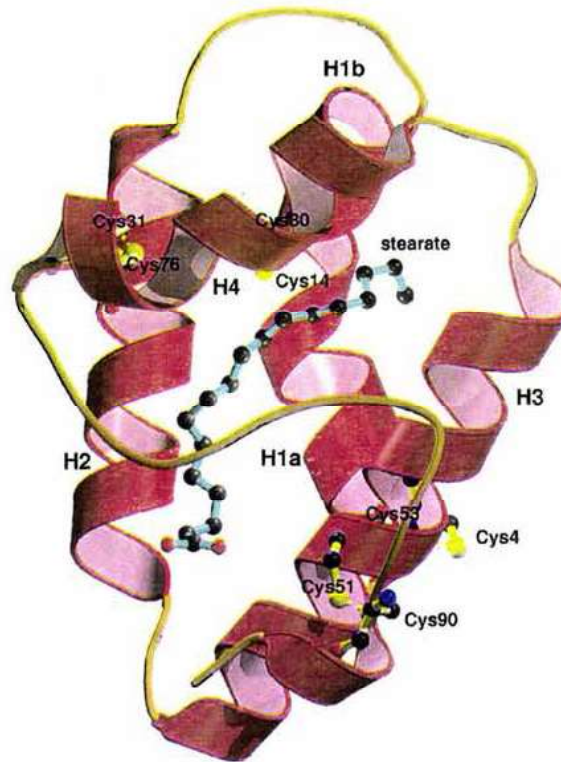
hélice H2 (figuras 4.23 y 4.24). Aparte de otras diferencias en el asa L3, la hélice H4 y la región C-terminal, el resto de la estructura del esqueleto del modelo tiene una conformación parecida a la que presenta la nsLTP1 de arroz (Fig. 4.23).



**Figura 4.24.** Superposición de las coordenadas del esqueleto del modelo de la nsLTP1 de amaranto (en verde) y de la estructura 3D de una nsLTP1 de arroz (en azul). Las diferencias más notables entre estas estructuras se encuentran en la conformación del asa L1. La imagen se generó con QUANTA.

Finalmente, es conveniente mencionar que el modelo de la estructura de la nsLTP1 de amaranto unida con estearato [88], generado a partir de las estructuras 3D de nsLTPs1 de maíz y arroz, sugiere que la proteína de amaranto unida con una molécula de lípido podría adoptar un plegamiento global parecido al de la nsLTP1 de maíz ligada con palmitato, aunque la identidad de secuencia entre las nsLTPs1 de amaranto y arroz es algo mayor (51 % contra 47 %). En este modelo, los residuos de Ala 28 y Asn 29 efectivamente forman parte de la hélice H2; por consiguiente, el asa L1 se acorta y luce más rígida que en el

modelo de la nsLTP1 libre (Fig. 4.25). El modelo de la proteína unida con estearato fue construido con MODELLER a partir de la misma estructura de la nsLTP1 de arroz [código PDB:1rzl] y de una nsLTP1 de maíz unida con palmitato [código PDB:1mzm] (para los detalles, véase ref. 88).



**Figura 4.25.** Representación del modelo 3D de la nsLTP1 de amaranto unida con estearato. El lípido se representa con bolas y barras en el interior de la estructura. Las líneas de puntos (en amarillo) representan los cuatro puentes disulfuro. Los extremos N- y C-terminal aparecen al frente de la estructura [Tomado de Ramírez-Medeles y col. 2003; ref. 88]

### Residuos de prolina en las regiones helicoidales de nsLTPs de plantas

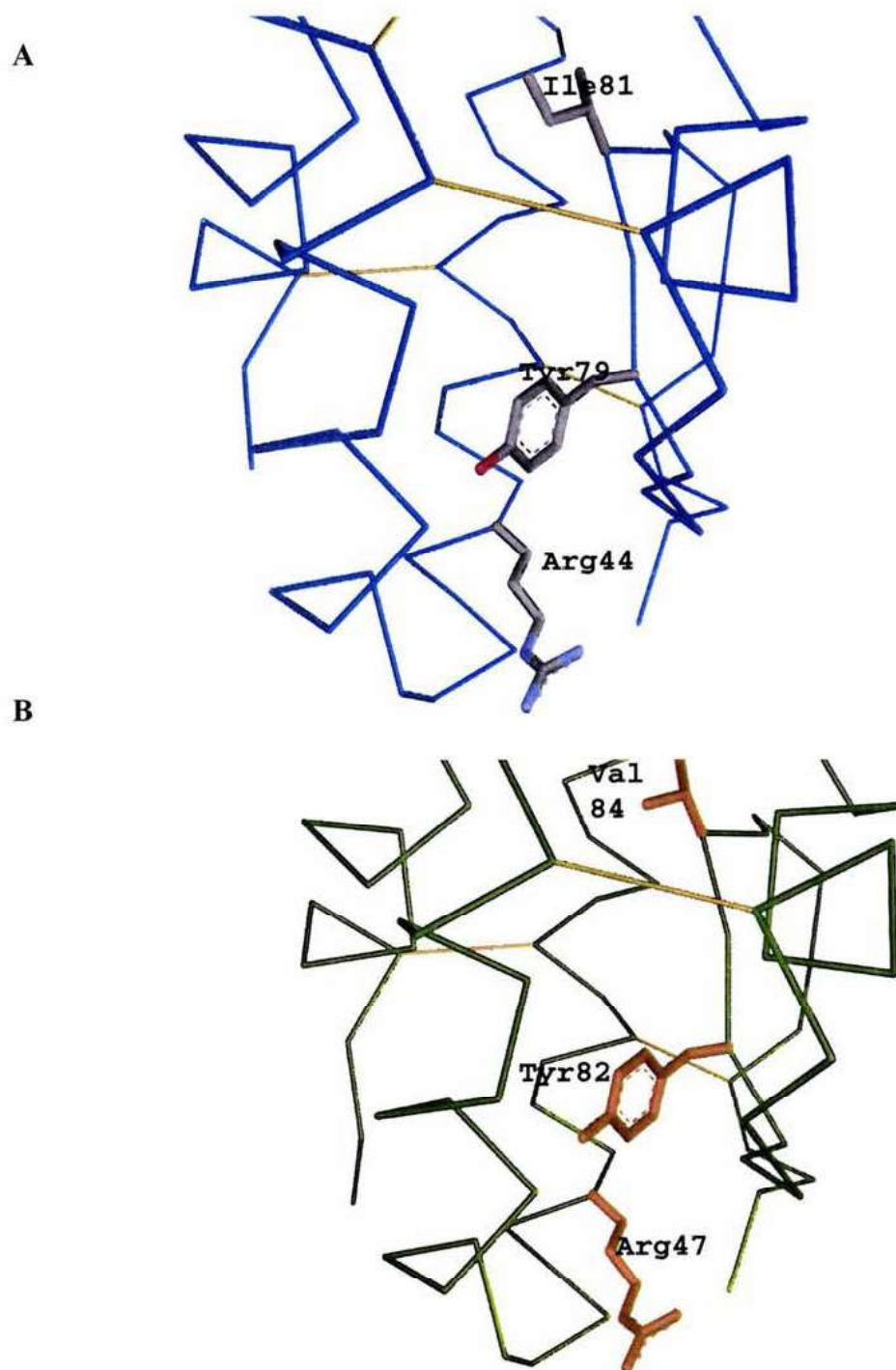
Los residuos altamente conservados de Pro 12/13 y Pro 70/72 son estructuralmente importantes en las nsLTPs debido a que se encuentran en regiones  $\alpha$  helicoidales (hélices H1 y H3, respectivamente), donde inducen torsiones de las hélices debido a que eliminan enlaces de hidrógeno con el esqueleto del polipéptido [94]. El residuo de Pro 12/13 (equivalente a Pro 13 en la nsLTP1 de amaranto) induce una torsión de  $\sim 20^\circ$  en la hélice H1

de nsLTPs de maíz y arroz. Como consecuencia, la hélice H1 se divide en dos partes (H1a y H1b) [66,71, 73]. El residuo de Pro 70/72 induce también una ligera curvatura en la hélice H4 de ambas proteínas y puede influir en la posición del C-terminal respecto del resto de la molécula. La mutación Pro 70/72→ Ala 73 en la nsLTP1 de amaranto debe influir en la conformación de la hélice H4 y la región C-terminal, sin embargo, este residuo de prolina no parece ser determinante para la unión de ligandos hidrófobos, como sugieren los experimentos de unión y desplazamiento de 1-Pyr-C12 (Sección 4.9). La mutación del residuo de Pro 72 por leucina disminuye la actividad antifúngica de una nsLTP1 de arroz [100]. En este sentido, la ausencia del residuo de Pro 72 en la nsLTP1 de amaranto ofrece una valiosa oportunidad para establecer si este residuo es crítico para la actividad antifúngica de las nsLTPs de plantas.

### **Residuos conservados y dimensiones de las cavidades hidrofóbicas de nsLTPs de plantas**

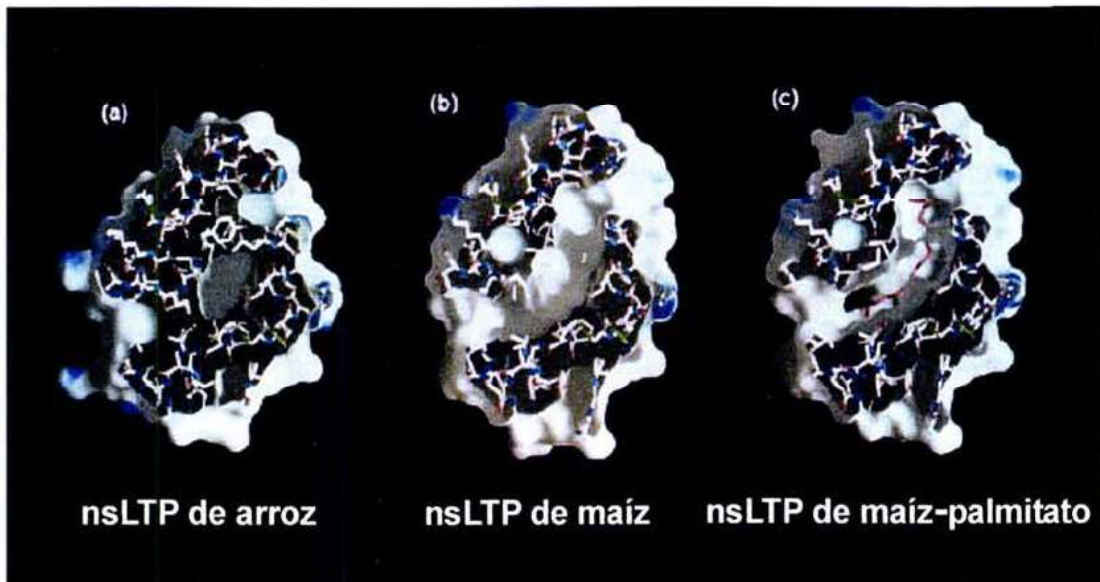
La región C-terminal de la estructura de la nsLTP1 de arroz (código PDB:1rzl) empleada como molde para generar el modelo de la nsLTP1 de amaranto se encuentra algo colapsada en la cavidad hidrofóbica, lo que podría deberse, en parte, a la ausencia de un lípido unido en esta estructura [66]. El colapso de esta región es más notable alrededor del segmento formado por los residuos de Tyr 79 - Ile 81 (equivalentes a Tyr 82 y Val 84 en la de nsLTP1 amaranto), (Fig. 4.26). El volumen de la cavidad de la nsLTP1 de arroz (144 Å<sup>3</sup>) es mucho menor que el que presenta la proteína de maíz libre (408 Å<sup>3</sup>) o unida con palmitato (585 Å<sup>3</sup>), a pesar de que ambas proteínas comparten una identidad de secuencia de 79% [66] (figuras 4.27-28). Además de la falta de lípido, el colapso parcial de la cavidad en la nsLTP1 de arroz es consecuencia de la posición del residuo de Tyr 79 en la cavidad principal, que la divide en dos segmentos o cavidades menores (figuras 4.26A y 4.27a).

El residuo de Arg 44 bloquea parcialmente la boca de la cavidad de la nsLTP1 de arroz y el otro extremo de la misma prácticamente se cierra por el residuo de Ile 81 (Fig. 4.26A). Es interesante notar que en el modelo de la nsLTP1 de amaranto el residuo de Val 84 (equivalente al de Ile 81 en la nsLTP1 de arroz) no obstruye totalmente la cavidad hidrofóbica (figuras 4.26B y 4.29). La mutación por un residuo más pequeño podría hacer más grande la cavidad de la proteína de amaranto comparada con la de arroz.



**Figura 4.26.** Residuos que delimitan los extremos de las cavidades de nsLTPs de arroz y amaranto. Las imágenes representan parte de la cavidad de una nsLTP1 de arroz (código PDB:1rzi) (A) y del modelo 3D de la nsLTP1 de amaranto libre (B). Los residuos de Arg se encuentran en la entrada de la cavidad. El residuo de Tyr divide la cavidad principal en dos partes. Las estructuras se construyeron con el programa Weblab Viewerlite v.5 (<http://www.Accelrys.com>). Las imágenes fueron generadas con el programa POV-ray v.3.1 (<http://www.povray.org>).

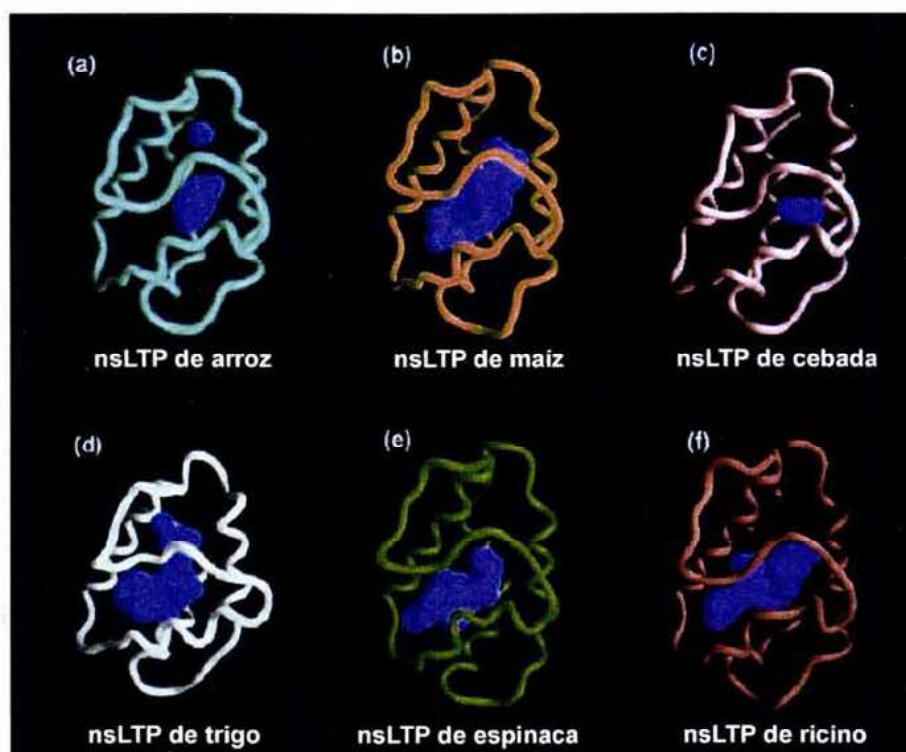
La estructura de la cavidad de la nsLTP1 de maíz contrasta espectacularmente con la que presenta la proteína homóloga de arroz [66] (figuras 4.27-28). La cadena lateral del residuo de Arg 46 (equivalente a Arg 44 en la nsLTP1 de arroz) se extiende hacia el disolvente y deja la cavidad abierta en este extremo. En la estructura de la nsLTP1 de maíz unida con palmitato [73] (Fig. 4.27c), la cadena de acilo empuja la cadena lateral de Ile 83 lejos de la cavidad hidrofóbica. Aun en la estructura libre (Fig. 4.27b), el residuo de Ile 83 (Ile 81/Val 84 en las nsLTPs de arroz y amaranto) no obstruye completamente la cavidad. De esta manera, la cavidad en la nsLTP1 de maíz atraviesa la estructura como un túnel (figuras 4.27b y c).



**Figura 4.27.** Vista transversal de las cavidades de nsLTPs1 de arroz y maíz. Las estructuras *a* y *b* son de las proteínas libres. La estructura *c* es de la proteína de maíz unida con palmitato, que se distingue en color rojo a lo largo de la cavidad hidrofóbica. El residuo de Tyr 79 divide la cavidad de la nsLTP1 de arroz. [Adaptado de Lee y col. 1998; ref. 66].

Los volúmenes de las cavidades hidrofóbicas de las nsLTPs tipo 1 son variables, con dimensiones que abarcan desde  $<100$  a poco más de  $600 \text{ \AA}^3$  [66], (Fig. 4.28). Las dimensiones de la cavidad hidrofóbica de nsLTPs de maíz y cebada unidas con lípidos son mucho mayores que las de otras nsLTPs1 de estructura conocida. Aunque la nsLTP1 de maíz sólo puede acomodar una molécula de lípido, como demuestran las estructuras

crystalinas de la proteína unida con distintos ácidos grasos [35], la longitud de la cadena del ligando puede aumentar de C<sub>10</sub> a C<sub>18</sub> sin que haya cambios sustanciales en el patrón de plegamiento global de la proteína.



**Figura 4.28.** Representación de las cavidades hidrofóbicas de nsLTPs1 de plantas. El patrón de plegamiento es similar en todas estas proteínas. Los extremos N- y C-terminal apuntan hacia arriba. [Adaptado de Lee y col. 1998; ref. 66].

La plasticidad de la cavidad de la nsLTP1 de cebada es algo más espectacular. Cuando la proteína no está unida con lípidos (código PDB:1jtb), el volumen de la cavidad es relativamente pequeño ( $69 \text{ \AA}^3$ ), (Fig. 4.28c). Sin embargo, la cavidad puede expandirse casi 10 veces ( $620 \text{ \AA}^3$ ) cuando esta proteína forma un complejo con palmitoil CoA [24]. La plasticidad de esta estructura se ha atribuido, en parte, a la posición del residuo de Tyr 79 en la cavidad, que puede rotar hacia el disolvente para permitir la inserción del lípido. Es interesante notar que el residuo de Tyr 87 en la elicitorina llamada criptogeína también es desplazado de la cavidad cuando la proteína está unida con una molécula de ergosterol (véase Sección 5.3, Cap. 5).

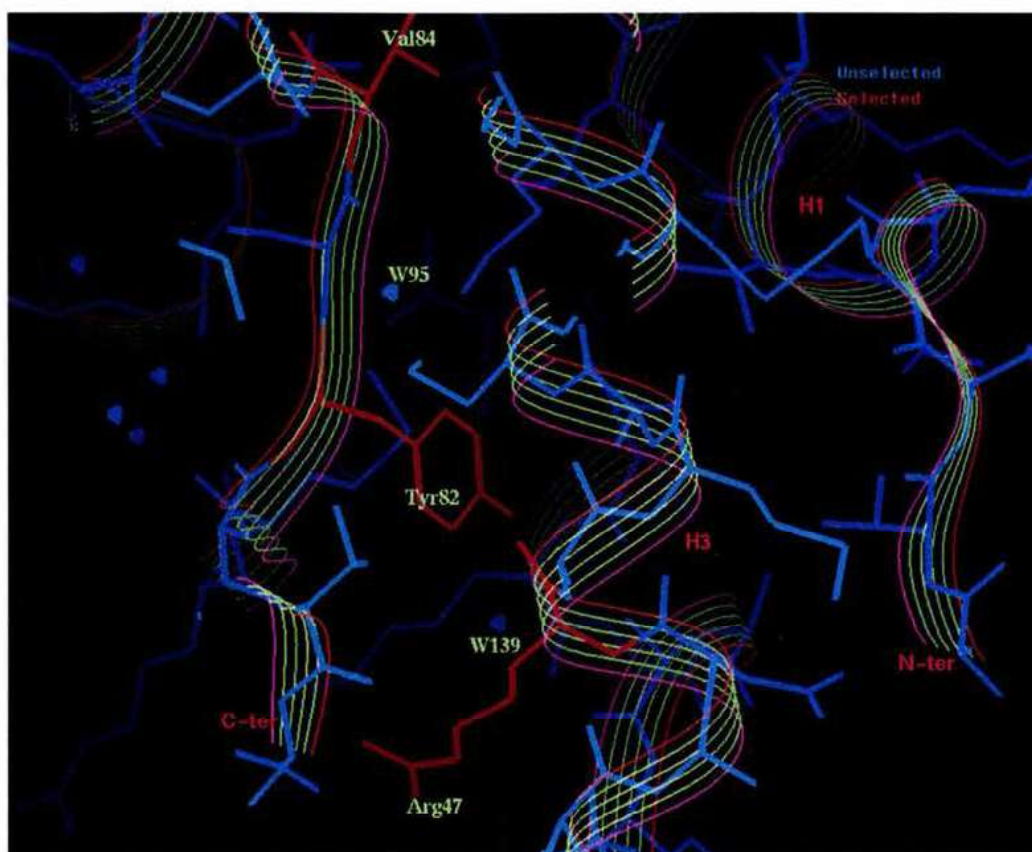
Los dos tipos de nsLTPs de trigo ofrecen otro ejemplo más de la plasticidad de la cavidad de estas proteínas. La cavidad de la nsLTP2 unida con una molécula de fosfolípido es algo menor ( $\sim 340 \text{ \AA}^3$ ) que la que presenta la nsLTP1 de cebada unida con palmitoil CoA [70], aunque la nsLTP2 es más pequeña por 24 residuos. Asimismo, a diferencia de la nsLTP1 de maíz, la nsLTP1 de trigo es capaz de unir dos moléculas de fosfolípido [67]. Una molécula de lípido interactúa fuertemente con el llamado sitio de unión 1 (de alta afinidad) mediante enlaces de H entre el grupo carboxilo del lípido y el grupo -OH del residuo de Tyr 79; mientras que la segunda molécula de lípido se une al sitio 2 (de baja afinidad) mediante interacciones hidrofóbicas [67].

### **Participación de residuos de tirosina y moléculas de agua en la estabilidad y transferencia de ligandos en la cavidad de las nsLTPs**

La estabilidad de las estructuras de las nsLTPs se favorece cuando las proteínas están unidas con ligandos (véase p. e. 27, 34, 35, 66). Sin embargo, sin un lípido dentro de la cavidad, la estabilidad estaría favorecida por la inserción de moléculas desordenadas de agua [35, 66, 73] que evitarían el colapso de esta estructura.

Se ha propuesto que el mecanismo de unión de lípidos implicaría la apertura de la región C-terminal exponiendo la cavidad hidrofóbica. El lípido podría ser succionado hacia la proteína atravesando con su cabeza polar a lo largo de la estructura [revisado en la ref. 33]. Este modelo sería aplicable a cualquier lípido transportado. El lípido podría salir de la proteína por el proceso inverso o continuar su trayecto atravesando la proteína para ser expulsado hacia el disolvente. De esta manera, la presencia de moléculas de agua y residuos hidrofóbicos en la cavidad ayudarían a transferir y unir moléculas anfipáticas.

Según la estructura modelo de la nsLTP1 de amaranto libre, las cadenas laterales de los residuos de Tyr 82, Lys 38, Cys 51 y Ser 83 potencialmente formarían enlaces de H con dos moléculas ordenadas de agua. La imagen de la figura 4.29 representa parte de la cavidad del modelo, donde se han conservado dos moléculas ordenadas de agua (W95 y W139) ocultas en la cavidad de la estructura cristalina de la nsLTP1 de arroz [66] usada para construir el modelo. Las figuras 4.30 y 4.31 destacan los detalles de estas interacciones.

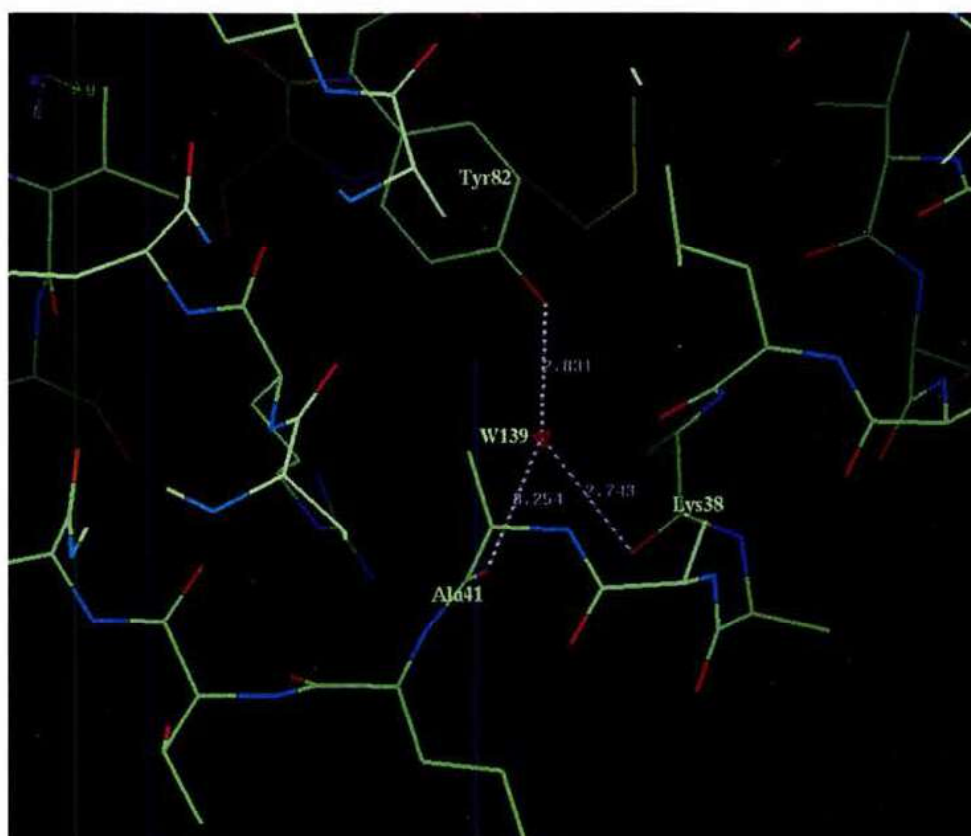


**Figura 4.29.** Vista parcial de la cavidad del modelo de la nsLTP1 de amaranto y posiciones relativas de otros elementos de estructura secundaria. Al frente destaca parte de la hélice H3. Una molécula ordenada de agua (W139 en triángulos azules), oculta dentro de la cavidad, podría estabilizarse a través de enlaces de H con las cadenas laterales de residuos de Tyr 82 y Lys 38. El residuo de Arg 47 (abajo) estaría en la entrada de la cavidad. El residuo de Val 84 (arriba) se encontraría en el extremo opuesto. Los extremos N- y C-terminal aparecen al fondo de la figura. La imagen se generó con QUANTA.

Las estructuras cristalinas de la nsLTP1 de maíz unida con lípidos de C<sub>10</sub>-C<sub>18</sub> [35] han mostrado que los residuos altamente conservados de Tyr 81, Arg 46 y Asn 37, así como varias moléculas de agua, participan en la estabilización de ligandos hidrófobos mediante la formación de enlaces de H [los residuos equivalen a Tyr 82, Arg 47 y Lys 38 en la nsLTP1 de amaranto]. Estas estructuras han mostrado también diferentes modos de unión de lípidos dependiendo de la longitud de la cola del lípido. Para los ácidos grasos de longitud media como caprato (C<sub>10</sub>) no hay interacciones entre el átomo de O del grupo carboxilato y los átomos de estos residuos. En lugar de ello, las cadenas laterales de Tyr 81 y Asn 37 forman enlaces de H con moléculas de agua. En los complejos con los ácidos láurico y mirístico, los átomos de O1 y O2 del grupo carboxilato de los ácidos grasos interactúan con un



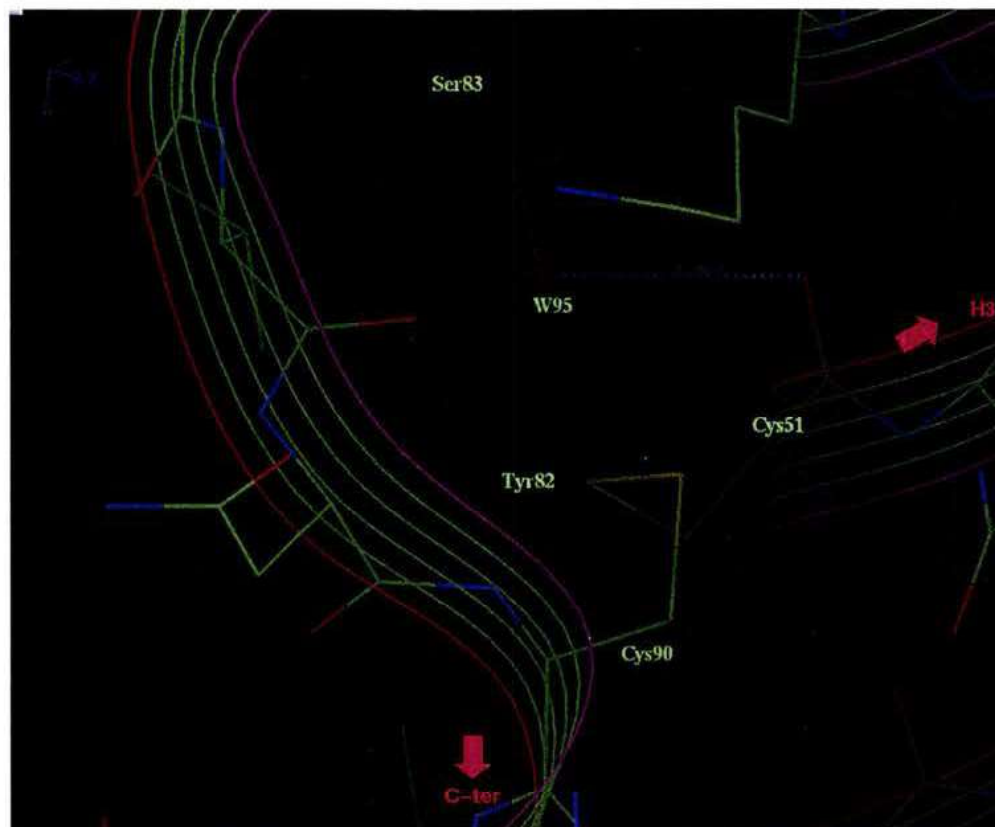
residuo de Asn 37 y una molécula de agua, respectivamente. Los ácidos grasos de C<sub>16</sub>-C<sub>18</sub> muestran un modo de unión distinto. Por ejemplo, los átomos de O1 de los grupos carboxilato de palmitato y palmitoleato forman enlaces de H con el grupo -OH de la Tyr 81. Este grupo forma un enlace de H con el O2 del grupo carboxilato de estearato a una distancia de 2.55 Å, mientras que el O1 del lípido forma enlaces de H con agua.



**Figura 4.30.** Interacciones potenciales entre una molécula ordenada de agua (W39) y residuos de Tyr 82 y Lys 38 en la cavidad de la nsLTP1 de amaranto. Tyr 82 O...W139 2.8 Å; Lys 38 N...W139 2.74 Å. El enlace de H entre el residuo de Ala 41 y la molécula de agua (3.2 Å) es poco favorable en este modelo. La figura se generó con QUANTA.

La discusión anterior destaca la importancia del residuo altamente conservado de Tyr 79/82 en la unión de ligandos hidrófobos con nsLTPs de plantas. La función de los residuos de tirosina de las elicinas (en posiciones 47 y 87) en la unión de esteroides, así como la posible relación de esta actividad en la inducción de respuestas de defensa de las plantas se

analiza en el capítulo 5, donde también se discute la posible similitud de los sitios de unión de las nsLTPs y elicitorinas asociados a las respuestas de defensa de las plantas.



**Figura 4.31.** Interacciones potenciales entre una molécula ordenada de agua (W95) y residuos de Ser 83 (arriba) y Cys 51 en la cavidad de la nsLTP1 de amaranto. Ser83 O...W95 2.69 Å. El enlace Cys 51 O...W95 3.2. Å es poco favorable. Las flechas rojas señalan la dirección del C-terminal (al frente) y de la hélice H3. En la figura se destaca un puente disulfuro entre los residuos de Cys 51-Cys 90. La figura se generó con QUANTA.

#### 4.11 Discusión

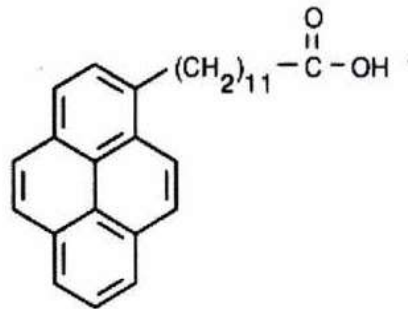
La secuencia de la nsLTP1 de *A. hypochondriacus* mostró ser idéntica a la de *A. caudatus*. Los estudios recientes de variación isoenzimática entre especies silvestres y cultivadas de amaranto [5] han mostrado que estas últimas especies están más relacionadas entre sí y con la especie *A. hybridus* (el supuesto ancestro común) que con sus presuntos progenitores silvestres (revisado en la ref. 2). Así, la identidad genética entre los cultivos de

amaranto como grupo es de 86 % y de 78 % con *A. hybridus*. La identidad genética del grupo con *A. powellii* (el supuesto progenitor silvestre de *A. hypochondriacus*) es de 56 %, y de 71 % con *A. quitensis* (el supuesto progenitor silvestre de *A. caudatus*). Esto implicaría un solo evento de domesticación con *A. hybridus* como antecesor común, como propuso Sauer, en 1967 (citado en ref. 2). Estas evidencias, junto con los hallazgos arqueológicos de granos de amaranto (*A. cruentus*) en Tehuacán Puebla, con antigüedad de 6000 años o más, refuerzan la hipótesis de un origen monofilético de los cultivos de granos de amaranto [4,5], la cual supone que *A. cruentus* se originó de *A. hybridus* y luego, por migración hacia el norte -donde se cruzó repetidamente con *A. powellii*- dio origen a *A. hypochondriacus*. En su migración hacia el sur del Continente Americano encontró a *A. quitensis* con el cual se cruzó también repetidamente dando origen a *A. caudatus* [4; revisado en ref. 3]. Basado en esta hipótesis, es factible que la secuencia de la nsLTP1 de amaranto se haya conservado durante la domesticación de *A. hybridus*, el supuesto ancestro común de las tres especies de amaranto productoras de grano [4,5; véase Cap. 1].

Los experimentos de unión de 1-Pyr-C12 indicaron que la nsLTP1 de amaranto es capaz de unir lípidos. Aunque no fue posible estimar con certidumbre razonable su afinidad por esta sonda, los experimentos de desplazamiento del fluoróforo por estearato sugieren que la proteína tendría cierta preferencia por ácidos grasos de cadena más larga. Puesto de otro modo, la unión del lípido fluorescente con los sitios de unión de la cavidad hidrofóbica pudiera no ser suficientemente estable y el lípido marcado sería desplazado más fácilmente por el estearato. Dada la longitud del lípido unido al pireno (C<sub>12</sub>), es factible que los oxígenos del grupo carboxilato no formen enlaces con los residuos de Tyr 82 de la nsLTP1 de amaranto pero sí con moléculas de agua (véase figuras 4.29-30 y la discusión previa) o con residuos cargados presentes en la cavidad (p. e. Lys 38, Ser 83) o en la entrada de la misma (p. e., Arg 47), como sucede con las estructuras de nsLTPs de maíz unidas con ácidos grasos de longitud de cadena inferior a C<sub>16</sub> [35].

Podría argumentarse que la unión de pireno modifica la afinidad de la proteína por el lípido marcado con este fluoróforo. Es posible que la unión con esta sonda no se vea muy favorecida por la estructura rígida y voluminosa del pireno (Fig. 4.32) Sin embargo, el pireno mismo es hidrofóbico y cabría esperar que no modificara sustancialmente la

conformación del lípido marcado con este fluoróforo dentro de la cavidad de las nsLTPs. Además, muchas nsLTPs han mostrado alta afinidad por el 1-Pyr-C12 (véase p. e. ref. 93).



**Figura 4.32.** Diagrama de la estructura del ácido 1-pireno-dodecanoico.

Finalmente, la información que darían las mediciones de afinidad por sondas fluorescentes como el 1-Pyr-C12, dependen del experimento en cuestión y de las preguntas que se quieran contestar. En este caso, la razón de usar esta sonda fue para medir la capacidad de la nsLTP1 de amaranto de unir lípidos, dado que este es un criterio para identificar una proteína como una nsLTP; aunque no todas las proteínas estructuralmente relacionadas con las nsLTPs son capaces de unirlos o transportarlos, como ya se ha discutido en la introducción. Posiblemente, los experimentos que aportarán más información sobre el modo de unión de lípidos por la nsLTP1 de amaranto serán los de desplazamiento de este fluoróforo con lípidos de distinta longitud de cadena. Aunque, indudablemente, las estructuras cristalinas (o en solución) de esta proteína unida con lípidos serán las que muestren los detalles precisos de la unión de ligandos en su cavidad hidrofóbica.

Las muestras de proteína empleadas en los experimentos de unión de lípidos no mostraron fluorescencia intrínseca, ya que la excitación selectiva a 280 nm no produjo emisión de fluorescencia a 306 nm debido a los residuos de tirosina (la nsLTP1 de amaranto tiene tres tirosinas y no contiene triptofano). De estos resultados concluimos que el pico de emisión de fluorescencia medido a 378 nm tras la excitación a 343 nm, probablemente proviene de los monómeros de pireno que estarían unidos en la cavidad hidrofóbica de la nsLTP1 de amaranto.

Por otra parte, podría argumentarse que la proteína de 9.9 kDa detectada en el espectro de masas de la nsLTP1 (Fig. 4.9) contribuiría a la fluorescencia total medida en los ensayos de unión de lípidos. De ser así, la proteína de 9.9 kDa tendría que ser una isoforma de la nsLTP1 o alguna proteína relacionada con la capacidad de unir lípidos (véase siguiente sección). Sin embargo, dado que no se detectó una secuencia distinta de la nsLTP1 durante la secuenciación de la proteína intacta o de los péptidos trípticos, es muy probable que la fluorescencia medida se deba principalmente a la inserción del lípido marcado con pireno en la cavidad hidrofóbica de la nsLTP1 de amaranto. Una forma indirecta para optimizar estos ensayos implicaría titular una proteína conocida (p. e. lisozima) que no tenga la habilidad de unir lípidos.

La formación del excímero de pireno tiende a aumentar con la concentración del fluoróforo en la solución, lo cual origina apagamiento del monómero de pireno detectado por una disminución en la emisión de fluorescencia a 378 nm y aumento en la señal de fluorescencia a 488 nm (debido a la emisión del excímero de pireno). Sin embargo, la emisión del excímero de pireno también disminuye en presencia de oxígeno, por lo que en este tipo de experimentos es difícil establecer con exactitud razonable la relación de fluorescencia monómero/excímero (378nm/488nm). Esta relación depende de la concentración de pireno y de la vida media del estado excitado, lo cual es variable debido al apagamiento por el oxígeno. Por otra parte, cabe la posibilidad de que también se formen excímeros de pireno dentro de la cavidad hidrofóbica de la nsLTP de amaranto, es decir, que la cavidad pudiera expandirse para acomodar dos moléculas de lípido, como se ha demostrado para la nsLTP1 de trigo [67].

Los experimentos de unión y desplazamiento de 1-pireno-C12 con lípidos de longitud de cadena variable darán información valiosa sobre la preferencia (y/o afinidad relativa) de la nsLTP1 de amaranto por ligandos hidrófobos y el número probable de sitios de unión. Para ello, será necesario variar las concentraciones de proteína y de la sonda para establecer la proporción óptima que permita medir la afinidad relativa por el fluoróforo con exactitud razonable. Asimismo, la discrepancia entre distintos laboratorios sobre el número de sitios de unión en las nsLTPs de plantas calculado de los experimentos de unión y/o transferencia de lípidos y el observado en las estructuras cristalinas sugiere que la unión de ligandos en la cavidad dependería también de las condiciones experimentales tales como pH, temperatura,

tipo de soluciones buffer y concentraciones de lípido y proteína. Finalmente, las estructuras cristalinas de la nsLTP1 de amaranto unida con lípidos y/o fosfolípidos, darán la información más precisa del modo de unión con sus ligandos y de las dimensiones de la cavidad hidrofóbica.

### **Possible identidad de la proteína de 9.9 kDa detectada por espectrometría de masas**

Durante la secuenciación de la nsLTP1 no se encontró una secuencia distinta de esta proteína, por lo que es posible que la proteína de 9.9 kDa que se aprecia en el espectro de masas de la nsLTP1 (Fig. 4.9) tenga la misma secuencia o bien, se encuentre en una proporción mínima y, por lo tanto, no fue detectada durante la secuenciación de la nsLTP1. La diferencia de masas entre estas proteínas (207 Da) sugiere que ambas podrían ser isoformas, algo común en la familia de las nsLTPs, como se discute en breve. El incremento en la masa de la posible isoforma de 9.9 kDa podría explicarse por la unión covalente de un aducto (p. e. un carbohidrato), como se ha demostrado para la isoforma nsLTP1b de cebada [69]. Se ha sugerido que un aducto de 294 Da podría estar unido covalentemente a una isoforma de la nsLTP1 de trigo [69a]. La nsLTP1 de cebada contiene cuatro residuos de lisina que son sitios potenciales de glicosilación y, de hecho, esta proteína se encuentra glicosilada en un 5 % [69].

Es interesante notar que dos péptidos trípticos (8 y 13) de la nsLTP1 de amaranto reducida y alquilada contienen un residuo interno de lisina (en posiciones 55 y 60) que no fue cortado por la tripsina. Esto podría explicarse por una digestión incompleta de la muestra debido al corto tiempo de incubación con tripsina. Esta suposición se basa en que algunas nsLTPs son relativamente resistentes a la degradación por proteasas, por ejemplo, la isoforma nsLTP1 de cebada [91]. Dado que los grupos  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub> de las lisinas son sitios potenciales de glicosilación, pudiera ser que los residuos de lisina 55 y 60 en la nsLTP1 de amaranto no fueran cortados por tripsina al estar modificados por la unión covalente de algún carbohidrato. Esta posibilidad deberá verificarse con el análisis del contenido de carbohidratos. Finalmente, el análisis de la secuencia de la proteína de 9.9 kDa será fundamental para establecer su identidad y demostrar si es o no una isoforma de la nsLTP1 de amaranto.

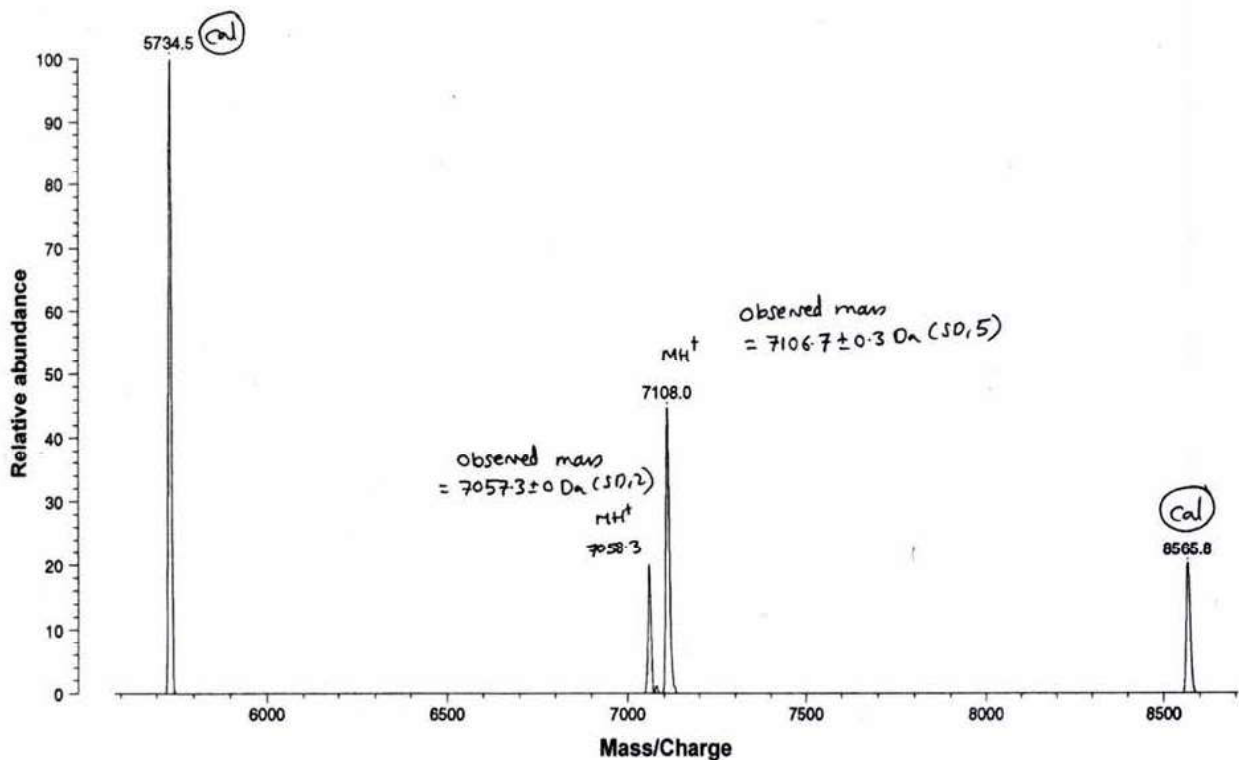
### **Isoformas de nsLTPs de plantas**

Además de las isoformas de nsLTPs tipo 1 aisladas de cebada [69] y trigo [69a], en estas especies se han identificado varias isoformas de nsLTPs tipo 2 [69, 33]. También se han identificado isoformas de nsLTPs tipo 1 de uva, espinaca, maíz y ricino [revisado en ref. 33]. La detección de las isoformas de las nsLTPs1 de cebada y trigo depende del proceso de purificación. La isoforma LTP1b de cebada no se detecta cuando las proteínas se precipitan con sulfato de amonio durante la purificación inicial. Las características cromatográficas de las isoformas varían también dependiendo de la fuente de proteína. Las isoformas pueden eluir en el mismo pico cromatográfico o como un hombro del mismo, como sucede con las nsLTPs1 de cebada [69]. Las nsLTPs1 de trigo tienen otro comportamiento cromatográfico. Utilizando una columna C18 de fase reversa Douliez y col. [69a] detectaron una isoforma de la nsLTP1 (llamada nsLTP1b) con diferencias de tiempos de retención de 5 min. Como estos mismos autores reconocen, la identificación y purificación de las isoformas de nsLTPs no es un proceso trivial. Dos isoformas de nsLTPs de uva tienen la misma secuencia pero distinta hidrofobicidad [citado en ref. 69a]. Las dos isoformas de nsLTPs1 de cebada y trigo tienen diferencias de masas de 160 y 294 Da, respectivamente [69,69a]. Para las nsLTPs tipo 1 de cebada, esta diferencia de masas se atribuyó a modificaciones postraduccionales por unión covalente de carbohidratos de 160 Da. Estos aductos no fueron identificados en la isoforma nsLTP1b de trigo. La secuencia del N-terminal de esta proteína fue idéntica a la que presenta la isoforma nsLTP1, con pequeñas diferencias en la composición de aminoácidos. La masa de las dos proteínas reducidas y alquiladas fue idéntica, por lo que los autores sugieren que ambas proteínas tienen una secuencia similar o idéntica. De estos estudios se concluye que la espectrometría de masas es el método de detección más confiable para identificar isoformas de las nsLTPs durante la separación por RP-HPLC (69a).

El espectro de masas por ESI-MS de una proteína de 7 kDa que eluye en la fracción enriquecida con la nsLTP1 de amaranto mostró que esta proteína se resuelve en dos picos con diferencia de masas de 50 Da (Fig 4. 33), lo que sugiere que ambas proteínas pueden ser isoformas. Aunque se desconoce la identidad de estas proteínas, la magnitud de sus masas moleculares y su comportamiento cromatográfico en RP-HPLC sugiere que podrían pertenecer a la familia nsLTP tipo 2. Esta suposición se basa también en que esta familia

frecuentemente se halla en las fracciones enriquecidas con nsLTPs tipo 1 de otras especies de plantas [véase p e., ref. 69]. Además, las dos familias de nsLTPs se encuentran en las semillas.

Por otra parte, los experimentos preliminares de DC con muestras de proteínas de amaranto parcialmente purificadas, con masas cercanas a 7 kDa en SDS-PAGE, mostraron una estructura altamente helicoidal que se mantiene relativamente estable hasta una temperatura de 105 °C. Estos experimentos, sin embargo, no permiten hacer conclusiones sobre la identidad de las isoformas de 7 kDa, por lo que será necesario purificarlas hasta homogeneidad e identificarlas con la secuencia de aminoácidos (y posiblemente también con los experimentos de unión y/o transferencia de lípidos). Sin embargo, las masas moleculares tan cercanas imponen una dificultad mayor para separarlas.



**Figura 4.33.** Espectro de masas de proteínas de amaranto de 7 kDa<sup>6</sup>.

<sup>6</sup> Este espectro fue obtenido por el Dr. Len Packman en la Unidad de Química de Proteínas y Ácidos Nucleicos del Medical Research Council, en Cambridge, Reino Unido.



### **Rendimiento de la nsLTP1 de amaranto**

El rendimiento de la nsLTP1 purificada hasta homogeneidad electroforética fue de menos del 1 % de las proteínas solubles totales. La estrategia para identificar a las nsLTPs se basa en los ensayos de unión y (o) transferencia de lípidos. Estos experimentos requieren muestras de proteína con pureza relativamente alta, por lo que es difícil medir con certeza el contenido de una nsLTP durante las etapas de purificación parcial.

Utilizando anticuerpos específicos contra nsLTPs de maíz y otras especies se ha estimado que las nsLTPs constituyen alrededor del 4 % de las proteínas solubles [10]. Es factible que la nsLTP1 se encuentre en menor proporción en la semilla de amaranto. Por otra parte, la formación de agregados con otras proteínas y/o con la matriz de la columna de filtración en gel, contribuiría poco a la pérdida de proteína debido a la presencia de sal en los extractos y en las soluciones buffer utilizadas en su separación. Dado que es difícil medir significativamente “la actividad” de la nsLTP1 en las fracciones parcialmente purificadas, es posible que se pierda parte de esta proteína en las fracciones que no se colectan; es decir, en los hombros y colas de los picos enriquecidos con ella. Otra fuente potencial de pérdida de proteína es la manipulación repetida de las fracciones que la contienen durante las etapas de purificación hasta homogeneidad electroforética.

La formación de agregados de proteínas de amaranto en los extractos se refleja en el aumento de absorbencia de las fracciones que eluyen en el volumen muerto (fracciones 10-15) y disminución paralela de la absorbencia en las fracciones subsecuentes, particularmente en las últimas fracciones, donde eluyen las proteínas pequeñas. Esto sucede cuando no se incluye NaCl en el buffer de elución y en el extracto de proteínas. La asociación de proteínas y otros componentes de los extractos (p. e. lípidos) con la matriz de la columna se evidencia por su coloración progresiva, además, la resolución de la columna disminuye después de aplicar varias muestras. De estos resultados se concluye que, durante la separación de las proteínas de la semilla de amaranto por cromatografía de filtración en gel, debe emplearse un buffer que contenga NaCl (p. e. 0.1 a 0.2 M) para disminuir la asociación inespecífica entre las proteínas y/o la matriz de la columna. Después de varias separaciones cromatográficas es necesario reconstituir la columna con un tratamiento ligero (p.e., NaOH 0.05 M) y lavarla varias veces con el buffer de elución.

La dependencia de la presencia de sal de los extractos de proteínas solubles limita su separación inicial por intercambio iónico. Con algunas proteínas, este problema puede ser superado con la precipitación selectiva de las proteínas que no interesan variando el pH y la fuerza iónica de los extractos. De esta forma, se logró aislar una proteína de reserva de 34.8 kDa utilizando una precipitación en medio ácido y dos etapas de purificación por intercambio catiónico sin necesidad de purificarla previamente por filtración en gel. Esta proteína tiene por lo menos una isoforma con una masa de 34.9 kDa estimada por espectrometría de masas. El *pI* de estas isoformas difiere en ~0.2 unidades de pH, lo que dificulta su separación por intercambio iónico. Independientemente del método empleado para la purificación parcial de estas proteínas, es imprescindible utilizar siempre un sistema cromatográfico de alta resolución en las etapas finales de purificación.

#### **Experimentos futuros para investigar las características estructurales de la nsLTP1 de amaranto y de unión con ligandos hidrófobos**

1. Aislamiento y purificación de la proteína en cantidades suficientes para llevar a cabo los siguientes experimentos:
  - a) Realizar ensayos de unión y/o transferencia de distintos lípidos fluorescentes entre membranas. Determinar las constantes de afinidad aparente de ácidos grasos no fluorescentes de cadena larga (C<sub>12</sub>-C<sub>18</sub>), así como de monómeros de cutina.
  - b) Hacer estudios detallados de desnaturalización de la nsLTP1 por temperatura y agentes desnaturalizantes con técnicas de DC.
  - c) Determinar la sensibilidad de la nsLTP1 a la acción proteolítica de enzimas, en particular, enzimas digestivas.
  - d) Determinar el *pI* de la nsLTP1 por electroforesis en geles 2D.
  - e) Desarrollar pruebas de cristalización que permitan establecer las condiciones favorables para cristalizar la nsLTP1.

Además de las investigaciones propuestas, es necesario demostrar si la nsLTP1 de amaranto posee actividad antifúngica y/o antimicrobiana *in vitro*. Los experimentos encaminados a estudiar su actividad antifúngica serán especialmente interesantes debido a la ausencia del residuo altamente conservado de Pro 72 en esta proteína. Estos

experimentos darán información valiosa sobre la función de este residuo en la actividad antifúngica de las nsLTPs.

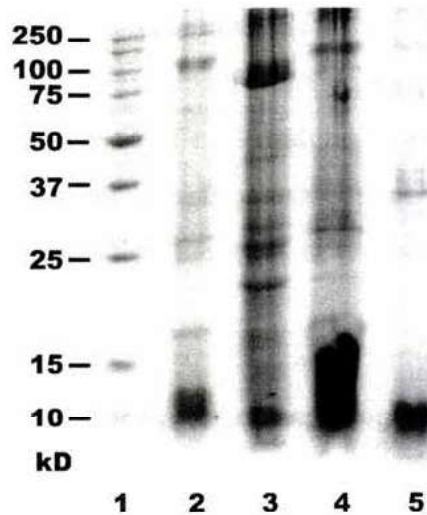
En la siguiente y última parte de esta sección se resumen los resultados de experimentos preliminares para la purificación parcial de proteínas pequeñas de amaranto por intercambio catiónico. Este método tendría la ventaja de evitar la etapa inicial de purificación por filtración en gel (FG). Concretamente, al evitar este primer paso, se acortaría el tiempo empleado para obtener fracciones enriquecidas con la nsLTP1, ya que cada cromatografía de filtración en gel dura 12 a 15 h, en promedio. Este tiempo aumenta al tomar en cuenta las etapas de concentración de las fracciones colectadas en varias cromatografías así como el lavado y la limpieza de la columna de FG después de varias separaciones cromatográficas.

### **Experimentos preliminares de purificación de proteínas de semilla de amaranto por intercambio iónico**

Al dializar una porción del extracto acuoso con un buffer de fosfatos-citratos pH 6.5, se elimina por precipitación una proporción alta de las proteínas que migran en las zonas II a IV en SDS-PAGE con 15 % de poliacrilamida (Fig.4.1). En el sobrenadante se concentran las proteínas pequeñas (Fig. 4.34, carril 4), identificadas inicialmente en la zona I por SDS-PAGE (Fig. 4.1). El sobrenadante se fraccionó por intercambio catiónico, la fracción ancha que eluye con ~30% de NaCl 0.1 M en buffer de fosfatos-citratos, pH 6.5, se dializó y concentró para el análisis de las proteínas por SDS-PAGE. En esta fracción se encuentra una proteína de ~10 kDa (Fig. 4.34, carril 3), una proporción importante de varias proteínas que aparecen como bandas más nítidas -con  $M_r$  de 22 a 43 kDa- así como una banda intensa de ~80 a 100 kDa. En menor proporción se encuentran otras proteínas pequeñas. En la fracción que no se pega a la columna se identifica una banda ancha de ~9 a 13 kDa, dos proteínas de ~18 y 28 kDa y una proteína de ~110 kDa (Fig. 4.34, carril 2).

En el sobrenadante de los extractos acuosos dializados con un buffer ácido (pH 5) se encuentran principalmente dos bandas de proteína de ~35 y 150 kDa y una banda ancha con masa aparente de 8 a 12 kDa (Fig. 4.34, carril 5). En la fracción separada por intercambio catiónico (Fig. 4.34, carril 3) se define mejor la banda de ~10 kDa, sin embargo, esta fracción tiene más abundancia de otras proteínas del sobrenadante que la obtenida tras la

precipitación en medio ácido. La separación posterior de cada una de estas fracciones por RP-HPCL servirá como punto de partida para seleccionar el método de separación más eficaz para aislar la nsLTP1 de amaranto. Los experimentos de DC serán fundamentales para predecir la estabilidad de esta proteína en función del pH.



**Figura. 4.34.** Patrón electroforético de extractos acuosos de proteínas de amaranto dializados con soluciones buffer de pH 6.5 y 5, en gel de poliacrilamida al 12 %. Carril 1, estándares de proteína. Carriles 2 y 3, proteínas del extracto en buffer de citratos-fosfatos (C-F), pH 6.5, separadas por intercambio catiónico. Las proteínas del carril 2 no se pegan a la columna, las del carril 3 eluyen con ~30 % de NaCl 0.1 M en el mismo buffer. Carril 4, sobrenadante del extracto de proteínas en buffer de C-F. Carril 5, sobrenadante del extracto de proteínas en buffer de acetatos, pH 5.

Por otra parte, dado que la nsLTP1 de amaranto es básica, podría variarse el pH de los extractos en el intervalo de 7 a 8 para precipitar otras proteínas y eliminarlas por centrifugación. Es factible que se encuentren varias isoformas de los dos tipos de nsLTPs en las semillas de amaranto, por lo que se vuelve más crítico separarlas si no se cuenta con un detector de masas acoplado al sistema de HPLC. Esto puede resolverse empleando una columna C18 de fase reversa, que separa mejor los péptidos y proteínas pequeñas con pequeñas diferencias de masas. Paralelamente, las proteínas parcialmente purificadas por filtración en gel pueden separarse en geles de 2D y transferirse a membranas de PVDF para identificarlas después por la secuencia del N-terminal. Al mismo tiempo, los “spots” o *bolitas* de las proteínas separadas en otro gel 2D podrían cortarse y emplearse para inducir la producción de anticuerpos en animales de laboratorio. De esta forma sería posible seguir a las proteínas identificadas en las distintas etapas de purificación.

## Capítulo 5

### **PERSPECTIVAS EN LA INVESTIGACIÓN DE LAS FUNCIONES DE nsLTPs DE PLANTAS**

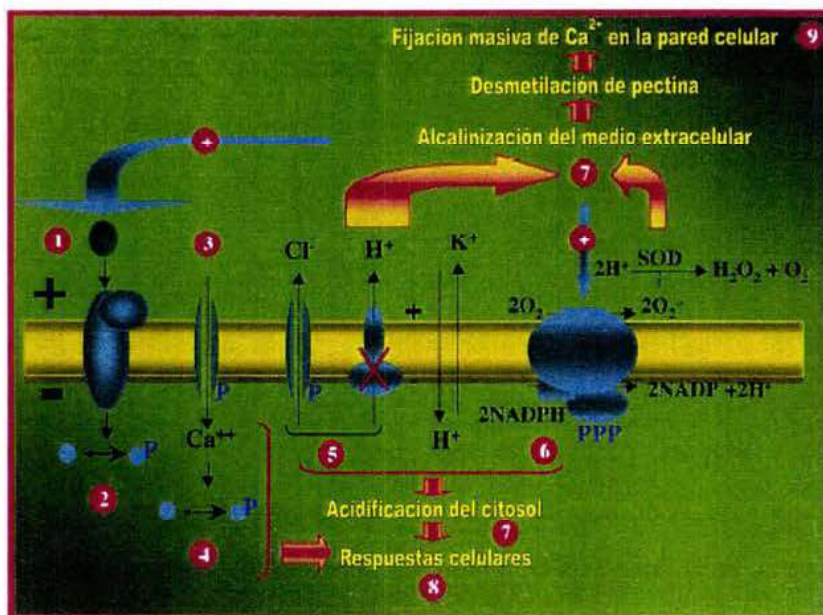
La participación de las nsLTPs en la embriogénesis somática, en la formación de la cutícula hidrofóbica y en la defensa contra patógenos es la hipótesis más aceptada actualmente (Cap.2). Sin embargo, las funciones propuestas para estas proteínas no han sido demostradas *in vivo*. Las interacciones de estas proteínas con patógenos es, quizá, una de las líneas de investigación que recientemente ha generado mayores expectativas para esclarecer la función biológica de las nsLTs de plantas. Este interés viene de las investigaciones recientes de unión nsLTPs con sitios de alta afinidad en membranas de células de tabaco que también son receptores de elicinas [47]. En esta sección se presenta una breve exposición de las características distintivas de las elicinas. Posteriormente se discuten los procesos implicados en las respuestas celulares de plantas sensibles a estas proteínas. Finalmente se discuten los posibles mecanismos implicados en la interacción de elicinas y nsLTPs con receptores comunes en membranas celulares de plantas.

#### **5.1 La familia de las elicinas**

Las elicinas son proteínas monoméricas de ~10 kDa secretadas por patógenos de las especies *Phytophthora* y *Phytium* del género *Oomiceto* [95]. Los oomicetos ya no se consideran como hongos, sino que se han agrupado filogenéticamente dentro de las algas [95], de ahí que las elicinas se sitúan en un nicho taxonómico poco explorado. Las características que reúne una proteína para ser considerada como elicina son: 1) su tamaño (casi siempre 98 aminoácidos); 2) una composición de aminoácidos donde están ausentes los residuos de triptofano, histidina y arginina; 3) la abundancia notable de aminoácidos como serina y treonina, que representan cerca de 30 % de la proteína, y una proporción menor de residuos de alanina (>10 %) y leucina (10 %); 4) la presencia de seis residuos de cisteína en posiciones conservadas que forman tres puentes disulfuro determinantes para la estructura y 5) una estructura primaria global con una secuencia particular que define una

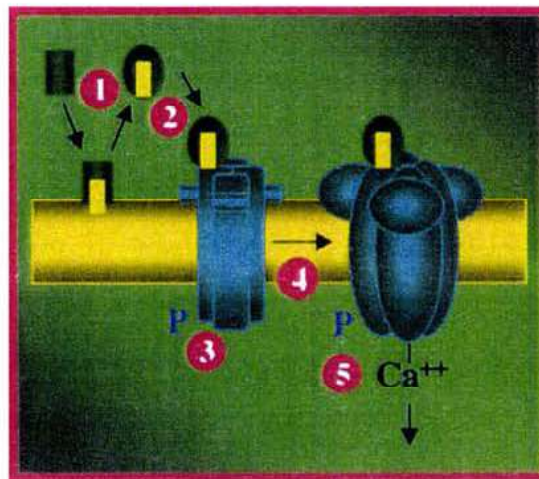
“firma de elicitorina” incluida en varias bases de datos de dominios, como PROSITE [revisado en ref. 95]. La cavidad de estas estructuras tiene varios residuos hidrofóbicos (Met, Leu, Ile, Phe, Val, Tyr) muy conservados. Según sus respectivos  $pI$ , las elicitorinas pueden ser clasificadas como ácidas ( $\alpha$ ,  $pI < 5$ ) o básicas ( $\beta$ ,  $pI > 7.5$ ).

Las elicitorinas deben estar unidas con esteroles para inducir respuestas celulares (p. e., hipersensibilidad) de plantas o para ser reconocidas por sus receptores [50]. Las respuestas de hipersensibilidad de las plantas a las elicitorinas implican los siguientes eventos principales: 1) reconocimiento del complejo elicitorina-esterol por sitios de alta afinidad que dispara un cambio alostérico de sus subunidades (posiblemente asociado con un evento de fosforilación); 2) aumento en la entrada de  $Ca^{2+}$  a las células; 3) varias etapas de fosforilación de proteínas; 4) cambios en la permeabilidad a iones  $H^+$ ,  $K^+$  y  $Cl^-$  y 5) alcalinización del medio extracelular. Estos procesos llevarían, finalmente, a la producción de especies reactivas de oxígeno y a la muerte celular [95]. Los detalles de estos eventos se resumen en la figura 5.1.



**Figura 5.1.** Rutas de señalización inducidas por elicitorinas (9 etapas). La elipse verde, junto al No. 1, representa una elicitorina. A partir del lado izquierdo: un receptor de elicitorinas (un complejo de proteínas de 160 y 50 kDa), un canal de calcio, un canal de cloro, una ATPasa dependiente de  $H^+$  (inhibida) y una NADPH oxidasa. Los signos + y - representan el potencial de membrana. Las etapas de fosforilación se representan con la P azul. Las flechas anaranjadas señalan los procesos que generan cambios en el pH. La flecha azul indica la retroalimentación positiva de la alcalinización del medio extracelular. Los números señalan los eventos en orden cronológico [Adaptado de Ponchet y col. 1999; ref. 95].

Los bloqueadores de canales de calcio dependientes de voltaje (p. e., verapamil y nifedipina) no influyen en la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por las elicitinias. Esto sugiere que si la entrada de calcio se lleva a cabo a través de canales, estos no son del tipo dependiente de voltaje, sino de ligandos. La captación transitoria de  $\text{Ca}^{2+}$  puede ser inducida por la adición sucesiva de elicitina. La mutación del residuo de Tyr 87 por fenilalanina en la criptogéina disminuye el intercambio espontáneo de  $\text{Ca}^{2+}$  [50]. Estas evidencias han llevado a proponer que el receptor de elicitinias podría ser un canal de calcio dependiente de ligando [50, 95] que estaría organizado como un complejo de cuatro subunidades (figuras 5.2 y 5.3).



**Figura 5.2.** Eventos iniciales en la señalización de elicitinias. El posible receptor de estas proteínas es un canal de calcio de 4 subunidades. Cada subunidad podría unir una molécula de elicitina. La interacción inicial canal-elicitina (paso 2) precisa que la elicitina esté cargada con esteroles de membranas plasmáticas de plantas y que este complejo dispare un cambio conformacional del canal (pasos 3-5). Este evento podría estar asociado con la fosforilación de la subunidad unida a la elicitina. Este cambio conformacional facilitaría la unión de otras moléculas de elicitina (cargadas o no) con el receptor. Finalmente, esta unión dispararía respuestas biológicas sólo cuando la elicitina se encuentre cargada con esteroles. [Tomado de Ponchet y col. 1999; ref. 95].

## 5.2 Unión de nsLTPs y elicitinias con receptores comunes

Las elicitinias y las nsLTPs son secretadas al espacio extracelular, ambas son capaces de unir ligandos hidrófobos y comparten algunas características estructurales (véase Cap.2). Los oomicetos de las especies *Phytophthora* y *Phytium* no sintetizan los esteroides necesarios para su crecimiento y reproducción [revisado en ref. 95], de ahí que las elicitinias secretadas por estos microorganismos actuarían como acarreadores de los esteroides presentes en las

plantas hospederas. A diferencia de las elicitinas, las nsLTPs no son capaces de unir esteroides. Una pregunta importante que surge de estas evidencias es saber si las nsLTPs están implicadas en las reacciones de hipersensibilidad inducidas por las elicitinas. Los experimentos de unión de ambas proteínas con receptores comunes apuntan a una posible relación en la función de ambas proteínas, como se discute en breve.

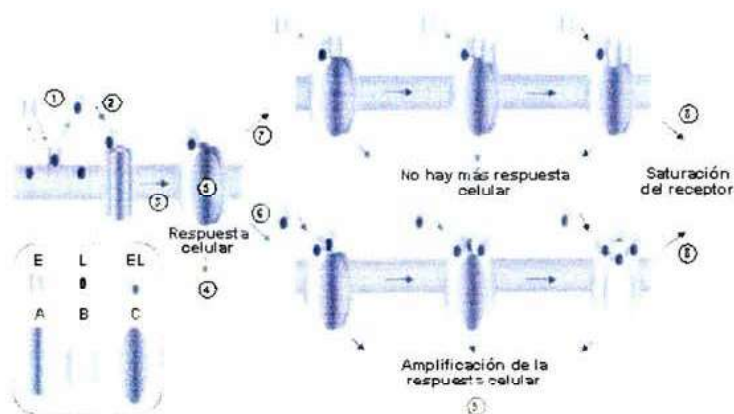
La unión de una nsLTP1 de trigo con sitios de alta afinidad presentes en membranas plasmáticas de la planta de tabaco se ajusta a una cinética sigmoide, lo que sugiere que el sitio de unión de la nsLTP es oligomérico, con cooperatividad de unión positiva [47]. El modelo alostérico aplicado a los datos de unión sugiere cuatro sitios (o subunidades) de unión ( $n$ ) y una constante de disociación  $K_B = 1.6$  nM. El mismo modelo aplicado a los datos experimentales de unión de criptogeína (una elicitina con potente actividad antifúngica) en el mismo sistema experimental, da valores semejantes para estos parámetros: cuatro subunidades de unión ( $n = 4$ ) y una  $K_B = 2$  nM. Sin embargo, de los datos de la constante alostérica ( $T$ ) para la criptogeína ( $T = 30$ ), mucho menor que para la nsLTP1 de trigo ( $T = 1252$ ), los autores de este trabajo sugieren que la criptogeína es más efectiva para cambiar la conformación del receptor hacia el conformero con capacidad de inducir respuestas biológicas. Los experimentos de desplazamiento de [ $^{125}$ I]criptogeína y [ $^{125}$ I]nsLTP1 de trigo por las respectivas proteínas frías mostraron que ambas proteínas interactúan de manera reversible con los mismos sitios de unión y que estos exhiben todas las características de posibles receptores. La capacidad de unión de estas proteínas se demostró también *in vivo* utilizando suspensiones de células de la planta de tabaco. La capacidad de las elicitinas para producir especies reactivas de oxígeno fue abolida en ~50% por la presencia simultánea de concentraciones equimolares de la nsLTP1 de trigo. Estas respuestas fueron totalmente abolidas al duplicar la concentración de la nsLTP1. Los autores concluyen que las nsLTPs tipo 1 podrían actuar *in vivo* como antagonistas de las elicitinas al unirse con los mismos sitios de unión en las células de plantas [47].

Los experimentos previos de Osman y col. [44] habían identificado los sitios de unión de las nsLTPs en células de tabaco como receptores de elicitinas. El modelo molecular que propusieron para estos receptores es el de una estructura oligomérica de cuatro subunidades idénticas (véase Fig. 5.3). Este modelo es compatible con los resultados de los



experimentos de unión y desplazamiento de criptogeína y de la nsLTP1 de trigo descritos arriba.

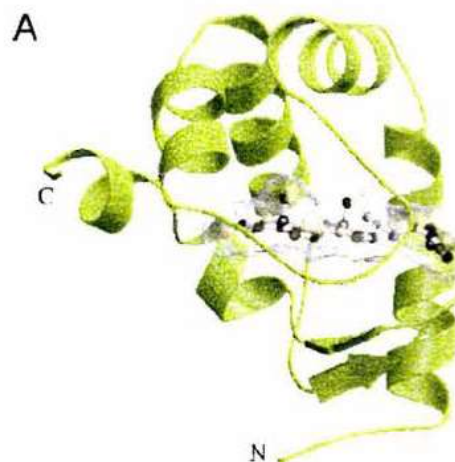
El modelo propuesto por Osman y col. (Fig. 5.3) es similar al que se resume en la figura. 5.2 de esta sección. En este modelo se supone también que la elicitorina cargada con esterol es la única forma capaz de activar una de las subunidades del receptor. Cuando el complejo elicitorina-ligando (EL) se une con la forma A del receptor (paso 2), induce un cambio conformacional hacia la forma B. Este nuevo estado dispara la respuesta biológica en la célula (paso 4) y favorece el cambio conformacional de las otras subunidades, C (efecto cooperativo, etapa 5). La forma C del receptor es capaz de unirse con la elicitorina cargada con su ligando EL, (paso 6) o bien, con la proteína no cargada E (paso 7). Esto explicaría la saturación de las subunidades del receptor por las elicitorinas (paso 8). Sin embargo, sólo la forma cargada de la elicitorina (EL) podrá inducir un nuevo tipo de respuestas biológicas (paso 9).



**Figura 5.3.** Esquema de un modelo que explica la interacción cooperativa del complejo elicitorina-esterol con el receptor de elicitorinas presente en membranas plasmáticas. A, B y C son los tres estados conformacionales de las subunidades del receptor. E, L y EL representan a las moléculas de elicitorina, ligando y complejo, respectivamente. Los detalles del modelo se describen en el texto. [Adaptado de Osman y col. 2001; ref. 50].

Recientemente se ha demostrado que las elicitorinas son capaces también de unir ácidos grasos con una estequiometría de 1:1 [96]. Los ácidos grasos insaturados de C<sub>7</sub> a C<sub>12</sub> y los ácidos grasos saturados de C<sub>16</sub> a C<sub>22</sub> son los mejores ligandos para estas proteínas. Estos ligandos compiten con los esteroides por el sitio de unión de la cavidad hidrofóbica de las elicitorinas, aunque estas estructuras tienen mayor afinidad por esteroides.

La estructura cristalina del complejo ergosterol-criptogeína [49] mostró que las elicinas poseen una cavidad hidrofóbica que puede unir una molécula de ergosterol (Fig. 5.4) con pocas modificaciones en el plegado global de la proteína comparada con la estructura nativa. Estos cambios están relacionados con un residuo de Tyr 87 oculto en la cavidad hidrofóbica, el cual es empujado hacia el disolvente para permitir la inserción de ergosterol. Este ligando parece estabilizarse por enlaces de H entre el grupo -OH de un residuo de Tyr 47 y el grupo  $\beta$ -hidroxilo del esterol, así como por 28 interacciones de van der Waals entre los anillos del ligando y la cadena lateral de 16 residuos hidrofóbicos presentes en el centro de la proteína [49]. La función del residuo de Tyr 47 en la unión y estabilización de la molécula de ergosterol pudiera ser análoga al de Tyr 79/82 en la unión de nsLTPs tipo 1 con lípidos.

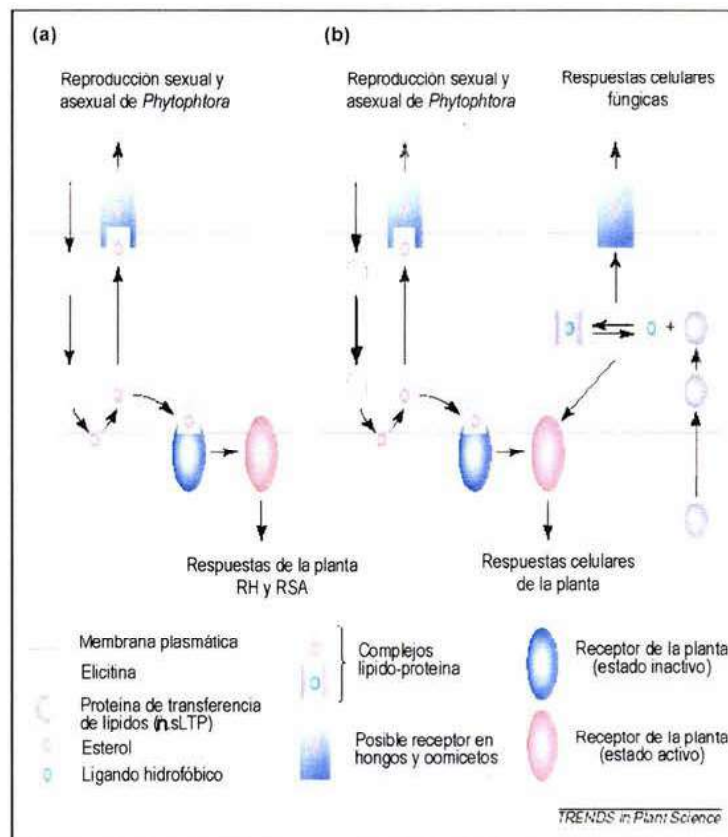


**Figura 5.4.** Representación de la estructura 3D del complejo elicina-ergosterol. El ligando se representa con bolas y barras dentro de la superficie transparente. El plegamiento global de la estructura consiste en seis hélices alfa ( $\alpha 1$ -  $\alpha 6$ ), un motivo en forma de pico formado por dos láminas  $\beta$  antiparalelas ( $\beta 1$  y  $\beta 2$ ) y un loop omega. El motivo en forma de pico, altamente conservado en las elicinas, podría ser el principal sitio de reconocimiento del receptor en membranas de plantas y (o) del ligando. La estabilidad de la estructura se mantiene por medio de tres puentes disulfuro altamente conservados. [Tomado de Boissy y col. 1999; ref. 49].

### 5.3 Posible interacción de elicinas y nsLTPs en la defensa de las plantas

Aunque las elicinas no comparten una identidad de secuencia con las nsLTPs de plantas, la similitud en la orientación de las hélices de ambas proteínas explicaría, en parte, su afinidad y competencia por el mismo receptor de membrana [41], como se ha discutido previamente. Sin embargo, los distintos modos de unión de estas proteínas con el receptor

[47] estarían relacionados con sus distintas actividades en las membranas celulares. Las respuestas de células sensibles a elicitoras (muerte celular y resistencia sistémica no específica al ataque de otros microorganismos) son inhibidas por las nsLTPs1 [47], es decir, estas proteínas se comportan como antagonistas de las elicitoras. Sin embargo, se desconoce si las nsLTPs deben formar previamente un complejo con lípidos para interactuar con su receptor, como se ha demostrado para las elicitoras. En este sentido, sería muy útil determinar las características de unión de las nsLTPs con sus receptores en su forma libre y unida con lípidos. En el esquema de la figura 5.5 se resume un modelo de los posibles eventos que sucederían durante el “diálogo” de la planta con oomicetos, donde se propone la participación de elicitoras y nsLTPs.

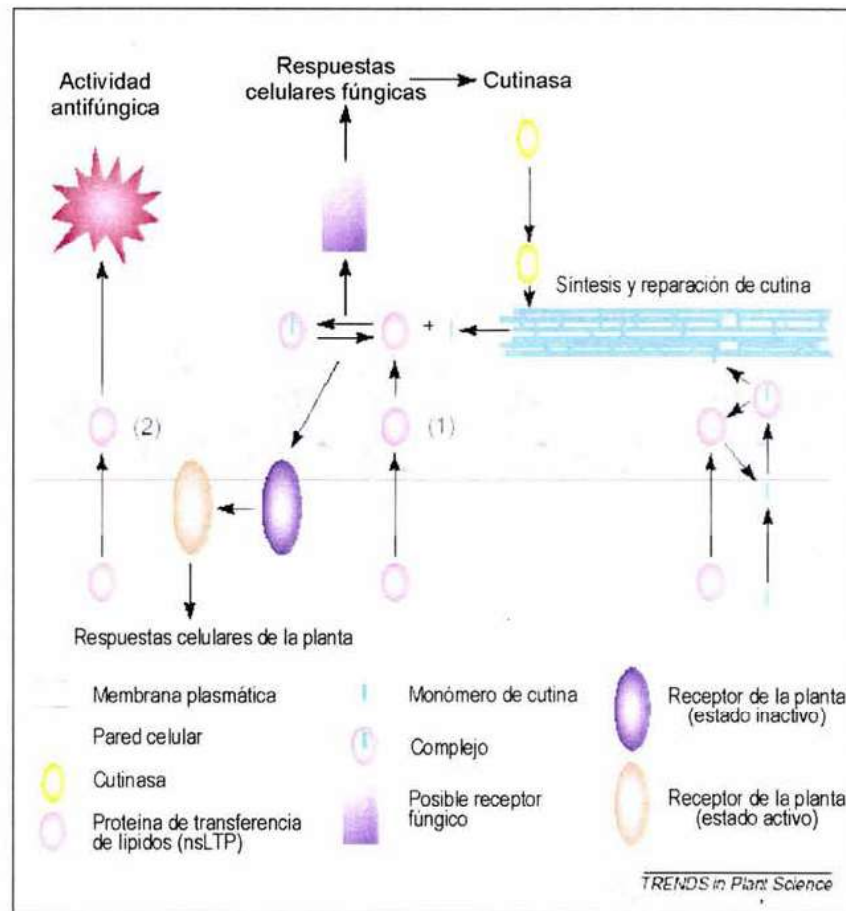


**Figura 5.5.** Posibles eventos en el diálogo entre plantas con oomicetos y hongos. En la primera etapa se formaría un complejo elicitorina-esterol seguido de su reconocimiento por receptores específicos en la membrana celular (a). Durante la interacción de la planta con el patógeno *Phytophthora* las elicitoras actuarían como acarreadores entre las células de la planta y del patógeno. Ambas células reconocerían los complejos de elicitorina-esterol generando respuestas biológicas, donde participarían las elicitoras y las nsLTPs (b). Las células de la planta secretarían nsLTPs y ligandos hidrofóbicos complejos que inducirían respuestas biológicas. Abreviaturas: RH, respuestas de hipersensibilidad. RSA: resistencia sistémica adquirida. [Adaptado de Blein y col. 2002; ref. 98].

#### **5.4 Posible participación de las nsLTPs en la interacción de patógenos con plantas**

Se sabe que algunos monómeros de cutina liberados por la acción de cutinasas fúngicas son capaces de disparar respuestas de defensa de las plantas [9,97]. Estas evidencias han llevado a especular si los complejos de nsLTPs con monómeros de cutina podrían disparar respuestas de hipersensibilidad de las plantas u otras respuestas de defensa ante el ataque por patógenos [98]. Es importante mencionar que los componentes de la cutícula estimulan una etapa específica del desarrollo de hongos patógenos para la germinación de esporas e inducen la producción de cutinasa por estos organismos [9]. Será interesante investigar si en las membranas de estos hongos existen receptores que reconozcan complejos de nsLTPs con componentes de la cutícula. Estas investigaciones ayudarán a esclarecer la relación entre la capacidad de las nsLTPs de unir ligandos hidrófobos y su función en la defensa de las plantas frente a organismos patógenos.

La Fig. 5.6 ilustra un modelo que propone la posible participación de las nsLTPs durante la interacción de hongos patógenos con plantas. En este mismo sentido, se ha especulado si las respuestas de hipersensibilidad en la defensa de las plantas y las de la alergia humana comparten mecanismos comunes de reconocimiento, ya que los principales alérgenos de plantas como espárrago, maíz, manzana, zanahoria, durazno, chabacano etc., son nsLTPs (para una revisión reciente, véase ref. 99). En cierto modo, las nsLTPs disparan una reacción de hipersensibilidad que podría compararse con la de las células de las plantas a las elicinas [98]. Estos hallazgos han llevado a una pregunta fundamental: ¿las respuestas a los alérgenos de nsLTPs estarían asociadas a la unión con receptores específicos de membranas en células animales que compartan características con los de las plantas y hongos patógenos? El reconocimiento por estos receptores podría ser el detonante en la cascada de señales metabólicas que llevan a las respuestas alérgicas a las nsLTPs tipo 1. Seguramente, las investigaciones en este campo aportarán información valiosa sobre la relación evolutiva entre las reacciones de hipersensibilidad en las respuestas alérgicas humanas y las de defensa de las plantas.



**Figura 5.6.** Posible participación de las nsLTPs en la interacción entre hongos patógenos y plantas. Este esquema analiza un caso general en el que un hongo patógeno (p. e. *Fusarium pathogens*) no secreta elicinas. La producción constitutiva de cutinasa por el hongo induce liberación de monómeros de cutina. Éstos se unen con las nsLTPs expresadas constitutivamente en la superficie de la planta (1). El complejo monómero de cutina-nsLTP puede unirse con receptores de la membrana plasmática y disparar respuestas de defensa de la planta, que incluyen la síntesis de diferentes nsLTPs y otras proteínas de defensa que inhiben el crecimiento del hongo (2). La sobreexpresión de nsLTPs podría contribuir a la reparación de cutina y a la inhibición del crecimiento del hongo. Al mismo tiempo, el complejo monómero de cutina-nsLTP podría unirse con un receptor fúngico para inducir la producción excesiva de cutinasa. El balance entre las respuestas de defensa de la planta y del hongo llevará a la muerte de uno de los combatientes. [Adaptado de Blein y col. 2002; ref. 98].

## REFERENCIAS

1. Diamond J, y Bellwood P. 2003. Farmers and their languages: the first expansions. *Science* **300**, 597-602.
2. D. M. Brenner, y col. Genetic resources and breeding of *Amaranthus*. En: *Plant Breeding Reviews*. Janick. J. (ed.), Wiley & Sons, Inc., vol. 19, pp. 227-285, 2000.
3. J.T. Williams y D. Brenner. Grain Amaranth (*Amaranthus species*), en: *Cereals and Pseudocereals*. J. T. Williams (ed.). Chapman y Hall, cap. 3, p.129-186, 1995.
4. Sauer JD. 1967. The grain amaranths and their relatives: a revised taxonomic and geographic survey. *Ann. Missouri Botanical Garden* **54**, 102-137.
5. Chan KF, y Sun M. 1997. Genetic diversity and relationships detected by isozyme and RAPD analysis of crop and wild species of *Amaranthus*. *Theor. Appl. Genet.* **95**, 865-873.
6. G. K. O'Brien y M.L. Price. Amaranth: Grain & Vegetables Types. Echo Technical Note, 1983. ECHO website: <http://www.echonet.org>.
7. Kunst L, y Samuels AL. 2003. Biosynthesis and secretion of plant cuticular wax. *Prog. Lipid Res.* **42**, 51-80.
8. Jenks MA, Joly RJ, Peters PJ, Rich PJ, Axtell JD, y Ashworth EN. 1994. Chemically induced cuticle mutation affecting epidermal conductance to water vapor and disease susceptibility in *Sorghum bicolor* (L.) Moench. *Plant Physiol.* **105**, 1239-1245.
9. Kolattukudy PE, Rogers LM, D, Li D, Hwang C-S, y Flaishman MA. 1995. Surface signalling in pathogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 4080-4087.
10. Kader J.-C. 1996. Lipid transfer proteins in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant. Mol. Biol.* **47**, 627-654.
11. Arondel V, Vergnolle C, Tchang F, & Kader J.-C. 1990. Bifunctional lipid:transfer:fatty acid-binding proteins in plants. *Mol. Cell. Biochim.* **98**, 49-56.
12. Tchang F, This P, Stiefel V, Arondel V, Morch MD, Pages M, Puidomenech P, Grellet F, Delseny M, Bouillon P, Huet JC, Guerbette F, Beauvais-Cante F, Duranton H, Permnollet JC, y Kader J.-C. 1988. Phospholipid transfer protein: full lenght cDNA and amino acid

- 
- sequence in maize. Aminoacid sequence homologies between plant lipid transfer proteins. *J. Biol. Chem.* **263**, 16849-16856.
13. Bernhard WR, Thoma S, Botella J, y Somerville CR. 1991. Isolation of a cDNA clone for spinach lipid transfer protein and evidence that the protein is synthesized by the secretory pathway. *Plant Physiol.* **95**, 164-170 (abstr.).
  14. Sterk P, Booij H, Schellekens GA, Van Kammen A, y De Vries SC. 1991. Cell-specific expression of the carrot EP2 lipid transfer protein gene. *Plant Cell* **3**, 907-921.
  5. Zachowski A, Guerbette F, Grosbois M, Jolliot-Croquin A, y Kader J-C. 1998. Characterisation of acyl binding by a plant lipid transfer protein. *Eur. J. Biochem.* **257**, 443-448.
  16. Douliez JP, Michon T, y Marion D. 2000. Steady state tyrosine fluorescence to study the lipid-binding properties of a wheat non-specific lipid-transfer protein (nsLTP1). *Biochim. Biophys. Acta* **1467**, 65-72.
  17. Douliez J-P, Jégou S, Pato C, Mollé D, Tran V, y Marion D. 2001. Binding of two monoacylated lipid monomers by the barley lipid transfer protein, LTP1, as viewed by fluorescence, isothermal titration calorimetry and molecular modelling. *Eur. J. Biochem.* **268**, 384-388.
  18. Sossountzov L, Ruiz-Avila L, Vignols F, Jolliot A, Arondel V, Tchang F, Grosbois M, Guerbette F, Miginiac E, Delseny M, Puigdomenech P, y Kader J-C. 1991. Spatial and temporal expression of a maize lipid transfer protein gene. *Plant Cell* **3**, 923-933.
  19. Pyee J, y Kolattukudy PE. 1995. The gene for the major cuticular wax-associated protein and three homologous genes from broccoli (*Brassica oleracea*) and their expression patterns. *Plant J.* **7**, 49-59.
  20. Treviño M, y O'Connell M. 1998. Three drought-responsive members of the nonspecific lipid-transfer protein gene family in *Lycopersicon pennellii* show different developmental patterns of expression. *Plant Physiol.* **116**, 1461-1468.
  21. Park S-Y, Jauh G-Y, Mollet J-C, Eckard KJ, Nothnagel EA, Walling LL, y Lord EM. 2000. A lipid transfer-like protein is necessary for lily pollen tube adhesion to an in vitro stylar matrix. *Plant Cell* **12**, 151-163.

22. Pyee J, Yu H, y Kolattukudy PE. 1994. Identification of a lipid transfer protein as the major protein in the surface wax of broccoli (*Brassica oleracea*). *Arch. Biochem. Biophys.* **311**, 460-468.
23. Hollenbach B, Schreiber L, Hartung W, y Dietz K-J. 1997. Cadmium leads to stimulated expression of the lipid transfer protein genes in barley: implications for the involvement of lipid transfer proteins in wax assembly. *FEBS Lett. Planta* **203**, 9-17.
24. Lerche MH, Kragelund BB, Bech LM, y Poulsen FM. 1997. Barley lipid-transfer protein complexed with palmitoyl CoA. The structure reveals a hydrophobic binding site that can expand to fit both large and small lipid-like ligands. *Structure* **5**, 291-306.
25. Guerbette F, Grosbois M, Jolliot-Croquin A, Kader J-C, y Zachowski A. 1999. Comparison of lipid binding and transfer properties of two lipid transfer proteins from plants. *Biochemistry* **38**, 14131-14137.
26. Tassin-Moindrot S, Caille A, Douliez J-P, Marion D, and Vovelle F. 2000. The wide binding properties of a wheat nonspecific lipid transfer protein. Solution structure of a complex with prostaglandin B<sub>2</sub>. *Eur. J. Biochem.* **267**, 1117-1124.
27. Samuel D, Liu Y-J, Cheng C-S, y Lyu P-C. 2002. Solution structure of plant nonspecific lipid transfer protein-2 from rice (*Oryza sativa*). *J. Biol. Chem.* **277**, 35267-35273.
28. Garcia-Olmedo F, Molina F, Segura A, & Moreno M. 1995. The defensive role of non specific lipid transfer proteins in plants. *Trends Microbiol.* **3**, 72-74.
29. García-Olmedo F, Molina A, Alamillo JM, y Rodríguez-Palenzuela P. 1998. Plant defense peptides. *Biopolymers* **47**, 479-491.
30. Torres-Schuman, S., Godoy JA, y Pintor-Toro JA. 1992. A probable lipid transfer gene is induced by NaCl in stems of tomato plants. *Plant Mol. Biol.* **18**, 749-757.
31. Hinch DK, Neukamm B, Sror HAM, Sieg F, Weckwarth W, Rückels M, Lullien-Pellerin V, Schröder W, y Schmitt JM. 2001. Cabbage cryoprotectin is a member of the nonspecific plant lipid transfer protein gene family. *Plant Physiol.* **125**, 835-846.
32. Wirtz KWA. 1997. Phospholipid transfer proteins revisited. *Biochem. J.* **324**, 353-360.



- 
33. Douliez J-P, Michon T, Elmorjani K, y Marion D. 2000. Structure, biological and technological functions of lipid transfer proteins and indolines, the major lipid binding proteins from cereal kernels. *J. Cereal Sci.* **32**, 1-20.
  34. Poznanski J, Sodano P, Suh SW, Lee JY, Ptak M, and Vovelle F. 1999. Solution structure of a lipid transfer protein extracted from rice seeds. Comparison with homologous proteins. *Eur. J. Biochem.* **259**, 692-708.
  35. Han GW, Lee JY, Song HK, Chang C, Min K, Moon J, Shin DH, Kopka ML, Sawaya MR, Yuan HS, Kim TD, Choe J, Lim D, Moon HJ, y Suh SH. 2001. Structural basis on non-specific lipid binding in maize lipid-transfer protein complexes revealed by high-resolution X-ray crystallography. *J. Biol. Mol.* **308**, 263-278.
  36. Charlet M, Chernysh S, Philippe H, Hetru C, Hoffmann JA, y Bulet P. 1996. Isolation of several cysteine-rich antimicrobial peptides from the blood of a mollusc, *Mytilus edulis*. *J. Biol. Chem.* **271**, 21808-21813.
  37. Broekaert WF, Cammue B, De Bolle M, Thevissen K, y De Samblanx G. 1997. Antimicrobial peptides from plants *Crit. Rev. Plant Sci.* **16**, 297-323.
  38. Selitrennikoff CP. 2001. Antifungal proteins. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 2883-2894.
  39. Cociancich S, Ghazi A, Hetru C, Hoffmann JA, y Letellier L. 1993. Insect defensin, an inducible antibacterial peptide, forms voltage-dependent channels in *Micrococcus luteus*. *J. Biol. Chem.* **268**, 19239-19245.
  40. Kagan BL, Ganz T, y Lehrer RI. 1994. Defensins: a family of antimicrobial and cytotoxic peptides. *Toxicology* **87**, 131-149.
  41. Broekaert WF, Terras FRG, Cammue BPA, y Osborn RW. 1995. Plant defensins: novel antimicrobial peptides as components of the host defense system. *Plant Physiol.* **108**, 1353-1358.
  42. Kagan BL, Selsted ME, Ganz T, y Lehrer RI. 1990. Antimicrobial defensin peptides form voltage-dependent ion-permeable channels in planar lipid bilayer membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 210-214.
  43. Wimley WC, Selsted ME, y White SH. 1994. Interactions between human defensins and lipid bilayers: Evidence for formation of multimeric pores. *Protein Sci.* **3**, 1362-1373.

44. Yeaman MR, y Yount NY. 2003. Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. *Pharmacol. Rev.* **55**, 27-56.
45. Thevissen K, Osborn RW, Acland DP, y Broekaert WF. 1997. Specific, high affinity binding sites for an antifungal plant defensin on *Neurospora crassa* Hypjae and microsomal membranes. *J. Biol. Chem.* **272**, 32176-32181.
46. Thevissen K, Terras FRG, y Broekaert WF. 1999. Permeabilization of fungal membranes by plant defensins inhibits fungal growth. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 5451-5458.
47. Buhot N, Douliez JP, Jacquemard A, Marion D, Tran V, Maume BF, Milat ML, Ponchet M, Mikes V, Kader J-C, y Blein JP. 2001. A lipid transfer protein binds to a receptor involved in the control of plant defence responses. *FEBS Lett* **509**, 27-30.
48. Mikès V, Milat M-L, Ponchet M, Panabières F, Ricci P, y Blein J-P. 1998. Elicitins excreted by *Phytophthora* are a new class of sterol carriers proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **245**, 133-139.
49. Boissy G, O'Donohue M, Gaudemer O, Perez V, Pernellet JC, y Brunie S. 1999. The 2.1 angstrom structure of an elicitin-ergosterol complex: a recent addition to the sterol carrier protein family. *Protein Sci.* **8**, 1191-1199.
50. Osman H, Vauthrin S, Mikes V, Milat M.-L, Panabieres F, Marais A, Brunie S, Maume B, Ponchet M, y Blein J-P. 2001. Mediation of elicitin activity on tobacco is assumed by elicitin-sterol complexes. *Mol. Biol. Cell* **12**, 2825-2834.
51. Terras FRG, Goderis IJ, Van Leuven F, Vanderleyden J, Cammue BPA, y Broekaert WF. 1992. In vitro antifungal activity of a radish (*Raphanus sativus L.*) seed protein homologous to nonspecific lipid transfer proteins. *Plant Physiol.* **10**, 1055-11058.
52. Molina A, Segura A, y García-Olmedo F. 1993. Lipid transfer proteins (nsLTPs) from barley and maize leaves are potent inhibitors of bacterial and fungal plant pathogens. *FEBS Lett.* **316**, 119-122.
53. Cammue BPA, Thevissen K, Hendriks M, Eggermont K, Goderis IJ, Proost P, Van Damme J, Osborn RW, Guerbette F, Kader J-C, y Broekaert WF. 1995. A potent antimicrobial protein from onion seeds showing sequence homology to plant lipid transfer proteins. *Plant Physiol.* **109**, 445-455.

- 
54. Tassin S, Broekaert WF, Marion D, Acland DP, Ptak M, Vovelle F, y Sodano P. 1998. Solution structure of *Ace*-AMP1, a potent antimicrobial protein extracted from onion seeds. Structural analogies with plant nonspecific lipid transfer proteins. *Biochemistry* **37**, 3623-3637.
55. Charlet M, Chernysh S, Philippe H, Hetru C, Hoffmann JA, y Bulet P. 1996. Isolation of several cysteine-rich antimicrobial peptides from the blood of a mollusc, *Mytilus edulis*. *J. Biol. Chem.* **271**, 21808-21813.
56. López-Solanilla E, García Olmedo F, y Rodríguez-Palenzuela P. 1998. Inactivation of the *sapA* to *sapF* locus of *Erwinia chrysanthemi* reveals common features in plant and animal bacterial pathogenesis. *Plant Cell* **10**, 917-924.
57. Hoffmann JA, Kafatos FC, Janeway CA, y Ezekowitz RAB. 1999. Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science* **284**, 1313-1318.
58. Veronese P, Ruíz MT, Coca MA, Hernández-López A, Lee H, Ibeas JI, Damsz B, Pardo JM, Hasegawa PM, Bresan RA, y Narasimhan ML. 2003. In defense against pathogens. Both plant sentinels and foot soldiers need to know the enemy. *Plant Physiol.* **131**, 1580-1590.
59. McDowell JM, y Dangl JL. 2000. Signal transduction in the plant immune response. *Trends Biochem. Sci.* **25**, 79-82.
60. Sabelis MW, Janssen A, y Kant MR. 2001. The enemy of my enemy is my ally. *Science* **291**, 2104-2105.
61. Kessler A, y Baldwin, I.T. 2001. Defensive function of herbivore-induced plant volatile emissions in nature. *Science* **291**, 2141-2144.
62. Nishimura M, y Somerville S. 2002. Resisting attack. *Science* **295**, 2032-2033.
63. Agrawal AA. 2001. Phenotypic plasticity in the interactions and evolution of species. *Science* **294**, 321-326.
64. Kahn TL, Fender SE, Bray EA, y O'Connell MA. 1993. Characterization of expression of drought- and abscisic acid-regulated tomato genes in the drought-resistant species *Lycopersicon pennellii*. *Plant Physiol.* **103**, 597-605.

65. Choi DW, Song JY, Oh MH, Lee JS, Moon J, Suh S W, y Kim SG. 1996. Isolation of a root-specific cDNA encoding a nsLTP-like protein from the roots of bean (*Phaseolus vulgaris*) seedlings. *Plant Mol. Biol.* **30**, 1059-1066.
66. Lee J, Min K, Cha H, Shin DH., Hwang KY, y Suh SW. 1998. Rice non-specific lipid transfer protein: the 1.6 Å crystal structure in the unliganded state reveals a small hydrophobic cavity. *J. Mol. Biol.* **276**, 437-448.
67. Charvolin D, Douliez J-P, Marion D, Cohen-Addad C, y Pebay-Peyroula E. 1999. The crystal structure of a wheat nonspecific lipid transfer protein (ns-LTP1) complexed with two molecules of phospholipid at 2.1 Å resolution. *Eur. J. Biochem.* **264**, 562-568.
68. Douliez J-P, Pato C, Rabesona H, Mollé D, y Marion D. 2001. Disulfide bond assignment, lipid transfer activity and secondary structure of a 7-kDa plant lipid transfer protein, LTP2. *Eur. J. Biochem.* **268**, 1400-1403.
69. Jégou S, Douliez J-P, Mollé D, Boivin P, y Marion D. 2000. Purification and structural characterization of LTP1 polypeptides from beer. *J. Agric. Food Chem.* **48**, 5023-5029.
- 69a. Douliez J-P, Jégou S, Pato C, Larré C, Mollé D, y Marion D. 2001. Identification of a new form of lipid-transfer protein (LTP1) in wheat seeds. *J. Agric. Food Chem.* **49**, 1805-1808.
70. Pons JL, de Lamotte F, Gautier M-F, y Delsuc M-A. 2003. Refined solution structure of a liganded type 2 wheat nonspecific lipid transfer protein. *J. Biol. Chem.* **278**, 14249-14256.
71. Gomar J, Petit MC, Sodano P, Sy D, Marion D, Kader J-C, Vovelle F, y Ptak M. 1996. Solution structure and lipid binding of a nonspecific lipid transfer protein extracted from maize seeds. *Protein Sci* **5**, 565-577.
72. Heinemann B, Anderson KV, Nielsen PR, Bech LM, y Poulsen FM. 1996. Structure in solution of a four-helix lipid binding protein. *Protein Sci.* **5**, 13-23.
73. Shin DH, Lee JY, Hwang KY, Kim KK, y Suh SW. 1995. High-resolution crystal structure of the non-specific lipid-transfer protein from maize seedlings. *Structure* **3**, 189-199.
74. Poznanski J, Sodano P, Suh SW, Lee JY, Ptak M, y Vovelle F. 1999. Solution structure of a lipid transfer protein extracted from rice seeds. Comparison with homologous proteins. *Eur. J. Biochem.* **259**, 692-708.

- 
75. Arondel V, Vergnolle C, Cantrel C, y Kader J-C. 2000. Lipid transfer proteins are encoded by a small multigene family in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Sci.* **157**, 1-12.
  76. Horvath BM, Bachem CWB, Trindade LM, Oortwijn MEP, y Visser RGF. 2002. Expression analysis of a family of nsLTP genes tissue specifically expressed throughout the plant and during potato tuber life cycle. *Plant Physiol.* **129**, 1494-1506.
  77. Wu Z, y Burns K. 2003. Isolation and characterization of a cDNA encoding a lipid transfer protein expressed in 'Valencia' orange during abscission. *J. Exp. Botany* **54**, 1183 (abstr.).
  78. Combet C, Blanchet C, Geourjon C, y Deleage G. 2000. NPS@: network protein sequence analysis. *Trends Biochem Sci*, **25**(3), 147-50.
  79. Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, y Lipman DJ 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**,3389-3402.
  80. Thompson JD, Higgins DG y Gibson TJ. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* **22**,4673-4680.
  81. Jones TA, Zou JY, Cowan SW y Kjeldgaard M. 1991. Improved methods for building protein models in electron density maps and the location of errors in these models. *Acta Cryst. A* **47**,110-119.
  82. Brünger AT, Adams PD, Clore GM, Delano WL, Gros P, Grosse-Kunstleve RW, Jiang JS, Kuszewski J, Nilges M, Pannu NS, Read RJ, Rice LM, Simonson T y Warren GL. 1998. Crystallography and N.M.R. system: a new software suite for macromoleular structure determination. *Acta Cryst. D* **54**,905-921.
  83. HA Scoble, JE Vath, W Yu, y S Martin. En: *A Practical Guide to Protein and Peptide Purification for Microsequencing*. Matsudaira (ed.). Academic Press, Inc., San Diego CA, p. 127-135, 1993.
  84. Nielsen KK, Nielse JE, Madrid SM, y Mikkelse JD. 1996. New antifungal proteins from sugar beet (*Beta vulgaris L.*) showing homology to non-specific lipid transfer proteins. *Plant Mol. Biol.* **31**, 539-552.
  85. Pelese-Siebenbourg F, Caelles C, Kader J-C, Delseny M, y Puigdomenech P. 1994. A pair of genes coding for lipid-transfer proteins in *Sorghum vulgare*. *Gene* **148**, 305-308.

86. Ma DP, Tan H, Si Y, Creech RG, y Jenkins JN. 1995. Differential expression of a lipid transfer protein gene in cotton fiber. *Biochem. Biophys. Acta*, **1257**, 81-84.
87. Bernhard WR, y Somerville CR. 1989. Coidentity of putative amylase inhibitors from barley and finger millet with phospholipid transfer proteins inferred from amino acid sequence homology. *Arch. Biochem. Biophys.* **269**, 695-697.
88. Ramírez-Medeles MC, Aguilar MB, Miguel RN, Bolaños-García VM, García-Hernández E, y Soriano-García M. 2003. Amino Acid Sequence, Biochemical Characterization and Comparative Modeling of a Non-specific Lipid Transfer Protein from *Amaranthus hypochondriacus*. *Arch. Biochem. Biophys.* **415**, 33-42.
- 88a. Mizuguchi K, Deane MC, Blundell TL, Johnson MS, y Overington JP. 1998. JOY: protein sequence-structure representation and analysis. *Bioinformatics*, **14**, 617-623.
89. Gerjoun C, y Deléage G. 1995. SOPM: a self-optimised method for protein secondary structure prediction. *Prot. Eng.* **7**, 157-164.
90. De Bakker PIW, Bateman A, Burke DF, Miguel RN, Mizuguchi K, Shi J, Shirai H, y Blundell TL. 2001. HOMSTRAD: adding sequence information to structure-based alignments of homologous protein families. *Bioinformatics* **17**, 748-749.
91. Lindorff-Larsen K, y Winther JR. 2001. Surprisingly highly stability of barley transfer protein, LTP1, towards denaturant, heat and proteases. *FEBS Lett* **488**, 145-148.
92. Astwood JD, Leach JN Y Fuchs RL. 1996. Stability of food allergens to digestion in vitro. *Nat. Biotechnol.* **14**, 1269-1273.
93. Dansen TB, Westerman J, Wouters FS, Wanders RJA, van Hoek A, Gadella TWJ, y Wirtz KWA. *Biochem J.* **339** (1999) 193-1999.
94. MacArthur MW, y Thornton JM. 1991. Influence of proline residues on protein conformation. *J. Mol. Biol.* **218**, 397-412.
95. Ponchet M, Panabières F, Milat M-L, Mikès V, Montillet J-L, Suty L, Triantaphylides C, Tirilly Y, y Blein J-P. 1999. Are elicitors cryptograms in plant-Oomycete communications? *Cell. Mol. Life Sci.* **56**, 1020-1047.
96. Osman H, Mikes V, Milat M-L, Ponchet M, Marion D, Prangé T, Maume BF, Vauthrin S, y Blein J-P. 2001. Fatty acids bind to the fungal elicitor cryptogein and compete with sterols. *FEBS Lett.* **489**, 55-58.

- 
97. Fauth M, Schweizer P, Buchala A, Markstädter C, Riederer M, Kato T, y Kauss H. 1998. Cutin monomers and surface wax constituents elicit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in conditioned cucumber hypocotyl segments and enhance the activity of other H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> elicitors. *Plant Physiol.* **117**, 1373-1380.
  98. Blein J-P, Coutos-Thévenot P, Marion D, y Ponchet M. 2002. From elicitors to lipid-transfer proteins, a new insight in cell signalling involved in plant defence mechanisms. *Trends in Plant Sci.* **7**, 293-296.
  99. Díaz-Perales A, Tabar AI, Sánchez-Monge R, García BE, Gómez B, Barber D, y Salcedo G. 2002. Characterization of asparagus allergens: a relevant role of lipid transfer proteins. *J. Allergy Clin. Immunol.* **110**, 790-796.
  100. Ge X, Chen J, Sun C y Cao K. 2003. Preliminary study on the structural basis of the antifungal activity of a rice lipid transfer protein. *Protein Eng.* **16**,387-390.

---

## **ANEXOS DE PUBLICACIONES**



Search  for   

## NiceProt View of Swiss-Prot:

[P83167](#)[Printer-friendly view](#)[Submit update](#)[Quick BlastP search](#)[\[Entry info\]](#) [\[Name and origin\]](#) [\[References\]](#) [\[Comments\]](#) [\[Cross-references\]](#) [\[Keywords\]](#) [\[Features\]](#) [\[Sequence\]](#) [\[Tools\]](#)

Note: most headings are clickable, even if they don't appear as links. They link to the user manual or other documents.

### Entry information

Entry name	NLT1_AMAHP
Primary accession number	P83167
Secondary accession numbers	None
Entered in Swiss-Prot in	Release 41, February 2003
Sequence was last modified in	Release 41, February 2003
Annotations were last modified in	Release 42, October 2003

### Name and origin of the protein

Protein name	Nonspecific lipid-transfer protein 1
Synonyms	LTP 1 NS-LTP1
Gene name	None
From	<a href="#">Amaranthus hypochondriacus (Prince's feather)</a> [TaxID: 38502]
Taxonomy	<a href="#">Eukaryotes</a> ; <a href="#">Vandiplantes</a> ; <a href="#">Streptophyta</a> ; <a href="#">Embryophyta</a> ; <a href="#">Tracheophyta</a> ; <a href="#">Spermatophyta</a> ; <a href="#">Magnoliophyta</a> ; <a href="#">eudicotyledons</a> ; <a href="#">com eudots</a> ; <a href="#">Caryophyllales</a> ; <a href="#">Amaranthaceae</a> ; <a href="#">Amaranthus</a>

### References

- [1] SEQUENCE, MASS SPECTROMETRY, CIRCULAR DICHROISM ANALYSIS, AND 3D-STRUCTURE MODELING.  
TISSUE=Seed;  
STRAIN=cv Melcado;  
MEDLINE=22686080, PubMed=12801509, [NCBI, ExPASy, EBI, Israel, Japan]  
[Ramirez-Medales M.C., Aguilar-Ramirez M.E., Miguel R.N., Bolanos-Garcia V.M., Garcia-Hernandez E., Soriano-Garcia M.;](#)  
"Amino acid sequence, biochemical characterization, and comparative modeling of a nonspecific lipid transfer protein from *Amaranthus hypochondriacus*."  
[Arch Biochem Biophys 415:24-33\(2003\).](#)

### Comments

- **FUNCTION:** Plant nonspecific lipid-transfer proteins transfer phospholipids as well as galactolipids across membranes. May play a role in wax or cutin deposition in the cell walls of expanding epidermal cells and certain secretory tissues (*By similarity*).
- **MASS SPECTROMETRY:** MW=9747.29; METHOD=MALDI.
- **SIMILARITY:** Belongs to the plant LTP family.

### Cross-references

InterPro	<a href="#">IPR001612</a> ; AAI; <a href="#">IPR000523</a> ; Plant_LTP; <a href="#">Graphical view of domain structure</a>
Pfam	<a href="#">PF00234</a> ; tryp_alpha_amyl, 1
PRINTS	<a href="#">PR00332</a> ; LIPIDTRANSFER.
SMART	<a href="#">SM00490</a> ; AAI, 1
PROSITE	<a href="#">PS00592</a> ; PLANT_LTP, 1.
ProDom	<a href="#">[Domain structure / List of seq. sharing at least 1 domain]</a>
BLOCKS	<a href="#">P83167</a> .
Protein	<a href="#">P83167</a> .
Protein	<a href="#">P83167</a> .
PRESAGE	<a href="#">P83167</a> .
DIP	<a href="#">P83167</a> .
ModBase	<a href="#">P83167</a> .
SWISS-2DPAGE	<a href="#">Get region on 2D PAGE</a> .

### Keywords

[Lipid-binding](#); [Transport](#).

### Features



Feature table viewer

Key	From	To	Length	Description
DISULFID	4	53		BY SIMILARITY
DISULFID	14	30		BY SIMILARITY
DISULFID	31	76		BY SIMILARITY
DISULFID	51	90		BY SIMILARITY

### Sequence information

Length: 94 AA    Molecular weight: 9747 Da    CRC64: 7C165A7C37C96E17 [This is a checksum on the sequence]

```

      10           20           30           40           50           60
      |           |           |           |           |           |
AVTCTVVIKA LGPCNTYLKG TGATPPPANC CAGVRSLKAA AQTUADRRMA CNCMKSAAQK

      70           80           90
      |           |           |
TKSLNTRVAA RLASQCGVRH SYSVSPNVNC NSVQ

```

P83167 in [FASTA format](#)

[View entry in original Swiss-Prot format](#)

[View entry in raw text format \(no links\)](#)

[Report form for error/updates in this Swiss-Prot entry](#)

BLAST

[BLAST submission on ExPASy/SIB](#)  
or at [NCBI \(USA\)](#)



Sequence analysis tools: [ProtParam](#), [ProtScale](#), [Compute pI/Mw](#), [PeptideMass](#), [PeptideCutter](#), [Dotlet](#) (Java)



[ScanProsite](#), [MotifScan](#)



Search the [SWISS-MODEL Repository](#)

[ExPASy Home page](#)

[Site Map](#)

[Search ExPASy](#)

[Contact us](#)

[Swiss-Prot](#)

Hosted by [NCSC US](#)

Mirror sites:

[Bolivia](#)

[Canada](#)

[China](#)

[Korea](#)

[Switzerland](#)

[Taiwan](#)

ABBI4 ISSN 0003-9861  
Volume 415, Number 1, July 1, 2003

K 38

ABB  
ABB

Archives of Biochemistry and Biophysics

[www.elsevier.com/locate/yabbi](http://www.elsevier.com/locate/yabbi)

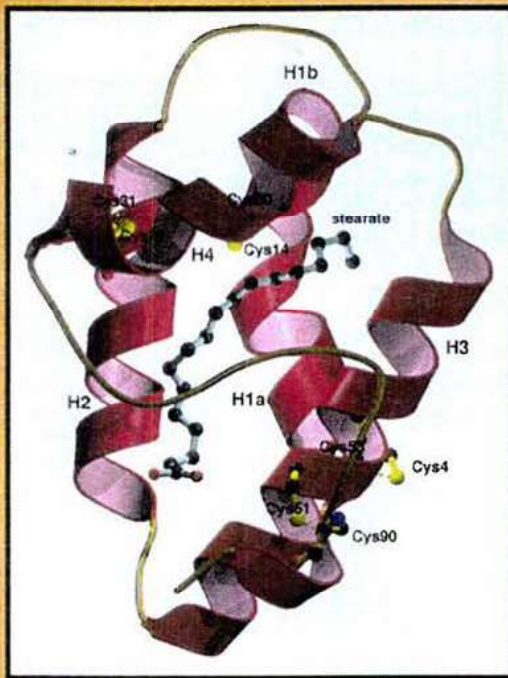


ABB  
ABB  
ABB



ACADEMIC PRESS

An imprint of Elsevier Science

Also available on

SCIENCE @ DIRECT®

[www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)



CBYS053500

e 415, Number 1

- A**  
Aguilar, Manuel B., 24  
Akamatsu, Shigeru, 117
- B**  
Beydoun, Salwa, 101  
Bolaños-García, Victor M., 24  
Broderick, R., 14
- C**  
Chambers, R., 14  
Chang, Chia-Ming, 109  
Chen, Hauh-Jyun Candy, 109  
Cheng, Xian Wu, 126  
Chu, Arthur J., 101  
Cody, M., 14  
Cruz, M., 14  
Czogalla, Aleksander, 94
- D**  
Daquin, Alex, 80
- F**  
Fischer, Richard, 34  
Frank, Elliot H., 69
- G**  
García, A. Minerva, 69  
García-Hernández, Enrique, 24  
Grabowski, Gregory A., 43  
Graf, Dirk, 34
- Grodzinsky, Alan J.**, 69
- H**  
Hatakeyama, Daijiro, 6, 117  
Häussinger, Dieter, 34  
Hersh, Louis B., 80  
Hirade, Kou Seki, 6  
Hoang, Julie, 101  
Hryniewicz-Jankowska, Anita, 94
- I**  
Iguchi, Akihisa, 126  
Imamura, Hiromi, 87  
Ito, Hidenori, 6
- K**  
Kanda, Shigeru, 126  
Kato, Kanefusa, 6  
Kozawa, Osamu, 6, 117  
Kurz, Anna Kordelia, 34  
Kuzuya, Masafumi, 126  
Kwolek, Paulina, 94
- L**  
Lun Wang, Qiu, 126  
Leluk, Jacek, 94
- M**  
Ma, Zhangjiang, 80  
Maeda, Keiko, 126  
Mathews, Suresh T., 101  
Mierke, Dale F., 54  
Miguel, Ricardo N., 24
- Morales, Teresa L.**, 69  
**Mrachko, G.T.**, 14
- N**  
Nakajima, Masahiro, 87  
Nietubyc, Malgorzata, 94  
Nihei, Hiroshi, 63  
Nitta, Kosaku, 63  
Niwa, Masayuki, 6
- O**  
Orlowski, Marian, 1
- P**  
Pal-Ghosh, Ruma, 54  
Polgar, Peter, 54  
Prado, Gregory N., 54
- Q**  
Qi, Xiaoyang, 43
- R**  
Ramirez-Medeles, Maria del Carmen, 24  
Reinehr, Roland, 34  
Rodgers, David, 80  
Rodriguez, R., 14  
Ruckman, E., 14
- S**  
Sasaki, Takeshi, 126  
Schneider, D., 14  
Sekine, Shizue, 63
- Shibata, Tami, 126  
Shibata, Toshiyuki, 117  
Shoun, Hirofumi, 87  
Sikorski, Aleksander F., 94  
Soriano-Garcia, Manuel, 24  
Sumbayev, Vadim V., 133  
Szasz, Nora, 69
- T**  
Tamaya-Mori, Norika, 126  
Tanabe, Kumiko, 117  
Taylor, Linda, 54  
Thompson, Michael W., 80  
Tokuda, Haruhiko, 6, 117  
Trippel, Stephen B., 69
- U**  
Uchida, Keiko, 63
- W**  
Wakagi, Takayoshi, 87  
Wang, Xiaodun, 6  
Wang, Ying, 43  
Watkins, L.M., 14  
Wilk, Sherwin, 1  
Wu, Shi-Bei, 109
- Y**  
Yao, Jia, 80  
Yoshida, Minoru, 117  
Yu, Jun, 54  
Yumura, Wako, 63

**Cover photo.** Diagram of the 3D model of amaranth nsLTP1 in complex with stearate. (See article by Ramirez-Medeles et al., *Arch. Biochem. Biophys.* 415, 24-33.)



ACADEMIC  
PRESS

Available online at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)

SCIENCE @ DIRECT®

Archives of Biochemistry and Biophysics 415 (2003) 24–33

ABB

[www.elsevier.com/locate/yabbi](http://www.elsevier.com/locate/yabbi)

## Amino acid sequence, biochemical characterization, and comparative modeling of a nonspecific lipid transfer protein from *Amaranthus hypochondriacus*<sup>☆</sup>

María del Carmen Ramírez-Medeles,<sup>a</sup> Manuel B. Aguilar,<sup>b</sup> Ricardo N. Miguel,<sup>c</sup> Víctor M. Bolaños-García,<sup>c</sup> Enrique García-Hernández,<sup>d</sup> and Manuel Soriano-García<sup>d,\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento Sistemas Biológicos, UAM-X, 04960 México, D.F., Mexico

<sup>b</sup> Laboratorio de Neurofarmacología Marina y Unidad de Bioquímica Analítica, Instituto de Neurobiología, UNAM, 76230 Juriquilla, Qro., Mexico

<sup>c</sup> Department of Biochemistry, University of Cambridge, 80 Tennis Court Road, Cambridge CB2 1GA, UK

<sup>d</sup> Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, UNAM, 04510 México, D.F., Mexico

Received 30 January 2003, and in revised form 2 April 2003

### Abstract

Plant nonspecific lipid transfer proteins (nsLTPs) are characterized by their ability to bind a broad range of hydrophobic ligands in vitro. Their biological function has not yet been elucidated, but they could play a major role in plant defense to physical and biological stress. An nsLTP was isolated from *Amaranthus hypochondriacus* seeds and purified by gel filtration and reversed-phase high-performance liquid chromatography techniques. The molecular mass of the protein as determined by mass spectrometry is 9747.29 Da. Data from amino acid sequence, circular dichroism and binding/displacement of a fluorescent lipid revealed that it belongs to the nsLTP1 family. The protein shows the  $\alpha$ -helical secondary structure typical for plant nsLTPs 1 and shares 40 to 57% sequence identity with nsLTPs 1 from other plant species and 100% identity with an nsLTP1 from *Amaranthus caudatus*. A model structure of the protein in complex with stearate based on known structures of maize and rice nsLTPs 1 suggests a protein fold complexed with lipids closely related to that of maize nsLTP1.

© 2003 Elsevier Science (USA). All rights reserved.

**Keywords:** Lipid transfer protein; Amaranth; Amino acid sequence; Pyrene fluorescence; Comparative modeling

Nonspecific lipid transfer proteins (nsLTPs)<sup>1</sup> that bind and transfer a broad range of hydrophobic ligands in vitro are ubiquitous in the plant kingdom [1–3]. The specific biological function for these proteins remains unclear [2,4], though they may be involved in the formation of hydrophobic cuticle layers [5,6] and plant

adaptative responses to drought or salinity stress [7,8]. Plant nsLTPs are also thought to be defense proteins toward pathogens, because some nsLTPs are able to inhibit fungal and microbial pathogens in vitro [9–11]. Furthermore, plant nsLTPs share some structural and functional properties with elicitors [12–14], and they both may interact with common biological receptors [15].

The two main families of plant nsLTPs are identified by their molecular masses of about 9 and 7 kDa [2], named nsLTPs type 1 and 2, respectively [4]. nsLTPs 1 are cysteine-rich proteins with compact structures consisting of four  $\alpha$ -helices connected by three loops and a C-terminal segment enclosing a hydrophobic cavity [2,4] which accommodates different hydrophobic ligands. Four strictly conserved disulfide bonds interconnect the secondary structure elements and stabilize the global fold. The known three-dimensional (3D) structures of

<sup>☆</sup> The amino acid sequence has been deposited in the SwissProt data base (Accession No. P83167).

\* Corresponding author. Fax: +525-616-2217.

E-mail address: [soriano@servidor.unam.mx](mailto:soriano@servidor.unam.mx) (M. Soriano-García).

<sup>1</sup> Abbreviations used: nsLTPs, nonspecific lipid transfer proteins; Pyr C-12, 1-pyrene dodecanoic acid; TFA, trifluoroacetic acid; AcN, acetonitrile; PMSF, phenylmethylsulfonyl fluoride; RP-HPLC, reversed-phase high performance liquid chromatography; SWISS-PROT, SWISS-PROT data base; PDB, Protein Data Bank; CD, circular dichroism; MALDI-TOF, matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight; MS, mass spectra; 3D, three-dimensional.

plant nsLTPs include those isolated from maize, rice, wheat, and barley [16–22] and amino acid sequences of nsLTPs from numerous plant sources have been reported, including one from amaranth. We report here the primary structure of an nsLTP1 isolated from seeds of *Amaranthus hypochondriacus*, a crop originating in Mexico, and a 3D model of this protein complexed to stearate. The protein was purified using a combination of chromatographic procedures and was further characterized by mass spectrometry, CD, and lipid-binding activity using a pyrene-labeled fatty acid.

## Materials and methods

### Materials

Amaranth seeds (*A. hypochondriacus*, cv. Mercado) were obtained from the Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias, Chapingo, México. Complete protease inhibitor cocktail was purchased from Boehringer Mannheim (Mannheim, Germany). Pyr-C12 was purchased from Molecular Probes (Leiden, The Netherlands). Stearic acid and *n*-ethylmorpholine were from Sigma (St. Louis, MO, USA); TFA (sequencing grade) was from Aldrich (Milwaukee, WI, USA). 4-Vinylpyridine (Sigma) was vacuum-distilled. HPLC solvents were from Sigma and Fisher Scientific (Fair Lawn, NJ, USA). Reagents for protein sequencing were purchased from Applied Biosystems (Foster City, CA, USA). Reverse osmosis-purified water was deionized with an Easy-Pure UV compact ultrapure water system (Barnstead/ThermoLyne, Dubuque, IA, USA). The Sephacryl S200 column was from Amersham-Pharmacia Biotech (Piscataway, NJ, USA) and HPLC columns were from Vydac (Hesperia, CA, USA) and Waters (Milford, MA, USA). All other chemicals were analytical grade.

### Purification of amaranth nsLTP1

Soluble proteins were extracted from defatted flour in the presence of protease inhibitors according to a modification of a previous procedure [23]. The homogenate was dialyzed against distilled water, and the precipitate formed on dialysis was removed by centrifugation. The supernatant was subjected to ammonium sulfate precipitation (85% saturation) followed by dialysis against 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.5, containing 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, and 1 mM PMSF. The dialyzed material was applied to a Sephacryl S200 column (1.6 × 80 cm; flow rate 12 mL/h) preequilibrated with the same buffer. Fractions (1.8 mL) from the major (last-eluting) peak containing proteins lower than 25 kDa in SDS-PAGE were pooled, concentrated, and subjected to further separation by RP-HPLC on a Nucleosil C4 column (5 µm, 300 Å, 4.6 × 250 mm, Phase Separations/

Waters) provided with a Delta-Pack C4 precolumn (5 µm, 300 Å, 4.6 × 20 mm). The column was equilibrated with 0.1% (v/v) aqueous TFA (Sol. A), and proteins were eluted with a nonlinear gradient of 60% AcN–0.1% TFA and water (Sol. B) as follows: 0–26% B for 5 min, 26–35% B for 15 min, and 35–100% B for 5 min at a flow rate of 1 mL/min. Fractions eluted near 18 min were pooled, vacuum-dried (Savant Instruments, Farmingdale, NY, USA), dissolved in distilled water, and repurified on the same column using a linear gradient (0–100% B for 60 min, flow rate 1 mL/min). Proteins were detected by UV absorption at 206 or 280 nm. Fractions (named P1) exhibiting a single band around 10 kDa in SDS-PAGE were pooled, vacuum-dried (Savant), and used for further characterization of the protein.

SDS-PAGE was carried out under reducing conditions on precast gradient gels (Novex/Stratagene, UK) with a resolving gel of 4–12% acrylamide or on hand-made gels with 15% acrylamide using a MiniProtean apparatus (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Proteins were stained by Coomassie brilliant blue. Protein concentration was estimated by the Lowry method according to instructions provided by the supplier (Bio-Rad) using bovine serum albumin as standard.

### Mass spectrometry

The molecular mass of the protein was determined by MALDI-TOF MS on a Kompact SEQ mass spectrometer (Kratos Analytical Ltd., Manchester, UK). Sinapinic acid (10 mg/mL in water/AcN (2/1, v/v) with 0.1% TFA) was used as MALDI matrix; 0.5 µL of the sample containing ~10 pmol of protein and 0.5 µL of the matrix solution were mixed on the sample plate and allowed to dry at room temperature before being loaded into the instrument. Data from 100 laser pulses were averaged for each mass spectrum to improve the signal to noise ratio. Mass calibration was performed using external standards of human angiotensin I (1297.51 Da) and horse apomyoglobin (16951.3 Da).

### Amino acid sequencing

For Edman degradation of either intact nsLTP or its pyridylethylated tryptic fragments, samples were applied to Biobrene Plus-treated filters (Applied Biosystems) and subjected to automated amino acid sequence analysis using a Procise 491 Protein Sequencer (Applied Biosystems). Tryptic peptides were dissolved in 50 µL of TFA/water, 2/1 (v/v), and 10 µL were loaded for sequencing. The pulsed liquid method was employed.

### Alkylation and digestion with trypsin

Fraction P1 (~2 nmol) was dissolved in 110 µL of 0.5 M *N*-ethylmorpholine-acetate buffer, pH 8.3, and

denatured by adding 110 mg of guanidine-HCl; 5  $\mu$ L of 1 M dithiothreitol was added to this solution, and the mixture was incubated for 45 min at 37 °C (this step was performed twice). The mixture was incubated with 4  $\mu$ L of 4-vinylpyridine for 16 h at 37 °C [24]. The reduced and alkylated protein was diluted with 2 mL of deionized water and fractionated on a C4 column as described for the second RP-HPLC purification step. The product (eluted around 32 min) was vacuum-dried and named P1-PE. Lyophilized P1-PE (~1 nmol) was dissolved in 200  $\mu$ L of 0.1 M ammonium bicarbonate, pH 8.3; 2  $\mu$ L of 1 mg/mL trypsin (in 1 mM HCl) was added, and the mixture was incubated for 1 h at 37 °C. The digestion mixture was diluted to 2 mL with deionized water and fractionated by RP-HPLC on a C18 Protein and Peptide column (5  $\mu$ m, 300 Å, 4.6  $\times$  250 mm, Vydac) using a linear gradient as described above.

#### *Circular dichroism spectroscopy*

nsLTP1 was diluted in 0.04 M phosphate buffer, pH 6.0, to a final concentration of 0.1 mg/mL. Far-UV CD spectra (from 250 to 187 nm) were recorded at 25 °C on a Jasco J-720 spectropolarimeter (Jasco Ltd., UK) using 0.1-cm quartz cells (Hellma, Essex, UK). Eight scanning acquisitions in 0.2-nm steps were accumulated and averaged, yielding the final spectrum after blank subtraction. CD signals are expressed as mean residue ellipticity. The secondary structure of the protein was predicted by the method of Johnson [25] using a mean residue mass value of 104.7.

#### *Lipid titration by fluorescence spectroscopy*

Lipids were diluted from a methanol stock solution and used at concentrations of 0.5 and 0.7 mM for Pyr-C12 and stearic acid, respectively. Pyr-C12 fluorescence intensity was measured at 25 °C with a Hitachi spectrofluorometer (Hitachi, Ltd., Tokyo). Excitation was set at 343 nm while emission spectra were recorded from 300 to 500 nm (in steps of 0.2 nm). Titration was performed by adding lipid in a stepwise manner to 1.5 mL of a 6.7 or 10  $\mu$ M solution of nsLTP1 in 0.04 M phosphate buffer, pH 6.0. Emissions were corrected for direct excitation of the fluorescent fatty acid at 343 nm in the absence of protein. For the binding competition assay, protein (6.7  $\mu$ M in the same buffer) was preincubated with 7.5  $\mu$ M Pyr-C12 for 30 min at 25 °C followed by titration with stearic acid. After correction for direct excitation of Pyr-C12 (343 nm in absence of protein), the decrease in fluorescence emission at 378 nm was normalized relative to the maximal fluorescence intensity observed with Pyr-C12 in the presence of protein.

#### *Similarity search and protein modeling*

The sequence of amaranth nsLTP1 was compared with all protein sequences deposited in SWISS-PROT by using the Blast v2.0 program [26]. A PSI-BLAST search produced an alignment between amaranth nsLTP1 and homologous proteins which highlights conserved residues in the nsLTP family. Homologous proteins with known structure were identified using the FUGUE [27] homology recognition server. FUGUE searches for homologues in the structural profile library derived from the structure-based alignments in the HOMSTRAD database [28] and, using the environment-specific substitution tables, automatically generates the best alignments for the top hits. The alignment produced by FUGUE for the highest-scoring hit was formatted with JOY [29] and analyzed visually to highlight the conservation of structurally and functionally important residues. The model of amaranth nsLTP1 was constructed with MODELLER [30]. A final energy and structure minimization was done using the SYBYL (Tripos, Inc., St. Louis, MO, USA) force field. Finally, the model was validated by PROCHECK [31], VERIFY3D [32], JOY, and visual inspection using 3D graphics software. All of these programs revealed that the model needed no further modifications. Overall, the method followed here was the same as that in [33].

## **Results**

#### *Purification of amaranth nsLTP1 and molecular mass determination*

The fraction recovered after gel filtration contained proteins with low molecular weight (MW) as determined by SDS-PAGE and was selected for further purification of nsLTP1. After separation on a C4 column RP-HPLC, a fraction eluted at 18 min (around 35 % solvent B) was resolved by SDS-PAGE into three major protein bands of ~16, ~10, and ~7 kDa (Fig. 1A, lane 3). Further separation of the 18-min peak with a linear gradient on the same column yielded a single peak that eluted with 33% solvent B and contained most of the 10-kDa protein. After the final purification step, the protein migrated as a single band on SDS-PAGE gels (Fig. 1B). Starting from 2.0 g of water-soluble proteins, the total amount obtained for pure nsLTP1 based on SDS-PAGE is about 10 mg, which represents only 0.5%. MALDI-TOF MS mass spectra of the protein showed a major component with a molecular mass of 9747.29 Da (Fig. 2). The theoretical protein mass estimated from the amino acid sequence was 9740.52 Da, assuming a free C terminus and four disulfide bonds. The difference between the

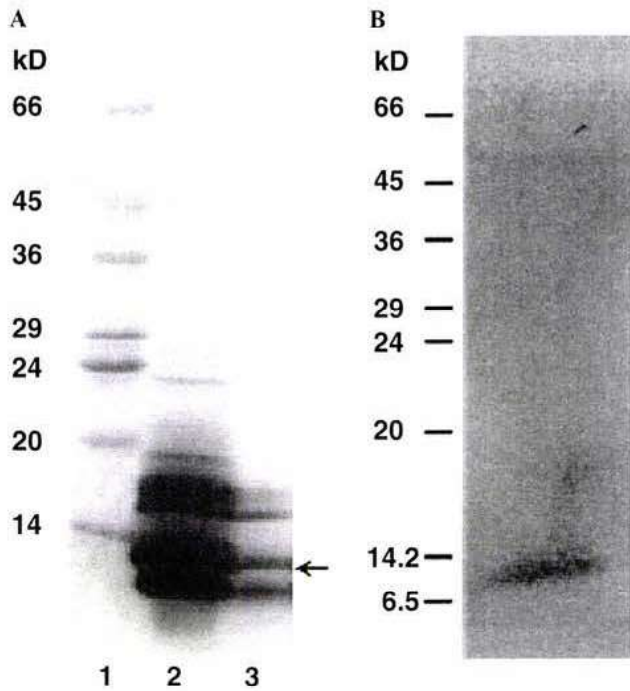


Fig. 1. SDS-PAGE analysis of the protein profiles at various stages of purification of amaranth nsLTP1. (A) Proteins separated in a precast gradient gel (4–12.5% acrylamide): lane 1, protein standards; lane 2, fraction from gel filtration on Sephacryl S 200; lane 3, fraction eluted by RP-HPLC using a nonlinear gradient. The arrow indicates the 10-kDa protein. (B) nsLTP1 purified to homogeneity by RP-HPLC migrated as a single band with apparent mass of 10 kDa using 15% acrylamide. Proteins were visualized by staining with Coomassie blue.

experimental and the theoretical masses is 6.77 Da, which is within the expected error (9.74 Da, 0.1%) of MALDI-TOF MS [34]. A minor peak of 9954.64 Da

was also detected, though no further analysis was performed on this protein.

#### Amino acid sequence analysis

Edman degradation of 625 pmol of intact nsLTP1 allowed identification of 31 of 35 residues of N-terminal sequence (Table 1). Residues at positions 4, 14, 30, and 31 were presumed to be cysteines, since no detectable phenylthiohydantoin derivative was found at any of these positions. This assumption proved reasonable when the partial sequence of this protein was compared with all plant nsLTPs sequences registered in SWISS-PROT. nsLTP from *Amaranthus caudatus* (LTP\_AMACA, SWISS-PROT Accession No. P80450) showed a sequence identical to that of the first 35 residues of nsLTP1 from *A. hypochondriacus*, and residues 4, 14, 30, and 31 of LTP\_AMACA were cysteines.

RP-HPLC fractionation of the digestion mixture of reduced-alkylated nsLTP1 yielded 7 major peaks and about 14 minor peaks (not shown). Sequencing of the pyridylethylated tryptic fragments (Table 1) allowed complete determination of the amino acid sequence of nsLTP1 (see Fig. 3) and confirmed Cys residues at positions 4, 14, 30, and 31. Peptides P2 and P6 contain an internal lysine residue that was not cut by trypsin, presumably due to the short incubation time. The order of the tryptic peptides within nsLTP1 was determined by homology with nsLTP1 from *A. caudatus*.

#### Spectroscopic measurements

Far-UV (from 250 to 187 nm) CD spectrum for amaranth nsLTP1 revealed a predominantly  $\alpha$ -helical

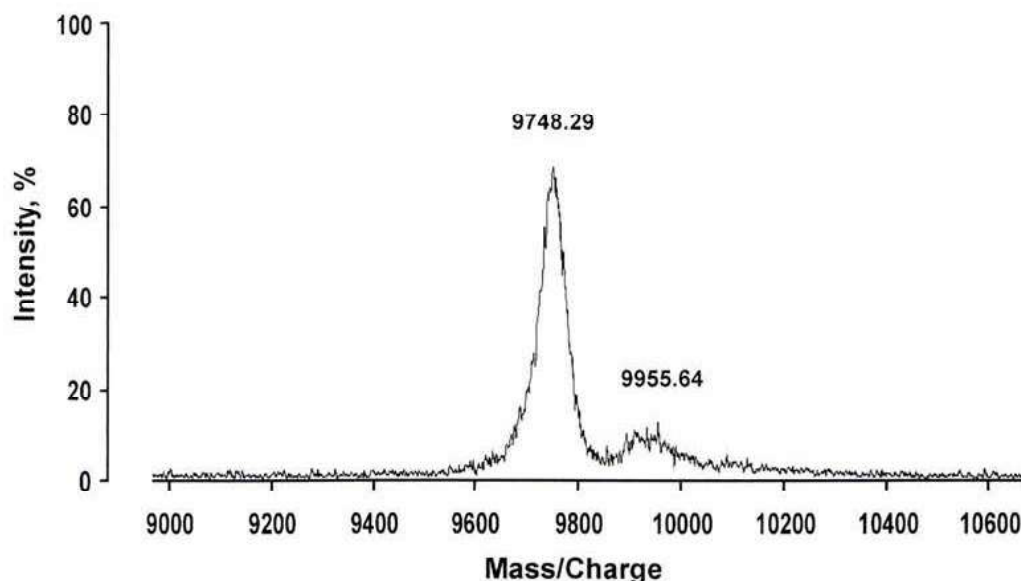


Fig. 2. MALDI-TOF MS of purified amaranth nsLTP1. The major component with molecular mass of 9747.28 Da corresponded to nsLTP1.



Table 1

Amino acid sequences of the N-terminal region of intact nsLTP1 from *Amaranthus hypochondriacus* and of peptides released by trypsin from pyridylethylated nsLTP1

N-terminal sequence from purified intact nsLTP1 (625 pmol): AVTcTVVTKALGPcMTYLKGTGATPPPAncAGVR (1–35)			
Tryptic peptide <sup>a</sup>	Sequence	Yield (pmol)	Sequence assignment
P1	VAAR SLK	200 60	(68–71) (36–38)
P2	QKTK	30	(59–62)
P3	AAAQTVADRR	200	(39–48)
P4	LASQCGVR	200	(72–79)
P5	MACNCMK SLNYK	180 130	(49–55) (63–67)
P6	ACNCMKSAQK	50	(50–60)
P7	GTGATPPPANCCAGVR	180	(20–35)
P8	AVTCTVVK	200	(1–9)
P11	MSYSVSPNVNCSVQ	160	(80–94)
P12	ALGPCMTYLK	150	(10–19)

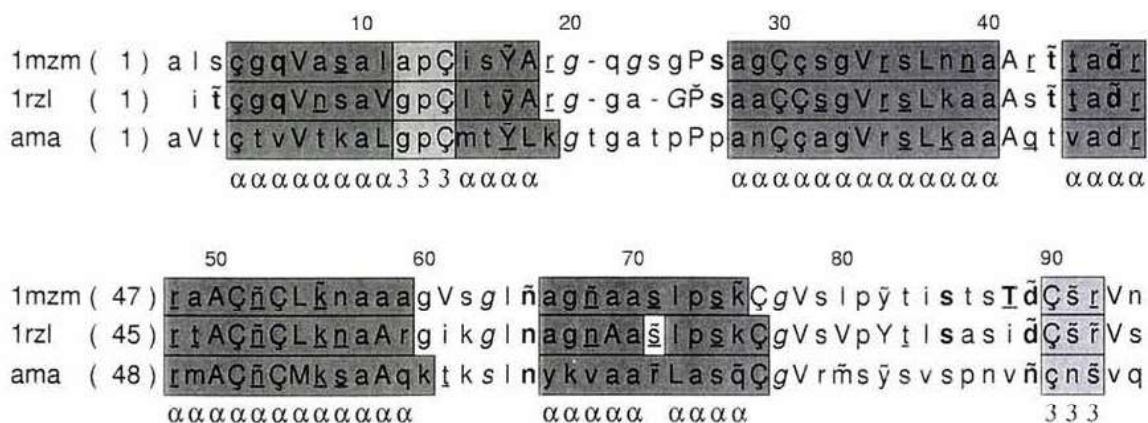
Note. Uppercase letters indicate residues identified unambiguously and lowercase letters denote residues assigned on the basis of homology with the nsLTP1 from *A. caudatus*.

Numbers in parentheses represent the corresponding positions within the complete sequence.

<sup>a</sup> Peptides from nsLTP1-PE formed after 1 h of digestion with trypsin.

structure (Fig. 4), which is a typical feature of plant nsLTPs 1 [2,4]. The secondary structure of the protein predicted from CD spectra by using the variable selec-

tion method SELVAR [25] suggests that almost half of the amaranth nsLTP1 amino acid residues are in the helicoidal conformation, only about 7% are strand



#### Key to JOY

solvent inaccessible	UPPER CASE	X
solvent accessible	lower case	x
$\alpha$ -helix		<u>X</u>
$\beta$ -strand		<u>x</u>
$3_{10}$ -helix		<u>X</u>
hydrogen bond to main chain amide	<b>bold</b>	<b>x</b>
hydrogen bond to main chain carbonyl	<u>underline</u>	<u>x</u>
hydrogen bond to other sidechain	tilde	<u>~</u>
disulphide bond	cedilla	ç
positive $\phi$	<i>italic</i>	<i>x</i>
<i>cis</i> -peptide	breve	˘

Fig. 3. Sequence alignment from maize (PDB code 1mzm), rice (PDB code 1rzl), and amaranth nsLTPs used in the comparative modeling and positions of  $\alpha$ -helical and  $\beta$ -structure segments annotated by JOY [29]. The sequence numbers correspond to those of amaranth nsLTP1.

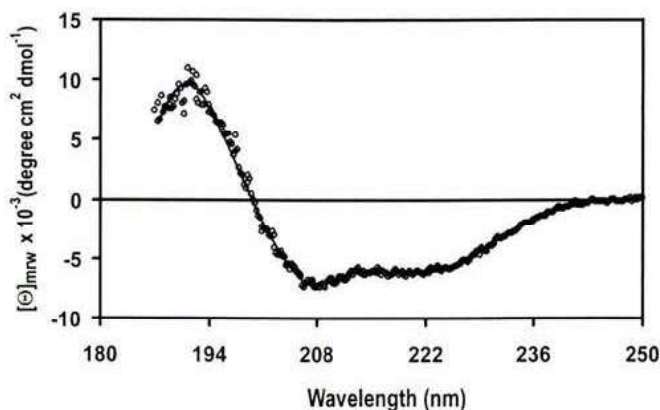


Fig. 4. Far-UV CD spectrum of amaranth nsLTP1.

structures, and the remaining conformation (46%) is undefined.

When irradiated at 343 nm, monomeric units of pyrene emit fluorescence mainly at 378 nm. Pyrene fluorescence, which is quenched in water, increases considerably within a hydrophobic environment. This fluorophore behavior has been utilized to study the binding of nsLTPs to the pyrene fatty acid, Pyr-C12 [35,36]. Upon sequential addition of Pyr-C12 to amaranth nsLTP1, an increased fluorescence was observed at 378 nm, indicating that Pyr-C12 was bound to protein (Fig. 5A). The fluorescence intensity achieves an apparent plateau, but it decreases significantly after a 0.8 lipid/protein ratio. Therefore, it was not possible to estimate the affinity of Pyr-C12 for nsLTP1 with reasonable accuracy. Quenching of pyrene fluorescence was followed by an increased fluorescence emission at 488 nm, indicative of a formation of pyrene excimer. Pyrene fluorescence quenching was also observed when maize and wheat nsLTPs were titrated with Pyr-C12 [35], and it was ascribed to the binding of two molecules of lipid by these proteins. The crystal structure of wheat nsLTP1 in complex with lyso-myristoyl-phosphatidylcholine confirmed the presence of two binding sites for lipids [21], which are inserted head to tail in the hy-

drophobic cavity, whereas maize nsLTP1, as demonstrated by high-resolution crystal structures complexed with lipids [17], binds only one fatty acid molecule.

The ability of stearic acid to displace Pyr-C12 from the lipid binding site of amaranth nsLTP1 is shown in Fig. 5B. The efficiency of displacement as reflected by a decrease in fluorescence emission of pyrene is usually taken as a measure of the affinity of nsLTPs for a nonfluorescent fatty acid. The addition of  $\sim 1.2 \mu\text{M}$  stearic acid to amaranth nsLTP1 preequilibrated with  $7.5 \mu\text{M}$  Pyr-C12 decreases the pyrene fluorescence by about 80%. This result indicates that amaranth nsLTP1 is able to bind C12 to C18 fatty acids.

#### Comparison with homologous nsLTPs

The alignment of the amino acid sequence of *A. hypochondriacus* nsLTP1 with those of homologous proteins revealed a sequence identity ranging from 40 to 57% with nsLTPs from plants other than amaranth. All of the eight cysteine residues (Cys 4, Cys14, Cys 30, Cys 31, Cys 51, Cys 53, Cys76, Cys90) are involved in disulfide bonds and are highly conserved among all plant nsLTPs 1 sequences (see Fig. 3). Furthermore, there are several well-conserved hydrophobic residues, including Val7, Leu37, Ala40, Ala41, Ala50, Ala69, and Val78. Arg47 is conserved in most of the homologous proteins, while Arg48 is sometimes replaced either by lysine (i.e., in betvularis and spinach nsLTPs) or by glutamine (in cotton nsLTP). Two aromatic residues are highly conserved in plant nsLTPs, Tyr17 (corresponding to Tyr16 in rice) and Tyr82 (corresponding to Tyr79 in rice [19] and Tyr81 in maize [16]). Pro70, which is invariant in all other nsLTPs sequences, undergoes a mutation to Ala73 in amaranth nsLTP1. In addition, the conserved Pro78 of the C-terminal region is replaced by Ser81 in amaranth nsLTP1. The strictly conserved Pro13, corresponding to Pro12 in rice nsLTP, is within an intervening  $3_{10}$  helix in helix H1. This protein has three other proline residues (Pro25, Pro26, and Pro27) in loop L1 between the  $\alpha$  helices H1 and H2 and only one

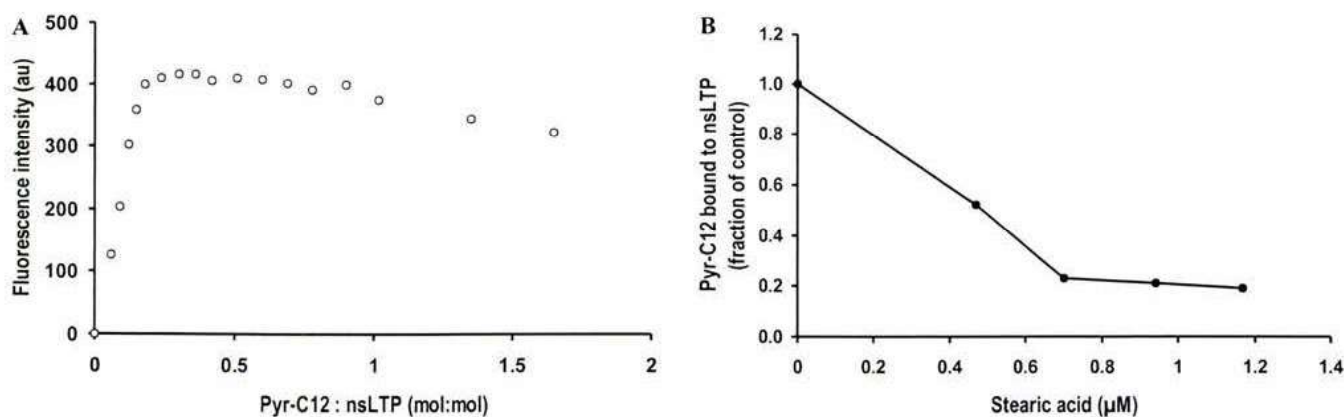


Fig. 5. Lipid-binding assay. (A) Binding of Pyr-C12 to amaranth nsLTP1. (B) Displacement of Pyr-C12 bound to amaranth nsLTP1 by stearate.

(Pro26, corresponding to Pro23 in rice) is strictly conserved among other nsLTPs sequences.

The amino acid sequence LASQCGVRMSYSVSP NVNCSNV from Leu72 in helix H4 up to Val93 in the C-terminal domain of amaranth nsLTP1 (Fig. 3) presents the characteristic “plant lipid-transfer protein signature” from PROSITE [37]. (PROSITE reference PS00597). FUGUE identified the “plant lipid-transfer proteins” family from HOMSTRAD [28] as the closest proteins of known structure. Within the five protein members in this HOMSTRAD family, the two with the highest sequence identity with amaranth nsLTP1 were those from rice (54.9% identity) and maize (46.2% identity). These structures [*Oryza sativa*, PDB code 1rzl; *Zea mays*, PDB code 1mzm] were included in the sequences alignment shown in Fig. 3 and used as templates to generate the 3D model of this protein.

#### Comparative modeling of amaranth ns-LTP1

The model of the 3D structure of amaranth nsLTP1 in complex with stearate (Fig. 6) generated using MODELLER has very good overall features with 97.6%

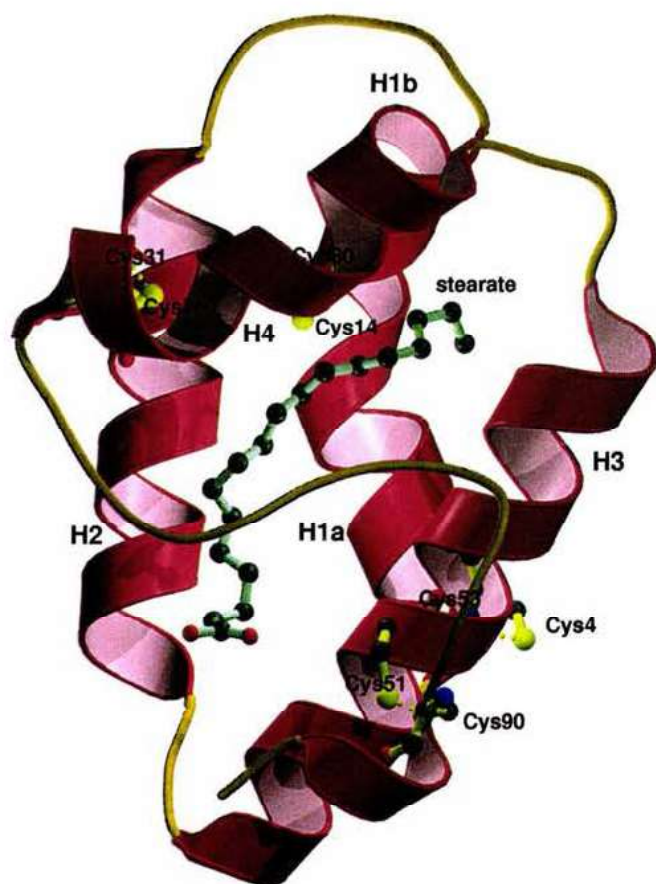


Fig. 6. Diagram of the 3D model of amaranth nsLTP1 in complex with stearate. Helices are depicted in red and the lipid in a CPK color scheme with bonds in blue. Disulfide bridges are shown with cysteines colored yellow. This figure was drawn using Molscript [38] and Raster3D [39].

of the residues in the most favored conformations, 2.4% in allowed conformations, and 0.0% in forbidden conformations [30]. The PROCHECK overall G-factor is +0.04. The authors of PROCHECK recommend a value for the overall score of  $-0.50$  or greater. The VERIFY3D report indicates that there are no poor areas, all residues exhibit positive values above 0.36. The sequences alignment annotated by JOY (Fig. 3) showed high similarity in the amino acid environment for the three structures and the most probable localization for the extended  $\beta$  structure and  $\alpha$ -helical conformations in amaranth nsLTP1. The 3D model suggests a global fold similar to the known structures of the nsLTP1 family, with four large helices involving residues Cys4–Lys19 (H1), Ala28–Ala40 (H2), Val44–Lys60 (H3), and Tyr66–Cys76 (H4). There is a turn of  $3_{10}$  helix in H1 involving residues Gly12–Pro13–Cys14 (see Fig. 3). The helices are connected by three loops, L1 (Gly20–Pro27), L2 (Ala41–Thr43), and L3 (Thr61–Asn65). The C-terminal region (Gly77–Gln94) is a long twisting loop containing a  $\beta$  turn type 1 (involving 85Ser–86Pro–87Asn–88Val residues) and one  $3_{10}$ -helical turn (involving Cys90–Ser92 residues). The pairing of the four disulfide bridges produced by MODELLER involved Cys4–Cys53, Cys14–30, Cys31–76, and Cys51–Cys90 residues. This disulfide-bonding pattern is consistent with that proposed for nsLTP from *A. caudatus*.

The model structure of amaranth nsLTP1 in complex with stearate (Fig. 6) also shows the lipid surrounded by the four helices that create a hydrophobic cavity lined by

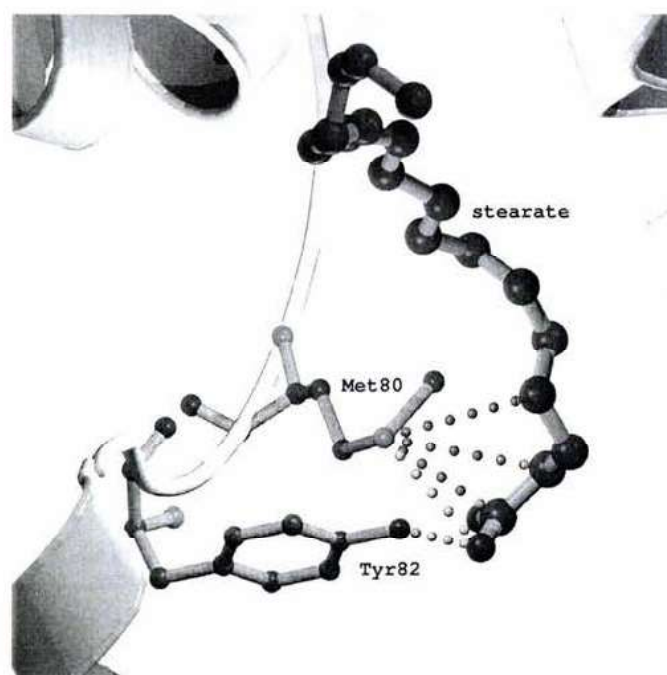


Fig. 7. Representation of the lipid binding site of amaranth nsLTP1 showing the side chains of the residues involved in interactions (dashed lines) with stearate.

the following hydrophobic residues: Leu11 and Leu18 of helix H1; Val34 and Leu37 of helix H2; Ala41 of loop L2; Ala50, Met54, Ala57, and Ala58 of helix H3; Leu72 and Ala73 of helix H4; and Val78, Met80, and Val84 of the C-terminal region. The lipid looks somewhat bent near the core of the protein where Leu18 in helix H1 partially obstructs the hydrophobic cavity. The polar head of stearate points to loop L2, whereas the hydrophobic tail lies near loop L3. The model reveals a potential carboxylate group binding site involving Tyr82 (Fig. 7), which occurs at a suitable distance (2.85 Å) to form a hydrogen bond with one of the oxygen atoms of the stearate carboxylate group. The sulfur of Met80 has hydrophobic interactions with carbon atoms C1 (3.2 Å), C2 (3.8 Å), and C4 (3.7 Å) of the fatty acid. In maize nsLTP [17], the highly conserved Arg46 and Tyr81 are near the top opening of the hydrophobic cavity, where they may interact with the polar head of fatty acids with hydrocarbon tails of C16 or longer (see Discussion).

Fig. 8 shows the superimposition of the backbone coordinates of the nsLTPIs from maize (in green) and amaranth (in red) in complex with lipids (left). The superimposed structures of lipid-free rice nsLTP1 (in blue) and amaranth nsLTP1 are depicted to the right. The stearate (colored in red) in amaranth nsLTP1 has been omitted in this case for comparison. Although the crystal structures of the two homologous proteins [16,19] were used to model amaranth nsLTP1, the resulting structure for amaranth nsLTP1 was modeled in complex with stearate using the coordinates of palmitate

in the crystal structure of maize complexed with this lipid [16]. That could explain the higher similarity observed in these two structures, despite that the sequence identity between amaranth and rice nsLTPIs is somewhat higher (Fig. 3). In rice nsLTP1, the C-terminal region is packed against the core of the protein, particularly in the neighborhood of Ile81 (corresponding to Val84 in amaranth nsLTP1), whereas in amaranth nsLTP1, the backbone around Val 84 (mutated by Ile 83 in maize nsLTP1) is pushed out from the core of the structure to accommodate the lipid (Fig. 8).

## Discussion

The complete amino acid sequence of an nsLTP1 isolated from *A. hypochondriacus* was determined by digestion with trypsin and automated Edman degradation. The protein comprises 94 residues, including 8 cysteines that presumably form four disulfide bridges between positions 4–53, 14–30, 31–76, and 51–90. The sequence of the protein proved to be identical to that from *A. caudatus*. Based on the hypothesis of a monophyletic origin of grain amaranths [40], it is conceivable that the nsLTP1 sequence might be conserved through domestication of *Amaranthus hybridus*, the putative common ancestor [40].

The secondary structure elements in the model of amaranth nsLTP and their locations in the sequence showed a high similarity with those structures from rice

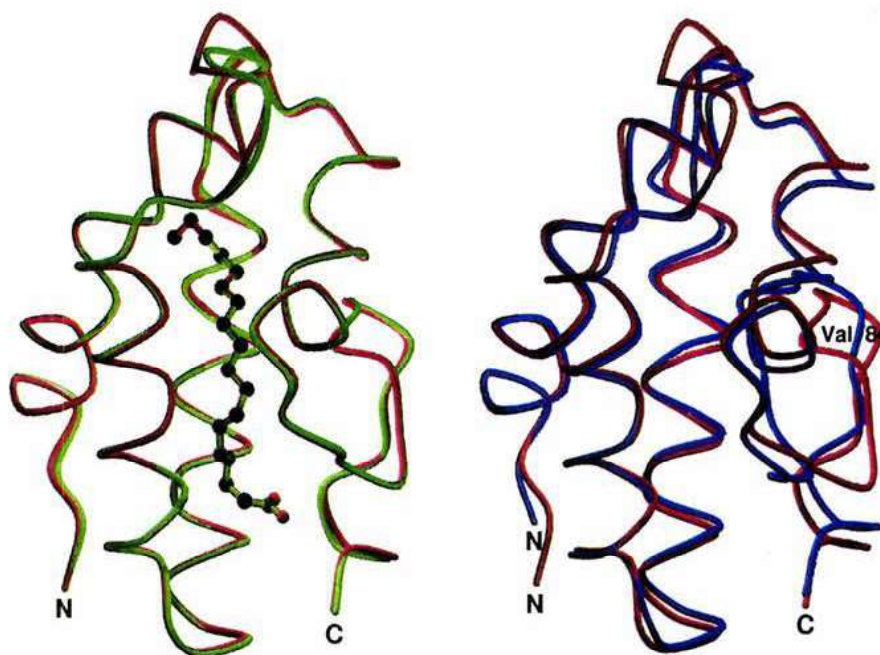


Fig. 8. Superimposition of backbone coordinates of nsLTP1 from amaranth (red) with nsLTP from maize (green) in complex with lipids (left) and with lipid-free rice nsLTP (blue). For clarity, the lipid was omitted in the backbone trace of amaranth superimposed with that from rice (right). The structures of maize and amaranth nsLTPIs are closer to each other, despite the larger sequence identities between nsLTPIs from amaranth and rice. Both figures were drawn using Molscript [38] and Raster3D [39].

and maize nsLTPs used as templates to generate a 3D model of the protein. The CD spectra of amaranth nsLTP1 revealed a largely helical structure, consistent with the model. Furthermore, using a pyrene-labeled fatty acid, it has been shown that amaranth nsLTP1 is able to bind lipids. Due to quenching of pyrene fluorescence resulting from excimer formation, it was not possible to determine the affinity of the protein for this fatty acid; however, the displacement of Pyr-12C bound to nsLTP1 by lower concentrations of stearic acid suggests that the protein has a preference for long-chain fatty acids.

The model structure of amaranth nsLTP1 in complex with stearate seems to be closely related to the structure of maize nsLTP1 in complex with palmitate, despite the higher sequence identity of amaranth nsLTP1 with rice nsLTP1. The major differences between the structure of rice nsLTP1 and that of amaranth nsLTP1 were found in the C-terminal region (Fig. 8), which is collapsed into the protein core in rice nsLTP1, particularly in the neighborhood of Ile 81 (mutated to Val 84 in amaranth nsLTP1). The sequence identity between rice and maize nsLTPs is even greater (79%), but their hydrophobic cavities are quite different [19]. The hydrophobic cavity of rice nsLTP1 is considerably smaller than that of maize nsLTP1. Moreover, the side chain of rice Tyr79 divides the main cavity into two parts, while the side chain of Ile 81 effectively closes the cavity end [19]. In maize nsLTP1, Tyr81 (equivalent to Tyr 79 in rice) protrudes out of the tunnel-like cavity slightly more in the lipid-free structure and Ile 83 (equivalent to Ile 81 in rice) does not completely obstruct the cavity [17]. It is probable that the hydrophobic cavity in amaranth nsLTP1 is more related to that of maize than to that of rice nsLTP1, although they show some differences in the cavity entrance near Leu 18 (equivalent to Ala 18 in maize nsLTP1) where the hydrophobic cavity in amaranth is smaller due to the larger size of Leu 18. The hydrophobic interactions between the sulfur atom of Met 80 and the C1–C4 of stearate in the model of amaranth nsLTP, with no other apparent interactions after C4, could explain the low specificity to lipids exhibited by this protein. As in maize nsLTP1 [17], the lipid chain inserted into the hydrophobic cavity of amaranth nsLTP1 could be of different lengths without major modifications in protein fold.

The model of amaranth nsLTP1 predicts that Tyr82 may interact through hydrogen bonds with one of the oxygen atoms of the stearate carboxylate group (Fig. 7), supporting the fundamental role of this aromatic residue in lipid binding. The high-resolution crystal structures of maize nsLTP1 in complex with several fatty acids [17] demonstrated a major role of Tyr81, Arg46, Asn 37, and water molecules in the stabilization of fatty acids by hydrogen bonding. These structures also revealed different lipid-binding modes depending on the tail length

of the lipid. The O1 atoms of the palmitate and palmitoleate carboxylate groups have hydrogen bonds to the OH of Tyr81, whereas in the stearate–maize nsLTP1 complex, the O2 atom of stearate is hydrogen bonded to the OH of Tyr81 at a distance of 2.55 Å, and the O1 atom participates in hydrogen bonds with water molecules. In the model of amaranth nsLTP1 complexed to stearate, the OH of Tyr82 lies at 2.85 Å from the O2 atom of the lipid (see Fig. 7), consistent with a highly conserved region of the amaranth nsLTP1 structure forming a lipid-binding site within the hydrophobic cavity.

Further studies of binding of amaranth nsLTP1 to lipids differing in the hydrophobic tail size together with crystal structures of this protein in complex with lipids will afford detailed insights on their lipid-binding mode. Finally, because of the recognized tolerance exhibited by amaranth crops to stress environments, such as drought [41], cold, and saline–alkaline soils [42], the amaranth plant could be particularly useful to establish the major function of nsLTPs in plant defense mechanisms.

#### Acknowledgments

We gratefully acknowledge Dr. Zhirui Lian (Shire Biologics, Inc; Northborough, MA, USA) for performing mass spectrometry experiments on amaranth nsLTP1. We are also grateful to Dr. Dorothy D. Pless (Instituto de Neurobiología, UNAM) for her invaluable help in revising the manuscript. V.M. Bolaños-García is a fellow of The Wellcome Trust, International Fellows Program, 60125.

#### References

- [1] V. Arondel, C. Vergnolle, F. Tchang, J.-C. Kader, *Mol. Cell. Biochem.* 98 (1990) 49–56.
- [2] J.-C. Kader, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant. Mol. Biol.* 47 (1996) 627–654.
- [3] F. Guerbet, M. Grosbois, A. Jolliot-Croquin, J.-C. Kader, A. Zachowski, *Mol. Cell. Biochem.* 192 (1999) 157–161.
- [4] J.-P. Douliez, T. Michon, K. Elmorjani, D. Marion, *J. Cereal Sci.* 32 (2000) 1–20.
- [5] P. Sterk, H. Booi, G.A. Shellekens, A. Van Kammen, S.C. De Vries, *Plant Cell* 3 (1991) 907–921.
- [6] B. Hollenbach, L. Schreiber, W. Hartung, K.-J. Dietz, *Planta* 203 (1997) 9–19.
- [7] S. Torres-Schumann, J.A. Godoy, J.A. Pintor-Toro, *Plant Mol. Biol.* 18 (1992) 749–757.
- [8] M. Treviño, M.A. O'Connell, *Plant Physiol.* 116 (1998) 1461–1468.
- [9] F. Garcia-Olmedo, F. Molina, A. Segura, M. Moreno, *Trends Microbiol.* 3 (1995) 72–74.
- [10] W.F. Broeckert, B.P.A. Cammue, M.F.C. De Bolle, K. Thevisen, G.W. De Samblanx, R.W. Osborn, *Crit. Rev. Plant Sci.* 16 (1997) 297–323.
- [11] C.P. Sellitrennikoff, *Appl. Environ. Microbiol.* 67 (2001) 2883–2894.

- [12] S. Fefeu, S. Bouaziz, J.C. Huet, J.C. Pernollet, E. Guittet, *Protein Sci.* 6 (1997) 2279–2284.
- [13] V. Mikès, M.-L. Milat, M. Ponchet, F. Panabières, P. Ricci, J.-P. Blein, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 245 (1998) 133–139.
- [14] G. Boissy, M. O'Donohue, O. Gaudemer, V. Perez, J.C. Pernollet, S. Brunie, *Protein Sci.* 8 (1999) 1191–1199.
- [15] N. Buhot, J.-P. Douliez, A. Jacquemard, D. Marion, V. Tran, B.F. Maume, M.-L. Milat, M. Ponchet, V. Mikes, J.-C. Kader, J.-P. Blein, *FEBS Lett.* 509 (2001) 27–30.
- [16] D.H. Shin, J.Y. Lee, K.Y. Hwang, K.K. Kim, S.W. Suh, *Structure* 3 (1995) 89–199.
- [17] G.W. Han, J.Y. Lee, H.K. Song, C. Chang, K. Min, J. Moon, D.H. Shin, M.L. Kopka, M.R. Sawaya, H.S. Yuan, T.D. Kim, J. Choe, D. Lim, H.J. Moon, S.W. Suh, *J. Mol. Biol.* 308 (2001) 263–278.
- [18] J. Gomar, M.C. Petit, P. Sodano, D. Sy, D. Marion, J.-C. Kader, F. Vovelle, M. Ptak, *Protein Sci.* 5 (1996) 565–577.
- [19] J.Y. Lee, K. Min, H. Cha, D.H. Shin, K.Y. Hwang, S.W. Suh, *J. Mol. Biol.* 276 (1998) 437–448.
- [20] J. Poznanski, P. Sodano, S.W. Suh, J.Y. Lee, M. Ptak, F. Vovelle, *Eur. J. Biochem.* 259 (1999) 692–708.
- [21] D. Charvolin, J.-P. Douliez, D. Marion, C. Cohen-Addad, E. Pebay-Peyroula, *Eur. J. Biochem.* 264 (1999) 562–568.
- [22] M.H. Lersche, B.B. Kragelund, L.M. Bech, F.M. Poulsen, *Structure* 5 (1997) 291–306.
- [23] N.L. Vasco-Méndez, M. Soriano-García, A. Moreno, R. Castellanos-Molina, O. Paredes-López, *J. Agric. Food Chem.* 47 (1999) 862–866.
- [24] G.E. Tarr, in: J.E. Shively (Ed.), *Methods of Protein Microcharacterization*, Humana Press, Clifton, 1986, pp. 155–194.
- [25] W.C. Johnson, *Proteins: Struct. Funct. Genet.* 35 (1999) 307–326.
- [26] S.F. Altschul, T.L. Madden, A.A. Schäffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, D.J. Lipman, *Nucleic Acids Res.* 25 (1997) 3389–3402.
- [27] J. Shi, T.L. Blundell, K. Mizuguchi, *J. Mol. Biol.* 310 (2001) 243–257.
- [28] P.I.W. de Bakker, A. Bateman, D.F. Burke, R.N. Miguel, K. Mizuguchi, J. Shi, H. Shirai, T.L. Blundell, *Bioinformatics* 17 (2001) 748–749.
- [29] K. Mizuguchi, C.M. Deane, T.L. Blundell, M.S. Johnson, J.P. Overington, *Bioinformatics* 14 (1998) 617–623.
- [30] A. Sali, T.L. Blundell, *J. Mol. Biol.* 234 (1993) 779–815.
- [31] R.A. Laskowski, M.W. MacArthur, D.S. Moss, J.M. Thornton, *J. Appl. Crystallogr.* 26 (1993) 283–291.
- [32] R. Luthy, J.U. Bowie, D. Eisenberg, *Nature* 356 (1992) 83–85.
- [33] R.N. Miguel, J. Shi, K. Mizuguchi, in: I. Tsigelny (Ed.), *Protein Structure Prediction: Bioinformatic Approach*, IUL Publishers, La Jolla, CA, 2002, pp. 143–169.
- [34] H.A. Scoble, J.E. Vath, W. Yu, S. Martin, in: P. Matsudaira (Ed.), *A Practical Guide to Protein and Peptide Purification for Microsequencing*, Academic Press, Inc, San Diego, CA, 1993, pp. 127–153.
- [35] F. Guerbet, M. Grosbois, A. Jolliot-Croquin, J.-C. Kader, A. Zachowski, *Biochemistry* 38 (1999) 14131–14137.
- [36] T.B. Dansen, J. Westerman, F.S. Wouters, R.J.A. Wanders, A. van Hoek, T.W.J. Gadella Jr., K.W.A. Wirtz, *Biochem. J.* 339 (1999) 193–199.
- [37] K. Hofmann, P. Bucher, L. Falquet, A. Bairoch, *Nucleic Acids Res.* 27 (1999) 215–219.
- [38] P.J. Kraulis, *J. Appl. Crystallogr.* 24 (1991) 946–950.
- [39] E.A. Merrit, D.J. Bacon, *Methods Enzymol.* 277 (1997) 505–524.
- [40] K.F. Chan, M. Sun, *Theor. Appl. Genet.* 95 (1997) 865–873.
- [41] E. Espitia-Rangel, in: O. Paredes-Lopez (Ed.), *Amaranth: Biology, Chemistry and Technology*, CRC, Boca Raton, FL, 1994, pp. 34–35.
- [42] J.T. Williams, D. Brenner, in: J.T. Williams (Ed.), *Cereals and Pseudocereals*, Chapman & Hall, London, 1995, pp. 140–141.