Universidad Nacional de La Plata
Facultad de Ciencias Exactas
Departamento de Ciencias Biológicas

Biblioteca Central
Fac. Cs. Exactas
U.N.LP

"Globulina-p de amaranto: Análisis de estructura y homología con otras proteínas de reserva"

Tesis Doctoral | Alejandra V. Quiroga

-2008-

1480

rector: María Cristina Añón, Co-director: Nora Martínez

El presente trabajo, para optar por el grado académico de Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas, fue realizado en el Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA) bajo la dirección de la Dra. María Cristina Añón y la codirección de la Dra. Nora Martínez.

…"Ante esta petición, el Cuervo le tomó el pulso a Pinocho; luego le palpó la nariz, a continuación el dedo meñique de ambos pies, y cuando lo hubo palpado todo a conciencia, pronunció solemnemente estas palabras:

-A mi entender, la marioneta está muerta; pero si por desgracia no estuviera muerta, eso sería un indicio seguro de que sigue viva.

-Lamento tener que contradecir al Cuervo, mi ilustre amigo y colega -dijo la Lechuza-. En mi opinión, la marioneta está viva; pero si por desgracia no estuviera viva, eso sería señal de que está realmente muerta.

-¿Y usted no dice nada? –preguntó el Hada al Grillo Parlante.

-Yo digo que el médico prudente, cuando no sabe lo que dice, lo mejor que puede hacer es permanecer callado"….

"Pinocho". Carlo Collodi.

Agradecimientos

Quiero agradecer el apoyo y la confianza de muchas personas e instituciones que permitieron realizar este trabajo de tesis doctoral.

A las directoras María Cristina Añón y Nora Martínez por su constante solidaridad y afecto.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) que mediante el otorgamiento de becas apoyó financieramente este trabajo.

A la Universidad Nacional de La Plata en donde realicé mis estudios de grado y posgrado de forma gratuita y con excelente nivel académico.

A mi familia, quienes mediante su cariño y apoyo incondicional han ayudado a concretar mis sueños y anhelos.

A todos los técnicos, profesionales, docentes e investigadores de los laboratorios de la Facultad de Ciencias Exactas (UNLP) y del Instituto Fundación Leloir, quienes han colaborado generosamente para la concreción de este trabajo.

A mis compañeros del Laboratorio de Proteínas, Ariana, Aldo, Paula, Bruno, Fabricio, Jorge, Francisco, Gabriela, Pablo, Valeria, Adriana M., Adriana S., Silvana, Sara, Cecilia P., Cecilia C., Renata, Cachito, Isabel, María, Virginia, Camila, Agustín, Cristina, María Victoria y Lili; por hacer de mi lugar de trabajo un espacio de reflexión y creación científica.

A mis compañeros de las cátedras de Química General e Inorgánica de la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales y Bromatología y Nutrición de la Facultad de Ciencias Exactas.

A todos mis compañeros del CIDCA, muchas gracias por su cariño y colaboración.

1 INTRODUCCIÓN 9

1.1 GENERALIDADES DEL AMARANTO 9

1.1.1 Historia 9

1.1.2 Características y utilización 9

1.1.3 Composición química del grano 11

1.2 PROTEÍNAS DE RESERVA 14

1.2.1 Características generales de las proteínas de reserva de semillas 14

1.2.2 La familia de las globulinas 15

1.2.3 La superfamilia de las prolaminas de reserva 22

1.3 PROTEÍNAS DE RESERVA DE AMARANTO 27

1.3.1 Generalidades 27

1.3.2 Albúminas 28

1.3.3 Globulinas 30

1.3.4 Globulina-p 35

1.3.5 Glutelinas 37

1.3.6 Prolaminas 38

1.3.7 Proteínas no de reserva 39

2 OBJETIVOS 42

3 MATERIALES Y MÉTODOS 44

3.1 SEMILLAS Y HARINA 44

3.2 EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS A PARTIR DE HARINA DESGRASADA 44

3.2.1 Albúminas 44

3.2.2 Globulina 11S 44

3.2.3 Globulina-p (gp) 45

3.3 PURIFICACIÓN DE FRACCIONES PROTEICAS 45

3.3.1 Cromatografía de exclusión molecular preparativa 45

3.4 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN PROTEICA 46

3.5 SOLUBILIDAD 46

3.6 ELECTROFORESIS 47

3.6.1 Reactivos generales 47

3.6.2 Preparación de las muestras 47

3.6.3 Desarrollo 48

3.6.4 Coloración 50

3.6.5 Electroforesis bidimensional (IEF/SDS-PAGE) 50

3.6.6 Obtención de las imágenes y análisis de los geles 51

3.7 DETERMINACIÓN DE LA HIDROFOBICIDAD SUPERFICIAL 51

3.8 CROMATOGRAFÍA RÁPIDA DE PROTEÍNAS EN MEDIO LÍQUIDO (FPLC) 53

3.8.1 Cromatografía de exclusión molecular 53

3.8.2 Cromatografía de intercambio iónico 54

3.9 CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA PERFORMANCE (HPLC) 55
3.9.1 Cromatografía de intercambio iónico *55*
3.9.2 Cromatografía en fase reversa RP-HPLC *57*
3.10 COMPARACIÓN DE LA ESTRUCTURA TERCIARIA DE LAS PROTEÍNAS POR ESPECTROSCOPÍA DE FLUORESCENCIA 58
3.11 TRATAMIENTO CON AGENTES QUÍMICOS. CURVAS DE DESNATURALIZACIÓN 58
3.11.1 Desnaturalización con urea *58*
3.11.2 Desnaturalización con 2-mercaptoetanol *62*
3.12 DETERMINACIÓN DE GRUPOS SULFHIDRILOS TOTALES 64
3.12.1 Síntesis del reactivo 2-nitro-5-tiosulfobenzoato (NTSB). *64*
3.12.2 Determinación de la cantidad de sulfhidrilos totales. *64*
3.13 RECUPERACIÓN DE LA ESTRUCTURA NATIVA DE LAS GLOBULINAS A PARTIR DE MUESTRAS DESNATURALIZADAS 65
3.13.1 Desnaturalización *65*
3.13.2 Renaturalización *65*
3.14 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS Y PROGRAMAS UTILIZADOS. 68

4 COMPARACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS ESTRUCTURALES DE GLOBULINA-P Y GLOBULINA 11S DE AMARANTO 70

4.1 ANÁLISIS Y CARACTERIZACIÓN DE LA ESTRUCTURA NATIVA DE GLOBULINA-P Y GLOBULINA 11S 70
4.2 DETERMINACIÓN DE LA HIDROFOBICIDAD SUPERFICIAL DE LAS GLOBULINAS PURIFICADAS 80
4.3 ANÁLISIS POR RP-HPLC DE LAS FRACCIONES PURIFICADAS. 84
4.4 CARACTERIZACIÓN DE LA ESTRUCTURA TERCIARIA DE GLOBULINA Y GLOBULINA-P MEDIANTE ESPECTROSCOPÍA DE FLUORESCENCIA 85
4.5 TRATAMIENTO CON UREA Y 2-MERCAPTOETANOL 88
4.6 DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE ENLACES DISULFURO DE LAS FRACCIONES PURIFICADAS 95
4.7 CONCLUSIONES 97

5 CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL DE GP: COMPOSICIÓN POLIPEPTÍDICA DE GLOBULINA-P EN COMPARACIÓN CON GLOBULINA 11S 102

5.1 ANÁLISIS DE TAMAÑO DE LOS POLIPÉPTIDOS 102
5.2 CROMATOGRAFÍA DE INTERCAMBIO IÓNICO 105
5.3 CARACTERIZACIÓN DE LOS POLIPÉPTIDOS POR SU PUNTO ISOELÉCTRICO: ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL IEF→ SDS-PAGE 107
5.4 ELECTROFORESIS DESNATURALIZANTE EN PRESENCIA DE UREA (UREA-PAGE) 110
5.5 CARACTERIZACIÓN DE LOS POLIPÉPTIDOS POR SU HIDROFOBICIDAD: CROMATOGRAFÍA EN FASE REVERSA (RP-HPLC) 114
5.6 ANÁLISIS DE LA SECUENCIA DE ALGUNOS DE LOS POLIPÉPTIDOS DE LAS GLOBULINAS DE AMARANTO 116

5.7 RENATURALIZACIÓN 127
5.8 CONCLUSIONES 137

6 CONCLUSIONES GENERALES 140

7 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 144

Introducción

1 Introducción

1.1 Generalidades del amaranto

1.1.1 Historia

El amaranto ha sido cultivado en América Latina desde antes de su descubrimiento. Se presume que este cultivo ha sido desarrollado desde hace aproximadamente 7000 años. Los primeros en utilizarlo como un cultivo altamente productivo fueron los mayas, posteriormente los incas y aztecas aprendieron acerca de su producción y consumo.
Con el descubrimiento del nuevo mundo se inició un intercambio intenso de cultivos en los que algunos de estos cobraron mayor importancia y otros llegaron a desaparecer.
Al momento de la llegada española a tierras americanas el amaranto, también denominado Huautli, era uno de los granos más preciados entre los integrantes del pueblo azteca. Sólo ellos producían entre 15 y 20.000 toneladas por año. Su producción no sólo se destinaba a la elaboración de diversos alimentos para el consumo humano como tortillas, atoles, tamales, pinoles, sino que, además, numerosos historiadores han documentado el empleo de esta planta en diversos rituales religiosos propios de esta cultura. Se fabricaban pequeñas esculturas que representaban a deidades paganas con una masa denominada tzoalli fabricada con granos de amaranto molidos junto con miel de maguey, la ceremonia incluía una etapa final en la que las estatuillas eran consumidas. Los descubridores interpretaron estos actos como heréticos y prohibieron su práctica, este hecho junto con la incorporación de cultivos provenientes del viejo mundo (preferidos por los españoles) prácticamente desterraron el cultivo del amaranto. Afortunadamente, gracias al esfuerzo de pequeños agricultores que continuaron su producción en pequeña escala, se logró preservar la existencia del amaranto.
Hoy en día la forma más común de consumir el amaranto es a través de las golosinas llamadas "alegrías" muy populares en México. Curiosamente, la preparación de este dulce es similar a la antigua preparación de tzoalli ya que se realiza con una pasta de miel, pero en lugar de harina de amaranto se emplean las semillas reventadas.

1.1.2 Características y utilización

Técnicamente el grano de amaranto es considerado como un pseudocereal ya que comparte algunas características con los cereales. Posee cantidades importantes de

almidón, aunque éste se encuentra almacenado en el perisperma. Sin embargo como pertenece a las Dicotiledóneas no es considerado un cereal verdadero.

Pertenece a la familia de las amarantáceas, de rápido crecimiento, con hojas, tallos y flores morados, rojos y dorados.

Taxonómicamente, el amaranto pertenece a la división Angiospermae, familia Centrospermae, clase Dicotyledonae, género Amaranthus, es una planta de tipo C_4, como el maíz, presenta alta capacidad de biosíntesis y baja velocidad de fotorespiración (Kigel, 1994); en consecuencia tiene altas velocidades de crecimiento y altos rendimientos. El amaranto como la mayoría de los cultivos C_4 es muy resistente a la sequía y adaptable a condiciones adversas de cultivo como los suelos salinos y temperaturas extremas (Bressani, 1994; Saunders y Becker, 1984).

Su tallo central puede alcanzar de 2 a 2,5 m de altura en la madurez, a pesar de que algunas variedades son más pequeñas. Las ramas de forma cilíndrica, pueden empezar desde la base de la planta. Posee flores vistosas de color púrpura que brotan del tallo principal, por este motivo algunas especies son utilizadas con fines ornamentales. Cada panoja tiene flores masculinas y femeninas que se autopolinizan.

Las semillas de amaranto son pequeñas alcanzando tamaños entre 1-2 mm; se pueden encontrar en variados colores desde crema a negro pasando por rojo. La cubierta de la semilla es brillosa y el embrión de forma curva se ubica de tal forma que rodea al perisperma almidonoso.

Dentro del género *Amaranthus* L. existen aproximadamente 80 especies, entre estas se incluyen tres que se cultivan para la producción de granos: A. *hypochondriacus*, A. *cruentus*, A *caudatus*; asociadas a ellas hay tres especies consideradas débiles o malezas A. *powelli*, A. *hybridus*, A. *quitensis*. Las especies cultivadas, se originaron en América antes del descubrimiento, y hoy en día se han distribuido a lo largo de Asia y África; de las especies consideradas malezas sólo una, A. *hybridus*, ha alcanzado una expansión similar a la de las especies cultivadas.

Algunos autores reconocen una cuarta especie cultivada A. *mantegazzianus* Pass o A. *edulis* Speg que al igual que *A. caudatus* proviene de Sudamérica aunque algunos estudios genéticos no garantizan que este grupo sea una especie cultivada diferente (Espitia-Rangel, 1994).

La relación evolutiva que existe entre los amarantos productores de granos y sus parientes salvajes ha sido el objeto de estudio por parte de varios autores (Sauer, 1967; Chan y Sun, 1997; Sun y col., 1999).

Las tres especies cultivadas para la producción de granos, se ubican en diferentes regiones del continente americano: A. *cruentus*, se desarrolla en el sur de México y América Central; A. *hypochondriacus* en el norte y centro de México y A. *caudatus* en los Andes. Existen además especies que se cultivan para el consumo de sus hojas: A. *tricolor* L., A. *viridis* L., A. *bitum*, L. Estas especies tienen un follaje particularmente rico en carotenoides, proteínas, hierro, calcio, magnesio y vitaminas (Prakash y Pal, 1991; Prakash y col., 1995; Shukla y col., 2003 y 2006).

Las plantas utilizadas para el consumo así como las que se emplean con fines ornamentales, son las especies de mayor porte, con grandes inflorescencias y abundante producción de semillas. Las plantas que son consideradas malezas son de menor tamaño, con flores y frutos más pequeños y de color oscuro.

En los últimos años el cultivo de amaranto ha despertado gran interés en países de climas adversos debido a sus especiales cualidades de adaptación (Joshi y col., 2002; Schahbazian y col., 2006).

Por el contrario, en Argentina el amaranto se cultiva en pequeña escala. Los integrantes de la Estación Experimental Agropecuaria Anguil de INTA, La Pampa se encargan del cultivo de amaranto tendiendo como objetivo realizar una siembra extensiva del mismo. Este grupo de trabajo, ha desarrollado la publicación periódica de un boletín informativo que lleva por nombre "Amarantos", en donde se discuten las particularidades de este cultivo. Asimismo, en la Universidad Nacional de La Pampa, se llevan a cabo cultivos de distintas especies de amaranto bajo la dirección de la Dra. Rosa M. de Troiani en el marco del proyecto "Amaranth: future food" financiado por la Unión Europea.

1.1.3 Composición química del grano

Como fuera descrito anteriormente, las semillas de amaranto poseen tamaños comprendidos entre 1 y 2 mm; sin embargo, Marcone (2000) describió una especie productora de granos 1,6 veces más grandes y 2,63 veces más pesados que los promedio.

La composición porcentual de las semillas de amaranto, para varias especies, se encuentra resumida en la Tabla 1 extraída de Bressani (1994), los datos coinciden con determinaciones de otros autores (Singhal y Kulkarni, 1988; Bertoni y col., 1984), en la

misma tabla se listan en negritas los resultados obtenidos en nuestro laboratorio para la composición de *A. cruentus* y *A. hypochondriacus*.

Tabla 1. Composición química de las semillas de diferentes especies de amaranto (g/100g).

Nutriente	*A. cruentus*		*A. hypochondriacus.*		*A. caudatus*
Humedad	9,7	**10,8**	10,4	**12,3**	10,7
Proteína*	17,0	**24,2**	15,6	**26,7**	14,9
Lípidos*	8,1	**2,8**	7,8	**1,9**	9,1
Cenizas*	3,5	**4,9**	3,5	**5,4**	2,9
Fibra cruda*	3,4	-	3,1	-	2,8
Carbohidratos*	67,9	**68,1**	70,0	**65,9**	70,3

***porcentaje en base seca**

El componente mayoritario corresponde a los hidratos de carbono, dentro de estos la mayor parte se presenta como almidón. Este último, está constituído, principalmente, por la amilopectina mientras que el contenido en amilosa puede variar entre 4,8 y 7,2% (Saunders y Becker, 1984). Los polisácaridos que no son almidón constituyen entre un 6 y 7%, los mismos contienen arabinosa, xilosa, manosa, galactosa, glucosa y ácido urónico en su composición. Otros carbohidratos como sacarosa, estaquiosa y maltosa se encuentran en cantidades pequeñas variables (Saunders y Becker, 1984).

El segundo componente más abundante de los granos de amaranto, son las proteínas (12-17%). Al comparar la composición de aminoácidos de las proteínas del grano de amaranto con los valores establecidos por FAO/WHO, (1973), encontramos a leucina como el primer aminoácido limitante. Las proteínas de amaranto, poseen un contenido de aminoácidos esenciales bueno, particularmente lisina que es deficiente en otros cereales. Desde el punto de vista nutricional, sus proteínas son de interés para el

consumo humano no sólo por la calidad de sus aminoácidos constituyentes sino también por la ausencia de gluten (Petr y col., 2003).

La fracción lipídica correspondiente a las semillas de amaranto es baja, aproximadamente del 8% (Becker, 1994). Sin embargo, la composición de la misma es interesante ya que contiene tocotrienoles que no se encuentran habitualmente en otros aceites, α y β tocotrienoles fueron identificados como potentes agentes hipocolesterolémicos (Marcone y col., 2004).

Dentro de la fracción insaponificable del aceite de amaranto encontramos una proporción elevada de escualeno (Marcone, 2000) en comparación con aceites de otros granos de cereales. El escualeno es un precursor de todos los esteroides, siendo un ingrediente importante en la industria cosmética debido a sus características fotoprotectoras. Hace unos años ha sido declarado de interés medicinal (Budin y col., 1996; Sun y col., 1995).

En cuanto a las cenizas, P, Ca, K y Mg son los principales elementos que las constituyen.

Se ha descrito la presencia de fitoquímicos en el grano de amaranto que pueden ejercer efectos fisiológicos benéficos en humanos, tales como las lecitinas, polifenoles, saponinas, inhibidores de tripsina y fitatos (Guzman-Maldonado y Paredes-López, 1998). En los últimos años se han comenzado a estudiar sus efectos directos en ensayos "in vitro" e "in vivo", detectándose efectos hipocolesterolémicos en dietas basadas en semillas de amaranto asociados a la fibra soluble, aunque en ciertos productos de extrusión esta potencialidad ha sido atribuída a las proteínas (Guzman-Maldonado y Paredes-López, 1998). Por otra parte, Czerwiski y col. (2004) encontraron un efecto positivo asociado al consumo de harina de amaranto en el perfil lipídico de ratas sometidas a una dieta rica en colesterol. Del mismo modo, Plate y Areas (2002), encontraron un efecto similar en ensayos realizados en conejos, efecto que puede ser atribuido a la fibra o la proteína de éste pseudocereal. Czerwinski y col. (2004), demostraron que el contenido de flavonoides, fenoles totales y antocianinas de la torta desgrasada de amaranto *hypochondriacus* correlaciona con la actividad antioxidante "in vitro" de las muestras. Masanobu Hibi y col. (2003) encontraron que el grano de amaranto ó sus extractos inhiben la producción específica de IgE a través de la inducción de perfiles de citoquina Th1 dominante, tanto "in vivo" como "in vitro", fenómeno que mostró su utilidad en tratamientos de alergias. Una especie salvaje de amaranto, A. *Spinosus Linn.*, es ampliamente utilizada en China como medicina para el

tratamiento de la diabetes. Mediante ensayos in vitro, Bi-Fong Lin y col. (2005) han mostrado que una proteína obtenida de hojas de esta especie desarrolla una potente actividad inmuno-moduladora y puede activar la proliferación de células B. De este modo, las semillas de amaranto se manifiestan como una fuente promisoria de sustancias nutracéuticas.

1.2 Proteínas de reserva

1.2.1 Características generales de las proteínas de reserva de semillas

La primera forma sistematizada de clasificar, caracterizar y nombrar a las proteínas de plantas fue realizada por T. B. Osborne en 1924 (Osborne, 1924). Osborne usó el sistema de clasificación propuesto por el American Committee on Protein Nomenclature (1908) que dividía a las proteínas en tres clases mayoritarias (simples, conjugadas y derivadas), cada clase a su vez constaba de distintos grupos. Basándose en sus propias determinaciones y en un análisis bibliográfico exhaustivo, concluyó que las proteínas presentes en los tejidos de plantas se repartían en sólo cuatro grupos de proteínas simples. Estos cuatro grupos fueron definidos como: ***albúminas***, solubles en agua; ***globulinas*** solubles en soluciones salinas; ***prolaminas***, un grupo característico de proteínas de cereales solubles en soluciones alcoholicas 60%-70% v/v e insolubles en agua o en soluciones salinas y ***glutelinas*** insolubles en agua, soluciones salinas o alcohol, extraíbles con álcalis.

Hoy en día, esta antigua clasificación, ha caído en desuso y ha sido reemplazada por otra más actual basada en la estructura de los genes, la homología de las secuencias de aminoácidos y su mecanismo de acumulación en los cuerpos proteicos (Fukushima, 1991). Siguiendo estos criterios se han caracterizado dos familias de proteínas de reserva: las globulinas y las prolaminas.

Todas las proteínas de reserva que pertenecen a la familia de globulinas son sintetizadas en el retículo endoplásmico (ER) y transportadas a las vacuolas de almacenamieto (PSVs) mediante vesículas. En cuanto a los genes que codifican la síntesis de estas proteínas, se caracterizan por tener varios intrones, cuya posición se encuentra altamente conservada según lo informado por Shutov y col. (1995).

Las prolaminas, también son acumuladas en cuerpos proteicos, aunque a diferencia de las globulinas su estructura genética carece de intrones y poseen dominios con secuencias de aminoácidos que se repiten.

1.2.2 La familia de las globulinas

1.2.2.1 Generalidades

La familia de las globulinas de reserva está incluida dentro de una superfamilia más amplia denominada "superfamilia de cupinas". Dentro de esta clasificación se agrupan distintas proteínas que cubren funciones biológicas muy diversas (Khuri y col., 2001; Dunwell y col., 2001; Dunwell y col., 2004), cuya evolución puede ser trazada desde archea y bacterias hasta eucariotas en las que se incluyen plantas y animales (Lane y col. 1991; Bäumlein y col. 1995). El descubrimiento de esta superfamilia, se basó en la identificación de similitud de secuencia entre germina de trigo, una glicoproteína resistente al ataque de proteasas y altamente termoestable; esferulina fúngica producida por *Physarum polycephalum* durante la formación de esporos, y globulinas de reserva de semillas. Estas proteínas comparten dos motivos de secuencias cortas de consenso conservadas y un dominio estructural de donde proviene el término cupinas ("cupa" que en latín significa pequeño barril) (Dunwell, 1998).

Dentro de esta superfamilia, encontramos diferentes subgrupos clasificados según la cantidad de dominios de cupina que poseen en la estructura proteica. Las globulinas de reserva de semillas están incluidas dentro de las bicupinas.

Las globulinas son las proteínas de reserva mayoritarias de las leguminosas, sin embargo, se dispone de datos de secuencia de aminoácidos que han confirmado la distribución de esta clase de proteínas a lo largo de Monocotiledóneas, Dicotiledóneas y Gimnospermas (Casey, 1999)

Dentro de la fracción globulinas, se han caracterizado dos clases con coeficientes de sedimentación comprendidos entre 7 y 8S y entre 11 y 12S denominadas vicilina y legumina respectivamente. Ambos tipos de globulinas comparten ciertas características estructurales, tienen subunidades formadas por dos dominios (N-terminal y C-terminal) de estructura equivalente lo que hace suponer que han derivado de un ancestro común (Ko y col., 1993; Lawrence y col., 1994; Woo y col., 2000; Bäumlein y col., 1995; Shutov y Bäumlein, 1999). Este ancestro sería del tipo de las germinas, proteínas involucradas en la respuesta de las plantas cuando son sometidas a condiciones de stress

(Dunwell y col., 2000). Del mismo modo que para los monómeros de germina, los dominios de las subunidades de las globulinas de reserva consisten en un barril-β de hojas β antiparalelas seguido por α-hélices (Adachi y col., 2001; 2003; Maruyama y col., 2001).

Las diferencias que se encuentran entre las estructuras de ambas globulinas se deben a modificaciones post-traduccionales que han sufrido durante su procesamiento.

1.2.2.2 Globulina 11S (legumina)

El análisis estructural de leguminas mediante diversas técnicas de microscopía electrónica y la resolución de estructuras cristalográficas determinadas por difracción de rayos X ha confirmado su organización en hexámeros (Adachi y col., 2001; 2003). Se caracterizan por ser solubles en soluciones salinas de alta fuerza iónica y pH neutro, y poseen masas moleculares aparentes entre 300 y 360 kDa (Marcone y col., 1998a, Marcone, 1999b). Los hexámeros están formados por subunidades de masa molecular aproximada entre 50 y 70 kDa que se mantienen unidas por interacciones no covalentes. Cada una de las subunidades, a su vez, está conformada por un polipéptido ácido de masa molecular aproximada 30 kDa y un polipéptido básico de alrededor de 20 kDa, dichos polipéptidos están unidos por un enlace disulfuro, cuya posición ha sido altamente conservada entre las distintas globulinas 11S (Adachi y col., 2001; 2003).

Los polipéptidos de globulina 11S son sintetizados como un único precursor (propolipéptido) que contiene a los polipéptidos ácido y básico unidos covalentemente por un enlace peptídico entre el extremo C-terminal del ácido y el N-terminal del polipéptido básico. El enlace disulfuro que une ambos polipétidos (ácido y básico) en la estructura final se forma durante el plegado y ensamblado de la estructura cuaternaria de la proteína y el enlace peptídico que mantiene unida a la parte ácida y básica del precursor es escindido luego del ensamblado de las subunidades en trímeros. La hidrólisis de este enlace peptídico dispara la conversión del trímero en hexámero.

Varias leguminas bien caracterizadas, como por ejemplo glicinina de soja, heliantinina de girasol y arveja, y legumina de poroto (broad bean) exhiben una importante heterogeneidad molecular que tiene origen en el polimorfismo de los genes que codifican para la síntesis de estas globulinas (Kitamura y col., 1980; Utsumi y col., 1981; Utsumi y col., 1987; Bacon y col., 1987; Raymond y col., 1995; Natarajan y col, 2006).

En particular, en la glicinina de soja (hexámero de masa molecular aproximada 320–380 kDa) se han identificado cinco subunidades mayoritarias que pueden ser divididas en dos grupos de acuerdo a la homología de secuencia de aminoácidos que las constituyen (Staswick y col., 1984 Utsumi y col., 1997). Esto mismo se observa en otras globulinas de reserva como las de *Pisum sativum* (Casey y col., 1986) y de diferentes especies de *Vicia* (Horstmann, 1983; Bäumlein y col., 1986; Schlesier y col., 1990). La identidad de secuencia de las subunidades dentro de cada grupo es de aproximadamente 80–90 % y de 45 % entre los dos grupos (Nielsen y col., 1989; Adachi y col., 2001). Dentro del grupo I encontramos a: G1 ($A_{1a}B_2$), G2 (A_2B_{1a}), G3 ($A_{1b}B_{1b}$) y dentro del grupo II encontramos a: G4 ($A_5A_4B_3$), G5 (A_3B_4). Las tres subunidades pertenecientes al grupo1 (G1, G2, G3) son las de menor tamaño molecular y las que contienen mayor cantidad de aminoácidos azufrados (Zhang y col., 2002). Cada una de las subunidades caracterizadas es codificada por uno de cinco genes estructurales Gy_1-Gy_5 caracterizados por Nielsen y col. (1989). Beilinson y col. (2002), identificaron una subunidad minoritaria en soja (G7) constituida por un polipéptido ácido de 37 kDa y uno básico de aproximadamente 20 kDa. La diferencia de tamaño que se observa entre las subunidades que pertenecen al grupo I y las que pertenecen al grupo II, se debe en parte a las variaciones en la secuencia que codifica para el extremo C-terminal de la cadena ácida, denominada zona hipervariable (Nielsen y col., 1989). Debido a la alta concentración de aminoácidos cargados en la región hipervariable, y su proximidad al sitio de corte post-traduccional en el precursor, esta región se supone localizada en la superficie de la molécula de proglobulina (Argos y col., 1985).

Se ha podido determinar la estructura cristalina de un homotrímero de proglicinina de soja (A1aB1b) (Adachi y col., 2001) (Figura 1) y de un homohexámero A3B4 (Adachi y col., 2003) (Figura 2).

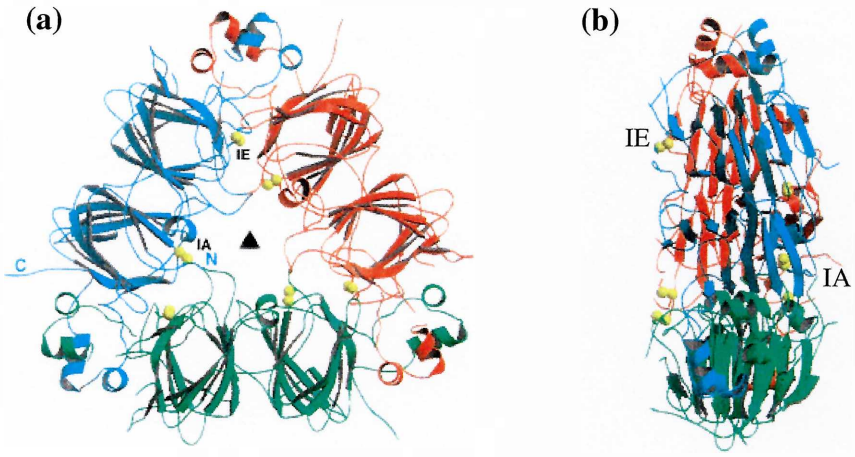


Figura 1. Diagrama de cintas que representa la estructura del homotrímero de proglicinina de soja. Imagen extraída de Adachi y col., 2001. Los tres protómeros se muestran en: rojo, verde y celeste. El eje de simetría 3 corre perpendicular al papel y se indica con un triángulo lleno. Los enlaces disulfuro en la molécula del trímero están representados por esferas amarillas. Las letras N y C indican el extremo N-terminal y C-terminal respectivamente. Las letras IE y IA señalan las caras del trímero en donde se ubican los enlaces disulfuro intercatenarios (une el polipéptido ácido y básico) e intracatenarios respectivamente.

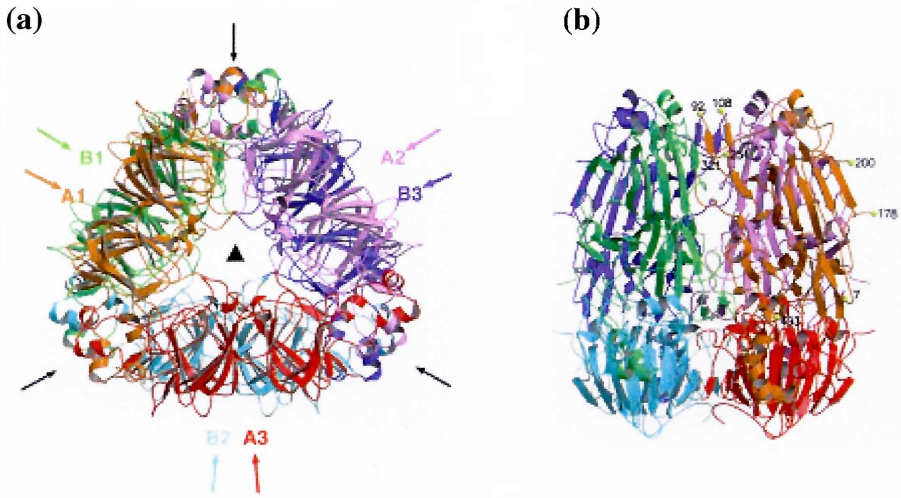


Figura 2. Diagrama de cintas que representa la estructura del homohexámero A3B4 determinada por Adachi y col., 2003. Los seis protómeros de la glicinina hexamérica se muestran en: naranja (A1), rosa (A2), rojo (A3), verde (B1), celeste (B2), azul (B3). (a) El eje de simetría 3 corre perpendicular al papel y se indica con un triángulo lleno. Las flechas negras indican los ejes de simetría dos del hexámero. Las flechas de color indican ejes de pseudo-simetría dos de dos trímeros, (b) Diagrama de cintas del hexámero rotado 90º.

A través del análisis de las estructuras cristalinas propuestas se ha sugerido un mecanismo para la formación del hexámero en la proteína madura. Dicho hexámero, se formaría a través de la interacción de dos trímeros mediante sus caras denominadas "IE" que son las que tienen la mayor cantidad de residuos hidrofóbicos expuestos en la superficie.

1.2.2.3 Globulina 7S (vicilina)

Las denominadas vicilinas, se caracterizan por tener un coeficiente de sedimentación comprendido entre 7 y 9S. Se organizan estructuralmente formando trímeros cuya masa varía entre 150 y 200 kDa (Casey y col., 1986). A diferencia de lo que se describió para las leguminas, las subunidades que forman los trímeros en vicilinas no poseen uniones disulfuro.

Se pueden distinguir dos tipos de subunidades dentro de los trímeros en la mayoría de las proteínas que pertenecen a esta clase, unas de masa molecular entre 70 y 80 kDa y otras de masa molecular 50 kDa. Ambos tipos de subunidades comparten una fuerte homología de secuencia. Las de mayor tamaño poseen un inserto en el extremo N-terminal de características marcadamente hidrofílicas. Algunos autores, han sugerido que las subunidades de 50 kDa evolucionaron de las de 70 kDa por pérdida de su región polar variable (Dure, 1990; Shutov y col., 1995).

Las subunidades pequeñas (50 kDa) difieren en el grado de glicosilación y en la presencia o no de sitios de procesamiento dentro de su secuencia que llevan a la reduccion de tamaño. Esto genera una gran diversidad a la hora de estudiar la masa de los polipéptidos que forman las globulinas 7S. Por ejemplo, en el caso de *Vicia faba*, se han descrito subunidades no glicosiladas sin sitios de corte (Bassüner y col., 1987; Weschke y col., 1988); en cambio, para faseolina (globulina 7S de *Phaseolus vulgaris* L.), se encontraron subunidades que carecen de sitios de corte con distintos grados de glicosilación (Slightom y col., 1985) y finalmente, las subunidades de vicilina de arveja son sintetizadas como un único precursor de masa 50 kDa que sufre hidrólisis y glicosilación post-traduccionales dando origen a polipéptidos de masa molecular entre 12,5 y 33 kDa (Gatehouse y col., 1983; Casey y col., 1986 y 1993).

Las estructuras de los cristales que forman algunas globulinas 7S han sido estudiadas por difracción de rayos X. Ko y col. (1993, 2000, 2001) determinaron la estructura cristalina de canavalina, la globulina 7S de poroto negro (jack bean *Canavalia ensiformis*); Lawrence y col. (1994) determinaron la estructura de faseolina de poroto francés (*Phaseolus vulgaris*); Maruyama y col. (2001) caracterizaron a β-conglicinina de soja (Figura 3), y recientemente Itoh y col. (2006) determinaron la estructura para "mung bean" (*Vigna radiata* L. Wilczek).

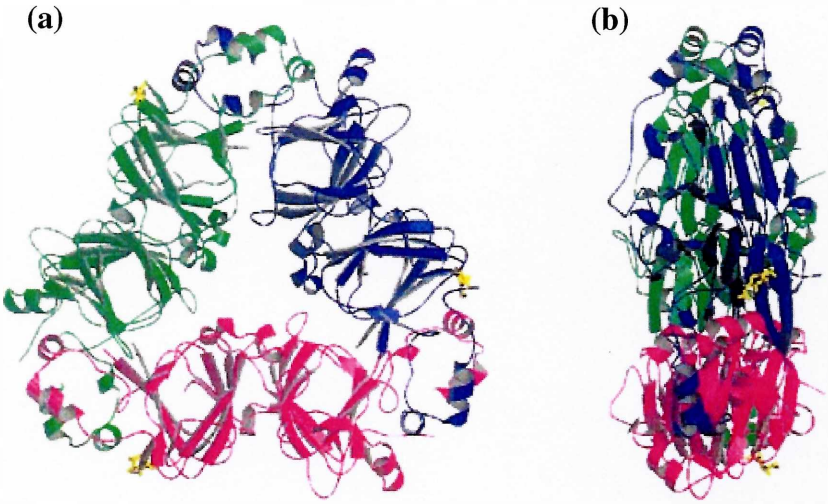


Figura 3. Diagrama de cintas de β–homotrímeros. Los monómeros se muestran en rosa, verde y azul. Las posiciones glicosiladas se señalan en color amarillo. En la figura (a) el eje de simetría 3 pasa perpendicular al papel. En la figura (b) el trímero está rotado 90°.

Las subunidades de vicilina consisten en dos módulos estructurales similares. Cada uno de ellos posee un dominio de barril-β seguido por un dominio de α-hélice. La estructura trimérica que alcanzan estas proteínas en su madurez es mediada por la interacción de los dominios de α-hélice. Estos dominios hacen las veces de "ganchos" e interaccionan con los dominios α-hélice de otra subunidad adyacente (Lawrence, 1999).

1.2.2.4 Síntesis, transporte y ensamblado de globulinas 7S y 11S

La síntesis y deposición de proteínas de reserva de semillas está regulada espacial y temporalmente, sólo ocurre en tejidos específicos y tiempos específicos durante el desarrollo de las semillas.

Las globulinas de reserva, son sintetizadas en ribosomas asociados con el retículo endoplásmico rugoso (REr) como un precursor (pre-pro-proteína) que posee en su extremo N-terminal un péptido señal. El péptido señal hace posible la traslocación transmembrana desde el citosol al lumen del RE, proceso que está acompañado por la pérdida del péptido señal mediante un corte específico de una serin-proteasa localizada en el lado interno de la membrana (esquema Figura 4) (Müntz, 1998).

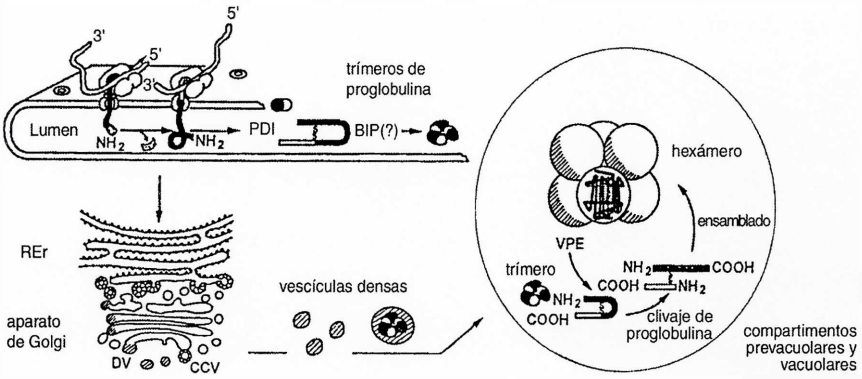


Figura 4 Diagrama de síntesis, transporte y almacenamiento de leguminas. Rer: retículo endoplásmico, PDI: proteína disulfuro isomerasa, BIP: posible intervenciíon de una chaperonina (proteína de unión) en el plegamiento y ensamblado de los propolipéptidos. VPE: enzima de procesamiento vacuolar. En los compartimientos de almacenamiento se puede apreciar un esquema de proteína ensamblada con una estructura cuaternaria como la propuesta por Plietz (ver texto). Müntz, 1998.

Las pro-globulinas originadas de este modo, son parcialmente plegadas, ensamblándose en trímeros en el lumen del retículo endoplásmico, aquí también se lleva a cabo la formación de enlaces disulfuro. Estos procesos son asistidos por distintas proteínas que residen en el retículo endoplásmico denominadas chaperonas moleculares. Entre ellas encontramos a las proteínas de unión (BiP, "binding proteins") y a la proteína disulfuro isomerasa (PDI). Las primeras facilitan el plegado uniéndose transitoriamente al péptido naciente y previniendo de este modo, la formación de interacciones intermoleculares e intramoleculares incorrectas. La segunda cataliza la correcta formación de enlaces disulfuro.

Una vez que el trímero de vicilinas y leguminas ha sido formado, es transferido desde el RE al complejo de Golgi, mediante vesículas cubiertas de proteínas denominadas COP II (Phillipson y col., 2001 y Yang y col., 2005). Las vesículas anteriormente mencionadas se unen a la parte del complejo de Golgi denominada cis-Golgi dejando allí su carga, la que posteriormente es transportada a través de un mecanismo de cisternas hasta el trasn-Golgi. Durante este estadío, las vicilinas se glicosilan a través de la unión de un glicósido rico en manosa, mientras que la mayoría de las leguminas permanecen sin glicosilar con excepción de la perteneciente al lupino (Duranti y col., 1988; 1995).

La mayoría de las proteínas de reserva de semillas sufre algún tipo de procesamiento enzimático luego de haber sido transferidas a las vacuolas de almacenamiento de proteínas (VAPs). En algunas especies se ha observado el procesamiento enzimático de subunidades de vicilinas, sin embargo, la mayoría de las globulinas 7S no son atacadas

por enzimas específicas conservando su estructura trimérica en la forma madura. Es diferente lo que ocurre con las pro-leguminas. Al llegar a las vacuolas de almacenamiento (VAPs) como trímeros, las cadenas α (ácida) y β (básica) no sólo están unidas por un enlace peptídico, sino también por un enlace disulfuro. En esta instancia, las pro-globulinas 11S son atacadas por una enzima de procesamiento que corta el enlace peptídico entre las cadenas α y β. Luego del corte, se produce un cambio conformacional de modo que dos trímeros se ensamblan para formar un hexámero compacto siendo esta la estructura final que adquiere la legumina madura. La formación del hexámero protege a las leguminas del ataque de las enzimas que coexisten con ellas en los compartimentos de reserva y que son activadas durante la germinación (Shutov y col., 1996; Shutov y col., 2003).

La enzima que interviene en el procesamiento de las pro-leguminas, pertenece a las legumainas que tienen una estricta especificidad por Asn y Asp. El procesamiento de pro-leguminas, ha sido observado tanto en coníferas, como en Monocotiledóneas y Dicotiledóneas (Nielsen y col., 1995).

En las proteínas de almacenamiento 2S se ha observado un procesamiento similar según los resultados obtenidos por Hara-Nishimura y col. (1993).

Se han propuesto distintos modelos que describen el transporte de proteínas de reserva hacia su último destino antes de que comience la germinación. En el caso de las globulinas de reserva (7S y 11S) el más aceptado es el que propone el transporte a través de vesículas densas (VD) que se desprenden del complejo de Golgi (Vitale y Hinz, 2005; Robinson y col., 2005). Sin embargo, en zapallo se ha observado un transporte directo (evitando el paso por el complejo de Golgi) en vesículas denominadas PAC ("precursor-accumulating vesicles) (Hara-Nishimura y col., 1998).

1.2.3 La superfamilia de las prolaminas de reserva

Las prolaminas, constituyen el principal grupo de proteínas de reserva de los cereales y los miembros de la familia de gramíneas, incluyendo a las proteínas de todos los cereales pertenecientes a la tribu Triticeae: cebada, centeno y trigo y Panicoideae: maíz, sorgo y mijo (Shewry y col., 2002). Existen algunas excepciones como el arroz y la avena en los que las principales proteínas de reserva son globulinas tipo 11S (aunque también encontramos prolaminas en menor proporción). El grupo de las prolaminas ha sido uno de los más tempranamente estudiados, los primeros datos con los que se

cuentan datan de 1745 y fueron informados por Jacopo Beccari Profesor de la Universidad de Bologna (Beccari, 1745). Inicialmente, estas proteínas se definieron en base a su solubilidad en mezclas de etanol-agua y su alto contenido de prolina y glutamina.

Hoy en día, la definición de una superfamilia basada en el esqueleto de ocho cisteínas conservado entre las secuencias de la distintas proteínas (Kreis y col., 1985) ha permitido asociar a este grupo, además de las ya mencionadas prolaminas de cereales, otras proteínas de bajo peso molecular ricas en cisteínas y con una estructura tridimensional rica en alfa hélices (Shewry y Halford, 2002; Breiteneder y Radauer, 2004) incluyendo a las albúminas de reserva 2S de Dicotiledóneas (Shewry y Pandya, 1999), las proteínas no específicas transportadoras de lípidos (Douliez y col., 2000), los inhibidores de α-amilasa y de tripsina o de ambas (Carbonero y García-Olmedo,1999) y las denominadas puroindolinas (Douliez y col., 2000). Estas últimas se caracterizan por tener un dominio rico en triptofano y se encuentran específicamente en cereales siendo las que determinan la terneza de los granos. Algunas de estas prolaminas de bajo peso molecular ricas en cisteínas son alergénicas (Breiteneder y Radauer, 2004; Radauer y Breiteneder, 2007).

La mayoría de las prolaminas comparten dos características estructurales comunes: la primera es la presencia de dominios que adoptan diferentes estructuras uno de otro y que tendrían diferente origen, la segunda es la presencia de bloques de secuencias de aminoácidos (motivos) que se repiten o que están enriquecidos en residuos específicos como por ejemplo metionina. Estas características son las responsables de la alta proporción de glutamina, prolina y otros aminoácidos específicos en algunos grupos de prolaminas (Phe, Met, Gly, His) (Shewry y Halford, 2002)

De acuerdo a comparación de secuencia de aminoácidos y composición, es posible clasificar a las prolaminas que pertenecen a la tribu Triticeae (trigo, cebada y centeno) en tres diferentes categorías: prolaminas ricas en azufre, pobres en azufre y de alto peso molecular (HMW) (Miflin y col., 1983). Las prolaminas que pertenecen a esta tribu, son mezclas altamente polimórficas cuyos componentes tienen masas moleculares en un rango comprendido entre 30 y 90 kDa.

1.2.3.1 Prolaminas de cereales

1.2.3.1.1 Proteínas ricas en azufre

En todas las especies, este grupo de prolaminas es el mayoritario constituyendo entre el 70 y el 80 % del total de la fracción prolaminas. Poseen masas moleculares en un rango comprendido entre 30 y 55 kDa e incluye tanto componentes poliméricos (que poseen enlaces disulfuros intercatenarios) como monoméricos (con enlaces disulfuro intracatenarios) y pueden distinguirse al menos dos familias en cada especie: las B y γ-hordeinas de cebada, dos tipos de γ-secalinas de centeno y la α-gliadina, γ-gliadina y las subunidades de bajo peso molecular (LMW) de glutenina en trigo.

En la secuencia de aminoácidos se distinguen dos dominios separados, uno N-terminal que se caracteriza por tener secuencias repetidas y un dominio C-terminal de secuencias no repetidas (Shewry y col., 1995). El dominio repetitivo se caracteriza por tener varias repeticiones de uno o dos motivos peptídicos cortos ricos en prolina y glutamina, ésta estructura es la responsable de la alta proporción de estos dos residuos en la proteína total. El dominio C-terminal no repetitivo, contiene tres regiones denominadas A, B y C, que muestran similitud en la secuencia en todos los tipos. Este dominio además posee la mayoría o todos los residuos de cisteína conservados.

1.2.3.1.2 Proteínas pobres en azufre

Este grupo de prolaminas constituye aproximadamente entre un 10 y un 20 % de las prolaminas totales. Abarca a las C-hordeínas de cebada, ω-secalinas de centeno y de trigo (Kasarda y col., 1983). En todos los casos la secuencia de aminoácidos se caracteriza por ser una repetición de un motivo octapéptidico flanqueado por: en el extremo N-terminal una secuencia corta única de doce residuos y en el extremo C-terminal por una secuencia corta única de seis residuos en el caso de C-hordeínas o cuatro residuos en el caso de ω-secalinas. Este tipo de prolaminas carece de residuos de cisteínas y por lo tanto no puede formar polímeros. Contienen altos niveles de glutamina, prolina y fenilalanina. Se ha informado un rango de masas moleculares entre 30 y 80 kDa.

1.2.3.1.3 Proteínas de alto peso molecular

Son los componentes minoritarios, constituyendo aproximadamente el 10 % de la fracción de prolaminas totales en trigo, sus masas moleculares oscilan entre 65 y 90 kDa. En cuanto a su secuencia de aminoácidos, estas proteínas poseen un dominio central que se caracteriza por tener extensas secuencias repetidas que se basan en diferentes motivos peptídicos, flanqueado por un dominio N-terminal y uno C-terminal

no repetitivos (Shewry y col.,1999). La variación en la longitud del dominio repetitivo es la responsables de la variación en el tamaño molecular de las subunidades de HMW.

1.2.3.2 Proteínas de reserva 2S

Las proteínas de reserva 2S fueron definidas inicialmente en base a su coeficiente de sedimentación, están ampliamente distribuidas en las semillas de Dicotiledóneas.
Del mismo modo que para otras proteínas de reserva, las albúminas 2S muestran un alto nivel de polimorfismo, esto hace que se encuentren características bastante distintas en la estructura y propiedades entre las diferentes especies (Higgins y col., 1986; Anisimova y col., 1994; Shewry y col., 1995). De todos modos es posible definir ciertas características comunes a todas las proteínas que pertenecen a esta clase: son proteínas heterodiméricas que constan de dos cadenas polipéptidicas de 4 y 9 kDa que permanecen unidas por cuatro enlaces disulfuro (Shewry y col., 1995).
Las proteínas de reserva 2S son sintetizadas como un único precursor que es co-traduccionalmente transportado al interior del lumen del retículo endoplásmico. Luego de la formación de los cuatro enlaces disulfuro que involucran a los ocho residuos de cisteína conservados (característica que la clasifica dentro de la superfamilia de las prolaminas de reserva) la proteína plegada es transportada a vacuolas en donde es enzimáticamente procesada hasta alcanzar su estado maduro (Shewry y Pandya, 1999).

1.2.3.3 Síntesis, transporte y ensamblado de prolaminas

En el arroz, se acumulan dos tipos de proteínas de reserva, las glutelinas, con características similares a las de globulinas de leguminosas y las prolaminas.
De manera análoga a lo que ocurre en el transporte de globulinas de reserva, las glutelinas de arroz son transportadas desde el lumen del retículo endoplásmico a través del aparato de Golgi hasta las vacuolas de almacenamiento. En cambio, para las prolaminas se observa un mecanismo diferente. Estas proteínas son retenidas en el interior del lumen del retículo endoplásmico. Durante este período las prolaminas se unen a chaperonas moleculares como BiP, hasta formar grandes agregados que son expulsados directamente desde el retículo (Figura 5).
Las diferencias encontradas en la acumulación de las proteínas de reserva de arroz parecen ser facilitadas por un direccionamiento diferencial de sus ARNm hacia diferentes zonas del REr (Li y col., 1993).

De acuerdo a lo expuesto el endosperma de arroz tiene dos tipos diferentes de cuerpos proteicos, unos de origen vacuolar (conteniendo glutelinas) y otros derivados de RE (conteniendo prolaminas).

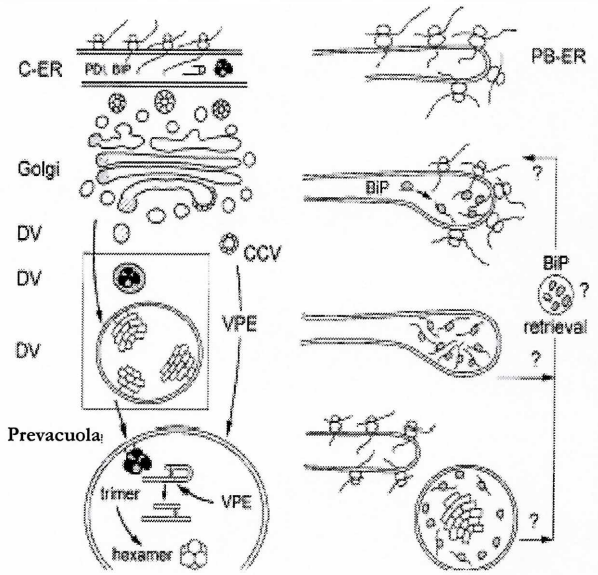


Figura 5. Esquema de síntesis y transporte de las glutelinas y prolaminas, al interior de los cuerpos proteicos de arroz. Segregación de los ARNm en diferentes regiones del RE. Gráfico extraído de Müntz 1998.

La situación se hace mas complicada para trigo, ya que las prolaminas se encuentran en los dos tipos de cuerpos proteicos, los derivados de retículo endoplásmico y los de origen vacuolar.

Como se observa en la Figura 6 las prolaminas de trigo son sintetizadas en el REr y posteriormente, pueden tomar dos rutas diferentes para su acumulación (Levanony y col., 1992). Una de las vías de transporte pasa a través del aparato de Golgi siguiendo el sistema clásico de endomembranas ya descrito. Mientras que en la otra, se evita el paso por el aparato de Golgi. Las proteínas de reserva ensambladas en el REr son polimerizadas en grandes estructuras que directamente se secretan desde el REr. Posteriormente estos cuerpos proteicos derivados de RE son secuestrados por una vacuola de almacenamiento mediante un sistema similar al de la autofagia. (Figura 6, tomada de Herman y Larkins, 1999).

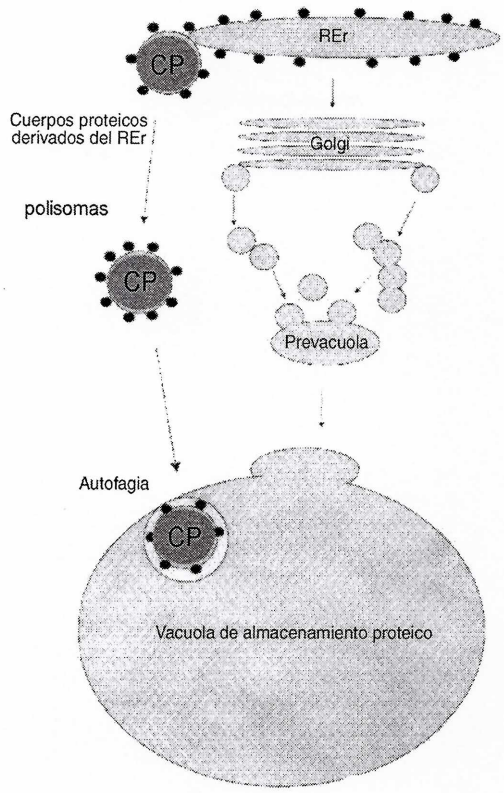


Figura 6. Diagrama conceptual de la ontogenia de los cuerpos proteicos (CP) y las vacuolas de almacenamiento proteico. Estas dos rutas alternativas se han observado para las proteínas del trigo. (Ver texto)

1.3 Proteínas de reserva de amaranto

1.3.1 Generalidades

Las proteínas del grano de amaranto han sido ampliamente estudiadas. Los diferentes grupos de trabajo abocados a su investigación y caracterización han desarrollado diversas metodologías para aislar a las proteínas desde la harina. Debido a las diferencias en las condiciones de extracción empleadas, se hace bastante dificultoso llevar a cabo una comparación de resultados. Con algunas diferencias, todos los autores coinciden en mencionar como fracciones más abundantes a las albúminas, globulinas y glutelinas (Tabla 2), mientras que las prolaminas son las proteínas que se encuentran en menor proporción (entre 1,5 y 11%).

En aquellos casos en los que hay una gran cantidad de albúminas el porcentaje obtenido para glutelinas es menor y viceversa. Konishi y col. (1992) asignaron esta variabilidad a la presencia de una fracción con características de extracción particulares que se

denominó albúmina-2. En nuestro laboratorio, teniendo en cuenta la estructura de esta fracción proteica, se la denominó globulina-p.

Tabla 2. Cantidad relativa de las diferentes fracciones proteicas de la semilla de amaranto.

Fracción proteica	% [(a)]	Referencia bibliográfica [(b)]
Albúminas	50 - 65 10 – 20 26	(1), (2) (3), (4) (5)
Globulinas	13 - 20 56	(1), (2), (3), (4) (5)
Glutelinas	7 - 8,5 42 – 56 18	(1), (2) (3), (4) (5)
Prolaminas	7,2 - 11 1,5 - 2,1	(1), (2) (3), (4)

(a) % expresado como g fracción proteica/100g proteína total. (b) (1) Abdi y Sahib, 1976; (2) Duarte-Correa y col., 1986; (3) Bressani y García-Vela, 1990; (4) Marcone, 2000; (5), datos de nuestro laboratorio.

1.3.2 Albúminas

Considerando la clasificación propuesta por Osborne en 1924, se denominan albúminas a aquellas proteínas que se extraen de la harina con agua. De acuerdo a los resultados obtenidos por Konishi y col. (1991) esta fracción se encontraría ubicada en el citoplasma de la célula, ya que es rápidamente degradada al someter a la harina a un tratamiento enzimático. La solubilidad de esta fracción proteica no se vio mayormente afectada por la presencia de diferentes cationes metálicos, se informaron valores por encima del 70 % de proteína soluble. Mediante cromatoenfoque se encontraron dos poblaciones cuyos pIs están comprendidos entre: 4,5-6,5 y 7-7,5.

Todos los autores coinciden en destacar como componentes principales de esta fracción, polipéptidos con una masa entre 10 y 40 kDa (Gorinstein y col., 1991b; Segura Nieto y col., 1992). Además han sido caracterizados polipéptidos con masas moleculares mayores, hasta 94 kDa aunque estos se encuentran en menor proporción (Konishi y col., 1991; Barba de la Rosa y col., 1992a; Segura-Nieto y col., 1994; Martínez y Añón, 1996). Todas las descripciones sobre esta fracción proteica, coinciden en señalar que sus polipéptidos no se encuentran unidos por enlaces disulfuro. La estabilidad térmica encontrada para esta fracción proteica es baja, siendo su temperatura de

desnaturalización de aproximadamente 60 °C, (Martínez y Añón, 1996; Gorinstein y col., 2001).

La composición de aminoácidos de las albúminas determinada por varios autores, presentó cierta variabilidad en los valores asignados a lisina (6,2-9,4% p/p) y aminoácidos azufrados (4,1-9,7% p/p) (Mora-Escobedo y col., 1990; Bressani y Gracía-Vela, 1990; Gorinstein y col., 1991b; Konishi y col., 1991; Segura- Nieto y col., 1992; Barba de la Rosa y col., 1992a). En general, los componentes mayoritarios asignados a esta fracción son los aminoácidos azufrados, glutamina/ácido glutámico, y asparagina; mientras que los que se encuentran en menor proporción son leucina y treonina.

A través de ultracentrifugación en gradiente de sacarosa, se separaron dos componentes para las albúminas, uno mayoritario con un coeficiente de sedimentación entre 1,4-2,0S y otro minoritario que sedimenta a 4,6S. Los polipéptidos que sedimentan en el pico de aproximadamente 1,7S son los de menor tamaño (entre 4 y 9 kDa) y son ricos en metionina (Segura Nieto y col., 1994), en tanto que las proteínas que sedimentan en el pico de 4,6S tienen un peso molecular de aproximadamente 60 kDa (Segura-Nieto y col., 1992).

Marcone y col., (1994a) purificó a la fracción albúminas de amaranto por cromatografía de exclusión molecular, los resultados obtenidos por estos autores difieren de todos los mencionados hasta el momento. Mediante SDS-PAGE determinó la presencia de polipéptidos de un único tamaño, 12 kDa. Cada uno de estos protómeros individuales, interaccionan de forma no covalente con otros 11 constituyendo un homo-oligómero de 133,4 kDa. Los mencionados autores determinaron para esta fracción proteica un pI de 7,5, un contenido de hoja plegada β elevado y un bajo contenido de estructura terciaria.

Raina y Datta (1992) clonaron el gen que codifica para una albúmina de amaranto de 35 kDa (AmA_1). La proteína codificada es rica en aminoácidos esenciales, por este motivo Chakraborty y col., (2000) expresaron este gen en papas aumentando de manera asombrosa la producción de tubérculos y su contenido de proteínas totales con un incremento de la mayoría de los aminoácidos esenciales.

Por otra parte, las excelentes propiedades funcionales que presenta la fracción albúminas de amaranto, han hecho posible su utilización en el mejoramiento de propiedades funcionales y reológicas de productos panificados (Silva-Sánchez y col., 2004).

1.3.3 Globulinas

La fracción globulinas es aquella que se extrae con soluciones salinas de fuerza iónica entre 0,5 M y 1,0 M y pH próximo a siete a partir del residuo que queda luego de la extracción de albúminas con agua. Para el amaranto se reconocen, al igual que en las leguminosas, dos tipos con diferente coeficiente de sedimentación, leguminas y vicilinas, la mayor parte de las globulinas de amaranto corresponden a las denominadas 11S y una fracción minoritaria a las 7S.

1.3.3.1 Globulina 7S

Es poco lo que se conoce acerca de la globulina 7S de amaranto. Aunque existen algunos estudios previos que hacen referencia a esta fracción proteica (Segura Nieto y col., 1992; Barba de la Rosa y col., 1992b; Martínez y col., 1997), fue Marcone (1999a) quien la purificó y estudió con más detalle. Esta globulina es un hetero-oligómero cuya masa molecular, determinada por cromatografía de exclusión molecular, es cercana a los 200 kDa. El punto isoeléctrico esta comprendido entre 5,2 y 5,8. El perfil electroforético de esta fracción determinó la existencia de un gran número de polipéptidos de masas moleculares comprendidas entre 90 y 15 kDa, que carecen de uniones disulfuro. Sólo unas pocas bandas son compartidas con globulina 11S. Las masas determinadas para los polipéptidos de globulina 7S son: 90,0; 70,9; 40,0; 37,4; 35,2; 31,2; 23,6 y 15,2 kDa que están de acuerdo con las determinados por Barba de la Rosa y col. 1992b y Martínez y col. 1997 para esta misma fracción.

El análisis de la estructura secundaria (Marcone, 1999a), reveló la presencia de una baja proporción de estructura de α-hélice (aproximadamente 12%), siendo más importante la estructura de hoja-β (aproximadamente 50%). De los estudios de estructura terciaria se puede inferir que los aminoácidos aromáticos presentes en globulina 7S, estarían próximos a la superficie y tendrían una alta movilidad.

El análisis térmico de la fracción de globulina entera (comprendiendo 7S y 11S) (Marcone, 1999a) evidenció dos transiciones endotérmicas, la menor a una T_D = 80,2°C, valor característico de globulina 7S. Un resultado análogo fue encontrado por Martínez y Añón (1996) y Martínez (1997).

Ensayos inmunoquímicos establecieron una homología del 30% entre 7S y 11S de amaranto revelando epitopes comunes de tipo estructurales (Marcone, 1999a).

1.3.3.2 Globulina 11S

Dentro de la fracción globulinas, la globulina 11S es la que se encuentra en mayor proporción. En uno de los primeros ensayos enfocados a la caracterización de esta fracción (Konishi y col., 1985) se informó la presencia de un 81% de globulina 11S en el extracto crudo de globulinas. En coincidencia con este resultado, Marcone y Yada (1991 y 1998) encontraron un porcentaje similar al analizar siete líneas de amaranto genéticamente diferentes.

En estado nativo, la globulina 11S forma un hetero-oligómero. La determinación de su masa por cromatografía de exclusión molecular, ha arrojado valores muy diferentes que van desde 440 hasta 166 kDa (Konishi y col., 1985, Barba de la Rosa y col., 1992b). Otros grupos de investigación encontraron valores de aproximadamente 300 kDa (Segura Nieto y col., 1994 y Martínez y col., 1997). Según informaran Marcone y Yada (1998) existe cierta diversidad en la masa molecular de la globulina 11S extraída de amarantos pertenecientes a diferentes líneas genéticas, estos autores encontraron masas moleculares comprendidas entre 237 y 381 kDa. A pesar de la variabilidad de datos obtenidos, todos ellos excepto uno, están en el rango de masas característico para las globulinas tipo 11S según lo determinado por Derbyshire y col. (1976). Estas discrepancias, estarían asociadas a los diferentes modos de extracción y purificación empleados por los autores para obtener esta fracción proteica.

También se observó una importante variabilidad en los datos referidos a la composición polipeptídica que ha sido informada por los distintos grupos de trabajo abocados al estudio de esta fracción proteica. Los resultados encontrados se resumen en la Tabla 3.

Los polipéptidos de los grupos II y III se encuentran principalmente cuando la globulina 11S es tratada con un agente reductor como 2-mercaptoetanol (2ME); mientras que los polipéptidos pertenecientes al grupo I han sido descritos en condiciones no reductoras. En consecuencia, se ha propuesto que, al igual que otras globulinas 11S, estos polipéptidos están formados por polipéptidos más pequeños (grupos II, III y IV) unidos por enlaces disulfuro.

Tabla 3. Masas moleculares de los polipéptidos de la fracción globulinas.

SDS-PAGE sin 2ME					*SDS-PAGE con 2ME*				
Grupos					*Grupos*				
I			**II**	**III**	**I**	**II**	**III**	**IV**	*Referencia*
75,5	46,5		37,5-31,5	20-14	67	37,5-31,5	26,5-20,5	14,5	(1), (2)
58	52	38	34-32	25		33-32	24-23		(3)
	56-52	39,6				36-31	24-19		(4)

(1) Marcone y Yada (1991); (2) Marcone y Yada (1992); (3) Barba de la Rosa y col. (1992b); (4) Martínez y col. (1997).

El análisis mediante isoelectroenfoque de la fracción globulinas reveló que los polipéptidos pertenecientes a los grupos II y III tienen un comportamiento equivalente al descrito para los polipéptidos ácidos y básicos que caracterizan a las globulinas tipo 11S (Segura-Nieto y col., 1992).

Gorinstein y col. (1991b) describieron a la globulina 11S como formada por polipéptidos mayoritarios de masas moleculares entre 18 y 14 kDa. La abundancia de polipéptidos de bajo peso molecular y la ausencia de polipéptidos de alto peso molecular podría deberse, al menos en parte, al procedimiento de extracción utilizado.

De un modo semejante a lo que ocurre en otras globulinas tipo 11S, se han detectado en amaranto, una pequeña proporción de agregados de masa molecular mayor a la informada para las moléculas de globulina 11S en estado nativo. Estos agregados están estabilizados por uniones disulfuro (Marcone y Yada, 1991 y 1998; Martínez y col., 1997).

Los resultados obtenidos por Martínez y col. (1997); Marcone y Yada (1992); Barba de la Rosa y col. (1992b); Konishi y col. (1985) coinciden en establecer para globulina 11S de amaranto un coeficiente de sedimentación entre 11 y 13S según ensayos realizados en gradiente de sacarosa.

La composición de aminoácidos del extracto crudo de globulinas que comprende tanto a 7S como a 11S, fue determinada por varios autores (Konishi y col., 1985; Gorinstein y col., 1991b; Barba de la Rosa y col., 1992), todos ellos coinciden en destacar a glutamina/ácido glutámico y asparagina/ácido aspártico como los aminoácidos

principales encontrados en esta fracción. La presencia de valores altos para estos aminoácidos parece ser una característica común en proteínas de reserva de semillas (Marcone y Yada, 1991). En términos de aminoácidos esenciales, las globulinas de amaranto poseen una proporción de aminoácidos azufrados y de lisina superior a la de las globulinas de avena y soja (Segura-Nieto y col., 1994). Marcone y Yada (1991 y 1998) fueron los únicos autores en informar valores para la composición de aminoácidos de la fracción globulina 11S parcialmente purificada. Debido a que esta fracción globulínica es la mayoritaria, en líneas generales la composición aminoacídica de la fracción cruda y purificada es coincidente.

Marcone y col. (1994b), mediante microscopía electrónica, obtuvieron información de la estructura cuaternaria de la globulina 11S que apoyó el modelo consistente en un dodecámero con sus subunidades organizadas en dos anillos hexagonales ubicados paralelamente resultando en un cilindro oblato con un orificio central.

Los resultados de calorimetría diferencial de barrido (CDB), determinados por varios autores (Marcone y col., 1998b; Gorinstein y col., 1996a y Martínez y Añón, 1996) establecieron una estabilidad térmica elevada de las globulinas de amaranto. La Td es aproximadamente 95°C, este valor es comparable a los obtenidos para otras globulinas 11S como las de soja, avena o *phaseolus lunatus* (Chel-Guerrero y col., 2007; Scilingo y Añón, 1995 y Harwalkar y Ma, 1987). Sin embargo, el valor de la entalpía de desnaturalización (ΔH) encontrado para las globulinas de amaranto, entre 4,25 y 8 J/g, es mucho menor que la de las anteriores globulinas.

Al analizar siete líneas genéticamente diferentes de amaranto mediante dicroísmo circular, Marcone y Yada (1998), determinaron que la estructura secundaria de la globulina 11S contenía un porcentaje de hoja beta plegada que variaba entre 35 y 71 %, con aproximadamente un 7% de α-hélice y 18% de giros β. Estos resultados están de acuerdo con los de la fracción globulinas de varias Dicotiledóneas y Monocotiledóneas (Marcone y col., 1998b). En un estudio previo realizado por Gorinstein y col. (1996b), se encontraron valores contrarios a los anteriores. Estos autores informaron un 31,4% de estructura en α hélice y un 41,6% de estructura desordenada siendo el resto, hoja plegada β.

Barba de la Rosa y col. (1996) extrajeron y purificaron la globulina 11S de amaranto mediante cromatografía de exclusión molecular y ultracentrifugación. Esta proteína, con una masa molecular aproximada de 398 kDa está formada por polipéptidos de 59, 36 y

24 kDa. El polipéptido de 59 kDa, que correspondería a una proglobulina inmadura, fue secuenciado en su extremo N-terminal y a partir de estos datos se clonó el gen que codifica para este polipéptido. La secuencia de aminoácidos deducida mostró un alto porcentaje de homología de secuencia con proteínas tipo 11S. Esto permitió confirmar que, de manera similar a lo que se ha informado para otras globulinas tipo 11S, la globulina de amaranto es sintetizada como un precursor.

En la secuencia determinada para el precursor, se encontraron siete residuos de cisteína dos de los cuales, uno en la posición 112 y otro en la posición 295 (posición 7 del polipéptido básico) estarían involucrados en la formación de un enlace disulfuro intercatenario entre los polipéptidos ácido y básico, mientras que los residuos de cisteína ubicados en la subunidad ácida en la posición 36 y 69 estarían formando un enlace intracatenario. A partir de esta secuencia se determinó un posible sitio de corte para el polipéptido precursor cuya ruptura genera un polipéptido ácido de 265 aminoácidos (pI = 5,79; MM = 35,4 kDa) y un polipéptido básico de 188 aminoácidos (pI = 9,22; MM = 23,95 kDa).

Debido al alto valor nutricional que se ha encontrado para la globulina 11S de amaranto (FAO/WHO, 1973; Barba de la Rosa y col., 1996) y a la posibilidad de contar con la secuencia del gen que codifica para esta proteína, varios autores (Rascón-Cruz y col., 2004; Sinagawa-García y col., 2004) han expresado este gen en plantas transgénicas de maíz con el fin de mejorar la calidad nutricional de sus proteínas, obteniendo un aumento en cantidad y calidad, sin registrarse casos de alergias. Previamente a estos estudios la globulina 11S de amaranto había sido expresada exitosamente en *Escherichia coli* encontrándose propiedades electroforéticas, inmunoquímicas y de superficie similares a las de la proteína nativa (Osuna-Castro y col., 2000). Por otra parte, Medina-Godoy y col. (2004) mediante modificaciones lograron que la globulina 11S se expresara en *E coli* en una forma soluble capaz de ensamblarse correctamente en trímeros. Estos trímeros fueron procesados correctamente al ser tratados "in vitro" por la enzima de procesamiento. Valdez-Ortiz y col. (2005) purificaron y caracterizaron la globulina 11S modificada con histidina expresada en tabaco transgénico encontrando un correcto procesamiento, ensamblado y acumulación de esta proteína como hexámero.

Por otra parte, Medina-Godoy y col. (2006) demostraron que la asociación de una secuencia C-terminal de retención a Retículo Endoplásmico (KDEL), mejora la producción de globulina 11S de amaranto cuando ésta es expresada en *Pichia Pastoris.*

Estudios recientes realizados por Petruccelli y col. (2007) determinaron que dos secuencias cortas provenientes de globulina 11S de amaranto son suficientes para dirigir a GFP a vacuolas de células de *Arabidopsis*. De acuerdo a la estructura tridimensional de las globulinas 7S y 11S las secuencias internas seleccionadas corresponden a la región de alfa hélices que participa en la formación del trímero y que es conservada entre estas familias, demostrándose por primera vez el rol de una secuencia corta conservada entre las globulinas 7S y 11S en el direccionamiento vacuolar.

1.3.4 Globulina-p

Konshi y col. (1991) describieron una fracción proteica que era extraída con agua en una etapa posterior a la extracción de globulinas y albúminas-1. Estos autores denominaron a la nueva fracción proteica albúminas-2. Según los datos informados por Konishi y col. (1991), las albúminas-2 se disuelven en agua o en soluciones salinas de baja fuerza iónica (concentración de NaCl menor a 0,1 N). Su punto isoeléctrico aparente está entre 5 y 6 unidades de pH. A diferencia de las albúminas-1, esta fracción está formada por 5 polipéptidos de masas moleculares: 56, 36, 31, 26 y 22 kDa. Las masas de los polipéptidos que constituyen a la fracción albúmina-2 son similares a las de los polipéptidos que forman la fracción globulinas excepto por la abundante cantidad del polipéptido de 56 kDa. El aminoácido más importante que integra a las albúminas-2 es el ácido glutámico/glutamina (Glx). Al comparar ambas fracciones de albúminas, las albúminas-2 son más ricas en prolina, serina, arginina, histidina y fenilalanina y menos en lisina, metionina, cisteína y valina. La resistencia al ataque de pronasa que ofrece la fracción albúmina-2, a diferencia de lo que se observa para albúmina-1 cuando la harina es tratada con dicha enzima, permitió sugerir a Konishi y col. (1991) que la primera se encontraría resguardada en cuerpos proteicos, dato que fuera confirmado posteriormente por Nakamura y col. (1998).

En nuestro laboratorio, se aisló una fracción proteica con características de extracción similares a las descritas por Konishi y col. (1991) para la fracción albúmina-2. El perfil de polipéptidos obtenido en condiciones no reductoras fue similar al de la globulina 11S (Martínez, 1997 y Martínez y col., 1997) y al analizarla en presencia de un agente reductor, se observó un perfil equivalente al informado para albúminas-2 (Konishi y col., 1991).

Una particularidad de esta proteína es su capacidad para formar y estabilizar agregados de alto peso molecular (600-1500 kDa, Casellani, 2000), sólo una pequeña proporción de sus moléculas está libre, para las cuales se ha determinado una masa molecular próxima a 300 kDa (Martínez, 1997; Martínez y col., 1997, Castellani, 2000) siendo esta otra característica que comparte con globulina 11S.

Evaluando todas estas características se propuso para esta fracción la denominación de globulina polimerizada (globulina-p o gp).

Se ha determinado que los agregados característicos de globulina-p se encuentran parcialmente estabilizados por enlaces disulfuro (Martínez, 1997). Al aislar esta proteína en presencia de bajas concentraciones de un agente reductor (20 mM, 2-Mercaptoetanol) y analizarla por cromatografía de exclusión molecular utilizando la misma concentración del agente reductor, se observó una disminución en la cantidad de agregados (Martínez, 1997).

La globulina-p parcialmente purificada presentó una elevada estabilidad térmica, con una Td = 94,0 °C (Martínez y col., 1997). Al analizar la respuesta de esta fracción proteica cuando es sometida a diferentes condiciones de pH (Castellani y col., 1998) se encontró una región de máxima estabilidad térmica en una zona de pHs cercana a la neutralidad (pH 6,0-8,0). Mientras que a pHs extremos, la fracción globulina-p se encuentra desnaturalizada, siendo esta desnaturalización más importante en la zona ácida.

Utilizando un método de extracción secuencial alternativo Chen y Paredes-López (1997), obtuvieron una fracción proteica que clasificaron como globulina 11S. Sin embargo, las propiedades fisicoquímicas y la composición polipeptídica mostraron rasgos en común con globulina-p (Romero-Zepeda y Paredes-Lopez, 1996).

Gorinstein y col. (2001) analizaron a esta fracción proteica no purificada mediante fluorescencia intrínseca (FI) y dicroísmo circular (DC) en condiciones nativas, asignándole una mayor exposición de los residuos de triptofano en la superficie y una mayor hidrofobicidad superficial en comparación con otras globulinas. En cuanto a la estructura secundaria de globulina-p determinada por DC, se encontró aproximadamente un 15% de α hélice, 25% de hoja β y el resto correspondió a estructura sin periodicidad.

Cuando globulina-p fue tratada con papaína (Castellani y col., 2000) los polipéptidos con masa molecular 56 kDa (M) y los polipéptidos ácidos (A) fueron atacados en mayor medida por la enzima mientras que las subunidades básicas conservaron el mismo

tamaño. Estos resultados permitieron sugerir a los autores que tanto A como M estarían localizados en la superficie de la molécula.

Estudios inmunoquímicos realizados sobre esta fracción proteica por Aphalo y col. (2004), revelaron que la moléculas de globulina-p y sus agregados tienen superficies reactivas similares. Por otra parte el polipéptido de 56 kDa fue el de mayor reactividad, seguido por los polipéptidos ácidos. Globulina-p presentó reacción cruzada con las restantes fracciones de amaranto, siendo la globulina 11S la más reactiva. También se observó reacción cruzada con globulinas de quinoa y en menor grado con globulinas de girasol y arroz.

Estudios recientes realizados por Molina y col. (2008) demostraron que el polipéptido característico de globulina-p de 56 kDa se trata de una subunidad no procesada aunque posee el sitio de corte característico asparagina-glicina presente en las globulinas 11S y ha sido demostrado que existe actividad de la enzima de procesamiento vacuolar (VPE) tanto en semillas de amaranto en desarrollo como en semillas maduras. De este modo, los resultados obtenidos por estos autores, no han podido esclarecer cual es la causa de la presencia del precursor no procesado en las semillas maduras.

1.3.5 Glutelinas

Las glutelinas constituyen la fracción proteica más insoluble obtenida a partir de harina de semillas, sólo son extraídas en condiciones drásticas de pH. Generalmente se utiliza buffer borato de pH 10 y en algunos casos se agregan detergentes y/o agentes reductores para aumentar el rendimiento de extracción (Segura Nieto y col., 1994; Paredes-López y col., 1993). También se utiliza NaOH 0,1N para la extracción de esta fracción con el que se obtiene un rendimiento mayor (Abugoch y col., 2003).

Existe una importante variabilidad en los datos informados por distintos autores para el rendimiento de extracción de esta fracción abarcando un rango entre 7 y 56 %.

En cuanto a su composición aminoacídica, el ácido glutámico/glutamina es el aminoácido más abundante, le siguen arginina, leucina, fenilalanina y tirosina (Bressani y García Vela, 1990).

Se ha determinado su composición polipeptídica en varias condiciones (Vasco-Méndez y Paredes-López, 1995; Segura-Nieto y col., 1994, Martínez y col., 1997). Su perfil electroforético es similar al descrito para globulina-p de amaranto (Martínez y col., 1997, Abugoch y col., 2003). En condiciones no reductoras las principales bandas

detectadas para esta fracción se encuentran entre 50-67, 30-38 y 20-28 kDa, además de algunas de mayor masa molecular que no entran en el gel de separación.

En presencia de un agente reductor como 2ME, se encontraron polipéptidos de masa molecular similar a los de globulinas, se detectó una banda entre 54-60 kDa, y entre dos y tres bandas en las regiones de 35-38 kDa y 24-26 kDa, junto con una baja proporción de polipéptidos agregados (Gorinstein y col., 1998 y 1991b; Barba de la Rosa y col., 1992a, Martínez y col., 1997). La disminución de los agregados de alta masa molecular al pasar de condiciones no reductoras a condiciones reductoras indicó que estaban formados y estabilizados por uniones disulfuros (Abugoch y col., 2003).

Abugoch y col. (2003), encontraron cierto grado de plegamiento para las glutelinas de amaranto cuando eran extraídas con buffer borato (pH=10), mientras que están completamente desnaturalizadas cuando se extraen con NaOH 0,1N.

Estudios inmunoquímicos han determinado la existencia de homología entre las subunidades ácidas de globulinas y los polipéptidos de 32 y 60 kDa de glutelinas de amaranto. Además se determinó cierto grado de homología entre estos polipéptidos y los de globulina de avena y glutelina de arroz (Vasco-Méndez y Paredes-López, 1995).

Por otra parte, Aphalo y col. (2004) describieron cierto grado de homología entre la fracción globulina-p y glutelinas de amaranto.

1.3.6 Prolaminas

La fracción prolaminas comprende a las proteínas solubles en soluciones alcohólicas, en general se utiliza una concentración de 70% de isopropanol para su extracción. Gorinstein y col. (1991a) analizaron diferentes condiciones de extracción, encontrando que el rendimiento máximo de prolaminas (2,1%) se obtiene usando 55% de isopropanol y 5% de 2-mercaptoetanol. Aunque Bressani y García-Vela (1990), informaron un rendimiento de 7,3% utilizando la misma concentración de alcohol sin el agente reductor. El valor máximo informado para el rendimiento de esta fracción fue de 11% (Duarte-Correa y col., 1986). A pesar de las diferencias, todos los autores encuentran a esta fracción como la minoritaria.

Existen también algunas discrepancias en cuanto a las masas de los polipéptidos principales que forman a las prolaminas de amaranto. Gorinstein y col. (1991a) informaron que las bandas mayoritarias tienen una masa entre 10 y 14 kDa y en menor proporción una de 20 kDa. Segura-Nieto y col. (1992) encontraron tres bandas

principales a 16, 18 y 22 kDa y dos bandas menores debajo de 12 kDa. Por otra parte Barba de la Rosa y col. (1992a) informaron que en ausencia de un agente reductor, se observan bandas de alto peso molecular que en presencia del agente reductor, se transforman en 67, 34 y 22 kDa. Estas diferencias podrían explicarse en parte por los cambios que sufren las prolaminas de acuerdo al solvente empleado para el desgrasado de la harina (Segura-Nieto y col., 1994) y a las condiciones que se utilizan para su extracción.

Dentro de los aminoácidos esenciales, la treonina y la leucina (Segura Nieto y col., 1992) son los que se encuentran en mayor proporción en estas prolaminas, al igual que los aminoácidos azufrados y la fenilalanina (Barba de la Rosa y col., 1992a).

Las características estructurales e inmunoquímicas de las prolaminas de amaranto están alejadas de las gliadinas de trigo, cebada y centeno, por lo que no presentan contraindicación en pacientes celíacos.

1.3.7 Proteínas no de reserva

Dentro de la fracción albúminas, se han caracterizado algunas proteínas con diferente actividad biológica. Entre estas últimas, se encuentra un inhibidor de tripsina y uno de α-amilasa que han sido caracterizados y secuenciados por Valdés-Rodríguez y col. (1993) y Lu y col. (1999) respectivamente. El inhibidor de tripsina, es un polipéptido de 7,4 kDa y pI 7,5 con elevados contenidos de valina, arginina y ácido glutámico y no contiene metionina. En cuanto al inhibidor de α-amilasa (AAI), es una proteína de sólo 32 aminoácidos. Se determinó su estructura mediante espectroscopía de resonancia magnética nuclear de protones H^1 NMR. Su estructura consta de tres hojas β antiparalelas unidas por enlaces disulfuro siguiendo un esquema característico para estos inhibidores.

Ramírez-Medeles y col. (2003) determinaron la secuencia de una proteína no específica transportadora de lípidos de *A. hypochondriacus*. Las proteínas no específicas transportadoras de lípidos pertenecen a la superfamilia de las prolaminas, su función biológica aún no ha sido dilucidada aunque se cree que jugarían un rol importante en la defensa de las plantas frente a condiciones de stress.

De acuerdo a lo anterior las características estructurales de las proteínas de amaranto son muy similares a las de las proteínas de leguminosas, sin embargo presentan

algunas particularidades, una de ellas es la mayor proporción de albúminas y la presencia en cantidades importantes de la fracción globulina-p. Esta mayor diversidad estructural permite proponerlas como un ingrediente alimentario pasible de desarrollar diversas propiedades funcionales, que, sumado a su alta calidad nutricional, las presenta como una alternativa interesante para la industria alimentaria.

Por otro lado la existencia de dos globulinas, globulina-11S y globulina-p, con características estructurales similares y diferentes propiedades fisicoquímicas, más allá de permitir una mayor versatilidad funcional, nos plantean interrogantes que van desde las causas estructurales que originan los diferentes comportamientos fisicoquímicos, hasta la posible existencia de diferencias en su síntesis o en su participación en el proceso de germinación.

Objetivos

2 Objetivos

El estudio de las propiedades estructurales de las proteínas de amaranto contribuye no sólo al conocimiento básico sino que sirve de base para desarrollos tecnológicos en los que se considera su funcionalidad en alimentos. Dado que las globulinas conforman una de sus fracciones mayoritarias y presentan una singular variedad de propiedades fisicoquímicas, el estudio comparativo de las distintas globulinas permitirá conocer las bases estructurales de estas diferencias y aportará al análisis de sus mecanismos de síntesis y deposición.

En base a lo anterior es **objetivo general** de este trabajo de tesis,

Aportar al mayor conocimiento de la fracción proteica denominada globulina-p y compararla con la globulina 11S

Objetivos particulares

- Obtener más información acerca de las características estructurales y fisicoquímicas de las fracciones globulina-p y globulina 11S de amaranto,
- Contribuir a un conocimiento más acabado de las interacciones que estabilizan la estructura de globulina-p y de globulina 11S,
- Aislar, caracterizar y comparar a los diferentes polipéptidos que forman parte de la fracción globulina-p con aquellos que pertenecen a la fracción globulina11S.

Materiales y Métodos

3 Materiales y Métodos

3.1 Semillas y harina

Las semillas de *Amaranthus hypochondriacus*, variedad Mercado, fueron cultivadas en en la estación experimental del INTA Anguil, Provincia de La Pampa. Los ensayos llevados a cabo en esta tesis, fueron realizados con harina, que fue preparada en la cátedra de Cerealicultura de la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales de la Universidad Nacional de La Plata. Para ello, las semillas enteras se molieron en un molino Udy, de 1 mm de mesh y se tamizaron a través de un cedazo de 0,092 mm de mesh. Antes de su utilización, la harina, fue desgrasada con n-hexano al 10% p/v con agitación continua durante 24 h a 4 °C. Luego del tratamiento con hexano, se filtró a temperatura ambiente y se secó en las mismas condiciones. La harina desgrasada se almacenó a 0 °C.

3.2 Extracción de proteínas a partir de harina desgrasada

A partir de la harina desgrasada se realizó una extracción secuencial de proteínas utilizando una relación harina/solvente de extracción 1/10 (g/ml). Con cada uno de los solventes utilizados se realizaron tres extracciones, la primera de 60 min y las dos siguientes de 30 min. Las distintas fracciones proteicas extraídas con cada uno de los solventes utilizados se detallan a continuación.

3.2.1 Albúminas

Se puso en contacto la harina desgrasada con agua destilada y se realizaron 3 extracciones secuenciales como se mencionó anteriormente.

3.2.2 Globulina 11S

La fracción globulina 11S sin purificar fue extraída de acuerdo a lo descrito por Martínez y col. (1997). El residuo de harina que queda luego de la extracción de albúminas fue tratado con buffer A (K_2HPO_4 32,5 mM, KH_2PO_4 2,6 mM (pH 7,5) conteniendo NaCl 0,4 M). Luego de 60 min de agitar la suspensión se centrifugó a 9.000 x g durante 20 min a 20 °C. Se separó el sobrenadante (S1) y el residuo de la harina se resuspendió nuevamente en buffer A (30 min), luego de repetir la

centrifugación anterior se obtuvo el segundo sobrenadante (S2) y repitiéndose este último paso el tercero (S3). Se reunieron los sobrenadantes S1, S2 y S3 y la proteína contenida en los mismos fue precipitada a pH = 6,0 con HCl 2N (precipitación isoeléctrica). El precipitado proteico se separó por centrifugación a 9.000 x g durante 20 min a 4 °C. El residuo obtenido luego de la centrifugación, se resuspendió en agua destilada y se neutralizó con NaOH 0,1N ajustando el pH a 7,0. La suspensión obtenida se congeló a -20 °C y se liofilizó en un equipo Heto modelo FD4.

3.2.3 Globulina-p (gp)

Los pasos seguidos para la obtención de esta fracción fueron equivalentes a los descritos para la fracción globulina. En este caso, la extracción se llevo a cabo a partir del residuo que queda luego de la obtención de globulina utilizando agua destilada como solvente de extracción. El pH de precipitación isoeléctrica fue 6,0. El tratamiento posterior fue equivalente al realizado sobre la fracción albúmina.

3.3 Purificación de fracciones proteicas

La globulina 11S (g11S) y los componentes de globulina-p: moléculas (UM) de 280 kDa y polímeros (P) de masa molecular mayor que 500 kDa fueron preparados por cromatografía de exclusión molecular preparativa.

3.3.1 Cromatografía de exclusión molecular preparativa

3.3.1.1 Preparación de las muestras

Para cada cromatografía se suspendieron 100 mg de la fracción proteica estudiada en 5 ml del buffer correspondiente con NaN_3 0,02% p/v. Las muestras se mantuvieron durante 1 h con agitación intermitente a temperatura ambiente en un agitador Thermolyne Maxi Mix, y luego se centrifugaron a 20.000 x g y 20 °C durante 20 min en una microcentrífuga (IEC, Centra MP4R). Luego fueron sembradas manualmente en la columna.

3.3.1.2 Desarrollo

Para realizar las cromatografías preparativas de exclusión molecular se utilizó una columna (2,5 cm x 90 cm) rellena con Sephacryl TM S-300 HR (Pharmacia, Upsala Suecia) con un rango de fraccionamiento de 10.000–1.500.000. Fue empacada y equilibrada con tres veces el volumen de su lecho, utilizando el buffer correspondiente con NaN_3 0,02% p/v a una velocidad de flujo de 2,5 ml/min mediante el uso de una bomba peristáltica Gilson Minipuls 2 a temperatura ambiente.

Las cromatografías se desarrollaron a 0,58 ml/min y temperatura ambiente. Las fracciones fueron colectadas por un colector Buchler (modelo Fractomet e Alpha 400) regulado por tiempo (5,2 min/fracción), el volumen de las mismas fue de 3,0 ml. Posteriormente, sobre cada tubo recogido de determinó la DO_{280nm} en un espectrofotómetro Beckman DU 650.

Algunas fracciones obtenidas fueron diafiltradas con agua destilada (20 volúmenes) utilizando una celda de ultrafiltración AMICON 8020 (Amicon Inc.), con una membrana de 10.000 Da de tamaño de poro (Amicon, YM10) y luego liofilizadas. Otras fueron diafiltradas con el buffer adecuado para realizar otras determinaciones.

3.4 Determinación de la concentración proteica

Método de Lowry

El contenido proteico fue determinado por el método de Lowry (Lowry y col 1951): para la realización de la curva de calibración se utilizó una dilución 1/10 de una solución 10 mg/ml de albúmina de suero bovino (Sigma Chem. Co, St. Louis, MO, Precipitación alcohólica. Fracción V) disuelta en el mismo buffer que la muestra. Las lecturas de las distintas fracciones proteicas se realizaron en un espectrofotómetro Beckman DU 650, a una longitud de onda de 750 nm.

3.5 Solubilidad

La determinación de solubilidad tanto de las muestras crudas como de las purificadas, se llevó a cabo dispersando la proteína liofilizada en los buffer indicados en cada caso durante 1 h a temperatura ambiente (concentración final de 0,1% p/v). Se utilizó un agitador rotativo a velocidad media. Cada 15 min, se realizó una agitación más intensa en un agitador Termolyne Maxi Max. Las muestras fueron luego centrifugadas a 10.000

x g durante 30 min a 15 °C. El contenido de proteínas en el sobrenadante fue cuantificado por el método de Lowry (ver item 3.4, Materiales y Métodos). La solubilidad se expresó como % de la cantidad de proteína soluble en relación a la cantidad de proteína inicial en la muestra.

3.6 Electroforesis

3.6.1 Reactivos generales

Buffer de electrodo: hidroximetil aminometano-HCl (Tris-HCl) 0,025 M, glicina 0,192 M (pH 8,3), con o sin el agregado de dodecil sulfato de sodio (SDS) 0,1% p/v, para electroforesis desnaturalizante o no desnaturalizante respectivamente.

Buffer de gel separador: Tris-HCl 0,375 M (pH 8,8) con o sin el agregado de SDS 0,1% p/v. N´, N´, N´, N´, tetrametiletilendiamina (TEMED) 0,1% v/v.

Buffer de muestra:

- ***SDS-PAGE:*** Tris-HCl 0,185 M (pH 8,8), glicerol 12,5% v/v, SDS 2,0% p/v, y azul de bromofenol 0,05% p/v con o sin el agregado de 2-mercaptoetanol (2ME) 5% v/v, para obtener condiciones reductoras o no reductoras, respectivamente.
- ***ND-PAGE (no desnaturalizante):*** Tris-HCl 0,185 M (pH 8,8), glicerol 12,5% v/v y azul de bromofenol 0,05% p/v.
- ***UREA-PAGE:*** Tris-HCl 0,185 M (pH 8,8), urea 7 M, tiourea 2 M y azul de bromofenol 0,05% p/v.

Buffer de tratamiento para electroforesis bidimensional: Tris-HCl 0,0625 M (pH 6,8), SDS 0,1% p/v, sacarosa 20% p/v, con o sin el agregado de 2ME 0,2 M (Utsumi y col., 1984).

3.6.2 Preparación de las muestras

Las muestras se prepararon disolviendo la proteína liofilizada en buffer de muestra (10 mg/ml) o, en el caso de tener muestras en solución, agregando 3 volúmenes de las mismas a 1 volumen de buffer de muestra 4x. En las electroforesis en condiciones desnaturalizantes y reductoras las muestras fueron calentadas a 100 °C durante 1 min. Todas las muestras, antes de ser sembradas en el gel correspondiente, se centrifugaron a 12.000 x g durante 20 min a 20 °C en una microcentrífuga IEC (Centra MP4R, International Equipment Company), y los sobrenadantes se sembraron a razón de 20-30

μg de proteína/calle cuando se realizó una tinción con Coomasie Brilliant Blue R-250, o de 1-2 μg de proteína/calle cuando se realizó una tinción con nitrato de plata.

En algunos casos las muestras fueron tratadas con iodoacetamida para bloquear los residuos SH libres antes del agregado del agente desnaturalizante para evitar el intercambio sulfhidrilo-disulfuro. En ese caso, se procedió del siguiente modo: a 75 μl de las muestras disueltas en buffer B (2 mg/ml) se adicionaron 75 μl de una solución de iodoacetamida 200 mM, la mezcla anterior se incubó durante 30 min a 37 ° C en ausencia de luz, posteriormente, se adicionó el buffer de muestra correspondiente según el caso (con SDS o urea).

3.6.3 Desarrollo

Todas las electroforesis se realizaron en miniplacas con un equipo BIO-RAD, modelo Mini Protean II. Se utilizó el sistema de buffers descrito por Laemmli (1970), que se detalló previamente. Las corridas electroforéticas se llevaron a cabo a un voltaje constante de 200 V durante aproximadamente 1,5 h.

3.6.3.1 SDS-PAGE

Se utilizaron geles de poliacrilamida formados por un gel separador de concentración constante de acrilamida 12% p/v y un gel apilador en su parte superior (acrilamida 4% p/v).

Los patrones de masa molecular utilizadas para el cálculo de las masas de los polipéptidos: fosforilasa b (94 kDa); seroalbúmina bovina (67 kDa); ovoalbúmina (43 kDa); anhidrasa carbónica (30 kDa); inhibidor de tripsina (20,1 kDa) y α-lactoalbúmina (14,4 kDa), fueron adquiridos en GE-healthcare en un único vial.

Las proteínas patrón fueron solubilizadas en 200 μl de buffer de muestra desnaturalizante con 2ME y sometidas al mismo tratamiento que se aplicó a las muestras. Se construyeron curvas de calibración relacionando el factor de distancia de las distintas proteínas (Rf), con el logaritmo de su peso molecular. Los pesos moleculares de los polipéptidos son el resultado de tres determinaciones como mínimo.

$R_f = D_x/D_f$ (D_x: distancia recorrida por el polipéptido x y D_f: distancia recorrida por el frente de corrida).

3.6.3.2 SDS-PAGE + 2ME

Se realizó del mismo modo que la electroforesis desnaturalizante, con el agregado de 2-mercaptoetanol al buffer de muestra. Las proteínas patrones de masa molecular empleadas fueron las mismas.

3.6.3.3 ND-PAGE (electroforesis no desnaturalizante)

Para todas las electroforesis en estas condiciones se utilizaron geles de concentración constante de poliacrilamida 6% p/v.

3.6.3.4 Urea-PAGE

Para todas las electroforesis en estas condiciones se utilizaron geles de concentración constante de poliacrilamida 6% p/v. Se utilizó el mismo sistema buffer gel separador que para las electroforesis no desnaturalizantes con el agregado de urea 6 M, contemplando el aumento de volumen que produce este compuesto en las soluciones.

3.6.3.5 Electroforesis bidimensionales

Luego de correr la primera dimensión (geles de 1 mm de espesor) se cortó la porción de gel correspondiente a dos calles con la proteína a analizar y se trató con 30 ml de buffer de tratamiento (descrito en item 3.6.1, Materiales y Métodos), a 55 °C durante 30 min con dos cambios de la solución. La porción de gel tratada se colocó sobre el gel de la segunda dimensión de 1,5 mm de espesor. En este mismo gel, en una calle aparte y como referencia, se sembró la mezcla de proteínas patrón de masa molecular. La electroforesis se desarrolló a un voltaje constante de 200V durante aproximadamente 1,5 h.

Se realizaron las siguientes electroforesis bidimensionales:

- SDS-PAGE → SDS-PAGE + 2ME
- Urea-PAGE → SDS-PAGE,
- Urea-PAGE → SDS-PAGE + 2ME,
- Urea-PAGE + 2ME → SDS-PAGE,
- Las electroforesis IEF→SDS-PAGE están descritas en 3.6.5.

3.6.4 Coloración

Los geles fueron fijados y teñidos al mismo tiempo con Coomasie Brilliant Blue R-250 al 0,192% p/v en agua/metanol/ácido acético (10:10:4) durante 12 h y desteñidos con etanol 25% p/v y ácido acético 10% p/v a temperatura ambiente. Cuando la cantidad de proteína no fue la suficiente para ser detectada con Coomassie Brilliant Blue R-250, se realizó una tinción con plata (Blum y col., 1987). La tinción empleada se indica en cada figura.

3.6.5 Electroforesis bidimensional (IEF/SDS-PAGE)

Las fracciones purificadas de globulina (g11S) y globulina-p (P y UM) provenientes de harina desgrasada fueron analizadas mediante electroforesis en dos dimensiones (IEF/SDS-PAGE). La cantidad de proteína sembrada en la primera dimensión fue de 100 μg. La separación por punto isoeléctrico de las proteínas se llevó a cabo utilizando strips ("tiras") de 18 cm de longitud de rango de pH 3-10 (Inmobiline Dry Strips pH 3-10, 18 cm; Amersham Biosciences). Estas tiras fueron hidratadas durante 14 h a temperatura ambiente, con un buffer conteniendo urea 7 M, CHAPS 2% p/v, tiourea 2 M, DTT 28% p/v, 10 μl buffer IPG 3-10 (Amersham Biosciences) y cubiertas con 3 ml de aceite mineral (Amersham Biosciences) para evitar su deshidratación. La separación de los polipéptidos por su punto isoeléctrico (pI), se llevó a cabo a temperatura ambiente en un equipo Ettan IPGphor System (Amersham Biosciences) utilizando la siguiente secuencia de potenciales: 1 h a 500V, 1 h a 1000V y 4 h a 8000V hasta alcanzar al final de la corrida 30.000V/ h.

Una vez finalizada la corrida y antes de realizar la segunda dimensión las tiras fueron equilibradas 1 h a temperatura ambiente en cada una de las siguientes soluciones:

- Urea 6 M, glicerol 30% v/v, SDS 2% p/v, Tris-HCl 50 mM pH 8,8, azul de bromofenol 0,01% p/v y ditiotreitol (DTT) 30 mM.
- La segunda solución tiene la misma composición que la anterior a excepción del DTT que es reemplazado por iodoacetamida (IAA) 60mM.

Para la segunda dimensión, se utilizaron geles de poliacrilamida formados por un gel separador de concentración de acrilamida 12% p/v sin gel apilador utilizando el mismo equipo y las mismas condiciones que fueran detalladas anteriormente para electroforesis desnaturalizantes (ver item 3.6.3.1, Materiales y Métodos).

Antes de la corrida las tiras fueron cortadas por la mitad de manera que cada tira era resuelta en la segunda dimensión en dos placas. Este ensayo se realizó por duplicado.
La determinación de los valores aproximados de pI se hizo considerando un gradiente lineal de pH entre 3 y 10, distribuido homogéneamente a lo largo de la distancia total del gel, midiendo la distancia recorrida por cada polipéptido.

3.6.6 Obtención de las imágenes y análisis de los geles

Las imágenes de las electroforesis fueron digitalizadas con un equipo BIO–RAD (Gel Doc 1000), mientras que el análisis de las masas moleculares se realizó con el programa Molecular AnalystTM/PC (versión 1.5) (BIO-RAD).

3.7 Determinación de la hidrofobicidad superficial

La constante de asociación (K_a), el número de sitios de unión (n) y la hidrofobicidad superficial (H_0) de las muestras purificadas (P, UM y g11S) se determinó siguiendo el método propuesto por Cardamone y Puri (1992). Se utilizó la sonda fluorescente 8-anilino-1-naftalensulfonato de amonio (ANS, Aldrich Chemical Co.).
Las muestras purificadas por cromatografía de exclusión molecular se diluyeron hasta un volumen final de 3 ml alcanzando una concentración final de proteína entre 0,05 y 0,15 mg/ml. Por otro lado se preparó, fresca cada día, una solución de ANS 10 mM en el buffer B.
Se agregaron cantidades crecientes de la solución de ANS a una cubeta conteniendo buffer B (blanco) y a una cubeta conteniendo la muestra de proteína (muestra). Se realizó un espectro de emisión luego de cada agregado de ANS usando una longitud de onda de excitación de 350 nm, la emisión fue colectada entre 370 y 600 nm. Las concentraciones de ANS barridas durante el ensayo estuvieron comprendidas entre: 0,00 y 83,47 μM.
Luego de restar al espectro de emisión de cada muestra el de su blanco correspondiente (blanco con la misma concentración de ANS que la muestra), se graficó la intensidad de fluorescencia detectada a 470 nm (máximo de emisión del complejo proteína-ANS) en función de la concentración de ANS en μM. Se ajustaron los datos obtenidos con la Ecuación 1:

Ecuación 1 (curva de saturación)

$$IF = A \times ANS / (B + ANS)$$

Se obtuvieron los valores de A y B siendo "B" la inversa del valor de la constante de asociación del complejo proteína-ANS ($1/K_a$) y "A" la intensidad de fluorescencia máxima para la concentración de proteína empleada cuando la superficie de la proteína está completamente saturada con la sonda (IF_{max}).

Teniendo en cuenta algunas aproximaciones, con los datos obtenidos se puede realizar un gráfico de Scatchard y estimar la K_a y el número de sitios de unión (n) en la superficie de la proteína empleando la Ecuación 2:

Ecuación 2 (Scatchard)

$$L_u/L_t = n \times P_t \times K_a - L_u \times K_a$$

Siendo: L_u: la cantidad de ANS unido a la superficie de la proteína.

L_t: la cantidad de ANS total agregado a la muestra.

P_t: la concentración de proteína total en mg/ml.

n: el número de sitios de unión en la superficie de la proteína.

K_a: la constante de asociación proteína-ANS.

Considerando que L_u es proporcional a la intensidad de fluorescencia (IF) medida a 470 nm para cada una de las concentraciones de la sonda (L_t = ANS), se obtiene la Ecuación 3:

Ecuación 3

$$IF/ANS = n \times P_t \times K_a - IF \times K_a$$

La K_a obtenida mediante esta aproximación fue similar aunque no igual a la calculada con la Ecuación 1.

La hidrofobicidad superficial H_0, proporcional a la máxima intensidad de fluorescencia obtenida por mg de proteína (Cardamone y Puri 1992), fue estimada a partir de la Ecuación 1 realizando el cociente entre "A" y la concentración de proteína calculada para cada muestra. La concentración proteica se determinó por el método de Lowry (ver item 3.4, Materiales y Métodos).

3.8 Cromatografía rápida de proteínas en medio líquido (FPLC)

3.8.1 Cromatografía de exclusión molecular

3.8.1.1 Preparación de las muestras

Las fracciones proteicas provenientes de un liofilizado fueron suspendidas en el buffer correspondiente, en una concentración de 25 mg/ml y solubilizadas durante 1 h a temperatura ambiente. Luego se las centrifugó a 20.000 x g en una microcentrífuga IEC modelo Centra MP4R (International Equipment Company) durante 20 min a 20 °C. El sobrenadante fue filtrado a través de filtros de nylon de 0,22 μm de poro y el filtrado así obtenido se inyectó en el equipo de FPLC (Pharmacia LKB) utilizando el reservorio correspondiente al volumen sembrado.

3.8.1.2 Desarrollo

Las cromatografías se realizaron a temperatura ambiente utilizando una columna Pharmacia LKB (Upsala, Suecia), Superosa 6B HR 10/30. Todos los buffers utilizados fueron previamente filtrados a través de filtros de celulosa con diámetros de poro de 0,22 μm. Las corridas se desarrollaron en el mismo buffer en que se solubilizó la muestra. Para equilibrar la columna, se pasó un volumen del buffer equivalente al de 2 columnas (50 ml). La velocidad de flujo seleccionada fue de 0,2 ml/min y la misma se suministró mediante una bomba Pharmacia LKB P-500, la presión promedio de las cromatografías fue de 0,3 MPa. Se realizó una colección automática de las fracciones eluídas (0,3 ml) empleando el colector FRAC-100 (Pharmacia LKB). Las fracciones obtenidas que no fueron analizadas inmediatamente se conservaron a -20 °C.

3.8.1.3 Calibración

La columna se calibró con azul dextrano (para el volumen muerto, V_0), y las siguientes proteínas de masa molecular conocida: tiroglobulina (669 kDa), apoferritina (443 kDa), β-amilasa (200 kDa), alcohol deshidrogenasa (150 kDa), albúmina (66 kDa) y citocromo C (12,4 kDa), todas provistas por Sigma. Los patrones se disolvieron en buffer A a una concentración de 4 mg/ml y fueron eluídos de la columna con el mismo caudal que las muestras.

Luego se obtuvo una curva de calibración relacionando el logaritmo de la masa molecular (en kDa) con el K_{AV}, siendo K_{AV}:

Ecuación 4

$$K_{AV} = (V_e - V_0) / (V_T - V_0)$$

Donde: Ve corresponde al volumen de elución en mililitros del pico de interés. V_T, corresponde al volumen total del lecho (25ml, indicado por Amersham Bioscience) y V_0 ha sido definido previamente.

Los valores de absorbancia a 280 nm fueron determinados de modo continuo a la salida de la columna mediante un monitor UV-1 (Pharmacia LKB). El procesamiento de los perfiles obtenidos se realizó con el programa FPLC Director™ (Pharmacia LKB). Las cromatografías se realizaron por triplicado, a menos que se indique lo contrario.

3.8.2 Cromatografía de intercambio iónico

3.8.2.1 Preparación de las muestras

Las muestras liofilizadas fueron suspendidas (20 mg/ml) en el buffer inicial de la cromatografía (bajo contenido salino), centrifugadas a 20.000 x g en una microcentrífuga (IEC, Centra MP4R) durante 20 min a 20 °C y por último filtradas mediante una membrana con poros de 0,22 μm de diámetro. Las muestras provenientes de cromatografía de exclusión molecular, antes de ser introducidas en la columna, fueron diafiltradas en un equipo Amicon 8020 (Amicon Inc.), empleando el buffer inicial de cromatografía, con 20 veces el volumen de la muestra. En este proceso se utilizó una membrana semipermeable cuyo tamaño de poro es, en promedio, 10.000 Da (Amicon, YM10). Luego, estas muestras fueron sometidas a los mismos tratamientos que las muestras liofilizadas.

Buffer de bajo contenido salino (buffer C): dietanolamina 20 mM (pH 8,5).

Buffer de alto contenido salino (buffer C + NaCl 1M): dietanolamina 20 mM (pH 8,5), NaCl 1 M.

3.8.2.2 Desarrollo

Se empleó una columna Hi-Trap (Pharmacia, Upsala, Suecia) que fue tratada con un volumen equivalente al de cinco columnas (≅ 25 ml) de buffer C, 5 ml de buffer de alta fuerza iónica (buffer C + NaCl 1M) y por último, nuevamente 10 ml de buffer C. El

caudal empleado en todos los casos fue 0,5 ml/min a una presión promedio de 1,5 MPa. De modo automático, se colectaron fracciones de 0,5 ml empleando el colector FRAC-100 (Pharmacia LKB). Para la elución se utilizó un gradiente de NaCl entre 0,0 y 1,0 M escalonado a 0,35, 0,41, 0,47 y 0,53 M. El mismo se formó con el buffer inicial (buffer C) y buffer C + NaCl 1M. Para la mezcla de estas dos soluciones se usaron dos bombas Pharmacia LKB P-500 y un mezclador (Mixer 24V, Pharmacia LKB).

3.9 Cromatografía líquida de alta performance (HPLC)

Estas determinaciones se realizaron en un equipo Waters 600 E HPLC Multisolvent Delivery System (pump and controller) equipado con un Water 717 Plus Autosampler y un detector Waters 996 arreglo de diodos.

3.9.1 Cromatografía de intercambio iónico

3.9.1.1 Preparación de las muestras

Las muestras fueron procesadas como se describe en 3.8.2.1, Materiales y Métodos

3.9.1.1.1 Preparación de las muestras de los polipéptidos disociados

Para los ensayos en donde se analizaron los polipéptidos disociados se suspendió la muestra en un buffer Na_2HPO_4 10 mM, pH 8,5, conteniendo urea 8 M, DTT 20 mM y se incubó la muestra durante 60 min a 37 ° C. Luego se adicionó iodoacetamida (Sigma) hasta alcanzar una concentración final 40 mM, la reacción de alquilación se llevó a cabo durante 60 min a 37 ° C en ausencia de luz.

3.9.1.2 Desarrollo

Se inyectaron 50 µl de la muestra en una columna Waters AP-Minicolumn 5x 100 nm 1000 A 8 um (Waters) pre-equilibrada con un volumen de solvente (A) equivalente al volumen de cuatro columnas, cuatro columnas de solvente (B) y por último, nuevamente cuatro columnas del solvente (A).

El caudal empleado en todos los casos fue 0,5 ml/min a una presión promedio de 250 Psi. Dependiendo de la muestra se diseñaron distintos gradientes de elución. Unos fueron lineales y otros escalonados y están indicados en las figuras correspondientes. Los mismos se formaron con el solvente (A) y el solvente (B) (cuya composición es

igual a la del solvente (A) con el agregado de 1M NaCl). El volumen eluido fue monitoreado a 210 nm y 280 nm y los picos de cada fracción fueron colectados manualmente.

Análisis de las moléculas de globulinas (P, UM y g11S).

Fases móviles:

Solvente A: buffer Tris-HCl 20 mM, pH 9,0;

Solvente B: buffer Tris-HCl 20 mM, pH 9,0, NaCl, 1M.

Gradiente:

Tiempo (min)	%A	%B
0	100	0
5	100	0
45	50	50
50	50	50
75	100	0

Análisis de los polipéptidos constituyentes de las globulinas.

Fases móviles:

Solvente A: (Na_2HPO_4 10 mM, pH 8,5 – acetonitrilo (ACN)) 80-20%;

Solvente B: (Na_2HPO_4 10 mM, pH 8,5 – NaCl 1 M), 80 % - (acetonitrilo (ACN)), 20%,.

Gradiente:

Tiempo (min)	%A	%B
0	100	0
20	100	0
60	67	33
67	67	33
80	0	100
90	0	100
110	100	0

Las fracciones provenientes de dos corridas fueron liofilizadas y analizadas por electroforesis desnaturalizante.

3.9.2 Cromatografía en fase reversa RP-HPLC

3.9.2.1 Preparación de las muestras

Las muestras liofilizadas fueron suspendidas en el buffer inicial de la cromatografía, centrifugadas a 20.000 x g en una microcentrífuga (IEC, Centra MP4R) durante 20 min a 20 °C y por último filtradas mediante una membrana con poros de 0,22 μm de diámetro. Las muestras provenientes de cromatografía de exclusión molecular, antes de ser introducidas en la columna, fueron diafiltradas en un equipo Amicon 8020 (Amicon Inc.), empleando el buffer inicial de cromatografía, con 20 veces el volumen de la muestra.

Para los ensayos en donde se analizaron los polipéptidos disociados se suspendió la muestra en buffer B con una concentración 10mg/ml, se solubilizó durante 1h, luego se centrifugó a 20.000 x g en una microcentrífuga (IEC, Centra MP4R) durante 20 min a 20 °C. Se tomó un volumen de la muestra soluble y se le agregó un volumen de una solución conteniendo cloruro de guanidinio 6 N, Tris-HCl, 0,2M, DTT 30mM manteniendo una proporción 30:70 respectivamente. Se incubó durante 1h a 37 °C, luego se centrifugó a 20.000 x g en una microcentrífuga (IEC, Centra MP4R) durante 20 min a 20 °C y por último se filtró a través de una membrana con poros de 0,22 μm de diámetro antes de ser inyectada en la columna.

3.9.2.2 Desarrollo

Se inyectaron 50 μl de la muestra en una columna Sephasil Peptide C8, 5 μm ST 4.6/250 (Pharmacia Biotech) equilibrada con solvente (A). La columna fue eluída con el solvente (A) a un flujo de 1ml/min, luego de tres min se aplicó un gradiente lineal desde 100% de (A) a 100% de (B) durante 55 min. Se empleó una temperatura de 60°C.

El volumen eluido fue monitoreado a 210 nm y 280 nm y los picos de cada fracción fueron colectados manualmente. Las fracciones provenientes de dos corridas fueron liofilizadas y analizadas por electroforesis desnaturalizante.

Fases móviles:

Solvente A: acetonitrilo (ACN) 2%/ ácido trifluoroacético (TFA) 0.065 % (v/v) en agua.

Solvente B: acetonitrilo 65%/ ácido trifluoroacético (TFA) 0.065 % (v/v) en agua.

Gradiente:

Tiempo (min)	%A	%B
0	100	0
3	100	0
55	0	100
75	0	100
83	100	0
100	100	0

3.10 Comparación de la estructura terciaria de las proteínas por espectroscopía de fluorescencia

Se analizó la estructura terciaria de las proteínas estudiando la fluorescencia intrínseca de las mismas. Para ello se empleó un equipo Perkin Elmer LS 50B. Se utilizó como longitud de onda de excitación 290 nm y se obtuvo un espectro de emisión en el rango de 310 a 550 nm a una velocidad de barrido de 300 nm/min.

Las muestras liofilizadas fueron suspendidas en buffer B con una concentración de 1mg/ml, se agitaron durante 1h, luego fueron centrifugadas a 20.000 x g en una microcentrífuga (IEC, Centra MP4R) durante 20 min a 20 °C. Se determinó la concentración proteica por el método de Lowry y se llevaron por dilución a una concentración entre 0,01 y 0,03 mg/ml. Para las muestras provenientes de cromatografía se midió la concentración de proteína por Lowry y se ajustó la concentración entre estos mismos valores. Estos ensayos de realizaron por quintuplicado y los espectros de fluorescencia para cada uno de los ensayos fueron determinados por duplicado.

3.11 Tratamiento con agentes químicos. Curvas de desnaturalización

3.11.1 Desnaturalización con urea

A partir de las muestras purificadas de polímeros (P), moléculas de globulina-p (UM), moléculas de globulina 11S (g11S). Se prepararon soluciones a las distintas concentraciones de urea siguiendo el protocolo indicado en la Tabla 4.

Tabla 4. Protocolo de preparación de muestras desnaturalizadas con urea.

Nº muestra	[urea] M	ml urea (9,44M)	ml buffer	ml proteína
1	0,00	0,00	3,00	0,20
2	0,59	0,20	2,80	0,20
3	0,88	0,30	2,70	0,20
4	1,18	0,40	2,60	0,20
5	1,47	0,50	2,50	0,20
6	1,77	0,60	2,40	0,20
7	2,36	0,80	2,20	0,20
8	3,69	1,25	1,75	0,20
9	3,83	1,30	1,70	0,20
10	3,98	1,35	1,65	0,20
11	4,13	1,40	1,60	0,20
12	4,28	1,45	1,55	0,20
13	4,42	1,50	1,50	0,20
14	4,57	1,55	1,45	0,20
15	4,72	1,60	1,40	0,20
16	4,87	1,65	1,35	0,20
17	5,01	1,70	1,30	0,20
18	5,90	2,00	1,00	0,20
19	6,49	2,20	0,80	0,20
20	6,64	2,25	0,75	0,20
21	7,08	2,40	0,60	0,20
22	7,52	2,55	0,45	0,20
23	7,96	2,70	0,30	0,20
24	8,85	3,00	0,00	0,20

Las muestras fueron incubadas durante 3 h con el desnaturalizante y posteriormente se midió el espectro de fluorescencia en un equipo Perkin Elmer LS 50B. Se utilizó como longitud de onda de excitación 290 nm y se obtuvo un espectro de emisión en el rango de 310 a 550 nm a una velocidad de barrido de 300 nm/min. En las figuras se muestra solamente el espectro de fluorescencia en el rango de 310 hasta 425 nm.

Para cada concentración de urea en estudio se determinó la posición del máximo del espectro de fluorescencia ajustando una curva polinomial de grado 5 (que fue la que realizó el mejor ajuste de los datos experimentales). Posteriormente se graficó el valor de λ de máxima emisión en cada caso versus la concentración de urea en unidades de molaridad, obteniendo de este modo las curvas de desnaturalización. Los puntos experimentales de las curvas de desnaturalización fueron ajustados con la Ecuación 5.

Ecuación 5

$$y = [(y_N - y_D) / (1 + e^{(x-x0)/dx})] + y_D$$

Donde "y" es cualquier parámetro observable escogido para seguir el proceso de desnaturalización, en nuestro caso la λ_{max} del espectro de fluorescencia de triptofano e y_N, y_D representan los valores de "y" (λ_{max}) característicos de los espectros de la proteína completamente nativa y completamente desnaturalizada. El valor de x_0 es la concentración de urea cuando la muestra está un 50% desnaturalizada, x es la concentración de urea en cada punto.

Las muestras fueron analizadas por duplicado. La concentración proteica fue determinada por Lowry (ver item 3.4, Materiales y Métodos).

3.11.1.1 Determinación de la estabilidad conformacional (ΔG_{H2O})

A partir de las curvas de desnaturalización con urea puede estimarse el parámetro termodinámico ΔG_D (cambio de energía libre) para la Reacción 1.

Reacción 1

Nativa ↔ Desnaturalizada

El método clásico para el análisis de estas curvas asume un mecanismo de dos estados para la reacción anterior. Por lo tanto, en el equilibrio sólo está presente en concentraciones apreciables la proteína completamente nativa o completamente desnaturalizada. En la Figura 7 se ilustra a modo de ejemplo la desnaturalización a través de un mecanismo de dos estados para una proteína genérica y los cálculos que se realizan a partir de esta aproximación para un punto en la región de transición entre el estado nativo y desnaturalizado.

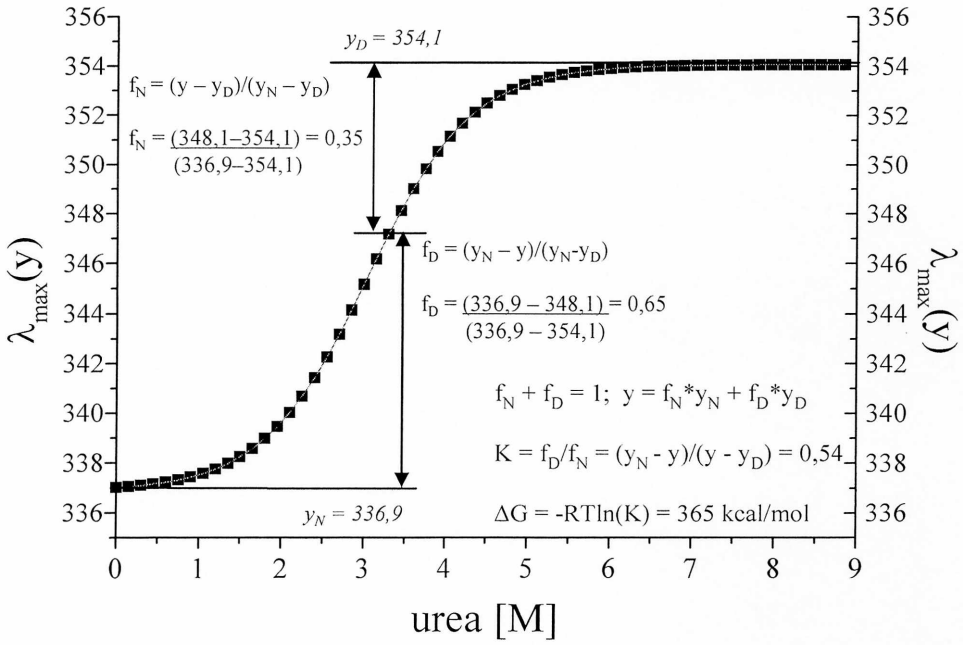


Figura 7. Análisis de la curva de desnaturalización con urea de una proteína genérica asumiendo un mecanismo de dos estados.

Por supuesto, estas consideraciones no son reales, ya que durante el pasaje desde el estado nativo al desnaturalizado forzosamente existen especies intermediarias. Sin embargo, para muchas proteínas la concentración de las especies intermediarias en el equilibrio son bajas en relación con la cantidad de proteína nativa y desnaturalizada. Despreciando la concentración de los intermediarios el análisis se hace más sencillo, asumiendo entonces un mecanismo de dos estados se cumple que:

Ecuación 6

$$f_N + f_D = 1$$

Donde f_N y f_D representan la fracción de proteína total en la conformación plegada y desplegada respectivamente. El valor observado en cualquier punto de la curva de transición esta dado por:

Ecuación 7

$$y = y_N f_N + y_D f_D$$

Donde "y" es cualquier parámetro observable escogido para seguir el proceso de desnaturalización, en nuestro caso la λ_{max} del espectro de fluorescencia de triptofano e y_N, y_D representan los valores de "y" (λ_{max}) característicos de la proteína completamente

nativa y completamente desnaturalizada. Los valores para f_N y f_D en cualquier punto de la región de transición se obtienen por la extrapolación de las líneas de base trazadas en las regiones antes y después de la transición. Si se combinan las ecuaciones 6 y 7 se obtiene:

Ecuación 8

$$f_D = (y_N - y)/(y_N - y_D)$$

El valor de la constante de equilibrio (K_D) y del cambio de energía libre (ΔG_D) para la Reacción 1 puede ser calculada usando:

Ecuación 9

$$K_D = f_D/(1-f_D) = f_D/f_N = (y_N - y)/(y - y_D) \qquad \text{y}$$

Ecuación 10

$$\Delta G_D = -RTlnK_D = -RTln[(y_N - y)/(y - y_D)]$$

Donde, R es la constante de los gases (1,987 kcal/(Kmol)) y T la temperatura expresada en grados Kelvin (K). La constante de equilibrio puede medirse con mayor precisión en el punto medio de la curva de desnaturalización, para valores de K_D por fuera del rango 0,1-10 ($0,1 \leq f_D \leq 0,9$) el error se vuelve importante.

Para obtener un valor aproximado de la estabilidad conformacional (ΔG_{H2O}) a partir de esta medidas, los valores obtenidos para la constante de equilibrio K_D se grafican en función de la concentración de desnaturalizante y se extrapola hasta una concentración igual a cero. Al analizar los datos de este modo, se encuentra generalmente un valor para ΔG_D que varía linealmente con la concentración de agente desnaturalizante empleada.

Ecuación 11

$$\Delta G_D = \Delta G_{H2O} - m[urea\ M]$$

3.11.2 Desnaturalización con 2-mercaptoetanol

A partir de las muestras purificadas de polímeros (P), moléculas de globulina-p (UM), moléculas de globulina 11S (g11S). Se prepararon soluciones a las distintas concentraciones de 2-mercaptoetanol (2ME) siguiendo el protocolo indicado en la Tabla 5.

Tabla 5 Protocolo de preparación de muestras desnaturalizadas con 2ME.

N° muestra	[2ME] mM	µl 2ME 100 mM	µl 2ME 500 mM	µl 2ME 1500 mM	µl Buffer B	µl proteína
1	0	0,0	0,0	0,0	200,0	100,0
2	5	15,0	0,0	0,0	185,0	100,0
3	10	30,0	0,0	0,0	170,0	100,0
4	20	60,0	0,0	0,0	140,0	100,0
5	50	0,0	30,0	0,0	170,0	100,0
6	100	0,0	60,0	0,0	140,0	100,0
7	250	0,0	150,0	0,0	50,0	100,0
8	500	0,0	0,0	100,0	100,0	100,0
9	715	0,0	0,0	143,0	57,0	100,0

Las muestras fueron incubadas durante 3 h con el agente reductor. Posteriormente se analizaron siguiendo el Esquema1.

Esquema1

Muestra tratada → *250 µl +* *2750 µl Buffer B + 2ME a la concentración del tratamiento* → *Espectroscopía de fluorescencia*

Muestra tratada → *30 µl +* *10 ul buffer muestra nativo* → *ND-PAGE* (Ver item 3.6.3.3, Materiales y Métodos)

Se midió el espectro de fluorescencia en un equipo Perkin Elmer LS 50B. Se utilizó como longitud de onda de excitación 290 nm y se obtuvo un espectro de emisión en el rango de 310 a 550 nm a una velocidad de barrido de 300 nm/min. En las figuras se muestra solamente el espectro de fluorescencia en el rango de 310 hasta 425 nm.

Para cada concentración de 2-mercaptoetanol en estudio se determinó la intensidad de fluorescencia emitida en el máximo del espectro ajustando una curva polinomial de grado 5. Posteriormente se graficó IF/IF_0, versus la concentración del agente reductor en unidades de mM, donde:

IF: intensidad de fluorescencia emitida en el máximo para cada concentración de 2ME.

IF_0: intensidad de fluorescencia emitida en el máximo para la muestra sin reductor.

3.12 Determinación de grupos sulfhidrilos totales

3.12.1 Síntesis del reactivo 2-nitro-5-tiosulfobenzoato (NTSB).

El NTSB fue sintetizado de acuerdo al método de Tannhauser y col., (1984), con pequeñas modificaciones. El DTNB (0,1 gramos) fue disuelto en 100 ml de Na_2SO_3 1 M. El pH de la mezcla se ajustó a 7,5 y se adicionaron 50 µl de solución 0,1 M de $CuSO_4$ amoniacal. La reacción se inició en un baño termostatizado a 38 °C, agitando a 120 oscilaciones por min. La síntesis se dio por finalizada cuando la solución original (color rojo brillante) se tornó color amarillo pálido (3 h aproximadamente). Así se obtuvo la solución madre que se almacenó a -60 °C. La solución NTSB de ensayo se preparó por dilución 1:100 de la solución madre en Tris-Base 0,2 M, Na_2SO_3 0,1 M, EDTA 0,01 M y tiocianato de guanidinio 3 M. El pH de esta solución se ajustó a 9,5 con HCl.

3.12.2 Determinación de la cantidad de sulfhidrilos totales.

Se realizó por el método descrito por Damodaran (1985), mezclando 35 µl de la solución de la fracción proteica correspondiente (10 mg/ml) con 500 µl de NTSB pH 9,5 preparado fresco cada día en el momento de la determinación. Se dejó desarrollar el color durante 30 min en la oscuridad y se determinó la absorbancia a 412 nm. Para transformar el valor de densidad óptica en concentración de sulfhidrilos se utilizó como coeficiente de extinción molar para el NTB 13.600 $M^{-1}.cm^{-1}$. Las determinaciones se realizaron por triplicado. La cantidad de sulfhidrilos totales se calculó según la Ecuación 12:

Ecuación 12

$$SHt = 73,53x(DO_1-DO_2)x1000/(VxC)$$

En donde,

SHt: concentración de sulfhidrilos totales en la muestra (µmol SH/g proteína).

DO_1: absorbancia a 412 nm de la muestra a los 30 min de agregado el reactivo de Ellman.

DO_2: absorbancia a 412 nm del blanco de reactivos a los 30 min de agregado el reactivo de Ellman.

V: volumen de muestra (µl) agregado a 1ml del reactivo de Tannhauser.

C: concentración de proteína en la muestra (mg/ml), determinada por el método de Lowry, (ver item 3.4, Materiales y Métodos).
Las lecturas de absorbancia, se realizaron en espectrofotómetro Beckman DU 650.

3.13 Recuperación de la estructura nativa de las globulinas a partir de muestras desnaturalizadas

3.13.1 Desnaturalización

Las muestras fueron disueltas en el buffer correspondiente a cada condición según se indica en la Tabla 6, fueron mantenidas a temperatura ambiente durante 3h.

3.13.2 Renaturalización

Las muestras desnaturalizadas, fueron llevadas hasta una condición similar a la inicial por dilución en la mayoría de los casos, las condiciones se detallan en la Tabla 6.
Las muestras a las que se intentó renaturalizar por dilución, fueron dejadas en reposo luego de la dilución durante 3 h a temperatura ambiente y posteriormente se refrigeraron durante toda la noche a 4 °C. Luego, la solución fue centrifugada a 20.000 x g en una microcentrífuga (IEC, Centra MP4R) durante 20 min a 20 °C obteniéndose una o dos fracciones según se indique (Tabla 6).
La fracción soluble obtenida fue concentrada por ultrafiltración en un equipo Amicon 8020 (Amicon Inc.). En este proceso se utilizó una membrana semipermeable cuyo tamaño de poro es, en promedio 3.000 Da (Amicon, YM 3) hasta un volumen de 0,50 ml. Todas las muestras fueron analizadas mediante electroforesis no desnaturalizante (ND-PAGE) y desnaturalizantes (SDS-PAGE, SDS-PAGE + 2ME).

Tabla 6. Condiciones de desnaturalización y renaturalización.

Desnaturalización				Renaturalización				
muestra	condición	Buffer	Tiempo	condición	Método renaturalización	Tiempo	Fracción soluble	Fracción insoluble
2,5 mg gp/ml de buffer desnaturalizante	*D1* (*)	Urea 7 M Tiourea 2 M Buffer B pH = 8,5	3 h	*R1*	dilución 1:50 buffer B	3 h 25 ° C 12 h 4 ° C	+	+
	D2 (*)	Urea 7 M Tiourea 2 M Buffer B pH = 8,5 2ME 5%		*R2* (***)	dilución 1:50 buffer B + 2-mercaptoetanol 5%	3 h 25 ° C 12 h 4 ° C	+	+
Proteína soluble en buffer B de suspención 2 mg/ml	*D3* (**)	Urea 7 M pH = 3	3 h	*R3*	dilución 1:50 buffer B	3 h 25 ° C 12 h 4 ° C	+	+
				R4	Diálisis (en todos los pasos de la diálisis se utilizó NaN_3, se hicieron 2 cambios a cada uno de los pHs señalados)	8 h pH = 4 8 h pH = 7 8 h pH = 8,5	+	+

Proteína soluble en buffer Tris 0,1 M pH = 8,5 de suspención 2 mg/ml	*D4* (**)	Urea 7 M Tiourea 2 M Tris 0,1 M pH = 8,5 DTT 100 mM EDTA 0,1 mM	2 h	*R5*	1) Ajuste de pH a 3 con ácido acético glacial. Diálisis contra una solución de urea 7 M, tiourea 2 M, pH = 3	2 h 4 ° C	+	+
					2) dilución 1:50 buffer Tris 0,1 M pH = 8,5 glutatión oxidado 0,3 mM glutatión reducido 3 mM	3 h 25 ° C 12 h 4 ° C		
Proteína soluble en buffer Tris 0,1 M pH = 8,5 de suspención 2 mg/ml	*D5* (**)	Urea 7 M Tiourea 2 M Tris 0,1 M pH = 8,5 DTT 100 mM	3 h	*R6*	dilución 1:50 Buffer Tris 0,1 M pH = 8,5	3 h 25 ° C 12 h 4 ° C	+	+
				R7	dilución 1:50 agua bidestilada	3 h 25 ° C 12 h 4 ° C	+	-

(*) La muestra se disuelve directamente en el buffer desnaturalizante lográndose una disolución completa.

(**) La muestra se disuelve en un buffer de pH alcalino (según se indica en cada caso) y posteriormente se lleva a condiciones desnaturalizantes, sólo a la fracción soluble en estas condiciones.

(***) En este caso, luego de llevar adelante la renaturalización de la muestra, se cambió el buffer de renaturalización con 5% 2ME por buffer B fresco mediante un equipo AMICON utilizando una membrana de 3 kDa de corte hasta que la concentración de 2ME no tuviera efecto reductor.

3.14 Análisis estadístico de los resultados y programas utilizados.

Los resultados fueron analizados estadísticamente empleando el programa Origin 7.0. Se efectuaron análisis de varianza (ANAVA) y la comparación de medias se realizó con el Test de la menor diferencia significativa (LSD). Todos los ensayos descritos anteriormente fueron realizados por lo menos por triplicado, salvo en aquellos casos donde se indique lo contrario.

Capítulo 1

4 Comparación de las características estructurales de globulina-p y globulina 11S de amaranto

4.1 Análisis y caracterización de la estructura nativa de globulina-p y globulina 11S

Como fuera descrito en la introducción globulina-p es una globulina tipo 11S con propiedades fisicoquímicas algo diferentes de las leguminas, especialmente a la globulina 11S de amaranto (Martínez y col., 1997; Castellani y col., 1998, 1999). Los estudios que se desarrollan en el presente capítulo están orientados a obtener información acerca de las diferencias estructurales entre globulina-p (gp) y globulina 11S (g11S) responsables de su distinto comportamiento.

Ambas globulinas fueron caracterizadas mediante electroforesis no desnaturalizante, los resultados obtenidos se muestran en la Figura 8:

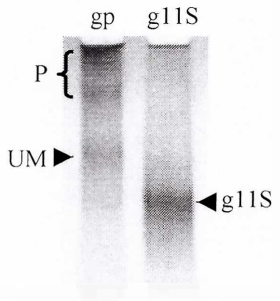


Figura 8. Electroforesis no desnaturalizante (ND-PAGE) de las fracciones gp y g11S de amaranto. Concentración de acrilamida 6% p/v. Tinción Coomassie Brillant Blue.

Tal como fuera informado anteriormente (Martínez y col., 1997) el perfil de la fracción globulina 11S tiene una sola banda constituida por especies de alta movilidad (señalada con una punta de flecha en la Figura 8), mientras que en la fracción globulina-p se observan varias bandas de menor movilidad (agrupadas como P en la Figura 8) y una de movilidad algo mayor (UM). Estas diferencias en la movilidad de las especies que componen a globulina-p se deben a diferencias en la masa molecular de las mismas, dado que la composición polipéptidica de dichas especies es similar (Martínez y col. 1997). De este modo quedan en evidencia los distintos grados de agregación que posee esta última fracción. La banda con mayor movilidad de globulina-p (UM) posee una

relación carga/masa menor que la banda observada en globulina 11S, esto se debería a diferencias en la composición polipeptídica de ambas fracciones puesto que la masa para ambas moléculas es similar (Martínez y col. 1997).

Una de las características que distingue a globulina 11S de globulina-p es su diferente solubilidad en los solventes de extracción, soluciones salinas y agua respectivamente (ver item 1.3.4, Introducción). Para confirmar este comportamiento se analizó la solubilidad de estas fracciones proteicas sin purificar en buffers de alta y baja fuerza iónica. Los resultados se muestran en la Tabla 7.

Tabla 7. Solubilidad de las fracciones gp y g11S en buffer A (μ=0,5) y buffer B (μ=0,08)

	gp (buffer B)	gp (buffer A)	g11S (buffer B)	g11S (buffer A)
% S(*)	65,0 ± 2,0	4,6 ± 0,3	46,6 ± 0,9	50,0 ± 1,0

(*) g/100 g proteína (ver item 3.5, Materiales y Métodos)

Los datos de solubilidad obtenidos muestran que globulina-p, posee una solubilidad marcadamente inferior en buffer A, (pH= 8,5; μ= 0,5) que la que posee esta misma fracción en buffer B, (pH= 7,5; μ=0,08); mientras que la solubilidad para globulina 11S es levemente superior en buffer A.

El análisis mediante cromatografía de exclusión molecular de las fracciones sin purificar reveló diferencias en los perfiles de las fracciones disueltas en distintos buffers (Figura 9).

La fracción globulina-p se disolvió en buffer B ya que en esta condición presenta la mayor solubilidad. Para globulina 11S, se utilizó buffer A en el cual esta fracción es solubilizada durante la extracción secuencial de proteínas.

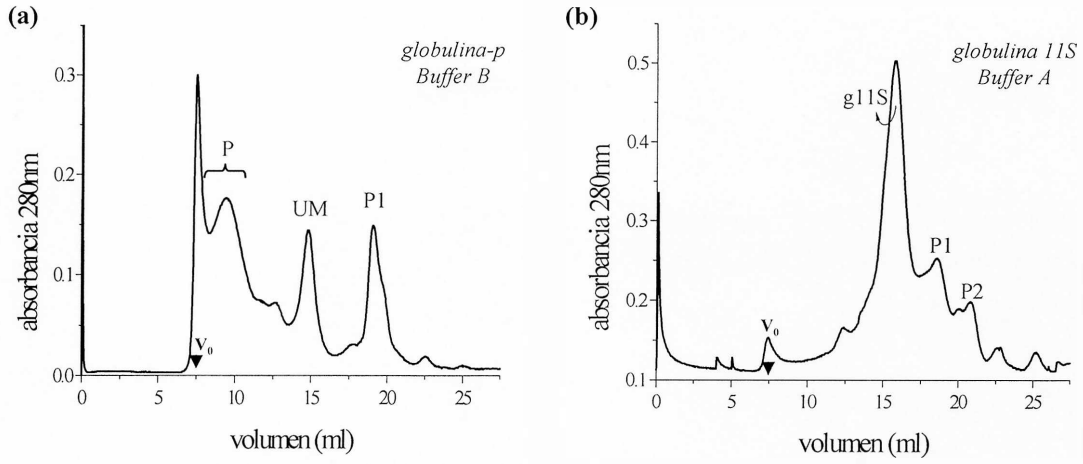


Figura 9. Cromatografía de exclusión molecular (FPLC) de: (a) globulina-p, en buffer B pH 8,5, μ 0,08, (b) globulina 11S de amaranto en buffer A pH 7,5, μ 0,5.

Como fuera informado anteriormente (Martínez y col, 1997) la fracción globulina-p de amaranto presenta la mayor parte de sus moléculas (60%) formando agregados de alta masa molecular (P) con un tamaño mayor a 600 kDa (Figura 9**a**), sólo una pequeña porción de las mismas (16%) están libres (UM) y poseen un tamaño molecular de aproximadamente 300 kDa. Una porción similar a la anterior (20%), que eluye a un volumen mayor (P1) podría tratarse de polipéptidos sueltos, desprendidos de las especies más complejas. Para la fracción globulina 11S (Figura 9**b**) encontramos que el pico principal (57%) se corresponde con especies cuyo tamaño molecular aproximado es de 300 kDa (g11S), hay otras especies que eluyen a volúmenes superiores P1 (18%) y P2 (10%) que corresponderían a globulinas de bajo peso molecular (Aphalo, 2006) o también podría tratarse de una contaminación con la fracción albúminas que se extrae en un paso anterior.

En la Figura 10 se observa el perfil cromatográfico de las fracciones al intercambiar los buffers. Podemos notar que cuando globulina-p está disuelta en buffer A, los agregados de alta masa molecular (P) no son solubles (Figura 10**a**). La insolubilidad de los agregados de globulina-p en soluciones con alta fuerza iónica ya había sido observada en nuestro laboratorio (Castellani y col., 1998).

Al cambiar el buffer de disolución de la fracción globulina 11S (Figura 10**b**) se observa una disminución en el área del pico g11S de 57% a 29% y un aumento paralelo de los picos siguientes (P1, de 18% a 29%, y P2, de 10% a 21%), esto podría deberse a una disociación parcial de esta fracción en solución de baja fuerza iónica, situación ya informada para otras globulinas de reserva (Wagner y Guegen, 1995).

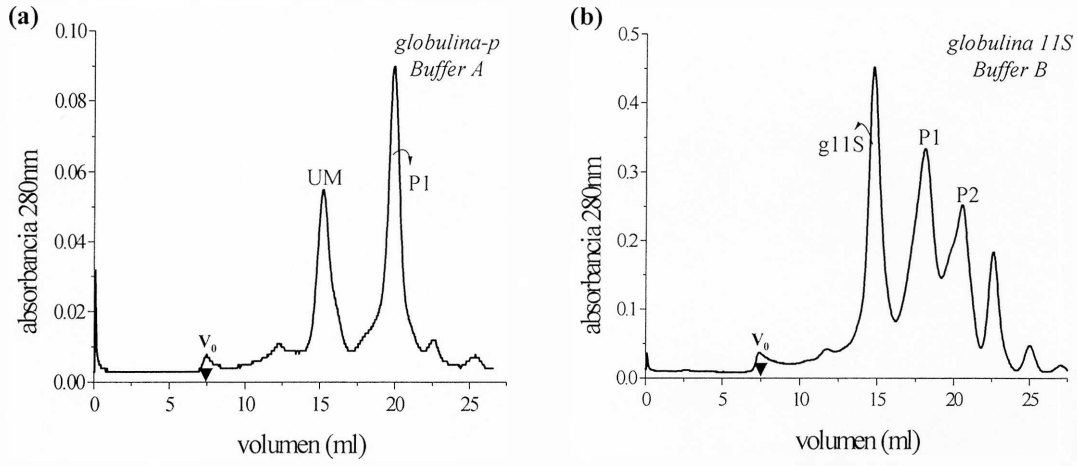


Figura 10. Cromatografías de exclusión molecular (FPLC) de las fracciones proteicas (a) globulina-p de amaranto, en buffer A pH 7,5 y μ 0,5. (b) globulina 11S de amaranto en buffer B pH 8,5 y μ 0,08.

Para investigar la posible disociación de globulina 11S de amaranto cuando es disuelta en soluciones de baja concentración salina (buffer B, μ=0,08), se purificó esta fracción proteica por cromatografía de exclusión molecular empleando el buffer de alta fuerza iónica (buffer A, μ=0,5). Posteriormente se cambió el buffer A de la muestra purificada por buffer B (ver item 3.3, Materiales y Métodos) y se analizó por cromatografía de exclusión molecular empleando como disolvente buffer B. Los resultados de estas experiencias fueron recopilados en la Figura 11.

Al comparar los perfiles de globulina 11S purificada (Figura 11**a**, *g11Sp buffer A → buffer B*) y sin purificar (Figura 11**a**, *g11Ss/p buffer B*) disueltas en buffer B puede observarse en la preparación purificada, que el pico mayoritario (69%) corresponde al hexámero de 300 kDa (señalado como g11S en la Figura 11). Por otro lado, no se evidencia una proporción importante de especies proteicas eluyendo a volúmenes mayores lo que sería característico de productos de la disociación de las moléculas de globulina 11S sino que sólo se encuentra P1 con 15,9%, (Figura 11). La comparación de los mencionados perfiles nos indica que la mayoría de las especies proteicas que conforman la fracción analizada conservan el mismo tamaño molecular antes y después de cambiar el buffer de alta fuerza iónica por el de fuerza iónica baja.

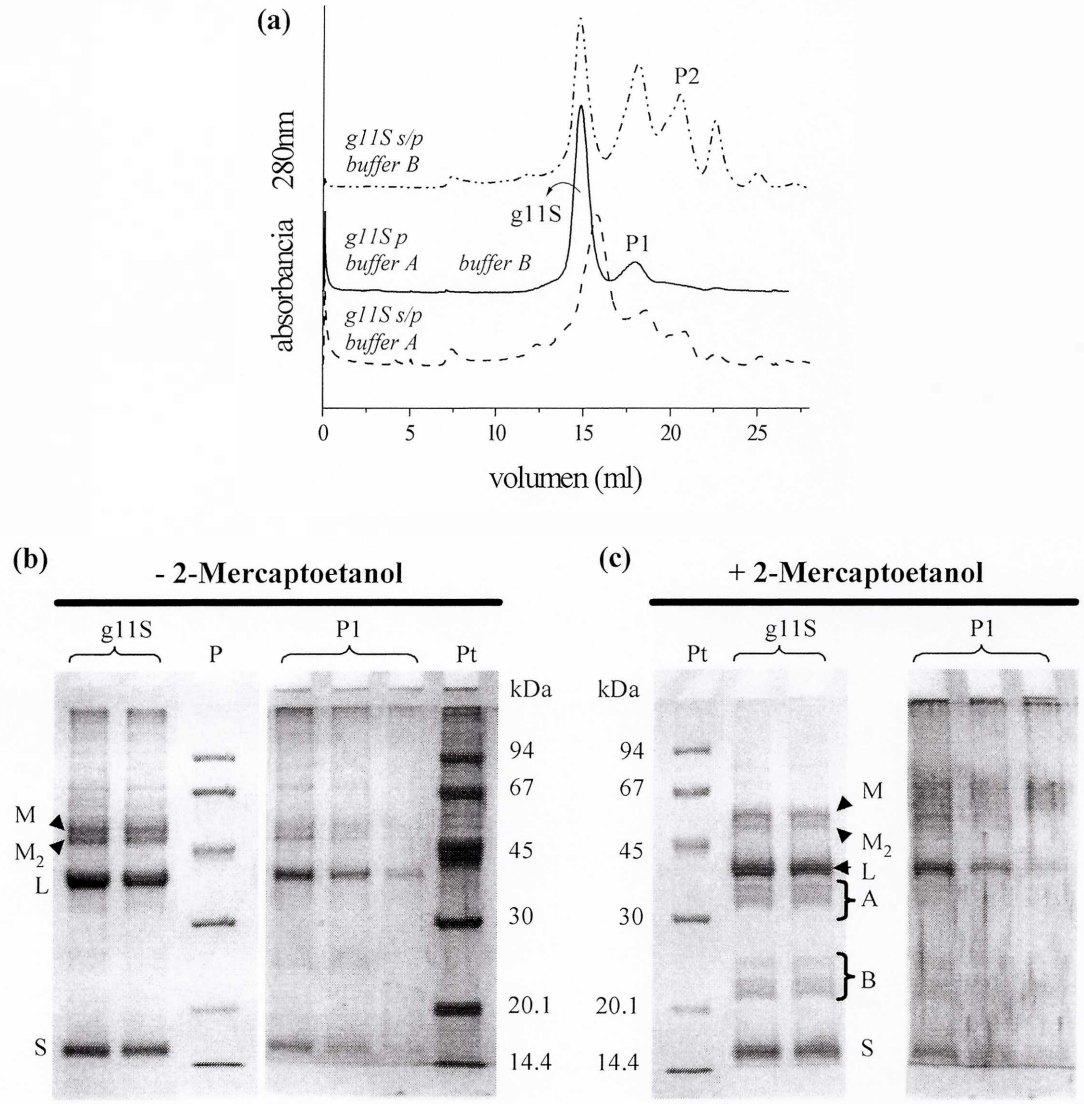


Figura 11. (a) Cromatografía de exclusión molecular (FPLC). *g11Ss/p buffer A*: globulina 11S sin purificar eluida en buffer A; *g11Ss/p buffer B*: globulina 11S sin purificar eluida en buffer B; *g11Sp buffer A → buffer B*: pico que contiene a las moléculas de globulina 11S purificado en buffer A diafiltrado con buffer B. (b) SDS-PAGE de los picos señalados en (a), (c) SDS-PAGE + 2ME de los picos señalados en (a). Se indican las masas de las proteínas patrones en kDa. Tinción Coomasie Brillant Blue en los geles de g11S, y plata en los geles de P1. Concentración de acrilamida: 12% p/v.

Al comparar el perfil de globulina 11S sin purificar en buffer A (Figura 11**a**, *g11S s/p buffer A*) y en buffer B (Figura 11**a**, *g11S s/p buffer B*), se observa que el pico principal de esta globulina (g11S) se desplaza hacia volúmenes mayores cuando se usa la solución de alta fuerza iónica como eluyente (buffer A); este resultado es de esperar debido a la compactación que sufren las proteínas al someterlas a fuerzas iónicas elevadas.

Al analizar mediante electroforesis (Figura 11**b**) las fracciones correspondientes a los picos g11S y P1 del perfil *g11Sp buffer A → buffer B* (Figura 11**a**), se encontraron los mismos polipéptidos característicos de globulina 11S en ambos. Esto nos hace pensar que probablemente el pico denominado P1, contenga algunos polipéptidos separados de la estructura principal de g11S.

A diferencia de lo observado en la globulina 11S sin purificar disuelta en buffer B (Figura 11**a**, *g11S s/p buffer B*), en el perfil que corresponde a g11S purificada disuelta en buffer B (*g11Sp buffer A → buffer B*) la proporción en la que se encuentra P1 respecto de g11S y la ausencia de P2, nos permite descartar la idea que asociaba el incremento en el área de los picos P1 y P2 a la disociación de g11S, encontrándose que la mayor parte de las moléculas de g11S conserva su tamaño característico.

Considerando los resultados obtenidos en estas experiencias, no es posible atribuir el incremento en el área de P1 y P2 en el perfil de globulina 11S sin purificar disuelta en buffer B (Figura 11**a**, *g11S s/p buffer B*) a una disociación parcial de globulina 11S al ser tratada con un buffer de baja concentración salina.

El cambio producido en las proporciones de los picos P1 y P2 en los perfiles de la globulina 11S sin purificar en buffer A y buffer B (Figura 11**a**, *g11S s/p buffer B* y *g11S s/p buffer A*) podría deberse a una disminución de la solubilidad de globulina 11S en el buffer de baja fuerza iónica y un aumento paralelo de la solubilidad en este buffer de especies más hidrofóbicas y más pequeñas que eluyen en los picos P1 y P2, estas moléculas pequeñas estarían ausentes en la fracción g11S purificada..

A la luz de esta hipótesis la similar solubilidad de la fracción globulina 11S no purificada en buffer A y buffer B se explicaría considerando que los componentes de la fracción disueltos en cada uno de ellos son diferentes.

Para la realización de los siguientes ensayos se utilizaron los componentes proteicos purificados. Dado que no se encontró disociación de globulina 11S en el buffer de baja fuerza iónica, se purificaron ambas fracciones (gp y g11S) en buffer B (pH=8,5, μ= 0,08). Para ello se separaron mediante cromatografía de exclusión molecular preparativa, dos poblaciones de moléculas para globulina-p que luego se caracterizaron independientemente, agregados o polímeros con una masa molecular superior a 600 kDa (P) y moléculas con una masa molecular de 300 kDa (UM). Para globulina 11S se obtuvo una población principal con una masa molecular de 300 kDa (g11S). Los perfiles cromatográficos de las proteínas purificadas se muestran en la Figura 12. En ellos se puede observar que las moléculas de globulina-p (UM) y las de globulina 11S

(g11S) presentan el mismo tamaño, mientras que los agregados sólo contienen una muy pequeña proporción de UM.

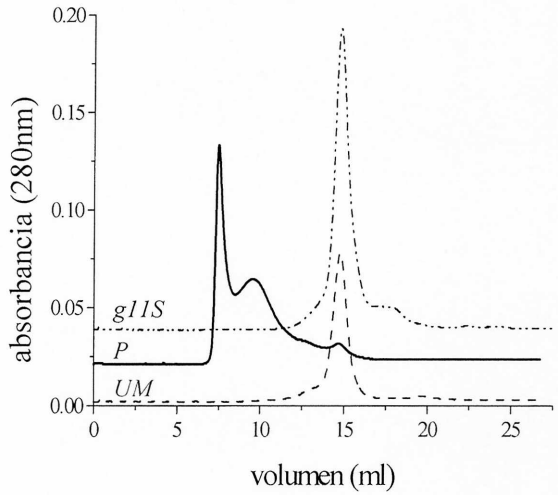


Figura 12. Cromatografía de exclusión molecular (FPLC) de las fracciones purificadas de globulina p y globulina 11S. Línea llena: polímeros de gp (P). Línea-punto-punto: moléculas de gp (UM). Línea cortada: moléculas de globulina 11S (g11S). Eluyente buffer B.

Para las fracciones purificadas se ensayó la solubilidad en buffer A y B, los resultados se muestran en la Figura 13.

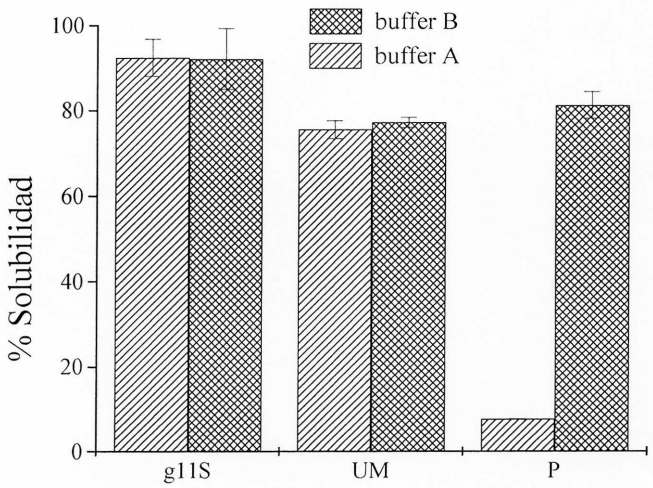


Figura 13. Solubilidad de las fracciones purificadas de globulina-p y globulina 11S de amaranto en buffer de alta fuerza iónica (buffer A, μ=0,5) y buffer de baja fuerza iónica (buffer B, μ=0,08).

De manera análoga a lo observado para las fracciones sin purificar analizadas anteriormente, se observa una baja solubilidad de los polímeros de globulina-p (P) en el buffer de alta fuerza iónica. Para las moléculas de globulina-p (UM), en cambio, se

encontró una solubilidad similar en ambos buffers (alta y baja fuerza iónica). Sin embargo, este valor es algo menor al encontrado para globulina 11S en dichas soluciones. Por otro lado, no se encontraron diferencias significativas en la solubilidad de globulina 11S en ambos buffers. Los resultados muestran que, de los componentes de globulina-p, sólo los polímeros (P) son muy poco solubles en condiciones de alta fuerza iónica, mientras que las moléculas de 300 kDa (UM) se comportan como las de globulina 11S. Esto nos lleva a pensar que, las moléculas de globulina-p sufren algún tipo de cambio conformacional al agregarse para formar los polímeros. La nueva conformación daría origen a una superficie con características de hidrofobicidad diferentes de la que tenían las moléculas antes de formar agregados.

La solubilidad similar de globulina 11S en buffer A y buffer B no concuerda con la hipótesis planteada anteriormente que proponía una parcial insolubilización de esta fracción en buffer de baja fuerza iónica. Teniendo en cuenta que esta globulina fue purificada en buffer B la fracción insoluble estaría ausente. Por otro lado, una purificación en buffer A llevaría a resultados equivalentes ya que al cambiar el buffer mediante ultrafiltración se produciría una progresiva insolubilización quedando los agregados adheridos a la membrana.

Las especies purificadas también fueron caracterizadas mediante electroforesis no desnaturalizante.

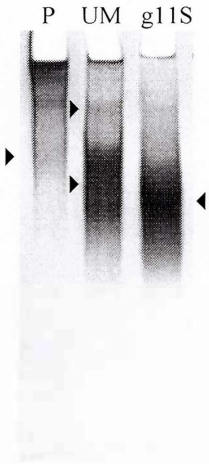


Figura 14. Electroforesis no desnaturalizante de las fracciones proteicas purificadas. P: polímeros, UM: moléculas de globulina-p. g11S: moléculas de globulina 11S. Tinción Coomasie Brillant Blue.

El perfil de las moléculas de globulina 11S (Figura 14) es similar al de la fracción sin purificar (Figura 8). El perfil de los agregados de globulina-p (P) está constituido mayoritariamente por las bandas de baja movilidad que presentara el perfil de globulina-

p sin purificar (Figura 8) y en una proporción muy pequeña la banda más móvil señalada con una punta de flecha. El perfil de las moléculas de globulina-p (UM) presenta una banda mayoritaria de alta movilidad y una muy tenue que correspondería a agregados. Es de notar que la banda de UM tiene una movilidad menor que la observada para las moléculas de globulina 11S (g11S). Dado que ambas especies UM y g11S poseen la misma masa molecular (Martínez y col. 1997), este resultado nos estaría indicando que existen ligeras diferencias estructurales entre ambas moléculas que las llevan a exponer cargas distintas, siendo algo menor la de UM de globulina-p.

Para estudiar las diferencias de carga superficial de las fracciones purificadas mediante cromatografía de intercambio iónico, se emplearon dos sistemas cromatográficos, FPLC y HPLC (ver item 3.8.2 y 3.9.1, Materiales y Métodos), en ambos casos se obtuvieron resultados equivalentes. De acuerdo a los resultados que se muestran en la Figura 15**a**, los polímeros de globulina-p (P), se separaron en dos picos principales que eluyeron a una concentración de NaCl de 0,41M (II) y 0,53M (III) y un pico menos importante que eluyó a 0,35M (I) de NaCl. Como ya fuera informado (Castellani, 2000), las diferencias de carga detectadas por el intercambiador aniónico en la fracción polímeros, se relacionan con un aumento en el tamaño de las especies separadas en cada pico. Estos agregados poseen una mayor carga superficial.

Las moléculas de globulina p (UM) y globulina 11S (g11S) presentaron perfiles equivalentes con sólo algunas pequeñas diferencias. En la Figura 15**a** la fracción UM muestra un pico mayoritario que eluye a una concentración salina de 0,41M. Este pico es ancho, lo que puede relacionarse con la heterogeneidad de carga de las moléculas. A continuación está presente un pico menos importante que se corresponde con la banda de menor movilidad de la electroforesis (Figura 14). En cambio en el perfil correspondiente a g11S, sólo se observa un pico un poco más agudo que eluye a una concentración salina de 0,41M.

Cuando las muestras fueron analizadas por cromatografía de intercambio aniónico en HPLC, se obtuvieron resultados análogos (Figura 15**b**). La resolución alcanzada en el desarrollo de la cromatografía usando el sistema de HPLC es aparentemente mayor, de todos modos el gradiente de separación utilizado fue diferente por lo que no se puede hacer una comparación directa entre ambos sistemas. Los polímeros de globulina-p (P) de amaranto se resuelven en 3 picos principales señalados en la figura como 1, 2 y 4 que eluyen a una concentración salina de 0,290 M, 0,361 M y 0,498 M respectivamente y un hombro del pico 4 que eluye a una concentración salina de 0,440 M señalado como 3 en

la figura. Las moléculas de globulina p (UM) y globulina 11S (g11S) presentaron perfiles similares aunque en UM la carga superficial sería ligeramente mayor que para g11S.

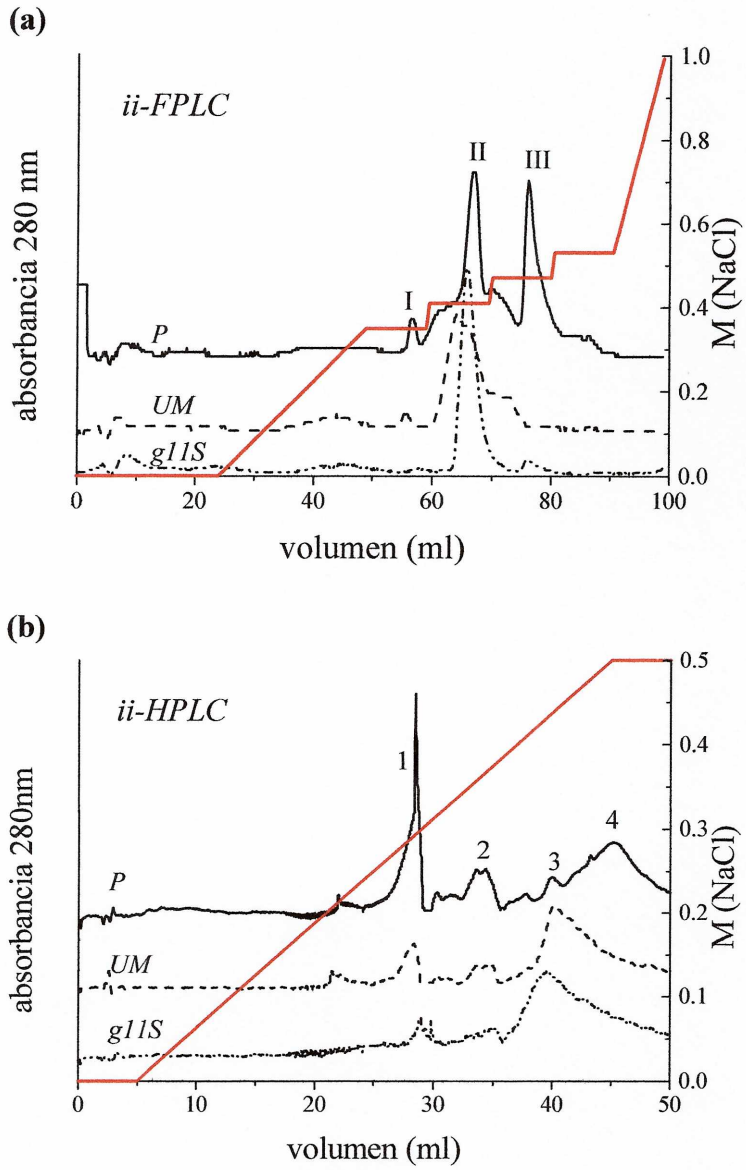


Figura 15. (a) Cromatografía de intercambio iónico FPLC (columna Hi-Trap, Pharmacia, Upsala, Suecia). Con línea roja se indica el gradiente de NaCl entre 0 y 1,0 M, escalonado a 0,35, 0,41, 0,47 y 0,53 M. (b) Cromatografía de intercambio iónico mediante HPLC (Columna Waters AP mini column Q 8HR). Con línea roja se indica el gradiente lineal de NaCl entre 0 y 0,5 M. Muestras analizadas: P, polímeros de globulina-p; UM, moléculas de globulina-p; g11S moléculas de globulina 11S.

Estos resultados no muestran diferencias de carga importantes entre UM y g11S, por lo que resulta difícil encontrar una explicación para la distinta movilidad de estas especies en la electroforesis no desnaturalizante (Figura 14). Sin embargo, podemos pensar que pueden existir tanto diferencias de carga no detectadas por la cromatografía de

intercambio iónico como una diferencia de masa entre las moléculas de ambas globulinas que no fue resuelta en la cromatografía de exclusión molecular.
De los resultados analizados hasta el momento, podemos concluir que existen pequeñas diferencias en la calidad de las moléculas de globulina-p (UM) respecto de las de globulina 11S.

4.2 Determinación de la hidrofobicidad superficial de las globulinas purificadas

La hidrofobicidad que presenta una proteína en su superficie surge de un complejo balance entre la estructura nativa que adopta y la composición de aminoácidos característica para dicha proteína. Diferencias de secuencia que pueden llevar o no a distintos arreglos conformacionales, podrían reflejarse en diferentes hidrofobicidades expuestas. Por esta razón la variación en las propiedades fisicoquímicas de las globulinas en estudio podría explicarse a partir del conocimiento de sus hidrofobicidades superficiales.
Uno de los métodos para determinar la hidrofobicidad de una proteína se basa en el empleo de sondas fluorescentes, que se caracterizan por incrementar el rendimiento cuántico de fluorescencia y disminuir la longitud de onda a la que se encuentra el máximo de emisión cuando pasan de estar en un medio hidrofílico a encontrarse en un medio hidrofóbico. Esta condición se cumple cuando, estando en solución acuosa, la sonda se une a membranas o cavidades hidrofóbicas que se forman en algunas proteínas (Figura 16).
Dentro de las sondas más populares utilizadas para tal fin, encontramos al 1-(anilino)-naftalen-8-sulfonato (ANS) (Hayakawa y Nakai, 1985). Esta sonda es estable y soluble en un amplio rango de pHs, por lo que fue seleccionada para la determinación.

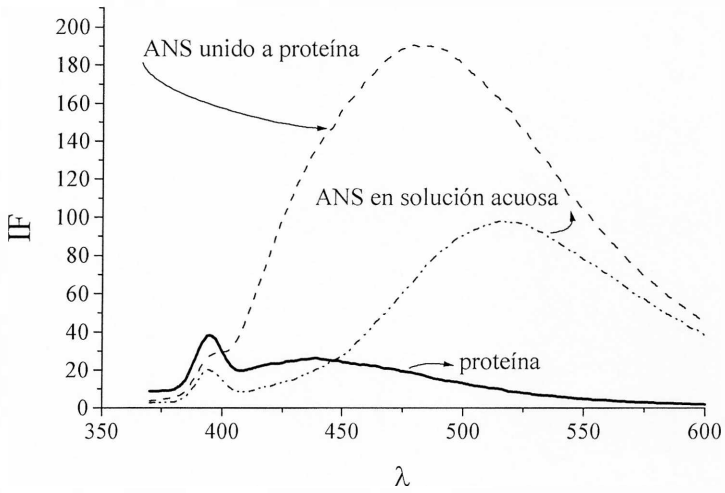


Figura 16. Espectros de emisión de la sonda ANS libre en una solución acuosa, ANS unida a una proteína, la proteína libre en solución. Solvente: buffer B. En los tres casos se empleó una longitud de onda de excitación de 350nm.

Las medidas se pueden realizar de dos maneras; determinando la pendiente de la recta que se obtiene al representar gráficamente la fluorescencia relativa en función de la concentración de proteína (Kato y Nakai, 1980), o se puede determinar mediante la evaluación de algunas características de la fluorescencia como el corrimiento de la longitud de onda de máxima emisión hacia el azul, los rendimientos cuánticos, las constantes de afinidad y los números de sitios de unión (Cardamone y Puri, 1992).

De acuerdo a lo dicho anteriormente y continuando con el análisis de la superficie de las especies proteicas purificadas, se determinó la hidrofobicidad superficial de las mismas utilizando la sonda fluorescente ANS. Para ello se estimó la constante de afinidad (K_a) de cada una de las proteínas por la sonda, la hidrofobicidad superficial (H_0) y el número de sitios de unión a la sonda por miligramo de proteína (n° sitios/mg proteína) en cada una de las fracciones analizadas (ver item 3.7, Materiales y Métodos).

En la Figura 17 se muestran las curvas de titulación con ANS de cada una de las muestras analizadas.

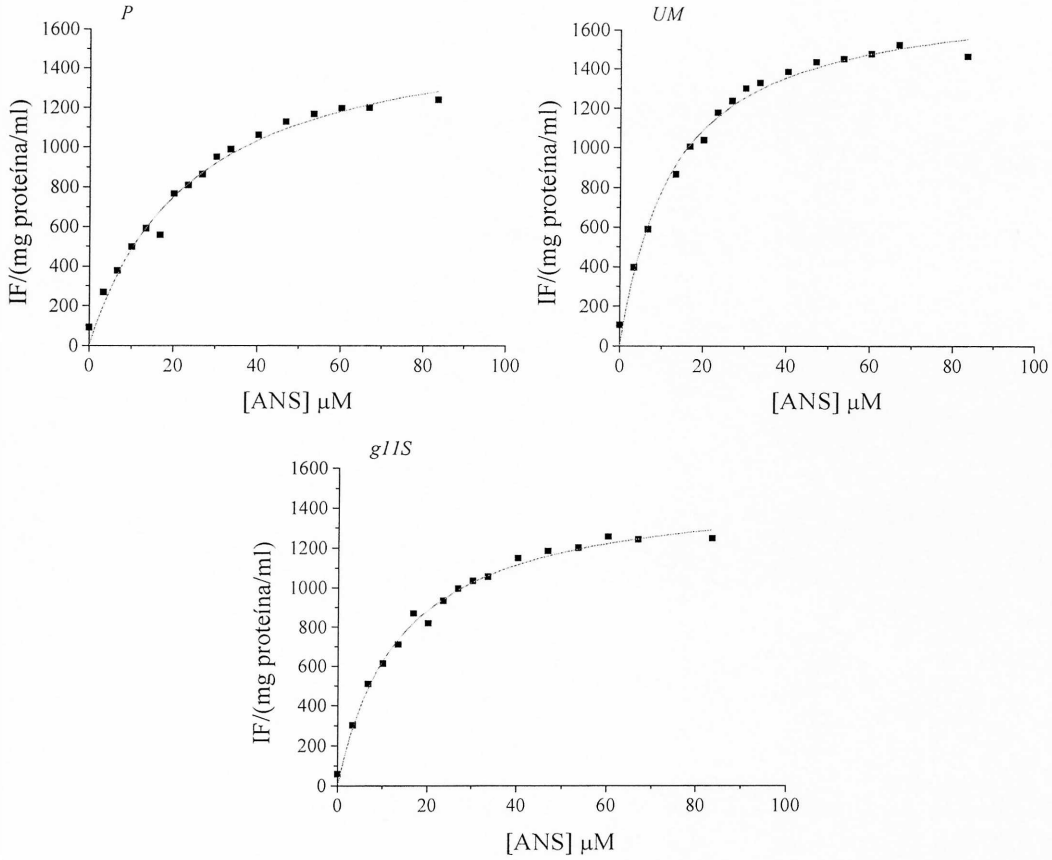


Figura 17. Curvas de titulación de las distintas proteínas con ANS mediante medida de intensidad de fluorescencia (IF). P: polímeros de globulina-p, UM: moléculas de globulina-p, g11S: moléculas de globulina 11S. La línea contínua muestra la curva de ajuste empleada para la determinación de los parámetros: H_0, K_a.

A partir de las curvas de saturación obtenidas para cada proteína se calcularon los parámetros que se listan en la Tabla 8 (ver item 3.7, Materiales y Métodos).

Tabla 8. Parámetros determinados a partir de las curvas de titulación con ANS de P y UM de globulina-p y g11S.

Fracciones	H_0 (IF/mg/ml proteína)	K_a (1/μM)	n/(mg proteína)
P	$1655^a \pm 263$	$0.042^a \pm 0.003$	$1571^a \pm 247$
UM	$1808^a \pm 334$	$0.080^b \pm 0.010$	$1856^a \pm 189$
g11S	$1512^a \pm 264$	$0.070^b \pm 0.001$	$1512^a \pm 258$

H_0: Hidrofobicidad superficial, K_a: constante de afinidad proteína-sonda, n: número de sitios de unión. Los valores con los mismos superíndices no son significativamente diferentes ($\alpha = 0,05$).

De acuerdo a los resultados obtenidos del análisis de las curvas, las tres especies proteicas, agregados (P), moléculas (UM) de globulina-p y moléculas de globulina 11S (g11S) presentan un valor de hidrofobicidad superficial (H_0) y un número de sitios de

unión (n) que no son significativamente diferentes. Sin embargo, los polímeros de globulina-p poseen una constante de asociación K_a significativamente inferior a las de las otras dos especies proteicas lo que nos está indicando una menor afinidad por la sonda.

La diferencia de afinidad encontrada entre los sitios hidrofóbicos de P respecto de los de g11S y UM sugiere que la superficie de las distintas especies proteicas no tiene expuestos los mismos sitios de unión por la sonda. Considerando que los polímeros están constituidos por UM unidas por puentes disulfuro y estabilizadas por otras interacciones no covalentes entre las que podemos incluir las interacciones hidrofóbicas (Castellani y col., 1999), podríamos pensar que los parches hidrofóbicos de mayor afinidad estarían ubicados en el interior de la estructura formada por los polímeros quedando en la superficie los sitios de menor afinidad para interaccionar con la sonda. Sin embargo, esto no se manifiesta en una disminución del valor de H_0 ni en el número de sitios de unión por la sonda (n). Podemos sugerir a partir de los resultados obtenidos en el presente trabajo que las moléculas de globulina-p (UM) han sufrido un cambio conformacional al agregarse que las lleva a exponer grupos distintos en su superficie, aunque no podemos descartar que la carga negativa del ANS esté participando en la interacción de esta molécula con la superficie de proteína favoreciendo o entorpeciendo la unión.

Se desprende además que tanto las moléculas de globulina-p como de globulina 11S poseerían superficies semejantes en cuanto a su hidrofobicidad.

Los resultados obtenidos por Castellani (2000) quien determinó la hidrofobicidad superficial (H_0) de P, UM y globulina 11S de amarnato sin purificar mediante el método propuesto por Kato y Nakai (1980), están de acuerdo con los determinados en este trabajo. Sin embargo, debido a las diferencias en la metodología empleada para la determinación los valores absolutos encontrados en uno y otro caso no pueden ser comparados directamente.

Gorinstein y col. (2001), determinaron la H_0 para las fracciones globulina y albúmina-2 (globulina-p) crudas de amaranto y soja, encontrando que la hidrofobicidad superficial de la fracción globulina-p es mayor que la de globulina 11S. Los resultados obtenidos en el presente trabajo no concuerdan con los descritos por estos autores, pudiendo atribuirse las diferencias encontradas al grado de purificación de las muestras analizadas en uno y otro caso.

Marcone y Yada (1992), no pudieron determinar la hidrofobicidad de globulina 11S de amaranto utilizando ANS, atribuyendo este resultado a la existencia sobre la superficie de globulina de una gran cantidad de aminoácidos con carga negativa lo que restringiría la posibilidad de unión del ANS con la proteína. Sin embargo, determinaron la hidrofobicidad usando ácido cis-parinárico (CPA) una sonda fluorescente que mide mayoritariamente la hidrofobicidad debida a cadenas alifáticas, encontrando un máximo relativo a pH 5,50. No hemos podido precisar las razones por las que nuestra experiencia no concuerda con la de los citados autores.

4.3 Análisis por RP-HPLC de las fracciones purificadas.

Como una manera alternativa de analizar la hidrofobicidad de las fracciones, se estudió su comportamiento cuando fueron sometidas a una separación por cromatografía de alta eficiencia en fase reversa (RP-HPLC). Los resultados se muestran en la Figura 18.

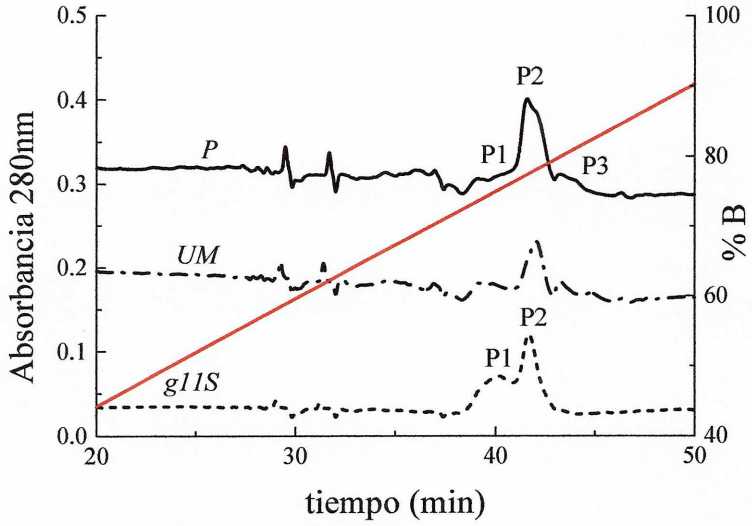


Figura 18. Cromatografía de alta eficiencia en fase reversa (RP-HPLC) de las muestras: P, polímeros de globulina-p; UM, moléculas de globulina-p; g11S moléculas de globulina 11S. Con línea roja se indica el gradiente empleado.

Se observa en la figura que los perfiles correspondientes a los polímeros y a las moléculas de globulina-p son similares. Ambos se separan en tres especies con diferente tiempo de retención (P1, P2 y P3). Sin embargo la proporción en la que se encuentran estos picos es diferente. En los polímeros, aproximadamente el 60 % del área corresponde a P2 y el resto se reparte entre P1 y P3 en partes iguales, mientras que en UM a P1, P2 y P3 le corresponde un 36, 34 y 30 % del área respectivamente.

El perfil correspondiente a globulina 11S, se separó en dos picos importantes, P1 (40%) y P2 (60%) que eluyeron a tiempos de retención equivalentes a los encontrados para los componentes de globulina-p.

Si consideramos que la separación encontrada se basa únicamente en la diferencia de hidrofobicidad de las especies en estudio, podemos sugerir que los polímeros de globulina-p tienen una mayor hidrofobicidad que el resto de las fracciones analizadas, ya que reúnen entre las dos especies más hidrofóbicas determinadas en este ensayo (P2 y P3) al 80% de sus componentes, mientras que las UM alcanzan un 64% y g11S un 60 % sólo de las especies que eluyen en P2 ya que P3 no está presente para esta última. Sin embargo, no debemos olvidar que no sólo existe este tipo de interacción entre la columna y la muestra, sino también otros múltiples efectos que contribuyen a la separación de una muestra por este método. Además, no se debe perder de vista que la estructura de la proteína puede verse afectada durante la separación, siendo una de las causas principales de su desnaturalización la hidrofobicidad de la fase estacionaria interrumpiendo las interacciones hidrofóbicas que la estabilizan (Lau y col., 1984; Cardamone y Puri, 1992). Debido a las razones anteriormente expuestas, el resultado obtenido nos estaría dando cuenta de un valor de hidrofobicidad total de las proteínas analizadas no siendo comparable al determinado con la sonda fluorescente ANS, para las proteínas con su estructura nativa conservada.

De acuerdo a las consideraciones anteriores estos resultados nos sugieren ciertas diferencias entre globulina p y globulina 11S en cuanto a la hidrofobicidad total de ambas fracciones proteicas. Siendo menor para la fracción globulina 11S.

4.4 Caracterización de la estructura terciaria de globulina y globulina-p mediante espectroscopía de fluorescencia

En la espectroscopía de fluorescencia, los tres aminoácidos aromáticos fenilalanina, tirosina y triptofano pueden contribuir a la fluorescencia intrínseca característica de cada proteína. Sin embargo, en la mayoría de los casos el comportamiento de la fluorescencia de una proteína está dominado por la emisión de los residuos de triptofano (Lackowicz, 1999b)

Una característica importante de la fluorescencia intrínseca de las proteínas es la alta sensibilidad de los residuos triptofano al ambiente que los circunda. Se pueden observar frecuentemente cambios en la emisión y el rendimiento cuántico de fluorescencia de

estos residuos en respuesta a un cambio conformacional que sufra una proteína, la asociación de subunidades, la unión de algún sustrato específico, o la desnaturalización, es decir, todo lo que afecte en alguna medida al microambiente que rodee al anillo del indol.

Se ha intentado clasificar a las proteínas teniendo en cuenta su espectro de emisión. A medida que los residuos de triptofano se encuentran en contacto con ambientes cada vez más polares, es decir más cercanos a la superficie proteica, el espectro de emisión se corre hacia zonas de menor energía (mayor longitud de onda). Son importantes además, los residuos aminoacídicos que se encuentran en las cercanías de los restos de triptofano en el interior hidrofóbico de las proteínas, ya que la presencia de ciertos grupos específicos puede producir un apagamiento en la señal de emisión, absorbiendo la energía emitida, registrándose entonces una intensidad de fluorescencia menor en el detector.

Como se observa en la Figura 19, se analizaron en forma comparativa los espectros de fluorescencia de polímeros (P) y moléculas (UM) de globulina-p, y moléculas de globulina 11S (g11S), con el fin de comparar los entornos que presentan los residuos triptofano en estas fracciones. Todos los espectros están referidos a la misma masa de proteína en solución (buffer B) y son el promedio de cuatro determinaciones para cada proteína.

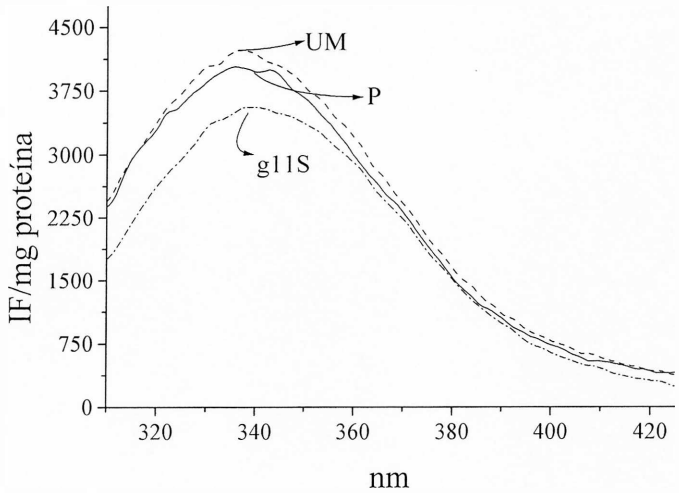


Figura 19. Espectros de fluorescencia de las diferentes especies estudiadas disueltas en buffer B. P: polímeros de globulina-p, UM: moléculas de globulina-p, g11S: moléculas de globulina 11S. La longitud de onda de excitación empleada fue 290 nm. El espectro de emisión fue barrido entre 310 nm y 550 nm. Todas las curvas están graficadas por mg de proteína soluble.

De acuerdo a la clasificación de los diferentes triptofanos en la molécula de proteína según su espectro de emisión, estas fracciones poseerían la mayoría de sus triptofanos, en la superficie de la proteína en contacto con H_2O de movilidad menor a la del H_2O libre (triptofanos tipo II, λ=340-342 ancho=53-55, Permyakov, 1993).

Tabla 9. Parámetros de los espectros de emisión de P, UM y g11S.

Muestra	λ_{max} (nm)	IF_{max}
P	$337{,}6^a \pm 1{,}0$	$4463^a \pm 556$
UM	$337{,}9^a \pm 0{,}8$	$4219^a \pm 195$
g11S	$341{,}6^b \pm 0{,}8$	$3084^b \pm 453$

Los valores con los mismos superíndices no son significativamente diferentes (α = 0,05).

En la Tabla 9 se resumen los resultados presentados en la Figura 19. Del análisis de los mismos surgen diferencias significativas entre las moléculas de globulina 11S y el resto de las especies estudiadas tanto en la longitud de onda a la que se encuentra el máximo de emisión (λ_{max}) como en la intensidad de fluorescencia máxima por mg de proteína soluble. Este resultado nos sugiere que los entornos de los restos de triptofano de ambas moléculas son diferentes, de este modo es posible pensar que, o bien la estructura molecular, o bien la proporción de triptófanos en la secuencia de aminoácidos de ambas proteínas sería distinta. De acuerdo a la primera hipótesis, en las moléculas de globulina 11S los triptofanos se encontrarían un poco más expuestos a un ambiente más hidrofílico que en las moléculas de globulina-p (UM) y estarían rodeados por restos capaces de apagar parcialmente la fluorescencia emitida por los aminoácidos aromáticos. De acuerdo a la segunda hipótesis las diferencias en la intensidad de fluorescencia podrían ser atribuidas a cantidades diferentes de triptofano en la secuencia de aminoácidos.

En un análisis similar de los datos obtenidos para las moléculas (UM) y los polímeros (P) de globulina-p no se encontraron diferencias significativas. Esto sugiere que, al menos a través de esta metodología de estudio de estructura terciaria, los tripotofanos presentes en UM y P se encuentran en ambientes equivalentes.

Gorinstein y col. (1996b) analizaron la estructura terciaria de las globulinas de amaranto y quinoa no purificadas encontrando un valor de λ_{max} similar (341,5 nm) al determinado en este trabajo para globulina 11S de amaranto. Sin embargo, algunos de estos autores en un trabajo posterior informaron valores de λ_{max} de 338 nm para la fracción globulinas

y 351 nm para globulina-p sin purificar de soja y amaranto contradiciendo los valores informados anteriormente (Gorinstein y col., 2001).

Ma y Harwalkar (1988) informaron que globulina de avena en condiciones nativas presentaba un λ_{max} de 336 nm, mientras que, Schwenke y col. (2000) determinaron para la fracción globulinas de haba un valor de λ_{max} de 319 nm. En el caso de glicinina y β-conglicinina de soja (Lakemond y col., 2000a y Sze y col., 2007) se han informado valores de λ_{max} de aproximadamente 340 nm y 344 nm respectivamente, sugiriendo que los triptofanos de la fracción globulina 7S se encuentran en un ambiente más polar que los de globulina 11S. Estas diferencias son del orden de las encontradas en este trabajo.

Por otro lado, Marcone y col. (1998b) y Marcone (1999b), estudiaron la estructura terciaria de globulinas de varias especies de Monocotiledóneas y Dicotiledóneas mediante dicroísmo circular en el UV-cercano que es otra forma de analizar la estructura terciaria de una proteína. Estos autores encontraron que, a diferencia de lo que ocurre con la estructura secundaria, la estructura terciaria es muy variable entre las distintas globulinas revelando que existen diferencias sustanciales entre el arreglo, proximidad y exposición de los aminoácidos aromáticos en la superficie proteica. Las diferencias encontradas en el presente trabajo entre las globulinas de amaranto están de acuerdo con dichos resultados. Teniendo en cuenta las limitaciones de la técnica aplicada para el estudio de la estructura terciaria de globulina-p y globulina 11S, la utilización de métodos alternativos nos permitiría obtener resultados más precisos.

4.5 Tratamiento con urea y 2-mercaptoetanol

La estructura nativa que adopta una proteína resulta de un delicado balance de fuerzas. Para que una proteína adquiera su estructura nativa, las fuerzas que favorezcan la formación de la misma (generalmente interacciones no covalentes) deberán superar a las que se opongan (principalmente entropía conformacional). El cambio de energía libre (ΔG) asociado al proceso de desnaturalización de una proteína –N(nativo) $\leftrightarrow$ D(desnaturalizado)– se denomina estabilidad conformacional.

Una forma de analizar y comparar la estabilidad conformacional de una proteína es evaluar su comportamiento frente a la acción de agentes desnaturalizantes. De este modo fue nuestro propósito estudiar los cambios que sufren globulina-p (P y UM) y globulina 11S (g11S) purificadas cuando son sometidas a una desnaturalización parcial por agentes químicos como urea y 2-mercapotoetanol (2ME). Los cambios

conformacionales fueron seguidos por espectroscopía de fluorescencia y electroforesis nativa.

En una primera instancia, las fracciones P, UM y g11S fueron sometidas a una desnaturalización progresiva usando urea como agente desnaturalizante. Los espectros obtenidos para alguna de las concentraciones de urea ensayadas se muestran en la Figura 20.

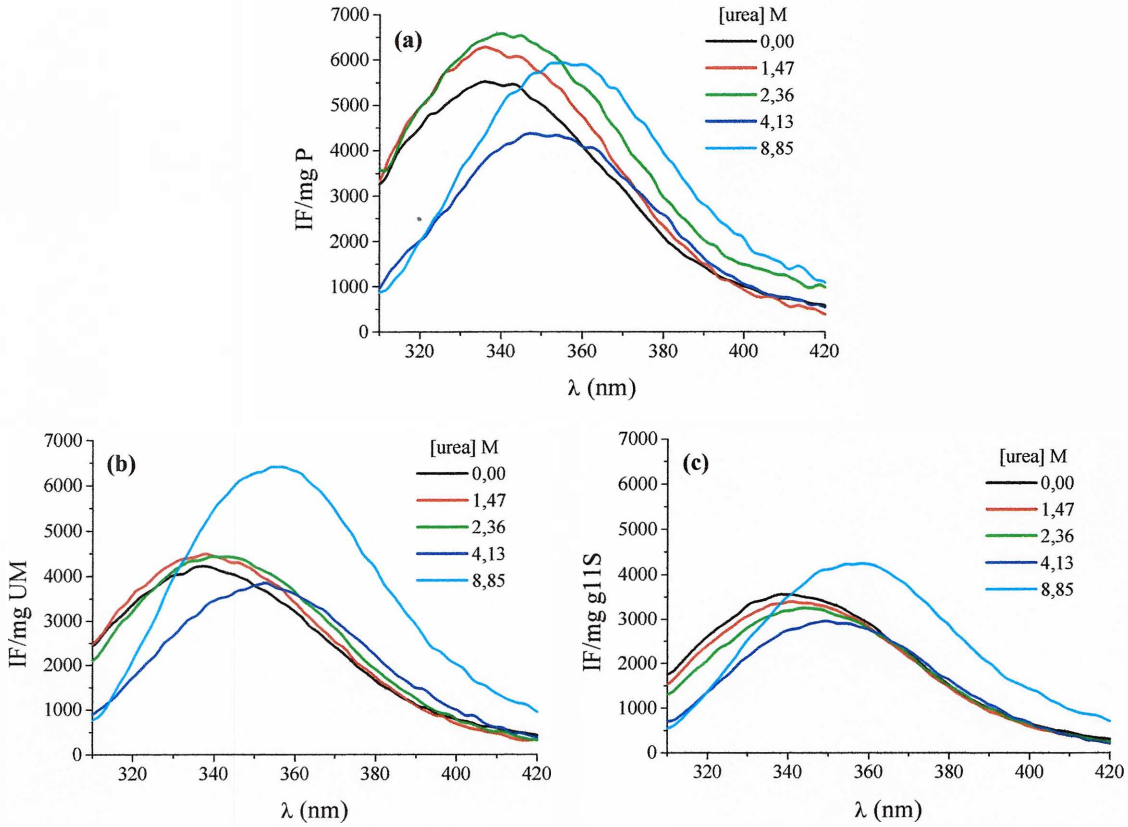


Figura 20. Espectros de fluorescencia por unidad de masa, λ_{exc}=295 nm. (a) P, (b) UM y (c) g11S. En la figura se indica la concentración de urea a la que se midió cada espectro de fluorescencia.

Del análisis de estos resultados se desprende que existe un cambio paulatino en el entorno de los residuos de triptofano al aumentar la concentración de urea. El desplazamiento observado en la longitud de onda del máximo del espectro de emisión hacia valores mayores (zona de menor energía) a medida que aumenta la concentración de desnaturalizante, es característico de un incremento en el desorden de la estructura proteica y por consiguiente de una mayor exposición de los restos hidrofóbicos hacia un medio más polar (Lakowicz, 1999a y b).

Al graficar las longitudes de onda de máxima emisión (λ_{max}) de cada espectro en función de la correspondiente concentración de urea (Figura 21) vemos que las especies proteicas muestran diferencias en su comportamiento.

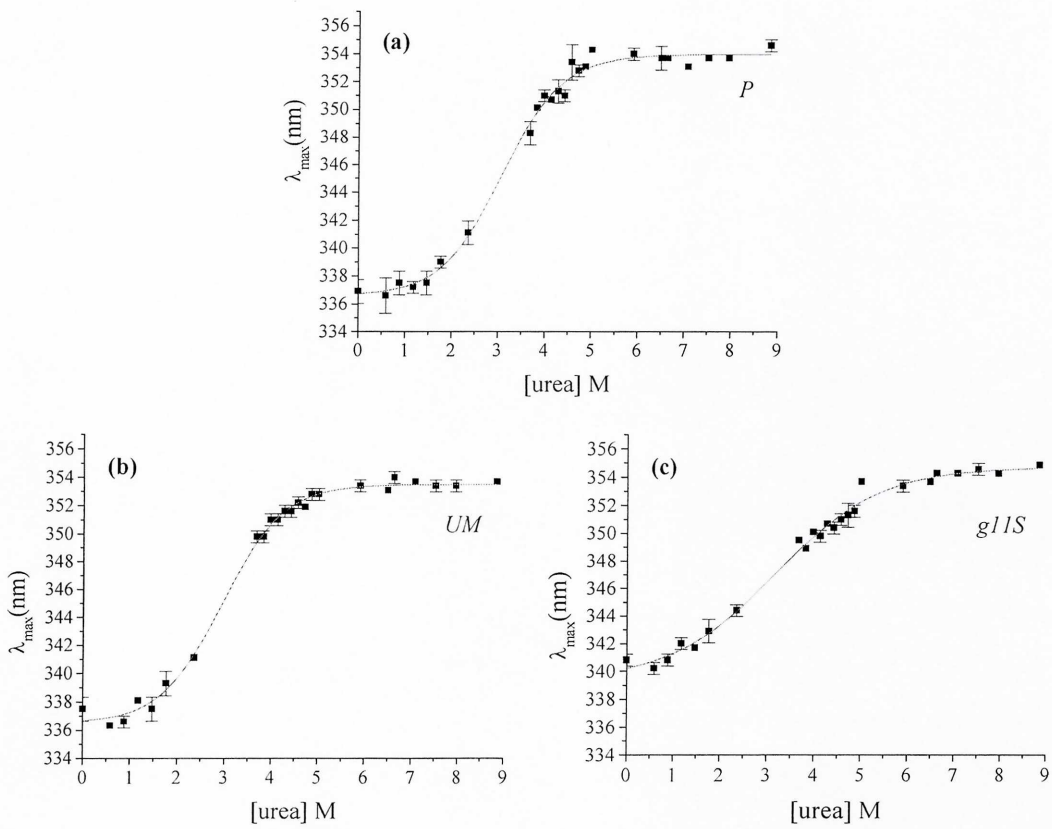


Figura 21 Curvas de desnaturalización con urea. (a) P, (b) UM y (c) g11S. Se representa la longitud de onda del máximo de emisión de los espectros de fluorescencia vs la concentración de urea. Longitud de onda de excitación 295nm. La línea contínua muestra la curva de ajuste de los puntos experimentales.

De las curvas de ajuste se determinaron una serie de parámetros: la concentración molar de urea cuando la proteína está un 50% desnaturalizada (U_{50}), la relación entre las concentraciones de urea cuando la proteína está desnaturalizada un 80 % y un 20% (U_{80}/U_{20}) factor que determina la cooperatividad del proceso de desnaturalización y finalmente la estabilidad conformacional de las proteínas en estudio ΔG_{H2O} (kcal/mol) (ver item 3.11.1, Materiales y Métodos). Los resultados se resumen en la Tabla 10.

Tabla 10 Parámetros de estabilidad globulinas purificadas*.

Fracciones	U_{50} (M)	U_{80}/U_{20}	ΔG_{H2O} (kcal/mol)
P	$3{,}09^a \pm 0{,}06$	$1{,}813^a \pm 0{,}007$	$3{,}1^a \pm 0{,}1$
UM	$3{,}00^a \pm 0{,}20$	$1{,}860^a \pm 0{,}060$	$2{,}9^a \pm 0{,}1$
g11S	$3{,}19^a \pm 0{,}06$	$2{,}900^b \pm 0{,}500$	$2{,}2^b \pm 0{,}3$

*** calculados a partir de la curva de ajuste propuesta para cada ensayo. Los valores con los mismos superíndices no son significativamente diferentes (α = 0,1).**

No se encontraron diferencias significativas entre los valores de U_{50}. Sin embargo, el factor de cooperatividad del proceso de desnaturalización (U_{80}/U_{20}) fue significativamente diferente con un nivel de confianza del 90% para los polímeros (P) y las moléculas (UM) de globulina-p con respecto a las moléculas de globulina 11S (g11S). El menor valor de este factor para P y UM implica que su estructura se desorganiza de un modo más cooperativo que la de g11S.

Por otra parte, también se encontraron diferencias significativas con una confianza del 90%, entre el valor de ΔG_{H2O} de P y UM con respecto al de g11S. Esto nos estaría indicando que P y UM poseen una estructura nativa más estable que g11S. Entre P y UM no se encontraron diferencias significativas para este parámetro.

Aunque la conformación nativa es esencial para asegurar el correcto desempeño de la función asociada a una proteína, la estabilidad conformacional de las mismas es relativamente baja, siendo el estado nativo solamente entre 5 y 15 kcal más estable que el estado desnaturalizado (Shirley, 1995). Schwenke y col. (2001) determinaron un valor de ΔG_{H2O} = 5,1 kcal/mol para legumina de arveja utilizando en la desnaturalización cloruro de guanidinio. Sin embargo, los resultados informados por Vaintraub y Morari (2003), en un experimento similar realizado sobre glicinina de soja pero utilizando urea como desnaturalizante, arrojaron valores de estabilidad conformacional (ΔG_{H2O}) y de U_{50} similares a los encontrados en este trabajo.

Gorinstein y col. (1996a y b) y Gorinstein y col. (2001) analizaron el efecto del tratamiento con urea en altas concentraciones sobre la conformación de globulinas de amaranto, quinoa y soja. Al igual que en este trabajo, sus resultados muestran un corrimiento en la λ_{max} de emisión y una disminución progresiva de la intensidad de fluorescencia a medida que aumenta la concentración del desnaturalizante. Los resultados presentados no son comparables ya que no realizaron un análisis equivalente al del presente trabajo.

Sze y col. (2007) analizaron las modificaciones producidas sobre la estructura de globulina 11S y 7S de soja por acción de distintos desnaturalizantes químicos. Estos autores informaron un corrimiento del λ_{max} de emisión hacia el rojo para ambas globulinas a medida que se incrementa la concentración del agente desnaturalizante, encontrando que para una concentración de urea mayor que 4 M los triptofanos de ambas globulinas se encuentran completamente expuestos en la superficie. Los resultados obtenidos por estos autores están de acuerdo con los presentados en este

trabajo, puesto que encontramos una fracción desnaturalizada (F_D) de aproximadamente 90 % para todas las proteínas en estudio a esta concentración de urea.

Como otra forma de abordar el estudio de la conformación de las globulinas, se trataron las tres especies proteicas con distintas concentraciones de 2-mercaptoetanol (ver item 3.11.2, Materiales y Métodos), se analizaron luego mediante electroforesis no desnaturalizante y espectroscopía de fluorescencia, los resultados de muestran en la Figura 22 y Figura 23 respectivamente.

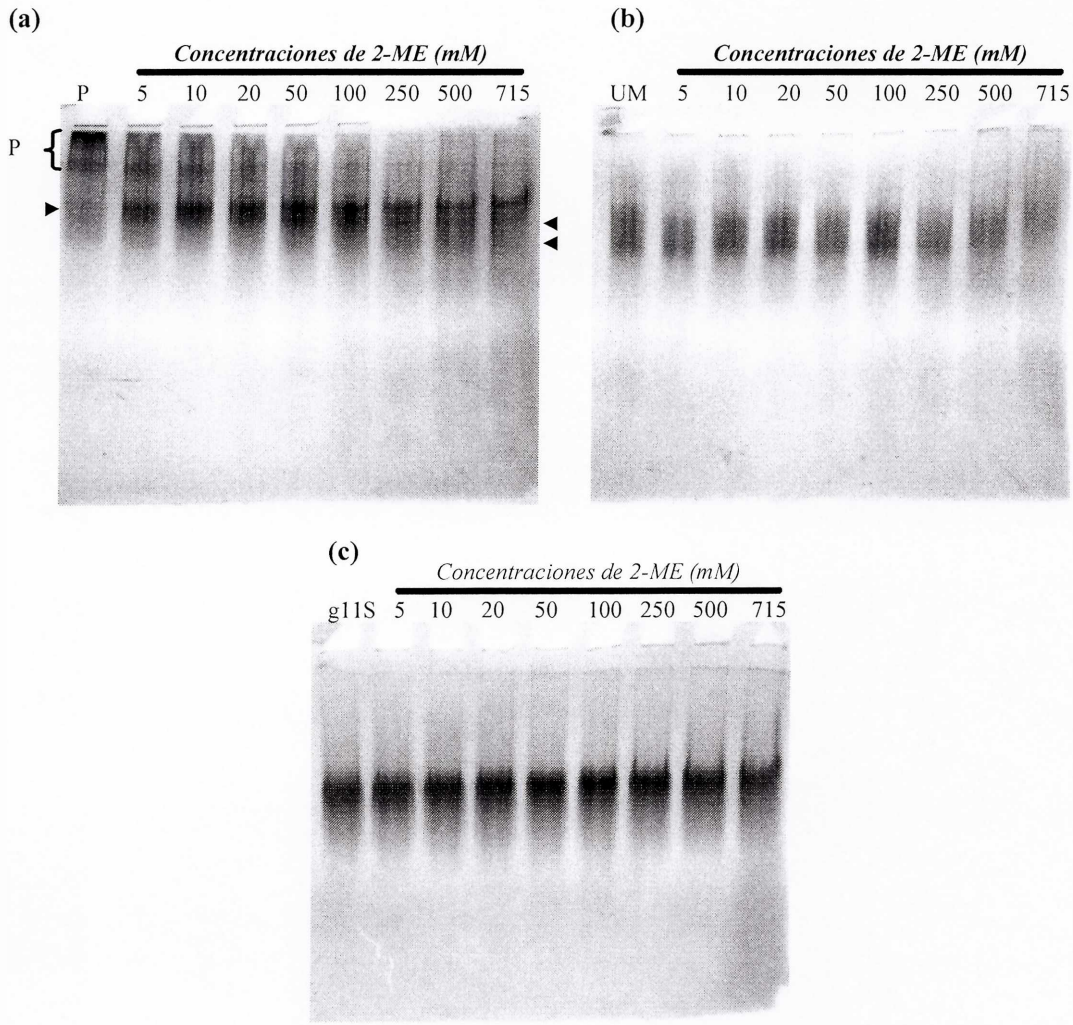


Figura 22. Electroforesis no desnaturalizante de las fracciones tratadas con distintas concentraciones de 2-mercaptoetanol: (a) P, (b) UM, (c) g11S. En la parte superior de cada gel se indican las concentraciones de 2ME. Concentración de acrilamida, 6%. Tinción Coomasie Brillant Blue.

En la fracción agregados de globulina-p (Figura 22**a**) se observa una disminución paulatina en la intensidad de las bandas de menor movilidad (señaladas como P en la figura) junto con un aumento de la intensidad de la banda más móvil (señalada con una

punta de flecha en el lado izquierdo del gel) al incrementar la concentración del agente reductor hasta 20 mM. Este resultado indica una disminución en la cantidad de polímeros, y un aumento equivalente de las moléculas libres de globulina-p confirmando lo informado por Castellani y col. (1999) que indica que la unión disulfuro es una de las principales interacciones que estabilizan la estructura de los agregados de globulina-p. A concentraciones superiores a 50 mM se observa una disociación de las moléculas en especies de menor tamaño dando origen a bandas con mayor movilidad señaladas con puntas de flecha en el lado derecho del gel.

Por otra parte, no se aprecia una modificación importante en los perfiles electroforéticos de UM y g11S tratadas en las mismas condiciones que la fracción P (Figura 22(**b**) **y** (**c**)).

Los espectros de fluorescencia medidos para las distintas fracciones en estudio en presencia de algunas de las concentraciones de 2-mercaptoetanol utilizadas anteriormente se presentan en las Figura 23.

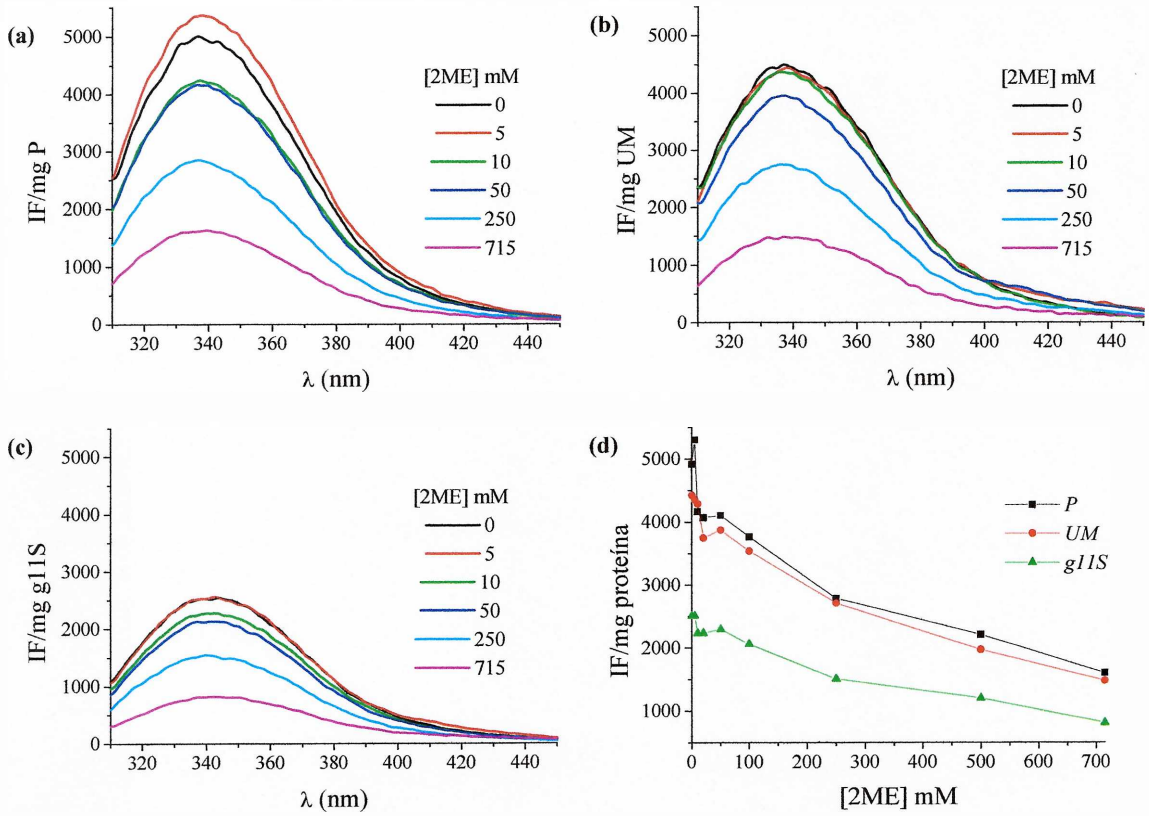


Figura 23. Espectros de fluorescencia a distintas concentraciones de 2ME, λ_{exc}=290 nm. (a) P, (b) UM y (c) g11S. Inserto en la figura se detalla la concentración de 2ME a la que se midió cada uno de los espectros de fluorescencia presentados como ejemplo. Todas las curvas están normalizadas para 1 mg de proteína. (d) curva de desnaturalización para las tres especies proteicas. Se representa la IF/IF_0 vs concentración de 2ME en mM.

Se puede observar que para las tres fracciones proteicas (Figura 23 **(a)**, **(b)** y **(c)**) el agregado del agente reductor no produce un desplazamiento en la longitud de onda de máxima emisión.

Contrariamente a lo que se observa en otras proteínas (Lin y col., 1996; Lin y col., 2007) en las tres especies estudiadas la intensidad de fluorescencia y la longitud de onda de máxima emisión no se vieron sustancialmente modificadas hasta una concentración del agente reductor de 50 mM. Se observó un comportamiento similar cuando glicinina de soja fue tratada con el agente reductor (Sze y col., 2007), lo que indica alteraciones mínimas del microambiente de los residuos triptofano. Del mismo modo, Kim y col. (2004) y Choi y Ma (2005) han informado cambios mínimos sobre los termogramas de globulina 11S de soja y globulina 11S de trigo sarraceno, respectivamente, cuando son tratadas con un agente reductor hasta una concentración de 10 mM. Por otra parte, Castellani y col. (1999) no encontraron diferencias significativas en los termogramas de globulina–p cuando esta fracción fue tratada con el agente reductor hasta una concentración de 300 mM. Sin embargo, a concentraciones de 20 mM del agente reductor, observaron cambios importantes en la distribución de tamaños moleculares mediante cromatografía de exclusión molecular, disminuyendo sustancialmente la cantidad de agregados de alto peso molecular e incrementándose la cantidad de moléculas de globulina-p.

La falta de cambios en la longitud de onda de máxima emisión emisión que muestran nuestros resultados, nos permite inferir que aunque el 2ME es capaz de romper los enlaces disulfuro que hay en P, g11S y UM la estabilidad conformacional de estas fracciones no se ve sustancialmente afectada debido posiblemente a la presencia de otras interacciones de tipo no covalentes que estabilizan la estructura proteica.

Teniendo en cuenta que la estructura de los polímeros de globulina-p está consolidada por enlaces disulfuro y considerando que los polímeros se desagregan para formar UM al ser tratados con el agente reductor (Martínez, 1997, Castellani y col., 1999), los resultados nos indican que tanto las moléculas (UM) de globulina-p como aquellas provenientes de la desagregación, poseen estructuras muy similares, ya que sus espectros de fluorescencia no difieren (Figura 23 **(a)**, **(b)**). Esto sugiere que las moléculas de globulina-p sufren cambios estructurales al agregarse y descarta la posibilidad que exista cierta segregación de moléculas con características ligeramente diferentes a las UM con una tendencia mayor a la formación de los agregados.

A concentraciones superiores a 50 mM del agente reductor, se observa una disminución equivalente en la intensidad de fluorescencia para todas las proteínas estudiadas. Esto se debe principalmente a la alta densidad óptica que tiene la muestra a la longitud de onda de la luz empleada para excitar a los triptofanos (λ_{exc} = 290 nm) debido a la absorbancia del 2ME (Lakowicz, 1999c). Como consecuencia de ello, se observa un efecto de apagamiento en la intensidad de fluorescencia emitida ya que la mayor parte de la luz incidente es absorbida por el agente reductor disminuyendo el número de moléculas en condiciones de emitir fluorescencia. De este modo quedan enmascaradas posibles modificaciones estructurales que provocaran un cambio en la intensidad de fluorescencia. Estos posibles cambios podrían ser observados mediante otras técnicas según fuera informado por Castellani y col. (1999). De todas formas podemos especular que los cambios que provoca el agente reductor sobre la estructura proteica son diferentes a los producidos por la urea ya que no se modifica la λ_{max}.

4.6 Determinación del contenido de enlaces disulfuro de las fracciones purificadas

En estudios realizados previamente en nuestro laboratorio (Castellani, 2000; Castellani y col., 1999) se determinó la cantidad de restos de cisteína que se encontraban comprometidos formando enlaces disulfuro (SS) y los sulfhidrilos libres (expuestos y totales) para las fracciones no purificadas globulina-p y globulina 11S, encontrándose que la mayor parte de los restos SH no son reactivos en condiciones nativas, hecho que coincide con otras determinaciones realizadas en proteínas similares (Hoshi y Yamauchi, 1983; Choi y Ma, 2006; Choi y col., 2006). Para completar la caracterización de las especies purificadas de globulina-p y globulina 11S se llevó a cabo la determinación de sulfhidrilos totales en estas fracciones siguiendo el método propuesto por Thannhauser y col. (1984) con algunas modificaciones (ver item 3.12, Materiales y Métodos).

Dadas las limitaciones del método utilizado para la determinación, con el cual sólo fue posible medir la cantidad de SH totales (SH libres y la mitad de los comprometidos en uniones S-S) y debido a la imposibilidad de medir sólo a los SH libres dadas las pequeñas cantidades de proteína disponibles, se realizó un cálculo estimativo de la cantidad de enlaces disulfuro utilizando los valores de SH libres determinados previamente en nuestro laboratorio para las globulinas sin purificar.

Utilizando la proporción de sulfhidrilos libres respecto a sulfhidrilos totales determinada con anterioridad en el laboratorio (Castellani, 2000) para las fracciones sin purificar globulina-p y globulina 11S (10/73 y 7/65 respectivamente), se estimó el número de enlaces disulfuro presente en las fracciones purificadas polímeros de globulina-p (P) y moléculas de globulina 11S (g11S). En la Figura 24**a** se representan los valores de SH_t determinados para las fracciones purificadas y en la Figura 24**b** los enlaces disulfuro estimados de acuerdo a las aproximaciones descritas anteriormente.

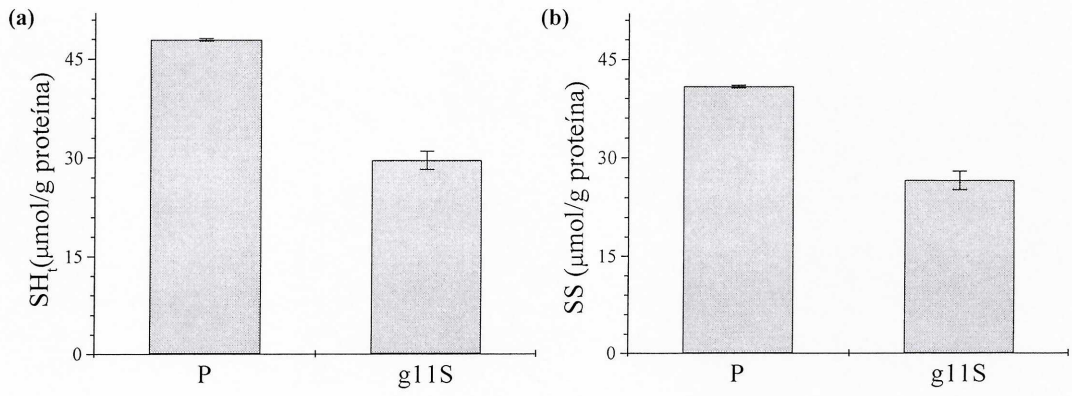


Figura 24. (a) Sulfhidrilos totales SH_t (µmol/g proteína), (b) Enlaces disulfuro SS estimados (µmol/g proteína), para: P (polímeros de globulina-p), g11S (moléculas de globulina 11S).

El contenido de enlaces disulfuro de g11S y P fue significativamente diferente, siendo mayor para los polímeros de globulina-p. Este resultado permite explicar, en parte, la marcada tendencia de globulina-p de formar polímeros, cuya estructura es estabilizada por este tipo de enlaces (Castellani y col, 1999) propiedad que la diferencia de globulina 11S.

Este resultado no es coincidente con el observado en las fracciones no purificadas las cuales no mostraron diferencias significativas en el contenido de puentes disulfuro (Castellani y col., 1999). Dada la diferencia en el grado de pureza de las muestras analizadas en uno y otro caso, la falta de concordancia de ambos resultados sería atribuible a la presencia de proteína contaminante en las fracciones no purificadas.

La cantidad de enlaces disulfuro estimada para la fracción globulina 11S purificada en este trabajo, es comparable con la informada para globulina 11S de amaranto por Marcone y Yada (1997) (33 µmol/g) y la determinada por Choi y Ma (2006) (36,4 ± 2,49 µmol/g) para la globulina 11S de trigo sarraceno.

4.7 Conclusiones

La fracción globulina-p de amaranto sólo ha sido descrita y reconocida como una fracción proteica independiente de globulina 11S por un número pequeño de autores, entre los que podemos nombrar a Konishi y col. (1991) que fueron los primeros en describirla, Gorinstein y col. (1999, 2001), Martínez y Añón (1996); Martínez y col. (1997), Castellani y col. (1998, 1999, 2000); Aphalo y col. (2004); de esto se deduce que las diferencias entre globulina 11S y globulina-p son sutiles. La característica más destacada que da cuenta de un comportamiento distinto entre estas fracciones es la solubilidad. De acuerdo a los resultados presentados en este trabajo la diferencia de solubilidad entre ambas globulinas es debida a la presencia de agregados (P) de alto peso molecular en la fracción globulina-p, que no están presentes en globulina-11S. Esto nos lleva a preguntarnos ¿cuáles son las diferencias que existen entre P y g11S que determinan un comportamiento tan distinto? Esta pregunta nos conduce a otra, ¿cuáles son las diferencias que hay entre las moléculas de globulina 11S (g11S) y las de globulina-p (UM) que permiten en el primer caso la existencia como entidades individuales y en el segundo la alta tendencia a la formación de agregados siendo estos últimos la forma predominante en la que encontramos a globulina-p?

Al comparar a los polímeros de globulina-p (P) con las moléculas de globulina 11S (g11S), nos encontramos con algunas diferencias entre ambas especies proteicas. Según información anterior (Martínez y col., 1997) y los presentes resultados, los polímeros (P) de globulina-p presentan un tamaño varias veces mayor al de las moléculas de globulina 11S (g11S) lo que explica la mayor carga expuesta detectada por cromatografía de intercambio iónico. Sin embargo, dada la diferencia de tamaño entre P y g11S no podemos inferir que la densidad de carga superficial sea distinta.

Los resultados del tratamiento con 2-mercaptoetanol (hasta 50mM), confirmaron que una de las principales interacciones que estabilizan la agregación de los polímeros corresponde a los enlaces disulfuro. Marcone y col. (1998a) informaron la existencia de especies agregadas de globulinas tipo 11S de Mono y Dicotiledóneas siendo las uniones disulfuro una de las interacciones principales involucradas en la estabilización de estas estructuras. En contraposición a este comportamiento, la g11S de amaranto presenta una menor tendencia a la agregación, lo que se explicaría a través de los resultados aquí expuestos que la muestran con un menor contenido de sulfhidrilos.

En base a los datos de λ_{max} determinados por espectroscopía de fluorescencia, la estructura de P sería más compacta que la de g11S, este mayor grado de compactación se puede atribuir a la presencia de una mayor cantidad de enlaces covalentes estabilizando la estructura de los polímeros. Ha sido estudiado e informado por varios autores (Permyakov, 1993; Lin y col., 1996; Lin y col., 2007), que la presencia de enlaces disulfuro en las cercanías de los triptofanos, pueden provocar un efecto de apagamiento sobre la intensidad de fluorescencia emitida por los mismos. Sin embargo, con el uso de esta técnica, se observó un comportamiento similar tanto de P como de g11S al ser tratadas con cantidades pequeñas de 2-mercaptoetanol, cantidades que provocan un efecto comprobado de desagregación de los polímeros mientras que no ejerce efecto sobre g11S. El hecho de no producirse un aumento en la intensidad de fluorescencia con el agregado de 2-mercaptoetanol cuando se analiza la fracción polímeros, nos estaría indicando que los enlaces disulfuro que los mantienen agregados están próximos a la superficie, mientras que los triptofanos se encontrarían más hacia el interior. El hecho de no haber observado un corrimiento en el λ_{max} durante el tratamiento con bajas concentraciones de 2ME nos sugiere que la desagregación de los polímeros no modifica los alrededores de los residuos de triptofano, de lo que podemos inferir que estos residuos hidrofóbicos no cambiarían su exposición al medio.

Los valores estimados para la estabilidad conformacional y la cooperatividad del proceso de desnaturalización cuando se trata a las especies proteicas con urea son mayores para los polímeros de globulina-p que para g11S. Nuevamente podemos explicar este comportamiento por la presencia de una mayor cantidad de sulfhidrilos totales que posibilita la formación de un número de enlaces disulfuro mayor en P y además aumenta las chances de que existan reacciones de intercambio sulfhidrilo-disufuro al encontrarse en presencia de un agente desnaturalizante que permite la apertura de la estructura molecular. La presencia de un mayor número de enlaces covalentes en los polímeros de globulina-p, conduciría a la formación de estructuras energéticamente más estables.

La importante diferencia de solubilidad encontrada entre g11S y P al usar un buffer de alta fuerza iónica, nos lleva a pensar que la hidrofobicidad superficial (H_0) de ambas especies es diferente. Sin embargo, al medir algunos parámetros relacionados con la H_0 con la sonda fluorescente ANS, no encontramos diferencias significativas, excepto en el valor asociado a la constante de asociación (K_a) del complejo formado por la proteína y el ANS. Considerando que la sonda empleada en la determinación de la hidrofobicidad

superficial interacciona especialmente con los residuos aromáticos que se encuentran en la superficie de las proteínas, y retomando la idea que indica que los triptofanos se encuentran en el interior de las moléculas que forman a P y de las moléculas de g11S, el resultado obtenido para la hidrofobicidad superficial no es del todo contradictorio, de todas maneras no debemos olvidar que los residuos de fenilalanina y tirosina también contribuyen al valor de H_0 y su posible ubicación no ha sido analizada. Para poder dar una conclusión con mayor fundamento acerca de la H_0 de estas especies sería conveniente el análisis con otras sondas fluorescentes que dieran cuenta de otros sitios de unión.

Retomando la pregunta que fuera formulada al comienzo de la discusión, nos propusimos estudiar las diferencias que hay entre UM y g11S para poder determinar las causas que llevan a la agregación de UM. Para las moléculas de ambas globulinas se encontró una relación carga masa diferente, siendo mayor la de las moléculas de globulina 11S lo que revela o bien una mayor carga negativa expuesta a pH = 8, o bien una masa ligeramente menor. Sin embargo, los análisis cromatográficos de exclusión molecular e intercambio iónico no mostraron diferencias de tamaño o carga entre las fracciones purificadas. En estos casos debemos tener en cuenta los alcances de los resultados con los métodos cromatográficos en los que no hemos tenido en cuenta diferencias de formas de las moléculas. En el estudio de la carga superficial realizado a través de cromatografías de intercambio iónico, la presencia de picos anchos reveló cierta heterogeneidad en la composición de los mismos, hecho que sería el responsable del espesor de la banda observada en la electroforesis nativa.

A partir de los resultados obtenidos por espectroscopía de fluorescencia, encontramos ciertas diferencias en cuanto a la estructura de g11S y UM. Tanto λ_{max} como IF_{max} del espectro de g11S revelaron una estructura terciaria más abierta, con los restos de triptofano algo más expuestos al medio. Del mismo modo, el estado nativo de UM fue energéticamente más estable y el proceso de desnaturalización más cooperativo que el de g11S. Sin embargo, no se encontraron diferencias cuando ambas fracciones fueron tratadas con 2-mercaptoetanol a bajas concentraciones (hasta 50mM).

Como se mencionara anteriormente, el agregado de 2-mercaptoetanol desestabiliza la estructura de los polímeros aumentando la proporción de moléculas que provienen de ellos, UM(P). A través del análisis de los resultados obtenidos por el tratamiento con 2-mercaptoetanol, en donde se observa un comportamiento equivalente entre las moléculas que provienen de la desagregación de polímeros UM(P) y las UM libres

originales, podemos inferir que ambas serían equivalentes. Estas observaciones son apoyadas por los resultados informados por Martínez (1997) y Castellani y col. (1999), quienes encontraron similitudes entre las UM y las UM(P) analizando otras características.

Los valores obtenidos para la hidrofobicidad superficial de g11S y UM, no fueron significativamente diferentes, de este modo no podemos pensar que sean las interacciones hidrofóbicas la fuerza impulsora que lleve a UM a la agregación. De todos modos en coincidencia con lo ya discutido para los polímeros, el valor de H_0 debería ser determinado por más de una sonda para poder sacar una conclusión definitiva. Sin embargo, la similitud encontrada para la solubilidad de UM en buffer de alta y baja fuerza iónica no parece indicar la existencia de superficies hidrofóbicas importantes en la estructura de UM.

Al no contar con la información de la cantidad de SH totales para la fracción UM, no podemos especular que sean estos grupos los responsables de la formación de los agregados aunque, según los resultados obtenidos para la fracción P en cuanto a este valor (mayor cantidad de SH totales que en g11S) y considerando que las moléculas que forman los polímeros son equivalentes a las UM libres, entonces, podemos tener en cuenta como una de las posibles causas de formación de agregados la presencia de un mayor número de estos residuos capaces de formar uniones covalentes entre varias UM. De todos modos como ya fuera mencionado antes, es posible que las UM sufran algún cambio conformacional al agregarse que las lleve a exponer grupos diferentes en la superficie.

En este capítulo las moléculas y los agregados que constituyen la fracción globulina-p han sido caracterizados y comparados con las moléculas de globulina 11S a través de varias técnicas distintas. Los resultados hasta aquí obtenidos han sido de importancia para el conocimiento más profundo de ambas globulinas, las pequeñas diferencias (estructura terciaria, relación carga/masa) entre las moléculas de ambas fracciones (g11S y UM) sumadas explicarían parcialmente la tendencia a la formación de agregados que caracteriza a globulina-p. Sin embargo, este análisis es incompleto ya que no se ha profundizado en las diferencias de la composición polipeptídica de ambas globulinas. Parte de estas inquietudes trataremos de responder en el siguiente capítulo.

Capítulo 2

5 Caracterización estructural de gp: composición polipeptídica de globulina-p en comparación con globulina 11S

Como se mencionara anteriormente las diferencias en las propiedades fisicoquímicas observadas entre globulina-p y globulina-11S están relacionadas con su características conformacionales que provienen de diferencias en su composición polipeptídica. Es sabido que globulinas de almacenamiento de otras plantas (Horstmann y col., 1993; Bacon y col., 1987; Kitamura y col., 1980; Utsumi y col., 1981, 1987; Raymond y col., 1995) presentan cierta heterogeneidad polipeptídica como consecuencia de un polimorfismo genético. En este capítulo exploraremos dicha heterogeneidad en las globulinas de amaranto y trataremos de relacionar la composición polipeptídica de ambas globulinas con sus propiedades fisicoquímicas.

5.1 Análisis de tamaño de los polipéptidos

En una primera instancia se analizó la composición de las globulinas purificadas: polímeros de globulina-p (P), moléculas de globulina-p (UM) y moléculas de globulina 11S (g11S) mediante SDS-PAGE.

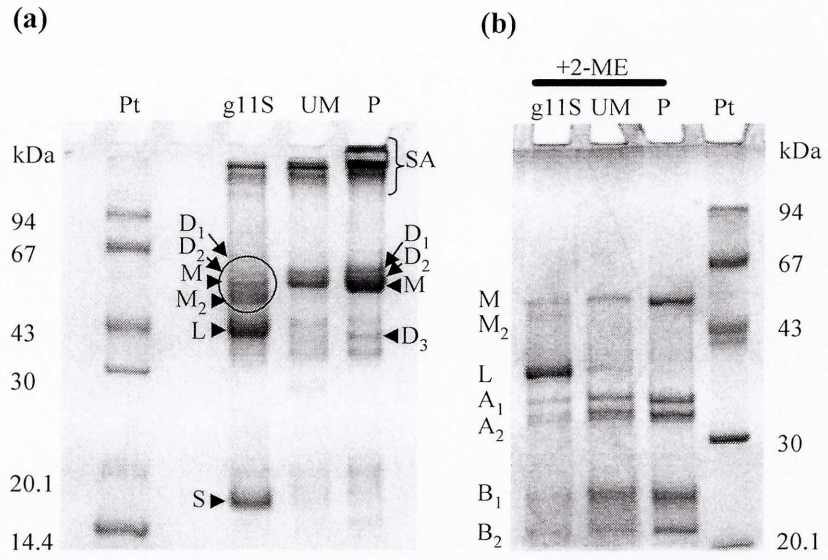


Figura 25. (a) SDS-PAGE; (b) SDS-PAGE + 2ME de las fracciones purificadas, P: polímeros de globulina-p, UM: moléculas de globulina-p, g11S: moléculas de globulina 11S, Pt: proteínas patrones de masa molecular. A la izquierda y a la derecha de la figura, se señalan las masas de las proteínas patrones. Concentración de acrilamida 12%. Tinción: Coomasie Brillant Blue.

Los resultados (Figura 25) muestran que las globulinas de amaranto presentan algunas diferencias en cuanto a su composicion polipeptídica. En concordancia con datos previos recogidos en nuestro laboratorio (Martínez y col., 1997), encontramos que las moléculas de globulina-p (UM) están formadas por una subunidad monomérica de 56,0 ± 1,0 kDa (señalada como M en la Figura 25**a**) y dos subunidades diméricas D_1 (de aproximadamente 60 kDa) y D_2 (aproximadamente 57 kDa) (Figura 25**a**) integradas por polipéptidos A (34,0 ± 1,0 y 32,0 ± 1,0 kDa) y B (22,0 ± 1,0 y 20,0 ± 1,0 kDa) (Figura 25**b**). Hay además un polipéptido dimérico de aproximadamente 40 kDa (D_3) (Figura 25**a**).

Del análisis de los perfiles en condiciones reductoras (Figura 25**b**) surge que tanto P como UM están formados por los mismos polipéptidos monómeros de 56,0 ± 1,0 kDa (M Figura 25b), A (34,0 ± 1,0 y 32,0 ± 1,0 kDa) y B (22,0 ± 1,0 y 20,0 ± 1,0 kDa), aunque hay una menor proporción del polipéptido de 56 kDa en UM. De acuerdo a los resultados presentados por Abugoch y col., (2003), Martínez y col., (1997) y Romero-Zepeda y Paredez-López, (1996) los polipéptidos de masa molecular entre 50 y 60 kDa son más abundantes en la fracción globulina-p y glutelinas que en globulina 11S y se consideran polipéptidos no procesados (Barba de la Rosa y col., 1996, Castellani y col., 2000, Molina y col., 2008). Este tipo de polipéptidos no procesados también se encuentran en otras globulinas como quinoa (Segura-Nieto M. y col., 1999)

Si analizamos ahora el perfil correspondiente a g11S sin reducir (Figura 25**a**), encontramos que está formada por los polipéptidos M, M_2, L y S de 56,0 ± 1, 52,8 ± 0,6, 41,0 ± 2,0 y 15,5 ± 0,6 kDa, respectivamente, y las mismas subunidades D_1 y D_2 que globulina-p. La composición encontrada para globulina-11S concuerda con los resultados presentados por Romero-Zepeda y Paredes-López (1996) y Marcone y col. (1998c), Martínez y col. (1997); Chen y Paredes-López (1997); Segura-Nieto y col. (1994), y en parte están de acuerdo con lo informado por Marcone y Yada (1998) para la globulina 11S purificada. La mayor diferencia con globulina-p es la presencia de los polipéptidos L (41,0 ± 2,0 kDa), S (15,5 ± 0,6 kDa) y M_2 (52,8 ± 0,6 kDa), todos ellos con masas moleculares estadísticamente diferentes de los polipéptidos de globulina-p con un nivel de confianza de 0,05. En la fracción 7S descrita por Marcone (1999a) están presentes polipéptidos de masa molecular similar a la de L y S.

De los perfiles sin reducir (Figura 25**a**), podemos observar que en P hay material proteico que no ingresa en el gel apilador y una gran proporción de proteína cuya masa molecular es superior a 94 kDa que se observa en la parte superior del gel,

constituyendo los denominados polipéptidos agregados de diferente tamaño (SA) que han sido descritos anteriormente por Castellani (2000). La proporción de polipéptidos agregados disminuye en UM y se hace aún menor en g11S. Con el agregado de 2ME, estos SA desaparecen lo que confirma que los mismos están asociados mediante enlaces disulfuro (Castellani y col., 1999)

Para determinar la composición de cada una de las subunidades diméricas se realizaron electroforesis bidimensionales SDS → SDS + 2ME de las moléculas en estudio (Figura 26). Para evitar reacciones de intercambio sulfhidrilo-disulfuro, se sometió a las muestras a un tratamiento con iodoacetamida para bloquear los sulfhidrilos libres antes de llevar a cabo la primera dimensión (ver item 3.6.2, Materiales y Métodos).

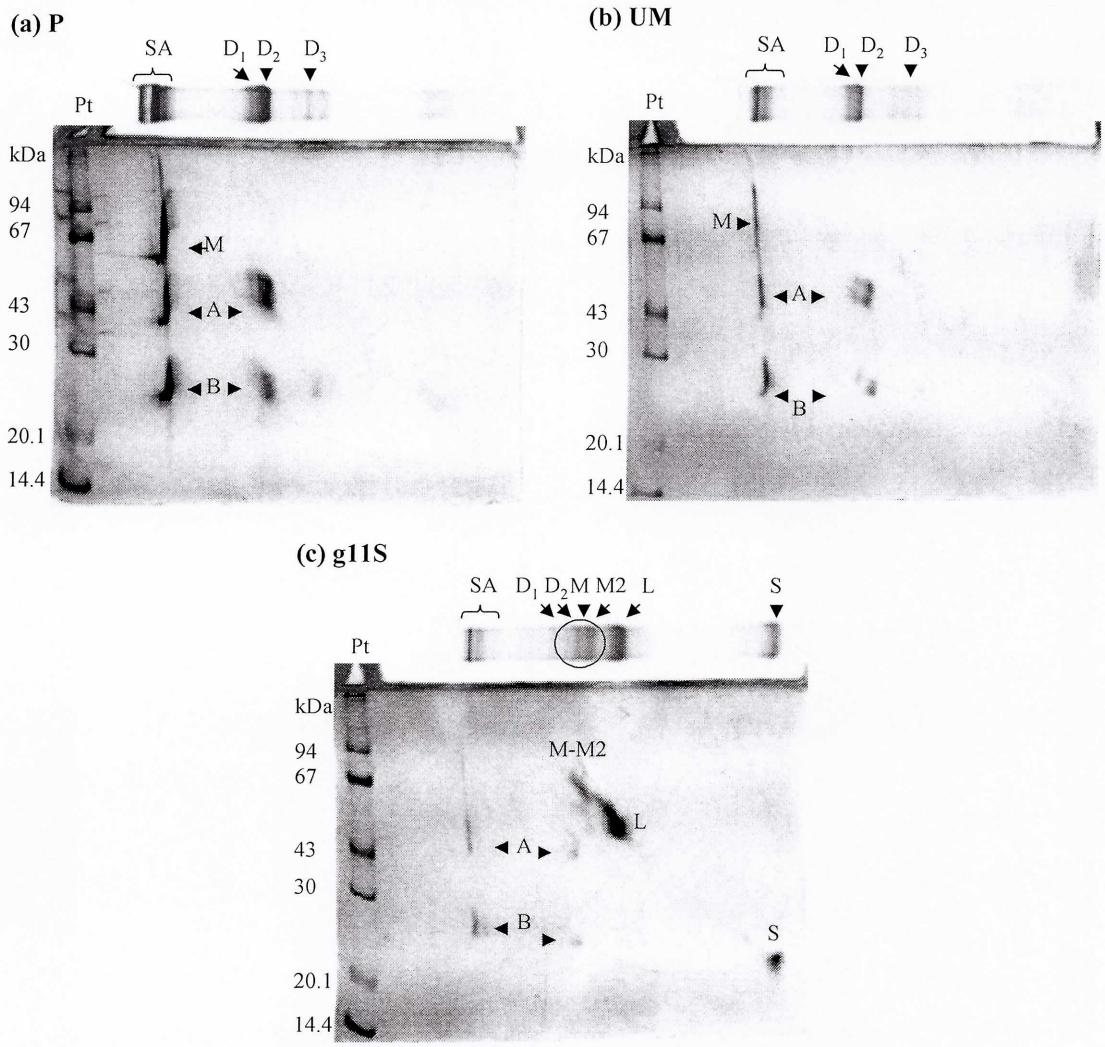


Figura 26. Bidimensional SDS-PAGE→SDS-PAGE + 2ME de las fracciones purificadas, (a) P, (b) UM (c) g11S. Pt: proteínas patrones de masa molecular. A la izquierda se señalan las masas de las proteínas patrones. Concentración de acrilamida 12%. Tinción: Coomasie Brillant Blue.

De acuerdo a los perfiles electroforéticos obtenidos, la subunidad D_2 (Figura 26**b**) estaría formada por los polipéptido A y B de menor masa molecular unidos por un enlace disulfuro, mientras que la subunidad D_1 (Figura 26**b**) estaría formada por los polipéptido A y B de mayor tamaño. Por otra parte, el dímero D_3 estaría formado por dos de los polipéptidos B más pequeños.

Es importante señalar que los monómeros de 56 kDa (M) característicos de globulina-p están formando parte de los agregados que quedan acumulados en la parte superior del gel (Figura 26a y **b**), no se observa nada de éste polipéptido libre en la diagonal. Un resultado análogo a éste fue encontrado por Martínez y col. (1997) para la fracción globulina-p sin purificar. La presencia de M en mayor proporción en globulina-p y especialmente en los polímeros nos sugiere que dicho polipéptido estaría involucrado en la estabilización de la estructura de los polímeros (P) en coincidencia con lo informado por Martínez y col. (1997) y Castellani y col. (2000).

De acuerdo a los resultados anteriores, existen diferencias importantes en la composición polipeptídica de globulina-p y globulina-11S. Globulina-p posee una mayor proporción que globulina 11S del polipéptido monomérico M (56,0 ± 1,0 kDa) mientras que para la fracción 11S hay tres polipéptidos monoméricos característicos, L (41,0 ± 2,0 kDa), S (15,5 ± 0,6 kDa) y M_2 (52,8 ± 0,6 kDa) que no se encuentran ni en P ni en UM. Los polímeros de globulina-p poseen a su vez una mayor proporción que las UM del polipéptido de 56 kDa. Los resultados hasta aquí encontrados nos muestran una heterogeneidad polipeptídica que apoya la hipótesis de la existencia de más de un gen que codifica para las subunidades que forman a los hexámeros de globulinas.

5.2 Cromatografía de intercambio iónico

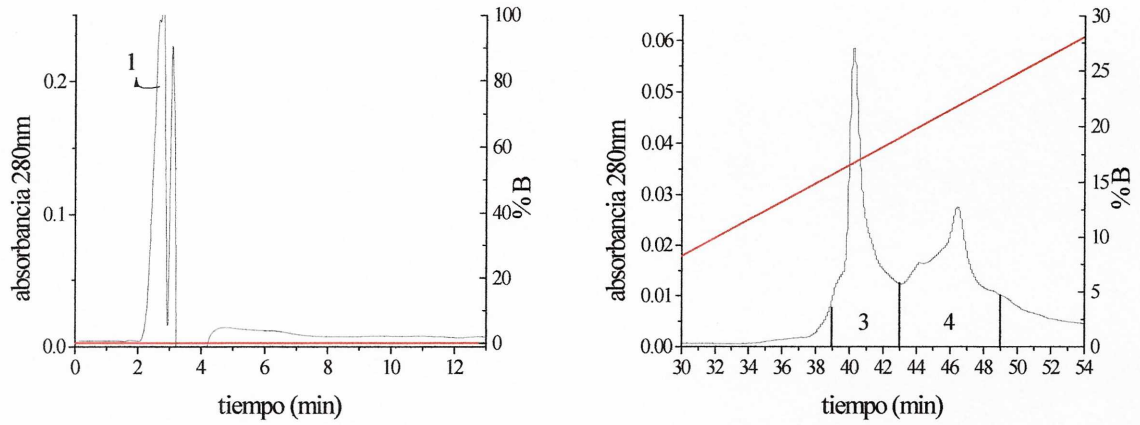
Continuando con la caracterización de los polipéptidos de las globulinas de amaranto, se estudió su comportamiento por cromatografía de intercambio iónico. Las fracciones colectadas en cada corrida fueron analizadas por SDS-PAGE.

Considerando que las fracciones P y UM de globulina-p están integradas por los mismos polipéptidos y debido a que contábamos con una mayor disponibildad de la fracción P, se analizó sólo a esta última en comparación con globulina 11S.

Los polipéptidos B con masas cercanas a 20 kDa no fueron retenidos por el intercambiador aniónico (Figura 27**a** y **b**, fracción 1). Los polipéptidos M de 56 kDa eluyeron a un tiempo de retención intermedio (Figura 27**a** y **b**, fracción 3) y finalmente

los polipéptidos A de alrededor de 30 kDa fueron los más retenidos por la columna, mostrando de esta manera su mayor carácter ácido (Figura 27**a** y **b,** fracción 4).

(a) Cromatografía de intercambio iónico



(b) SDS-PAGE

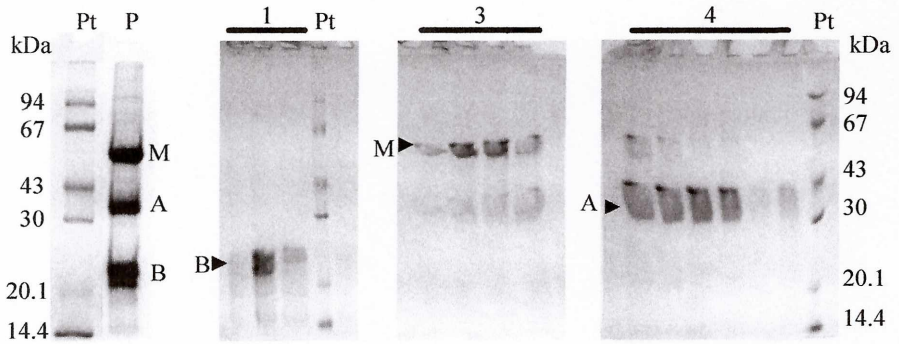
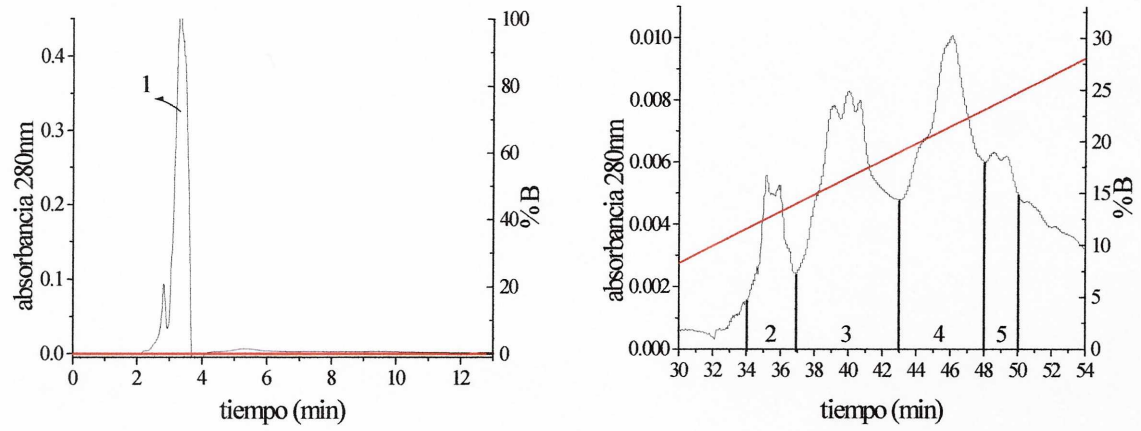


Figura 27. (a) Cromatografía de intercambio iónico de Polímeros de globulina-p (HPLC, columna Waters AP mini column Q 8HR). Con línea roja se indica el gradiente empleado. (b) SDS-PAGE de las fracciones colectadas en la cromatografía. Se indican con números y barras las zonas del cromatograma sembradas en el gel. Pt: patrones de masa molecular, las masas de las proteínas patrones se indican a los costados de los geles. Tinción Coomasie Brillant blue. Concentración de acrilamida 12% para el gel separador y 4% para el gel apilador.

En g11S la separación de los polipéptidos M, A, y B (Figura 28**a** y **b**) fue similar a la encontrada para P. Por otra parte, los polipéptidos S (15,5 kDa) y M_2 de g11S eluyeron a la misma concentración salina que los M (Figura 28**a** y **b**, fracción 3), y finalmente L (41 kDa) eluyó junto con A (Figura 28**a** y **b**, fracción 4). En el perfil correspondiente a g11S, se resuelven dos picos adicionales señalados como 2 y 5 en la Figura 28**a**, sin embargo, en el perfil electroforético que les corresponde (Figura 28**b,** fracción 2 y 5) no se detectó proteína.

(a) Cromatografía de intercambio iónico



(b) SDS-PAGE

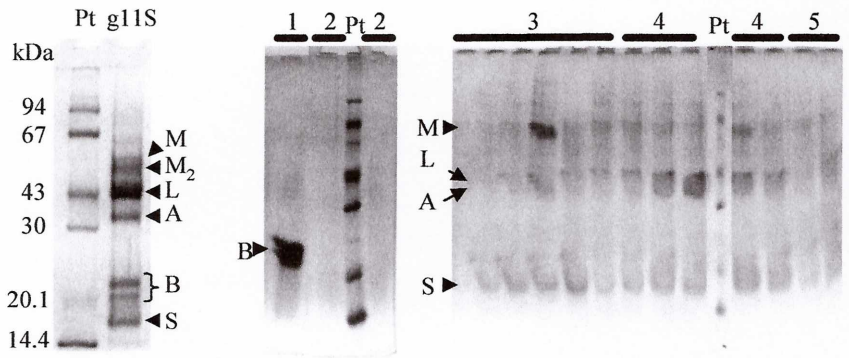


Figura 28. (a) Cromatografía de intercambio iónico de g11S (HPLC, columna Waters AP mini column Q 8HR. Con línea roja se indica el gradiente empleado. (b) SDS-PAGE de las fracciones colectadas de la cromatografía. Se indican con números y barras las zonas del cromatograma sembradas en el gel. P: patrones de masa molecular, las masas de las proteinas patrones se indican a los costados de los geles. Tinción Coomasie Brillant blue. Concentración de acrilamida 12% para el gel separador y 4% para el gel apilador.

A diferencia de lo informado por Wolf (1993), quien a través de esta técnica pudo separar los polipéptidos A de glicinina de soja por su carga, en el presente trabajo, no fue posible distinguir cargas diferentes para este tipo de polipéptidos.

5.3 Caracterización de los polipéptidos por su punto isoeléctrico: electroforesis bidimensional IEF→ SDS-PAGE

Se analizó la heterogeneidad en la carga de los polipéptidos de las globulinas a través de electroforesis en dos dimensiones IEF → SDS-PAGE. Se encontraron para el polipéptido M que forma parte de la fracción P (Figura 29), cinco especies en el rango de pH 7,0-7,5. De acuerdo a la distribución de manchas, podemos inferir que se trataría de polipéptidos codificados por un único gen. La diversidad de pIs observada se debería

a modificaciones postraduccionales o a pequeñas deleciones o sustituciones de uno o dos aminoácidos que no modifican apreciablemente la masa del péptido pero si su carga. Ha sido informado por Maruyama y col. (2003) que la sustitución de tan sólo uno o unos pocos aminoácidos en las proteínas de reserva de soja es capaz de cambiar apreciablemente la movilidad electoforética de las mismas. Del mismo modo, Davies y col. (1985) y Matoba y col. (2001) informaron que cambios estructurales que tienen efecto sobre la movilidad electroforética, no necesariamente son el resultado de grandes alteraciones en la esructura primaria sino que pueden resultar de cambios tan pequeños como la sustitución de un aminoácido.

La heterogeneidad fue mayor para el polipéptido A. Se observan cuatro especies de pI comprendido entre 5,0 y 6,0 para el polipéptido A de mayor tamaño (Figura 29, A_1) y un segundo grupo con un pI entre 6,0 y 7,0 (Figura 29, A_2); estos polipéptidos provendrían de al menos dos genes diferentes. Por otra parte los polipéptidos B mostraron al menos cuatro especies con puntos isoeléctricos comprendidos entre 9,0 y 10,0. Existen además dos polipéptidos con una masa molecular equivalente a la de los polipéptidos B más pequeños, aunque el punto isoeléctrico de estos se encuentra en un rango ligeramente ácido, entre 6,0 y 7,0. Dado que los pIs de estos polipéptidos no los incluye dentro de los denominados básicos (B), fueron nombrados como A_2' y A_3'. Estos últimos podrían integrar una subunidad junto con un polipéptido A y un polipéptido B de un modo similar a lo encontrado para una de las subunidades de glicinina de soja $A_5A_4B_3$, (Momma y col., 1985).

El patrón encontrado para el perfil bidimensional de globulina 11S (Figura 30) fue similar al de globulina-p con respecto a los polipéptidos A y B. También encontramos a los polipéptidos denominados A_2' y A_3', aunque, existe además un polipéptido más ácido de 20 kDa que se denominó A_1'.

El rango de pI de los polipéptidos M y M2 de globulina 11S (6,5–7,0) fue ligeramente inferior al de los polipéptidos M de globulina-p, aunque no podemos descartar que estas diferencias se deban a errores asociados a cuestiones metodológicas. Para los polipéptidos L se observaron cinco especies con distinto pI (7,0-7,5). Los polipéptidos S mostraron seis diferentes pIs en el rango 5,5-7,0.

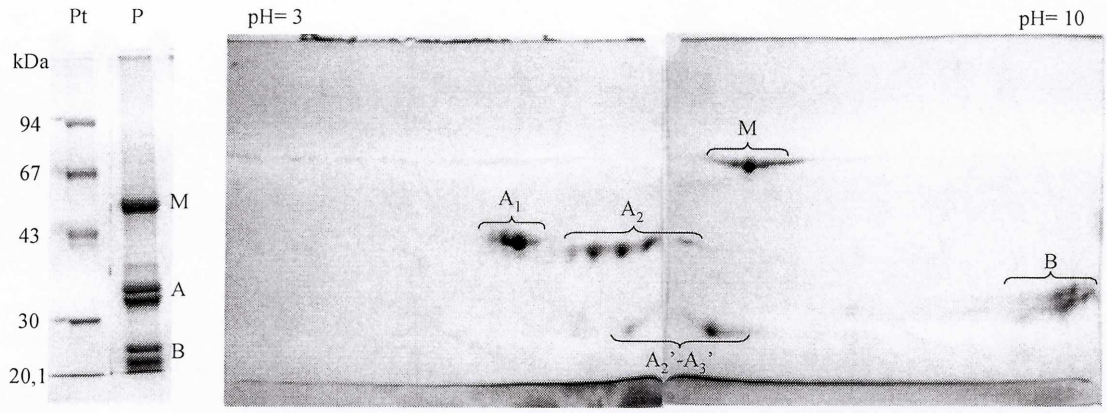


Figura 29. Electroforesis bidimensional IEF → SDS-PAGE + 2ME de los polímeros de globulina-p En la figura se señalan los polipéptidos que se mencionan en el texto. A la derecha se observa el perfil SDS-PAGE+2ME de la muestra y los patrones de masa molecular. Tinción Coomasie Brillant Blue. Concentración de acrilamida 12%.

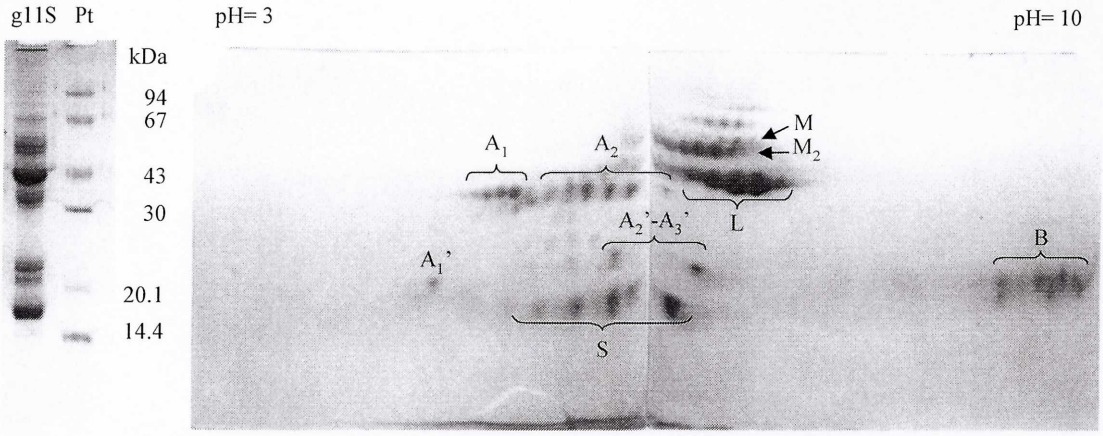


Figura 30. Electroforesis bidimensional IEF → SDS-PAGE + 2ME de las moléculas de globulina 11S. En la figura de señalan los polipéptidos que se mencionan en el texto. A la derecha se observa el perfil SDS-PAGE + 2ME de la muestra y los patrones de masa molecular. Tinción Coomasie Brillant Blue. Concentración de acrilamida 12%.

De acuerdo a los resultados hasta aquí informados, los polipéptidos M con pIs cercanos a 7,0 podrían tratarse de polipéptidos no procesados incluyendo en su secuencia la de los polipéptidos B con pIs cercanos a 9,0 y la de los polipéptidos A con pIs cercanos a 5,0. Estos resultados concuerdan con los publicados recientemente por Molina y col. (2008), asi como los informados anteriormente por Valdez-Ortiz y col. (2005).

Por otra parte, considerando la presencia de los polipéptidos L y S en globulina 11S, podría plantearse la hipótesis de que estos polipéptidos surgen como productos de hidrólisis a partir de un precursor diferente a M, ambos, L y S, estarían unidos a través de interacciones no covalentes formando subunidades en la globulina 11S.

Al comparar la carga y masa de los polipéptidos de las dos globulinas, se observa que las subunidades diméricas constituidas por los polipéptidos A y B unidos por un puente disulfuro son comunes a ambas.

Segura Nieto y col. (1992), a través de la técnica de electroforesis de no equilibrio en gradiente de pH (NEPHGE), estudiaron la variabilidad de los puntos isoeléctricos de los polipéptidos de las fracciones proteicas de amaranto sin purificar. Ellos encontraron que existe una heterogeneidad de carga importante en todas las fracciones. Estos autores emplearon un procedimento de extracción de proteínas diferente al que se utilizó en el presente trabajo, con lo cual no informaron resultados para globulina-p, siendo esta última fracción parte de las glutelinas. Debido a la diferencia de metodología empleada para el análisis y al grado de pureza de las muestas utilizadas en uno y otro caso, nuestros resultados dan cuenta de un mayor número de especies con distinto pI para los polipéptidos de una misma masa.

5.4 Electroforesis desnaturalizante en presencia de urea (UREA-PAGE)

La relación carga/masa de los polipéptidos que componen a las fracciones purificadas de ambas globulinas, P y g11S, fue analizada mediante electroforesis bidimensional UREA + 2ME → SDS-PAGE. En la Figura 31**a** y **b** se muestra el perfil electroforético obtenido para P y g11S respectivamente. De acuerdo a la relación carga/masa, se caracterizaron dos clases de polipéptidos ácidos, los de mayor movilidad pertenecerían al grupo denominado A_1 mientras que los A de menor movilidad corresponderían a los A_2 (Figura 31**a** y **b**) identificados en el punto anterior.

Los polipéptidos B_1 y B_2, quedaron inmediatamente después del punto de siembra en ambas globulinas, es decir, su movilidad fue prácticamente nula asociada a su carácter básico. Mientras que, el grupo de polipéptidos denominados A' presentó la misma relación carga masa que los A_2, lo que concuerda con su comportamiento en los geles bidimensionales (IEF → SDS-PAGE) (Figura 31**a** y **b**).

También se puede observar en la Figura 31**a** y **b** que los polipéptidos M, tuvieron un comportamiento intermedio al de A y B, con una relación carga masa mayor que la de los polipéptidos B pero menor que la de los polipéptidos A_2.

En el perfil correspondiente a g11S (Figura 31**b**), encontramos además a los polipéptidos denominados L, S y M_2. Los L, poseen una relación carga/masa equivalente a la de los polipéptidos A_2 y A'. Los denominados S tienen una movilidad

ligeramente mayor que A', característica que concuerda con su menor masa y su pI equivalente al encontrado para A'. El polipéptido M_2 (≈52 kDa) tiene un R_f algo mayor al de los M (≈56 kDa) en la primera dimensión lo que concuerda con su menor masa y mayor carácter ácido.

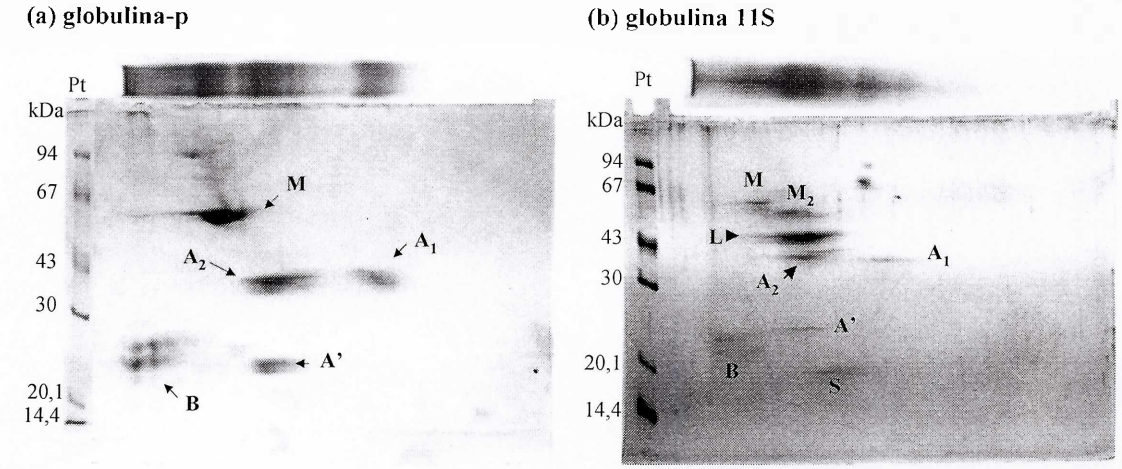


Figura 31. Electroforesis bidimensional UREA + 2ME → SDS-PAGE. (a) globulina-p sin purificar. (b) globulina 11S sin purificar. Tinción Coomasie Brillant Blue. Concentración de acrilamida en la primera dimensión: 6%, urea 6M. Segunda dimensión 12% acrilamida.

Para completar la caracterización de las subunidades D_1, D_2 y D_3 de globulina-p y globulina 11S se analizó su relación carga/masa mediante electroforesis bidimensional UREA → SDS-PAGE en presencia y ausencia de 2ME en la segunda dimensión. Para evitar el intercambio sulfhidrilo-disulfuro que se produce en condiciones denaturalizantes a pH alcalino, antes de ser tratadas con urea, las muestras fueron alquiladas con iodoacetamida (ver item 3.6.2, Materiales y Métodos).

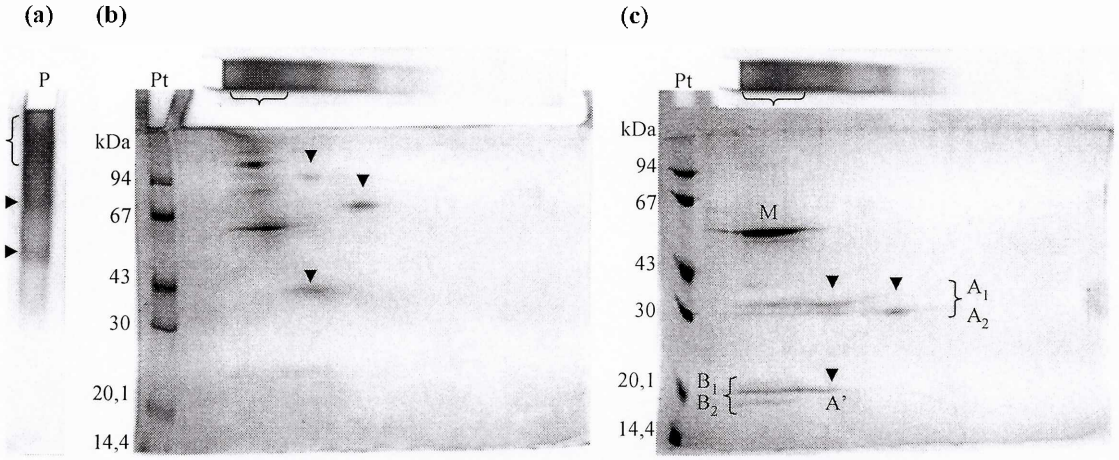


Figura 32. Fracción purificada polímeros de globulina–p (a) UREA-PAGE, (b) UREA-PAGE → SDS-PAGE, (c) UREA-PAGE → SDS-PAGE + 2ME. Tinción Coomasie Brillant Blue. Concentración de acrilamida en la primera dimensión: 6%, urea 6M. Segunda dimensión 12% acrilamida.

Como se observa en la Figura 32**a**, la fracción P presenta tres bandas principales con diferente movilidad señaladas en el lado izquierdo de la figura. Cuando esta fracción fue analizada en una segunda dimensión, UREA → SDS-PAGE (Figura 32**b**) encontramos que, en la banda menos móvil, se agrupaban los agregados de alta masa molecular (SA) y las subunidades de aproximadamente 56 kDa que podrían tratarse de M y/o D_1 y D_2. Recordando el perfil electroforético que se mostró en la Figura 26**a**, es probable que estas subunidades sean sólo D_1 y D_2 ya que los polipéptidos M estaban formando parte los agregados (SA) y no eran liberados por el SDS (Martínez y col., 1997). La banda de movilidad intermedia se separó en un agregado de masa cercana a 94 kDa y una banda más o menos ancha que tiene una masa molecular entre 35 y 40 kDa. Finalmente en la banda más móvil encontramos un polipéptido con una masa aproximada a los 67 kDa. Este polipéptido también fue observado, aunque en menor proporción en el perfil correspondiente a g11S (Figura 33**b**) y UM (resultados no mostrados).

Al analizar la muestra P + urea en condiciones reductoras en la segunda dimensión (Figura 32**c**), encontramos que la banda de mayor movilidad conteniendo al polipéptido de aproximadamente 67 kDa era un dímero formado por dos polipéptidos A, unidos por un puente disulfuro. Teniendo en cuenta que habían sido bloqueados los restos de sulfhidrilos libres para evitar el intercambio sulfhidrilo-disulfuro, podemos pensar que éste polipéptido podría tratarse de una subunidad intermedia que forma parte del hexámero característico de las globulinas 11S. Sin embargo, no podemos descartar la posibilidad de que haya habido intercambio sulfhidrilo-disulfuro en pequeña proporción, y que se trate de un artefacto operacional.

En la banda de movilidad intermedia encontramos a los polipéptidos ácidos A_1 y A_2 y al polipéptido de alrededor de 20 kDa que, por su tamaño correspondería a los denominados A' (con características ligeramente ácidas). Esto nos lleva a pensar que uno de los polipéptidos que formaban la banda de movilidad intermedia (Figura 32**b**), cuya masa rondaba los 40 kDa probablemente se tratara del dímero D_3, en donde al menos uno de los polipéptidos que lo forman sería A' (debido a la relación carga/masa asociada al mismo). Este resultado está de acuerdo con los datos informados por Castellani (2000), que encontró al analizar el perfil de intercambio iónico de los polipéptidos de globulina-p en presencia de urea, características ácidas para D_3 concluyendo que al menos uno de los dos polipéptidos de ≅ 20 kDa que lo forman debía tener un carácter más ácido que el resto de los polipéptidos de esa masa molecular. El agregado de 94 kDa observado en condiciones no reductoras (Figura 32**b**)

correspondería, de acuerdo al perfil de la Figura 32**c**, a una mezcla de los polipéptidos de 30 kDa (A_1 y A_2) y de 20 kDa (probablemente A') también unidos por uniones disulfuro.

Los agregados de alta masa molecular que formaban la banda de menor movilidad en la primera dimensión (Figura 32**b**), de acuerdo a los resultados de la Figura 32**c**, estarían integrados por dímeros AB y el polipéptido M. Este último se encontró en mayor proporción.

Haciendo un análisis similar para globulina 11S, observamos que en la primera dimensión, Figura 33**a**, sólo hay una banda principal que coincide con la de movilidad intermedia para globulina-p aunque para globulina 11S es ligeramente más ancha sugiriendo que contiene especies de variada movilidad. Además de esta banda está presente otra de mayor movilidad más tenue indicada con una punta de flecha en la figura.

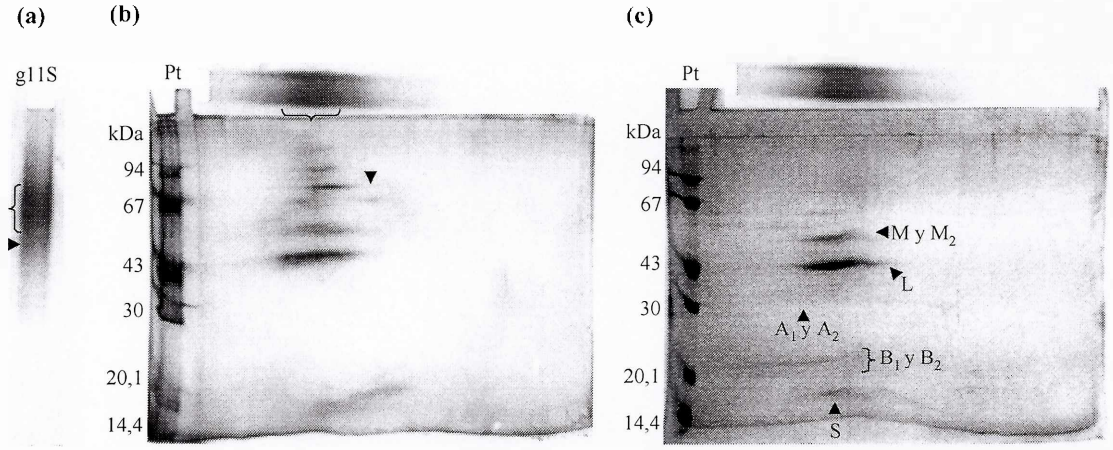


Figura 33. Fracción purificada globulina 11S (a) urea-page. Tinción Coomasie Brillant Blue. (b) urea-page → sds-page. Tinción con plata. (c) urea-page → sds-page + 2ME. Tinción Coomasie Brillant Blue. Concentración de acrilamida en la primera dimensión: 6%, urea 6M. Segunda dimensión 12% acrilamida.

De acuerdo a lo encontrado en la segunda dimensión de g11S en condiciones no reductoras (Figura 33**b**), en la banda principal, se agrupan con ciertas diferencias de movilidad, agregados mayores de 67 kDa, polipéptidos entre 50 y 60 kDa (probablemente correspondientes a subunidades diméricas y polipéptidos M) y el polipéptido L. En la banda más tenue observamos la presencia, en muy pequeña proporción, del dímero de 67 kDa que fuera observado en la fracción P.

Analizando la segunda dimensión en condiciones reductoras para g11S (Figura 33**c**), aunque la resolución obtenida en este último gel no es muy buena, en la banda ancha

que fuera señalada en la Figura 33**b**, encontramos a todos los polipéptidos que forman parte de g11S.

5.5 Caracterización de los polipéptidos por su hidrofobicidad: cromatografía en fase reversa (RP-HPLC)

Cuando globulina-p fue desnaturalizada y reducida para luego ser sometida a una separación cromatográfica de alta eficiencia en fase reversa (RP-HPLC) la proteína se separó en 5 picos (Figura 34**a**).

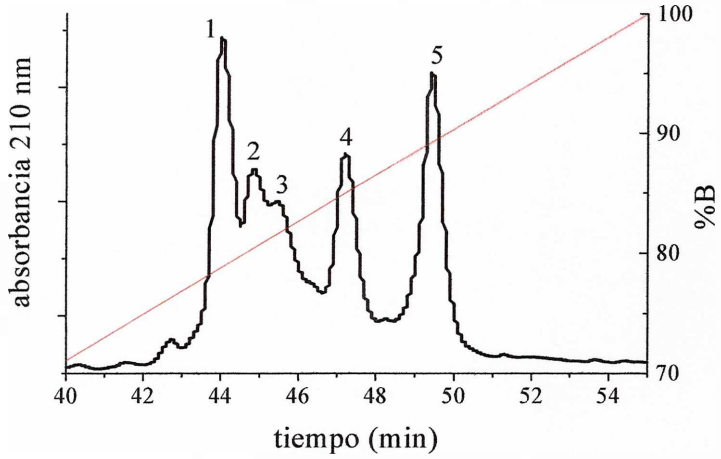
Se colectaron fracciones a distintos tiempos de elución y se analizaron los componentes de cada pico por electroforesis desnaturalizante y desnaturalizante- reductora, el perfil se muestra en la Figura 34**b**. Teniendo en cuenta que uno de los factores principales que intervienen en una separación cromatográfica de esta naturaleza es la hidrofobicidad de las moléculas, podemos realizar una clasificación de los polipéptidos separados de acuerdo a esta característica.

El perfil electroforético de las fracciones recogidas muestra que existen tres clases de polipéptidos B desde el punto de vista de su hidrofobicidad, el más hidrofílico es eluido en el primer pico del cromatograma (pico 1) y tiene una masa molecular de 22 kDa, también encontramos algunos polipéptidos de 20 kDa de hidrofobicidad intermedia y alta (pico 3 y pico 5). Si recordamos que los polipéptidos A' poseen una masa coincidente con la de los polipéptidos B más chicos (Figura 29) y considerando los resultados obtenidos aquí, podríamos asociar a los polipéptidos A' una hidrofobicidad intermedia o alta, ya que los encontraríamos en el pico 3 o 5.

Los polipéptidos A también se separaron en dos grupos de diferente hidrofobicidad (picos 1 y 4), aquellos que eluyen en el primer pico, son los A de menor tamaño molecular (32 kDa), mientras que los más grandes se encuentran en el pico 4.

Los polipéptidos M eluyeron en un único pico de comportamiento intermedio (pico 2).

(a) RP-HPLC



(b) SDS-PAGE

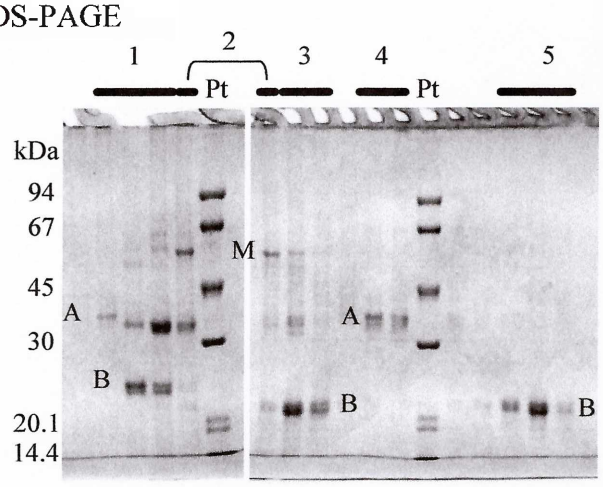


Figura 34. RP-HPLC de polímeros de globulina-p (a) Cromatograma, en la figura se señalan los picos que se mencionan en el texto, (b) SDS-PAGE de las fracciones recogidas durante la cromatografía: Sobre el gel se señala a que pico del cromatograma corresponde cada una. Tinción Coomasie Brillant Blue. Concentración de acrilamida 12%.

Al analizar g11S (Figura 35**a** y **b**), encontramos que tanto M como M_2 eluyen en la misma fracción (pico 2) y además el tiempo de retención es equivalente al que se encontró para los polipéptidos M de los polímeros. Sin embargo, existe en el perfil de g11S, otro polipéptido M con características más hidrófobicas que eluyó en el pico 5. Los polipéptidos A de g11S eluyeron en los picos 3 y 4. En el pico 3 se encuentran polipéptidos A de menor tamaño molecular (32 kDa) mientras que en el pico 4 eluyó el de mayor masa, comportándose de un modo similar a lo que fuera observado para los polipéptidos A de la fracción P. La hidrofobicidad de los polipéptidos B de globulina 11S que eluyeron en los picos 3 y 5 fue equivalente a la encontrada para los de P.

Los polipéptidos S y L presentaron una hidrofobicidad intermedia ya que fueron encontrados en las fracciones 3' y 4 respectivamente.

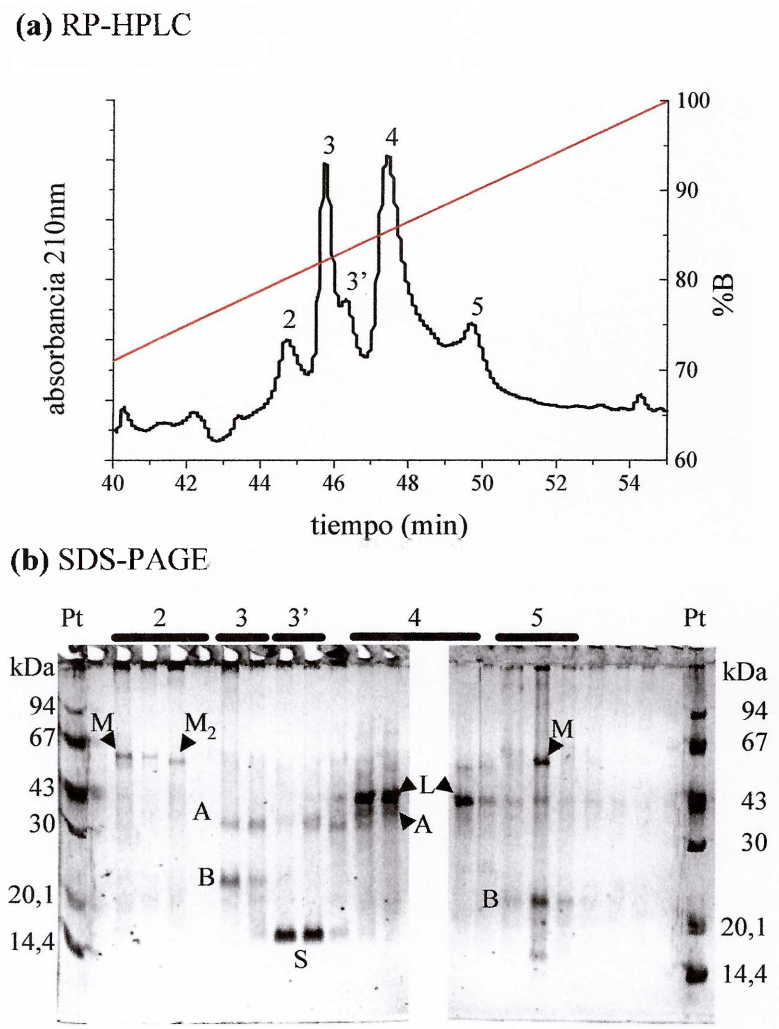


Figura 35. RP-HPLC de las moléculas de globulina 11S (a) Cromatograma, en la figura se señalan los picos que se mencionan en el texto, (b) SDS-PAGE de las fracciones recogidas durante la cromatografía: Sobre el gel se señala a que pico del cromatograma corresponde cada una. Tinción Coomasie Brillant Blue. Concentración de acrilamida 12%.

Este análisis, agrega algunas diferencias a las ya encontradas en cuanto a carga y masa para los polipéptidos de globulina-p y globulina 11S. Las principales diferencias entre ambas globulinas que fueron detectadas mediante este método de separación incluyen a polipéptidos A y B más hidrofílicos en la fracción P que eluyen en el pico 1 y polipéptidos M presentes sólo en g11S que eluyen en el pico 5.

5.6 Análisis de la secuencia de algunos de los polipéptidos de las globulinas de amaranto

Retomando la idea que se planteara al comienzo del capítulo, uno de nuestros objetivos era obtener información acerca del polimorfismo en las globulinas de amaranto. Hasta

aquí, ha sido demostrada la existencia de heterogeneidad en cuanto a masa, carga e hidrofobicidad de los polipéptidos que las constituyen.

Para ampliar la información obtenida con los análisis realizados y considerando que una de las principales herramientas para determinar la existencia o no de homología entre polipéptidos de distintas proteínas es contar con datos de sus secuencias se procedió a realizar esta determinación en los polipéptidos más representativos de ambas globulinas. Aunque aun no se cuenta con la metodología adecuada y con la formación requerida para llevar a cabo este tipo de experiencias en nuestro laboratorio, pero pensando en la necesidad próxima de manejar estas herramientas, la determinación fue llevada a cabo en el INRA Unité BIA-plateforme B.I.B.S Spectrométrie de Masse (Nantes Francia), las medidas estuvieron a cargo de la Dra. Helene Rogniaux.

Teniendo en cuenta los resultados anteriores que indican que el polipéptido M es una subunidad no procesada, se plantearon varias preguntas que podrían ser respondidas mediante análisis de secuencias: ¿M tiene similitud de secuencia con el precursor caracterizado por Barba de la Rosa y col. (1996)?¿Se encuentra M parcialmente procesado, dando origen a los polipéptidos A y B presentes en esta fracción?

Por otra parte, este tipo de análisis nos permitiría comprobar o desechar la hipótesis planteada anteriormente en donde L y S surgirían como productos de hidrólisis a partir de un precursor de la familia de M. A su vez podríamos también resolver el interrogante sobre el origen de A' el cual podría tratarse de un homólogo de A que ha sufrido un tratamiento hidrolítico diferente o, alternativamente, se correspondería con un homólogo de B con un procesamiento distinto. Para los análisis se utilizaron las fracciones purificadas polímeros de globulina-p (P) y globulina 11S (g11S) y se separaron sus polipéptidos mediante electroforesis bidimensional IEF → SDS - PAGE. En la figura se señalan los polipéptidos elegidos para el análisis, los cuales fueron sometidos a hidrólisis tríptica y analizados mediante MALDI-MS y LC-ESI-MS/MS.

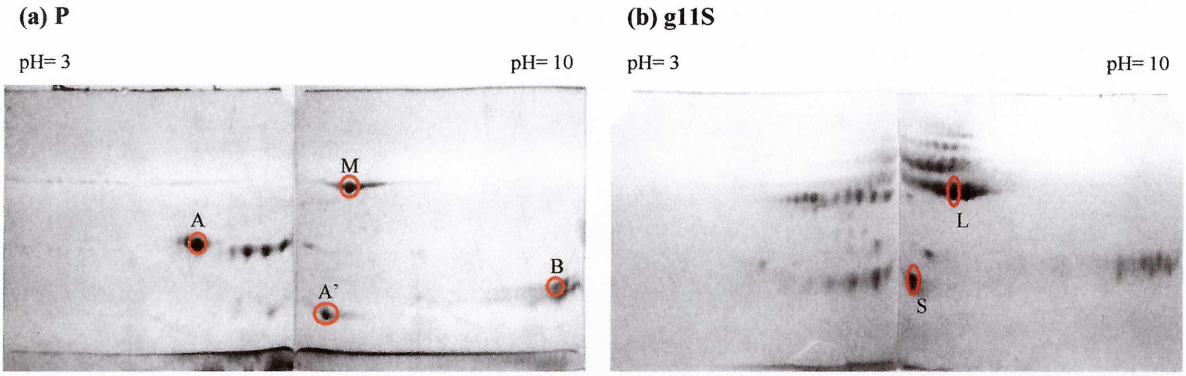


Figura 36. Electroforesis bidimensional IEF → SDS-PAGE. En la figura se señalan los polipéptidos analizados. Tinción Coomasie Brillant Blue. Concentración de acrilamida 12%. (a) P: polímeros de globulina-p. (b) g11S: globulina 11S.

En una primera instancia, se llevó a cabo el análisis de masas (MALDI), obteniéndose un "fingerprint" de masas de los correspondientes péptidos trípticos. Inesperadamente, ninguno de los perfiles fue superponible (Figura 37, Figura 38). De acuerdo a estos resultados, el polipéptido M no es precursor de A y B, lo que nos hace pensar que no se encontraría parcialmente procesado.

Posteriormente se llevó a cabo un análisis de los péptidos trípticos por cromatografía líquida acoplada a detectores de masa en tandem (MS/MS) para obtener datos de secuencia. Esta información se comparó con la almacenada en los bancos de datos Swiss-Prot y TrEMBL. A partir de la información de masa y de secuencia obtenida solamente algunos de los péptidos provenientes de los polipéptidos A' y B mostraron similitud con el precursor secuenciado por Barba de la Rosa y col. (1996). Debido que a partir de estos resultados un gran número de datos de masa no pudo ser interpretado, se llevó a cabo el secuenciamiento "*de novo*" (Figura 39) y se intentó alinear las "palabras" obtenidas con las secuencias de proteínas almacenadas en el banco de datos NrDB (usando el programa MS-BLAST).

Los polipéptidos A' y B mostraron similitud con el polipéptido β (B) extremo C-terminal del precursor de globuina 11S secuenciado por Barba de la Rosa y col. (1996) (Figura 41, Figura 42). Aunque M y A no presentaron homología con este precursor, de todos modos la homología con una legumina de *Gossypium hirsutum* y *Perilla frutescens* respectivamente, los clasificó como provenientes de leguminas (Figura 40, Figura 44).

Los resultados corresponientes a L y S fueron diferentes, por un lado, a S no se le pudo asignar similitud con ninguna proteína almacenada en el banco de datos, por otro lado, L mostró cierta homología con una globulina 7S de *Sesamum indicum* (Figura 43).

Las secuencias de novo obtenidas a partir del análisis de los datos del espectro de masas, son bastante pocas en número y longitud con lo cual los resultados deben ser tomados con cuidado.

Los resultados presentados demuestran que el polipéptido M no se encuentra procesado en absoluto y que los polipéptidos A y B entonces provendrían de otra/s subunidad/es diferente/s que si está/n procesada/s. Siendo M una subunidad no procesada, surge otro interrogante, ¿la falta de procesamiento se debe a que carece del sitio de corte de las globulinas 11S? Las secuencias obtenidas no nos permiten responder esta pregunta. Sin embargo, como se indicó previamente (ver item 1.3.4, Introducción), estudios recientes realizados por Molina y col. (2008) informaron que el polipéptido M de globulina-p es un polipéptido no procesado que posee el sitio de corte característico de las globulinas 11S (Asn-Gly) y da origen a un polipéptido A y uno B al tratar a la fracción globulina-p con la enzima de procesamiento de girasol (VPE). Además, estos autores confirmaron que la carencia de procesamiento sobre el polipéptido M no se debe a una baja actividad de la enzima VPE de amaranto.

La secuencia determinada para el polipéptido A mostró cierta similitud con la subunidad "α" (A) de una globulina 11S de *Perilla frutescens*. De acuerdo a los resultados informados por Adachi y col. (2001, 2003) quienes resolvieron la estructura cristalina para un homotrímero y homohexámero de globulina 11S de soja, en el extremo N-terminal del propolipéptido (subunidad α), se concentran cuatro de las cinco regiones desordenadas que no han podido ser resueltas por cristalografía, estas regiones coinciden, aunque con ciertas diferencias, con las regiones variables determinadas por medio de la alineación de secuencia de varias globulinas 11S (Lawrence, 1999). De este modo la subunidad alfa de las globulinas 11S en general es más sensible a sufrir modificaciones, lo que explicaría, la falta de similitud establecida entre el polipéptido analizado y la subunidad "α" (A) del propolipéptido de amaranto ya secuenciado.

Por otro lado el hecho de que A' y B presenten homología con el precursor ya secuenciado (Barba de la Rosa y col., 1996) concuerda con el hecho de que esta es la región más conservada en las leguminas. Sin embargo, no se encontró homología entre A' y B, lo que hace suponer que provendrían de precursores diferentes. De acuerdo a estos resultados, el polipéptido A' correspondería a la región C-terminal de un precursor que ha sufrido un procesamiento distinto al que sufren los polipéptidos B.

En cuanto a la caracterización de los polipéptidos presentes sólo en globulina 11S, la homología del polipéptido L con una secuencia de globulina 7S debe tomarse con

cuidado ya que existen algunos fragmentos trípticos importantes en su espectro de masa que no han podido ser alineados con la secuencia mencionada (Figura 43).

Con respecto al polipéptido S la falta de similitud con otras proteínas se debe probalemente a que el número de secuencias determinadas es escaso para poder asociarle semejanza con una proteína conocida. De acuerdo a los resultados alcanzados, no podemos confirmar la hipótesis planteada al comienzo, que proponía a L y S como provenientes de un precursor similar a M con distinto procesamiento.

Sin embargo, no debemos dejar de lado que el número de secuencias de los péptidos obtenidas *de novo* para todos los polipéptidos es escaso y además la longitud de las mismas es corta, por lo tanto las conclusiones que puedan derivarse de su análisis deberían ser reconfirmadas a través de nuevas experiencias.

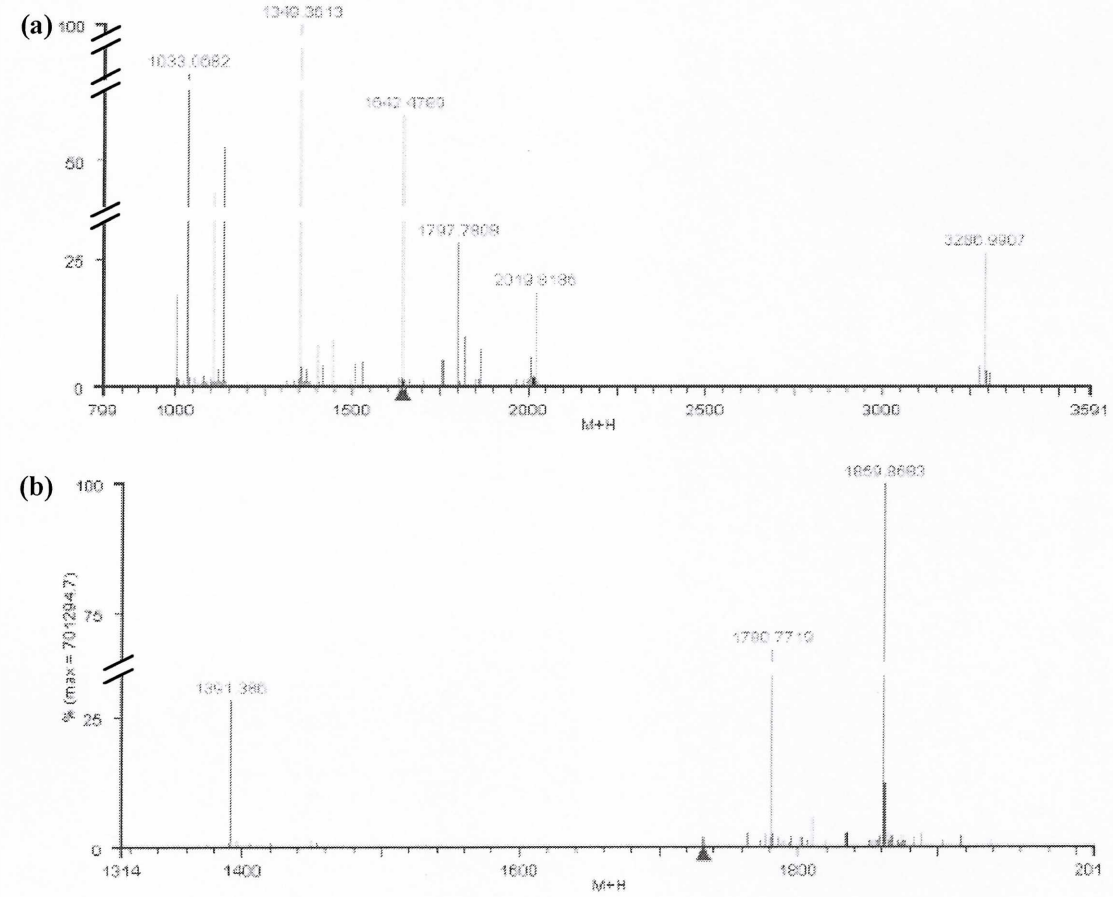


Figura 37. Espectros de masa (MALDI) de los fragmentos trípticos de: (a) polipéptido L, (b) polipéptido S.

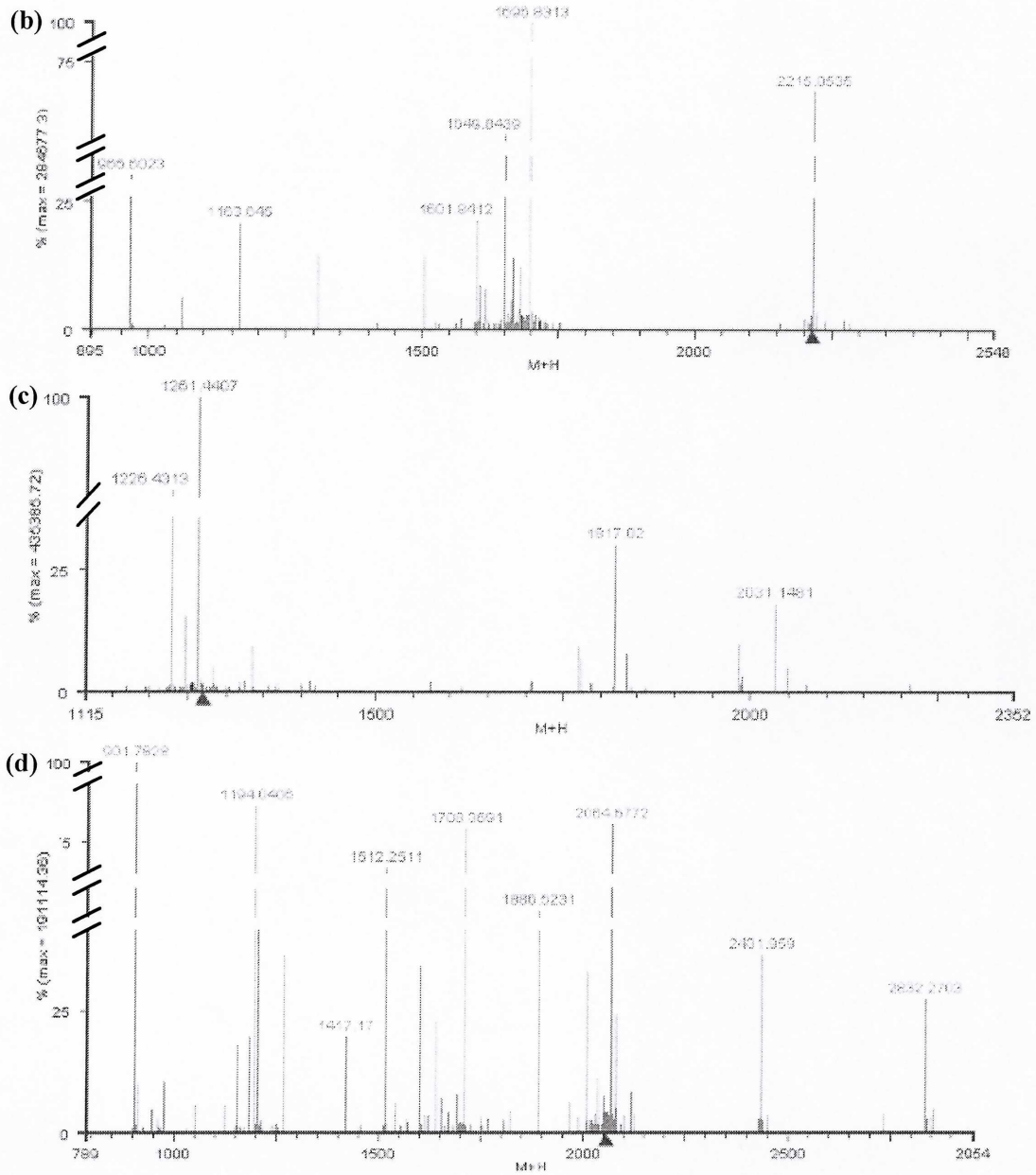


Figura 38. Espectros de masa (MALDI) de los fragmentos trípticos de: (a) polipéptido A, (b) polipéptido A', (c) polipéptido B, (d) polipéptido M.

Polipéptido A

-LVYLER-AFYL-SDDAMQCR-NPSNAQDASFR-GTLPNFFPFPR-AFGVPEELLSR-EEDLVAV-
CDTGCDE-TFPGCPETYQ-GECDTGCDEEEHESR-TLDNPMMLLRL-EFPGCPETYQ-GLMGVTFPGC-
DWEDLVAVHV-WEDLVAVHV-ELCGEGGLLELW-EYVW-

Polipéptido A'

-MAPN-TSLN-VQLAGHEGR-VFNPQNR-GLEETLCSVR-LNAHSLLYFTK-PEQADVFN-
AFLTSDEAMLS-LPLLNYLGALSAEK-PEQVVMNSY-LTVFSPSEEFQR-NLVV-LTENLDDPEQADVFN-
LMGVTFPGC-

Polipéptido B

-DSDVYTR-HLDMSL-GLEETLCSVR-GLEESLCTMK-PLVGYTSVFR-QHQTFFLPSR-LNAHSLLYFTK-
-GNDGFEYVSFK-TSENA-TLPNFF-LPLLNYLQLSAEK-LNLVNEHKLPLLK-VLLNSYQLSPR-
PEQVVMNS-VVSNEXXTPVDDR-YQNALMAP-TVFSPSE-LLSGWG-VLLNSYQLSPR-VLPQYF-

Polipéptido L

-HADPFGGK-DSGPLQLFR-LLEGLENYR-LVGVLLNPVSNPSGK-LVGYTSVFR-AFSTELLEAAYK
-LFSQQSEGALLR-PAGVTAYL--FEMACP--TLPNFF-ASEEQLSALTH-LPLLNYLQL-QGEGTVSLV-
-VMVLPAGVTA-QSNAFGTLMXXXSQQSEXXRR-FQENGELVDL-EEEEVGGESGAPYVFDEQH-

Polipéptido M

-EFESLR-LLEGLENYR-NPVSN-FLAGNPQGR-WFYND-QCAGVSLVR-FQHQD-TLPNFF-NDDR-
VYQGHLVALPAGVSK-LFSENNLLSGFDR-AEAGVNEL-PAML-YPGHE-SQAFGLEPETVSK-
VMVLPA-LLDQLSANEPLNR-QSNAFGTLFETDMMDR-VEGDLGLLL-LDVLAGTAEQFLNAVK-
NPPFLPAGQSNT-EYGSSE-PGHGSDAEPSYPGHSGER-

Polipéptido S

-FQDFK-FLAGN-QCAGVT-FDPLEEC-LFSQQAV-GDESTTPVHYER-TLPNFF-LFSENNLLS-FVVP-
-AEAGVEE-HSQAFGLEP-ELAFASS-LLDQLSANEP-QSNAFG-EEEEEVGWSQ-

Figura 39. Secuencias *de novo* determinadas para los péptidos trípticos de los polipéptidos analizados.

```
                                 1                                                  50
Q9SE84|Q9SE84_PERFR   .NASKLLLAL SLSLLV.... .....SLAVR AENYRADARN GLRLSRNQ.Q
  P09800|LEGB_GOSHI   .MAYTSLLSF SVCLLVLFHG CCAQIDLVTN HRQDPFWGQP QQPQPRHQSQ
                                                                    SDDAMQ
                                 51                                                 100
Q9SE84|Q9SE84_PERFR   CRIQRISAVQ PHHQIQSEGG LTELWDEMEA QFQCAGVVAN RNTLRPNALS
  P09800|LEGB_GOSHI   QQLQNLNALQ PKHRFRSERG ETEPWDQNED QFQCAGVAFL RHKIQRKGLL
                      QR             ELCGEGG LLELW                          GT-
                                 101                                                150
Q9SE84|Q9SE84_PERFR   LPWYEPWPRL WYLERGEGFI GVIPPGCAET YH.GGEEASF EGRREGEQKE
  P09800|LEGB_GOSHI   LPSFTSAPML PYVEQGEGIH GAVPPGCPEI YQSQSQQNIQ DRPQ......
                      LPNFFPFPRL VYLER   GLM GVTFPGCPET YQ
                                               EFPGCPET YQ
                                 151                                                200
Q9SE84|Q9SE84_PERFR   GGRARDSHQK IHRIRQGDIV VLPPGAVHWC HNDGSEDLVA YSINDLNHQE
  P09800|LEGB_GOSHI   ....RDQHQK LRRLKEGDVV ALPAGVAHWI FNNGRSQLVL VALVDVGNDA
                                                           EEDLVA V       NPS
                                                          DWEDLVA VHV
                                 201                                                250
Q9SE84|Q9SE84_PERFR   NQLDQKPPAF YLAG....GV PSGQEQGQGK QEAGR..... ........ES
  P09800|LEGB_GOSHI   NQLDENPRKP FLAGSPQGGV VRGGQSRDRN QRQSRTQRGE REEEESQESG
                      NAQDASFRAF YL
                                 251                                                300
Q9SE84|Q9SE84_PERFR   FHNIPGAFDA ELMAEAFNVS PDIIPRNQAS EEERGLSVMA ..........
  P09800|LEGB_GOSHI   GNNVLSGFRD NLLAQAFGID TRLARKLQNE RDNRGAIVRM EHGFEWPEEG
                                  EMMAEAFGWP EELLSR
                                 301                                                ▶350
Q9SE84|Q9SE84_PERFR   .......... .......... .HESNRYIRP .EEMREHSRR SSSNENGLEE
  P09800|LEGB_GOSHI   QRRQGREEEG EEEREPKWQR RQESQEEGSE EEEPEERGRG RRRSGNGLEE
                                               GECDTGCD EEEHESR          ▶
                                 351                                                400
Q9SE84|Q9SE84_PERFR   SFCSMKIMSN LDNTREADVY SRQAGKLNVV DMHKLPILRA VDMSAEKGTL
  P09800|LEGB_GOSHI   TFCSMRLKHR TPAS.SADVF NFRGGRITTV NSFNLPILQY LQLSAERGVL

                                 401                                                450
Q9SE84|Q9SE84_PERFR   FFNAMLSFDW AMQGHTIVYV TRGNAKVQVV DHKGQSLMND RVQQGEMFVV
  P09800|LEGB_GOSHI   YWNAIYAFHW NMNAHSIVYI TRGNGRIQIV SENGEAIFDE QVERGQVITV

                                 451                                                500
Q9SE84|Q9SE84_PERFR   PQFYTSTAEA GNEGFEWVAF KTSGFPMRNQ VAGYTSALRA NPLQVLTNAY
  P09800|LEGB_GOSHI   PQNHAVVKKA GRRGFEWIAF KTNANAKISQ IAGRVSINRG LPVDVLANSF

                                 501                                   532
Q9SE84|Q9SE84_PERFR   QNSFNEARAI KTNRGSQTFL LSFTRAHGRK RY
  P09800|LEGB_GOSHI   GISREEAMRL KHNR.QEVSV FSFRQGSQQ. ..
```

Figura 40. Alineación de secuencia del polipéptido A con legumina de *Perilla frutescens* (Beefsteak plant): Q9SE84|Q9SE84_PERFR y legumina B de *Gossypium hirsutum* (algodón): P09800|LEGB_GOSHI. La secuencia de aminoacidos deducida a partir de la interpretacion *de novo* se señala en caracteres azules. Se resaltan en amarillo las partes de la secuencia de las proteínas coincidentes con los aminoácidos *de novo*. En caracteres rojos y una punta de flecha se indica el sitio de corte. I=L, Q=K.

```
                        1                                                  50
      gi|122726601      ..MAKSTNYF LISCLLFVLF WGCM.GEGRF ........... REFQQGNECQ
Q9AUD2|Q9AUD2_SESIN     MALTSLLSFF IVVTLLIRGL SAQLAGEQDF YWQDLQSQQQ HKLQARTDCR
Q40347|Q40347_MAGSL     ..MAALISLA LFFLVLVHGS VAQF.GRGPL QPQQ.QQQQQ QRFRRQSECR
                        51                                                100
      gi|122726601      IDRLTALEPT NRIQAEAGLT EVWDSNEQEF RCAGVSVIRR TIEPHGLLLF
Q9AUD2|Q9AUD2_SESIN     VERLTAQEPT IRFESEAGLT EFWDRNNQQF ECAGVAAVRN VIQPRGLLLF
Q40347|Q40347_MAGSL     VESLSALEPN RRYESEAGVT EQWDQNNEQL ECAGVAATRR TIAPRGLLLF
                        101                                               150
      gi|122726601      SFTSAPELIY IEQGNGITGN MIPACPQTYE SGSQQFQGGE DERIREQGSR
Q9AUD2|Q9AUD2_SESIN     HYNNAPQLLY VVRGRGLQGT VIPGCAETPE RDTQPRQ... ..DRRR....
Q40347|Q40347_MAGSL     SFDNAPRLIY VVQGSGITGA IIPGCPESPQ SPQQSEQPEG GQGQRQ....
                                           LMGV TFPGC
                        151                                               200
      gi|122726601      KFGMRGDRPQ DQHQKIRHLR EGDIPANPAG VFHWAYHNGD HPLVPVILID
Q9AUD2|Q9AUD2_SESIN     .......RPN DRHQKVRQFR QGDILALPAG LTLWFYNNGG EPLITVALLD
Q40347|Q40347_MAGSL     .......RQR DQHQKIQHFR QGDVIAIPAG VAHWTYNDPE TPVVLVSVLD
                        201                                               250
      gi|122726601      TANHANQLDK NFPTRSYLAG KPQQEHSGEH QPSRESRRGE RNTGNIFRGF
Q9AUD2|Q9AUD2_SESIN     TGNAANQLDQ TF.RHFFLAG NPQGGRQSYF G.RPQTEKQQ GETKNIFNGF
Q40347|Q40347_MAGSL     TSNYANQLDQ NH.RRFFLAG GQQQQSRQSY Q.QQQT.REQ GPSDNIFNGF
                        251                                               300
      gi|122726601      ETRLLAESFG VSEEIAQKLQ AEQDDRGNIV RVQEGLHVIK PPSRAWEERE
Q9AUD2|Q9AUD2_SESIN     DDEILADAFG VDVQTARRLK GQDDLRGRIV RAER.LDIVL PGEE...EEE
Q40347|Q40347_MAGSL     NVETLAEAFG VSRETARKLQ SQDDNRGSIV RVENGLQVVR PPRR...EED
                                                            LTVFS PS-E---EFQ
                        301                                               350
      gi|122726601      QGSRGSRYLF NGVETICSA RLAVNVDDPS NADVYIPEAG KLLLVSSLL
Q9AUD2|Q9AUD2_SESIN     RWERDPYSGA NGLEETLCTA KLRENLDEPA RADVYNPHGG RISSLNSLTL
Q40347|Q40347_MAGSL     ..EEQEQFRL KGLEETQCSA KLTYNIADPT RADVYNPQAG RITSLNSQKF
                        R          GLEETLCSV RLTENLDDPE QADVFNPQGG R        L
                        351                                               400
      gi|122726601      RLLNHLRLSA AKGVLYRNAN MAPHYNLNAE NINYCVRGRG RIQIVNDQGQ
Q9AUD2|Q9AUD2_SESIN     FVLSWLRLSA EKGVLYRNGL VAPHWNLNAH SIIYITRGSG RFQVVGHIGR
Q40347|Q40347_MAGSL     FILNYLQLSA ERGVLYRNAL LAPQWNVNAH SVVYATRGNG RVQIVGEQGR
                        FLLNYLQLSA EK         MAPN  LNAH SLLYFTK     VQLAGHEGR
                        401                                               450
      gi|122726601      SVFDEELSRG QLVVVPQNFA IVKQAFED.G FEWVSFKTSE NAMFQSLAGR
Q9AUD2|Q9AUD2_SESIN     SVFDGVVREG QLIIVPQNYV VAKRASQDEG LEWISFKTND MAMTSQLAGR
Q40347|Q40347_MAGSL     FVFDGELREG QLVVVPQSFA VVKQAG.KKG FEYVAFKTND MAMNSFLVGK
                                                            AFLTSD EAMLS
                        451                                               500
      gi|122726601      TSAIRSLFID VVSNIYQISR EEAFGLKFNR PETTLFRSSG QGEYRRKISI
Q9AUD2|Q9AUD2_SESIN     LSAIRAMFEE VVMTAYQVSR DEARRLKYNR EESRVFSSTS RYSWFRSSRF
Q40347|Q40347_MAGSL     TSVIRAMFED VLMNSYRISR EEARRLKYNR EEIAVFAPRF Q.SQERAAAL
                                PEQ VVMNSY
                        501                 519
      gi|122726601      A......... .........
Q9AUD2|Q9AUD2_SESIN     NSYNPKPFEY VLDVIKSMM
Q40347|Q40347_MAGSL     F......... .........
```

Figura 41. Alineación de secuencia del polipéptido A' con globulina 11S de *Amaranthus hypochondriacus*: gi|122726601; globulina 11S de *Sesamum indicum*: Q9AUD2|Q9AUD2_SESIN y globulina de *Magnolia salicifolia*: Q40347|Q40347_MAGSL. La secuencia de aminoacidos deducida a partir de la interpretacion *de novo* se señala en caracteres azules. En celeste se resaltan las partes de la secuencia identificadas automáticamente en la búsqueda en el banco de datos y en amarillo las partes de la secuencia de las proteínas coincidentes con los aminoácidos *de novo*. En caracteres rojos y una punta de flecha se indica el sitio de corte. I=L, Q=K.

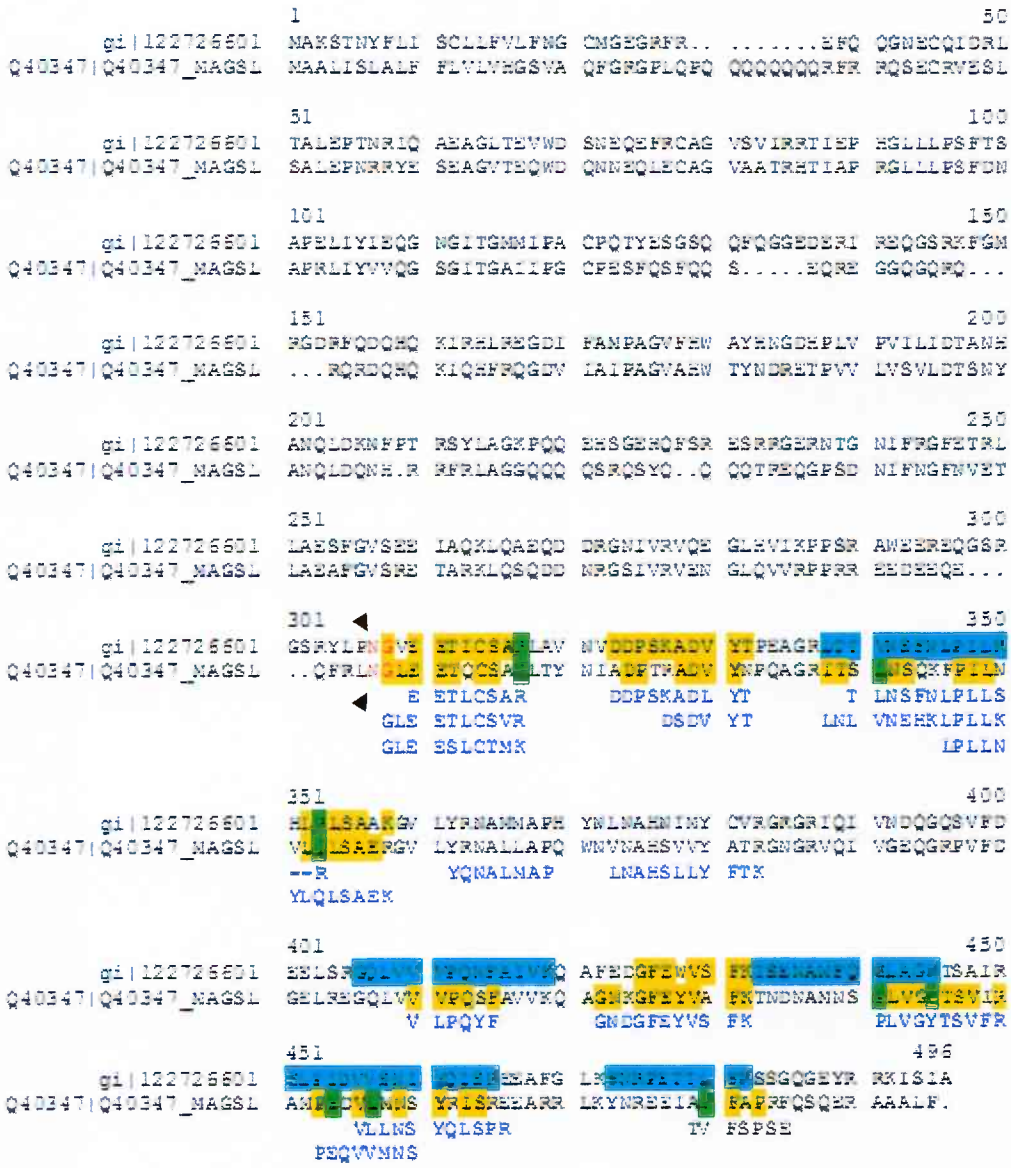


Figura 42 Alineación de secuencia del polipéptido B con globulina 11S de *Amaranthus hypochondriacus*: gi|122726601 y globulina de *Magnolia salicifolia*: Q40347|Q40347_MAGSL. La secuencia de aminoacidos deducida a partir de la interpretación *de novo* se señala en caracteres azules. En celeste se resaltan las partes de la secuencia identificadas automáticamente en la búsqueda en el banco de datos, en amarillo las partes de la secuencia de las proteínas coincidentes con los aminoácidos *de novo* y en verde las secuencias conflictivas. En caracteres rojos y una punta de flecha se indica el sitio de corte. I=L, Q=K.

(a)

```
>Q9AUD0|Q9AUD0_SESIN 7S globulin - Sesamum indicum (Oriental sesame) (Gingelly).

MSCGGRLCLVLFALLLASAVVASESKDPELKQCKRQCKAQQQISKEQKEACIQACKEYIR

QKRQGEHGRGGGDILEEEVWNRKSPIERLRECSRGCEQQHGEQREECLRRCQEEYQREKG

RQDDDNPTDPEKQYQQCRLQCRRQGEGGGFSREREERRREEKYREQQGREGGRGENYEGR

EREEEQEEQGRGRIPYYEEQHFITGFRTQHGRNRVLQKFTDRSELLRGIENYRVAILEA
  EEEEEVGGESGAPYVFDEQE                          LLEGLENYR
EPQTFIVPNEWDAEEVVFVARGRGTISLVRQDRREGLNIKQGDILKINAGTTAYLINRDN
                    QGEGTVSLV                    PAGVTAYL
NERLVLAKLLQFVSTPGEFELFFGAGGENPESFFKSFSDEILEAAFNTRRDRLQRIFGQQ
   LV-GVLLNFVSNPSGK                   AFSTELLEAAYK
RQGVIVKASEEQVRAMSREEGGIWFGGESKGTINIYQQRPTHENQYGQLHEVDASQYR
       ASEEQLSALTH     HADPFGGK                QSNAFGTLM--- SQQS
QLRILDLTVSLANITQGAMTAPHYNSKATKIALVVDGEGYFEMACPHMSRSRGSYQGETR
E-RR                                        FEMACP
GRPSYQRVASRLTRGTVVIIPAGHPVAVASSNQNLQVLCFEVNANNNEKFPLAGRRNVN
                 VNVLPAGVTA
NQLEREAKELAFGNPARRVEEVSRSQQEEFFFKGFRQQQQGRADA
```

(b)

MALDI	# spectre	mass	m/z	charge	sequence
+	205	1031.5232	1032.5232	1	DSGPLQLFR
+	1	1133.5968	567.7984	2	FREQEGNVR
+	214	1347.7562	674.8781	2	LFSQQSEGALLR

Figura 43 Alineación de secuencia del polipéptido L con 7S globulin - *Sesamum indicum*: Q9AUD0|Q9AUD0_SESIN. (a) La secuencia de aminoacidos deducida a partir de la interpretación *de novo* se señala en caracteres azules. Se resaltan en amarillo las partes de la secuencia de las proteínas coincidentes con los aminoácidos *de novo* y en verde las secuencias conflictivas. I=L, Q=K. (b) Péptidos importantes en el epectro de masa MALDI que no fueron interpretados (su secuencia deducida a partir de la interpretación *de novo* no alinea correctamente con la proteína señalada).

(a)

```
>P09800|LEGB_GOSHI Legumin B - Gossypium hirsutum (Upland cotton).
1                                                                                80
MAYTSLLSFSVCLLVLFHGCCAQIDLVTNHRQDPFWGQPQQPQPRHQSQCQLQNLNALQPKHRFRSEAGETEFWDQNEDQ

81                                                                              160
PQCAGVAFLRHKLQRKGLLLPSFTSAFMLFYVEQGEGIHGAVFPGCPETYQSQSQQNIQDRPQRDQHQKLRRLKEGDVVA
 QCAGVSLVR                                                                  VYQGHLVA
161                                                                              NPPF
LPAGVAENIFNNGRSQLVLVALVDVGNDANQLDENFRKHFLAGSPQGGVVRGGQSRDRNQRQSRTQRGEPEEEESQESGG240
LPAGVSK                                  FLAGNPQGR                              LFSE
LPAGQSNT                                                                         320
241NNVLSGFDNLLAQAFGIDTRLAFKLQNERDNRGAIVRNEHGFEWFEEGQRRQGREEEGEEERERPKWQRRQESQEEGSEE
NNLLSGFDR   SQAFGLEPETVSK                                                        400
321EERERRGRGRRRSCNGLEETFCSMRLKHRTPASSADVFNPRGGRITTVNSFNLFILQYLQLSAERGVLYNNAIYAPHWNN

401                                                                              480
NAHSIVYITRGNGRIQIVSENGEAIFDEQVERGQVITVPQNHAVVKKAGRRGFEWIAFKTNANAKISQIAGRVSIMRGLF

481                                  516
VDVLANSFGISPEEAMRLKHNRQEVSVFSPRQGSQQ
```

(b)

MALDI	# spectre	mass	m/z	charge	sequence
+	1	900.4428	451.2214	2	-PGH---R
+	70	1199.5292	600.7646	2	WFYND--
+	21	1415.7228	708.8614	2	--QHQD--
+	152	1596.841	799.4205	2	--AEAGVNEL--PR
+	5	1706.8302	569.9434	3	YPGHE---
+	127	1884.9554	943.4777	2	---LLDQLSANEPLNR
+	37	2062.9908	688.6636	3	---YPGHGSQG--PR
+	133	2430.2055	811.0685	3	---LPAGQSNT--
+	180	2853.344	714.336	4	PGHGSWEPSYPGH--------

Figura 44. Alineación de secuencia del polipéptido M con legumina B de *Gossypium hirsutum* (algodón): P09800|LEGB_GOSHI. (a) La secuencia de aminoacidos deducida a partir de la interpretación *de novo* se señala en caracteres azules. Se resaltan en amarillo las partes de la secuencia de las proteínas coincidentes con los aminoácidos *de novo* y en verde las secuencias conflictivas. Con un círculo rojo se indica el sitio de corte. I=L, Q=K. (b) Péptidos importantes en el epectro de masa MALDI que no fueron interpretados (su secuencia deducida a partir de la interpretación *de novo* no alinea correctamente con la proteína señalada).

5.7 Renaturalización

Como una forma alternativa de analizar las interacciones entre los polipéptidos que integran globulina-p y globulina 11S y estabilizan la estructura nativa de ambas moléculas se estudió el proceso de desnaturalización–renaturalización. En estos experimentos se utilizaron las fracciones sin purificar.

Se realizaron varios ensayos empleando diferentes procedimientos y condiciones experimentales para establecer el mejor juego de condiciones (pH, presencia o no de algún aditivo) que ayude a la proteína a adquirir un plegamiento similar al nativo (ver item 3.13, Materiales y Métodos).

Cuando la fracción globulina-p es tratada con urea en alta concentración a pH alcalino, (ver item 3.13.1, condición *D1*, Materiales y Métodos) se produce un intercambio

sulfhidrilo-disulfuro, se liberan algunos polipéptidos A y B que integraban dímeros D y se forman agregados de alta masa molecular. En la Figura 45**a** se observa como cambia el perfil de una muestra control y una desnaturalizada en estas condiciones. Con puntas de flecha se señalan algunas de las modificaciones que sufre el perfil electroforético por el intercambio SH-SS.

Cuando la muestra desnaturalizada con urea en medio alcalino se llevó hasta una condición similar a la previa al tratamiento mediante dilución en buffer B (pH=8,5; μ=0,08), (ver item 3.13.2, condición *R1*, Materiales y Métodos), se observó la formación de un precipitado insoluble. Ambas fracciones (soluble e insoluble), fueron analizadas por SDS-PAGE en presencia y en ausencia de 2-mercaptoetanol (2ME) (Figura 45**b**). A pesar que la figura no tiene una buena resolución, se puede inferir a partir de ella que en la fracción soluble en ausencia del agente reductor (Figura 45**b**, -2ME, calle "s"), se encontarían principalemente agregados de masa molecular superior a 94 kDa (llave superior en la figura), polipéptidos de alrededor de 56 kDa (punta de flecha en la figura), y polipéptidos con una masa entre 35 y 43 kDa (llave intermedia en la figura) y en menor medida algunos polipéptidos B (llave inferior en la figura). Mientras que en la fracción insoluble (Figura 45**b**, -2ME, calle "i") encontramos principalmente a polipéptidos de 56 y 20 kDa y en menor medida, algunos agregados.

Al analizar la fracción soluble en presencia del agente reductor (Figura 45**b**, +2ME, calle "s"), encontramos principalmente polipéptidos A y en menor proporción polipéptidos B. Es decir, las bandas observadas en el perfil de la fracción soluble en ausencia de 2-mercaptoetanol (Figura 45**b**, -2ME, calle "s"), estaban formadas por polipéptidos A unidos por enlaces disulfuro a otros polipéptidos de la misma masa o bien a algunos polipéptidos B. El perfil de la fracción insoluble en presencia del agente reductor (Figura 45**b**, +2ME, calle "i"), igual al observado en ausencia de 2ME, mostró los polipéptidos M y B, y en menor medida, algunos polipéptidos A.

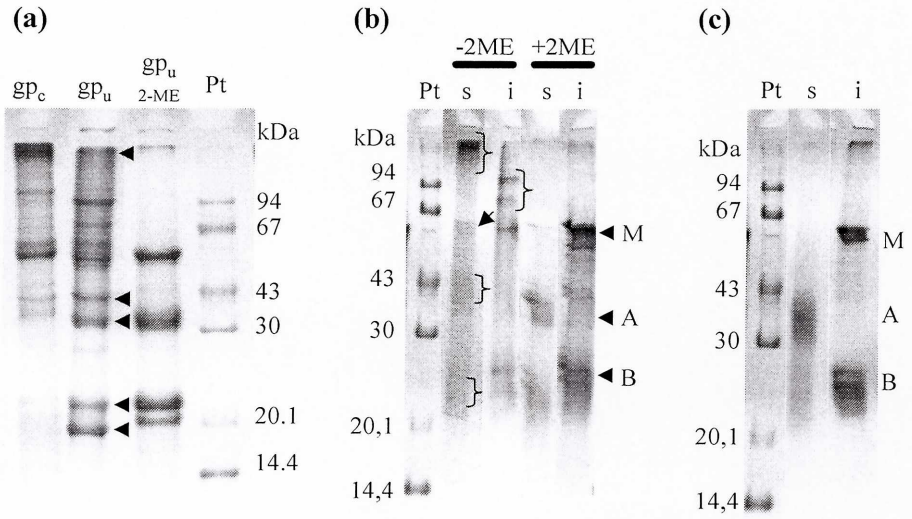


Figura 45. SDS-PAGE y SDS-PAGE+2ME de globulina-p desnaturalizada con urea, renaturalizada por dilución en buffer B (ver item 3.13.1 condición *D1*, 3.13.2 condición *R1*, Materiales y Métodos). (a) gpc: globulina-p control; gpu: globulina-p desnaturalizada con urea; gpu 2ME: globulina-p reducida con 2-Mercaptoetanol. Se señalan con puntas de flecha las bandas que aparecen por el intercambio SH-SS. (b) gp renaturalizada por dilución en buffer B. (c) SDS-PAGE de globulina-p desnaturalizada con urea + 2ME, renaturalizada por dilución en buffer B +2ME (ver item 3.13.1 condición *D2*, 3.13.2 condición *R2*, Materiales y Métodos). En la parte superior de los geles se señala con una "s" a la fracción soluble y con una "i" a la insoluble. Pt: proteínas patrones de masa molecular. Concentración de acrilamida 12%. Tinción: Coomasie Brillant Blue.

En la Figura 45**c**, se puede apreciar un fenómeno de segregación de polipéptidos en fracción soluble e insoluble similar al descrito, pero en este caso el proceso de desnaturalización y renaturalización se llevó a cabo en condiciones reductoras (ver item 3.13.1 condición *D2*, 3.13.2 condición *R2*, Materiales y Métodos). Este ensayo confirma la existencia de una interacción entre los polipéptidos M y B que sería de tipo no covalente, ya que se establece aún en presencia del agente reductor. A diferencia de los resultados que observamos en la Figura 45**b**, en donde algunos de los polipéptidos B permanecían en la fracción soluble y algunos polipéptidos A se encontraban en la insoluble, el hecho de romper el enlace disulfuro que los mantiene unidos hace que la segregación de A hacia el soluble sea completa.

En un ensayo posterior, se desnaturalizó globulina-p en presencia de urea en alta concentración a pH ácido (ver item 3.13.1, condicion *D3*, Materiales y Métodos) para evitar el intercambio SH-SS. Posteriormente, se volvió a una condición similar a la inicial (concentraciones de urea y ácido no desnaturalizantes), diluyendo la muestra lo suficiente en buffer B (ver item 3.13.2, condición *R3*, Materiales y Métodos). Nuevamente se observó la formación de agregados insolubles. Al analizar su composición en SDS-PAGE +2ME (resultados no mostrados), encontramos que estos

agregados estaban formados por todos los polipéptidos, mientras que en la fracción soluble aparentemente no había proteína. De este modo se deduce que es necesario que exista intercambio sulfhidrilo-disulfuro o bien, que haya algún agente reductor que interrumpa el enlace entre A y B para que exista la segregación de los polipéptidos A hacia la fracción soluble.

En ciertas proteínas, resulta beneficioso para su correcto plegado enfrentarse a concentraciones de desnaturalizante intermedias a las utilizadas para la desnaturalización (Rudolph y Lilie, 1996; Vallejo y Rinas, 2004), sin embargo, esto debe ser probado experimentalmente para cada proteína. De este modo, se estudió una forma alternativa para llevar adelante el proceso de renaturalización. Se desnaturalizó a globulina–p en presencia de urea en alta concentración a pH ácido (ver item 3.13.1, condición *D3*, Materiales y Métodos). Posteriormente, la muestra fue llevada a una condición no desnaturalizante a través de un proceso de diálisis contra buffers de diferentes pHs (ver item 3.13.2, condición *R4*, Materiales y Métodos). Del mismo modo que en los casos anteriores se observó la formación de agregados insolubles al llevar a condiciones no desnaturalizantes. Como lo muestra la Figura 46 +2ME, calle "i", en este caso, todos los polipéptidos (M, A y B) se encontraban formando parte de los agregados, estos mismos polipéptidos en ausencia de 2-mercaptoetanol formaban agregados y dímeros, entre ellos D_3, unidos por enlaces disulfuros (Figura 46, -2ME, calle "i"). La fracción soluble (Figura 46, +2ME, calle "s"), estaba formada por los polipéptidos A principalmente y en menor medida por algo del polipéptido B. A pesar que la diálisis se realizó en presencia de azida de sodio, su concentración no fue suficiente para evitar la contaminación por microorganismos, que provocaron la hidrólisis parcial de globulina-p, esto se infiere por la presencia de péptidos de menor masa molecular (indicados en Figura 46 con una punta de flecha) que serían productos de hidrólisis. Se puede suponer que durante el proceso de diálisis existió cierto grado de intercamio SH-SS que dio origen a la liberación de A y su solubilización en medio alcalino.

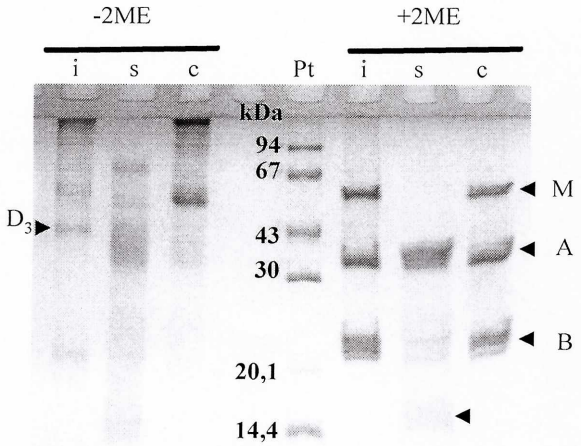


Figura 46. SDS-PAGE y SDS-PAGE+2ME de globulina-p desnaturalizada con urea a pH ácido, renaturalizada por diálisis (ver item 3.13.1 condición *D3* y 3.13.2 condición *R4*, Materiales y Métodos). En la parte superior c: muestra control, s: fracción soluble; i: insoluble. A la derecha de ambas figuras se señalan los polipéptidos más importantes de globulina-p. Con una punta de flecha se indican los posibles productos de hidrólisis. A la izquierda se señalan las masas de las proteínas patrones. Concentración de acrilamida 12%. Tinción: Coomasie Brillant Blue.

Los protocolos que se utilizan en la renaturalización de proteínas en la mayoría de los casos no son aplicables para una reconstrucción eficiente de la estructura nativa de proteínas que tienen multidominios o están formadas por varias subunidades o poseen una cantidad relativamente alta de enlaces disulfuro (Rudolph y Lilie 1996, Vallejo y Rinas, 2004). Debido a que tanto globulina-p como globulina 11S pertenecen a esta clase de proteínas se ensayó un protocolo de desnaturalización-renaturalización similar al utilizado por Osuna-Castro y col. (2000) para renaturalizar globulina 11S de amaranto a partir de su sobreexpresión en *E. coli* (ver 3.13.1 condición *D4*, 3.13.2 *R5*, Materiales y Métodos). El buffer de renaturalización empleado contenía glutation oxidado y reducido; esta mezcla de tioles es ampliamente empleada para favorecer la formación de los enlaces disulfuros presentes en la estructura nativa. Este protocolo no fue efectivo para recuperar la estructura de globulina-p, nuevamente se observó la segregación de los polipéptidos A a la fracción soluble como se muestra en Figura 47, + 2ME, calle "s".

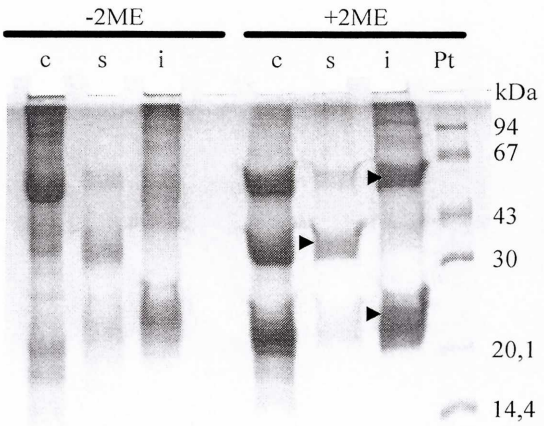


Figura 47. SDS-PAGE y SDS-PAGE+2ME de globulina-p (ver 3.13.1 condición *D4*, 3.13.2 *R5*, Materiales y Métodos). En la parte superior, c: control, s: fracción soluble, i: fracción insoluble. Con puntas de flecha se señalan los polipéptidos más importantes de globulina-p. A la derecha se señalan las masas de las proteínas patrones. Concentración de acrilamida 12%. Tinción: Coomasie Brillant Blue.

A pesar que la estructura nativa de una proteína es energéticamente más estable y a pesar de las condiciones utilizadas para la renaturalización, los polipéptidos M y B interaccionaron formando agregados insolubles (Figura 47, +2ME, calle "i"). No resultó suficiente la existencia de un potencial de óxido-reducción controlado para el correcto ensamblado *in-vitro* de las subunidades de globulina-p. Evidentemente las interacciones que se establecen entre M y B son tan importantes que superan a las interacciones que llevan a la formación de la estructura nativa. De este modo, podemos sugerir que la relación que se establece entre los polipéptidos M y B no existe en la estructura nativa, sino que se establece cuando globulina-p se encuentra desnaturalizada. En el trabajo presentado por Osuna Castro y col. (2000) tampoco se demuestra la efectividad del método de renaturalización.

Como fuera observado en los casos anteriores, la interacción entre los polipéptidos M y B es no covalente, y se manifiesta cuando las cadenas polipeptídicas están desplegadas y expuestas al medio que las rodea. Una de las posibles interacciones no covalentes que podrían establecerse entre estos dos polipéptidos es de carácter hidrofóbico, ya que de acuerdo a los resultados obtenidos en el RP-HPLC los polipéptidos B tienen una hidrofobicidad intermedia o alta (Figura 34**a** y **b**). Con el objetivo de probar esta hipótesis se realizaron ensayos de desnaturalización-renaturalización utilizando en paralelo dos condiciones de renaturalización:

- *R6*: dilución de la muestra desnaturalizada en buffer B que se usó como control positivo de la interacción entre M y B,
- *R7*: dilución de la muestra desnaturalizada en agua (condición en la cual se ven desfavorecidas las interacciones hidrofóbicas).

Las muestras fueron desnaturalizadas de acuerdo a la condición *D5* (ver item 3.13.1, Materiales y Métodos)

Se obtuvieron resultados equivalentes a los anteriores cuando la muestra desnaturalizada fue diluida en buffer B. En presencia del agente reductor (Figura 48**a** +2ME, calle "RBBi"), todos los polipéptidos (M, A y B) se encontraban en la fracción insoluble, estos mismos polipéptidos en ausencia de 2-mercaptoetanol formaban agregados unidos por enlaces disulfuro (Figura 48**a**, -2ME, calle "RBBi"). La fracción soluble (Figura 48**a**, +2ME, calle "RBBs"), estaba formada principalmente por los polipéptidos A.

Sin embargo, cuando la misma muestra fue diluida en agua bidestilada, no se separó una fracción insoluble. Al analizar la fracción soluble de esta muestra mediante SDS-PAGE en presencia de 2-mercaptoetanol (Figura 48**b**, +2ME, calle "RH_2O"), encontramos a los tres tipos de polipéptidos que forman a globulina-p confirmando que la interacción entre los polipéptidos M y B no se produjo en las condiciones usadas para la renaturalización.

Sin embargo, al analizar la muestra por medio de una electroforesis no desnaturalizante (Figura 48**c**, calle "RH_2O"), comprobamos que el perfil, a pesar de la baja cantidad de proteína sembrada y de la mala resolución lograda en el gel, es similar al de la muestra desnaturalizada (Figura 48**c**, calle "D") y diferente al del control nativo (Figura 48**c**, calle "C"). Estos resultados nos estarían indicando que no hubo una recuperación apreciable de estructura nativa. De este modo, podemos sugerir que las interacciones entre M y B no son el único impedimento para la recuperación de la estructura nativa de globulina-p, tal vez el tiempo que se dispuso para la renaturalización no fue suficiente o bien debería agregarse algún aditivo que favorezca el plegamiento.

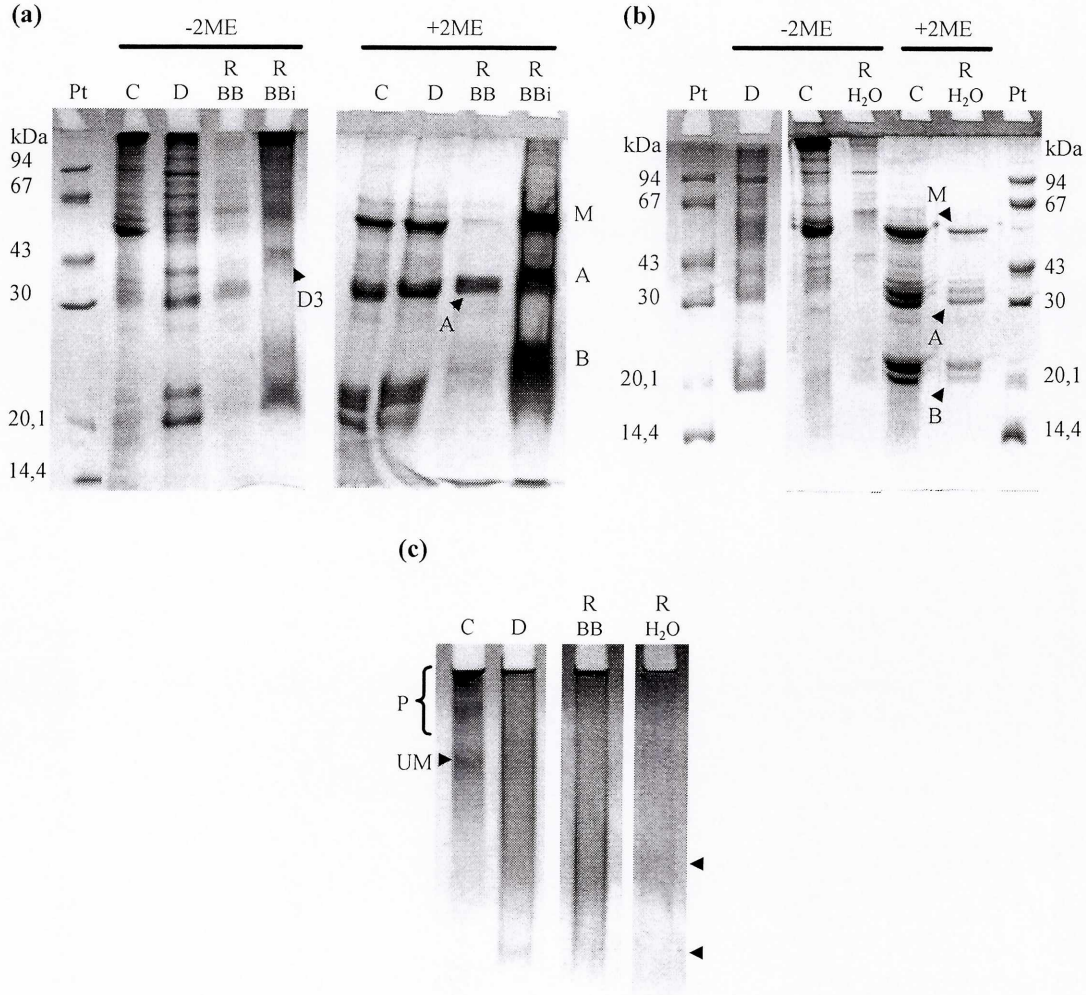


Figura 48. Globulina-p de amaranto. SDS-PAGE y SDS-PAGE+2ME. Concentración de acrilamida: 12%. (a) Desnaturalizada con urea renaturalizada por dilución en buffer B (ver item 3.13.1 condición *D5* y 3.13.2 condición *R6*, Materiales y Métodos). (b) Desnaturalizada con urea, renaturalizada en agua (ver item 3.13.1 condición *D5* y 3.13.2 condición *R7*). Las masas de las proteínas patrones se indican en la figura. (c) Electroforesis no desnaturalizante. Concentración de acrilamida: 6%. Tinción Coomasie brillant blue. Calles: C: control, D: desnaturalizada, RBB: renaturalizada en buffer B, RBBi: renaturalizada en buffer B insoluble, RH2O: renaturalizada en agua, Pt: proteínas patrones.

A pesar de encontrarse todos los polipéptidos que forman a globulina-p en la muestra renaturalizada en agua bidestilada, la concentración de los mismos es baja. Una posible explicación a este resultado, es que al no haberse formado una estructura compacta como la nativa, durante el paso de concentración de la muestra renaturalizada, los polipéptidos se hayan adherido a la membrana empleada en la ultrafiltración, resultado que se ha encontrado en ocasiones anteriores.

Utilizando estas últimas condiciones (*D5; R6* y *R7*) fue analizada una muestra de globulina 11S de amaranto. Esta globulina, se comportó de forma similar a globulina-p

(resultados no mostrados). Se observó la formación de agregados insolubles cuando la muestra fue diluida en buffer B (aunque la cantidad de precipitado obtenida fue menor), mientras que cuando la dilución se hizo en agua bidestilada, no se formó una fracción insoluble.

De acuerdo a los resultados anteriores, las interacciones predominantes responsables de la agregación de los polipéptidos M y B tendrían características hidrofóbicas ya que se vieron favorecidas en presencia de sales, cuando globulina-p fue renaturalizada por dilución usando buffer B o buffer Tris. Sin embargo, la interacción no se produjo al hacer la dilución con agua bidestilada. Otro aspecto interesante que resulta del análisis de los resultados es que, para que se manifieste la agregación entre los polipéptidos M y B, es suficiente con tener a la proteína desnaturalizada, no es necesario que el enlace disulfuro que une a los los dímeros AB se encuentre roto ya sea por la presencia de un agente reductor como 2ME o bien, por la presencia de intercambio SH-SS. Si por alguno de los motivos señalados antes el polipéptido B se encuentra separado del A, entonces en la fracción insoluble encontramos principalmente a los polipéptidos M y B mientras que el polipéptido A es segregado a la fracción soluble (Figura 45**b** y **c** y Figura 47). Si el dímero AB no ha sido roto o se encuentra parcialmente conservado, la interacción producida entre M y B arrastra a los polipéptidos de A (que se encuentran unidos a los B) a la fracción insoluble (Figura 46).

En coincidencia con lo descrito en el presente trabajo, Lakemond y col. (2000b), informaron para los polipéptidos ácidos y básicos de glicinina de soja un fenómeno de segregación similar al que ocurre en amaranto cuando globulina 11S de soja es desnaturalizada térmicamente bajo distintas condiciones de pH y fuerza iónica. De acuerdo a los resultados informados por estos autores, en la fracción soluble que queda luego del calentamiento, se encuentran los polipéptidos ácidos libres así como también formando agregados con una masa superior a 100 kDa unidos por enlaces disulfuros. Mientras que en la fracción insoluble se observan mayoritariamente a los polpéptidos básicos junto con algunos polipéptidos ácidos (entre un 10-20% de la cantidad inicial de A antes del calentamiento). Este particular comportamiento, implica la existencia de una ruptura del enlace disulfuro y las interacciones no covalentes que unen A con B y se verifica cuando las condiciones a las que se lleva a cabo la desnaturalización, favorecen la reacción de intercambio sulfhidrilo-disulfuro. Los resultados informados por Lakemond y col. (2000b), están de acuerdo con trabajos anteriores presentados por Mori y col. (1981) y Yamagishi y col. (1987). A diferencia de los resultados obtenidos en

nuestro trabajo, los polipéptidos B y lo que queda de los polipéptidos A de glicinina de soja en el precipitado están unidos por enlaces disulfuro. De todos modos, en coincidencia con nuestros resultados, la segregación de A en la fracción soluble nos permite sugerir que la interacción que insolubiliza a los polipéptidos B es hidrofóbica ya que, si fuera debida al intercambio sulfhidrilo disulfuro enontraríamos una distribución al azar de los polipéptidos A y B entre la fracción soluble e insoluble.

Ma y Harwalkar (1987) y Choi y col. (2006) analizaron la desnaturalización térmica de globulina 11S de avena y trigo sarraceno respectivamente y caracterizaron las fracciones soluble e insoluble que se forman durante el tratamiento térmico. Con respecto a globulina de avena, el tratamiento rompió sólo las interacciones no covalentes que mantenían unidas a las subunidades en el hexámero y lo disoció generando las subunidades libres, sugiriéndose que los agregados insolubles se forman directamente desde los dímeros (AB) disociados del hexámero. El intercambio sulfhidrilo-disulfuro que ocurre en globulina de avena es limitado. En cambio, para globulina 11S de trigo sarraceno, los autores encontraron que tanto las interacciones no covalentes (interacciones puente hidrógeno e hidrofóbicas) asi como las covalentes (enlaces disulfuro) están involucradas en la formación de los agregados insolubles. Sin embargo, no se observa una redistribución de las cadenas polipeptídicas ácidas y básicas en agregados solubles e insolubles respectivamente de modo similar a lo que ocurre para globulina de avena y a diferencia de lo informado para soja (Lakemond y col. 2000b, Yamagishi y col., (1987) y Mori y col., 1981) y los resultados encontrados en este trabajo para las globulinas de amaranto.

Aunque en ninguno de los casos analizados se pudo comprobar la formación de una estructura equivalente a la nativa, estos experimentos han sido muy útiles para conocer el tipo de interacciones que se establecen entre los polipéptidos desnaturalizados y nos permitirán reorganizar los ensayos dedicados a la renaturalización de las moléculas de globulina-p y globulina 11S que se realicen en el futuro.

El comportamiento asociado a los polipéptidos de las globulinas de amaranto, explica parcialmente la no recuperación de la estructura nativa. Esta interacciones deben ser tenidas en cuenta a la hora de utilizar estas fracciones proteicas, o aislados proteicos cuya composición este enriquecida en ellas, como ingredientes funcionales en un producto que requiera la formación de estructuras como por ejemplo formación de geles o películas.

5.8 Conclusiones

La heterogeneidad polipeptídica de las globulinas de amaranto mostrada en este capítulo sustenta la existencia de polimorfismo genético. En la Tabla 11 se resumen las características de los principales polipéptidos de globulina-p y globulina 11S.

Tabla 11. Punto isoélectrico, comportamiento en RP-HPLC (hidrofobicidad) y tamaño de polipéptidos de globulina-p y globulina 11S.

Polipéptidos comunes a ambas globulinas			
Grupos/ rango de masas	**Polipéptido (kDa)**	**Rango de pI**	**Hidrofobicidad**
I (60-50kDa)	**M** (56,0 ± 1,0)	7,0 - 7,5	Pico 2 baja
II (45-31 kDa)	**A_1** (34,0 ± 1,0)	5,0 - 6,0	Pico 3 y 4 intermedia/alta
	A_2 (32,0 ± 1,0)	6,0 - 7,0	Pico 1 baja
III (27-16 kDa)	**B_1** (22,0 ± 1,0)	9,0 - 10,0	Pico 1 baja
	B_2 (20,0 ± 1,0)	9,0 - 10,0	Pico 3 y 5 intermedia/alta
		(A') 6,0 - 7,0	
Polipéptidos separados solamente en la fracción g11S			
Grupos/ rango de masas	**Polipéptido (kDa)**	**Rango de pI**	**Hidrofobicidad**
I (60-50kDa)	**M_2** (52,8 ± 0,6)	6,5 - 7,0	Pico 2 baja
	M (56,0 ± 1,0)	6,5 - 7,0	Pico 5 alta
II (45-30 kDa)	**L** (41,0 ± 2,0)	7,0 - 7,5	Pico 4 intermedia/alta
III (26-16 kDa)	**S** (15,5 ± 0,6)	5,5 - 7,0	Pico 3' intermedia

En cuanto a la masa molecular, los distintos polipéptidos pueden dividirse en tres grupos: grupo I en el rango 50-60 kDa, grupo II en el rango 31-45 kDa y grupo III, entre 16 y 27 kDa. Los polipéptidos correspondientes al primer grupo, son más abundantes en globulina-p especialmente en los polímeros (P) y en glutelinas, y menos en globulina 11S y UM (Abugoch y col., (2003), Martínez y col., (1997) y Romero-Zepeda y Paredez-López, (1996)) y se consideran no procesados (Barba de la Rosa y col., 1996, Castellani y col., 2000). Si bien polipéptidos con pesos moleculares similares han sido descritos en otras globulinas 11S como quinoa (Segura-Nieto y col., 1999), la proporción presente en globulina-p es particularmente elevada.

A su vez, los polipéptidos A y B interaccionan covalentemente para formar las subunidades diméricas AB y especies de mayor tamaño en donde intervienen además polipéptidos M. Del mismo modo que fuera informado por Martínez y col., (1997) hemos encontrado en este trabajo que la mayoría de los polipéptidos M están comprometidos en los agregados de alta masa molecular. El origen de estos agregados no está claro, podrían provenir de los polímeros o de oxidaciones producidas durante la extracción.

Los resultados aquí presentados no alcanzan para caracterizar las distintas subunidades D_1 y D_2 con respecto a su composición exacta, si bien no podemos afirmar que provengan de precursores diferentes, la gran diversidad de propiedades fisicoquímicas asociadas a los polipéptidos A y B sugieren la existencia de más de un precursor. El precursor de estas subunidades sería diferente del ya secuenciado y del propolipéptido M.

En cuanto a la subunidad D_3 la misma provendría de un precursor diferente al de D_1 y D_2 ya que estaría constituída por A'A' ó A'B y A unido no covalentemente. Esta subunidad sería equivalente a la subunidad G4 ($A_5A_4B_3$) de soja (Nielsen y col., 1989).

La similitud de algunos fragmentos trípticos del polipéptido L con la secuencia de una proteína tipo vicilina, concuerda con la presencia de un polipéptido del mismo tamaño que L en la globulina 7S de amaranto (Barba de la Rosa y col., 1992b y Marcone, 1999a). Una posible explicación de la presencia de una contaminación de 7S en la fracción purificada de g11S estaría asociada a la técnica empleada para su purificación. Ha sido informado por varios autores (Marcone, 1999b; Martínez y col., 1997; Lakemond y col., 2000a) que por fenómenos de asociación-disociación las globulinas 7S y 11S podrían coeluir en la cromatografía de exclusión molecular a pesar de las diferencias de masa que existen entre ellas. Aunque no podemos descartar este tipo de contaminación en el perfil asociado a la globulina 11S purificada en este trabajo, es destacable la abundancia del polipéptido L y la ausencia de otros polipéptidos característicos de la globulina 7S de masas moleculares comprendidas entre 70 y 90 kDa (Barba de la Rosa y col, 1992b; Martínez y col., 1997; Marcone, 1999a).

A pesar que los datos de secuencia obtenidos para el polipéptido S no determinaron ninguna similitud con otras proteínas, polipéptidos con una masa similar fueron descritos por Barba de la Rosa y col. (1992b), Marcone y Yada (1991), Martínez y col. (1997) y Marcone (1999b) tanto en la fracción globulina 11S como 7S.

Conclusiones generales

6 Conclusiones generales

Con el propósito de entender las diferencias que separan y caracterizan a las fracciones proteicas de amaranto, globulina 11S y globulina-p, así como sus componentes purificados, en este trabajo nos hemos dedicado a estudiar las características estructurales y la composición polipeptídica de ambas globulinas.

La fracción globulina-p se presenta principalmente formando polímeros a los que hemos identificado a lo largo del trabajo como "P", sólo una pequeña parte de las moléculas hexaméricas se encuentran libres (UM), resultados que habían sido informados previamente (Martínez y col, 1997, Martínez, 1997, Castellani, 2000). La fracción globulina 11S, posee como componente principal a moléculas (g11S) de características similares en cuanto a su masa a las UM según fuera informado por Marcone y Yada (1991); Romero-Zepeda y Paredes López (1996); Segura Nieto y col. (1994); Martínez y col. (1997).

Según los resultados obtenidos en este trabajo, existen algunas diferencias en la composición polipeptídica de globulina 11S y globulina-p. La heterogeneidad asociada a los polipéptidos A y B, la existencia del polipéptido M con secuencia diferente de A y B, y la falta de homología secuencial entre los polipéptidos de nuestras globulinas y el precursor ya secuenciado por Barba de la Rosa y col. (1996), apoyan la existencia de más de un precursor que codifica para las subunidades de las globulinas de reserva de amaranto, lo que sustenta la hipótesis que asocia la heterogeneidad de los polipéptidos a la existencia de polimorfismo como ya ha sido demostrado para otras proteínas de reserva.

Si bien la mayoría de los polipéptidos y subunidades que forman a gp y g11S son comunes a ambas, por un lado, en la fracción globulina 11S han sido caracterizados los polipéptidos denominados L y S que están ausentes en globulina-p. Por otro lado, en la fracción globulina-p, existe mayor abundancia del polipéptido M no procesado. Los resultados obtenidos en este trabajo, han demostrado que este polipéptido se encuentra principalmente formando parte de los polipéptidos SA agregados por enlaces disulfuro. Teniendo en cuenta que la fracción P de globulina-p posee una mayor cantidad de sulfhidrilos que g11S y que la estructura de P está estabilizada mediante uniones disulfuro, se propone que la tendencia a polimerizarse de globulina-p, a diferencia de globulina 11S, se debe a la presencia de M, este último contendría un mayor número de residuos de cisteína que otros precursores.

No ha podido esclarecerse si los polipéptidos L y S son característicos de leguminas o se deben a la contaminación por otras globulinas. Parte de nuestros resultados así como los de otros autores (Barba de la Rosa y col, 1992b; Martínez y col., 1997; Marcone y Yada, 1991; Marcone, 1999a; Marcote, 1999b) contradicen la posible contaminación. Esto abre algunos interrogantes sobre los que hay que seguir trabajando, ¿la globulina aislada en este trabajo, se trata de una globulina 11S con subunidades que han sufrido un procesamiento diferente, o es una globulina diferente contaminada con 11S?. El conocimiento de las secuencias completas asociadas a cada uno de los polipéptidos de las fracciones en estudio y la caracterización de los genes de los cuales provienen serían de fundamental importancia para esclarecer este interrogante y las hipótesis planteadas.

Las diferentes propiedades fisicoquímicas encontradas para ambas globulinas relacionadas con sus características estructurales, como por ejemplo, la disposición de los residuos de triptofano en la estructura terciaria, la estabilidad conformacional, el contenido de sulfhidrilos totales y la hidrofobicidad total (RP-HPLC), tienen origen en las diferencias de composición polipeptídica mencionadas anteriormente.

La heterogeneidad molecular de las globulinas de reserva se manifiesta por la presencia de diferentes hexámeros. En soja los mismos han sido separados por diferencias de carga (Derbyshire y col., 1976), si bien en el amaranto, no se han podido separar por esta propiedad, en él se produce la segregación de moléculas con características fisicoquímicas diferentes que dan origen a las fracciones gp y g11S. Las moléculas de gp y g11S contienen algunas subunidades en común lo que sugiere que subunidades de amaranto de distintas familias son intercambiables entre los diferentes hexámeros siendo esto coincidente con lo observado para otras globulinas (Delseny y Raynal, 1999).

En base a estos resultados y teniendo en cuenta la homología que existe entre la fracción globulinas, globulina-p y glutelinas de amaranto, (Vasco-Méndez y Paredes-López 1995, Abougoch y col., 2003; Martínez y col., 1997) y considerando que todas pertenecen a la misma familia de proteínas (Dunwell, 1998) proponemos como fracción principal del grano de amaranto a las globulinas. Estas proteínas se encontrarían en diferentes estados de agregación originados en variaciones de secuencia que provocaría la presencia de una mayor cantidad de puentes disulfuro que serían a su vez, los responsables de la formación y estabilización de los polímeros (Castellani y col., 1999), dando origen a las fracciones con diferente solubilidad. Hasta el momento, no ha sido descrita una fracción con las características de solubilidad asociadas a globulina-p

incluyendo especies cercanas como quinoa y trigo sarraceno (Gorinstein y col. 2001; Konishi y col., 1992).

El conocimiento de las propiedades fisicoquímicas asociadas a los distintos polipéptidos integrantes de las globulinas, permitirá relacionar la abundancia de alguno de ellos con determinadas propiedades funcionales. Esto, unido al polimorfismo característico de las proteínas de reserva que llevan a la presencia o expresión de distintos genes según las especies y variedades (Drzewiecki, 2001; Drzewiecki y col., 2003; Prak y col., 2005; Maruyama y col., 2004) permitirá la elección de las semillas de amaranto más adecuadas según la propiedad funcional requerida para el desarrollo de un alimento.

Por otra parte, los resultados recogidos en los ensayos de desnaturalización-renaturalización nos permitirán orientar los esfuerzos para mejorar la aplicación de estas proteínas a alimentos funcionales y nuevas formulaciones. La interacción que se produce entre los polipéptidos M y B en condiciones desnaturalizantes y fuerzas iónicas iguales o mayores que 0,08 M, condición encontrada en la mayoría de los productos alimenticios, debe ser considerada a la hora de su aplicación para evitar efectos no deseados en el producto final. Modificaciones (fisicoquímicas o genéticas) tendientes a reducir la interacción entre estos polipéptidos, serían beneficiosas para su mejor aprovechamiento en la industria alimentaria. Esta interacción facilitaría su utilización en productos que requieran la formación de estructuras como por ejemplo geles (Avanza y col., 2005a y b), formación de películas y coberturas (Colla y col., 2006; Tapia-Blácido y col., 2005; Tapia-Blácido y col., 2007) y aumento de viscocidad.

Es importante conocer el estado conformacional de una proteína para poder realizar estudios relacionados con la ingeniería de proteínas tendientes a mejorar las propiedades funcionales de productos formulados a partir de las mismas. Es por ello que el avance en el conocimiento de la estructura y del comportamiento frente a distintos condiciones de las globulinas de amaranto alcanzados en el presente trabajo permitirá en el futuro obtener mejores resultados en la aplicación de estas proteínas a alimentos formulados, mejorando al mismo tiempo su calidad nutricional.

Referencias

7 Referencias Bibliográficas

Abdi, H. y Sahib M. K. Distribution of lysine in different legumes and some species of amaranth seeds. *J. Food Sci. Technol.* **(1976)**; 13:16-20.

Abugoch, L. E; Martínez E.N. y Añón, M. C. Influence of the extracting solvent upon the structural properties of amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) glutelin. *J. Agric. Food Chem.* **(2003)**; 51:4060-4065.

Adachi, M; Kanamori, J; Masuda, T; Yagasaki, K; Kitamura, K; Mikami, B y Utsumi, S. Crystal structure of soybean 11S globulin: glycinin A3B4 homohexamer. *PNAS.* **(2003)**; vol 100 n°72:7395-7400.

Adachi, M.; Takenaka, Y.; Gidamis, A. B.; Mikami, B. y Utsumi, S. Crystal structure of soybean proglycinin A1aB1b homotrimer. *J. Mol. Biol.* **(2001)**; 305:291-305.

Anisimova, I.; Fido, R. J., Tatham, A. S. y Shewry P. R. Heterogeneity and polymorphism of sunflower seed 2S albumins. *Biotec. Biotechnol. Equip.* **(1994)**; 7:63-69.

Aphalo, P. Tesis doctoral. Proteínas de Amaranto: Aspectos Biológicos Relacionados con la Movilización de las Proteínas de Reserva. *Universidad Nacional De La Plata.* **(2006)**.

Aphalo, P.; Castellani, O. F., Martínez, E. N. y Añón M. C. Surface physicochemical properties of globulin-p amaranth protein. *J. Agric. Food Chem.* **(2004)**; 52:616-622.

Argos P., Narayana S. L. V. y Nielsen N. C. Structural similarity between legumin and vicilin storage proteins from legumes. *EMBO J.* **(1985)**; 4:1111-1117.

Avanza M. V., Puppo M. C. y Anón M. C. Rheological characterization of amaranth protein gels. *Food Hydroc.* **(2005a)**; 19:889-898.

Avanza M. V., Puppo M. C. y Anón M. C. Structural characterization of amaranth

protein gels. *J. of Food Sci.* **(2005b)**; 70(3):223-229.

Bacon, J. R.; Lambert, N.; Phalp, M.; Plumb, G. W. y Wright, D. J. Resolution of pea legumin subunits by high-performance liquid chromatography. *Analytical Biochem.* **(1987)**; 160:202-210.

Barba de la Rosa, A. P.; Gueguen, J., Paredes-López, O. y Viroben G. Fractionation procedures, electrophoretic characterization and aminoacid composition of Amaranth seed proteins. *J. Agric. Food Chem.* **(1992a)**; 40:931-936.

Barba de la Rosa, A. P.; Herrera -Estrella A.; Utsumi, S. y Paredes-López O. Molecular characterization, cloning and structural analysis of a cDNA encoding an amaranth globulin. *J. Plant Physiol.* **(1996)**; 149:527-532.

Barba de la Rosa, A. P.; Paredes-López, O. y Gueguen J. Characterization of amaranth globulins by ultracentrifugation and chromatografic techniques. *J. Agric. Food Chem.* **(1992b)**; 40:937-940.

Bassüner R., Hai N. V. Jung R. Saalbach G y Müntz K. The primary structure of the predominating vicilinin storage protein subunit from field bean seeds (*Vicia faba* L. var minor cv. Fribo). *Nucleic Acid Research.* **(1987)**; 15:9609

Bäulmein, H.; Wobus, U.; Pustell, J. y Kafatoc, F. C. The legumin gene family: structure of a B type gene of *Vicia faba* and a possible legumin gene specific regulatory element. *Nucleic Acids Research.* **(1986)**; 14:2707-2720.

Bäumlein, H.; Braun, H.; Kakhovskaya, I. A. y Shutov, A. D. Seed storage proteins of spermatophytes share a common ancestor with desiccation proteins of fungi. *J. Mol. Evol.* **(1995)**; 41:1070-1075.

Beccari, J. B. De Frumento. De Bonoriensi Scientiarum et Artium. *Instituto Atque Academia Comentarii.* **(1745)**; Bologna, 2:122-127.

Becker, R. Amaranth oil: composition, processing and nutritional qualities. *Amaranth biology, chemistry and tecnology. Ed. Paredes-Lopez, O. Boca Ratón, Florida*

CRC Press. **(1994)**:133-141.

Beilinson, V.; Chen, Z.; Shoemaker, R. C.; Fischer, R. L.; Goldberg, R. B. y Nielsen N. C. Genomic organization of glycinin genes in soybean. *Theor. and Appl. Genet.* **(2002)**; 104:1132-1140.

Bertoni, M. H.; Gómez, R. G., and Cattaneo, P. y Covas G. Estudios sobre la semilla de especies americanas de Amaranthus- II. Harinas de extracción de *A. caudatus, A cruentus* y *A. mantegazzianus. An. Asoc. Quím. Argent.* **(1984)**; 72:597-605.

Bi-Fong Lin, Bor-Luen Chiangb y Jin-Yuarn Lin. *Amaranthus spinosus* water extract directly stimulates proliferation of B lymphocytes in vitro. *Internat. Immunopharm.* **(2005)**; 5:711-722.

Blum, H.; Beier, H. y Gross, H. Improved Silver Staining of Plant Proteins, RNA and DNA in Polyacrilamide Gels. *Electrophoresis.* (**1987**); 8: 93-99.

Breiteneder, H. y Radauer, C. A classification of plant food allergens. *J. Allergy Clin. Immunol.* **(2004)**:821-830.

Bressani, R. Composition and nutritional properties of amaranth. *Amaranth biology, chemistry and tecnology. Ed. Paredes-López,O. Boca Ratón, Florida CRC Press.* **(1994)**:185-206.

Bressani, R. y García Vela, L. A. Protein fractions in Amaranth grain and their chemical characterization. *J. Agric. Food Chem.* **(1990)**; 38:1205-1209.

Budin, J. T.; Breene, W. M. y Putnam, D. H. Some compositional properties of seeds and oils of eight Amaranthus species. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **(1996)**; 73:475-481.

Carbonero, P. y García-Olmedo, F. Capítulo 26 "A multigene family of trypsin/ alpha-amyase inhibitors from cereals". *Libro "Seed Proteins" Ed. Kluwer Academic Publishers. Shewry, P.R y Casey, R.* **(1999)**:617-633.

Cardamone, M. y Puri, N. K. Spectrofluorimetric assessment of the surface

hydrofobicity of proteins. *Biochem. J.* **(1992)**; 282:589-593.

Casey, R. Capítulo 8 "Distribution and Some Properties of Seed Globulins". *Libro "Seed Proteins" Ed. Kluwer Academic Publishers. Shewry, P.R y Casey, R.* **(1999)**:159-169 .

Casey R., Domoney C. y Smith A. M. Biochemistry and molecular biology of seed products. *Peas: Genetics Molecular Biology and Biotechnology.* In *Casey R. y Davies D. R. (Eds).* **(1993)**:121-163.

Casey, R.; Domoney, C. y Ellis T. H. N. Legume storage proteins and their genes. *Oxf. Surv. Plant Mol. Cell Biol.* **(1986)**; 3:1-95.

Castellani, O. F. Tesis doctoral. Caracterización estructural y fisicoquímica de la globulina-P de amaranto. *Universidad Nacional De La Plata, Argentina.* **(2000)**:156-164.

Castellani, O. F.; Martínez, E. N. y Añón M. C. Amaranth globulin structure modifications induced by enzymatic proteolysis. *J. Agric. Food Chem.* **(2000)**; 48:5624-5629.

Castellani, O. F.; Martínez, E. N. y Añón M. C. Role of disulfide bonds upon the structural stability of an Amaranth globulin. *J. Agric. Food Chem.* **(1999)**; 47:3001-3008.

Castellani, O. F.; Martínez, E. N y Añón M. C. Structural modifications of an Amaranth globulin induced by pH and NaCl. *J. Agric. Food Chem.* **(1998)**; 46:4846-4853.

Chakraborty, S.; Chakraborty, N. y Datta A. Increased nutritive value of transgenic potato by expressing nonallergenic seed albumin gene from *Amaranthus hypochondriacus.* *PNAS.* **(2000)**; 97 n° 7:3724-3729.

Chan K. F. y Sun M. Genetic diversity and relationships detected by isozyme and RAPD analysis of crop and wild species of *Amaranthus. Theor. Appl. Genet.* **(1997)**; 95:865-873.

Chel-Guerrero, L.; Scilingo, A. A.; Gallegos Tintoré, S.; Dávila, G. y Añón, M. C. Physicochemical and structural characterization of Lima Bean (*Phaseolus lunatus*) globulins. *LWT.* **(2007)**; 40:1537-1544.

Chen, S. y Paredes-López, O. Isolation and characterization of the 11S globulin from Amaranth seeds. *J. Food Biochem.* **(1997)**; 21:53-65.

Choi, S.-M.; Mine, Y. y Ma, C.-Y. Characterization of heat-induced aggregates of globulin from common buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench). *Internat. J. of Biol. Macromol.* **(2006)**; 39:201-209.

Choi, S.-M. y Ma, C.-Y. Conformational study of globulin from common buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) by fourier transform infrared spectroscopy and differential scanning calorimetry. *J. Agric. Food Chem.* **(2005)**; 53:8046-8053.

Choi, S.-M. y Ma, C.-Y. Extraction, purication and characterization of globulin from common buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) seeds. *Food Research Internat.* **(2006)**; 39:974-981.

Colla, E.; do Amaral Sobral P. J. y Menegalli, F. C. *Amaranthus cruentus* flour edible films: influence of stearic acid addition, plasticizer concentration, and emulsion stirring speed on water vapor permeability and mechanical properties. *J. Agric. Food Chem.* **(2006)**; 54(18):6645-53.

Czerwinski, J.; Bartnikowska, E.; Leontowicz, H.; Lange, E.; Leontowicz, M.; Katrich, E.; Trakhtenberg, S. y Gorinstein, S. Oat (*Avena sativa* L.) and amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) meals positively affect plasma lipid profile in rats fed cholesterol-containing diets. *J. of Nutr. Biochem.* **(2004)**; 15:622-629.

Damodaran, S. Estimation of Disulfide Bonds Using 2-Nitro-5-Thiosulfobenzoic Acid: Limitations. *Analytical Biochem.* **(1985)**; 145: 200-204.

Davies, C. S.; Coates, J. B. y Nielsen N. C. Inheritance and biochemical analysis of four electrophoretic variants of β-conglycinin from soybean. *Theor. Appl. Genet.*

(1985); 71:351-358.

Delseny, M. y Raynal, M. Cap 18 "Globulin Storage Proteins in Crucifers and Non-Legume Dycotiledonous Families". *Libro "Seed Proteins" Ed. Kluwer Academic Publishers. Shewry, P.R y Casey, R.* **(1999)**:427-451.

Derbyshire, E.; Wright, D. J. y Boulter, D. Legumin and vicilin, storage proteins of legume seeds. *Phytochem.* **(1976)**; 15:3-24.

Douliez, J. P.; Michon, T.; Elmorjani, K. y Marion, D. Structure, biological and technological functions of lipid transfer proteins and indolines, the major lipid binding proteins from cereal kernels. *J. of Cereal Sci.* **(2000)**; 32:1–20.

Drzewiecki, J. Similarities and differences between Amaranthus species and cultivars and estimation of outcrossing rates on the basis of electrophoretic separation of urea-soluble seed proteins. *Euphytica* **(2001)**; 119: 279-287.

Drzewiecki,J.; Delgado-Licon, E.; Haruenkit, R.; Pawelzik, E.; Martin-Belloso,O; Park, Y.-S; Jung, S.-T; Trakhtenberg,S. y Gorinstein S. Identification and differences of total proteins and their soluble fractions in some pseudocereals based on electrophoretic patterns. *J. Agric. Food Chem.* **(2003)**; 51:7798-7804.

Duarte-Correa, A.; Jokl, L. y Carlsson, R. Aminoacid composition of some Amaranthus sp. grain proteins and its fractions. *Arch. Latinam. Nutr.* **(1986)**; 26:466-476.

Dunwell, J. M.; Culham, A.; Carter, C. E.; Sosa-Aguirre, C. R. y Goodenough, P. W. Evolution of functional diversity in the cupin superfamily. *Trends in Biochem. Sci.* **(2001)**; Vol. 26 No. 12:740-746.

Dunwell, J. M.; Khuri, S. y Gane, P. J. Microbial relatives of the seed storage proteins of higher plants: conservation of structure and diversification of function during evolution of the Cupin superfamily. *Microbiol. and Molec. Biol. Reviews.* **(2000)**; 64(1):153-179.

Dunwell, J. M.; Purvis, A. y Khuri, S. Cupins: the most functionally diverse protein

superfamily? *Phytochem.* **(2004)**; 65:7-17.

Dunwell, J. M. Cupins: a new superfamily of functionally diverse proteins that include germins and plant storage proteins. *Biotechnol. Genet. Eng.* **(1998)**; 15:1-32.

Duranti, M.; Guerriere, N.; Takahashi, T. y Cerletti, P. The legumin-like storage protein of *Lupinus albus* seeds. *Phytochem.* **(1988)**; 27:15-23.

Duranti, M.; Horstmann, C.; Gilroy, J. y Croy, R. R. D. The molecular basis of N-glycosilation in the 11S globulin (legumin) of lupin seeds. *J. Protein Chem.* **(1995)**; 14:107-110.

Dure, L. An unsutable domain in the vicilin genes of higher plants. *New Biologist.* **(1990)**; 2:487-493.

Espitia-Rangel. Breeding of grain Amaranth. *Amaranth biology, chemistry and technology. Ed. CRC Press. Boca Raton , Florida.* **(1994)**; 23-38.

FAO/WHO Ad hoc Expert Comitee. Energy and protein requirements. *Tech. Report Series 522; FAO Nutrition Meetings Report Series No 52 WHO, Geneva, FAO,Rome.* **(1973)**.

Fukushima, D. Structures of plant storage proteins and their functions. *Food Rev.Intl.* **(1991)**; 7 n° 3:353-381.

Gatehouse, J. A.; Lycett, G. W.; Delauney, A. J.; Croy, R. R. D. y Boulter, D. Sequence specificity of the post-traslational protelytic cleavege of vicilin, a seed storage protein of pea (*Pisum sativum L.*). *Biochem. J.* **(1983)**; 212:427-432.

Gorinstein, S.; Arnao de Nue, I. y Arruda, P. Alcohol-soluble and total proteins from amaranth seeds and their comparison with other cereals. *J. Agric. Food Chem.* **(1991a)**; 39:848-850.

Gorinstein, S.; Jaramillo, N. O.; Medina, O. J.; Rogriques, W. A.; Tosello, G. A. y Paredes-López, O. Evaluation of some cereals, plants and tubers through protein

composition. *J. of Prot. Chem.* **(1999)**; Vol. 18, No. 6:687-693.

Gorinstein, S.; Moshe, R.; Greene L. J. y Arruda P. Evaluation of four Amaranthus species through protein electrophoretic patterns and their aminoacid composition. *J. Agric. Food Chem.* **(1991b)**; 39:851-854.

Gorinstein, S.; Delgado-Licon, E.; Pawelzik, E.; Permady, H. H.; Weisz, M. y Trakhtenberg, S. Characterization of soluble Amaranth and soybean proteins based on fluorescence, hydrophobicity, electrophoresis, aminoacid analysis, circular dicroism and differential scanning calorimetry. *J. Agric. Food Chem.* **(2001)**; 49:5595-5601.

Gorinstein, S.; Zemser, M.; Fliess, A.; Shnitman, I; Parede-López, O.; Yamamoto, K.; Kobayashi, S. y Taniguchi, H. Computational analysis of the amino acid residue sequences of amaranth and some other proteins. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **(1998)**; 62 n° 10:1845-1851.

Gorinstein, S.; Zemser, M. y Paredes-López O. Structural stability of globulins. *J. Agric. Food Chem.* **(1996a)**; 44:100-105.

Gorinstein, S.; Zemser, M.; Friedman, M.; Rodrigues, W. A.; Martins, P. S.; Vello, N. A.; Tosello, G. A. y Paredes-López, O. Physicochemical characterization of the structural stability of some pant globulins. *Food Chem.* **(1996c)**; 56:131-138.

Gorinstein, S.; Zemser, M.; Friedman, M.; Vasco-Méndez, N. L. y Paredes-López, O. Denaturant-induced conformations of globulins. *J. Agric. Food Chem.* **(1996b)**; 44:93-99.

Guzmán-Maldonado, S. y Paredes-López, O. Capítulo 9: "Functional Products of Plants Indigenous to Latin American: Amaranth, Quinoa, Common Beans and Botanicals". En: *Functional foods. Biochemical and processing aspects Ed. G. Mazza.* **(1998)**:293-327.

Hara-Nishimura, I.; Shimada, T.; Hatano, K.; Takeuchi, Y. y Nishimura, M. Transport of storage proteins to protein storage vacuoles is mediated by large precursor-

accumulating vesicles. *The Plant Cell.* **(1998)**; 10:825-836.

Hara-Nishimura, I.; Takeuchi, Y. y Nishimura, M. Molecular characterization of a vacuolar processing enzyme related to a putative cysteine proteinase of *Schistosoma mansoni. The Plant Cell.* **(1993)**; 5:1651-1659.

Harwalkar, V. R. y Ma, C. Study of thermal properties of oat globulin by differential scanning calorimetry. *J. Food Sci.* **(1987)**; 52:394-398.

Hayakawa, S. y Nakai, S. Relationship of hydrophobicity and net charge to the solubility of milk and soy proteins. *J. Food Sci.* **(1985)**; 50:486-491.

Hermann, E. M. y Larkins, B. A. Protein storage bodies and vacuoles. *The Plant Cell.* **(1999)**; 11:601-614.

Higgins, T. J. V.; Chandler, P. M.; Randall, P. J.; Spencer, D.; Beach, L. R.; Biagrove, R. J.; Kort, R. J. y Iglia A. S. Gene structure, protein structure and regulation of the synthesis of a sulphur-rich protein in pea seeds. *JBC.* **(1986)**; 261:11124-11130.

Horstman C. Specific subunits pairs of legumin from *Vicia faba. Phytochem.* **(1983)**; 22:1861-1866.

Horstmann, C.; Schlesier, B; Otto, A., and Kostka, S y Müntz K. Polymorphism of legumin subunits from field beans (*Vicia faba* L. var minor) and its relation to the corresponding multigene family. *Theor. Appl. Genet.* **(1993)**; 86:867-874.

Hoshi, Y. y Yamauchi, F. Determination of sulfhydryl and disulfide contents of soybean 11S globulin and their change by lyophilization. *Agric. Biol. Chem.* **(1983)**; 47:2435-2440.

Itoh, V.; Garcia, R. N.; Adachi, M.; Maruyama, Y.; Tecson-Mendoza, E. M.; Mikami, V. y Utsumi, S. Structure of 8S globulin, the major seed storage protein of mung bean. *Acta Cryst.* **(2006)**; 62:824-832 .

Joshi, V; Gautam, P. L; Bhag Mal, Sharma G. D. y Kochhar, S. Capítulo 33 "

Conservation and Use of Underutilized Crops: an Indian Perspective". En *"Managing Plant Genetic Diversity" © IPGRI Eds. JMM, Engels; V. Ramanatha Rao; AHD Brown y Jackson, MT.* **(2002)**:359-369.

Kasarda, D. D.; Autran, J. C.; Lew, E. J. L.; Nimmo, C. C. y Shewry, P. R. N-terminal aminoacids sequences of w-gliadinas y w-secalinas: implication for the evolution of prolamin genes. *Biochimica Et Biophysica Acta.* **(1983)**; 747:138-150.

Kato, A. y Nakai, S. Hydrophobicity determined by a fluorescence probe method and its correlation with surface properties of proteins. *Bioch. Biophys. Acta.* **(1980)**; 624:3-20.

Khuri, S.; Bakker, F. T. y Dunwell, J. M. Phylogeny, function, and evolution of the Cupins, a structurally conserved, functionally diverse superfamily of proteins. *Mol. Biol. Evol.* **(2001)**; 18(4):593-605.

Kigel, J. Development and ecophysiology of Amaranths. En *Amaranth biology, chemistry and technology. Ed. Paredes-López. Boca Raton Florida. CRC Press.* **(1994)**:39-73.

Kim, K. S.; Kim, S.; Yang, H. J. y Kwon, D. Y. Changes of glycinin conformation due to pH, heat and salt determined by differential scanning calorimetry and circular dichroism. *Internat. J. of Food Sci. and Technol.* **(2004)**; 39:385-393.

Kitamura, K.; Toyokawa, Y. y Harada, K. Polymorphism of glyicinin in soybean seeds. *Phytochem.* **(1980)**; 19:1841-1843.

Ko, T.-P.; Ng, J. D. y McPherson, A. The three-dimensional structure of canavalin from Jack Bean (Canavalia ensiformis). *Plant Physiol.* **(1993)**; 101:729-744.

Ko, T.-P.; Day, J. y McPherson, A. The refined structure of canavalin from jack bean in two crystal forms at 2.1 and 2.0 A resolution. *Acta Crystallogr.* **(2000)**; D56:411-420.

Ko, T.-P.; Kuznetsov, Y. G.; Malkin, A. J.; Day, J. y McPherson A. .X-ray diffraction and atomic force microscopy analysis of twinned crystals: rhombohedral canavalin. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* **(2001)**; 57:829-39.

Konishi, Y.; Azumaya, J.; Horikawa, K. y Nakatani, N. A pitfall in determining the globulin/albumin ratio in the amaranth grains. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* **(1992)**; 38:215-220.

Konishi, Y.; Fumita, Y.; Ikeda, K.; Okuno, K. y Fuwa, H. Isolation and characterization of globulin from seeds of *Amaranthus hypochondriacus L.* *Agric. Biol. Chem.* **(1985)**; 49:1453-1459.

Konishi, Y.; Horikawa, K.; Oku, Y.; Azumaya, J. y Nakatani, N. Extraction of two albumin fractions from amaranth grains:comparison of some physicochemical properties and the putative localization in the grains. *Agric. Biol. Chem.* **(1991)**; 55 n° 11:2745-2750.

Kreis, M.; Forde, B. G.; Rahman, S.; Miflin, B. J. y Shewry, P. R. Molecular evolution of the seed storage proteins of barley, rye and wheat. *J. Mol. Biol.* **(1985)**; 183:499-502.

Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* **(1970)**; 227:680-685

Lakemond, C. M. M.; de Jongh, H. H. J.; Hessing, M.; Gruppen, H. y Voragen, A. G. J. Soy glycinin: influence of pH and ionic strength on solubility and molecular structure at ambient temperatures. *J. Agric. Food Chem.* **(2000a)**; 48(6):1985-1990.

Lakemond C. M. M., de Jongh H. H. J. Hessing M. Gruppen H. y Voragen A. G. J. Heat Denaturation of Soy Glycinin: Influence of pH and Ionic Strength on Molecular Structure. *J. Agric. Food Chem.* **(2000b)**; 48:1991-1995.

Lakowicz, J. R. Cap 6 "Solvent Effects on Emission Spectra". *Libro "Principles of Fluorescence Spectroscopy".Ed. Kluwer Academic.* **(1999a)**:185-210.

Lakowicz, J. R. Cap 16 "Protein Fluorescence". *Libro "Principles of Fluorescence Spectroscopy". Ed. Kluwer Academic.* **(1999b)**:445-486.

Lakowicz J. R. Cap 2 "Instrumentation for Fluorescence Spectroscopy". *Libro "Principles of Fluorescence Spectroscopy".Ed. Kluwer Academic.* **(1999c)**.

Lane, B. G.; Bernier, F.; Dratewka-Kos, E.; Shafai, R.; Kennedy, T. D.; Pyne, C.; Munro, J. R.; Vaughan, T.; Walters, D. y Altomare, F. Homologies between members of the germin gene family in hexaploid wheat and similarities between these wheat germins and certain Physarum spherulins. *J.Biol.Chem.* **(1991)**; 266:10461-10469.

Lau, S. Y. M.; Taneja, A. K. y Hodges, R. S. Effects of high-performance liquid chromatographic solvents and hidrophobic matrices on the secondary and quaternary structure of a model protein. *J. Chromatogr.* **(1984)**; 317:129-140.

Lawrence, M. C. Cap 22: "Structural Relationship of 7S and 11S Globulins". *Libro "Seed Proteins" Ed. Kluwer Academic Publishers. Shewry, P.R. y Casey, R.* **(1999)**:517-541.

Lawrence, M. C.; Izard, T.; Beuchat, M; Blagrove, R. J. y Coleman, P. M. Structure of phaseolin at 2.2 angstroms resolution: implications for a common vicilin/legumin structure and the genetic engineering of seed storage proteins. *J. Mol. Biol.* **(1994)**; 238:748-776.

Levanony, H.; Rubin, R.; Altschuler, Y. y Galili G. Evidence for a novel route of wheat storage proteins to vacuoles. *J.Cell Biol.* **(1992)**; 119 n° 5:1117-1128.

Li, X; Franceschi, V. y Okita T. W. Segregation of storage protein mRNAs on the rough endoplasmic reticulum membranes of rice endosperm. membranes. *Cell.* **(1993)**; 73.

Lin, J.-L.; Ruaan, R. C. y Hsieh, H. J. Refolding of partially and fully denatured lysozymes. *Biotechnol Lett* . **(2007)**; 29:723-729.

Lin, S.; Gether, U. y Kobilka, B. K. Ligand stabilization of the adrenergic receptor: effect of DTT on receptor conformation monitored by Circular Dichroism and Fluorescence Spectroscopy. *Biochem.* **(1996)**; 35 (46).

Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. L. y Randall, R. J. Protein measurement with Folin phenol reagent. *JBC.* **(1951)**; 193:265-271.

Lu, S.; Deng, P.; Liu, X.; Luo, J.; Han, R.; Gu, X.; Liang, S.; Wang, X.; Li, F.; Lozanov, V.; Patthy, A. y Pongor, S. Solution structure of the major α– amylase inhibitor of the crop plant amaranth. *JBC.* **(1999)**; 274 n° 29:20473-20478.

Ma, C.-Y. y Harwalkar, V. R. Study of thermal denaturation of oat globulin by Ultraviolet and Fluorescence Spectrophotometry. *J. Agric. Food Chem.* **(1988)**; 36:155-160.

Ma, C.-Y. y Harwalkar, V. R. Thermal coagulation of oat globulin. *Cereal Chem.* **(1987)**; 64(4):212-218.

Marcone, M. F. Evidence confirming the existence of a 7S globulin-like storage protein in *Amaranthus hypochondriacus* seed. *Food Chem.* **(1999a)**; 65:533-542.

Marcone, M. F. Biochemical and biophysical properties of plant storage proteins: a current understanding with emphasis on 11S globulins. *Food Res.Intl.* **(1999b)**; 32:79-92.

Marcone, M. F. First report of the characterization of the threatened plant species *Amaranthus pumilus* (seabeach amaranth). *J. Agric. Food Chem.* **(2000)**; 48:378-382.

Marcone, M. F. y Yada, R. Y. Isolation, purification and characterization of the oligomeric seed globulin from *Amaranthus hypochondriacus*. *Agric. Biol.Chem.* **(1991)**; 55 n° 9:2281-2289.

Marcone, M. F. y Yada, R. Y. Study of the charge profile and covalent subunit association of the oligomeric seed globulin from *Amaranthus hypochondriacus*.

J. Agric. Food Chem. **(1992)**; 40:385-389.

Marcone, M. F. y Yada, R. Y. Sulfhydryl and disulfide groups of the oligomeric seed globulin from *Amaranthus hypochondriacus* K343. *J. Food Biochem.* **(1997)**; 21:255-272.

Marcone, M. F. y Yada, R. Y. Structural analysis of globulins isolated from genetically different Amaranth hybrid lines. *Food Chem.* **(1998)**; 61 n° 3:319-326.

Marcone, M. F.; Beniac, D. R.; Harauz, G. y Yada, R. Y. Quaternary structure and model for the oligomeric seed globulin from *Amaranthus hypochondriacus* K 343. *J. Agric. Food Chem.* **(1994b)**; 42:2675-2678.

Marcone, M. F.; Kakuda, Y. y Yada, R. Y. Salt-soluble seed globulins of various Dicotyledonous and Monocotyledonous plants-I. Isolation/purification and characterization. *Food Chem.* **(1998a)**; 62 n° 1:27-47.

Marcone, M. F.; Kakuda, Y. y Yada, R. Y. Salt-soluble seed globulins of Dicotyledonous and Monocotyledonous plants II. Structural characterization. *Food Chem.* **(1998b)**; 63 n° 2:265-274.

Marcone, M. F.; Kakuda, Y. y Yada, R. Y. Immunochemical examination of the surface physico-chemical properties of various Dicotyledonous and Monocotyledonous globulin seed storage proteins. *Food Chem.* **(1998c)**; 63 n° 1:85-95.

Marcone, M. F.; Niekamp, F. K.; Le Maguer, M. y Yada, R. Y. Purification and characterization of the physicochemical properties of the albumin fraction from the seeds of *Amaranthus hypochondriacus*. *Food Chem.* **(1994a)**; 51:287-294.

Marcone, M. F.; Kakuda, Y. y Yada, R. Y. Amaranth as a rich dietary source of β-sitosterol and other phytosterols. *Plant Foods for Human Nutr.* **(2004)**; 58:207-211.

Martínez, E. N. Tesis doctoral. Caracterización de las proteínas de amaranto. *Universidad Nacional De La Plata.* **(1997)**.

Martínez, E. N y Añón M. C. Composition and structural characterization of amaranth protein isolates. An electrophoretic and calorimetric study. *J. Agric. Food Chem.* **(1996)**; 44 n° 9:2523-2530.

Martínez, E. N.; Castellani, O. F. y Añón M. C. Common molecular features among Amaranth storage proteins. *J. Agric. Food Chem.* **(1997)**; 45:3832-3839.

Maruyama, N.; Adachi, M.; Takahashi, K.; Yagasaki, K.; Kohno, M.; Takenaka, Y.; Okuda, E.; Nakagawa, S.; Mikami, B. y Utsumi, S. Cristal Structures of recombinant and native soybean β-conglycinin β-homotrimers. *Eur. J. Biochem.* **(2001)**; 268:3595-3604.

Maruyama, N.; Fukuda, T.; Saka, S.; Inui, N.; Kotoh, J.; Miyagawa, M.; Hayashi, M.; Sawada, M.; Moriyama, T. y Utsumi, S. Molecular and structural analysis of electrophoretic variants of soybean seed storage proteins. *Phytochem.* **(2003)**; 64:701-708.

Maruyama, N.; Prak, K.; Motoyama, S.; S.-K., Choi; Yagasaki, K.; Ishimoto, M.y Utsumi S. Structure physicochemical function relationships of soybean glycinin at subunit levels assessed by using mutant lines. *J. Agric. Food Chem.* **(2004)**; 52:8197-8201.

Masanobu Hibi, Satoshi Hachimura Shuichi Hashizume Takahide Obata y Shuichi Kaminogawa. Amaranth grain inhibits antigen-specific IgE production through augmentation of the IFN-c response in vivo and in vitro. *Cytotechnol.* **(2003)**; 43:33-40.

Matoba, N.; Doyama, N.; Yamada, Y.; Maruyama, N.; Utsumi, S. y Yoshikawa, M. Design and production of genetically modified soybean protein with anti-hypertensive activity by incorporating potent analogue of ovokinin (2-7). *Febs Lett.* **(2001)**; 497:50-54.

Medina-Godoy, S.; Nielsen, N. C. y Paredes-López, O. Expression and characterization of a His-tagged 11S seed globulin from *Amaranthus hypochondriacus* in *Escherichia coli. Biotechnol. Prog.* **(2004)**; 20:1749-1756.

Medina-Godoy, S.; Valdez-Ortiz, A.; Valverde, E. y Paredes-López, O. Endoplasmic reticulum-retentio C-terminal sequence anhances production of an 11S seed globulin from *Amaranthus Hipochondriacus* in *Pichia pastoris.* Biotechnol. J. **(2006)**; 1:

Miflin, B. J.; Field, J. M. y Shewry, P. R. Cereal storage proteins and their effects on techological properties. *En Seed Proteins. Daussant, J.; Mosse, J. y Vaughan, J. Eds. London Academic Press.* **(1983)**:255-319.

Molina, M. I.; Circosta, A.; Añón, M. C. y Petruccelli, S. Mature *Amaranthus hypochondriacus* seeds contain non-processed 11S precursors. *Phytochem.* **(2008)**; 69:58-65.

Momma, T.; Negoro, T.; Hirano, H; Matsumoto A.; Udaka, K y Fukazawa C. Glycinin A5A4B3 mRNA: cDNA cloning and nucleotide sequencing of a splitting storage protein subunit of soybean. *Eur. J. Biochem.* **(1985)**; 149:491 -496

Mora-Escobedo, R.; Paredes-López, O. y Odorica-Falomir, C. Characterization of albumins and globulins from Amaranth. *Lebensm.-Wiss. U. - Technol.* **(1990)**; 23:484-487.

Mori, T.; Nakamura, T. y Utsumi, S. Gelation mechanism of soybean 11S globulin: formation of soluble aggregates as transient intermediates. *J. of Food Sci.* **(1981)**; 47:26-30.

Müntz, K. Deposition of storage proteins. *Plant Mol. Biol.* **(1998)**; 38:77-99.

Nakamura, R.; Konishi, Y.; Kojima, A. y Nakatani, N. Globulin and albumin-2 associated with protein bodies in *Amaranthus cruentus* seeds. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **(1998)**; 62 n° 6:1231-1233.

Natarajan, S.; Xu, C.; Bae, C.; Caperna, T. J. y Garrett, W. M. Characterization of storage proteins in wild (*Glycine soja)* and cultivated *(Glicine Max)* soybean seeds using proteomic analysis. *J. Agric. Food Chem.* **(2006)**; 54.

Nielsen, N. C.; Dickinson, C. D.; Cho, T.-J.; Thanh, V. F.; Scallon, B. J.; Fischer, R. L.; Sims, T. L.; Drews, G. N. y Glodberg, R. B. Characterization of the glycinin gene family in soybean. *The Plant Cell* . **(1989)**; 1:313-328.

Nielsen, N.; Jung, R.; Nam, Y.; Beaman, T.; Olivera, L. y Bassüner, R. Synthesis and assembly of 11S globulins. *J. Plant Physiol.* **(1995)**; 145:641-647.

Osborne, T. En : The vegetable Proteins. 2da. edición Ed, Longmans y Green , Nueva York. **(1924)**.

Osuna-Castro, J. A.; Rascón-Cruz, Q.; Napier, J.; Fido, R. J.; Shewry, P. R. y Paredes-López, O. Overexpression, purification, and invitro refolding of the 11 S globulin from Amaranth seed in Escherichia coli. *J. Agric. Food Chem.* **(2000)**; 48:5249-5255.

Paredes-López, O; Mendoza, V y Mora, R. Isolation of amaranth flour proteins by fractionation procedures and sonication. *Plant Foods Hum. Nutr.* **(1993)**; 43:37-43.

Permyakov E. A. Cap 3 "Spectroscopic Properties of Isolated Protein Chromophores". *Luminiscent Spectroscopy of Proteins. Ed. CRC Press.* **(1993)**; 35-56.

Petr, J.; Michalik, I.; Tlaskalova, H.; Capouchova, I.; Famera, O.; Urminska, D.; Tukova, L. y Knoblochova, H. Extension of the spectra of plant products for the diet in celiac disease. *J. Food Sci.* **(2003)**; 21:59-70.

Petruccelli, S.; Molina, M. I.; Lareu, F. J. y Circosta, A. Two short sequences from amaranth 11S globulin are sufficient to target green fluorescent protein and beta-glucuronidase to vacuoles in *Arabidopsis* cells. *Plant Physiol. and Biochem.* **(2007)**; 45:400-409.

Phillipson, B. A.; Pimpl, P.; Pinto da Silva, L. L.; Crofts, A. J.; Taylor, J. P.; Movafeghi, A.; Robinson, D. G. y Denecke J. Secretory bulk flow of soluble proteins is efficient and COP II dependent. *The Plant Cell.* **(2001)**; 13:2005-2020.

Plate, A. Y. A. y Areas, J. A. G. Cholesterol-lowering effect of extruded amaranth (*Amaranthus caudatus* L.) in hypercholesterolemic rabbits. *Food Chem.* **(2002)**; 76:1-6.

Prak, K.; Nakatani, K.; Katsube-Tanaka, T.; Adachi, M.; Maruyama, N y Utsumi, S. Structure-function relationships of soybean proglycinins at subunit levels. *J. Agric. Food Chem.* **(2005)**; 53:3650-3657

Prakash, D. y Pal M. Nutritional and antinutritional composition of vegetable and grain amaranth leaves. *J. Sci. Food Agric.* **(1991)**; 57:573-585.

Prakash, D.; Joshi, B. D. y Pal, M. Vitamin C in leaves and seed oil composition of the *Amaranthus* species. *Intern. J.Food Sci.Nutr.* **(1995)**; 46:47-51.

Radauer C. y Breiteneder H. Evolutionary biology of plant food allergens. *J. Allergy Clin. Immunol.* **(2007)**; 120(3):518-525.

Raina, A. y Datta, A. Molecular cloning of a gene encoding a seed-specific protein with nutritionally balanced aminoacid composition from Amaranthus. *PNAS.* **(1992)**; 89:11774-11778.

Ramírez-Medeles, M. del Carmen; Aguilar, M. B.; Miguel, R. N.; Bolaños-García, V. M.; García-Hernández, E. y Soriano-García, M. Amino acid sequence, biochemical characterization, and comparative modeling of a nonspecific lipid transfer protein from *Amaranthus hypochondriacus. Archives of Biochem. and Biophysics.* **(2003)**; 415:24-33.

Rascón-Cruz, Q; Sinagawa-García, S; Osuna-Castro, J.A.; Bohorova, N. y Paredes-López, O. Accumulation, assembly and digestibility of amarantin expressed in transgenic tropical maize. *Theor. Appl. Genet.* **(2004)**; 108:335-342.

Raymond, J.; Robin, J. M. y Azanza, J. L. 11S seed storage proteins from *Helianthus* species (*Compositae*): biochimical, size y charge heterogeneity. *Pl. Syst. Evol.* **(1995)**; 198:195-208.

Robinson, D. G.; Oliviusson, P. y Hinz, G. Protein sorting to the storage vacuoles of plants: a critical appraisal. *Traffic.* **(2005)**; 6:615-625.

Romero-Zepeda, H. y Paredes-López, O. Isolation and characterization of amarantin, the 11S amaranth seed globulin. *J. Food Chem.* **(1996)**; 19:329-339.

Rudolph, R. y Lilie, H. In vitro folding of inclusion body proteins. *The FASEB J.* **(1996)**; 10:49-56.

Sauer, J. D. The grain amaranth and their relatives: a revised taxonomic and geographic survey. *Ann. Mo. Bot. Gard.* **(1967)**; 54(2):103-137.

Saunders, R. y Becker, R. Amaranthus: a potential food and feed resource. *Advances in Cereal Science and Technology. Ed. Pomeranz, Y. St.Paul: American Association of Cereal Chemists.* **(1984)**:357-397.

Schahbazian, N.; Kamkar, B. y Iran-Nejad, H. Evaluation of Amaranth production possibility in arid and semiarid regions of Iran. *Asian J. of Plant Sci.* **(2006)**; 5((4)):580-585.

Schlesier B., Bassüner R. Nong V. H. y Müntz K. The cDNA derived primary structure of two distinct legumin A subunit precursors from field bean (V. faba L.). *Nucleic Acids Research.* **(1990)**; 18:7146-7152.

Schwenke, K. D.; Henning, T.; Dudek, S.; Dautzenberg, H.; Danilenko, A. N.; Kozhevnikov, G. O. y Braudo, E. E. Limited tryptic hydrolysis of pea legumin: molecular mass and conformational stability of legumin-T. *Internat. J. of Biological Macromolec.* **(2001)**; 28:175-182.

Schwenke, K. D.; Knopfe, C.; Seifert, A.; Gornitz, E. y Zirwer, D. Acetylation of faba bean legumin: conformational changes and aggregation. *J. of the Sci. of Food and Agric.* **(2000)**; 81:126-134.

Scilingo, A. A. y Añón , M. C. Calorimetric study of soybean protein isolates: effect of calcium and thermal treatments. *J. Agric. Food Chem.* **(1995)**; 39:193-202.

Segura-Nieto, M.; Shewry, P. R. y Paredes-López, O. Cap.19 "Globulins of the Pseudocereals: Amaranth, Quinoa and Buckwheat". *Libro "Seed Proteins" Ed. Kluwer Academic Publishers. Shewry, P.R* y Casey, R. **(1999)**; 453-475.

Segura Nieto, M.; Barba de la Rosa, A. P. y Paredes-López, O. Biochemistry of amaranth proteins. *Amaranth biology, chemistry and technology. Ed. CRC Press. Boca Raton , Florida.* **(1994)**; 75-106.

Segura-Nieto, M.; Vázquez- Sánchez, N.; Rubio-Velázquez, H.; Olguín-Martínez, L. E., and Rodríguez-Nester, C. E. y Herrera Estrella L. Characterization of Amaranth (*Amaranthus hypochondriacus L.*) seed proteins. *J. Agric. Food Chem.* **(1992)**; 40:1553-1558.

Shewry, P. R.; Napier, J. A. y Tatham A. S. Seed storage proteins: structure and biosynthesis. *The Plant Cell.* **(1995)**; 7:945-956.

Shewry, P. R.; Tatham, A. S. y Halford, N. G. Cap 3 "The Prolamins of Triticeae ". *Libro "Seed Proteins" Ed. Kluwer Academic Publishers. Shewry, P.R y Casey, R.* **(1999)**:35-78.

Shewry, P. R. y Halford N. G. Cereal seed storage proteins: structures, proteins and role in grain utilization. *J. Exp.Botany.* **(2002)**; vol. 53 n° 370:947-948.

Shewry, P. R y Pandya, M. J. Capítulo 24 "The 2S albumin storage proteins". *Libro "Seed Proteins" Ed. Kluwer Academic Publishers. Shewry, P.R. y Casey, R.* **(1999)**:563-586.

Shewry, P. R.; Beaudoin, F.; Jenkins, J.; Griffiths-Jones, S. y Mills, E. N. C. Plant protein families and their relationships to food allergy. *Biochem. Society.* **(2002)**; 906-911.

Shirley, B. A. Cap 8 "Urea and Guanidine Hydrochloride Denaturation Curves". *Methods in Molecular Biology. Volume 40. Protein Stability and Folding. Theory and Practice. Ed. Humana Press Inc.* **(1995)**;177-190.

Shukla, S.; Bhargava, A.; Chatterjee, A.; Srivastava, A. y Singh, S. P. Genotypic variability in vegetable amaranth (*Amaranthus tricolor* L.) for foliage yield and its contributing traits over successive cuttings and years. *Euphytica.* **(2006)**; 151:103-110.

Shukla, S.; Pandey, V.; Pachauri, G.; Dixit, B. S.; Banerji, R. y Singh, S. P. Nutritional contents of different foliage cuttings of vegetable amaranth . *Plant Food Hum. Nutr.* **(2003)**; 58:1-8.

Shutov, A.D.; Bäumlein, H.; Blattner, F. R. y Müntz, K. Storage and mobilization as antagonistic functional constraints on seed storage globulin evolution. *J. Exp. Botany.* **(2003)**; 388:1645-1654.

Shutov, A. D.; Kakhovkaya, I. A.; Braun, H.; Bäumlein, H. y Müntz, K. Legumin-like and vicilin-like seed storage proteins: evidence for a common single-domain. *J. of Molec. Evol.* **(1995)**; 41:1057-1069.

Shutov, A. D. y Bäumlein, H. Cap 23 "Origin and Evolution of Seed Globulins". *Libro "Seed Proteins" Ed. Kluwer Academic Publishers. Shewry, P.R* y Casey, R. **(1999);** 543-561.

Shutov, A. D.; Kakhovskaya, I. A.; Bastrygina, A. S.; Bulnaga, V. P.; Horstmann, C. y Müntz, K. Limited proteolysis of β-conglycinin and glycinin, the 7S and 11S storage globulins from soybean (*Glycine max (L) Merr*). Structural and evolutionary implications. *Eur. J. Biochem.* **(1996)**; 241:221-228.

Silva-Sánchez, C.; González-Castañeda, J.; De León-Rodríguez, A. y Barba de la Rosa A. P. Functional and rheological properties of amaranth albumins extracted from two mexican varieties. *Plant Foods Hum. Nutr.* **(2004)**; 59:169-174.

Sinagawa-García, S. R.; Rascón-Cruz, Q.; Valdez- Ortiz, A.; Medina-Godoy, S.; Escobar-Gutiérrez, A. y Paredes-Lopez O. Safety assessment by in vitro digestibility and allergenicity of genetically modified maize with an amaranth 11S globulin. *J. Agric. Food Chem.* **(2004)**; 52:2709-2714.

Singhal, R. S. y Kulkarni, P. R. Composition of the seeds of some Amaranthus species. *J. Sci. Food Agric.* **(1988)**; 42:325-331.

Slightom, J. L.; Drong, R. F.; Klassy, R. C. y Hoffman, L. M. Nucleotide sequences from phaseolin cDNA clones: the major storage proteins from *Phaseolus vulgaris* are encoded by two unique gene families. *Nucleic Acids Research.* **(1985)**; 13:6483-6498.

Staswick, P.E.; Hermodson, M. A. y Nielsen, N. C. The Amino Acid Sequence of the A_2B_{1a} Subunit of Glycinin* *The J. of Biol. Chem.* **(1984)**; Vol. 259,(No. 21):13424-13430.

Sun, H.; Wiesenborn, D.; Rayas-Duarte, P.; Mohamed, A. y Hagen, K. Bench-scale processing of amaranth seed for oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **(1995)**; 72:1551-1555.

Sun, M.; Chen, H. y Leung, F. C. Low-cot sequences for fingerprinting analysis of germplasm diversity and relationship in *Amaranthus. Theor. Appl. Genet.* **(1999)**; 99:464-472.

Sze, K. W. C.; Kshirsagar, H. H.; Venkatachalam, M. y Sathe, S. K. A Circular Dichroism and Fluorescence Spectrometric assessment of effects of selected chemical denaturants on soybean (*Glycine max* L.) storage proteins glycinin (11S) and β-conglycinin (7S). *J. Agric. Food Chem.* **(2007)**.

Tapia-Blácido, D.; Sobral, P. J. y Menegalli, F. C. Development and characterization of biofilms based on Amaranth flour (*Amaranthus caudatus*). *J. of Food Engin.* **(2005)**; 67:215-223.

Tapia-Blácido, D.; Mauri, A. N.; Menegalli, F. C.; Sobral, P. J. A. y Añón, M. C. Contribution of the starch, protein, and lipid fractions to the physical, thermal, and structural properties of amaranth (A*maranthus caudatus*) flour films. *J. F. S.* **(2007)**; 72:E293-E300.

Thannhauser, T. W.; Konishi, Y. y Scheraga, H. A. Sensitive quantitative analysis of

disulfide bonds in polypeptides and proteins. *Analytical Biochem.* **(1984)**; 138:181-188.

Utsumi, S.; Inaba, H. y Mori, T. Heterogenity of soybean glycinin. *Phytochem.* **(1981)**; 20:585-589.

Utsumi, S.; Kohno, M.; Mori, T. y Kito, M. An alternate cDNA encoding glycinin $A_{1a}B_x$ subunit . *J. Agric. Food Chem.* **(1987)**; 35:210-214 .

Utsumi, S.; Gidamis, A. B.; Mikami, B. y Kito, M. Crystallization an d preliminary X-ray crystallographic analysis of the soybean proglycinin expressed in *E. coli* . *J. Mol. Biol.* **(1997)**; 233:177-178.

Vaintraub, I. A. y Morari, D. Applying the increase in rate constants of cooperative proteolysis to the determination of transition curves of protein denaturation. *J. Biochem. Biophys. Methods.* **(2003)**; 57:191-201.

Valdes-Rodríguez, S.; Segura-Nieto, M.; Chagolla-López, A.; Verver y Vargas-Cortina, A.; Martínez-Gallardo, N. y Blanco-Labra A. Purification, characterization and complete amino acid sequence of a trypsin inhibitor from Amaranth (*A. hypochondriacus*) seeds. *Plant Physiol.* **(1993)**; 103:1407-1412.

Valdez-Ortiz, A.; Rascón Cruz, Q.; Medina-Godoy, S.; Sinagawa-García, S. R.; Valverde-González, M. E. y Paredes-López, O. One-step purification and structural characterization of a recombinant His-tag 11S globulin expressed in transgenic tobacco. *J. of Biotechnol.* **(2005)**; 115:413-423.

Vallejo, L. F. y Rinas, U. Strategies for the recovery of active proteins through refolding of bacterial inclusion body proteins. *Microbial Cell Factories.* **(2004)**; 3(11):1-12.

Vasco-Méndez, N. L. y Paredes-López, O. Antigenic homology between amaranth glutelins and other storage proteins. *J. Food Chem.* **(1995)**; 18:227-238.

Vitale, A. y Hinz, G. Sorting of proteins to storage vacuoles: how many mechanisms?

Trends in Plant Sci. **(2005)**; 10 n ° 7:1380-1385.

Wagner, J. R. y Gueguen, J. Effects of dissociation, deamidation, and reducing treatment on structural and surface active properties of soy glycinin. *J. Agric. Food Chem.* **(1995)**; 43:1993-2000.

Weschke, W.; Bassüner, R.; Nong, V. H.; Czihal, A.; Bäumlein, H. y Wobus, U. The structure of *Vicia faba* vicillin gene. *Biochemie Und Physiologie Der Pflanzen.* **(1988)**; 183:233-242.

Wolf, W. J. Sulfhydryl content of glycinin: effect of reducing agents. *J. Agric. Food Chem.* **(1993)**; 41:168-176.

Woo, E.; Dunwell, J. M.; Goodenough, P. W.; Marvier, A. C. y Pickersgill, R. W. Germin is a manganese containing homohexamer with oxalate oxidase and superoxide dismutase activities. *Nature Structural Biology.* **(2000)**; 7(11).

Yamagishi, T.; Takahashi, N. y Yamauchi, F. Covalent polymerization of acidic subunits on heat-induced gelation of soybean glycinin. *Cereal Chem.* **(1987)**; 64:207-212.

Yang, Y-d; Elamawi, R.; Bubeck, J.; Pepperkok, R.; Ritzenthaler, C. y Robinson D. G. Dynamics of COP II vesicles and the Golgi apparatus in cultured *Nicotiana tabacum* BY-2 cells provides evidence for transient association of Golgi stacks with endoplasmmic reticulumm exit sites. The *Plant Cell.* **(2005)**; 17:1513-1531.

Zhang, G.-Y.; Hayashi, Y.; Matsumoto, S.; Matsumura, Y. y Mori, T. Molecular species of glycinin in some soybean cultivars. *Phytochem.* **(2002)**; 60:675-681.