



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
Instituto de Química

**ESTUDIO DE LA OLIGOMERIZACIÓN INDUCIDA POR EL
RECONOCIMIENTO A SU LIGANDO DE UNA LECTINA DE *Mytilus
californianus*. IMPLICACIONES EN SU FUNCIÓN**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
Doctor en Ciencias

PRESENTA

Efrén García Maldonado

TUTORA PRINCIPAL

Dra. Alejandra Hernández Santoyo
Instituto de Química

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Marietta Tuena Sangri.

Instituto de Fisiología Celular

Dr. José Federico Del Río Portilla.

Instituto de Química

Ciudad Universitaria, CD. MX., 27 de octubre de 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México por la oportunidad brindada de crecer académicamente y culturalmente, las experiencias adquiridas durante mi formación me han permitido crecer no solo como profesionista si no también como persona.

Al programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas por permitirme llevar a cabo mis estudios de doctorado en un programa de estudios con excelencia académica.

A mi tutora, la Dra. Alejandra Hernández Santoyo por su apoyo y darme la oportunidad de desarrollar este proyecto con el que pude descubrir mis intereses en la investigación.

A mi comité tutor: La Dra. Marietta Tuena Sangri (Instituto de Fisiología Celular), El Dr. José Federico del Río Portilla (Instituto de Química), gracias por su asesoría y consejos a través de mi formación, sus propuestas y comentarios enriquecieron mi proyecto de investigación.

A la Dra. Adela Rodríguez Romero, por sus consejos, comentarios y constante apoyo durante mis estudios de doctorado.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico otorgado a través del programa de becas nacionales para estudios de doctorado (No. De registro CVU:445804).

Este proyecto se realizó con apoyo económico brindado por la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) mediante el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) con el No. De Apoyo: IN207013.

Agradezco a los sinodales: Dra. Marietta Tuena Sangri (Instituto de fisiología Celular), Dra. Adela Rodríguez Romero (Instituto de Química), Dr. Sergio Sánchez Esquivel (Instituto de Investigaciones Biomédicas), Dr. Edgar Zenteno Galindo (Facultad de Medicina), Dr. Hector Riveros Rosas, gracias por sus revisiones y el tiempo invertido en sus observaciones y comentarios que ayudaron a mejorar este manuscrito.

Alma Lidia Cortés Montes de La Secretaria de Vinculación, por su constante asesoría e invaluable apoyo en todos los tramites referentes al posgrado.

Finalmente, a Joana, Siseth, Anayetzin, Israel, Yusvel, Benjamín, Alland, que además de compañeros del departamento de Biomacromoléculas, agradezco su amistad y apoyo. Con mucho cariño a Pamela y Bianca, por sus invaluable consejos durante los momentos críticos en el desarrollo de este proyecto.

Este trabajo se llevó a cabo en los laboratorios de Química de Biomacromoléculas 3 y Biología Molecular del Departamento de Química de Biomacromoléculas del Instituto de Química de la UNAM y los resultados se presentaron en los siguientes congresos y talleres:

- XXIX Congreso Nacional de Bioquímica de la sociedad Mexicana de Bioquímica. Noviembre de 2012, Ciudad de Oaxaca, México.
- XXX Congreso Nacional de Bioquímica de la sociedad Mexicana de Bioquímica. Noviembre de 2014, Guadalajara, Jalisco México.
- Small Angle X-ray Scattering for Proteins in Solution, European Molecular Biology Organization (EMBO). Mayo de 2015, Grenoble, Francia
- Cell Biology of Animal Lectins, European Molecular Biology Organization (EMBO). Junio del 2015, Rehovot, Israel.

Del proyecto de investigación se publicó el siguiente artículo:

E. Garcia-Maldonado, P. Cano-Sanchez, A. Hernandez-Santoyo, Fish & Shell fish Immunology Molecular and functional characterization of a glycosylated Galactose-Binding lectin from *Mytilus californianus*, 66 (2017) 564–574.

doi.org/10.1016/j.fsi.2017.05.057

CONTENIDO

CONTENIDO	5
INDICE DE FIGURAS	8
INDICE DE TABLAS	10
ABREVIATURAS.....	11
RESUMEN	14
1. INTRODUCCIÓN	15
2. MARCO TEÓRICO.....	17
2.1. RESPUESTA INMUNE INNATA	17
2.2. INMUNIDAD INNATA EN INVERTEBRADOS MARINOS	18
2.3. COMPONENTES HUMORALES.....	18
2.4. LECTINAS	18
2.5. CLASIFICACIÓN DE LAS LECTINAS ANIMALES.....	19
2.5.1. Calnexinas y Calreticulinas	19
2.5.2. Lectinas de tipo M	20
2.5.3. Lectinas tipo L.....	21
2.5.4. Lectinas tipo P.....	22
2.5.5. Lectinas tipo C	22
2.5.6. Galectinas	23
2.5.7. Lectinas tipo I (Siglecs)	23
2.5.8. Lectinas tipo R	23
2.5.9. Lectinas tipo caja F	24
2.5.10. Ficolinas.....	24
2.5.11. Lectinas tipo Quitinasa	25
2.5.12. Lectinas tipo F.....	25
2.5.13. Intelectinas	26
2.6. APLICACIONES DE LAS LECTINAS DE ORIGEN MARINO.....	28
3. ANTECEDENTES	29
3.1. LECTINAS DE INVERTEBRADOS MARINOS.....	29
3.2. OLIGOMERIZACIÓN DE PROTEÍNAS.....	30
3.3. OLIGOMERIZACIÓN EN LECTINAS DE INVERTEBRADOS MARINOS.....	31
3.4. CARACTERÍSTICAS DE LA NUEVA FAMILIA DE LECTINAS PRESENTES EN LA FAMILIA MYTILIDAE	32
3.5. DESCRIPCIÓN DEL MEJILLÓN MYTILUS CALIFORNIANUS	34
4. JUSTIFICACIÓN	36
5. HIPÓTESIS	36
6. OBJETIVOS	37

6.1. OBJETIVO GENERAL	37
6.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	37
7. METODOS	38
7.1. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA LECTINA DE <i>M. CALIFORNIANUS</i>	38
7.1.1. Formalización de eritrocitos de conejo.....	38
7.1.2 Ensayos de eritroaglutinación	39
7.2. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNA CON EL MÉTODO DEL ÁCIDO BICINCONÍNICO	39
7.3. PURIFICACIÓN DE LA LECTINA DE <i>M. CALIFORNIANUS</i>	40
7.4. DETERMINACIÓN DE LA PUREZA DE LA LECTINA	41
7.4.1. Electroforesis SDS-PAGE	41
7.4.2. Espectrometría de masas MALDI-TOF.....	41
7.5. DETERMINACIÓN DE LA ESPECIFICIDAD DE LA LECTINA DE <i>M. CALIFORNIANUS</i> Y SU ISOFORMA	42
7.6. DETERMINACIÓN DE LA ESTABILIDAD EN RELACIÓN A LA TEMPERATURA Y EL PH	43
7.7. EVALUACIÓN DE LA ESTABILIDAD POR TERMOFLUORESCENCIA	43
7.8. COMPORTAMIENTO EN SOLUCIÓN DE LA LECTINA DE <i>M. CALIFORNIANUS</i>	45
7.9. DETECCIÓN DE GLICOSILACIONES	45
7.11. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA	46
7.12. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA	46
7.13. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA	47
7.14. SECUENCIACIÓN DE LA LECTINA DE <i>M. CALIFORNIANUS</i>	47
7.14.1. Por digestión enzimática y análisis por espectrometría de masas	47
7.14.2. A partir del cDNA de <i>M. californianus</i>	48
7.14.2.1. Extracción de RNA _T y amplificación del gen con oligos degenerados	48
7.14.2.2. Rapid amplification cDNA Ends (RACE 5' y 3') y clonación en un vector pJET	48
7.15. OBTENCIÓN DE UNA ISOFORMA RECOMBINANTE DE LA LECTINA DE <i>M. CALIFORNIANUS</i> RMCL-1	49
7.15.1. Clonación y sobreexpresión	49
7.16. PURIFICACIÓN DE RMCL-1	50
7.17 PRUEBAS DE CRISTALIZACIÓN Y DETERMINACIÓN DE LA ESTRUCTURA TERCIARIA DE LA LECTINA DE <i>M. CALIFORNIANUS</i> Y SU ISOFORMA	51
7.18 DETERMINACION DE LOS PARÁMETROS TERMODINÁMICOS DE LA INTERACCION LECTINA-CARBOHIDRATO DE MCL-1 POR CALORIMETRÍA DE TITULACIÓN ISOTÉRMICA	52
8. RESULTADOS Y DISCUSION	53
8.1. PURIFICACIÓN DE UNA LECTINA DE <i>MYTILUS CALIFORNIANUS</i>	53
8.2. DETERMINACIÓN DE LA ESPECIFICIDAD DE LA LECTINA DE <i>M.CALIFORNIANUS</i>	55
8.2.1 Actividad de la lectina de <i>M. californianus</i> sobre eritrocitos de diferentes grupos sanguíneos	57
8.3. EFECTO DEL PH Y TEMPERATURA SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA LECTINA	59
8.4. EVALUACIÓN DE LA ESTABILIDAD ESTRUCTURAL DE MCL	61
8.5. COMPORTAMIENTO EN SOLUCIÓN DE LA LECTINA DE <i>M. CALIFORNIANUS</i>	63
8.6. SECUENCIA DE LA LECTINA MCL	64
8.6.1. Organización genómica del gen de MCL	65
8.7. DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE GLICOSILACIONES	66
8.9. ANÁLISIS ESTRUCTURAL DE LA LECTINA DE <i>M. CALIFORNIANUS</i>	68
8.10. OLIGOMERIZACIÓN INDUCIDA POR EL RECONOCIMIENTO DE SU LIGANDO EN MCL	75
8.10.1. Descripción de los sitios de reconocimiento	77
8.11. CLONACIÓN Y SOBREEXPRESIÓN DE UNA ISOFORMA DE LA LECTINA DE <i>MYTILUS CALIFORNIANUS</i> (RMCL-1)	80
8.12. PURIFICACIÓN DE RMCL-1	83

8.13. ESTUDIOS DE CALORIMETRÍA DE TITULACIÓN ISOTÉRMICA.....	84
8.14. ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE LAS LECTINAS DE M. CALIFORNIANUS MCL Y rMCL-1 ...	87
8.15 ESTRUCTURA DE LA ISOFORMA RECOMBINANTE DE LA LECTINA DE M. CALIFORNIANUS	89
8.16. OLIGOMERIZACIÓN DE rMCL-1 INDUCIDA POR EL RECONOCIMIENTO A SU LIGANDO.....	91
8.16.1. Oligomerización inducida por la adición de rafinosa	95
8.16.2. Oligomerización inducida por la adición de α -Lactosa en rMCL-1	99
8.16.3. Oligomerización inducida por la adición de melibiosa.....	101
9. CONCLUSIONES.....	115
10. PERSPECTIVAS.....	116
11. REFERENCIAS.....	117
ANEXO 1.....	126
ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO Y ELABORACIÓN DE UN ÁRBOL FILOGENÉTICO NEIGHBOR JOINING (NJ) DE LOS MIEMBROS DE LA FAMILIA DE LECTINAS MYTILIDAE	126
Resultados de análisis bioinformático y árbol filogenético (NJ)	126
ANEXO 2.....	131
ESTUDIOS DE DICROÍSMO CIRCULAR EN EL UV-LEJANO	131
Resultados de los estudios de dicroísmo circular en el UV lejano en MCL.....	132
ANEXO 3	134
Molecular and functional characterization of a glycosylated Galactose-Binding lectin from Mytilus californianus.....	134

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Dominios de reconocimiento a carbohidratos de acuerdo a la clasificación propuesta por Drickamer	27
Figura 2. Plegamiento de trébol β presente en una nueva familia de lectinas.....	34
Figura 3. Clasificación taxonómica del mejillón, <i>Mytilus californianus</i>	35
Figura 4. Esquema del ensayo de desnaturalización térmica utilizando termofluorescencia.....	44
Figura 5. Electroforesis en condiciones desnaturalizantes de la lectina de <i>M. californianus</i>	54
Figura 6. Espectro de masas MALDI-TOF de la lectina de <i>Mytilus californianus</i>	55
Figura 7. Carbohidratos que inhiben la actividad hemaglutinante de MCL.....	56
Figura 8. Aglutinación de eritrocitos de diferentes grupos sanguíneos.....	57
Figura 9. Estructura de los oligosacáridos presentes en los diferentes grupos sanguíneos humanos.....	59
Figura 10. Efecto del pH y la temperatura en la en la actividad hemaglutinante de la lectina de <i>M. californianus</i>	60
Figura 11. Estabilidad térmica de MCL.....	62
Figura 12. Curva de calibración de la columna de exclusión molecular	63
Figura 13. Secuencia de nucleótidos y aminoácidos de MCL.....	65
Figura 14. Determinación de la presencia de glicosilaciones en MCL.....	67
Figura 15. Estructura cristalográfica de MCL.....	72
Figura 16. Estructura cristalográfica de MCL en complejo con Galactosa.....	79
Figura 17. Amplificación del gen de rMCL-1.....	80
Figura 18. Análisis de restricción de pET28-rMCL-1.....	81
Figura 19. DNA plasmídico puro.....	81
Figura 20. Expresión preliminar de rMCL-1.....	82

Figura 21. Expresión de rMCL-1 en Rosetta.....	82
Figura 22. Purificación de rMCL-1.....	83
Figura 23. Isotermas y parámetros termodinámicos obtenidos por ITC de rMCL-1 con diferentes ligandos.....	86
Figura 24. Comparación de la estabilidad térmica de MCL y rMCL-1.....	88
Figura 25. Estructura cristalográfica de rMCL-1.....	90
Figura 26. Mapa de densidad electrónica 2F _c -F _c a 1σ de las mutaciones que presenta rMCL-1.....	91
Figura 27. Estructura de rMCL-1 en presencia de rafinosa.	93
Figura 28. Estructura cristalográfica de rMCL-1 en co-cristalización con rafinosa....	98
Figura 29. Estructura cristalográfica de rMCL-1 en co-cristalización con α-Lactosa.....	100
Figura 30. Estructura cristalográfica de MCL-1 en co-cristalización con Melibiosa.....	104
Figura 31. Mapas de densidad electrónica 2F _o -F _c a 1 σ de cada uno de los carbohidratos obtenidos en complejo con rMCL-1.....	106
Figura 32. Aglutinación de bacterias en presencia de MCL y rMCL-1.....	108
Figura 33. Actividad antifúngica de MCL y rMCL-1.....	110
Figura 34. Alineamiento múltiple con homologos de MCL.....	128
Figura 35. Árbol Filogenético de las lectinas de la familia Mytilidae.....	130
Figura 36. Espectro de dicroísmo circular en el UV lejano de MCL.....	133

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de lectinas animales propuestas por Drickamer	21
Tabla 2. Carbohidratos que inhiben la actividad hemaglutinante de MCL.....	56
Tabla 3. Actividad hemaglutinante de MCL con diferentes eritrocitos.....	57
Tabla 4. Estadística de la colecta de datos y afinamiento de las estructuras de la lectina de <i>Mytilus californianus</i>	73
Tabla 5. Interacciones de los tres sitios de reconocimiento de MCL con el glicerol..	74
Tabla 6. Interacciones de la trealosa en el sitio de reconocimiento 3 de MCL.....	74
Tabla 7. Estadística de la colecta de datos y el afinamiento de MCL en complejo con Galactosa	76
Tabla 8. Interacciones de los tres sitios de reconocimiento de MCL con las D-Galactosa	77
Tabla 9. Especificidad de MCL vs rMCL-1.....	88
Tabla 10. Estadística de la colecta de datos y el afinamiento de rMCL-1 y de rMCL-1 en complejo con rafinosa obtenida por “remojo”.....	94
Tabla 11. Interacciones de los tres sitios de reconocimiento de rMCL-1 con rafinosa.....	95
Tabla 12. Estadística de la colecta de datos y el afinamiento de rMCL-1 en co-cristalización con α -lactosa y rafinosa.....	96
Tabla 13. Interacciones de la α -lactosa en los tres sitios de reconocimiento de rMCL-1.....	101
Tabla 14. Estadística de la colecta de datos y el afinamiento de las estructuras de en presencia de melibiosa obtenidas por remojo y en co-cristalización rMCL-1.....	102
Tabla 15. Interacciones de la melibiosa en los tres sitios de reconocimiento de rMCL-1.....	103
Tabla 16. Pruebas de citotoxicidad en líneas celulares de cáncer en presencia de una mezcla de oligómeros de MCL.....	112
Tabla 17. Pruebas de citotoxicidad en líneas celulares de cáncer en presencia del dímero de MCL	112
Tabla 18. Homólogos de MCL encontrados con BLAST.....	127

ABREVIATURAS

- BCA: Ácido Bicinconínico
- BSL: Lectina de *Bryothammion seaforthii*
- CEL I: Lectina I de *Cuccumaria echinata*
- CEL II: Lectina II de *Cuccumaria echinata*
- CEL III: Lectina III de *Cuccumaria echinata*
- CEL IV: Lectina IV de *Cuccumaria echinata*
- CGL: Lectina de *Crenomytilus grayanus*
- DC: Dicroísmo circular
- DIG: Dioxigenina
- DLT: Dominio de lectina tipo L
- EFC: Eritrocitos de conejo formalinizados
- DLTC: Dominio de Lectinas tipo-C
- DRC: Dominio de Reconocimiento a Carbohidratos
- Fuc: Fucosa
- Gal: Galactosa
- GalNAc: N-acetil-galactosamina
- Glc: Glucosa
- GlcNAc: N-acetil-glucosamina
- GNA: Aglutinina de *Galanthus nivalis*
- LB: Medio Luria Bertani
- LPS: Lipopolisácaridos
- MAA: Aglutinina de *Mackia aamurensis*
- Man: Manosa
- MCL: Lectina de *Mytilus californianus*
- MCL-1: Isoforma de la lectina de *Mytilus californianus*
- MeML: Lectina de *Mytilus edulis*
- MRS: Medio Morgan Ross
- MTL: Lectina de *Mytilus Trossulus*
- MGL: Lectina de *Mytilus galloprovincialis*

PBS: de fosfato de sodio 50mM, pH 7.4, 150mM NaCl
PDA: Agar papa Dextrosa
PAMP: Patogeno-asociado a patrones moleculares
PGN: Peptido glicano
PMN: Polimorfos nucleares
PNA: Aglutinina de cacahuete
RMP: Receptores de Manosa-6-fosfato
RMP-DC: Receptores de Manosa dependientes de cationes
RMP-IC: Receptores de Manosa independientes de cationes
RRP: Receptores de reconocimiento de Patrones
SNA: Aglutinina de *Sacubus nigra*
SRB: Sulforodamida
TEV: Enzima de Virus del Tabaco
WGA: Aglutinina de germen de trigo

ABSTRACT

Lectins are carbohydrate binding proteins of non-immune origin, that can recognize antigens expressed in bacteria as LPS (lipopolysaccharides) and carry out agglutination and hemolysis mechanisms. These proteins play an important role in the innate defense system of marine invertebrates. In this work, we isolate a lectin with α -galactosides specificity from the mollusk *Mytilus californianus* (MCL). MCL showed a molecular mass of 18 kDa, thermal stability and ability to form oligomers, being the dimer the most abundant oligomer in solution. We obtained the whole cDNA sequence from the total RNA and the analysis of the sequence confirmed that MCL belongs to a new lectin family with only three reported members at this time. The previously reported members were lectins from bivalves of the Mytilidae Family. Analysis of the sequence showed that MCL shares 100% identity with a *Mytilus galloprovincialis* lectin (MGL), with the difference that MCL was glycosylated.

From the genomic DNA, we cloned and overexpressed an isoform (rMCL-1) previously identified in the mussel DNA. The isoform has three mutations in comparison with MCL (V107I, G130K y N141D) and recognizes the same carbohydrate structures but with different specificity. Isothermal Titration Calorimetry (ITC) showed that the interaction between the isoform and its ligands was driven by enthalpy contribution and the isotherms were fitted to different interaction models depending of the ligand. Structural analysis showed that both lectins possess a β -trefoil fold domain with one recognition site in each β -trefoil subdomain. We observed that in absence of their ligands both lectins form dimers but when these are present, lectins acquire a different quaternary structure depending on the ligand. The analysis in the interfaces allowed us to find the structural determinants that trigger oligomerization phenomenon. We observed that self-assembly mechanisms play an important role in the innate immune response of the organism and its potential application in biomedical and biotechnological areas, since these lectins showed a higher antifungal activities compared with commercial antifungals against *Alternaria alternata*, *Fusarium oxysporum*, *Phytophthora capsica* y *Pythium aphanidermatum*. Also, both lectins showed antibacterial activities against Gram-positive and negative bacteria and cytotoxic activity against different cancer cell lines.

RESUMEN

Las lectinas son proteínas que tienen la capacidad de reconocer carbohidratos. Estas pueden reconocer los antígenos de superficie que son expresados en bacterias como lipopolisacáridos y llevar a cabo mecanismos de aglutinación y de hemólisis, por lo que forman parte del sistema de defensa innato de invertebrados marinos. En el presente estudio se aisló del molusco marino *Mytilus californianus* una lectina que mostró una masa molecular de 18 kDa, alta estabilidad térmica, especificidad por α -galactósidos y una fuerte tendencia de formar oligómeros, siendo la forma dimerica la más abundante. Obtuvimos la secuencia de aminoácidos completa de la lectina mediante el cDNA sintetizado a partir del RNA_T extraído del organismo observando que pertenece a una nueva familia de lectinas recientemente descrita que sólo cuenta con 3 miembros reportados a la fecha, todos obtenidos de bivalvos de la familia Mytilidae. El análisis de dicha secuencia mostró 100% de identidad con una lectina de *Mytilus galloprovincialis*, siendo la única diferencia que la de *M. californianus* estaba glicosilada.

A partir de la amplificación del DNA genómico clonamos y sobre-expresamos en *E. coli* una isoforma previamente identificada en el material genético de *M. californianus*. Esta cuenta con 3 aminoácidos diferentes (V107I, G130K y N141D) y reconoce los mismos galactosidos que la nativa con diferente especificidad. La calorimetría de titulación isotérmica mostró que las isothermas ajustaron a diferentes modelos de unión dependiendo del ligando. El análisis de las estructuras cristalográficas de ambas lectinas, mostró que poseen un plegamiento tipo trébol β con un sitio de reconocimiento a carbohidratos en cada sección del trébol. Observamos que en ausencia de su ligando ambas lectinas forman dímeros y que en presencia de ellos adquieren una estructura cuaternaria diferente dependiendo del azúcar. El análisis de las interacciones entre las subunidades observadas en cada oligómero nos permitió establecer cuáles son los determinantes estructurales que desencadenan el fenómeno de oligomerización. Observamos que este mecanismo de asociación juega un papel importante en la respuesta inmune innata del organismo y en su posible aplicación en el área biomédica y biotecnológica, ya que las lectinas mostraron actividad antifúngica mayor a los antifúngicos comerciales contra *Alternaria alternata*,

Fusarium oxysporum, *Phytophthora capsia* y *Pythium aphanidermatum*. También mostraron actividad antimicrobiana inhibiendo el crecimiento de bacterias Gram (+) y Gram (-), además de inhibir el crecimiento de diferentes líneas celulares de cáncer.

1. INTRODUCCIÓN

El sistema de defensa ha evolucionado en los metazoos desde que aparecieron hace 600 millones de años, dicho sistema posee mecanismos de defensa adquiridos (inmunidad adquirida) y un sistema inmune adaptativo que surgió a partir de la aparición de los vertebrados con mandíbulas articuladas (Gnatóstomos), que puede reconocer e iniciar una respuesta contra diversos patógenos [1]. Si el elemento no propio es considerado como una amenaza, el sistema inmune monta una reacción de defensa para destruirlo. Las características básicas de una respuesta inmune efectiva son la rapidez (para no permitir que el agente peligroso se multiplique y cause daños graves) y la especificidad (debe ser capaz de discriminar entre lo que es peligroso y lo que no lo es). Para lograr esto, en vertebrados superiores se activan dos sistemas en paralelo, el sistema inmune innato que es el sistema más primitivo y rápido, y el sistema inmune adaptativo que es más sofisticado, altamente específico y con una característica adicional, tiene memoria. Esto significa que después de haberse encontrado con un agente extraño y de haber diseñado y construido las armas específicas contra él, las células del sistema mantienen la memoria de lo que han hecho y, si el mismo agente se encuentra de nuevo (por ejemplo, un virus infeccioso), el sistema puede reconstruir las armas específicas más rápidamente [1,2]. Por otro lado, la respuesta inmune innata le permite a los organismos producir receptores que reconocen patrones conservados en diferentes patógenos, para generar una respuesta que limita la invasión del patógeno [1].

Organismos más ancestrales como los invertebrados marinos carecen de inmunidad adaptativa y en su lugar poseen un sistema de defensa innato, lo que comúnmente se refiere a una respuesta inmune inespecífica que carece de memoria [3-5]. Sin embargo, su sistema de defensa es complejo, poseen células que circulan a través de la hemolinfa (hemocitos) las cuales son responsables de llevar a cabo fagocitosis, producir especies reactivas de oxígeno, liberar enzimas hidrolíticas y

péptidos antimicrobianos, como respuesta al reconocimiento de un antígeno. Estos mecanismos de defensa en invertebrados marinos están acompañados de un componente humoral [6] que está constituido por moléculas solubles que intervienen en el reconocimiento de patógenos a través de Receptores de Reconocimiento de Patrones (RRPs) [1,2,6,7] que son reconocidos por lectinas o aglutininas [8].

Las lectinas son proteínas que pertenecen al sistema de defensa inmune humoral, de origen distinto a las inmunoglobulinas, son ubicuas en la naturaleza y tienen la capacidad de reconocer carbohidratos sin desplegar actividad enzimática hacia los azúcares que reconocen [9]. Debido a su capacidad para aglutinar células se ha encontrado que en invertebrados marinos participan en procesos de reconocimiento, aglutinación y encapsulación de patógenos [10,11]; algunas de estas proteínas poseen actividades citotóxicas inhibiendo el crecimiento de parásitos o provocando hemólisis en las membranas celulares. Debido a sus funciones biológicas tienen múltiples aplicaciones biomédicas y biotecnológicas [9,12]. En bivalvos marinos del género *Mytilus* se han reportado también proteínas de tipo c1q y gc1q (proteínas globulares c1q) que al igual que las lectinas, están involucradas en la respuesta inmune innata [13-15], estas proteínas forman parte de la vía del complemento y en vertebrados primitivos como la lamprea, que carece de inmunidad adaptativa, se ha propuesto que es un ortólogo de la que poseen los mamíferos. La importancia de este tipo de proteínas recae en el hecho de ser un vínculo entre la inmunidad adaptativa e innata [13,16]. Los mecanismos implicados en la inmunidad innata son de suma importancia ya que por un lado son útiles como modelos de estudio en la evolución de la respuesta inmune y la relación que tienen las proteínas de tipo c1q en la inmunidad adaptativa o en la vía del complemento, y por otro lado, el estudio de estas proteínas y sus características permiten explicar lo eficiente que es este sistema de defensa aún sin ser tan sofisticado como el de los mamíferos, los cuales poseen una respuesta inmune adaptativa. En el presente estudio se caracterizó bioquímica, termodinámica y estructuralmente a una lectina y una de sus isoformas del mejillón *Mytilus californianus*. Así mismo, se analizaron los mecanismos de oligomerización que sufren ambas lectinas al reconocer a sus ligandos específicos y el efecto de dicha asociación en su estabilidad, especificidad y actividad biológica.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Respuesta inmune innata

El sistema inmune de los vertebrados está conformado por dos principales componentes una respuesta inmune innata y una adaptativa, en donde cada uno reconoce diferentes tipos de receptores que desempeñan un papel importante en el reconocimiento de patógenos [17]. En primer lugar, hay células de defensa especiales en los diferentes tejidos que están directamente involucradas en la eliminación de patógenos, éstas pertenecen al componente de la defensa celular [18]. En segundo lugar, tanto el sistema innato como el adaptativo necesitan de diversas sustancias solubles que se encuentran en la sangre y otros fluidos, tales como como enzimas, anticuerpos y péptidos. Estas moléculas pertenecen a la defensa humoral [18,19]. De esta forma los dos mecanismos en la respuesta inmune están respaldados por estrategias de defensa celular y humoral [20]. La inmunidad innata está presente en todos los animales y su principal tarea es la defensa del organismo contra los patógenos; este mecanismo de defensa es la primer respuesta que se desencadena ante la detección de un patógeno y se caracteriza porque es evolutivamente más ancestral que el mecanismo de defensa adaptativo que está presente en animales superiores y que comúnmente se describe como una solución definitiva a la respuesta inmune generada por el reconocimiento de patógenos [7]. La respuesta inmune innata se considera inespecífica, la especificidad es una cualidad vinculada con la inmunidad adaptativa presente en vertebrados [21,22]; sin embargo, los invertebrados marinos al no poseer inmunoglobulinas han desarrollado mecanismos para la detección de antígenos de las superficies microbianas como son: lipopolisácaridos (LPS), ácidos lipídicos, lipoproteínas, peptidoglicanos (PGN) y β 1,3-D-glicanos. Tanto organismos vertebrados como invertebrados generan una respuesta inmune ante todos estos antígenos, por lo que es probable que el reconocimiento de estos epítomos haya surgido en una etapa temprana en la evolución de los animales [19,23,24].

2.2. Inmunidad innata en invertebrados marinos

La inmunidad de invertebrados marinos es considerada un modelo de estudio de interés en el sistema de defensa que está conformado por componentes celulares y humorales, que a su vez están constituidos por un mecanismo aferente (de detección) y uno eferente (efector). Las estrategias aferentes involucran el reconocimiento a patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) que son altamente conservados dentro de las especies microbianas y generalmente ausentes en el hospedero [22,25]. Esto permite a los receptores del hospedero unirse a patógenos y desencadenar una respuesta inmune como la coagulación de la hemolinfa, producción de especies reactivas de oxígeno producidas por los hemocitos que circulan a través de los diferentes tejidos, de péptidos antimicrobianos que son capaces de lisar las células, así como los procesos de fagocitosis [19].

2.3. Componentes humorales

El sistema de defensa humoral está constituido por moléculas solubles cuya función principal es contrarrestar a los patógenos a través de mecanismos de aglutinación, opsonización y neutralización de bacterias mediante la adhesión a la pared celular para permitir la permeabilidad de la membrana celular o producir inhibición del crecimiento de los parásitos [26]. Los invertebrados no cuentan con mecanismos de memoria mediados por inmunoglobulinas, pero se ha demostrado que poseen moléculas con alta especificidad hacia determinados patrones de reconocimiento. Muchas de estas moléculas son proteínas con la capacidad de interactuar directamente con la partícula extraña además de llegar a sitios donde las células no pueden cuando se presenta un patógeno [18].

2.4. Lectinas

Las lectinas son moléculas que participan en uno de los principales mecanismos de defensa empleado por invertebrados marinos, ya que al carecer de un sistema inmune

mediado por anticuerpos dependen exclusivamente de la respuesta inmune innata para defenderse de patógenos [28]. En invertebrados marinos estas proteínas, que tienen la capacidad de reconocer azúcares, están relacionadas con procesos de aglutinación, actividad citotóxica y de penetrar la membrana de las bacterias [24,27,29]. Estas proteínas han sido clasificadas de acuerdo a la estructura de sus dominios de reconocimiento a carbohidratos (DRC's), de su especificidad y de su dependencia de cationes divalentes [30].

2.5. Clasificación de las lectinas animales

Las lectinas son proteínas ubicuas en la naturaleza las cuales se han clasificado con base en su especificidad por algún carbohidrato, o por su estructura, pero sin duda la clasificación más comúnmente utilizada es la propuesta por Drickamer en 1988 (Tabla 1) [30]. Esta se basa en los motivos de secuencia de aminoácidos altamente conservados pertenecientes al DRC. En las lectinas que se han aislado de vertebrados existen ocho grandes grupos, de los cuales cuatro de ellos llevan a cabo sus funciones generalmente dentro de la célula como son las que pertenecen a la familia de la calnexina, tipo M, tipo L y tipo P, mientras que el resto realizan sus funciones en el exterior celular. Estas últimas son excretadas dentro de la matriz extracelular o mediante fluidos, aunque también se pueden localizar en el plasma membranal para mediar diversas funciones como la adhesión y comunicación celular, eventos de señalización, así como reconocimiento de glicanos y patógenos. Las familias que encabezan este grupo de lectinas son: tipo C, tipo R, siglecs y galectinas. Adicionalmente existen otras cinco familias que llevan a cabo funciones complementarias, y de las que aún se sigue estudiando su función biológica, estas son: lectinas de caja F, ficolinas, tipo quitinasa, tipo F e intelectinas [29,30] (Figura 1).

2.5.1. Calnexinas y Calreticulinas

Las calnexinas son el prototipo de un grupo muy pequeño de proteínas chaperonas que se localizan en el retículo endoplásmico y que se encuentran únicamente en eucariotas, mientras que su homólogo, la calreticulina parece estar presente en eucariotes que anteceden a los vertebrados como son *C. elegans* y *Drosophila*

melanogaster. Ambas lectinas son componentes del sistema de control de calidad que promueven el plegamiento correcto de las proteínas que entran en las vías secretorias de las proteínas blanco para su degradación. La calnexina se encuentra anclada a la membrana del retículo endoplásmico, por un dominio transmembranal, mientras que la calreticulina posee un péptido señal en el extremo C-terminal de retención al retículo endoplásmico, lo que le permite localizarse en el lumen de este organelo celular. La estructura del dominio luminal de la calnexina consiste de un dominio membranal globular con un plegamiento de tipo sándwich β similar al de las lectinas tipo L, además de un brazo que se proyecta fuera de la membrana que está formado por un giro conformado por segmentos polipeptídicos que se repiten. En el caso de la calreticulina este brazo es más pequeño. Los ligandos para la calnexina y la calreticulina son las glicoproteínas con N-glicosilaciones de tipo: $\text{Glc}_1\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$. Este tipo de glicanos es reconocido por las proteínas de esta familia mediante el dominio globular de sándwich β , que es donde se encuentra el sitio de reconocimiento a carbohidratos [30].

2.5.2. Lectinas de tipo M

Estas lectinas son miembros de la familia 47 del grupo estructural de las glicosil hidrolasas y están fuertemente relacionadas con las manosidasas del retículo endoplásmico y cis-Golgi. La función de estas proteínas se basa en el tráfico de las N-glicoproteínas, están relacionadas con las alfa-manosidasas, pero carecen de los residuos clave catalíticos, así como de un puente disulfuro que es esencial para la actividad catalítica. El dominio de reconocimiento a carbohidratos de esta lectina es una estructura de tipo barril conformada por hélices alfa y hebras beta, el cual tiene la capacidad de unir glicanos muy grandes de manosa unidos a glicoproteínas en el retículo endoplásmico [30].

Tabla 1. Clasificación de lectinas animales propuestas por Drickamer [30].

Clasificación	Ligandos que reconoce	Funciones
Calnexina	Clc1Man9	Plegamiento
Tipo M	Man8	Degradación de glicoproteínas
Tipo L	Varios	Plegamiento
Tipo P	Man6-fosfato, otros	Tráfico de glicoproteínas
Tipo C	Varios	Adhesión celular
Galectinas	β -galactosidos	Señalización
Tipo I (siglecs)	Ácido Siálico	Adhesión celular
Tipo R	Varios	Marcado de enzimas
Tipo caja F	NacGlc2	Degradación glicoproteínas desplegadas
Ficolinas	NacGlc, NacGal	Inmunidad innata
Tipo quitinasa	Quito oligosacáridos	Metabolismo del colágeno
Tipo F	Oligosacáridos con terminación en fucosa	Inmunidad innata
Intelectinas	Galactosa, galactofuranosa, pentosas	Inmunidad innata

2.5.3. Lectinas tipo L

El dominio de reconocimiento a carbohidratos de tipo L se encuentra en lectinas que se han aislado de semillas de leguminosas como es el caso de la Concanavalina A; sin embargo, se ha encontrado también, en proteínas homólogas de hongos y animales. Las lectinas tipo L, a pesar de encontrarse tanto en plantas como en animales, difieren en sus funciones biológicas. En animales se encuentran

comúnmente como proteínas ancladas a la membrana, encargándose de la clasificación de proteínas en los compartimientos luminales, mientras que en mamíferos y hongos estas lectinas participan en el tráfico de proteínas del retículo endoplásmico al aparato de Golgi. Un ejemplo de estas lectinas es la ERGIC-53, que es dependiente de calcio para el reconocimiento de glicanos ricos en manosa. En plantas estas lectinas participan en el desarrollo de las semillas, en los procesos de germinación y como proteínas de defensa. Este tipo de proteínas poseen un plegamiento de tipo sándwich β , que a su vez pueden contener un fragmento transmembranal que les permite anclarse a membranas del aparato de Golgi y llevar a cabo sus funciones de transporte de proteínas [30].

2.5.4. Lectinas tipo P

El dominio de reconocimiento a carbohidratos de tipo P fue identificado por primera vez en dos tipos de proteínas transmembranales: receptores de manosa 6-fosfato dependiente e independiente de cationes (CD-MPR y CI-MPR, respectivamente). El dominio de reconocimiento que presentan estas proteínas es conservado y está presente tanto en vertebrados como en organismos evolutivamente más ancestrales como los cordados y las ascidias. Proteínas homologas a éstas están presentes en invertebrados y en hongos, y son independientes de cationes, ya que en vertebrados solo se han identificado CD-MPR's. Las funciones biológicas equivalen de las identificadas en organismos no vertebrados, equivalen a las desempeñadas por CD-MPR y CI-MPR. Por ejemplo, los receptores de manosa 6-fosfato (MPRs) participan en el reconocimiento de proteínas del lisosoma, mientras que las proteínas de tipo-MPRs llevan a cabo una función similar en invertebrados y en hongos, con la diferencia que pueden reconocer a otras glicoproteínas, el reconocimiento de la manosa-6 fosfato esta mediado por la unión a Mn^{2+} en el sitio de reconocimiento en el caso de las MPRs que son dependientes de cationes [30].

2.5.5. Lectinas tipo C

El dominio de reconocimiento a carbohidratos dependiente de Ca^{2+} , se encuentra presente en diversas proteínas que llevan a cabo su función biológica reconociendo

carbohidratos en la superficie celular y en el exterior de la célula, otros módulos en estas proteínas pueden iniciar procesos biológicos como: adhesión celular, endocitosis y fijación complementaria. La unión de sus respectivos ligandos es mediada por el ion Ca^{2+} , el cual estabiliza la conformación local de la proteína formando enlaces de coordinación entre los residuos en la superficie de la proteína y los hidroxilos de los anillos de los azúcares. También los residuos de la lectina forman un enlace de coordinación con el Ca^{2+} pueden formar puentes de hidrogeno con los hidroxilos del carbohidrato [30].

2.5.6. Galectinas

Las galectinas son lectinas que poseen un DRC muy sencillo con una estructura de tipo sandwich α/β , similar a la topología que presentan los DRC de las lectinas tipo-L. Estas se caracterizan por reconocer principalmente galactósidos y cumplir con múltiples funciones fuera de la célula, ya que tienen la capacidad de unir glicoconjugados en la superficie celular y la matriz extracelular [30].

2.5.7. Lectinas tipo I (Siglecs)

Las lectinas tipo I unen carbohidratos a través de DRCs tipo Inmunoglobulina (DRCs tipo I). Estas lectinas también se consideran miembros de la familia de las siglecs, que cuentan con un DRC que presenta una arginina conservada, la cual es esencial para establecer las interacciones electrostáticas con su ligando, que es el ácido siálico. Se ha reportado un número muy pequeño de proteínas de tipo siglec que carecen de esta Arginina en el sitio de reconocimiento, tal es el caso de la siglec 12 de humano, en donde la unión está dirigida por dos residuos aromáticos que establecen interacciones de apilamiento de anillos con el azúcar [30].

2.5.8. Lectinas tipo R

El DRC de tipo R es el único dominio de lectinas animales que también se encuentra en procariontes, recibe el nombre del dominio B de la ricina, la cual pertenece a un grupo de lectinas tóxicas de origen vegetal. Este DRC une residuos de galactosa de las glicoproteínas que se encuentran en la superficie celular iniciando el transporte de

la ricina a través de la vía secretora. El dominio de tipo R tiene una estructura de trébol β en cuyos tres lóbulos (nombrados alfa, beta y gamma) se encuentran los sitios de reconocimiento a su ligando, cuyos residuos forman puentes de hidrógeno con los grupos hidroxilos del carbohidrato [30,31].

2.5.9. Lectinas tipo caja F

Estas proteínas son componentes clave del sistema enzimático del citoplasma que conjuga la ubiquitina y participan en la selección de las proteínas en el proceso de ubiquitinación. El DRC en estas lectinas está constituido de cinco hebras β anti paralelas formando un dominio tipo sándwich, en los extremos de este dominio se encuentran dos hélices α que corresponden a la región N y C- terminal; del lado opuesto de estas dos hélices se ubica el sitio de reconocimiento formado por dos asas que conectan las hebras β tres y cuatro. Este es específico para el disacárido quitobiosa formado por dos unidades de N-acetilglucosamina y la interacción con el ligando se da mediante apilamiento hidrofóbico con una de las unidades del disacárido, mientras que el grupo metilo del segundo interacciona con una cavidad hidrofóbica del sitio de la lectina [30].

2.5.10. Ficolinas

Las ficolinas son un grupo de lectinas que participan en eventos de inmunidad innata. La ubicación de estas proteínas dentro de la clasificación de las lectinas es controversial, ya que su dominio de unión a ligandos tiene la capacidad de reconocer grupos acetilo en carbohidratos (N-acetilglucosamina, N-acetilmanosa, N-acetilgalactosamina) y en otros ligandos (N-acetilglicina, N-acetilcisteína, acetilcolina). La unión a los azúcares no es dependiente de los anillos del carbohidrato, además, los azúcares que no se encuentran acetilados no son reconocidos por las ficolinas. La cadena polipeptídica de una ficolina consiste de una pequeña región N-terminal, un dominio de tipo colágeno, una región que actúa como un cuello y una región de tipo fibrinógeno. La región de tipo colágeno es responsable de la asociación de los monómeros de ficolina en trímeros, a su vez el N-terminal contiene residuos de cisteína que permite que la asociación se realice de forma covalente [30].

2.5.11. Lectinas tipo Quitinasa

Las lectinas tipo quitinasa son proteínas de mamíferos que pertenecen a la familia 18 de las glicosil hidrolasas, son solubles y pueden ser intracelulares o secretadas. Tienen una estructura de tipo barril $\alpha+\beta$ como el presente en la triosa fosfato isomerasa. La familia 18 de las glicosil hidrolasas incluye quitinasas y proteínas tipo quitinasa no enzimáticas que se han aislado de virus, bacterias, hongos, protozoarios e invertebrados, así como de animales superiores. Las quitinasas se adhieren a la quitina, la cual es una molécula estructural presente en hongos e invertebrados, por lo tanto el ligando que reconocen este tipo de lectinas son oligosacáridos formados por unidades de N-acetilglucosamina [30].

2.5.12. Lectinas tipo F

Las lectinas tipo F (fuclectinas) o proteínas de unión a fucosa poseen un dominio tipo F que comparten desde bacterias hasta vertebrados, sin embargo, presentan una distribución irregular a través de diferentes especies, Vasta y colaboradores sugieren que los genes de las lectinas tipo F han sido selectivamente perdidos a través de los linajes relacionados, lo que hace más difícil la búsqueda del ancestro en común de este dominio. Este dominio no se ha encontrado en mamíferos, aves o reptiles, pero se puede encontrar en bacterias y se sugiere que es debido a una transferencia horizontal de los metazoos. Los dominios de reconocimiento en este tipo de lectinas tienen un alto contenido de hebras β , como es el caso de la lectina de *Anguilla anguilla*, la cual es una fuclectina que se ha empleado principalmente para la tipificación de sangre, ya que reconoce de forma específica los residuos terminales de fucosa en grupos sanguíneos humanos. El DRC de esta lectina posee una estructura de tipo barril β , un lado del barril contiene cinco asas que forman una especie de anillo donde se ubica el sitio de unión a fucosa que está cargado positivamente, un ion Ca^{2+} , se une en este subdominio de asas para estabilizar esta región tan flexible y permitir la formación de oligómeros, estabilizando la estructura cuaternaria [30].

2.5.13. Intelectinas

Las intelectinas se han identificado en cordados como la rana *Xenopus laevis* y las ascidias. Este tipo de lectinas posee por lo regular un dominio simple de tipo intelectina, con una longitud variable, un N-terminal no conservado y una extensión que contiene un péptido señal en el C-terminal para ser secretada fuera de la célula. El DRC de intelectina no está relacionado en secuencia con alguna otra lectina con excepción de 45 residuos del N-terminal, los cuales presentan similitud con el dominio globular de fibrinógeno, en estos dominios de reconocimiento a carbohidrato se ha reportado que presentan dependencia por Ca^{++} y reconocimiento por diferentes monosacáridos como galactosa y algunas otras pentosas [30].

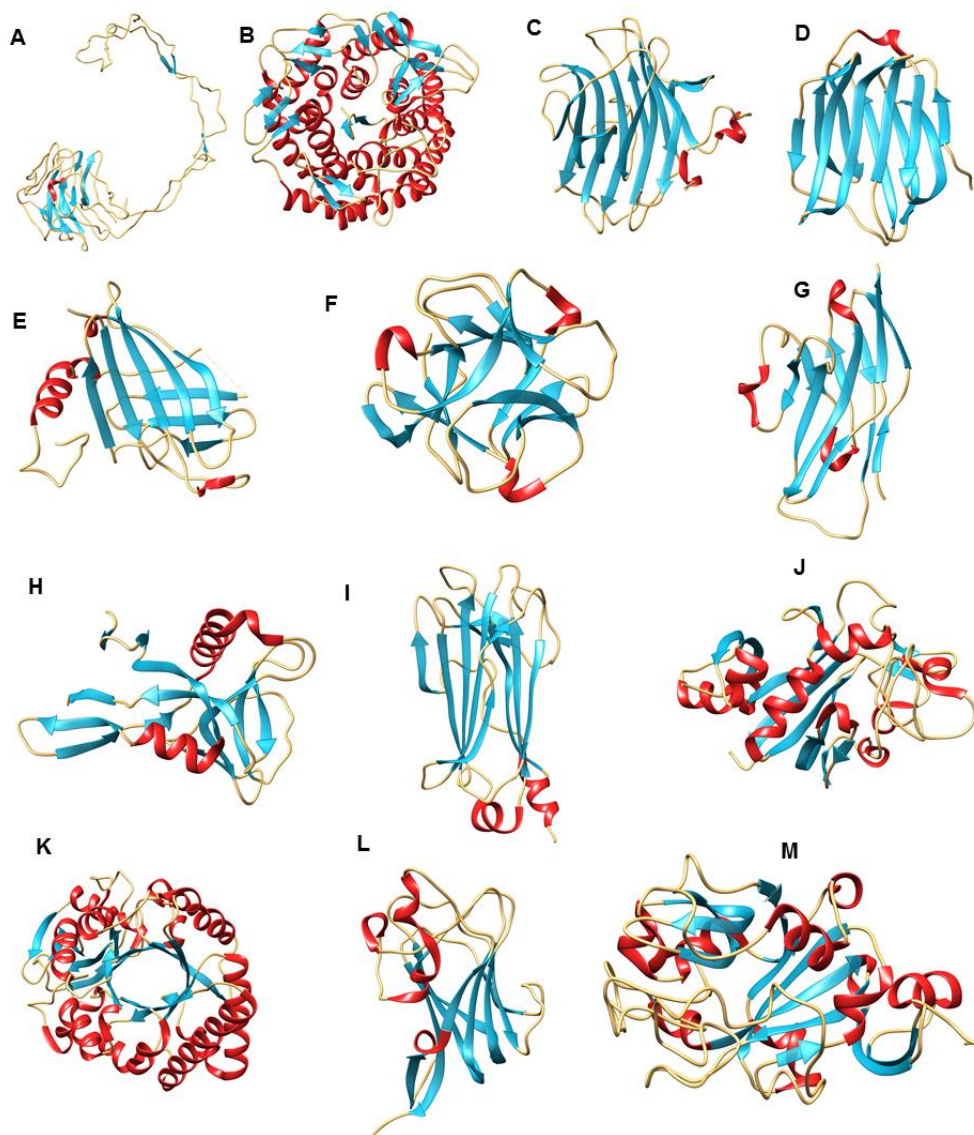


Figura 1. Dominios de reconocimiento a carbohidratos de acuerdo a la clasificación propuesta por Drickamer en 1998. A) dominio de tipo calnexina de *Canis lupus*, B) Dominio tipo M de *Homo sapiens*, C) Dominio tipo L de *Rattus norvegicus*, D) Dominio de tipo Galectina de *Homo sapiens*, E) Dominio tipo P de *Bos taurus*, F) Dominio de tipo R de *Marasmius oreades*, G) Dominio tipo I de *Mus musculus* H) Dominio tipo C de *Cucumaria echinata*, I) Dominio de tipo caja F de *Mus musculus*, J) Dominio de ficolina de *Tachypleus tridentatus*, K) dominio de tipo quitinasa de *Mus musculus*, L) Dominio tipo F de *Anguilla anguilla*, M) dominio de tipo Intelectina de *Homo sapiens*. Con códigos PDB 1JHN, 1X9D, 2A6V, 1KJL, 1M6P, 2HIO, 2BVE, 3ALS, 1UMI, 1JC9, 1E9L, 1K12 y 4WMQ respectivamente.

2.6. Aplicaciones de las lectinas de origen marino

Las lectinas son útiles en el estudio de los mecanismos de defensa de los invertebrados marinos, ya que es poco lo que se conoce sobre las vías empleadas en la inmunidad innata en este tipo de organismos. Los invertebrados marinos conforman un modelo de estudio interesante en el área de inmunotoxicidad donde constantemente son utilizados como biosensores al responder ante la presencia de un determinado antígeno en diversos ecosistemas acuáticos; tal es el caso del estudio de la presencia de metales pesados o una posible respuesta inmune ante parásitos y plagas como los realizados en *Mytilus edulis* donde bajo condiciones controladas se estudia la inmunomodulación de la respuesta inmune [17,32]. Además, muchas de estas especies son de interés comercial, por lo que el estudio de proteínas con actividades antimicrobianas resulta útil en una posible aplicación en la prevención de infecciones en cultivos marinos.

En la aplicación de las lectinas como moléculas antibacterianas se ha hecho énfasis en las lectinas de algas, ya que comparadas con lectinas vegetales poseen masas moleculares pequeñas, lo que las hace excelentes candidatos para efectuar pruebas *in vivo* debido a su baja antigenicidad, además, presentan una fuerte actividad inhibitoria en diversas cepas patógenas del género *Aeromonas*. Esta particularidad como candidatos en pruebas *in vivo* no se limita solo a lectinas de algas, también se ha reportado la inhibición de cepas patógenas por la lectina del invertebrado *Tachypleus tridentatus*, que además de inhibir bacterias como *Escherichia*, *Klebsiella* y *Salmonella*, tiene la ventaja de ser una lectina de baja masa molecular (8 kDa), lo que la hace una molécula con potencial para ser probada en diversos estudios [11].

Las aplicaciones médicas de lectinas de origen marino no solo se limitan al control de microorganismos, sino que debido al importante papel que desempeñan en la comunicación celular, también se ha estudiado su capacidad para regenerar tejido cutáneo, como se observó en una lectina del alga roja *Bryothammion seaforthii*. Esta lectina se aplicó mediante un tratamiento tópico de 12 días en ratones a los que previamente se les hicieron heridas cutáneas. Se observó una disminución en el área afectada, resultado que se relacionó con la estimulación en la producción de queratina [33].

3. ANTECEDENTES

3.1. Lectinas de invertebrados marinos

En invertebrados se han identificado lectinas de las familias: tipo C, tipo L, tipo P, tipo R, calnexina, intelectinas, galectinas y las tipo quitinasa. En invertebrados marinos se han identificado las mismas familias con excepción de las tipo quitinasa que sólo se han descrito en *Drosophila*. Adicionalmente, se han reportado lectinas que no pertenecen a ninguna de las familias reportadas, tal es el caso de las aisladas del cangrejo *Tachypleus tridentatus*, las cuales están involucradas en los procesos de coagulación de la hemolinfa como mecanismo de defensa [25,34]. También se han aislado lectinas de otros organismos marinos, de las que no se conoce su secuencia o su estructura terciaria y solo se han reportado sus especificidades, tal es el caso de la lectina de *Octopus maya*, una lectina oligomérica de 66 kDa, para la cual se reportó especificidad por metil- α y β galactosidos sin dependencia por cationes divalentes [35]. En invertebrados marinos las lectinas juegan un papel importante en la respuesta innata reconociendo y uniendo de forma específica diferentes carbohidratos que están presentes en las membranas de patógenos a través de sus DRC. Una característica interesante es su capacidad de formar oligómeros, tal es el caso de la lectina del crustáceo *Macrobrachium rosenbergii*, la cual se determinó que es un homodímero de 19 kDa, tiene especificidad por ácido siálico y la presencia de cationes divalentes es esencial para que lleve a cabo su actividad aglutinante. Además, en presencia de agentes reductores como ditiotreitól pierde por completo su actividad, lo que sugiere que el oligómero es estabilizado por puentes disulfuro. También, se encontró que tiene la capacidad de aglutinar bacterias como *Aeromonas sp.* a una concentración de 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de proteína por cada 2×10^5 células [36]. Por otro lado, las lectinas aisladas del pepino de mar *Cucumaria echinata*, se sabe que participan en mecanismos de inmunidad innata mediante el reconocimiento de α -lactosidos, Todas las lectinas caracterizadas de este organismo (CEL-I, CEL-II, CEL-III y CEL-IV) presentan dependencia por iones Ca^{++} y presentan actividad hemaglutinante frente a eritrocitos

de conejo [37,38], CEL-III es el único miembro de esta familia capaz de causar hemólisis en ensayos de eritroaglutinación [28]. En organismos de la familia *Mytilidae* se han aislado lectinas con masas cercanas a los 17 kDa que tienen la capacidad de aglutinar eritrocitos de todos los tipos sanguíneos humanos. Con base en su especificidad por N-acetilgalactosamina y galactosa se ubicarían dentro de la familia de las galectinas, sin embargo el análisis de la secuencias no mostró identidad con galectinas o alguna lectina reportada con anterioridad [39-41]. En vertebrados sin mandíbula como la *Lamprea japónica* se identificó y aisló de su suero una lectina perteneciente a la familia de las intelectinas con una secuencia de 334 aminoácidos, que además presentó homología con otras intelectinas de mamíferos y organismos marinos. Esta lectina tiene la capacidad de oligomerizarse y formar tetrámeros, mecanismo que permite aglutinar bacterias Gram-positivas, bacterias Gram-negativas y hongos, lo que sugiere juega un papel importante en la defensa contra patógenos del sistema de circulación de la lamprea. Además, mediante experimentos de interacción se encontró que esta intelectina era competitivamente inhibida con proteína de unión G en presencia de inmunoglobulinas, indicando que la región Fc de la Ig y la intelectina se unen a la proteína G en el mismo sitio, lo que sugiere que la estructura terciaria de ambas proteínas es similar, aún más importante es resaltar que en estos organismos carentes de un sistema de defensa adaptativo participan moléculas como esta intelectina capaz de llevar a cabo funciones similares a las de las inmunoglobulinas [42].

3.2. Oligomerización de proteínas

La oligomerización de proteínas se define como la asociación de dos o más cadenas polipeptídicas. Este comportamiento puede ser considerado un avance desde la perspectiva evolutiva, ya que está relacionado en el incremento de la función y regulación biológica, regulación alostérica y la formación de complejos [43]. Las proteínas oligoméricas pueden ser clasificadas como homo oligoméricas (conformadas por las mismas subunidades) o hetero oligoméricas (por subunidades diferentes), la abundancia de este tipo de proteínas es muy alta, ya que se estima que un 35 % de las proteínas de la célula son oligoméricas y el promedio de subunidades

que se presenta con mayor frecuencia son los tetrámeros. La mayoría de las estructuras de proteínas oligoméricas depositadas en el PDB son principalmente homo-oligómeros y frecuentemente presentan una simetría cíclica, dihedral o cúbica cuya asociación entre subunidades puede variar en fuerza y duración [43]. Se ha encontrado que algunas proteínas solo se presentan en estado oligomérico, lo que generalmente se relaciona con una constante de disociación en el intervalo nanomolar. Otras proteínas tienen una tendencia a asociarse, dependiendo de las condiciones del medio como la concentración, la temperatura y el pH, por lo que sus constantes de disociación están en el orden micromolar o milimolar [43]. Se sabe que muchas veces la oligomerización es un proceso dinámico en respuesta a estímulos como el cambio en un nucleótido de unión, de hidrólisis o estado de fosforilación, algunos cambios en el estado oligomérico pueden generar cambios dramáticos en la afinidad de las subunidades [43].

3.3. Oligomerización en lectinas de invertebrados marinos

La oligomerización de lectinas es un proceso les puede conferir ventajas estructurales, permitiéndoles regular de forma eficiente su función biológica. Estos mecanismos pueden estar mediados por diversas interacciones como son los puentes disulfuro, interacciones electrostáticas e interacciones hidrofóbicas, y pueden favorecer la disponibilidad de más sitios de reconocimiento a carbohidratos facilitando la interacción con los azúcares de las membranas de los patógenos [21]. En algunos casos estos mecanismos involucran cambios conformacionales en donde se exponen regiones hidrofóbicas que permiten la formación de oligómeros. Tal es el caso de la lectina CEL-III del pepino de mar *Cucumaria echinata* que, mediante un mecanismo de oligomerización desencadenado por el reconocimiento de su ligando (N-acetilgalactosamina), sufre un cambio conformacional que ocasiona la exposición de residuos hidrofóbicos al desplegar por completo las hélices que lo conforman, formando interacciones beta-beta con las hélices desplegadas de los demás monómeros que se encuentran también reconociendo azúcares en la membrana. Esto último le permite la formación de un poro constituido por siete subunidades y de esta forma permitiéndole penetrar la bicapa lipídica de las membranas de los eritrocitos

provocando hemólisis [28,38,44]. Terada y colaboradores estudiaron la oligomerización de una lectina del bivalvo *Mytilus galloprovincialis* (MGL) la cual tiene actividad citotóxica contra líneas celulares de cáncer que expresan globotriaosilceramida en la superficie [40,45]. Se encontró mediante centrifugación analítica que esta lectina tiene una fuerte tendencia a formar dímeros en solución, el análisis de la estructura cristalográfica mostró que los residuos Phe 93 y Phe 94 son los responsables de la formación del dímero, por lo que decidieron mutar dichos residuo (F93D-F94S) observando que la lectina ya no era capaz de formar dímeros y que los monómeros formados presentaban actividad aglutinante diez veces menor, además de no presentar actividad citotóxica frente a las células de linfoma Burkitt. Este resultado sugirió la importancia de la oligomerización en la actividad biológica de la lectina y sugiere que la presencia de seis sitios de reconocimiento favorecen su multivalencia siendo un hecho relevante para su actividad [45]. La estructura cristalográfica también mostró que MGL tiene un plegamiento de trébol β con un sitio de reconocimiento único en cuya unión con el ligando no están involucradas interacciones de apilamiento de anillos. Estas características están limitadas a un pequeño grupo de proteínas que han sido reportadas recientemente y que se consideran parte de una nueva familia de lectinas: la lectina de *Mytilus galloprovincialis* (MGL), de *Crenomytilus grayanus* (CGL) y de *Mytilus Trossolus* (MTL) y nuestro objeto de estudio la lectina de *Mytilus californianus* (MCL) [41,45-48], la cual se considera un miembro más de esta nueva familia de lectinas. En este estudio se hará referencia a las lectinas de esta nueva familia por medio de estas siglas.

3.4. Características de la nueva familia de lectinas presentes en la familia Mytilidae

En invertebrados marinos existen diversas lectinas reportadas de las que se describen características importantes como especificidad, actividad hemaglutinante y aún más importante el papel que desempeñan en la función biológica, los DRC's de todas éstas entran en la clasificación propuesta por Drickamer con la particularidad de que poseen dominios adicionales, tal es el caso de la lectina de *Mytilus edulis* (MeL) la cual posee

un dominio de tipo C con uno adicional de unión a fibrinógeno [49]. Si bien la clasificación anterior permite ubicar a la mayoría de las lectinas en diferentes familias de acuerdo a sus DRCs, no es suficiente para ubicar a proteínas que comparten características con diversas familias de lectinas y que no es posible ubicarlas en ninguna de las familias propuestas. Tal es el caso de MGL que es una lectina que posee una secuencia de aminoácidos con un dominio de reconocimiento nuevo, el cual no tiene identidad con ninguno de los reportados a la fecha, por lo que se considera que pertenece a una nueva familia [40], su estructura cristalográfica (PDB 3WMV) muestra un plegamiento de tipo trébol β (Figura 2) característico de la familia de lectinas tipo R [45], pero no comparte identidad significativa con éstas. El primer miembro aislado fue CGL, que poseía una masa cercana a los 18 kDa, tiene especificidad por GalNac y no tiene dependencia por iones divalentes. Posteriormente se obtuvo la secuencia completa de aminoácidos mediante la secuenciación de cDNA, en donde se determinó que estaba compuesta de 150 aminoácidos conteniendo tres repeticiones de segmentos con más de un 73 % de identidad, sugiriendo que cada uno de ellos corresponde a un dominio de reconocimiento a carbohidratos, ya que el modelo generado a partir de la secuencia mostraba un plegamiento de tipo trébol β en donde de forma simétrica se sugieren tres sitios de unión. También se demostró la participación de esta lectina en la inmunidad innata, ya que fue capaz de inhibir el crecimiento de bacterias Gram (+) y Gram (-), así como el crecimiento de hifas en conidios de hongos [39,47]. Las mismas características a nivel de estructura primaria fueron encontradas en MGL, de la cual se determinó su secuencia de aminoácidos por degradación de Edman, observando que esta lectina es capaz de inhibir el crecimiento de células de linfoma que expresan globotriaosilceramida [40]. El efecto de esta lectina en la inmunidad innata fue comprobado después con pruebas de actividad antimicrobiana donde se encontró que al igual que CGL, inhibe el crecimiento de bacterias Gram (+) y Gram (-) [50]. Las estructuras cristalográficas reportadas en su forma apo (PDB 3WMU), así como en complejo con su ligando (PDB 3WMV) confirman que presenta tres sitios de unión por cada subunidad. La estructura terciaria también reveló que el plegamiento es similar al que presenta el dominio B de la ricina, con la particularidad de que se trata de un sitio de reconocimiento único, ya que la interacción

con el ligando se da solo mediante interacciones electrostáticas, mediadas por histidinas [45,46]. El tercer miembro reportado de esta familia emergente es MTL que comparte 89% de identidad con CGL y MGL, también presentó actividad antimicrobiana y antifúngica, por lo que su función biológica también está relacionada con la respuesta inmune del organismo [41].

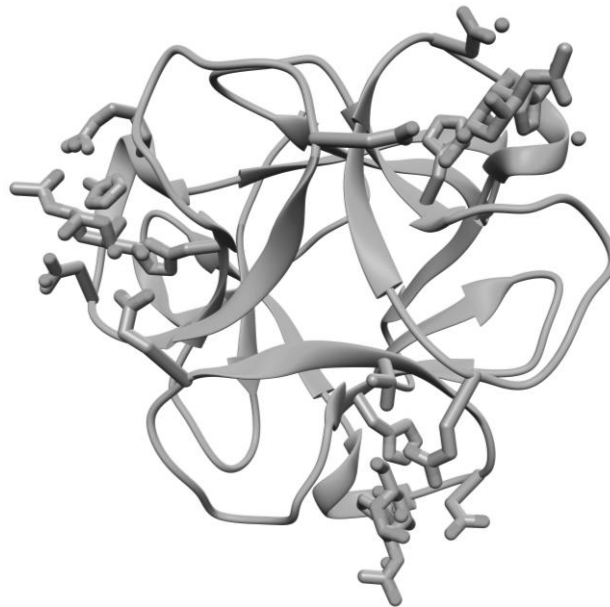


Figura 2. Plegamiento de trébol β presente en una nueva familia de lectinas. En cada hoja del trébol se encuentra un sitio de reconocimiento de carbohidratos. Los miembros de esta nueva familia se han identificado en moluscos de la familia Mytilidae. En la figura se muestra a la lectina de *M. galloprovincialis* (3WMV) [45].

3.5. Descripción del Mejillón *Mytilus californianus*

Los mejillones son moluscos bivalvos que viven adheridos a las rocas o unos con otros mediante una estructura filamentosa conocida como biso. Son organismos filtradores activos que llegan a filtrar hasta 8 litros por hora. Estos organismos se alimentan de partículas con tamaños de 2 a 8 μm de diámetro provenientes de materia orgánica (detritus), fitoplancton (microalgas) y en menor medida de bacterias. También son capaces de absorber directamente compuestos orgánicos que se encuentran disueltos

en el agua de mar como aminoácidos y azúcares, los cuales son absorbidos en las branquias antes de ser trasladados al manto y a la glándula digestiva [51].

El mejillón *Mytilus californianus* (Figura 3) es nativo de la costa oeste de Norteamérica, se ubica desde las Islas Aleutianas en Alaska hasta la isla Socorro en el Norte de México. Estos organismos se ubican en la zona intermareal y están expuestos a temperaturas que van de cerca del punto de congelación del agua en el invierno hasta los 40 °C en el verano. A diferencia de otras especies de mejillones, *M. californianus* está expuesto a un intervalo de temperaturas más variable [52]. Según el Departamento de Pesca y Acuicultura de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) *M. californianus* es una de las especies de moluscos de gran importancia comercial en México junto con las especies: *M. edulis* y *M. galloprovincialis*, especies que se cultivan en el norte de México.

Reino: Animalia

Filo: Mollusca

Clase: Bivalvia

Orden: Mytiloida

Familia: Mytilidae

Género: *Mytilus*

Especie: *Mytilus californianus*



Figura 3. Clasificación taxonómica del mejillón, *Mytilus californianus*.

4. JUSTIFICACIÓN

La oligomerización de proteínas es un fenómeno de asociación que se presenta de forma recurrente en las proteínas y que puede conferirles ventajas como el incremento en la actividad y una mayor estabilidad frente a diferentes cambios en el medio, como el pH o la temperatura. Además, es un mecanismo que algunas proteínas utilizan para regular su especificidad y función biológica. En el caso de lectinas de invertebrados marinos, la oligomerización desempeña un papel importante en la actividad biológica, en donde la respuesta inmune innata se ve favorecida por la formación de oligómeros que participan activamente en la neutralización de patógenos. Estas proteínas poseen una especificidad muy alta, que puede verse incrementada o alterada por la formación de nuevos sitios de reconocimiento, lo que es de suma importancia, ya que tienen un campo de aplicación muy grande.

Por lo anterior, es de suma importancia estudiar los determinantes estructurales que ocasionan la oligomerización en específico de una lectina obtenida del mejillón *Mytilus californianus*, cuya caracterización podrá permitir inducir una asociación controlada de dicha proteína para favorecer la formación de diversos estados oligoméricos con diferentes actividades biológicas, que en un momento dado puedan ser explotadas en campos como la medicina o la biotecnología. El estudio de los determinantes que ocasionan este comportamiento de asociación permitirá entender cómo es que ocurren, qué los desencadena, como se pueden controlar y que implicaciones tienen en diversos procesos biológicos.

5. HIPÓTESIS

La estabilidad, especificidad y actividad biológica de una lectina de *M. californianus* dependerán del estado oligomérico en el que se encuentre.

6. OBJETIVOS

6.1. Objetivo general

Analizar los mecanismos de oligomerización de una lectina y una de sus isoformas presentes en *Mytilus californianus* y evaluar su efecto en su estabilidad, especificidad y actividad biológica

6.2. Objetivos específicos

- Purificar y caracterizar a una lectina de *M. californianus*.
- Obtener de forma recombinante en *E. coli* a una isoforma de esta lectina
- Con ambas lectinas estudiar:
 - El comportamiento en solución y su tendencia a formar oligómeros
 - La estabilidad, especificidad y actividad de los oligómeros previamente identificados en solución
 - La termodinámica de unión del ligando con la lectina
- Determinar las estructuras de las lectinas en ausencia y en presencia de los ligandos que reconocen y encontrar los determinantes estructurales que desencadenan su oligomerización.
- Analizar su actividad bactericida, antifúngica y anticancerígena

7. METODOS

7.1. Determinación de la actividad de la lectina de *M. californianus*

Algunas lectinas marinas poseen por los menos dos sitios de reconocimiento a carbohidratos, lo que les permite formar complejos entrecruzados y aglutinar células al reconocer de manera específica a los carbohidratos de la superficie celular. Aprovechando esta característica, la actividad de MCL se determinó mediante pruebas de hemaglutinación de eritrocitos de conejo formalinizados (ECF) [53].

7.1.1. Formalización de eritrocitos de conejo

Para sensibilizar y hacer más resistentes a los eritrocitos de conejo que se utilizaron en las pruebas de actividad, éstos se formalizaron siguiendo el protocolo reportado por Fragkiadakis [53]. Se colectó sangre de conejo en una solución de NaCl 0.9% y se centrifugó a 3,000 x *g* por 20 min. Se realizaron varios lavados con la solución de NaCl hasta obtener un sobrenadante transparente.

Los eritrocitos se suspendieron en un amortiguador de fosfatos 50 mM pH 7.4, 150mM NaCl (PBS) para obtener una solución 20 % v/v. Por cada 100 mL de esta solución de eritrocitos, se prepararon 25 mL de formalina (Formaldehído 37 %) a pH 5.0 usando un amortiguador de fosfatos 0.7 M, pH 7.0. Esta solución fue colocada en una bolsa de diálisis con tamaño de corte de 12.5 kDa. La bolsa se sumergió en los eritrocitos y se dejó interaccionar por 12 h a 4°C con agitación suave. Posteriormente, la bolsa se perforó y se liberó el formol restante dejando interaccionar la solución de formaldehído por 36 h más a 4°C con agitación suave.

Después de la fijación, los ECF se centrifugaron a 3,000 x *g*, durante 5 min a 4°C y se lavaron exhaustivamente con una solución 0.9 % NaCl para eliminar los residuos de formaldehído. Con el fin de eliminar los grupos aldehídos libres de la membrana celular, los ECF (20 % v/v) se suspendieron en el amortiguador de fosfatos 50 mM pH 7.4, 150mM NaCl con 2 % w/v de BSA y se incubaron 24 h a 4°C con agitación suave. Finalmente, los eritrocitos fueron centrifugados a 3,000 x *g*, por 5 min a 4°C y lavados exhaustivamente con la solución de 0.9% NaCl y 0.05 % de azida de sodio y se almacenaron a 4°C hasta su uso.

7.1.2 Ensayos de eritroaglutinación

Los ensayos de actividad se realizaron en placas de 96 micro pozos con fondo en forma de "U", realizando diluciones seriadas 1:2, esto es, en cada pozo se colocaron 50µL de PBS; posteriormente, en el primer pozo de cada serie se colocaron 50 µL de la disolución de proteína, se mezcló con el amortiguador y posteriormente se tomaron 50 µL que fueron trasladados al segundo pozo, de nuevo se mezcló con el amortiguador ya presente y se tomaron otros 50µL para llevarlos al tercer pozo y así sucesivamente hasta completar la fila de 12 pozos o hasta donde fuese necesario para agotar la actividad [54]. Posteriormente, se agregaron 50 µL de la solución de ECF al 20%, se agitaron brevemente las cajas, se taparon y se dejaron a temperatura ambiente por 1.5 h, transcurrido ese tiempo se examinaron visualmente en busca de hemaglutinación. Un patrón positivo de sedimentación de los eritrocitos que indica hemaglutinación se observa como una capa uniforme en la base de los pozos, mientras que un patrón negativo, que indica que no hay actividad hemaglutinante es un agregado de eritrocitos al fondo de los pozos rodeados de una zona clara y concéntrica de igual tamaño que la del blanco negativo de las pruebas. Las pruebas se realizaron por triplicado y se reportó un promedio. Se utilizó como control positivo la aglutinina de germen de trigo (WGA) y como control negativo el amortiguador de fosfatos.

La actividad hemaglutinante se define como el recíproco del título, que corresponde al factor de dilución (número de pozo) más alto de proteína que presenta hemaglutinación. La actividad específica se expresó como U/µg de proteína [23].

7.2. Cuantificación de proteína con el método del ácido bicinonínico

Se utilizó el método de Smith *et al.*, [55], el cual emplea el reactivo BCA Protein Assay Reagent (PIERCE), que es muy sensible en la determinación espectrofotométrica de la concentración de proteína en soluciones acuosas. Este sistema de reactivos combina la reacción de proteínas con Cu^{2+} en un medio alcalino (produciendo Cu^{1+}), con un reactivo altamente selectivo y sensible de detección para Cu^{1+} llamado ácido

bicinconínico. Este reactivo es estable y compatible con detergentes iónicos y no iónicos. El color púrpura del producto de la reacción es formado por la interacción de dos moléculas de BCA con un ion cuproso (Cu^{1+}), este es soluble en agua y exhibe una fuerte absorbancia a 562 nm. La cantidad de proteína contenida en la muestra se determinó interpolando el dato de absorbancia en una curva tipo elaborada con estándares de albúmina de bovino a diferentes concentraciones. Para la elaboración de la curva de calibración se siguieron los siguientes pasos:

Se colocaron 50 μL de cada estándar en tubos apropiadamente marcados, utilizando 50 μL del diluyente como blanco.

Se adicionó a cada tubo 1mL del reactivo de trabajo (El reactivo de trabajo se prepara mezclando 50 partes del reactivo A del kit de BCA con una parte del reactivo B. Este reactivo se debe preparar el día de su uso). Se mezcló e incubó por 30 min a 60°C . Se dejó enfriar las muestras y se leyó la absorbancia a 562 nm, este método permite detectar de 5 a 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de proteína.

Una vez que se determinó el coeficiente de extinción teórico a través de la secuencia de aminoácidos, la concentración de proteína fue calculada usando este último

7.3. Purificación de la lectina de *M. californianus*

Se obtuvieron organismos frescos de Baja California, México, los cuales fueron identificados taxonómicamente por la Dra. Martha Reguero Reza en el Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, diez organismos de *M. californianus* fueron extraídos de las conchas y homogenizados en 250 mL de amortiguador PBS; este extracto se centrifugó a $10000 \times g$ por 20 min. en una centrifuga Beckman Coulter con un rotor JA-14, el sobrenadante obtenido se centrifugó nuevamente a $15000 \times g$ en un rotor JA-17 y el sobrenadante nuevo se aplicó a una columna de afinidad de α -Lactosa-agarosa (Sigma Aldrich), previamente equilibrada con el mismo amortiguador. Para eluir a la lectina se utilizó D (+) galactosa a una concentración de 250 mM, preparada en el mismo amortiguador de fosfatos.

7.4. Determinación de la pureza de la lectina

7.4.1. Electroforesis SDS-PAGE

Después de eluir a la lectina de la resina de afinidad, se evaluó la pureza de la misma mediante una electroforesis en condiciones desnaturalizantes en un gel de poliacrilamida al 12%. La lectina se desnaturalizó y redujo en presencia de una solución amortiguadora 2X (glicerol 20 mL, 2-mercaptoetanol 10 mL, SDS 5 g, tris base 1.51 g, azul de bromofenol 0.01 g y agua para aforar a 100 mL). La separación se realizó utilizando una corriente constante de 90 V por 30 min y después una hora a 120 V en amortiguador de electroforesis 1X (Tris base 3.025 g, 30.25 g, glicina 14.4 g, 144 g, SDS 1.0 g, aforado a 1L con agua destilada, para tener un amortiguador de electroforesis 10X), en un sistema electroforético de BioRad® (Mini-PROTEAN®). Como referencia de migración se utilizó el marcador de masa molecular de 200 kDa a 6.5 kDa (SDS-PAGE Molecular weight Standards BioRad®, Broad Range No. 161-0317). La visualización de las bandas proteicas se realizó mediante una tinción con nitrato de plata.

7.4.2. Espectrometría de masas MALDI-TOF

Un segundo criterio que se utilizó para verificar la pureza de la lectina fue la espectrometría de masas MALDI TOF (matrix assisted laser desorption/ionization, desorción/ionización laser asistida por una matriz) en un equipo Microflex Bruker daltonics, misma que nos permitió determinar la masa molecular de la proteína.

La espectrometría de masas MALDI TOF es un método de ionización suave que es utilizado en la determinación de masas de moléculas grandes como proteínas. Se distingue porque la muestra está embebida en una matriz química en exceso, lo que facilita la producción de iones intactos en fase gaseosa de compuestos, debido a que absorbe la energía de la luz del láser que se usa como fuente de desorción o ionización, con lo que es posible observar el espectro que caracteriza la relación masa/carga de la muestra [56]. La matriz utilizada fue una solución saturada de ácido sinapínico disuelto en una solución compuesta de 30% acetonitrilo, 70% agua y 0.1% de ácido trifluoroacético v/v.

7.5. Determinación de la especificidad de la lectina de *M. californianus* y su isoforma

Con el fin de determinar la especificidad por carbohidratos de MCL, se realizaron pruebas de inhibición con 60 azúcares entre monosacáridos, disacáridos, oligosacáridos y polisacáridos e identificamos a los carbohidratos que eran capaces de inhibir la actividad hemaglutinante sobre los ECF. Para este ensayo se utilizaron placas de 96 micro pozos en los que se colocaron 25 μL de amortiguador PBS. En el primer pozo de cada serie se colocaron 25 μL de los distintos carbohidratos y se realizaron diluciones seriadas 1:2 de los mismos hasta llegar a 12 diluciones. Las concentraciones para los monosacáridos y oligosacáridos fueron de 250mM, mientras que para los polisacáridos se utilizaron concentraciones desde 0.1 a 1%. Se agregaron 10 μL de la lectina purificada a una concentración de 55 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Con estas soluciones, las cajas se taparon y se sometieron a agitación suave a temperatura ambiente por 1 hora. Al concluir el tiempo de incubación, se adicionó a cada pozo 25 μL de la solución de ECF al 20%.

Al igual que en las pruebas de actividad hemaglutinante se preparó un control positivo y negativo para cada azúcar, el positivo contenía 35 μL del amortiguador, 25 μL de cada dilución de azúcar a probar y 25 μL de EFC al 20%, mientras que el negativo contenía 50 μL del amortiguador, 10 μL de la solución de lectina y 25 μL de EFC. Los ensayos se realizaron por triplicado.

Para todos los azúcares probados, se consideró que la dilución mínima inhibitoria de la actividad era el último pozo en el que visualmente el sedimento de eritrocitos al fondo de los pozos y la zona clara y concéntrica alrededor de estos era de igual tamaño que la del blanco positivo; la concentración mínima inhibitoria (CMI) se definió como la concentración mínima en la que se observó inhibición de la actividad hemaglutinante

7.6. Determinación de la estabilidad en relación a la temperatura y el pH

La estabilidad de la lectina se evaluó a diferentes temperaturas. Se incubaron alícuotas de la lectina purificada por 1 hora a 4°C, 18°C, 25°C, 37°C, 40°C, 45°C, 50°C y 60°C, transcurrido ese tiempo se midió la actividad de cada alícuota siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 7.1.2

7.7. Evaluación de la estabilidad por termofluorescencia

El ensayo de estabilidad térmica (estabilidad estructural) de proteínas basada en la fluorescencia o fluorimetría diferencial de barrido (Differential Scanning Fluorimetry, DSF) aprovecha el hecho de que la fluorescencia de fluoróforos que se unen a proteínas de manera no específica se incrementa cuando la hidrofobicidad del medio aumenta. En esta técnica, el fluoróforo interactúa con las regiones hidrofóbicas expuestas generadas por el desplegamiento parcial o total de la proteína. Esto da como resultado una curva sigmoideal aguda, que permite determinar la temperatura de fusión (T_m) de la proteína, la cual corresponde al valor de temperatura a la que el 50% de las moléculas de proteína se encuentran plegadas y el 50% desplegadas (Figura 4). Esta técnica permite evaluar la estabilidad térmica de una proteína bajo diferentes condiciones de pH, sales, aditivos, ligandos, agentes estabilizantes y solubilizantes [57].

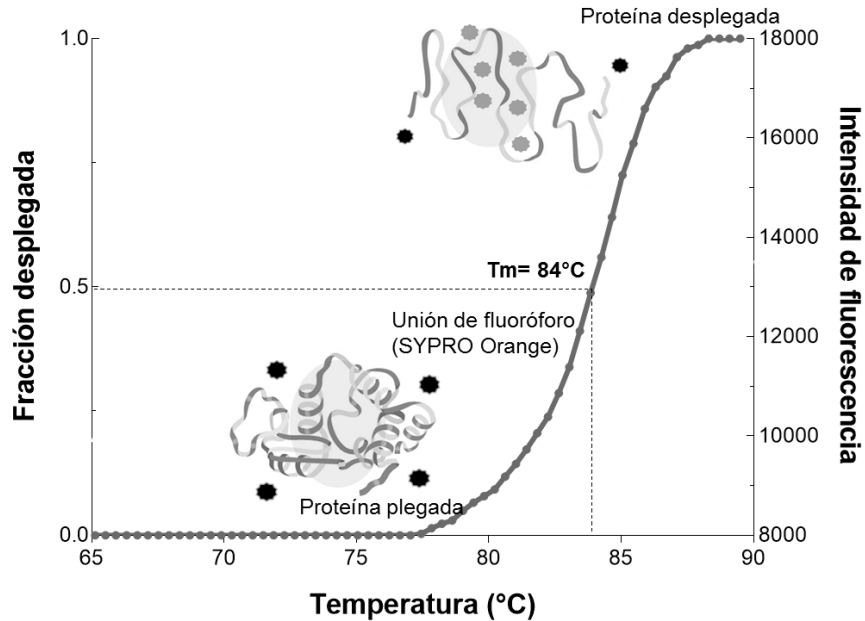


Figura 4. Esquema del ensayo de desnaturalización térmica utilizando termofluorescencia.

Para evaluar la estabilidad térmica de la proteína se utilizó 1 mL de la enzima a una concentración de 0.15 mg/mL, a la que se le adicionó 1 μ L del fluoróforo SYPRO® Orange (a una dilución final 1:1000), que al unirse a las regiones hidrofóbicas de la proteína presenta una máxima emisión a 570 nm [57]. Se colocaron 10 μ L de la proteína en presencia del fluoróforo en cada pozo de una placa de 96 (MicroAmp Fast 96-well reaction plate 0.1 mL; Applied biosystems), y a cada uno de ellos se le adicionaron 10 μ L de las soluciones evaluadas. La placa se selló con una película ópticamente inerte (Greiner VIEWseal de Jena Bioscience), para posteriormente centrifugarla a 300 rpm por 2 min a 25 °C y colocarla en un equipo de PCR en tiempo real (Applied Biosystems StepOne) siguiendo un programa de inicio de 25°C por 2 min, seguido del incremento de temperatura hasta 98°C en un lapso de un minuto, para mantenerse ahí por 15 seg. Con el fin de encontrar condiciones óptimas de estabilidad se evaluó el efecto del pH y sales amortiguadoras, utilizando el kit de pH de Rigaku (Rigaku-Wizard pH buffer screen), además, se evaluó el efecto de la galactosa en dicha estabilidad. Después de obtener el fluorograma de la señal de fluorescencia cruda en función de la temperatura para cada condición, se determinó el intervalo de

temperatura en el que ocurre la transición del estado nativo al desnaturalizado, el cual se caracteriza por tener una forma sigmoide. Para esto, se utilizó el programa StepOne v2.3 (Life Technologies, USA) y posteriormente los datos de la transición fueron normalizados. Finalmente se ajustaron al modelo sigmoide de Boltzmann utilizando el programa GraphPad 5.0 (GraphPad Software Inc., USA) con el cual se obtuvo el punto de inflexión que corresponde al valor de T_m [57,58].

7.8. Comportamiento en solución de la lectina de *M. californianus*

Para determinar el estado oligomérico en que se encontraba la lectina en solución se calibró una columna de exclusión molecular Agilent Bio Sec-3 (3 μ m, 150 Å, 7.8 x 150 mm) con estándares de masa molecular conocida utilizando un sistema de cromatografía de alta resolución (HPLC HP serie 1100). La columna se equilibró con amortiguador de fosfato de sodio 50 mM pH 7.4, 0.2 M NaCl a un flujo de 1 mL/min. Con las masas de los estándares y los tiempos de retención se construyó una curva de calibración para determinar la masa de la lectina en solución. A las fracciones obtenidas se les midió la actividad hemaglutinante como se menciona en 7.1.2

7.9. Detección de glicosilaciones

La detección de glicosilaciones se llevó a cabo usando el kit DIG Glycan Differentiation (Roche). Éste permite identificar y caracterizar de forma parcial la presencia de glicoconjugados o glicoproteínas a través de la transferencia de las muestras en un gel SDS-PAGE a una membrana de nitrocelulosa o inmobilon, donde mediante una electroforesis en condiciones desnaturalizantes, MCL junto con las glicoproteínas usadas como control positivo: Transferrina, Carboxipeptidasa Y, Asialofetuina y Fetuina, se transfirieron a una membrana de Immobilon (Millipore), una vez hecha la transferencia, la membrana fue teñida con una solución de Ponceau S, siguiendo las instrucciones del proveedor, finalmente cada uno de los carriles se dejó interaccionar con diferentes lectinas que reconocen las glicosilaciones presentes en las proteínas control. El fundamento de la técnica se basa el uso de anticuerpos mono específicos antidioxigenina (DIG) para el reconocimiento de lectinas conjugadas a este hapteno,

las cuales a su vez tienen la capacidad de reconocer estructuras de carbohidratos que se encuentran presentes en glicoconjugados [59].

7.11. Determinación de la actividad antimicrobiana

Para el ensayo de la inhibición del crecimiento bacteriano, se siguió el protocolo reportado por Naganuma *et al.*, con algunas modificaciones [60]. Las bacterias Gram-positivas (*Lactobacillus plantarum* ATCC8014) y Gram-negativas (*Escherichia coli* DH5 α) se incubaron en medio LB (Sigma-Aldrich Co. Ltd., St. Louis, MO, USA) y medio MRS, respectivamente a una temperatura de 37°C, hasta una densidad óptica de 1 a 600 nm. Una alícuota de 2 mL de cada uno de los cultivos se mezcló con 10 μ g totales de MCL y rMCL-1 e incubados a 37°C. Como control positivo se usó amortiguador 50 mM de fosfato de sodio, 150mM NaCl pH7.4. La absorbancia a 600 nm fue monitoreada cada hora. El valor de la inhibición de crecimiento fue calculado con la siguiente ecuación:

$$\text{Inhibición de crecimiento (\%)} = (1 - \text{OD}_{600\text{test}}/\text{OD}_{600\text{control}}) \times 100$$

Donde OD_{600test} corresponde a la densidad de la suspensión bacteriana en presencia de las lectinas, medida a OD₆₀₀. OD_{600control} corresponde a la densidad óptica de la suspensión bacteriana crecida en ausencia de las lectinas. Se evaluó la aglutinación de las bacterias de los cultivos anteriormente mencionados y se monitorearon en un microscopio Nikon Eclipse E200, para estos ensayos de aglutinación también utilizamos células liofilizadas de *Micrococcus lysodeikticus* (Sigma-Aldrich).

7.12. Determinación de la actividad antifúngica

La actividad antifúngica de MCL y su isoforma se analizó a través de la medición del crecimiento radial de los hongos en placas de medio PDA (Papa, Dextrosa, Agar). El efecto inhibitorio de crecimiento se realizó sobre los siguientes microorganismos fitopatógenos de importancia comercial: dos oomicetos, que son *Pythium*

aphanidermatum y *Phytophthora capsici*, así como dos hongos verdaderos: *Fusarium oxisporum* y *Alternaria alternata*.

Para este ensayo se utilizaron 200 µg/mL de las lectinas puras mediante el método de dilución en agar [61]. En cada tratamiento se agregó PDA estéril y se diluyó con la lectina antes de que solidificara, se realizaron 4 repeticiones de cada tratamiento incluyendo los controles positivo y negativo, en donde el fungicida Captan (ADAMA Agricultural Solutions Ltd.) fue utilizado como control positivo de inhibición y el amortiguador de fosfatos 50 mM, 0.15 M de NaCl a pH 7.5, fue utilizado como control negativo de la inhibición de crecimiento. El crecimiento radial fue medido a las 24 horas para *Pythium aphanidermatum* y a las 48 horas para el resto de los microorganismos.

7.13. Determinación de la actividad anticancerígena

Se evaluó la actividad antitumoral de MCL mediante la inhibición del crecimiento de células tumorales con las líneas celulares: HCT-15 (adenocarcinoma colo-rectal de humano), MCF-7 (adenocarcinoma mamario humano), K562 (Leucemia mielógena crónica), U251 (Glioblastoma humano), PC-3 (adenocarcinoma prostático humano), SK-LU-1 (Adenocarcinoma de pulmón humano). Las líneas celulares fueron donadas por el Instituto Nacional de Cáncer (NCI, USA).

La citotoxicidad en las células tumorales fue determinada usando el método de la sulforrodamina B a través de ensayos de micro cultivo para el crecimiento celular, así como lo describen los protocolos del NCI [62]. Estos experimentos fueron realizados con 10 µg totales de MCL y decidimos utilizar dos condiciones una que contiene diversas especies oligoméricas caracterizadas previamente por cromatografía de exclusión molecular y otra condición donde solo se evaluó la actividad citotóxica de la especie más abundante (el dímero).

7.14. Secuenciación de la lectina de *M. californianus*

7.14.1. Por digestión enzimática y análisis por espectrometría de masas

Para obtener la secuencia de aminoácidos de MCL se realizó una electroforesis en condiciones desnaturizantes donde las bandas se tiñeron con una solución de azul

de Coomassie G-250. La banda con la proteína pura se cortó y se envió a secuenciar a la Universidad de Arizona, en donde a través de la digestión enzimática con Tripsina, los fragmentos peptídicos fueron separados en un equipo de HPLC acoplado a espectrómetro de masas. Los resultados obtenidos correspondían a segmentos de la secuencia que correspondían a un 68% de la secuencia total, por lo que decidimos emplear técnicas de biología molecular para determinar la secuencia completa.

7.14.2. A partir del cDNA de *M. californianus*

7.14.2.1. Extracción de RNA_T y amplificación del gen con oligos degenerados

Se extrajo RNA del tejido del manto de *M. californianus* y se siguió el protocolo de extracción del kit comercial de RNAzol [63]. El cDNA se sintetizó de 2.0 µg de RNA total utilizando el kit RT-PCR Protoscript II (New England BioLabs Ipswich, Massachusetts, USA), siguiendo el protocolo del fabricante. Una vigésima parte de la reacción de RT fue utilizada para los ensayos de PCR. Se diseñaron primers degenerados de las regiones secuenciadas de la proteína, a través de la digestión enzimática. Para el diseño de oligos de la región del amino terminal correspondiente a MYFQFDV, el primer fue MCL_f 5'- ATGTASTTYCARTASGATG (Las posiciones degeneradas fueron diseñadas de acuerdo al código de la IUPAC) y para la región correspondiente al carboxilo terminal se utilizó la región de GDKHGM, el primer MCL 5'- CATWGCWCCYTGRTRTCWCC, la reacción de PCR se llevó a cabo utilizando la polimerasa KOD Hot Start (Novagen). La longitud del fragmento obtenido por PCR se analizó mediante electroforesis en geles de agarosa. El fragmento obtenido de cerca de 300 pb fue purificado utilizando un kit de extracción de geles (Bio Basic Inc.) y se envió a secuenciar a Laragen (Laragen Inc. Coulver City, CA, USA).

7.14.2.2. Rapid amplification cDNA Ends (RACE 5' y 3') y clonación en un vector pJET

Se diseñaron oligos correspondientes a los extremos 3' y 5', para amplificar las regiones correspondientes al amino y carboxilo terminal. Nuevamente se extrajo RNA de organismos frescos y se sintetizó cDNA para llevar a cabo la reacción de RACE (Rapid Amplification cDNA Ends) siguiendo el protocolo del SMARTER kit de Clontech [64]. Un nuevo par de oligos fue diseñado a partir de la secuencia conocida, GSP15'-

GAGGGGATGGACAATTTTCCCACTTGCAGC y GSP25'-GGCGGGAAAATACGTCCATCCGAAGGGCGG. Los productos de la reacción de PCR fueron clonados en un vector pGEM, después de secuenciarlos los nucleótidos se analizaron para verificar la secuencia del cDNA completo de MCL.

Basándonos en la secuencia completa del cDNA de MCL, se diseñaron y usaron dos pares de primers para amplificar la secuencia de DNA genómico de dos posibles ORF's (Open Reading Frame) que se encontraron a partir del cDNA, esto con la intención de conocer la organización del gen de MCL. La extracción del DNA genómico se llevó a cabo utilizando el kit DNA genomic isolation (Fermentas). Para la reacción de PCR se utilizó la polimerasa KOD-Hot Start (Novagen) y se clonó dentro de un vector pJET. Los productos de la ligación fueron transformados en células competentes de *E. coli* DH5 α y las clonas positivas fueron secuenciadas en Laragen Inc. (Culver City, CA, USA).

7.15. Obtención de una isoforma recombinante de la lectina de *M. californianus* rMCL-1

7.15.1. Clonación y sobreexpresión

Al obtener la topología del gen de MCL a partir de su DNA genómico, encontramos la secuencia de una isoforma que presentaba solo tres mutaciones (I107V, K130G y D141N), con la intención de entender su función en *M. californianus* decidimos clonarla y sobreexpresarla. La reacción de PCR se realizó utilizando como templado el cDNA y el gDNA que se obtuvieron por los métodos descritos anteriormente, los primers se diseñaron de acuerdo a la secuencia de MCL (codigo de acceso KT695159). Los productos de PCR fueron purificados usando un kit de purificación de PCR (Bio Basic Inc) y clonados en un vector pGEM (Promega). Después de la transformación en células competentes DH5 α , el DNA plasmídico fue purificado de las clonas positivas y secuenciado usando el primer T7 y verificando las secuencias por un alineamiento múltiple, en donde se verificó que se clonó la isoforma previamente identificada en el DNA genómico.

La región codificante de rMCL-1 (isoforma) fue amplificada por PCR usando primers específicos con los sitios de restricción Nde I y Hind III en el extremo 5'. El producto de PCR fue digerido con BamH I y Hind III e insertado en un vector de expresión pET-28a (+), el cual había sido cortado previamente con las mismas enzimas de restricción. Se realizó una restricción y se secuenció el plásmido recombinante para verificar el inserto, una vez verificado se transformaron en células competentes de *Escherichia coli* BL21 (DE3) RIL. Las clonas positivas fueron cultivadas por una noche en medio LB (Luria Bertani) suplementado con 50 µg/ml de kanamicina y 34 µg/ml cloranfenicol e incubados a 37°C con agitación a 200 rpm. El cultivo fue diluido 1:50 con medio LB fresco e incubado a 37°C hasta llegar a una densidad óptica de 0.6, que fue cuando la expresión se indujo con isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) 0.5 mM y se continuó el crecimiento por 16 h a 30°C. Posteriormente. Las células fueron centrifugadas a 15000 g por 20 min a una temperatura de 4°C, se lisaron y se verificaron los niveles de expresión de la proteína por medio de una electroforesis SDS-PAGE en condiciones desnaturalizantes.

7.16. Purificación de rMCL-1

Las células se suspendieron en un amortiguador de lisis (50 mM de fosfatos, 0.15 M de NaCl, 1mM de PMSF a pH 7.5) y se sonicaron (intervalos de 10 s con espacios de 30 s para completar un tiempo de 8 min, a 4°C). El lisado fue clarificado por centrifugación a 26,000 G, 4°C por 30 min, el sobrenadante fue filtrado y cargado a una columna de afinidad de Níquel, la cual fue previamente equilibrada con 50 mM de fosfatos, 0.15 M NaCl, 1mM de PMSF y 30mM de Imidazol. Las proteínas unidas a la columna se eluyeron con un gradiente de Imidazol de 30 a 350 mM. Una vez eluída, la isoforma de MCL fue dializada en un amortiguador de fosfatos 50 mM, 0.15 mM de NaCl, pH 7.5. La etiqueta de histidinas fue removida mediante un corte usando proteasa del virus del tabaco recombinante (TEV), toda la noche a 4°C. rMCL fue recirculada nuevamente en la columna de afinidad, esta vez no se unió a la columna, con lo que obtuvimos a la isoforma pura y activa.

7.17 Pruebas de cristalización y determinación de la estructura terciaria de la lectina de *M. californianus* y su isoforma

Para poder determinar la estructura de una proteína y analizar a nivel atómico las interacciones proteína-ligando y proteína-proteína, es necesario obtener cristales adecuados. Para lograr esto se deben cumplir diferentes criterios: que la proteína esté pura, monodispersa, estructurada y que sea estable durante el tiempo que dure la cristalización.

El proceso de cristalización de una proteína se divide en tres etapas: En la primera es necesario llevar a la proteína a saturación, para esto se requiere que el sistema soluto-disolvente sea llevado lentamente a un estado de solubilidad mínima y alcance un grado limitado de sobresaturación. Esto requiere de considerar las diversas variables que afectan la solubilidad, como son la concentración de proteína, temperatura, pH, fuerza iónica, presencia de aditivos específicos y agentes precipitantes. Estos últimos pueden ser sales, como el sulfato de amonio; precipitantes orgánicos de volatilidad baja como el 2-metil-2, 4-pentanodiol (MPD) y polietilenglicol de diferentes pesos moleculares, todo con el objetivo de lograrse una agregación controlada de la proteína. A la segunda etapa se le conoce como nucleación, en esta ocurre una transición de fase de moléculas de un estado desordenado a uno ordenado al incrementarse progresivamente la concentración de proteína para generar diminutos núcleos cristalinos. La última etapa involucra un continuo crecimiento del cristal hasta obtener un tamaño adecuado para los experimentos de difracción de rayos X [65].

Los experimentos de cristalización se realizaron a 18 °C utilizando el método de difusión en fase de vapor en la modalidad de gota sedente en cajas de 2 x 96 pozos (MRC96T-PS) de Jena Bioscience. MCL y su isoforma fueron dializadas contra un amortiguador HEPES 0.01 M, 0.15 M de NaCl, pH 7.5, utilizando un Amicon® Ultra-0.5 (Millipore) con una membrana con corte de 10 kDa, MCL se concentró a 15 mg/mL y la isoforma rMCL-1 a 20 mg/mL. En cada condición de cristalización se colocaron 80 µL de agente precipitante en el reservorio y gotas de 2 µL utilizando 1 µL de proteína y 1 µL del agente precipitante. Las condiciones que se probaron fueron las 96 contenidas en el kit PACT Suite de QUIAGEN. Con ambas proteínas se montaron pruebas en

ausencia y en presencia de los diferentes ligandos que reconocen. Para la colecta de datos se utilizó como solución crio protectora el licor madre con 30% de glicerol o trealosa 30%. La colecta de datos se realizó con un generador de ánodo rotatorio MicroMax-007 HF (Cu κ α , $\lambda = 1.5416 \text{ \AA}$) con un detector DECTRIS PILATUS 200K (Rigaku, TX, USA). Los datos fueron procesados con la suite de HKL 3000 (HKL Research, Inc.) [66]. Las fases se obtuvieron mediante la técnica de reemplazo molecular con el programa Phaser, usando la interfaz gráfica de Phenix [67] y utilizando la estructura de la lectina de *M. galloprovincialis* (codigo PDB 3WMV) como modelo. El afinamiento de la estructura se realizó utilizando el programa phenix-refine. El ajuste de los modelos a los mapas de densidad electrónica se realizó con COOT [68]. La estructura final se validó y verificó que cumpliera con los criterios de MolProbity [69]. Las figuras de los modelos finales se realizaron con UCSF Chimera [70]. El análisis de los sitios de reconocimiento y de las interfaces entre monómeros se realizó con los programas PDBsum [71] y PISA (European Bioinformatics Institute) [72].

7.18 Determinación de los parámetros termodinámicos de la interacción lectina- carbohidrato de MCL-1 por calorimetría de titulación isotérmica

La calorimetría de titulación isotérmica o ITC por sus siglas en inglés (Isothermal Titration Calorimetry), es una de las herramientas más poderosas y precisas con que se cuenta en la actualidad para caracterizar termodinámicamente la formación de complejos, ya sea proteína-ligando o proteína-proteína. ITC es una técnica que mide directamente el calor que se absorbe o libera en cualquier proceso de interacción, que a presión constante equivale a la entalpía de dicho proceso [73]. Esta técnica permite medir en un solo experimento parámetros como la constante de asociación, K_a , el cambio de la entalpía de unión, ΔH y la estequiometría de la reacción, n y como consecuencia, se puede calcular la energía libre de Gibbs y la entropía de formación del complejo (ΔG y ΔS). Además, si se realizan los experimentos a diferentes temperaturas es posible determinar el cambio en la capacidad calorífica del proceso ΔC_p [74].

Los experimentos de ITC se llevaron a cabo en un micro calorímetro MicroCal VP-ITC, 2mL de una solución 20 μ M de MCL-1 (en un amortiguador de HEPES 10 mM, NaCl 150mM, pH 7.5) fueron colocados en la celda, el experimento se realizó a una temperatura de 25 °C con los cuatro diferentes ligandos con los que previamente MCL-1 presentó especificidad en los ensayos de inhibición de la actividad hemaglutinante: D-Galactosa, α -Lactosa, Melibiosa y Rafinosa. Los ligandos fueron disueltos en el mismo amortiguador en el que se encontraba MCL-1 y se llevaron a una concentración final de 5mM para la D-Galactosa y 2.5 mM para los oligosacáridos. Se hicieron un total de 55 inyecciones de 5 μ L de ligando y una inyección inicial de 1 μ L, Los datos se analizaron y ajustaron a los correspondientes modelos utilizando Origin 7 (Origin Lab, Northampton, MA).

8. RESULTADOS Y DISCUSION

8.1. Purificación de una lectina de *Mytilus californianus*

La lectina de *Mytilus californianus* se purificó en un solo paso utilizando una columna de α -lactosa-agarosa. La fracción fue eluída de la resina con 200 mM de galactosa en amortiguador de fosfato de sodio 50mM pH7.4, 150 mM NaCl. La pureza de la fracción se analizó por electroforesis en condiciones desnaturalizantes y por espectrometría de masas MALDI-TOF. La electroforesis mostró una sola banda debajo del marcador de 21.5 kDa (Figura 5). El análisis por espectrometría MALDI-TOF mostró una masa molecular de 18 kDa. (Figura 6).

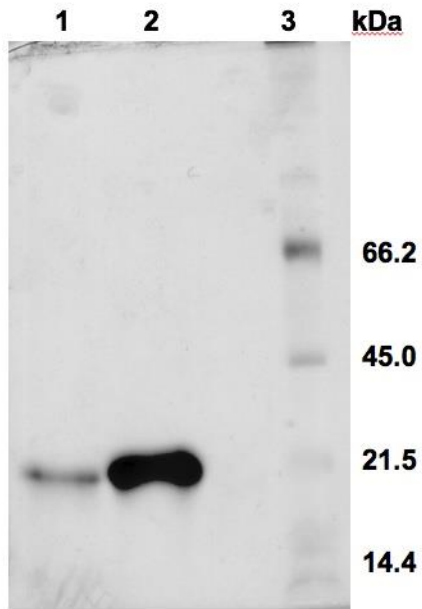


Figura 5. Electroforesis en condiciones desnaturizantes de la lectina de *M. californianus*. En los carriles 1 y 2 se observa a la lectina a 2.4 y 6 μ g. El carril 3 corresponde a los marcadores de masa molecular: Albumina de suero bovino (66.2 kDa), Ovoalbúmina (45 kDa), inhibidor de tripsina (21.5 kDa), lisozima (14.4 kDa). El gel se tiñó con nitrato de plata.

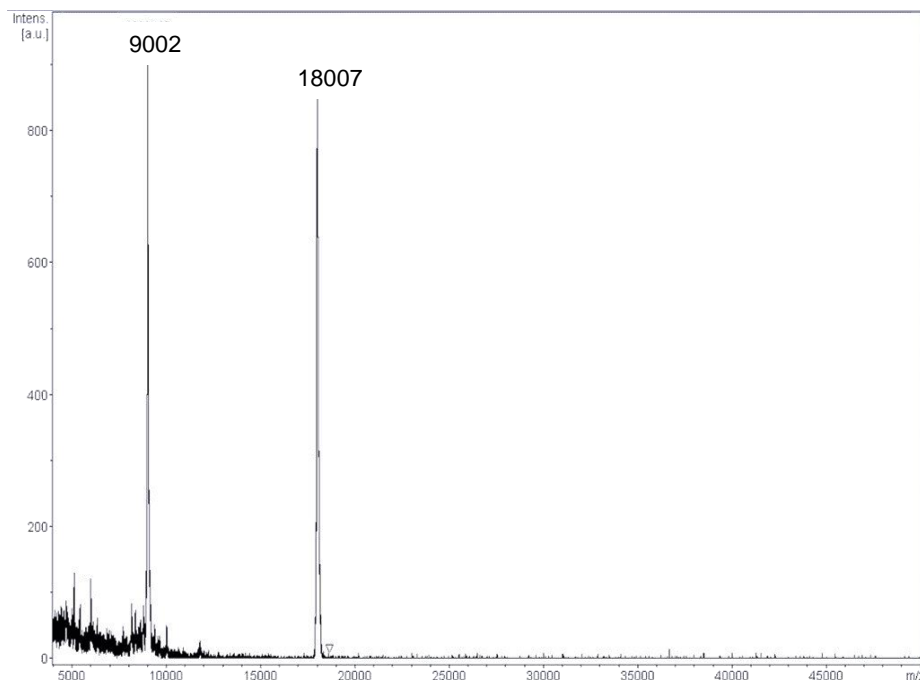


Figura 6. Espectro de masas MALDI-TOF de la lectina de *Mytilus californianus*. Se utilizó una matriz de ácido sinapínico

8.2. Determinación de la especificidad de la lectina de *M. californianus*

Con el fin de determinar la especificidad de MCL, se realizaron ensayos de inhibición con 60 diferentes carbohidratos. En dichos ensayos se observó que la lectina reconoció los galactósidos: D-galactosa (α -D-Gal), melibiosa (D-Gal (1 \rightarrow 6)- α -D-Glc), α -lactosa (D-Gal(1 \rightarrow 4)- α -D-Glc) y rafinosa (D-Gal-(1 \rightarrow 6)- α -D-Glc-(1 \rightarrow 4)- β -D-Fru) (Tabla 2) y en menor grado a la N- acetil galactosamina. Es importante notar que no reconoce a la β -lactosa, lo que nos habla de su capacidad para diferenciar entre anómeros α o β . Fue importante notar que la configuración del grupo hidroxilo en la posición C-4 es importante para el reconocimiento, ya que la D-glucosa siendo un epímero de la D-galactosa no inhibe la actividad hemaglutinante de MCL. Una inhibición similar se observó con la lectina de *Crenomytilus grayanus* [39]. La inhibición positiva observada en el trisacárido rafinosa y el resultado negativo que se observó con D-glucosa sugieren que el reconocimiento por este azúcar se da por medio de la

galactosa, que es un inhibidor potente, mientras que la D-glucosa unida por el enlace α -1 \rightarrow 6 debe estar orientada fuera del sitio de unión de la lectina como se comprobó posteriormente con el análisis estructural del complejo lectina-rafinosa.

Tabla 2. Carbohidratos que inhiben la actividad hemaglutinante de MCL

Inhibidor	*Concentración mínima inhibitoria (mM)
β -D(+) Galactosa	2
β -D(+) Rafinosa	4
α -D(+) Melibiosa	8
α -Lactosa	62

*Concentración mínima del azúcar, requerida para inhibir la actividad hemaglutinante de MCL.

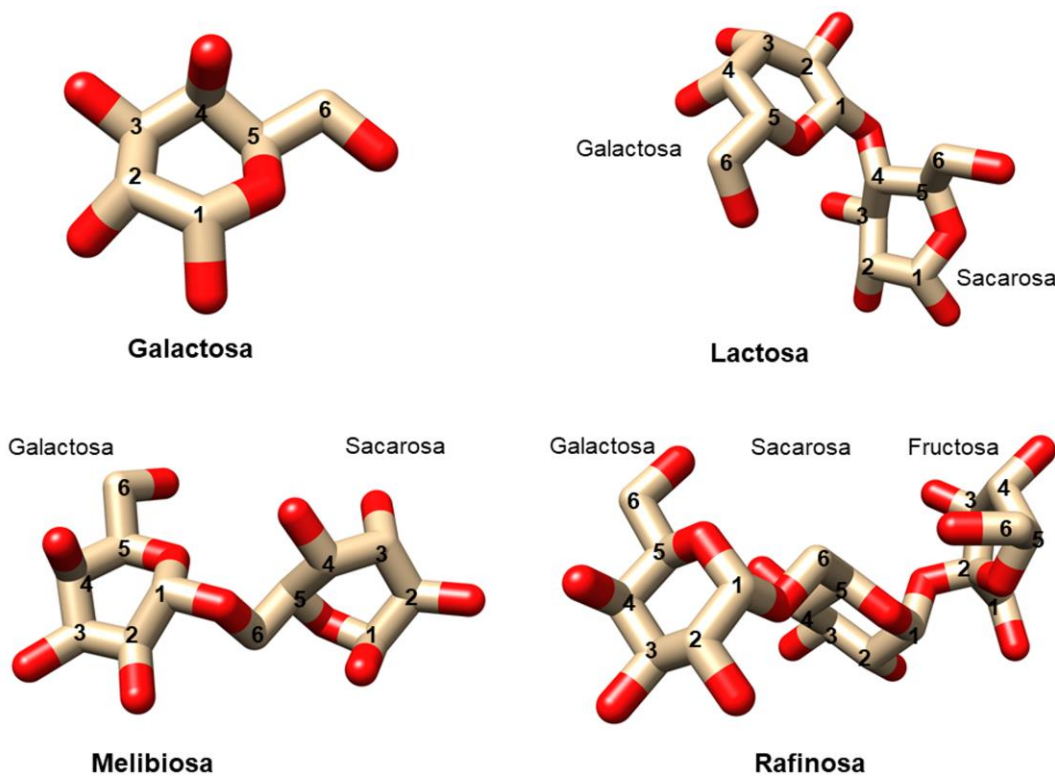


Figura 7. Carbohidratos que inhiben la actividad hemaglutinante de MCL.

8.2.1 Actividad de la lectina de *M. californianus* sobre eritrocitos de diferentes grupos sanguíneos

Los ensayos de actividad hemaglutinante mostraron que MCL es capaz de aglutinar eritrocitos de conejo y los tres grupos sanguíneos humanos, aunque con diferentes actividades específicas (Figura 8 y Tabla 3).

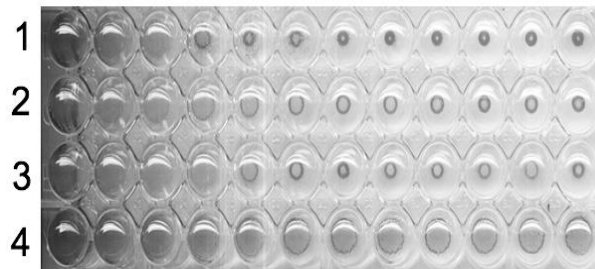


Figura 8. Aglutinación de eritrocitos de diferentes grupos sanguíneos en presencia de MCL. Filas 1-3, grupos sanguíneos: O, B y A respectivamente. En la fila 4 se utilizaron eritrocitos de conejo.

Tabla 3. Actividad hemaglutinante de MCL utilizando eritrocitos de humano y de conejo.

Tipo de eritrocitos	Grupo sanguíneo	Actividad específica (U*/mg de proteína)
Humano	O	3205
	B	12800
	A	6410
Conejo		25640

*U (unidad de actividad) se define como el recíproco de la dilución más alta que mostro actividad aglutinante.

Los antígenos de los eritrocitos humanos pueden ser clasificados en primera instancia en carbohidratos y proteínas. Los antígenos que contienen carbohidratos están covalentemente unidos a proteínas y/o esfingolípidos los cuales se encuentran en diversos fluidos, tejidos y tumores [75]. Las diferencias entre los grupos sanguíneos se hallan determinadas por ciertos oligosacáridos muy cortos, presentes en las membranas plasmáticas de los eritrocitos. Estos oligosacáridos sólo difieren en sus monómeros terminales. Por ejemplo, los eritrocitos pertenecientes al grupo sanguíneo A, presentan como monosacárido terminal una N-acetilgalactosamina y los del grupo B una galactosa. Cuando ambos monosacáridos terminales están ausentes estamos en presencia del grupo O, que por consiguiente tendrá expuestos tanto galactosa como fucosa (Figura 9).

La actividad hemaglutinante de MCL con los diferentes eritrocitos puede ser el resultado de la presencia de galactósidos en los extremos de los oligosacáridos presentes en los diferentes antígenos, y sugiere que esta lectina tiene preferencia por los enlaces α . Además, a pesar de que MCL presentó una mayor especificidad por los antígenos B, las diferencias entre los títulos (los recíprocos de la dilución) corresponden a un solo pozo de dilución lo que puede no ser representativo.

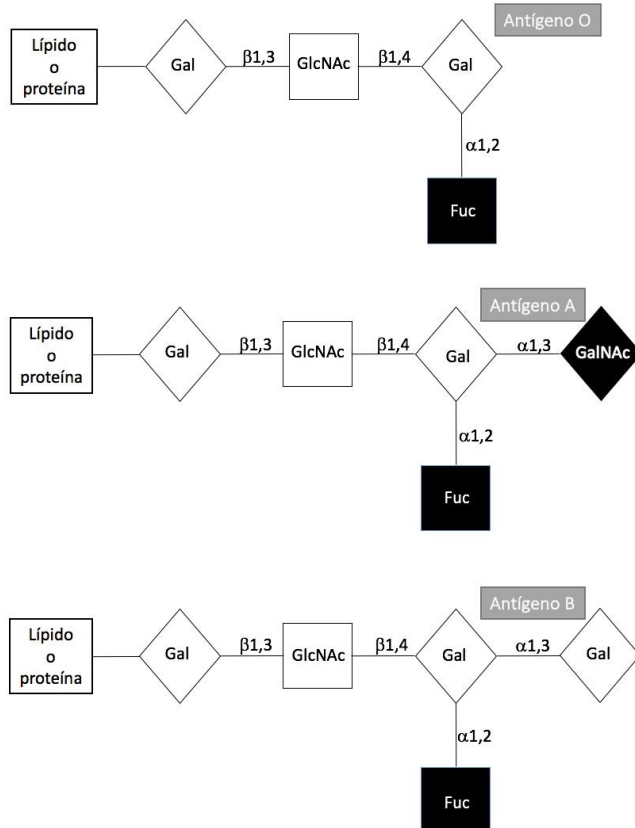


Figura 9. Estructura de los oligosacáridos presentes en los diferentes grupos sanguíneos humanos

8.3. Efecto del pH y temperatura sobre la actividad de MCL

Con el fin de mantener a la lectina pura en las condiciones óptimas para su función y poder caracterizarla apropiadamente, se evaluó su estabilidad incubándola a diferentes pH's y temperaturas por 1 hora. Se observó que MCL conservó su actividad en todo el intervalo de pH's analizado (de 3 a 10), siendo el pH 7.4 el de mayor estabilidad (Figura 10A). Otras lectinas reportadas tienen un comportamiento similar, tal es el caso de la lectina de *Vatairea guianensis* que mantiene su actividad hemaglutinante en un intervalo de pH de 4 a 10 [79]. En el caso de la lectina del bivalvo marino *Crenomytilus grayanus* se observó el mismo comportamiento, conservando su actividad en un intervalo de pH de 4-10, con óptimos a pH's de 8 a 10 [39].

Por otro lado, la temperatura es, al igual que el pH un factor determinante en la actividad de toda proteína. En el caso de la lectina de *Mytilus californianus* observamos que conserva su actividad a temperaturas entre 4 y 60° C, siendo a 37° C donde se

presenta la mayor estabilidad y actividad (Figura 10B). Este comportamiento es muy común en lectinas de diferentes fuentes; tal es el caso de las lectinas de extractos de la planta *Quercus fusiformis*, que mostraron actividad en un intervalo de 0 a 50°C conservando el 50% de su actividad a 100°C [77]. En el caso específico de la lectina de *Vatairea guianensis* su actividad se mantiene en un intervalo de 10 a 60°C, después del cuál disminuye su actividad más del 50% al llegar a 70°C y la pierde por completo a 100°C [76].

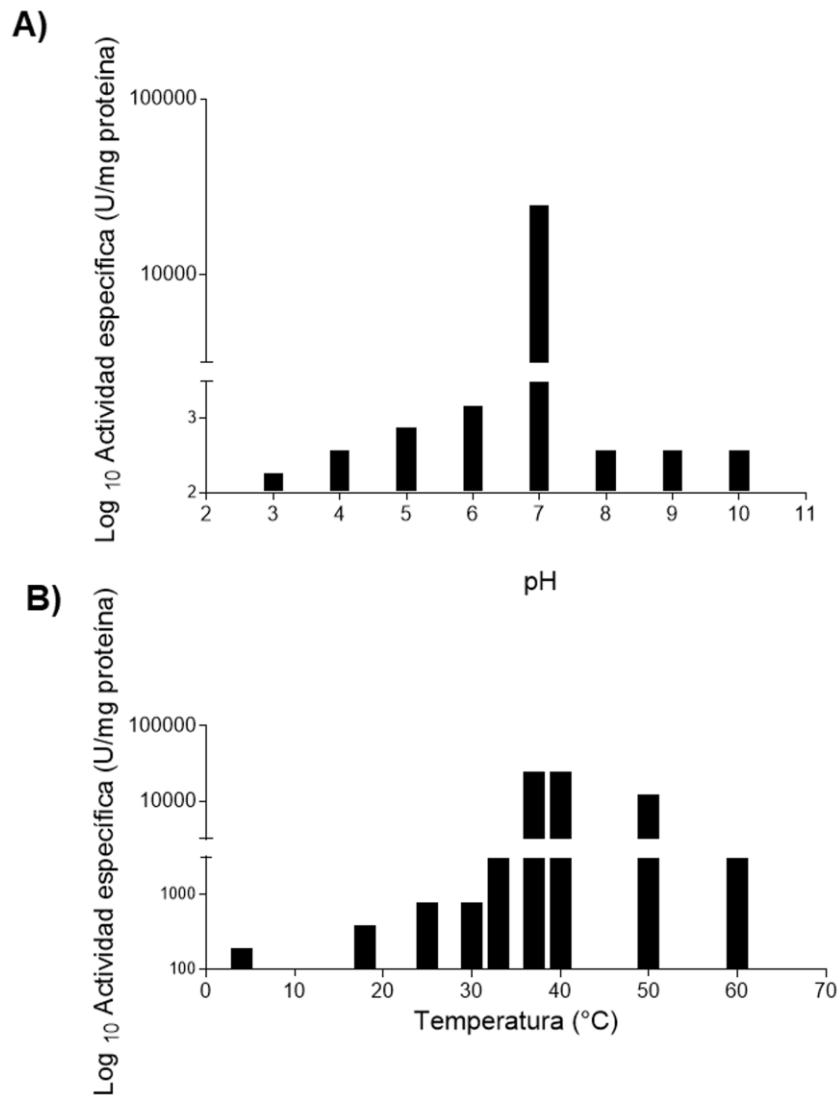


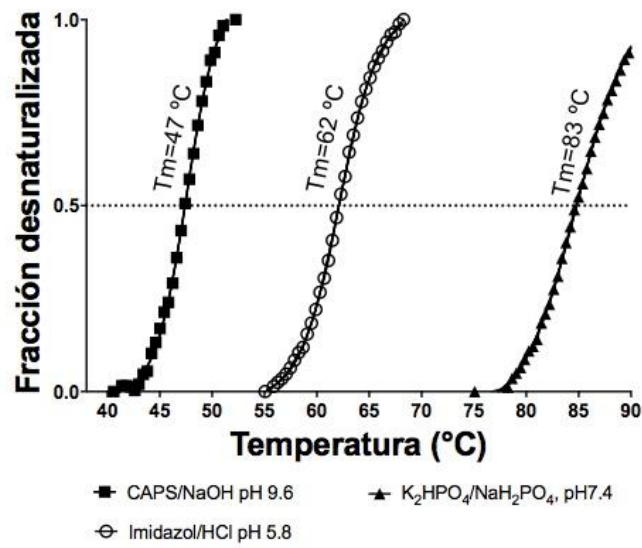
Figura 10. Efecto del pH y de la temperatura en la actividad hemaglutinante de la lectina de *M. californianus*.

8.4. Evaluación de la estabilidad estructural de MCL

Además de la estabilidad funcional, es importante evaluar la estabilidad estructural de las proteínas, ya que, en ocasiones, estas pueden mantenerse solubles y estables estructuralmente, pero no ser funcionales o, por el contrario, ser funcionales pero muy inestables. En este trabajo se evaluó la estabilidad de MCL utilizando técnicas de termofluorescencia. Para esto, se realizó un barrido de temperaturas de 25 a 95° C, en un equipo de PCR en tiempo real. De las 96 condiciones evaluadas variando el pH y las sales amortiguadoras, observamos que las mejores condiciones eran con los amortiguadores: K_2HPO_4/NaH_2PO_4 a pH 7.4, CAPS/NaOH pH 9.6 y con Imidazol/HCl pH 5.8 (Figura 11). Utilizamos un control con la proteína en el amortiguador de purificación y observamos que las condiciones de mayor actividad (amortiguador Na_2HPO_4/NaH_2PO_4 , pH 7.4) coincidían con la mayor estabilidad con una T_m de 83 °C. A valores de pH tanto por arriba como por abajo de 7.4, la T_m disminuye notablemente. Diversas lectinas muestran también estabilidades muy altas, tal es el caso de la de *Phaseolus vulgaris* que se desnaturaliza a temperaturas por arriba de 70 °C [78]. Es sabido que diversas proteínas adquieren mayor estabilidad cuando están en presencia de su ligando, esto debido a que generalmente los sitios de reconocimiento se encuentran en asas flexibles que al interactuar con su ligando se rigidizan dándole a la proteína una mayor estabilidad. Al adicionar galactosa a MCL observamos que el valor de la T_m se incrementa a 93°C. lo que confirma que el ligando la estabiliza aún más.

La estructura cristalográfica de la lectina de *Mytilus galloprovincialis* (PDB 3WMV) [45] mostró un plegamiento de trébol β que es simétrico y que los sitios de reconocimiento de carbohidratos están formados por asas. Estudios recientes realizados con MGL sobre las características fisicoquímicas que aporta este plegamiento, sugieren que incrementando la simetría del dominio de reconocimiento a carbohidratos se observa un incremento significativo en su estabilidad térmica [79], por lo que las características estructurales de este dominio aportan una mayor estabilidad a los miembros de esta nueva familia de lectinas.

A)



B)

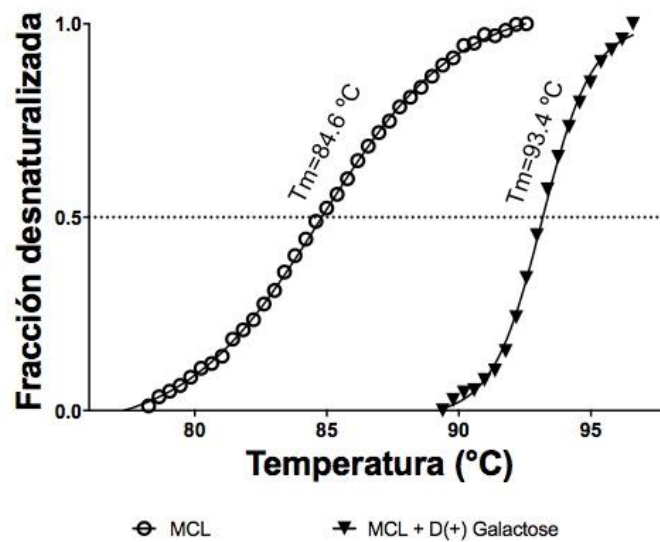


Figura 11. Estabilidad térmica de MCL determinada por termofluorescencia. A) Con diferentes amortiguadores, B) En presencia de su ligando (galactosa)

8.5. Comportamiento en solución de la lectina de *M. californianus*

Una de las características que distingue a MCL de los demás miembros de la familia *Mytilidae* es su fuerte tendencia a formar oligómeros de gran tamaño, comportamiento que comprobamos mediante cromatografía de exclusión molecular (Figura 12). En dicha cromatografía logramos observar dos especies en disolución, una que correspondía con un dímero, que era la más abundante (90%) y la otra que estaba formada por aproximadamente 20 subunidades (10%). Ambos oligómeros fueron separados y evaluamos su actividad hemaglutinante observando que el oligómero de 20 subunidades presentaba una actividad 12 veces mayor (8×10^4 U/mg) que el dímero (6.5×10^3 U/mg). En las otras lectinas de esta nueva familia (CGL, MGL) se ha reportado que la proteína se encuentra en forma dimérica y cuando se logra obtener en forma monomérica mediante la mutación de los aminoácidos que mantienen estable la interfaz, la actividad disminuye 10 veces [45,80].

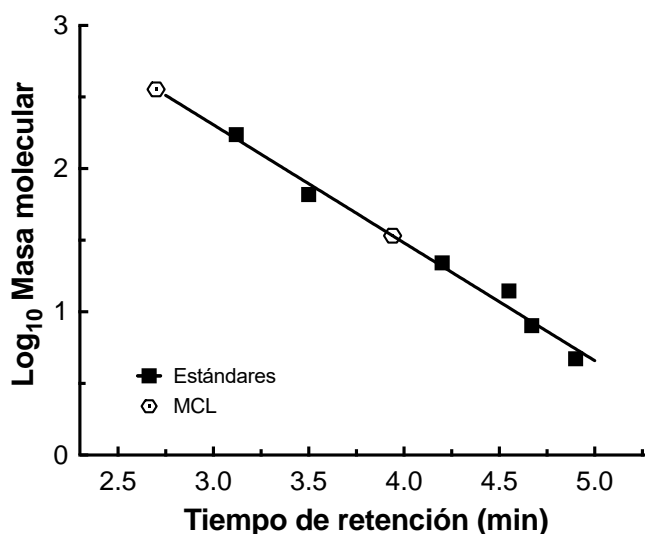


Figura 12. Curva de calibración de la columna de exclusión molecular Bio SEC-3 utilizada para calcular las masas moleculares de los oligómeros en solución. Los estándares utilizados fueron: Heveina (4.7 kDa), Ubiquitina (8.6 kDa), Lisozima (14.4 kDa), Taumatina (22.2 kDa), Albumina de suero bovino (66.4 kDa) y Glucosa isomerasa que forma tetrámeros (173 kDa).

8.6. Secuencia de la lectina MCL

Debido a que realizando una digestión enzimática con tripsina y el posterior análisis de los péptidos por espectrometría de masas sólo nos permitió conocer en un 65% la secuencia de la lectina, decidimos obtenerla mediante el cDNA sintetizado a partir del RNA_T extraído del organismo. Para esto, amplificamos por PCR un fragmento de 280 pb usando primers degenerados. Este fragmento fue secuenciado y a partir de la secuencia obtenida un nuevo par de primers fueron diseñados para generar la secuencia completa de cDNA. Se amplificó la secuencia completa de MCL, que resultó ser de 760 pb (Codigo del Gene Bank KT695159). A partir de la reacción de RACE 3' y 5' se obtuvieron dos fragmentos de 320 y 340 pb respectivamente, los cuales fueron amplificados y secuenciados. La secuencia completa del cDNA de MCL contiene dos posibles marcos de lectura abierta (ORFs, Open Reading Frames) de 543 pb y 453 pb respectivamente y una región 3' UTR de 137 pb con una cola de poly (A) de 30 pb (Figura 13).

Fue interesante observar que la secuencia de cDNA codifica para dos posibles cadenas polipeptídicas: una de 180 aminoácidos y otra de 150 aminoácidos con masas moleculares de 2027.2 Da y 16911.3 Da respectivamente. La secuencia de aminoácidos de la cadena polipeptídica más pequeña tiene 100 % de identidad con la secuencia previamente reportada de la lectina de *Mytilus galloprovincialis* (MGL) [40]. Es importante mencionar que los primeros 30 aminoácidos de la secuencia de cDNA no corresponden a una secuencia de un péptido señal y que ese polipéptido no forma parte de la proteína aislada de la fuente natural. Debido a que estos 30 aminoácidos están ausentes en la proteína pura podrían ser parte de una isoforma o una pre-proteína [48]. Recientemente en el gen de MGL reportan una región adicional de 37 aminoácidos. Esta secuencia en el 5'- terminal parece no estar presente en la proteína al igual que en MCL. Hasan y colaboradores proponen diversas posibilidades: una dependencia por "leaky scanning", procesamiento por una proteasa extracelular o la posibilidad de que sean dos transcritos que usan diferentes sitios de inicio de transcripción [50].

```

TCTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACATGGGGAAT
AGCATTATATTATTATCCATAGCGACATCGTATTTCAAAAATCGGACACAAAATATCT
S I I L L S I A T S Y F K I G H K I S
GAACTTGGAAATCGTATAGAGAAAAATGACTACGTTTCTTATCAAAACACAAGGCCAGT
E L G N R I E K M T T F L I K H K A S
GGAAAGTTTCTACATCCAAAGGGCGGCAGTAGCAATCCTGCTAACGATACTAACTTG
G K F L H P K G G S S N P A N D T N L
GTTCTGCACAGCGATATCCACGAAAGAATGTACTTCCAGTTCGATGTTGTTGATGAA
V L H S D I H E R M Y F Q F D V V D E
CGATGGGGATATATTAACATGCTGCAAGTGGGAAAAATGTCCATCCCCTCGGTGGGA
R W G Y I K H A A S G K I V H P L G G
AAAGCTGACCCACCAAATGAAACCAAGTTGGTCTGCATCAAGACCGTCATGATCGG
K A D D P P N E T K L V L H Q R H D R
GCACTGTTTCGCCATGGATTTTTTTCAACGACAATATTATACACAAGGCGGGAAAATAC
A L F A M D F F N D N I I H K A G K Y
GTCCATCCGAAGGGCGGATCCACGAATCCACCAAACGAAACATTAACAGTAATGCAT
V H P K G G S T N P P N E T L T V M H
GGAGATAAACATGGAGCTATGGAATTCATTTTTGTTTCCCCAAAAAATAAAGACAAA
G D K H G A M E F I F V S P K N K D K
CGCGTTTTAGTCTATGTCTAAAATTTATCATTTAAATTGACAAAAACAAATGTACATT
R V L V Y V *
TGGCTCGCTTAATCGTTAGTTTTTTTGTATATAAATGCATGAGAAGGTTTTGACAT
ATCTTACTAAGAAGTTTGTACAAATAAACAACATTGATCTGTTAAAAAAAAAAAAA
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAATTGATTTTTTC

```

Figura 13. Secuencia de nucleótidos y aminoácidos de MCL. La secuencia de nucleótidos se localiza por encima y la de aminoácidos correspondiente por debajo. Los nucleótidos fueron enumerados de la primer base en dirección 5'. La secuencia de poli adenilación AATAA se encuentra subrayada, el asterisco indica el codón de paro.

8.6.1. Organización genómica del gen de MCL

La estructura del gen de MCL se determinó comparando la secuencia completa del cDNA de MCL con los fragmentos genómicos de los que fueron clonados. Se usaron primers específicos para amplificar el gen por PCR y mediante el análisis del gen de 453 pb se encontró que esta agrupado en un exón. El análisis del gen clonado a partir del gDNA de *Mytilus californianus* mostró que la secuencia traducida a partir del cDNA está codificada en dos exones y un intrón como se observó en el gen de MGL [48,50]. La secuencia que corresponde a la proteína que se extrae de la fuente natural está codificada en el segundo exón, además de esto, 14 de los 30 residuos se observan a nivel gen mientras que los otros 16 aminoácidos están presentes en el primer exón. También observamos los sitios de “splice” 5’ y 3’ que contienen las secuencias

canónicas GT y AG para que se realice el “splicing” en ese sitio. En este caso la ausencia de los 30 aminoácidos en la proteína extraída de la fuente natural sugiere la posibilidad de un “splicing” alternativo, el cual nos lleva a concluir que la organización genómica de estos organismos es compleja y puede generar proteínas con diferentes funciones, o que la expresión depende de circunstancias específicas, sin embargo, se requiere un análisis genómico y proteómico que respalde esta hipótesis.

8.7. Detección y cuantificación de glicosilaciones

El análisis de la secuencia de aminoácidos de MCL mostró que comparte 100% de identidad con una lectina de *Mytilus galloprovincialis* [40] con una masa teórica obtenida a partir de dicha secuencia de 16,800 Da, que es menor que la masa obtenida de manera experimental por MALDI-TOF. Esto sugiere la posible presencia de modificaciones postraduccionales y dado que las principales modificaciones reportadas en lectinas de invertebrados marinos son las glicosilaciones [84,85], decidimos verificar la presencia de éstas. Primero se realizó un análisis con la secuencia en el servidor en línea NetNglyc [86] que sugirió que MCL posee un sitio potencial de N-glicosilación y dos para O-glicosilación. Con el fin de corroborar la presencia de glicosilaciones de manera experimental, utilizamos el kit DIG glycan differentiation (Roche). Los resultados demostraron que se trata de una glicoproteína (Figura 14). Las diferencias observadas entre la masa obtenida por MALDI-TOF y la masa teórica corresponden a un 7% de glicosilación. En el experimento de detección de glicoproteínas se encontró que MCL fue reconocida por la lectina SNA (*Sambucus nigra agglutinin*) y MAA (*Mackia aamurensis agglutinin*), lo que sugiere que MCL puede tener una glicosilación con terminación de tipo SA α (2-3)-Gal o SA α (2-6)-Gal.

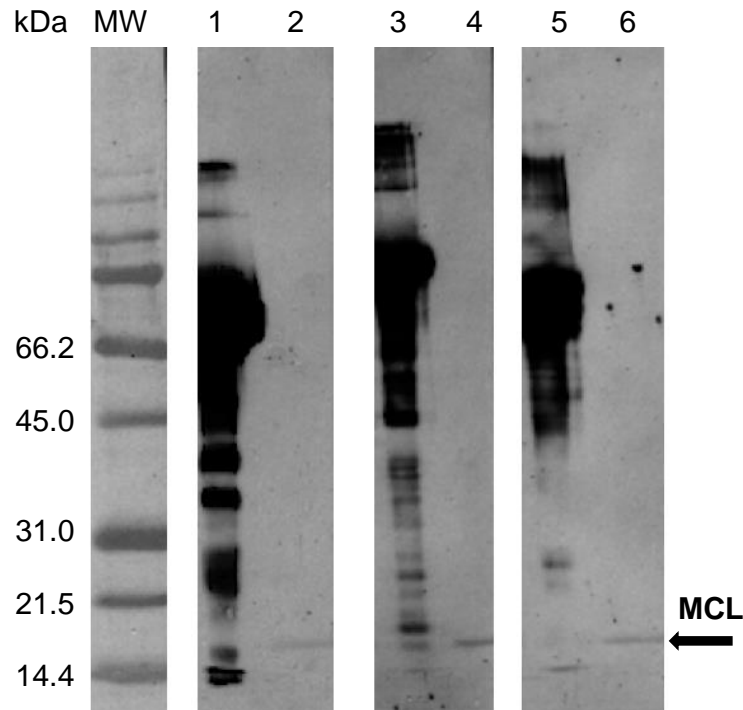


Figura 14. Detección de la presencia de glicosilaciones en MCL. Se utilizó una membrana de inmobilon. Las líneas 2,4 y 6 corresponden a MCL, Las líneas 1,3 y 5 corresponden a la glicoproteína control para ser reconocida por *Sambucus nigra agglutinin*, *Galanthus nivalis agglutinin* y *Maackia amurensis* respectivamente

Las glicosilaciones son las modificaciones postraduccionales más comunes. Estas pueden brindar a las proteínas complejidad estructural y propiedades fisicoquímicas diferentes, debido a que las estructuras de los azúcares en proteínas glicosiladas son muy variables y pueden estar constituidos desde pequeños monosacáridos a oligosacáridos ramificados. Estas glicosilaciones pueden ser N-glicosilaciones (unidas al nitrógeno de la Asparagina o Arginina) u O-glicosilación (unidas al grupo hidroxilo de Ser o Thr) [81,82]. Los oligosacáridos presentes en estas modificaciones pueden establecer interacciones estables proteína-carbohidrato y pueden modificar de forma significativa la estructura y la estabilidad de las glicoproteínas, tal es el caso de la lectina de *Erythrina corallodendron* (rEcorL) en donde se observó mediante dinámicas moleculares que el oligosacárido presente en la estructura polipeptídica permitía interacciones estables en diferentes residuos favoreciendo contactos entre aminoácidos que se encontraban alejados, lo que permite la formación de un núcleo

estable [84]. Los oligosacáridos más comunes reportados en glicoproteínas son N-glicanos oligomanosídicos y algunas estructuras pequeñas de manósidos, que a veces terminan con manosas 3-o-metiladas, muchas de estas modificaciones postraduccionales también contienen oligosacáridos de β -1-2-xilosa unidos a β -manosa, también dentro de los oligosacáridos ramificados de manosa puede haber una α -fucosilación con un enlace α -1,6-unido al grupo N-acetilglucosaminil en el núcleo de la glicosilación [81,83]. Por su parte los O-glicanos desempeñan un papel importante en la estabilización de la estructura de las glicoproteínas encontradas en caracoles; los oligosacáridos que principalmente componen estas glicosilaciones son: N-acetylgalactosamina, galactosa, manosa, y fucosa que a veces contienen una modificación adicional como metilación de hexosas [82]. En reportes de lectinas de otros miembros de esta nueva familia (MGL y CGL) se menciona que no están glicosiladas y que la modificación que presentan es una acetilación en el extremo amino terminal [40,47], que en el caso de MCL no está presente (como demostramos con la estructura terciaria).

8.9. Análisis estructural de la lectina de *M. californianus*

MCL pertenece a una nueva familia de lectinas, de las cuales solo se encuentran reportados otros tres miembros (MGL, CGL y MTL). De estas lectinas, a la fecha, se han reportado las estructuras cristalográficas de CGL (códigos PDB 5F8S, 5F8W, 5F8Y, 5F9O y 5DUY) [80,46] y de MGL (códigos PDB 3WMV y 3WMU) [45]. En este estudio logramos cristalizar a la lectina de *Mytilis californianus* y determinar su estructura por difracción de rayos X. MCL es el primer miembro de esta nueva familia de lectinas que ha sido cristalizado a partir de la fuente natural, ya que las anteriormente mencionadas se obtuvieron de manera recombinante, además es la primera glicosilada.

Los cristales de MCL difractaron a 1.79 Å de resolución. El patrón de difracción mostró que el cristal pertenece al grupo espacial monoclinico (C_{121}) con dimensiones de celda $a=81.44$ Å, $b=63.69$ Å, $c=66.29$ Å, $\alpha=90^\circ$, $\beta=120.49^\circ$, $\gamma=90^\circ$. El coeficiente de Matthews [85] de 2.19 Å³ Da⁻¹ indica la presencia de un dímero en la unidad asimétrica

con un contenido de disolvente de 43.78 %. La estructura final (5VBK) contiene un dímero cuyos monómeros constan de 150 residuos y 123 moléculas de agua con valores de R y R_{free} finales de 18.3 y 22.5, respectivamente. La estadística de la colecta de datos y afinamiento de la estructura se muestran en la Tabla 4. El análisis de la estructura de MCL mostró un plegamiento de trébol β (β -trefoil) constituido por tres subdominios relacionados que se asemejan a las hojas del trébol. El cual se caracteriza por un alto contenido de hebras β (Figura 15A y 15B). Este plegamiento posee una pseudo simetría de orden 3 que consta de seis hebras β unidas por giros, tres de estas hebras forman un barril, parte del cual se encuentra dentro del arreglo triangular formado por las hebras β [47]. Los tres subdominios están estabilizados por la interacción de un residuo ácido de un subdominio con una histidina del siguiente subdominio (E75-H125, D27-H81, E119-H33) (Figura 15B). El plegamiento tipo trébol β está presente en al menos 14 diferentes familias de proteínas [86], entre ellas se encuentran las lectinas de tipo R presentes en la clasificación de lectinas animales propuesta por Drickamer [30].

Los mapas de densidad electrónica $2F_o-F_c$ y F_o-F_c nos permitieron observar que el glicerol que se utilizó como agente crio protector se encontraba en los tres sitios de reconocimiento a azúcares de la proteína en cada monómero (Figura 15C). Estos sitios fueron previamente descritos por Terada y colaboradores en la estructura cristalográfica de MGL en complejo con GalNAc (código PDB 3WMV), donde se observó un motivo HxDxH, la primera histidina (His32, His80 e His120) no establece puentes de hidrógeno[45]. Estos sitios de reconocimiento pertenecen a un dominio inusual tipo ricina B, donde las interacciones que se establecen con el glicerol son a través de puentes de hidrógeno con histidinas. Estas interacciones se establecen con al menos una histidina, una glicina y un grupo carboxilo de un ácido aspártico o un glutámico, con excepción del primer sitio de reconocimiento, en donde se requieren dos grupos carboxilos para establecer la unión con el glicerol (Figura 15B-C Tabla 5). La interacción con el glicerol involucra cinco puentes de hidrógeno en el primer sitio de reconocimiento, siete para el segundo y ocho para el tercer sitio. Se observó un número diferente de interacciones en cada sitio como se muestra en la Tabla 5. Cabe señalar que los sitios de reconocimiento a los ligandos fueron numerados conforme se

observaba la densidad electrónica para modelar, siendo el Sitio 1 donde primero se modeló el ligando y el 3 el último en aparecer.

El dímero que forma MCL está estabilizado por una interfaz con un área de 696 Å² por cadena polipeptídica donde se pueden observar interacciones hidrofóbicas de apilamiento de anillos entre Phe94 y Phe95, enlaces de hidrógeno y diversos puentes salinos (Figura 15D), lo que la hace muy estable. Terada y colaboradores [45] observaron que si se mutaban las dos fenilalaninas, sólo se obtenía la forma monomérica con muy poca actividad aglutinante y su actividad anticancerígena se perdía.

Un factor importante en el estudio de los determinantes estructurales que favorecen la oligomerización de este tipo de proteínas es la identificación de modificaciones postraduccionales, ya que en muchos casos intervienen en la formación de oligómeros al establecer interacciones intercatenarias. En las lectinas de la familia Mytilidae, en MGL y CGL se sugirió una acetilación en la Thr2 [40,47] que no está presente en la lectina de *M. californianus*; sin embargo, a diferencia de esas lectinas, la estudiada en este trabajo está glicosilada, como detectamos con los inmunoensayos [48].

Decidimos coleccionar datos en el sincrotrón de Stanford en la estación experimental 12-2 del SLAC buscando obtener una mayor resolución que nos permitiera determinar el sitio de la o las glicosilaciones y además utilizamos como agente crioprotector a la trealosa que mediante los ensayos de inhibición sabíamos que no inhibía la actividad de la lectina y por consiguiente no era reconocida por ella. La proteína cristalizó en el mismo grupo espacial y las dimensiones de celda fueron muy similares logrando alcanzar una resolución de 1.22 Å (Tabla 4). Como esperábamos, los sitios 1 y 2 estaban vacíos, pero fue interesante notar que en el sitio 3 había una molécula de trealosa. Esto indica que tenemos dos sitios altamente específicos y uno inespecífico que es capaz de reconocer diferentes ligandos. El hecho de que sólo se una a un sitio explica porque no inhibe la actividad aglutinante de la lectina, ya que quedan 2 sitios para poder establecer los complejos entrecruzados y la aglutinación. Fue interesante notar que la trealosa interacciona con los mismos residuos que el glicerol, sin embargo, se establecen puentes de hidrógeno adicionales con dos residuos más, la His125 y el Asp127 (Tabla 6).

Aún con los datos obtenidos a mayor resolución, no logramos modelar las glicosilaciones ya que, si bien existía densidad positiva, ésta se localizaba en aminoácidos ácidos como el Asp86 o el Glu38, para los cuales no se han descrito glicosilaciones; Las que se han descrito mayormente son las N y O-glicosilaciones. Las N-glicosilaciones involucran la unión de GlcNac al grupo amida de la cadena lateral de una Asparagina, la cual se encuentra dentro de un motivo de N-glicosilación que corresponde a Asn-X-Ser(Thr) donde X puede ser cualquier aminoácido excepto Pro. Este tipo de glicosilación ocurre en el retículo endoplásmico y el precursor de esta glicosilación es importante para el plegamiento adecuado de glicoproteínas que son transportadas al aparato de Golgi [87]. Las O-glicosilaciones involucran la unión del C-1 de GalNAc al hidroxilo de Ser o Thr. Esta glicosilación se cataliza en el aparato de Golgi [87]. Es importante mencionar que glicosilaciones que no se habían descrito con anterioridad ni tampoco sus implicaciones biológicas se han reportado recientemente sobre todo en invertebrados marinos [68,69]. Sin embargo, se requiere un análisis bioquímico más profundo para determinarlas con precisión.

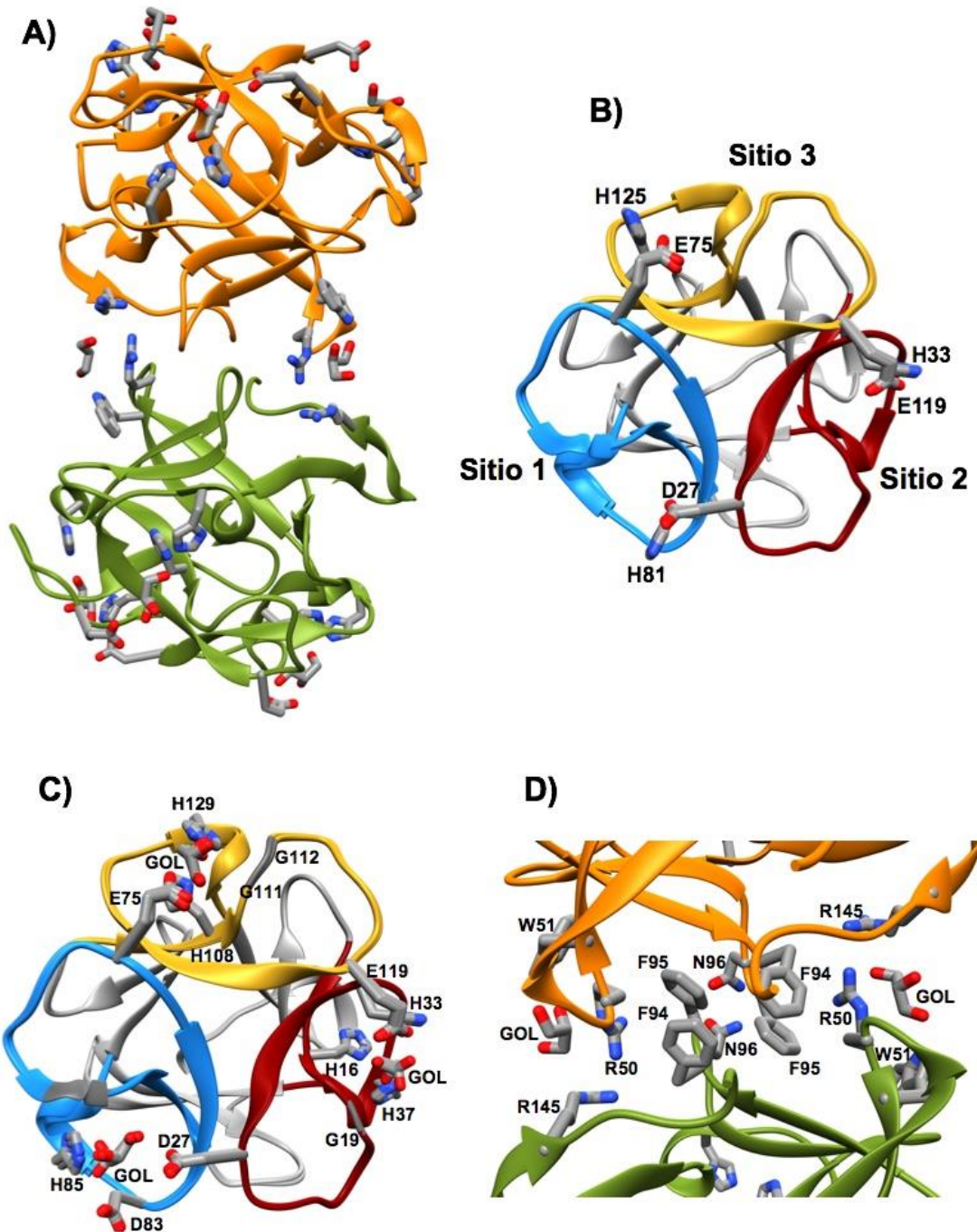


Figura 15. Estructura cristalográfica de MCL (5VBK). (A) La estructura presentó tres sitios de unión por cada una de las subunidades. (B) Superposición de los monómeros de MCL, cada monómero posee un plegamiento de trébol β y tres sitios de reconocimiento a carbohidratos (C) Interacciones involucradas en el reconocimiento al glicerol. (D) Interfaz del dímero establecida por puentes hidrógeno e interacciones hidrofóbicas.

Tabla 4. Estadística de la colecta de datos y afinamiento de las estructuras de la lectina de *Mytilus californianus*.

	MCL con glicerol como agente crioprotector	MCL con trealosa como agente crioprotector
Datos de la colecta		
Longitud de onda (Å)	1.54	0.97
Temperatura (K)	100	100
Grupo espacial	C ₁ 2 ₁	C ₁ 2 ₁
Dimensiones de la celda		
a,b,c (Å)	a = 81.4, b = 63.7, c = 66.3	a = 81.7, b = 63.9, c = 66.7
α, β, γ (°)	α = 90, β = 120.5, γ = 90	α = 90, β = 120.5, γ = 90
Contenido de disolvente (%)	43.78	44
Coeficiente de Matthews (Å ³ /Da)	2.19	2.21
Límite de resolución (Å)	35-1.79 (1.85-1.79)	31.96-1.35 (1.40-1.35)
Reflecciones únicas ^a	26332 (2078)	62126 (6152)
R _{merge} ^b	0.06 (0.31)	0.06 (0.53)
I/σ(I)	28.8 (2.13)	29.5 (0.77)
Integridad (%)	96.4 (83.9)	95.66 (94.76)
Multiplicidad	4.4 (2.3)	5.9 (1.5)
Factor B de Wilson (Å ²)	19.1	15.78
Estadística del afinamiento		
R ^c _{work} /R ^c _{free} (%)	18.3/22.5	18.8/19.4
No. de átomos de Proteína/disolvente	2406/214	2398/298
No. de moléculas de glicerol/trealosa	9/0	0/1
Valor B promedio (Å ²)	19.0	24.08
R.M.S.D. del ideal		
Longitud de enlace (Å)	0.010	0.012
Angulo de enlace (°)	1.06	1.49
Gráfico de Ramachandran (%)		
Región favorecida	98.0	96.61
Regiones permitidas	2.0	3.39
Regiones no permitidas	0	0
Código PDB	5VBK	En proceso

^aValores en paréntesis corresponden a la última capa de resolución.

^bR_{merge} = $\sum_j \sum_h (|I_{j,h} - \langle I_h \rangle|) / \sum_j \sum_h (\langle I_h \rangle)$, donde h es el índice de reflexión única, $I_{j,h}$ es la intensidad de la reflexión relacionada por simetría y $\langle I_h \rangle$ es la intensidad media.

^cR = $\sum_h || F_o|_h - |F_c|_h| / \sum_h |F_o|_h$ para todas las reflexiones, donde F_o y F_c son los factores de estructura observados y calculados respectivamente, y h define reflexiones únicas. R_{free} se calcula de manera análoga, estas reflexiones se seleccionan aleatoriamente y se excluyen del afinamiento (5%).

Tabla 5. Interacciones establecidas por el glicerol en los 3 sitios de reconocimiento de MCL.

Sitio de reconocimiento 1			Sitio de reconocimiento 2			Sitio de reconocimiento 3		
Donador	Distancia (Å)	Aceptor	Donador	Distancia (Å)	Aceptor	Donador	Distancia (Å)	Aceptor
OD1-Asp27	3.03	O1-GOL	NE2-His37	2.77	O1-GOL	NE2-His129	2.89	O1-GOL
N-Gly67	2.83	O1-GOL	NE2-His33	3.36	O2-GOL	ND1-His108	2.87	O1-GOL
N-Gly68	3.35	O2-GOL	ND1-His16	3.01	O1-GOL	N-Gly112	3.53	O2-GOL
NE2-His85	2.88	O3-GOL	OE2-Glu119	3.05	O2-GOL	O-Gly111	3.29	O2-GOL
OD2-Asp83	2.85	O3-GOL	OE2-Glu119	2.92	O3-GOL	N-Gly111	3.40	O2-GOL
			OE1-Glu119	2.90	O3-GOL	N-Gly111	3.02	O3-GOL
			N-Gly19	2.80	O3-GOL	OE2-Glu75	2.65	O3-GOL
						OE1-Glu75	3.28	O3-GOL

Tabla 6. Interacciones que establece la trealosa en el sitio de reconocimiento 3 de MCL.

Sitio de reconocimiento 3		
Donador	Distancia (Å)	Aceptor (Trealosa)
OD2-Asp127	2.62	O3-Glc1
NE2-His129	3.00	O3-Glc1
ND1-His108	2.85	O4-Glc1
ND1-His125	3.13	O4-Glc1
O-Gly111	3.33	O5-Glc1
N-Gly111	2.84	O6-Glc1
N-Gly112	3.13	O5-Glc1
OE1-Glu75	3.38	O6-Glc1
OE2-Glu75	2.73	O6-Glc1
NE2-His125	3.06	O2-Glc2
OE2-Glu75	2.72	O2-Glc2

8.10. Oligomerización inducida por el reconocimiento de su ligando en MCL

Para evaluar el efecto del ligando en la estructura de la lectina decidimos realizar pruebas de co-cristalización, adicionando por separado cada uno de los cuatro ligandos que reconoce MCL (galactosa, melibiosa, lactosa y rafinosa), desafortunadamente no obtuvimos cristales. Esto puede deberse a la fuerte tendencia de la lectina de formar oligómeros de gran tamaño que provoca que el proceso de supersaturación y nucleación sea muy rápido, lo que no permite un arreglo ordenado de las moléculas y la formación del cristal. Debido a esto, decidimos realizar ensayos remojando los cristales con 5mM de D-Galactosa (“soaking”). Fue interesante notar que en cuanto la galactosa estuvo en contacto con el cristal de la lectina, este se rompió. Sin embargo, se dejó interaccionando toda la noche y al día siguiente el cristal se había formado nuevamente. Este lucía con imperfecciones, pero se colectaron datos y sorprendentemente, estos difractaron a muy buena resolución (1.54 Å), sin embargo, observamos que si bien el cristal pertenecía al mismo grupo espacial (monoclínico C_{121}) las dimensiones de la celda habían cambiado, ahora era 48 Å más grande de uno de los lados. $a=115.08$ Å, $b=64.12$ Å, $c=82.03$ Å, $\alpha=90^\circ$, $\beta=97^\circ$, $\gamma=90^\circ$. Calculando el coeficiente de Matthews observamos que se trataba de un tetrámero en la unidad asimétrica (Tabla 7 Figura 16A). Es importante señalar que la oligomerización se forma a partir de la base dimérica, es decir es un dímero de dímeros. Esto fue muy interesante dado que sabíamos que los cristales crecidos en esa condición mostraban a la proteína en forma dimérica, sin embargo, como resultado de la adición de la galactosa, la proteína oligomerizó aún en un cristal ya formado. La interfaz formada por las subunidades A y B (dímero) tiene un área 724:730 Å² mientras que la C y D (segundo dímero) es más débil con un área de 704:712 Å². Fue interesante notar que la interacción entre los dímeros ocurre entre el monómero A de un dímero con el monómero B del otro dímero (cadena D en el PDB) y el B con el A (cadena C del PDB).

Tabla 7. Estadística de la colecta de datos y el afinamiento de MCL en complejo con Galactosa.

	MCL remojada con galactosa
Datos de la colecta	
Longitud de onda (Å)	1.54
Temperatura (K)	100
Grupo espacial	C ₁ 2 ₁
Parámetros de la celda unitaria a,b,c (Å)	a = 115.08, b = 64.12, c = 82.03
α, β, γ (°)	$\alpha = 90, \beta = 97, \gamma = 90$
Contenido de disolvente (%)	44.8
Coefficiente de Matthews (Å ³ /Da)	2.21
Límite de resolución (Å)	44.86-1.54(1.59-1.54)
Reflecciones ^a	86845 (8396)
R _{merge} ^b	0.076 (0.574)
I/ σ (I)	50.8 (3.0)
Integridad (%)	98.54 (96.38)
Multiplicidad	9.2 (4.5)
Factor B de Wilson (Å ²)	15.28
Estadística del afinamiento	
R _{work} /R _{free} ^c (%)	21/23.4
No. de átomos de Proteína/disolvente	4830/431
No. de moléculas de Galactosa	12
Promedio del factor B (Å ²)	20.43
R.M.S.D. del ideal	
Longitud de enlace (Å)	0.008
Angulo de enlace (°)	1.48
Gráfico de Ramachandran (%)	
Región mayormente favorecida	96.62
Regiones permitidas	3.38
Regiones no permitidas	0
Código PDB	En proceso

^aValores en paréntesis corresponden a la última capa de resolución.

^bR_{merge} = $\sum_j \sum_h (|I_{j,h} - \langle I_h \rangle|) / \sum_j \sum_h (\langle I_h \rangle)$, donde h es el índice de reflexión única, $I_{j,h}$ es la intensidad de la reflexión relacionada por simetría y $\langle I_h \rangle$ es la intensidad media.

^cR = $\sum_h || F_o|_h - |F_c|_h | / \sum_h |F_o|_h$ para todas las reflexiones, donde F_o y F_c son los factores de estructura observados y calculados respectivamente, y h define reflexiones únicas. R_{free} se calcula de manera análoga, estas reflexiones se seleccionan aleatoriamente y se excluyen del afinamiento (5%).

8.10.1. Descripción de los sitios de reconocimiento

En la estructura de MCL en presencia de galactosa se pudieron establecer con precisión los sitios de reconocimiento de carbohidratos, que corresponden a los sitios donde se unió el glicerol en las estructuras previas. En el Sitio 1 la interacción ocurre entre la galactosa y los aminoácidos Asp83, Asp27, His85, His64, Gly67 y Gly68 con un total de 8 enlaces de hidrógeno. En el segundo sitio, los puentes de hidrógeno se establecen entre la galactosa y los aminoácidos Asp35, His37, His16, Gly19, Gly20, y Glu119 formando 10 enlaces de hidrógeno. El último sitio en ocuparse, lo llamamos Sitio 3 y en este, la galactosa forma puentes de hidrógeno con los residuos Gly111, Asp127, His129, His108, Gly111, Gly112 y Glu75, estableciéndose 11 enlaces de hidrógeno (Tabla 8)

Tabla 8. Puentes de hidrógeno que establecen la galactosa con cada uno de los sitios de reconocimiento de MCL.

Sitio de reconocimiento 1			Sitio de reconocimiento 2			Sitio de reconocimiento 3		
Donador	Distancia (Å)	Aceptor	Donador	Distancia (Å)	Aceptor	Donador	Distancia (Å)	Aceptor
OD1-Asp83	2.62	O3-Gal	OD2-Asp35	3.08	O3-Gal	O-Gly111	2.64	O1-Gal
NE2-His85	3.17	O3-Gal	NE2-His37	3.05	O3-Gal	OD2-Asp127	2.33	O3-Gal
NE2-His85	3.07	O4-Gal	NE2-His37	2.94	O4-Gal	NE2-His129	3.08	O3-Gal
ND1-His64	2.77	O4-Gal	ND1-His16	2.74	O4-Gal	NE2-His129	3.10	O4-Gal
N-Gly68	3.32	O5-Gal	O-Gly19	3.40	O5-Gal	NE1-His108	2.67	O4-Gal
O-Gly67	3.37	O5-Gal	N-Gly20	3.20	O5-Gal	N-Gly111	3.35	O5-Gal
N-Gly67	3.08	O6-Gal	OE2-Glu119	2.94	O6-Gal	N-Gly112	3.16	O5-Gal
OD1-Asp27	2.54	O6-Gal	OE1	3.31	O6-Gal	O-Gly111	3.36	O5-Gal
			N-Gly19	2.77	O6-Gal	N-Gly111	2.77	O6-Gal
			O-Gly19	3.07	O1-Gal	OE1-Glu75	3.27	O6-Gal
						OE2-Glu75	3.43	O6-Gal

Con el fin de identificar cambios estructurales que pudieran originar la oligomerización de la proteína, se realizó la superposición de los monómeros en ausencia y en presencia del ligando utilizando el servidor 3dSS (<http://cluster.physics.iisc.ernet.in/3dss/>). Logramos identificar que el principal movimiento se observa en el Sitio 1 donde la His85, la Arg87 y las Gly67 y Gly68 se acercan en dirección del ligando. También se observó un cambio en la disposición de los dímeros, en donde el monómero D del segundo dímero se acerca hasta 2.5 Å al monómero B del primer dímero favoreciendo la estabilización del tetrámero (Figura 16B y 16C). La galactosa del Sitio 1 del monómero C establece un puente de hidrogeno con el ND2 de la Asn115 de la cadena B (Figura 16). Analizando las moléculas relacionadas por simetría observamos más de estas interacciones proteína-carbohidrato.

La galactosa del sitio de reconocimiento 3 (donde interviene el Glu75) del monómero A establece un puente de hidrógeno entre el oxígeno 2 con el oxígeno OD2 del Asp45 de la molécula de simetría A. Esta galactosa establece tres puentes de hidrogeno, el primero y el segundo se establecen entre el oxígeno 2 del azúcar, con el OD2 del Asp45 y con el nitrógeno NZ de la Lys55 de la molécula de simetría C, el tercer puente de hidrógeno se forma entre el oxígeno 1 de la galactosa y el ND2 de la Arg84. También fue posible identificar interacciones carbohidrato-carbohidrato como la que establecen las galactosas presentes en el el sitio de reconocimiento 2 del monómero A y C de simetría respectivamente que establecen un puente de hidrógeno entre los oxígenos 1 de la galactosa del monómero A y el oxígeno 2 del monómero C de simetría. Durante el análisis de la estructura observamos que los primeros sitios de reconocimiento que se ocupan son los Sitios 1 (donde aparece la densidad desde el primer ciclo de afinamiento), región que pertenece a un asa en donde interviene la Gly68 que forma parte de un sitio de reconocimiento, que al reconocer el ligando sufre un desplazamiento que favorece la formación de la interfaz entre A y D. Este análisis nos permitió determinar que el Sitio 1 es el responsable de la oligomerización en MCL.

Reportes previos con MGL, que es la lectina con la que MCL comparte 100% de identidad, mostraron que en solución se encuentra como monómero, resultado que

posteriormente Terada y colaboradores descartaron debido a que resultados de centrifugación analítica mostraban que se trataba de un dímero en disolución [45].

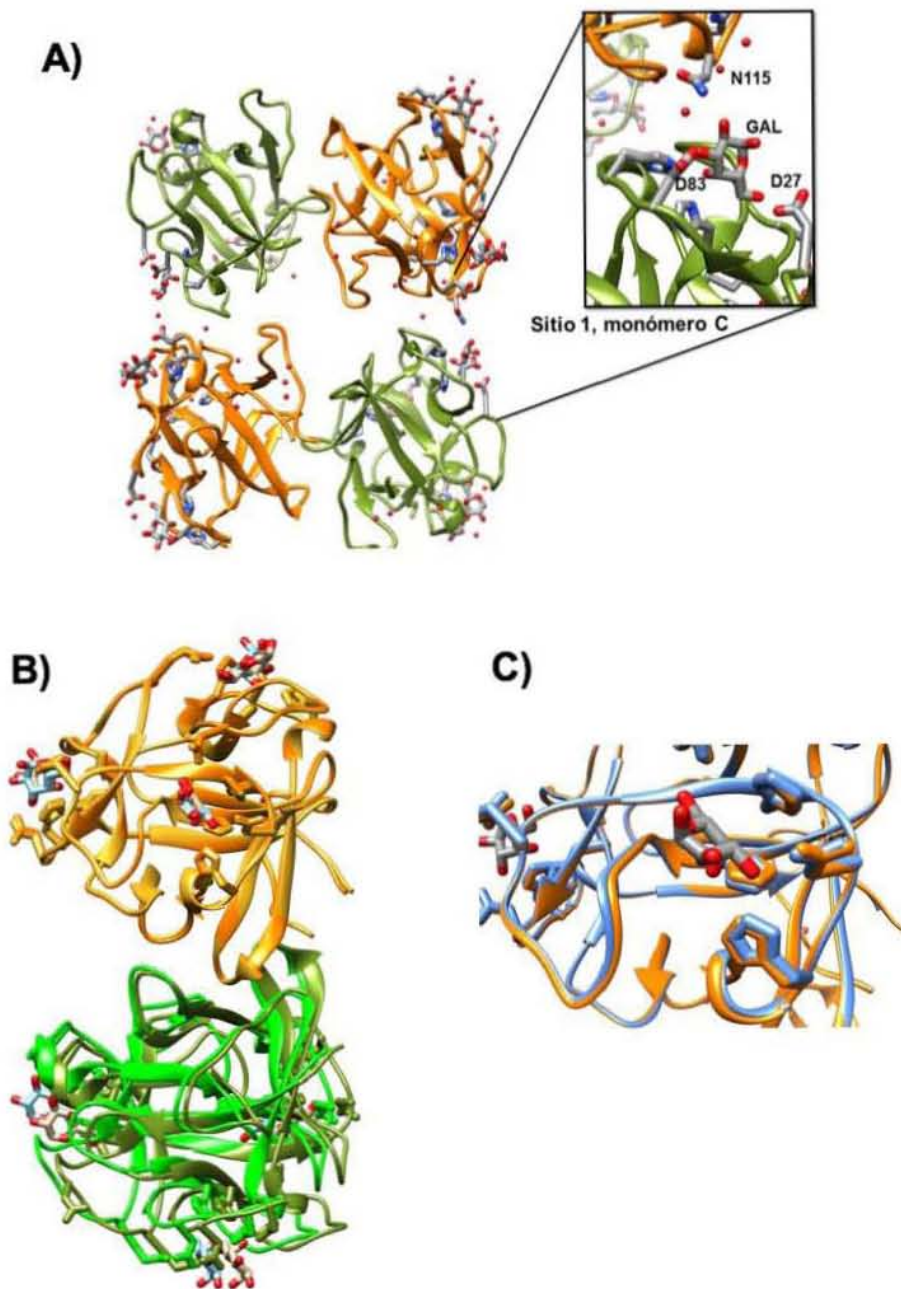


Figura 16. Estructura de MCL remojada con galactosa. A) Dímero de dímeros encontrado en la unidad asimétrica. Se observa que al interactuar con el ligando se favorecen interacciones proteína-carbohidrato. B) superposición de dímeros C) superposición del Sitio 1 con y sin galactosa

8.11. Clonación y sobreexpresión de una isoforma de la lectina de *Mytilus californianus* (rMCL-1)

Con el fin de obtener a la lectina en cantidades que nos permitieran realizar un estudio más completo de sus mecanismos de oligomerización y de la importancia del reconocimiento del ligando en esta, decidimos obtener a la proteína de forma recombinante. Para esto, elegimos un sistema de expresión que nos permitiera obtenerla sin glicosilaciones, con el fin de disminuir la tendencia a oligomerizar y poder obtener cristales adecuados de la proteína con los diferentes ligandos que reconoce. Para lograr lo anterior el gen amplificado de MCL previamente clonado en el vector pJET (Vector de clonación).

Al probar diferentes polimerasas se observó que el gen se logró amplificar con la polimerasa Kappa. El gen amplificado (Figura 17) se purificó del gel cortando y purificando la banda correspondiente al tamaño esperado de 475 pb.

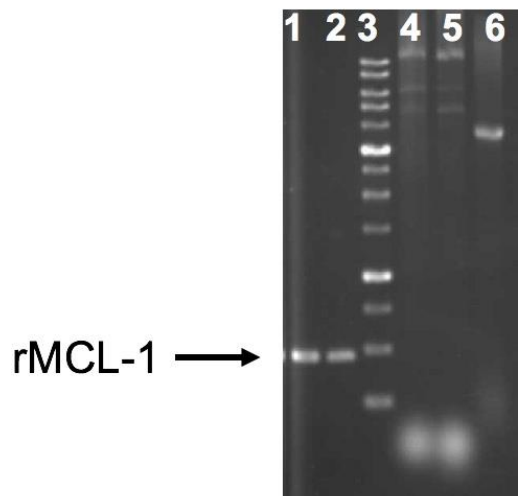


Figura 17. Amplificación del gen de MCL. Carriles: 1 y 2 duplicados de la reacción con la polimerasa Kappa; carril 3, marcador de peso molecular 1kbp, carriles 4 y 5 amplificación con polimerasa KOD, carril 6 amplificación con polimerasa Fusión.

De las 12 clonas revisadas obtuvimos 10 que corresponden con la secuencia (Figura 18) de las que seleccionamos los carriles 5, 8, 9 y 10 de donde se purificó el vector pET28-MCL para enviar a su secuenciación (Figura 19). Este resultado dio positivo para todas las clonas enviadas.

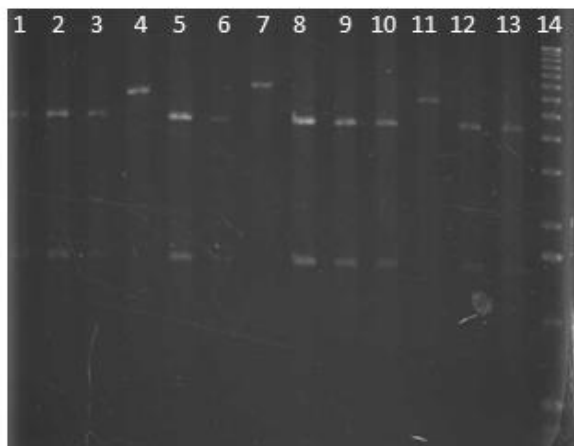


Figura 18. Análisis de restricción con NdeI/HindIII de las muestras de DNA plasmídico. Carriles 1-6 y 8-13 diferentes muestras, carril 7, vector pET28, carril 14 marcador de peso molecular

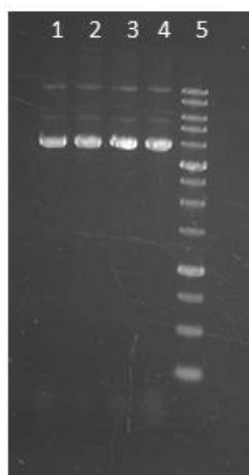


Figura 19. DNA plasmídico del vector pET28-MCL purificado a partir de gel. Carriles 1-4 muestras, carril 5 marcador de peso molecular.

Para los ensayos de sobreexpresión de rMCL-1, se evaluaron dos cepas: Rosetta y BL21 Ril. En la primera inducción se puede observar que la mayoría de la proteína se localiza en cuerpos de inclusión (Figura 20).

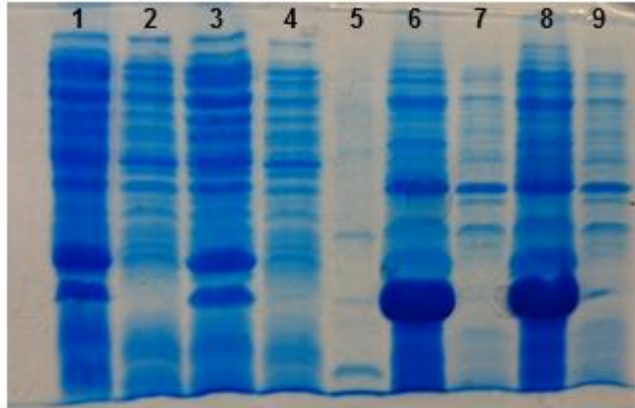


Figura 20. Expresión preliminar en células Rosetta a 37 °C con 0.5 mM de IPTG. Los carriles 2 y 4 corresponden a la fracción soluble a las 0 horas (sin inducir). Los carriles 7 y 9 a la fracción insoluble a las 0 horas (sin inducir). Los carriles 1 y 3 corresponden a la fracción soluble con 16 hrs. de incubación después de la inducción. Los carriles 6 y 8 corresponden a la fracción insoluble con 16 hrs. de incubación después de la inducción. En el carril 5 se observan los marcadores de masa molecular.

Con el fin de evitar que la proteína se fuera a cuerpos de inclusión, decidimos probar otras cepas de *E. coli* (π DE3 y BL21) a dos diferentes temperaturas de inducción (30 y 37 °C) para optimizar la sobre expresión en la parte soluble. El resultado de este análisis demostró que la mayor producción en la fracción soluble se logró con células Rosetta a 37 °C (Figura 21), si bien la cantidad de proteína en la fracción soluble era mayor, en el primer paso de purificación, la proteína se agregaba en un 80%, por lo que decidimos disminuir la temperatura de inducción y hacerla a 18 °C.

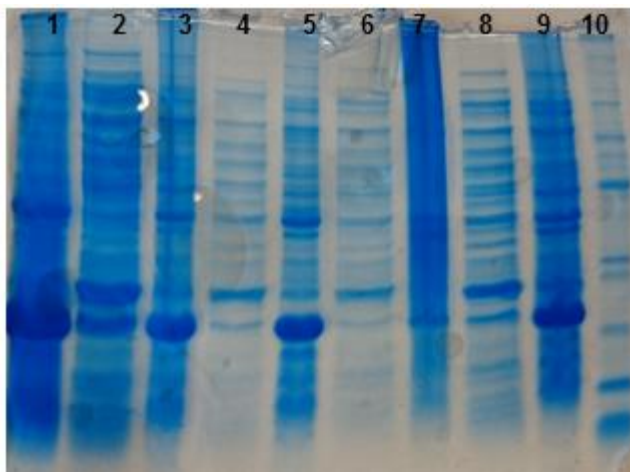


Figura 21. Expresión de MCL en células Rosetta a 18 °C con 0.2 mM de IPTG. Se observó que el tiempo óptimo de inducción fue a las 16 horas en la fracción soluble carril 1. Los carriles 2,4,6 y 8 corresponden a la fracción insoluble a los tiempos de inducción de 16 18, 20 y 22 horas. Las fracciones 1,3,5,7 y 9 corresponden a la fracción soluble en los tiempos 16 18, 20, 22 y 24 horas.

8.12. Purificación de rMCL-1

La proteína eluída de la columna de níquel se cortó con la enzima del virus de Tabaco (TEV) para eliminar la etiqueta de histidinas. Nuevamente se utilizó la resina de níquel para eliminar la TEV y la etiqueta de histidinas y obtener a la proteína pura y activa (Figura 22).

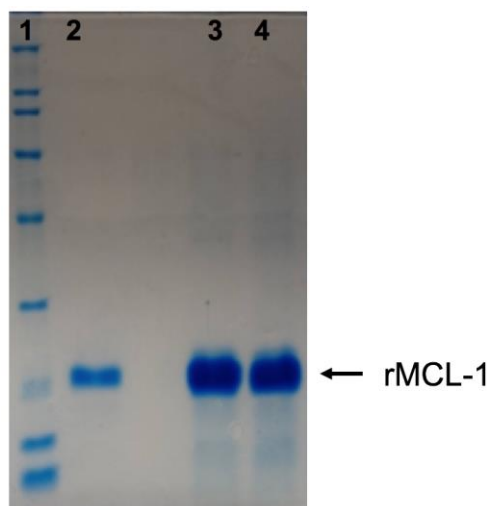


Figura 22. Purificación de rMCL-1, carril 1 marcadores de peso molecular, carril 2 rMCL-1 pura, carril 4 rMCL-1 después del corte con TEV, carril 5 elución de rMCL-1 de la columna de níquel.

8.13. Estudios de Calorimetría de Titulación Isotérmica

Las isotermas de unión obtenidas para rMCL-1 se muestran en la Figura 23. Las constantes de asociación para rMCL-1 deducidas de los ajustes de mínimos cuadrados de las ecuaciones no lineales obtenidas a partir de Origin fueron del orden milimolar. En el caso de la galactosa, la isoterma se ajustó a un modelo de sitios independientes con una constante de asociación de $4.5 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$, entálpicamente dirigida con un $\Delta H = -6.08 \text{ kcal/mol}$. Estos valores de entalpía sugieren la formación de nuevas interacciones, especialmente de puentes de hidrogeno que tienen una mayor aportación entálpica en el proceso de unión. Esto podemos corroborarlo con la estructura cristalográfica obtenida de rMCL-1 en donde observamos que las interacciones que intervienen en el reconocimiento al ligando están mediadas por puentes de hidrógeno en los tres sitios de reconocimiento, siendo la entalpía un parámetro termodinámico relevante para la interacción. La constante de asociación y la estequiometría obtenidas con galactosa se encuentran dentro de los intervalos obtenidos para MGL, en la que se evaluó su asociación a N-acetil-D-galactosamina, y donde se obtuvo una estequiometría de 2.4 ± 0.4 de ligando por monómero, es importante mencionar que al igual que la galactosa la N-acetil-D-galactosamina es un monosacárido.

En el caso de la melibiosa el ajuste empleado fue también de sitios independientes con una constante de asociación de $3.11 \times 10^3 \pm 32.4 \text{ M}^{-1}$. En el caso de los oligosacáridos α -lactosa y rafinosa, el mejor ajuste es de unión secuencial de 3 sitios como se muestra en la Figura 23. En el caso de la interacción con α -Lactosa al calcular el valor del ΔG^0 , para cada uno de los sitios (-7.2, -5.6 y -4.27 kcal/mol) se observa que la reacción es exergónica y que la entalpía es favorable en los tres sitios, aunado al hecho de que en los tres sitios la reacción está entálpicamente direccionada. Es importante mencionar que al analizar las constantes de asociación de cada sitio de unión se observa cooperatividad negativa, ya que los primeros sitios que se saturan son los de mayor afinidad. En el caso de la rafinosa la isoterma se ajustó a un modelo de unión secuencial de tres sitios con constantes de unión de: $2.56 \times 10^4 \pm 2.6 \times 10^4$, $5.09 \times 10^5 \pm 2.7 \times 10^4$, $2.72 \times 10^3 \pm 57 \text{ M}^{-1}$. Este tipo de cooperatividad fue reportado en

CGL, esta lectina que posee 88% de identidad con rMCL-1 presentó valores de K_d significativamente diferentes para cada sitio de unión. Estos valores fueron obtenidos mediante experimentos de titulación por resonancia magnética nuclear y los valores de K_d reportados para los tres sitios se encontraban en el intervalo del orden μM (168 ± 67 , 1288 ± 259 y $815 \pm 57\mu\text{M}$), al comparar este resultado con las constantes de disociación de rMCL-1 se observa que ambas lectinas tienen un reconocimiento independiente por su respectivo ligando en cada sitio [80].

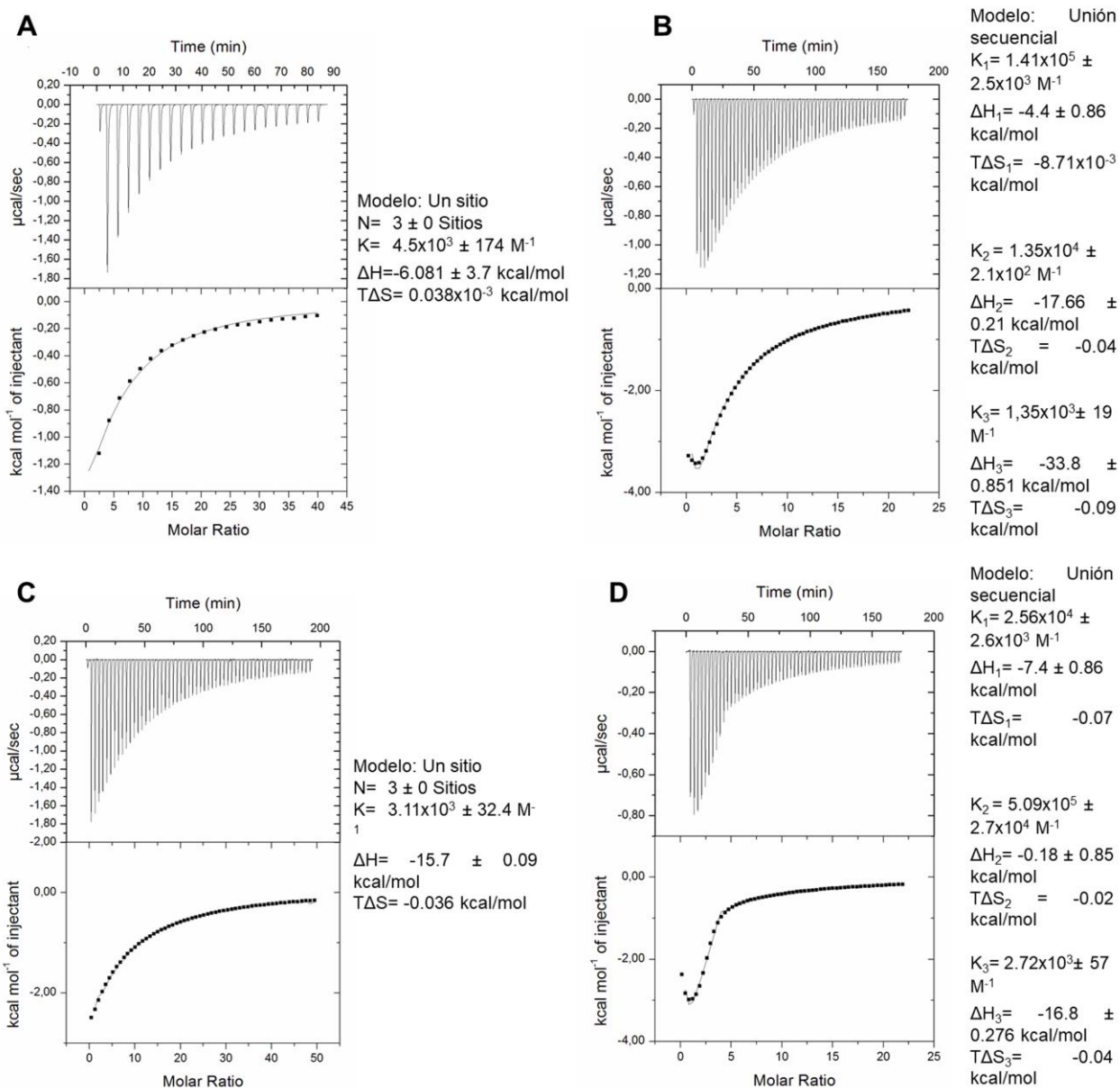


Figura 23. Isothermas y parámetros termodinámicos obtenidos por calorimetría de titulación isotérmica de la interacción de la isoforma de la lectina de *M. californianus*, con sus diferentes ligandos. En presencia de D-Galactosa (A), α -Lactosa (B), melibiosa (C), rafinosa (D).

8.14. Estudio comparativo entre las lectinas de *M. californianus* MCL y rMCL-1

El proceso de oligomerización de proteínas puede ser desencadenada por diversos factores como un mecanismo para regular su función biológica, algunos determinantes estructurales que pueden favorecer este comportamiento de asociación, pueden ser interacciones hidrofóbicas, interacciones electrostáticas o incluso algunas modificaciones postraduccionales como fosforilaciones o glicosilaciones, ya que muchas de éstas pueden establecer interacciones con los aminoácidos de la cadena polipeptídica y desencadenar este fenómeno. La identificación de glicosilaciones en MCL nos llevó a pensar que esta modificación podría ser la causa de la formación de oligómeros de gran tamaño. Es por esto que decidimos obtener a rMCL-1 en un sistema bacteriano que no permitiera dicha glicosilación y de esta manera podríamos estudiar el efecto en su comportamiento de asociación, función biológica, estabilidad y especificidad.

Mediante ensayos de inhibición de la actividad hemaglutinante observamos que rMCL-1 reconocía los mismos azúcares que MCL, sin embargo, se incrementó su especificidad por α -lactosa (Tabla 9). Además, también observamos que la actividad disminuyó un orden de magnitud en comparación con MCL (actividad específica de 6.4×10^3 para rMCL-1 contra 2.54×10^4 para MCL). También comparamos la estabilidad térmica de ambas lectinas utilizando la termofluorescencia y observamos que el valor de T_m en rMCL-1 disminuye casi a la mitad (37°C) (Figura 24). Sin embargo, al adicionarle galactosa la estabilidad se incrementaba hasta llegar al mismo valor obtenido con la lectina purificada del organismo (T_m de 94°C). Estos resultados confirman que la glicosilación es importante para la estabilidad y la actividad biológica de la lectina y que la unión con el ligando aumenta la estabilidad de ambas proteínas

Tabla 9. Comparación de las especificidades de MCL vs rMCL-1

Concentración mínima inhibitoria* (mM)			
MCL		rMCL-1	
Galactosa	2mM	Galactosa	62.5mM
Rafinosa	4mM	Rafinosa	15.62mM
Melibiosa	8mM	Melibiosa	15.62mM
α -Lactosa	62mM	α -Lactosa	8mM

*Concentración mínima del azúcar, requerida para inhibir la actividad hemaglutinante de MCL.

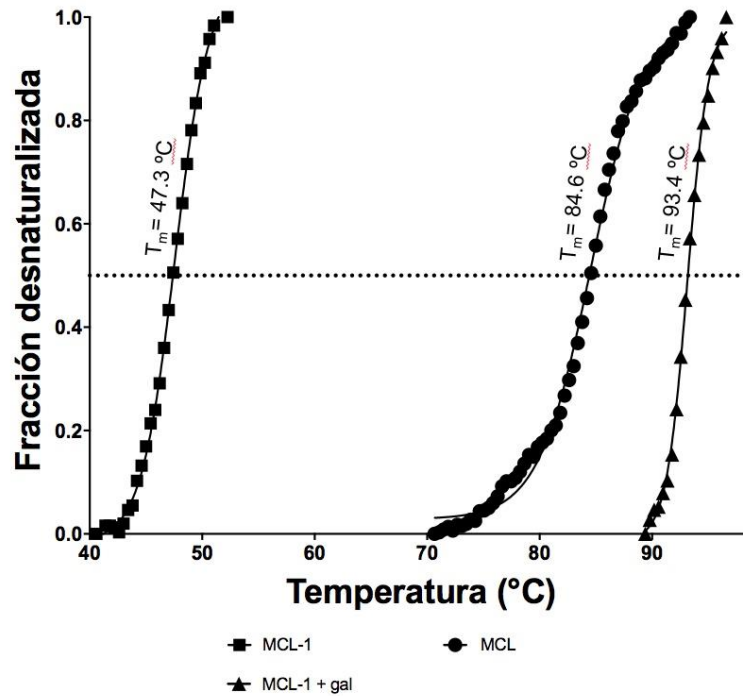


Figura 24. Comparación de la estabilidad térmica de MCL y rMCL-1. La estabilidad térmica de rMCL-1 disminuye 37°C con respecto a la obtenida del mejillón.

8.15 Estructura de la isoforma recombinante de la lectina de *M. californianus*

La lectina de *M. californianus* rMCL-1 al igual que la obtenida de la fuente natural cristalizó como un dímero en la unidad asimétrica y presentó el plegamiento de trébol β típico de los miembros de la familia Mytilidae (Figura 25 A). Al igual que en MCL encontramos que las Phe94 y Phe95 se encuentran en la misma posición en la interfaz realizando el apilamiento de anillos característico. También se identificaron tres sitios de reconocimiento por monómero, los cuales se encontraban ocupados por una molécula de glicerol (Figura 25B), el análisis de superposición de los dímeros de MCL y rMCL-1 realizado por 3dSS (<http://cluster.physics.iisc.ernet.in/3dss/>) mostró un RMSD de 0.35 Å y la superposición de los monómeros de MCL y rMCL-1 presentó un RMSD de 0.234 (Figuras 25C y 25D), lo que indica de que son prácticamente iguales estructuralmente. Al analizar exhaustivamente las regiones que presentaron cambios entre los dímeros encontramos cinco con cambios representativos a nivel de cadena principal, estas regiones se ubican del residuo 15-20, 65-75, 85-90 y del 135 al 142 (Figura 25E), sin embargo, al realizar la superposición de los monómeros no se observaron cambios significativos lo que implica que sólo existe un cambio en la orientación en la interfaz de los dímeros.

Durante los ciclos de afinamiento de la estructura de la proteína obtenida de forma recombinante, se lograron observar las tres mutaciones que habíamos identificado en su secuencia (Figura 26). Al analizar el gen obtenido del DNA genómico del organismo observamos que esta isoforma también existía en el organismo. Es importante mencionar que los aminoácidos que difieren en rMCL-1 no forman parte ni de los sitios de reconocimiento de carbohidratos ni de la interfaz.

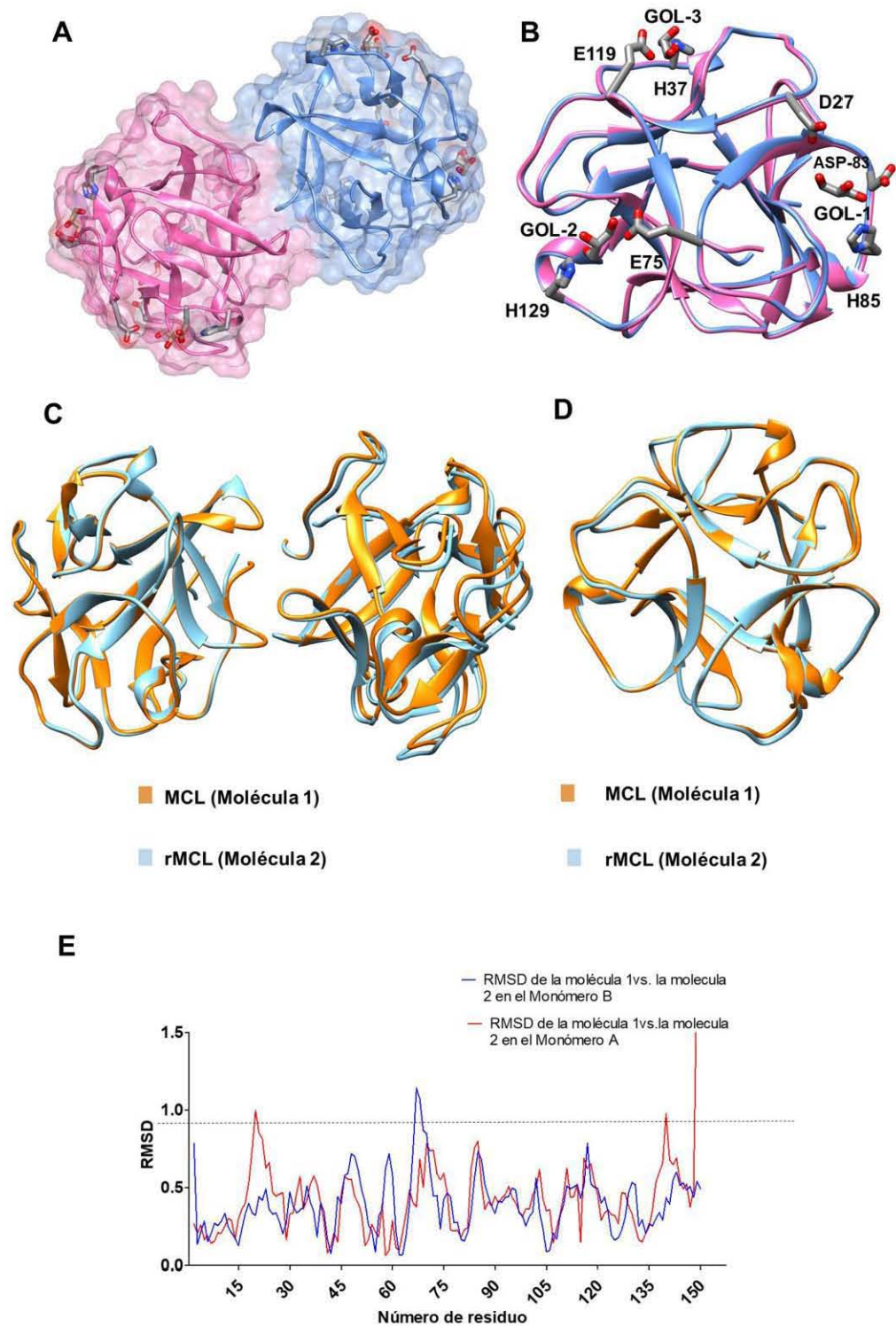


Figura 25. Dímero de rMCL-1 presenta un plegamiento de trébol β (A). Cada dominio de reconocimiento a carbohidratos presenta tres sitios (B). superposición de los dímeros de MCL y rMCL-1 (C). Superposición de los monómeros A y B de MCL y rMCL-1 (D). Regiones que presentaron cambios durante la superposición de los dímeros (E).

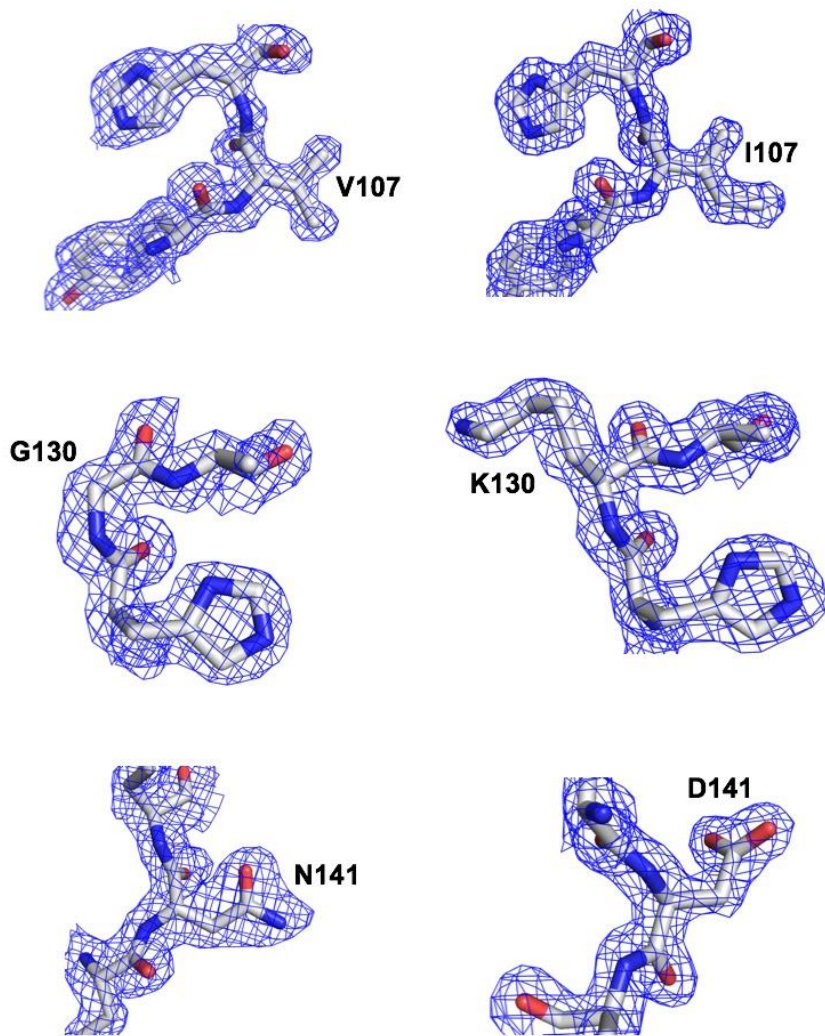


Figura 26. Mapa de densidad electrónica 2Fc-Fc a 1σ de las mutaciones que presenta rMCL-1. Del lado izquierdo se observan las mutaciones de rMCL-1 y del lado derecho los residuos que corresponden a MCL.

8.16. Oligomerización de rMCL-1 inducida por el reconocimiento a su ligando

Los primeros estudios de cristalización que realizamos en rMCL-1 fueron “remojando” el cristal con rafinosa. Con este método se obtuvo un dímero en la unidad asimétrica como se había obtenido en ausencia de ligando, con la diferencia de que

los 6 sitios de reconocimiento se encontraban ocupados por moléculas de rafinosa. En la Tabla 10 se muestra la estadística de la colecta y afinamiento

Observamos que el reconocimiento del ligando se realiza con los mismos aminoácidos observados con MCL (Tabla 8). Es relevante resaltar que todos los miembros reportados para esta nueva familia de lectinas no poseen ningún aminoácido aromático interaccionando con el ligando en los sitios de reconocimiento, contrario a lo propuesto por Drickamer, quien establece que en las familias de lectinas animales es esencial la presencia de un aminoácido aromático que establezca interacciones de apilamiento de anillos con los azúcares que reconocen. La estructura cristalográfica nos permitió definir con precisión que el reconocimiento de la rafinosa se hace mediante el reconocimiento del anillo de galactosa (Figura 27). En la Tabla 11 se pueden observar las interacciones que establece la rafinosa en cada sitio de reconocimiento, se observa que en los sitios de mayor especificidad hay menos enlaces de hidrógeno, de acuerdo a las constantes de afinidad obtenidas por ITC para cada sitio. Los análisis de calorimetría de titulación isotérmica sugieren que la interacción de rMCL-1 con la rafinosa se lleva a cabo mediante un modelo de unión secuencial de tres sitios en los cuales no se observó cooperatividad, el primer sitio en el que se identificó la interacción con el ligando fue en el Sitio 2, el cual hace referencia al sitio que presenta una constante de asociación de $2.56 \times 10^4 \pm 2.6 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$, el segundo sitio en donde se modeló el ligando fue el Sitio 1 con una constante de asociación de $5.09 \times 10^5 \pm 2.7 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ y el tercer sitio que corresponde al sitio que nombramos como Sitio 3 que es el de menos afinidad con una constante de asociación de $2.7 \times 10^3 \pm 57 \text{ M}^{-1}$

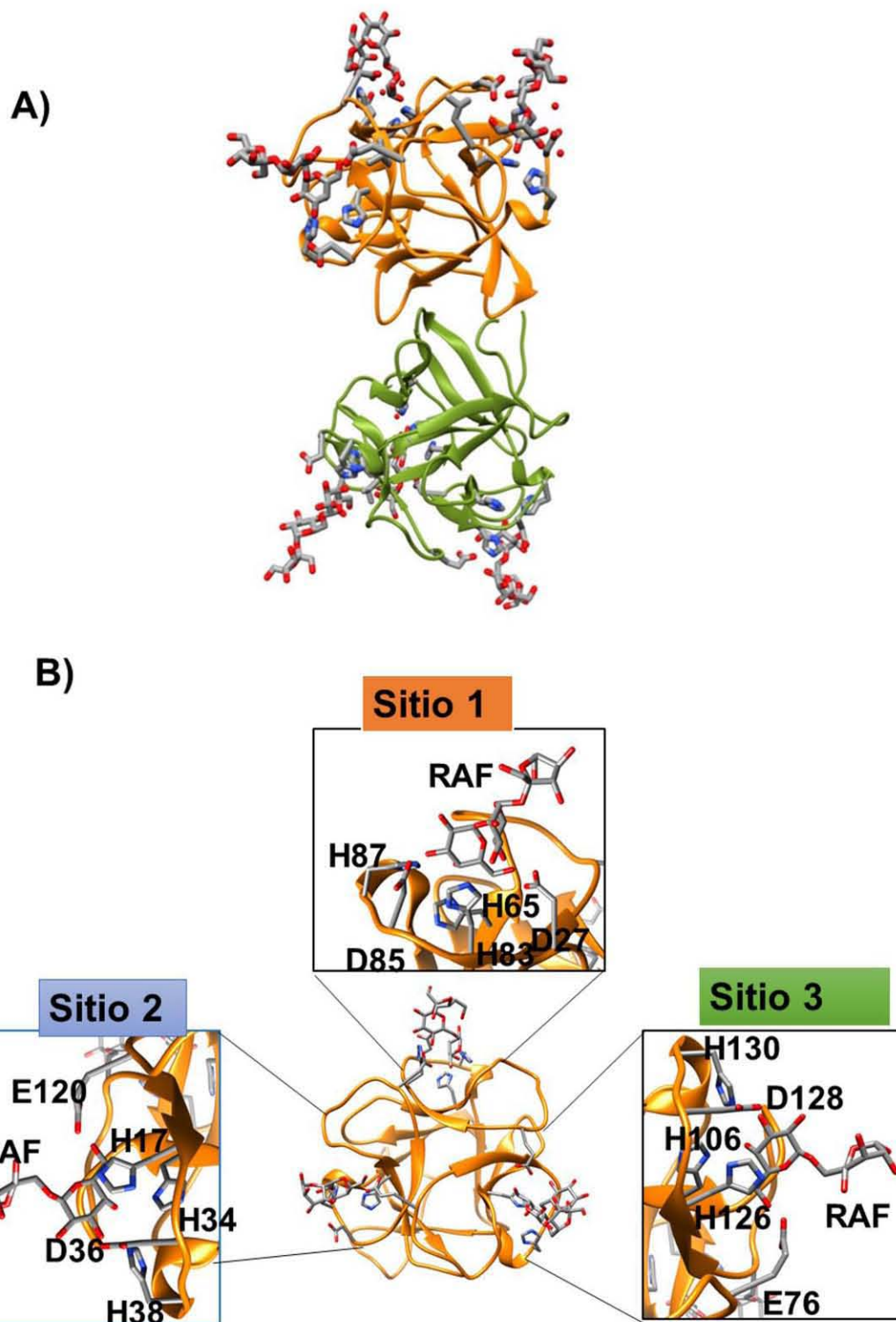


Figura 27. Estructura de rMCL-1 en presencia de rafinosa. A) La estructura se obtuvo con un cristal remojado con 5 mM de rafinosa donde se observa un dímero en la unidad asimétrica. B) Interacción de la rafinosa en cada sitio del monómero A.

Tabla 10. Estadística de la colecta de datos y del afinamiento de rMCL y rMCL en complejo con rafinosa obtenida por “remojo”

	MCL-1	MCL-1raf (remojo)
Datos de la colecta		
Longitud de onda (Å)	1.54	1.54
Temperatura (K)	100	100
Grupo espacial	P2 ₁	P2 ₁
Dimensiones de la celda (Å)	a = 56.9, b = 41, c = 66 $\alpha = 90, \beta = 106.5, \gamma = 90$	a = 56.9, b = 40.9, c = 65.8 $\alpha = 90, \beta = 106.5, \gamma = 90$
Contenido de disolvente (%)	43	43
Coeficiente de Matthews (Å ³ /Da)	2.18	2.17
Límite de resolución (Å)	36.5-1.74 (1.8-1.74)	36.46-1.58 (1.64-1.58)
Reflecciones ^a	30192 (2984)	39779 (3729)
R _{merge} ^b	0.079	0.094
I/ σ (I)	96.8 (12.8)	53.7(4.7)
Integridad (%)	99.3 (93.9)	99.9 (98.8)
Multiplicidad	18.4 (5.1)	8.4(3.8)
Factor B del gráfico de Wilson (Å ²)	18.7	17.6
Estadística del afinamiento		
R _{work} /R _{free} ^c (%)	14.6/18.5	16.6/20.0
No. de átomos de;		
Proteína/disolvente	2796/311	2754/161
Promedio del factor B (Å ²)	18	16.77
Valores de RMSD ideales:		
Longitud de enlace (Å)	0.01	0.008
Angulo de enlace (°)	1.12	1.13
Gráfico de Ramachandran (%)		
Región mayormente favorecida	98	98
Regiones permitidas	2	2
Regiones no permitidas	0	0
Codigo PDB	En proceso	En proceso

^aValores en paréntesis corresponden a la última capa de resolución.

^bR_{merge} = $\sum_j \sum_h (|I_{j,h} - \langle I_h \rangle|) / \sum_j \sum_h (\langle I_h \rangle)$, donde h es el índice de reflexión única, $I_{j,h}$ es la intensidad de la reflexión relacionada por simetría y $\langle I_h \rangle$ es la intensidad media.

^cR = $\sum_h || F_o|_h - |F_c|_h | / \sum_h |F_o|_h$ para todas las reflexiones, donde F_o y F_c son los factores de estructura observados y calculados respectivamente, y h define reflexiones únicas. R_{free} se calcula de manera análoga, estas reflexiones se seleccionan aleatoriamente y se excluyen del afinamiento, (5%).

Tabla 11 interacciones que establece la rafinosa en cada sitio de reconocimiento del monómero A.

Sitio de reconocimiento 1			Sitio de reconocimiento 2			Sitio de reconocimiento 3		
Donador	Distancia (Å)	Aceptor Rafinosa	Donador	Distancia (Å)	Aceptor Rafinosa	Donador	Distancia (Å)	Aceptor Rafinosa
OD2-Asp83	3.38	O3-Gal	OD2-Asp35	2.65	O3-Gal	OD1-Asp127	2.57	O2-Gal
NE2-His85	2.62	O3-Gal	NE2-His37	2.99	O3-Gal	NE2-His129	2.65	O3-Gal
NE2-His85	2.64	O4-Gal	NE2-His37	2.75	O4-Gal	ND1-His108	3.02	O3-Gal
ND1-His64	3.12	O4-Gal	ND1-His16	2.96	O4-Gal	ND1-His108	3.34	O4-Gal
OD1-Asp27	3.08	O6-Gal	N-Gly20	3.29	O5-Gal	O-Pro109	3.26	O4-Gal
N-Gly67	2.99	O6-Gal	O-Gly19	3.28	O5-Gal	N-Gly112	3.48	O4-Gal
O-Pro65	3.42	O6-Gal	OE1-Glu119	2.76	O6-Gal	O-Gly111	3.33	O5-Gal
			OE2-Glu119	3.24	O6-Gal	OE1-Glu75	3.06	O6-Gal
			N-Gly19	3.11	O6-Gal	OE2-Glu75	3.26	O6-Gal
						N-Gly111	3.10	O6-Gal
						NE2-His125	3.52	O6-Fru

8.16.1. Oligomerización inducida por la adición de rafinosa

Al igual que con MCL decidimos montar pruebas de cristalización de rMCL-1 en co-cristalización con sus diferentes ligandos. Iniciamos con rafinosa y fue interesante notar que el grupo espacial en que cristalizó fue el monoclinico $P12_1$ con dimensiones de celda $a = 56.9$, $b = 65.8$, $c = 106.5$ Å y $\alpha = 41$, $\beta = 90$, $\gamma = 90$, que eran mayores a las obtenidas por “remojo” ($a = 56.9$, $b = 40.9$, $c = 65.8$ y $\alpha = 90$, $\beta = 106.5$, $\gamma = 90$). En presencia de rafinosa la proteína forma un oligómero formado por 8 monómeros en la unidad asimétrica (un tetrámero de dímeros) (Tabla 12, Figura 28)

Tabla 12. Estadística de la colecta de datos y del afinamiento de rMCL en co-cristalización con α -lactosa y rafinosa.

	rMCL-1 co-cristalización con lactosa	rMCL-1 co-cristalización con rafinosa
Datos de la colecta		
Longitud de onda (Å)	1.54	1.54
Temperatura (K)	100	100
Grupo espacial	P ₁ 2 ₁	P ₁ 2 ₁
Dimensiones de la celda (Å)	a = 63.9, b = 77.8, c = 155.8 $\alpha = 90.8, \beta = 90.04, \gamma = 90$	a = 56.9, b = 65.8, c = 106.5 $\alpha = 41, \beta = 90, \gamma = 90$
Contenido de disolvente (%)	46	46
Coefficiente de Matthews (Å ³ /Da)	2.28	2.29
Límite de resolución (Å)	49.4-1.89 (1.9-1.89)	49.4-2.08 (2.16-2.08)
Reflecciones ^a	118607 (11059)	89501(7798)
R _{merge} ^b	0.048	0.136
I/ σ (I)	24.5(2.6)	29.2(2.3)
Integridad (%)	97.1(90.4)	99.6(97.5)
Multiplicidad	7.1(4.2)	8(4.5)
Factor B del gráfico de Wilson (Å ²)	17.6	27.4
Estadística del afinamiento		
R _{work} /R _{free} ^c (%)	17.01/21.1	21.2/23.6
No. de átomos de:		
Proteína/disolvente	10778/774	10649/282
Promedio del factor B (Å ²)	26.9	39.25
Valores de RMSD ideales:		
Longitud de enlace (Å)	0.007	0.011
Angulo de enlace (°)	1.03	1.13
Gráfico de Ramachandran (%)		
Región mayormente favorecida	98	98
Regiones permitidas	2	2
Regiones no permitidas	0	0
Código PDB	En proceso	En proceso

^aValores en paréntesis corresponden a la última capa de resolución.

^bR_{merge} = $\sum_j \sum_h (|I_{j,h} - \langle I_h \rangle|) / \sum_j \sum_h (\langle I_h \rangle)$, donde h es el índice de reflexión única, $I_{j,h}$ es la intensidad de la reflexión relacionada por simetría y $\langle I_h \rangle$ es la intensidad media.

^cR = $\sum_h || F_o|_h - |F_c|_h| / \sum_h |F_o|_h$ para todas las reflexiones, donde F_o y F_c son los factores de estructura observados y calculados respectivamente, y h define reflexiones únicas. R_{free} se calcula de manera análoga, estas reflexiones se seleccionan aleatoriamente y se excluyen del afinamiento, (5%).

Comparamos cada uno de los monómeros de rMCL-1 en su forma apo en comparación con cada uno de los monómeros del octámero, con la finalidad de encontrar cambios conformacionales producidos por el reconocimiento al ligando. Una vez identificados estos cambios conformacionales analizamos las interacciones de estas regiones entre monómeros y las moléculas relacionadas por simetría con la finalidad de encontrar las determinantes estructurales que intervienen el proceso de oligomerización. Los análisis en el monómero A, revelaron 3 regiones con cambios conformacionales en la cadena principal, la primera región incluye a la Gly20 que pertenece al sitio de reconocimiento 2, que establece un puente de hidrógeno con el O4 de la rafinosa provocando cambios a corta y larga distancia. La segunda región se encuentra en la posición de la Leu31, la cual sufre un desplazamiento en cadena principal. La última región que presentó cambios importantes en este monómero se encuentra muy cerca del amino terminal en la Lys141 donde el desplazamiento que sufre le permite establecer un puente de hidrógeno con la Gly112 de la molécula B relacionada por simetría.

La superposición con el monómero B presenta 3 regiones con cambios estructurales, la primera y tercera región corresponden a las mismas que en el monómero A en las que se ven implicadas la Gly20 y la Lys141, el desplazamiento de esta lisina le permite establecer un puente de hidrogeno con la rafinosa del primer sitio de reconocimiento del monómero C. La segunda región corresponde a la Ser60 que presenta un desplazamiento de cadena principal que le permite interaccionar con la Asn74 de la molécula de simetría F. El análisis en el monómero C mostró las mismas dos regiones mencionadas con anterioridad, la Gly20 provoca que la Arg39 establezca un puente de hidrogeno con el Asp193 que pertenece a la molécula relacionada por simetría E, La segunda región que es la de la Lys141, se desplaza provocando que la Asn116 pueda establecer un puente de hidrógeno con la Ser60 de la molécula relacionada por simetría G.

En el monómero D se observaron cambios solo en dos regiones, en la Gly20 y la Lys141. Además, un cambio conformacional de la Ser22 le permitió establecer dos puentes de hidrogeno con el Asp71 de la molécula C de simetría; en esta misma región la Asn23 sufre un cambio de tal manera que forma un puente de hidrógeno con la

Gly104 de la misma molécula de simetría. El monómero E solo presentó una región con un cambio significativo en la región de la Lys141. En el monómero F los cambios se observan en las mismas regiones que el monómero C (Gly20 y Lys141) favoreciendo que la Ser23 y Asn24 establezcan puentes de hidrógeno y formen una pequeña interface con la molécula relacionada por simetría de C. Por su parte los monómeros G y H solo presentan una región con desplazamientos que corresponde a la Lys141 del monómero H que establece un puente de hidrogeno con el O6 de la rafinosa 27 mientras que la Lys141 del monómero G establece un puente de hidrogeno con el Asp87 de la molécula relacionada por simetría D.

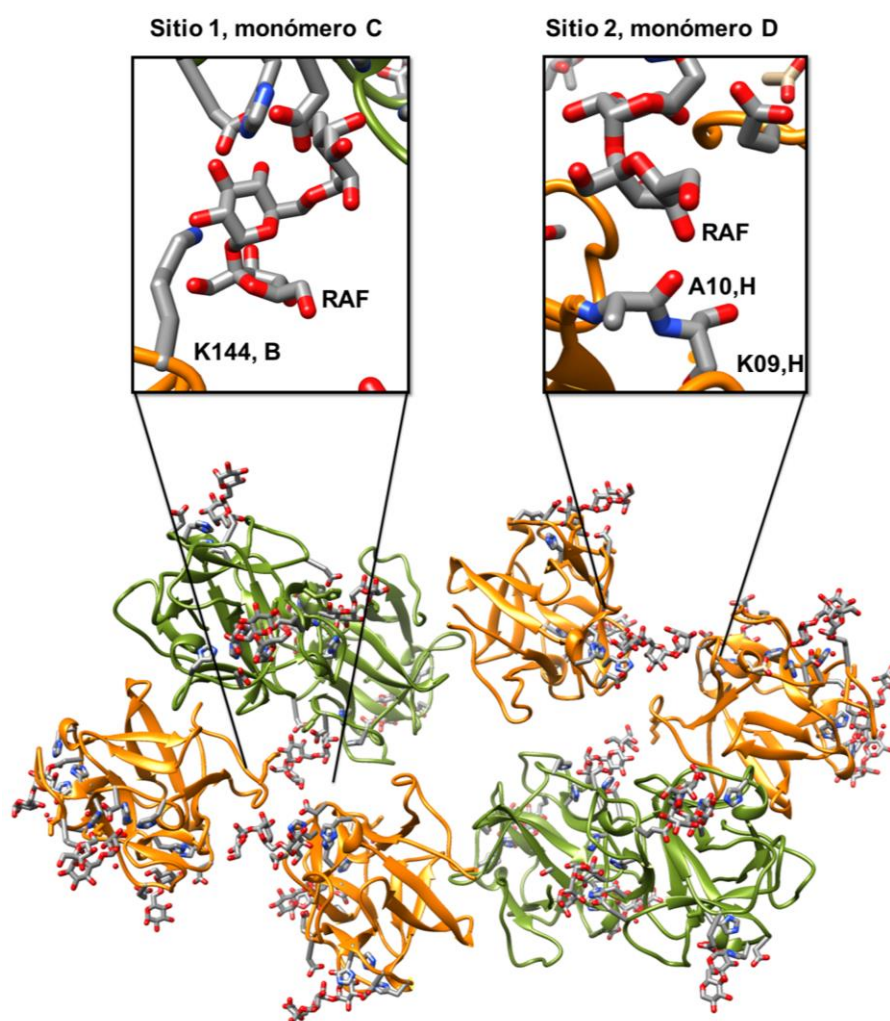


Figura 28. Tetrámero de dímeros encontrado en la unidad asimétrica de rMCL-1 en co-cristalización con rafinosa. La unión con el ligando desencadena interacciones proteína-carbohidrato.

8.16.2. Oligomerización inducida por la adición de α -Lactosa en rMCL-1

Los ensayos de co-cristalización en presencia de lactosa dieron lugar a un cristal con dimensiones de celda de $a = 63.9$, $b = 77.8$, $c = 155.8$ Å y en la unidad asimétrica se obtuvo al igual que en presencia de rafinosa un octámero formado por cuatro dímeros que está estabilizado por 10 intercaras (Figura 29). Las interacciones que se establecen con el ligando en los sitios de reconocimiento involucran los mismos residuos descritos para la estructura obtenida con rafinosa; sin embargo, la interacción con este ligando, si bien se ajusta a un modelo de unión secuencial como lo sugiere la calorimetría de titulación isotérmica, el comportamiento de unión sugiere una cooperatividad negativa ya que los sitios se saturan del de mayor a menor afinidad ($K_1 = 1.41 \times 10^5 \pm 2.5 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$, $K_2 = 1.35 \times 10^4 \pm 2.1 \times 10^2 \text{ M}^{-1}$, $K_3 = 1.35 \times 10^3 \pm 19 \text{ M}^{-1}$) siendo modelados los azúcares en los diferentes sitios en el siguiente orden: Sitio 1, 2 y 3. En la Tabla 13 se muestran las interacciones que establece la lactosa en los diferentes sitios de reconocimiento.

El análisis de superposición realizado con el monómero A de la estructura en ausencia de ligando con cada uno de los monómeros del octámero mostró cambios conformacionales en el sitio de reconocimiento 1, que como habíamos observado en la estructura con rafinosa, está involucrado en la oligomerización de la lectina. En presencia de la lactosa observamos que la His85 sufre un cambio conformacional que provoca que la Arg86 se oriente en dirección a la Gly67 provocando un desplazamiento de 3.62 Å en esta asa induciendo la oligomerización al favorecer contactos entre cadenas. Adicionalmente, en todos los monómeros se observan leves desplazamientos de cadena principal, que en el caso de la Lys141 en el monómero C le permite establecer un puente de hidrógeno con la Ser114 de la molécula relacionada por simetría D, también en esta región es posible observar que la Lactosa del tercer sitio de reconocimiento de esta molécula relacionada por simetría establece un puente de hidrógeno entre el nitrógeno de la Ile37 y el O1 del anillo de Glucosa de la α -Lactosa, el desplazamiento en la Lys141 de la molécula E le permite establecer un puente de hidrógeno con la Gly112 de la molécula F relacionada por simetría, el desplazamiento de la Lys141 en G permitió que el Asp142 establezca un puente de hidrógeno con la Arg40 de la molécula relacionada por simetría A.

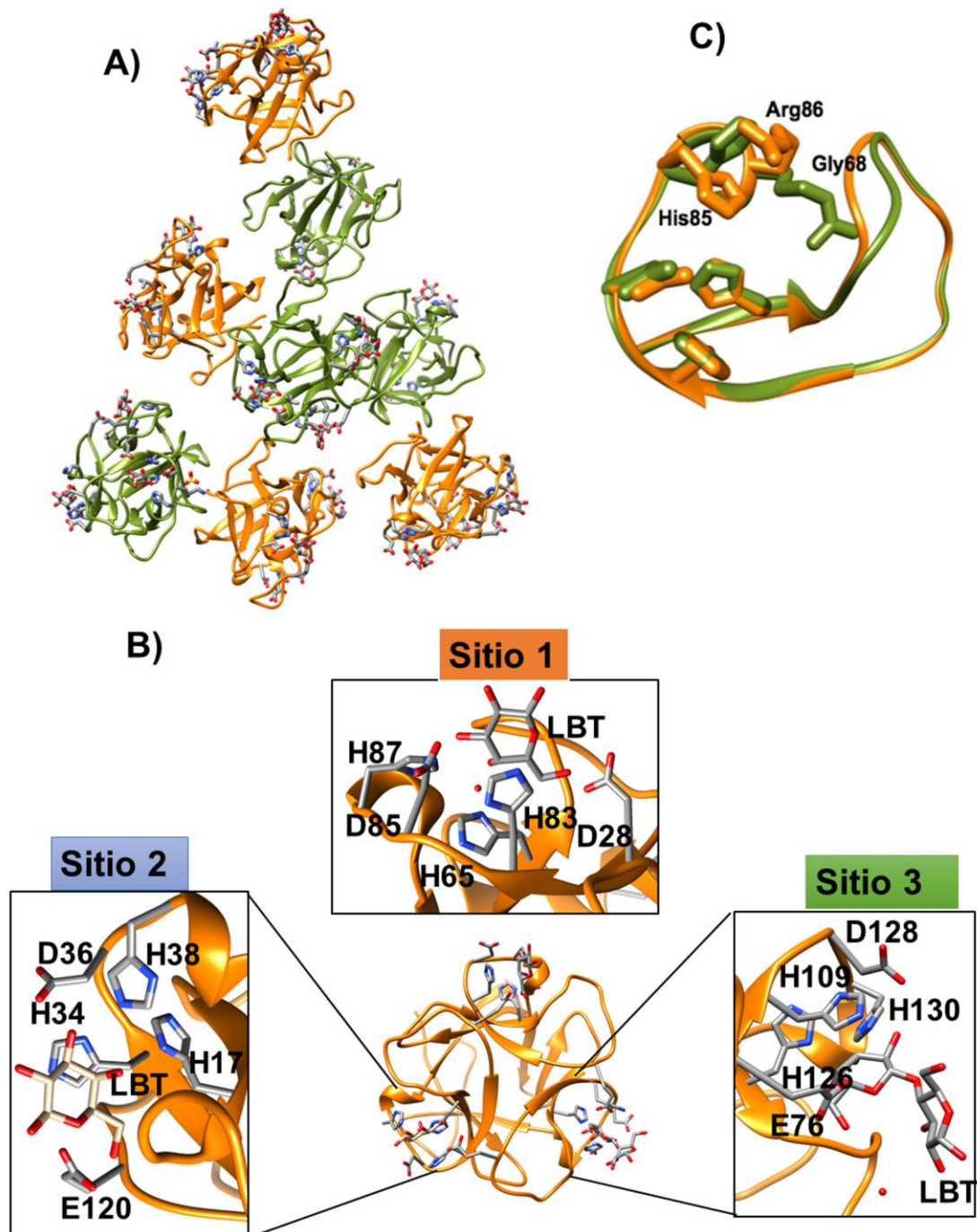


Figura 29. Oligomerización de rMCL-1 inducida por la unión con α -Lactosa. A) Se observa el tetrámero de dímeros. B) interacción del ligando en cada sitio de reconocimiento. C) Cambio conformacional que sufren la His85 y la Arg87 en el Sitio 1 en presencia del ligando.

Tabla 13. Interacciones de la lactosa en los sitios de reconocimiento.

Sitio de reconocimiento 1			Sitio de reconocimiento 2			Sitio de reconocimiento 3		
Donador	Distancia (Å)	Aceptor α -Lactosa	Donador	Distancia (Å)	Aceptor α -Lactosa	Donador	Distancia (Å)	Aceptor α -Lactosa
O-Gly67	3.48	O1-Gal	OD2-Asp35	2.90	O3-Gal	OD2-Asp127	3.06	O3-Gal
OD2-Asp83	3.04	O3-Gal	NE2-His37	2.87	O3-Gal	NE2-His129	3.24	O3-Gal
NE2-His85	2.79	O3-Gal	NE2-His37	3.39	O4-Gal	NE2-His129	3.17	O4-Gal
NE2-His85	3.52	O4-Gal	ND1-His16	2.96	O4-Gal	ND1-His108	3.40	O4-Gal
ND1-His64	2.91	O4-Gal	OE1-Glu119	2.81	O6-Gal	OE1-Glu75	3.25	O6-Gal
O-Gly67	3.56	O5-Gal	OE2-Glu119	3.06	O6-Gal	OE2-Glu75	3.13	O6-Gal
N-Gly67	3.15	O6-Gal	N-Gly19	2.86	O6-Gal	O-Pro109	3.46	O6-Gal
OD1-Asp27	2.87	O6-Gal				N-Gly111	2.86	O6-Gal

8.16.3. Oligomerización inducida por la adición de melibiosa

En las estructuras cristalográficas de rMCL-1 obtenidas por “remojo de cristales” y co-cristalización con melibiosa, se obtuvo un dímero y un terámero (dímero de dímeros) en la unidad asimétrica con los siguientes tamaños de celda unitaria, $a = 79$, $b = 63.5$, $c = 65.6$ y $a = 63.6$, $b = 151.6$, $c = 90$ respectivamente (Tabla 14). Los aminoácidos involucrados en los diferentes sitios de reconocimiento para este ligando son los mismos mencionados con anterioridad para rafinosa y α -lactosa, con algunas diferencias en las interacciones establecidas. Por ejemplo, al analizar el Sitio 1 el O6 del primer anillo de melibiosa establece puentes de hidrógeno con la Gly68 y el Asp27 y la His81 establece puentes de hidrogeno con el O3 y O5 del segundo anillo mientras que con rafinosa y α -Lactosa no se observó interacción con el segundo anillo de los azucares. En el sitio de reconocimiento 2, se observan el mismo número de interacciones que con α -Lactosa. En el Sitio 3 se pierden las interacciones con el Asp127 y la Pro109 y no se establecen nuevos puentes de hidrogeno con el segundo anillo de la melibiosa (Figura 30, Tabla 15). Los estudios termodinámicos para este oligosacárido sugieren un modelo de ajuste de tres sitios independientes con una constante de afinidad de $3.11 \times 10^3 \pm 32.4 \text{ M}^{-1}$.

Tabla 14. Estadística de la colecta de datos y del afinamiento de las estructuras de mCL-1 en presencia de melibiosa, obtenidas por remojo y en co-cristalización.

	MCL-1 Remojo con melibiosa	MCL-1 en co-cristalización con melibiosa
Datos de la colecta		
Longitud de onda (Å)	1.54	1.54
Temperatura (K)	100	100
Grupo espacial	C ₁ 2 ₁	P ₁ 2 ₁
Parámetros de la celda unitaria a,b,c (Å)	a = 79, b = 63.5, c = 65.6	a = 63.56, b = 151.6, c = 90
α,β,γ (°)	α = 90, β = 120.6, γ = 90	α = 77.1, β = 90, γ = 90
Contenido de disolvente (%)	41	49
Coefficiente de Matthews (Å ³ /Da)	2.10	2.43
Límite de resolución (Å)	39.6-1.83 (1.9-1.83)	39.5-2.59 (2.68-2.59)
Reflecciones ^a	24413 (2410)	23536 (2082)
R _{merge} ^b	0.073	0.171(0.99)
I/σ(I)	42.2(0.9)	26.8(2.5)
Integridad (%)	99.8(98.5)	99.6(99.7)
Multiplicidad	9.0(4.2)	7.1(4.9)
Factor B del gráfico de Wilson (Å ²)	31.8	53.0
Estadística del afinamiento		
R _{work} /R _{free} ^c (%)	19.6/23.6	23./27.8
No. de átomos de:		
Proteína/disolvente	2589/103	4957/1
Promedio del factor B (Å ²)	37.2	49.5
Valores de RMSD ideales		
Longitud de enlace (Å)	0.009	0.01
Angulo de enlace (°)	0.98	1.53
Gráfico de Ramachandran (%)		
Región mayormente favorecida	98	98
Regiones permitidas	2	2
Regiones no permitidas	0	0
Código PDB	En proceso	En proceso

^aValores en paréntesis corresponden a la última capa de resolución.

^b $R_{merge} = \sum_j \sum_h (|I_{j,h} - \langle I_h \rangle|) / \sum_j \sum_h \langle I_h \rangle$, donde h es el índice de reflexión única, $I_{j,h}$ es la intensidad de la reflexión relacionada por simetría y $\langle I_h \rangle$ es la intensidad media.

^c $R = \sum_h || F_o|_h - |F_c|_h | / \sum_h |F_o|_h$ para todas las reflexiones, donde F_o y F_c son los factores de estructura observados y calculados respectivamente, y h define reflexiones únicas. R_{free} se calcula de manera análoga, estas reflexiones se seleccionan aleatoriamente y se excluyen del afinamiento (5%).

Tabla 15. Interacciones de la melibiosa en cada sitio de reconocimiento del monómero A.

Sitio de reconocimiento 1			Sitio de reconocimiento 2			Sitio de reconocimiento 3		
Donador	Distancia (Å)	Aceptor (Melibiosa)	Donador	Distancia (Å)	Aceptor (Melibiosa)	Donador	Distancia (Å)	Aceptor (Melibiosa)
OD2-Asp83	2.47	O3-Gal	OD2-Asp35	2.87	O3-Gal	NE2-His129	2.38	O3-Gal
NE2-His81	3.05	O4-Gal	NE2-His37	3.21	O3-Gal	NE2-His129	3.41	O4-Gal
O-Gly67	3.34	O5-Gal	NE2-His37	3.18	O4-Gal	ND1-His108	2.40	O4-Gal
N-Gly68	3.33	O5-Gal	ND1-His16	3.06	O4-Gal	O-Gly111	3.41	O5-Gal
OD1-Asp27	2.69	O6-Gal	OE1-Glu119	2.72	O6-Gal	N-Gly111	3.41	O5-Gal
NE2-His81	3.48	O3-Glc	OE2-Glu119	3.17	O6-Gal	N-Gly112	3.34	O5-Gal
NE2-His81	3.46	O5-Glc	N-Gly19	3.18	O6-Gal	OE1-Glu75	2.94	O6-Gal
						OE2-Glu75	3.02	O6-Gal
						N-Gly111	2.78	O6-Gal

El dímero de dímeros obtenido en la unidad asimétrica está estabilizado por tres intercaras (Figura 30), la interfaz de A y B tiene un área de 730 y 726 Å² para cada monómero y está estabilizada por 6 puentes de hidrógeno, la segunda interfaz formada por C y D tiene un área de 708 y 709 Å² respectivamente y está formada por 1 puente salino y 6 puentes de hidrógeno, la tercera interfaz formada entre B y D tiene un área de 5447 y 556 Å² para cada monómero y está estabilizada por 3 puentes salinos y 3 puentes de hidrogeno.

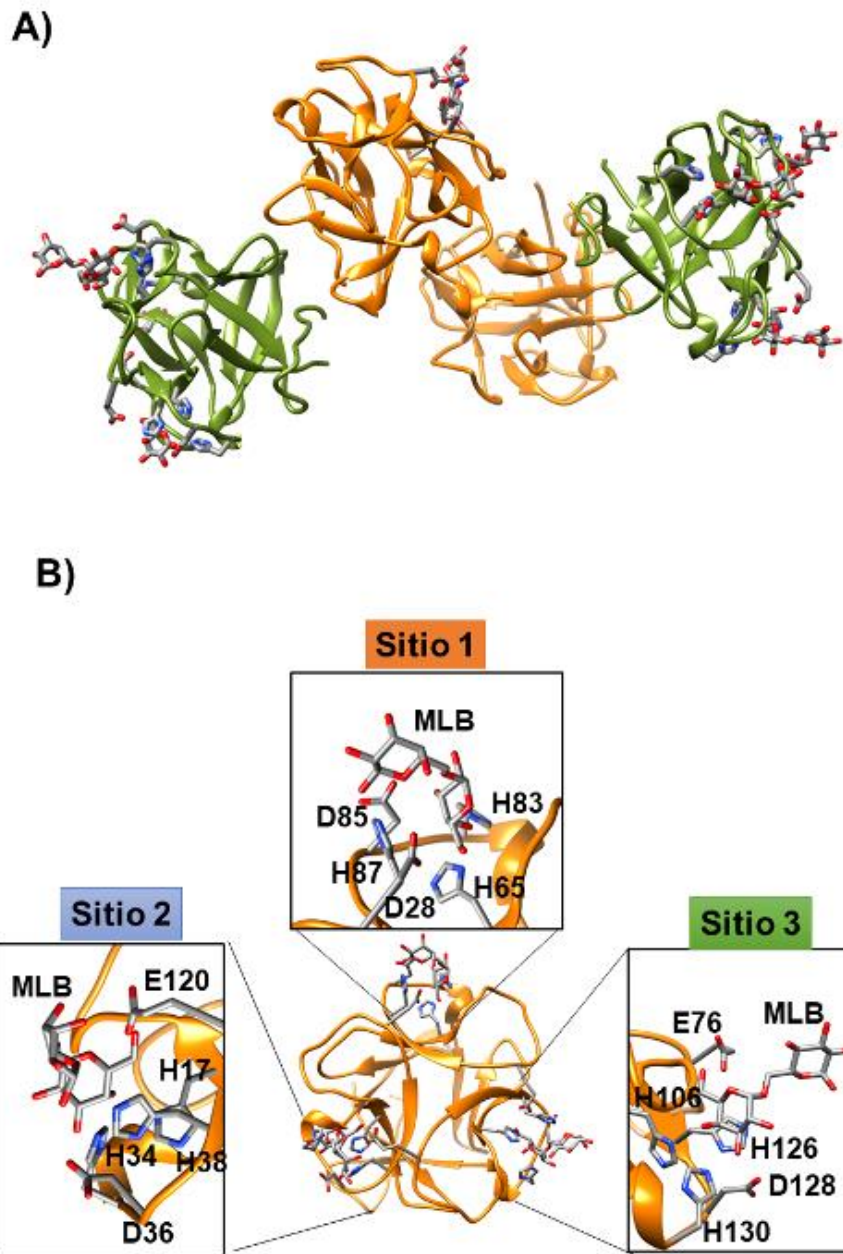


Figura 30. Estructura de rMCL-1 en presencia de melibiosa. A) Dímero de dímeros obtenido de la co-cristalización. B) Sitios de reconocimiento de rMCL-1 y su interacción con melibiosa.

Los análisis de superposición de cada uno de los monómeros mostraron cambios en la estructura de la lectina. El monómero A tiene un ligero movimiento en la región de la Lys141 que permitió que el Asp142 interactuara con la Asn115 de la molécula de simetría C. En el monómero B se observó un desplazamiento de 1.3 Å en la Gly67, residuo involucrado en el primer sitio de reconocimiento. En el monómero C se observaron dos desplazamientos, uno de 3.5 Å en la región de la Gly67 que permitió formar una pequeña interface con la molécula A de simetría, ya que en esa región la Lys69 establece un puente de hidrógeno con el Glu38 de la molécula de simetría; mientras que el Asp71 y la Lys105 también establecieron puentes de hidrógeno con la molécula de simetría. El segundo desplazamiento de interés en el monómero C fue en la región de la Lys141,

Con estos resultados podemos establecer que la presencia de los diferentes ligandos que reconocen las lectinas de *M. californianus* (Figura 31) inducen la formación de oligómeros de diferente tamaño y que el Sitio 1 es el responsable de iniciar este proceso. Es probable que éste sea el mecanismo por el cual las lectinas de MCL controlan su especificidad. Es importante resaltar que aun cuando dos ligandos favorecen la formación de un oligómero del mismo tamaño, el arreglo cuaternario es diferente.

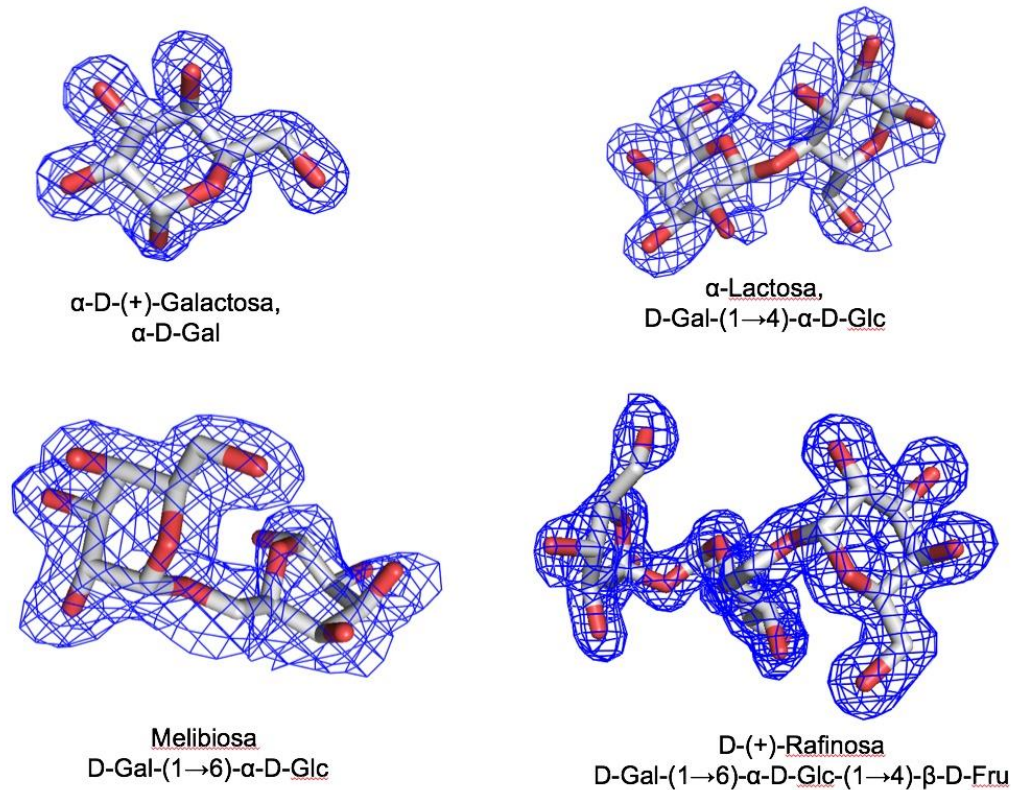


Figura 31. Mapas de densidad electrónica 2Fo-Fc a 1σ de cada uno de los carbohidratos obtenidos en complejo con rMCL-1.

8.9. Determinación de la actividad antimicrobiana de MCL y rMCL-1

Los invertebrados marinos carecen de inmunidad adaptativa por lo que los componentes humorales desempeñan un papel importante, específicamente las lectinas que son una de las principales moléculas involucradas en la inmunidad innata contra los patógenos y las sustancias foráneas a las cuales los mejillones se encuentran expuestos en el medio marino [32]. Con la finalidad de evaluar la función biológica de MCL en el organismo, realizamos ensayos de inhibición de crecimiento bacteriano en medio líquido, observando que fue capaz de inhibir el crecimiento de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, en los ensayos utilizamos 5 μ g totales de proteína; los porcentajes de inhibición de crecimiento fueron 90% en *E. coli* y 92% en *Lactobacillus plantarum*, también se observó que MCL fue capaz de aglutinar estas mismas cepas bacterianas así como a *Micrococcus lysodeikticus* (Figura 32). En el

caso de rMCL-1, esta actividad biológica fue menos de la mitad de la que presentó MCL, con un 35 y 42% de inhibición para *E. coli* y *L. plantarum* respectivamente. La actividad antifúngica y antimicrobiana ha sido reportada en todos los miembros de esta nueva familia de lectinas [47]. Mediante experimentos de unión a microorganismos de Enzyme-Linked Lectin Assay (ELLA) se determinó que la lectina CGL es capaz de unirse a bacterias Gram(+) y Gram(-) e inhibir su crecimiento; específicamente en *E. coli* se observó que la interacción de CGL hacía este patógeno era inhibida por su ligando D(+) Galactosa, lo que sugiere que el reconocimiento es a través de sus sitios de reconocimiento a carbohidratos [47].

Por otro lado, MGL, una lectina más que forma parte de esta nueva familia, presentó actividad bacteriostática que fue determinada mediante ensayos de aglutinación de bacterias Gram(+) y Gram(-), Esta actividad fue inhibida por la presencia de α -galactosidos, los cuales se ha reportado con anterioridad son los ligandos que presentan inhibición en las lectinas de esta familia [50]. Estudios más específicos sobre la participación de las lectinas de esta nueva familia en la inmunidad innata se han realizado al estudiar la inhibición del crecimiento en cepas a las cuales están expuestos los mejillones en el medio marino. La lectina del mejillón *Mytilus Trossulus* (MTL) fue capaz de aglutinar *V. proteolyticus* y al igual que en los otros miembros reportados, cuando se incubó con D-galactosa la actividad aglutinante fue completamente inhibida. En esta lectina la actividad anti fúngica fue evaluada también y los resultados mostraron una inhibición en hongos de los generos *Fusarium*, *Trichoderma*, *Haematonectria*, *Aspergillus* y *Alternaria* [41].

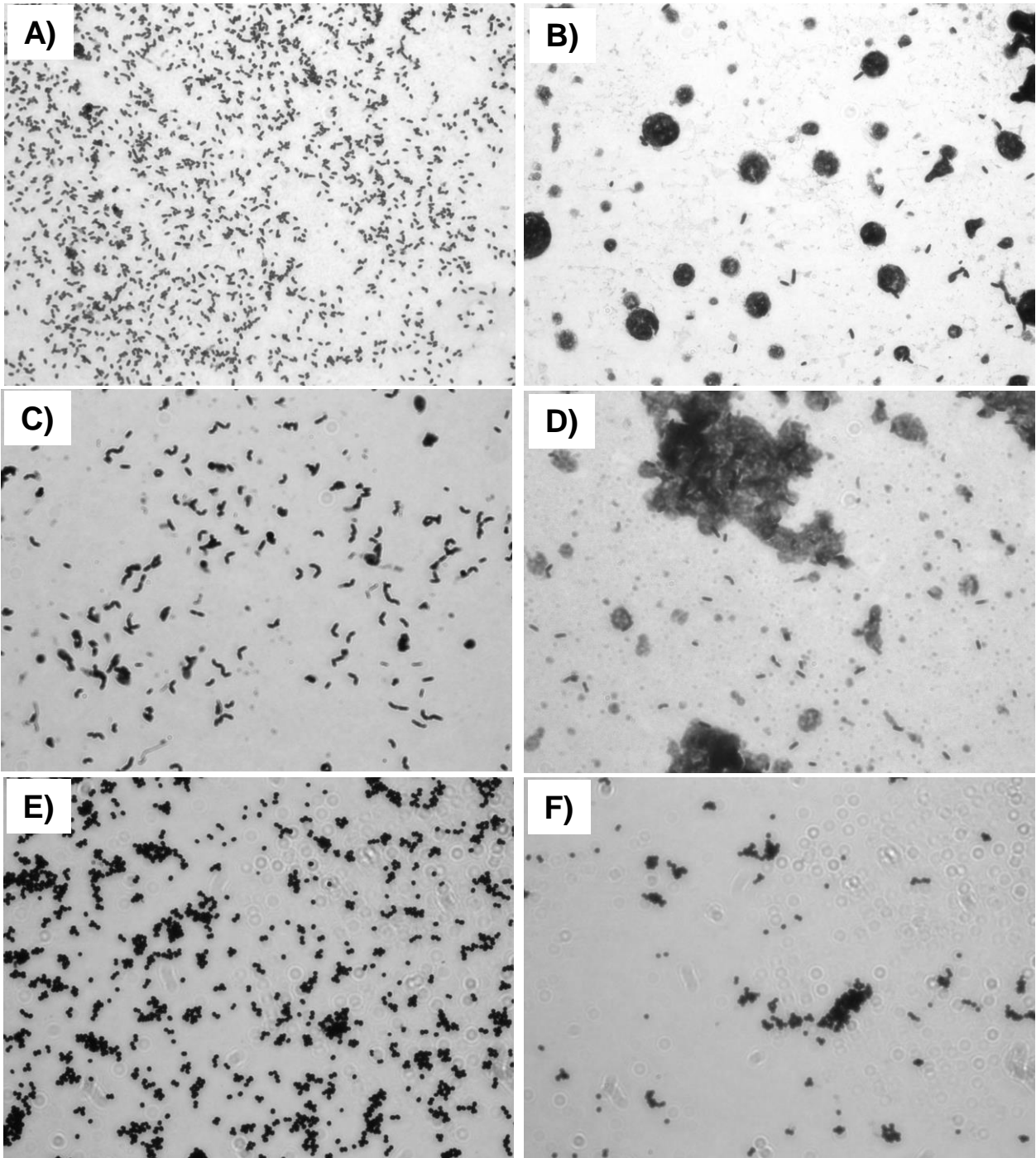


Figura 32. Aglutinación de bacterias en presencia de MCL. En *E. coli* (A,B), *L. plantarum* (C,D), *M. lysodeiktkikus* (E,F), las muestras incubadas en medio Luria Bertani (LB) para *E. Coli*, Medio Man Rogosa Sharp (MRS) para *L. plantarum*, Amortiguador de fosfato de sodio 50mM pH7.4 para *M. lysodeiktkikus* (A,C,E) and with purified lectin (B,D,F).

8.10. Determinación de la actividad antifúngica de MCL y rMCL-1

Como se observó en los estudios de actividad antimicrobiana, MCL es una lectina que interviene en la respuesta inmune de *M. californianus* ante la presencia de un patógeno. En los otros miembros de esta nueva familia de lectinas, también se evaluó la actividad biológica frente a diferentes hongos aislados a partir de los mismos organismos, para evaluar la respuesta inmune ante una infección causada por hongos, los estudios realizados con la lectina de *Crenomytilus grayanus* (CGL) y *Mytilus trossulus* (MTL) se llevó a cabo evaluando la inhibición del crecimiento de las hifas utilizando un microscopio óptico, en donde se determinó que ambas lectinas son capaces de inhibir el crecimiento en porcentajes por arriba del 70% [41].

En nuestro caso, realizamos estudios de actividad antifúngica utilizando dos hongos verdaderos y dos Oomicetos que representan una importancia económica, debido a los problemas que generan en cultivos. Los resultados obtenidos con ambas lectinas (MCL y rMCL-1) indican que ambas inhiben el crecimiento de los hongos verdaderos (*Alternaria alternata* y *Fusarium oxysporum*) y de los Oomicetos (*Phytophthora capsia* y *Pythium aphanidermatum*) como se muestra en la Figura 33, MCL fue capaz de inhibir al 100% el crecimiento de los hongos y los Oomicetos, mientras que rMCL-1, inhibió al 100% el crecimiento de *Alternaria* y los dos Oomicetos, en el caso de *Fusarium Oxysporum* solo inhibió el 50% de su crecimiento respecto al control negativo de inhibición. Es importante mencionar que ambas lectinas resultaron más potentes que el antifúngico comercial utilizado como control positivo de la inhibición (CAPTAN), ya que si bien este compuesto es capaz de inhibir el crecimiento radial del hongo, puede observarse que los inóculos tienen un crecimiento vertical. Todos estos resultados sugieren que las lectinas de *M. californianus* MCL y rMCL-1 pueden ser utilizadas como agentes de control de plagas contra estas especies de hongos y Oomicetos siendo una alternativa segura ante los riesgos que pueden representar los productos agroquímicos comerciales.

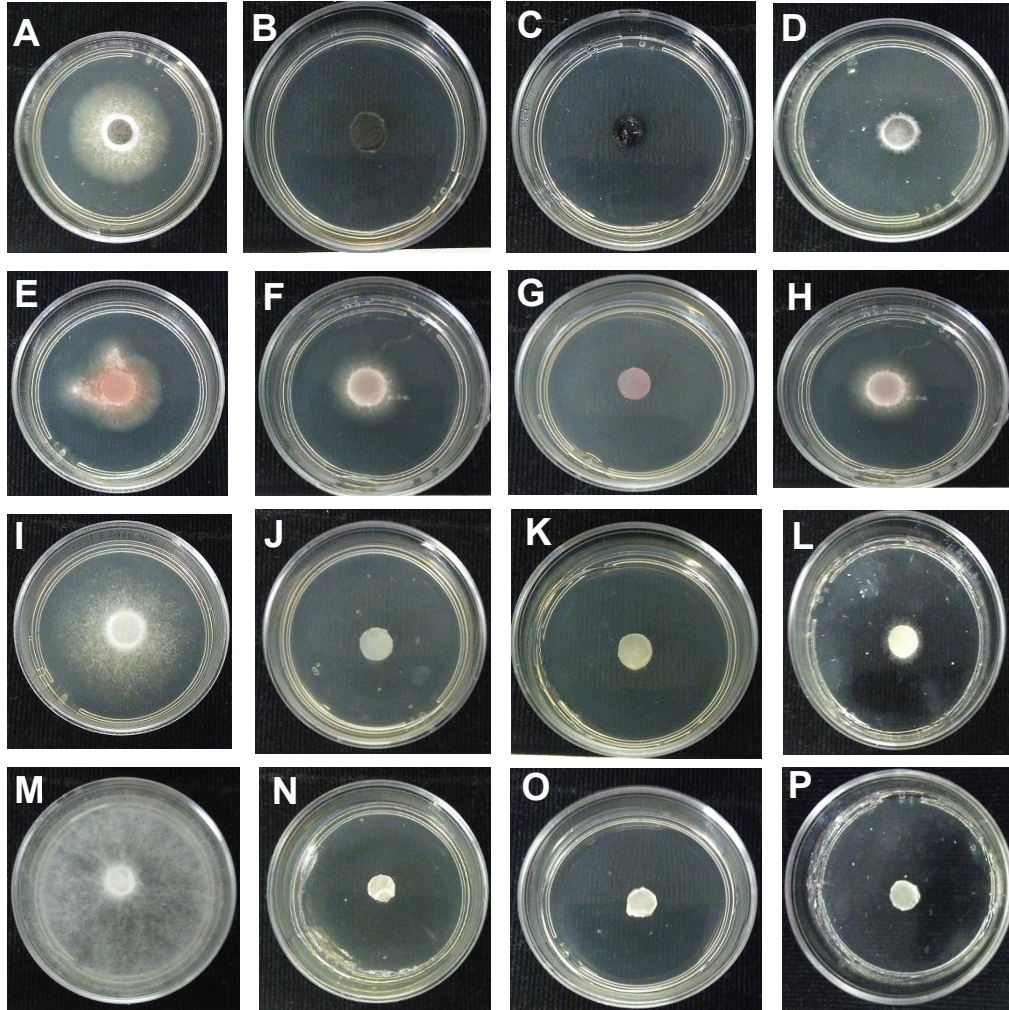


Figura 33. Bioensayos de inhibición de los Hongos de la especie *Alternaria alternata* (A-D) *Fusarium oxysporum* (E-H) *Phytophthora capsica* (I-L) *Pythium aphanidermatum*(M-P), los controles negativos de inhibición se encuentran en la primera columna (A-M), tratamiento con rMCL-1 a 200 ppm segunda columna (B-N), tratamiento con MCL a 200 pm (C-O), control positivo de inhibición con 200 ppm de captan (D-P).

8.11. Determinación de la actividad anticancerígena

Dado que se ha reportado la actividad anticancerígena de diversas lectinas, decidimos evaluar esta actividad en MCL con las líneas celulares: HCT-15 (adenocarcinoma colorrectal de humano), MCF-7 (adenocarcinoma mamario humano), K562 (Leucemia mielógena crónica), U251 (Glioblastoma humano), PC-3 (adenocarcinoma prostático humano), SK-LU-1 (Adenocarcinoma de pulmón humano). En la Tabla 16 se muestran los resultados de los ensayos citotóxicos en presencia de diferentes especies oligoméricas, donde se observa inhibición del crecimiento en las seis líneas celulares probadas, siendo la inhibición más alta en las SK-LU-1, lo que sugiere que existe un reconocimiento inespecífico hacia los antígenos de las diferentes células debido a la presencia de diferentes especies oligoméricas. En la Tabla 17, se observa que en la forma dimérica, MCL reconoce en un 100% los antígenos expresados por SK-LU-1, esto demuestra la importancia del estado oligomérico en el reconocimiento de las diferentes líneas celulares. En ambos casos no hubo efecto inhibitorio en el crecimiento de los polimorfos nucleares de sangre periférica de rata (PMN). Como observamos en los estudios llevados a cabo por co-cristalización en presencia de diferentes ligandos MCL es capaz de adoptar un arreglo cuaternario diferente que posiblemente esté relacionado con una determinada función biológica. Es probable que las glicosilaciones expresadas por la línea celular SKLU le permiten al dímero adquirir un arreglo determinado que le permite a MCL inhibir el crecimiento de estas células, este efecto no se observa cuando más de una especie oligomérica está presente ya que, el arreglo que adquieren oligómeros de diferentes tamaños puede conferirle a MCL la particularidad de reconocer otros antígenos, lo que implica que por medio de la oligomerización la lectina puede controlar su especificidad por un determinado ligando.

Tabla 16. Pruebas de citotoxicidad con la mezcla de diferentes estados oligoméricos de MCL.

Líneas celulares	Inhibición de crecimiento (%)
U251 (Glia)	36
PC-3 (Próstata)	29.3
K562 (Leucemia)	64.5
HCT-15 (Colon)	33.7
MCF-7 (Mama)	33.2
SK-LU-1 (Pulmón)	92.3
PMN	Incremento de 15.1

Tabla 17. Pruebas de citotoxicidad del dímero de MCL sobre diferentes líneas celulares de cáncer.

Líneas celulares	Inhibición de crecimiento (%)
U251 (Glia)	36
PC-3 (Próstata)	NC*
K562 (Leucemia)	NC*
HCT-15 (Colon)	NC*
MCF-7 (Mama)	NC*
SK-LU-1 (Pulmón)	100
PMN	Incremento de 15.1

*NC: no citotóxico

Una de las alteraciones genéticas que presentan las células tumorales es la sobreproducción de moléculas de señalización las cuales las vuelven indiferentes a los efectos de los supresores tumorales [92]. Entre estas modificaciones fenotípicas se encuentra la sobreproducción de glicosilaciones, que permiten la comunicación en

las células malignas. Estas moléculas de señalización pueden ser reconocidas por lectinas, las cuales tienen la capacidad de reconocer las estructuras de los oligosacáridos de forma muy específica con constantes de disociación por arriba del orden milimolar [87]. Haciendo uso de su capacidad para reconocer estructuras de carbohidratos de forma específica, las lectinas de origen vegetal han sido empleadas en diferentes estudios para una posible aplicación terapéutica, la cual aún sigue siendo un campo por explorar ya que muchas de estas lectinas si bien presentan actividades antitumorales hacia diversas líneas celulares de cáncer, poseen una alta actividad citotóxica [87].

En el 2012, se reportó que MGL, una lectina aislada del bivalvo *Mytilus galloprovincialis*, con especificidad por α -D galactosidos, es capaz de reconocer globotriosa (Gb3), $\text{Gal}\alpha(1,4)\text{Gal}\beta(1,4)\text{Glc}$, el cual es un componente de los glicoesfingolípidos expresados en algunos tipos de cáncer que incluyen a las células de linfoma Burkitt, inhibiendo su crecimiento [40]. Es importante mencionar que esta lectina comparte un 100% de identidad con MCL, sin embargo, esta última se encuentra glicosilada. Estudios sobre el mecanismo de acción de MGL hacia estas líneas celulares demostró que la presencia del dímero es importante para que la lectina cumpla con su función citotóxica, ya que al mutar las fenilalaninas 94 y 95 por alaninas, las cuales se determinó son importantes para la formación del dímero obtuvieron la forma monomérica, la cual no inhibe el crecimiento de las células de linfoma. Terada y colaboradores, señalan que la oligomerización en MGL es importante para incrementar el número de sitios de reconocimiento y de esta forma permitir la formación de complejos entrecruzados bloqueando la comunicación celular y por consiguiente la formación del tumor [45].

Terada y colaboradores [79] han realizado estudios de citotoxicidad en una versión sintética de MGL, en donde diseñaron de forma computacional un dominio de reconocimiento que conservaba las características de reconocimiento hacia las células Burkitt. Como parte de este diseño se mutaron aminoácidos implicados en la formación de la interfaz para evitar la dimerización y la formación de oligómeros de mayor tamaño lo que está relacionado con especificidad. Los resultados fueron satisfactorios como lo observaron por microscopia confocal, ya que el reconocimiento por las células Burkitt

se llevó a cabo, demostrando nuevamente que la oligomerización es esencial para inhibir el crecimiento de estas células. El diseño de lectinas artificiales a partir de las características estructurales deseadas es un campo emergente que Terada y colaboradores describen como prometedor, sin embargo, en estos estudios no se hace énfasis en la importancia que tiene la oligomerización, no solo a nivel de regulación biológica en el organismo, sino como una herramienta para generar complejos macromoleculares más eficientes. El estudiar los factores estructurales que ocasionan la oligomerización en MCL, nos permite no solo entender cómo se desencadena este fenómeno, sino como controlarlo o inducirlo, ya que los resultados obtenidos de las pruebas de citotoxicidad nos sugieren que los oligómeros de MCL pueden reconocer diferentes patrones de glicosilación según su estado oligomérico, el cual se puede inducir por mutaciones que promuevan la formación de interfaces más estables para obtener un oligómero con especificidad hacia una determinada línea celular de cáncer.

9. CONCLUSIONES

En este trabajo se describen los mecanismos de oligomerización de una lectina del mejillón *Mytilus californianus* (MCL) y de una de sus isoformas y las implicaciones de este proceso de asociación en su función biológica.

- Se purificó del molusco una lectina (MCL) con modificaciones postraduccionales. Esta comparte 100 % de identidad con otra aislada del mejillón del mediterráneo *Mytilus galloprovincialis* (MGL) la cual no presenta glicosilaciones.
- El análisis de la secuencia de ADN en MCL mostró que la proteína madura no posee un segmento N-terminal adicional de 30 aminoácidos, lo que sugiere que existe una regulación a nivel transcripcional, que posiblemente esté relacionada con la respuesta inmune de *M. californianus*, o con la capacidad de sintetizar una proteína con una función adicional.
- Se obtuvo de forma recombinante a una isoforma de MCL (rMCL-1), sin glicosilaciones y con sólo tres aminoácidos diferentes: V107I, G130K y N141D. Esta lectina reconoce los mismos galactosidos que MCL (Galactosa, melibiosa, α -lactosa y rafinosa) pero con diferente especificidad, es menos activa y menos estable, lo que hace pensar que las glicosilaciones son importantes.
- Los parámetros termodinámicos de la interacción de rMCL-1 con sus ligandos mostraron que se ajustan a modelos diferentes dependiendo del ligando (a un modelo de tres sitios independientes para D-galactosa y melibiosa y un modelo de unión secuencial de tres sitios para rafinosa y α -lactosa).
- La estructura tridimensional de ambas lectinas reveló que, en presencia de sus ligandos, las proteínas oligomerizan, siendo el arreglo cuaternario diferente, dependiendo de azúcar. El análisis de los diferentes oligómeros nos permitió establecer que el Sitio de reconocimiento 1 es el responsable de dicho proceso de asociación.
- Ambas lectinas mostraron actividad antimicrobiana y antifúngica, siendo esta última mayor a los controles comerciales, lo que las hace buenos candidatos para una potencial aplicación.

- Los ensayos citotóxicos con las líneas celulares de cáncer demostraron que MCL puede ser un importante agente anticancerígeno y es probable que al inducir diferentes estados oligoméricos se pueda inhibir el crecimiento de diferentes líneas celulares de cáncer.

10. PERSPECTIVAS

1. Identificar el tipo de glicosilación que presenta la lectina obtenida de la fuente natural y en que residuo se presenta.
2. Obtener a MCL de forma recombinante y realizar una caracterización similar a la que realizamos con MCL y rMCL-1, con el fin de analizar el efecto de las mutaciones (I104V, G130K y N141D) y de las modificaciones postraduccionales en su comportamiento de oligomerización y en su función biológica.
3. Realizar ensayos biológicos con microorganismos de origen marino que permitan profundizar en la respuesta inmune relacionada con la interacción patógeno-hospedero
4. Realizar un análisis sistemático de la viabilidad celular en líneas celulares de cáncer y evaluar el efecto de los diferentes oligómeros formados.
5. Mutar los residuos H125 y E75; H33 y E119; D27 y H81 que observamos estabilizan la formación del trébol en MCL y rMCL-1. Esto con el fin de determinar si son los responsables de la estabilidad de este plegamiento.

11. REFERENCIAS

- [1] M.D. Cooper, M.N. Alder, The evolution of adaptive immune systems, *Cell*. 124 (2006) 815–822
- [2] L. Canesi, P. Procházková, *The Invertebrate Immune System as a Model for Investigating the Environmental Impact of Nanoparticles*, Elsevier Inc., 2013.
- [3] J. Kurtz, Memory in the innate and adaptive immune systems, *Microbes Infect.* 6 (2004) 1410–1417.
- [4] J. Kurtz, Specific memory within innate immune systems, *Trends Immunol.* 26 (2005) 186–192.
- [5] A. Marín, El sistema inmune de los invertebrados -The immune system of the invertebrates), 10 (2009) 1695–7504.
- [6] A.E. Ward, B.M. Rosenthal, Evolutionary responses of innate immunity to adaptive immunity, *Infect. Genet. Evol.* 21 (2014) 492–496.
- [7] F. S. Martinez, Sistema inmune en camarones, *Boletin camaron nicovita* (2006) 1-6.
- [8] N. Sharon, Lectins: past, present and future., *Biochem. Soc. Trans.* 36 (2008) 1457–60.
- [9] B. Islam, A. Khan, Lectins: To Combat Infections, *Cdn.Intechopen.Com.* (2012) 167-189.
- [10] O. V Chernikov, V.I. Molchanova, I. V Chikalovets, a S. Kondrashina, W. Li, P. a Lukyanov, Lectins of marine hydrobionts., *Bioc h em . B i o k h i m i ĩ a*. 78 (2013) 760–70.
- [11] R.C.F. Cheung, J.H. Wong, W. Pan, Y.S. Chan, C. Yin, X. Dan, T.B. Ng, Marine lectins and their medicinal applications, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99 (2015) 3755–3773.
- [12] C. Gestal, A. Pallavicini, P. Venier, B. Novoa, A. Figueras, MgC1q, a novel C1q-domain-containing protein involved in the immune response of *Mytilus galloprovincialis*, *Dev. Comp. Immunol.* 34 (2010) 926–934.
- [13] T.M. Carland, L. Gerwick, The C1q domain containing proteins: Where do they come from and what do they do?, *Dev. Comp. Immunol.* 34 (2010) 785–90.
- [14] L. Wang, L. Wang, H. Zhang, Z. Zhou, V.S. Siva, L. Song, A C1q domain

- containing protein from scallop *Chlamys farreri* serving as pattern recognition receptor with heat-aggregated IgG binding activity., *PLoS One*. 7 (2012) e43289.
- [15] Y. Endo, M. Takahashi, T. Fujita, Lectin complement system and pattern recognition, *Immunobiology*. 211 (2006) 283–293.
- [16] J. Kasamatsu, Evolution of innate and adaptive immune systems in jawless vertebrates, *Microbiol. Immunol.* 57 (2013) 1–12.
- [17] R.P. Ellis, H. Parry, J.I. Spicer, T.H. Hutchinson, R.K. Pipe, S. Widdicombe, Immunological function in marine invertebrates: Responses to environmental perturbation, *Fish Shellfish Immunol.* 30 (2011) 1209–1222.
- [18] . Iwanaga, B.L. Lee, Recent advances in the innate immunity of invertebrate animals., *J. Biochem. Mol. Biol.* 38 (2005) 128–150.
- [19] B. Allam, E. Pales Espinosa, Bivalve immunity and response to infections: Are we looking at the right place?, *Fish Shellfish Immunol.* 53 (2016).
- [20] A.F. Rowley, A. Powell, Invertebrate Immune Systems-Specific, Quasi-Specific, or Nonspecific?, *J. Immunol.* 179 (2007) 7209–7214.
- [21] H. Schulenburg, C. Boehnisch, N.K. Michiels, How do invertebrates generate a highly specific innate immune response?, *Mol. Immunol.* 44 (2007) 3338–3344.
- [22] A. Montano, F. Tsujino, N. Takahata, Y. Satta, Evolutionary origin of peptidoglycan recognition proteins in vertebrate innate immune system, *BMC Evol Biol.* 11 (2011) 79.
- [23] Y. Tan, J. Xing, W. Zhan, Agglutination activities of haemolymph and tissue extracts in scallop *Chlamys farreri* and purification of mannan-binding lectin from haemolymph, *Aquaculture*. 400–401 (2013) 148–152.
- [24] H. Schulenburg, C.L. Kurz, J.J. Ewbank, Evolution of the innate immune system: The worm perspective, *Immunol. Rev.* 198 (2004) 36–58.
- [25] B.L.L. Sadaaki Iwanaga, Recent advances in the innate immunity of invertebrate animals., *J. Biochem. Mol. Biol.* 38 (2005) 128–50.
- [26] J. Yang, L. Wang, H. Zhang, L. Qiu, H. Wang, L. Song, C-Type Lectin in *Chlamys farreri* (CfLec-1) Mediating Immune Recognition and Opsonization, 6 (2011) 16–19.

- [27] M. Gerdol, P. Venier, An updated molecular basis for mussel immunity, *Fish Shellfish Immunol.* 46 (2015) 17–38.
- [28] H. Unno, K. Hisamatsu, T. Nagao, Y. Tateya, N. Matsumoto, S. Goda, T. Hatakeyama, Crystallization and preliminary crystallographic study of oligomers of the haemolytic lectin CEL-III from the sea cucumber *Cucumaria echinata*, *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* 69 (2013) 416–420.
- [29] A. Varki, M.E. Etzler, R.D. Cummings, J.D. Esko, *Discovery and Classification of Glycan-Binding Proteins*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2009.
- [30] Kurt Drickamer, *Classification of Animal Lectins*, (n.d.). <http://www.imperial.ac.uk/research/animalleclectins/ctld/lectins.html>.
- [31] A. Broom, A.C. Doxey, Y.D. Lobsanov, L.G. Berthin, D.R. Rose, P.L. Howell, B.J. McConkey, E.M. Meiering, Modular Evolution and the Origins of Symmetry: Reconstruction of a Three-Fold Symmetric Globular Protein, *Structure.* 20 (2012) 161–171.
- [32] R.K. Pipe, J.A. Coles, F.M.M. Carissan, K. Ramanathan, Copper induced immunomodulation in the marine mussel, *Mytilus edulis*, *Aquat. Toxicol.* 46 (1999) 43–54.
- [33] L.G. do Nascimento-Neto, R.F. Carneiro, S.R. da Silva, B.R. da Silva, F. Vassiliepe Sousa Arruda, V.A. Carneiro, K.S. do Nascimento, S. Saker-Sampaio, V.A. da Silva, A.L.F. Porto, B.S. Cavada, A.H. Sampaio, E.H. Teixeira, C.S. Nagano, Characterization of isoforms of the lectin isolated from the red algae *Bryothamnion seaforthii* and its pro-healing effect., *Mar. Drugs.* 10 (2012) 1936–54.
- [34] T. Ogawa, M. Watanabe, T. Naganuma, K. Muramoto, Diversified carbohydrate-binding lectins from marine resources., *J. Amino Acids.* 2011 (2011) 838914.
- [35] J. Alpuche, A. Pereyra, G. Mendoza-Hernández, C. Agundis, C. Rosas, E. Zenteno, Purification and partial characterization of an agglutinin from *Octopus maya* serum., *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* 156 (2010) 1–5.
- [36] L. Vazquez, F. Mass, P. Rosas, L.F.M. lot, Purification and characterization of a lectin from *Macrobrachium rosenbergh* (Crustacea Decapoda) hemolymph, 105 (1993) 617–623.

- [37] N.Y. Tomomitsu Hatakeyama, Hidetsugu Kohzaki, Haruna Nagatomo, Purification and Characterization of Four Ca²⁺-Dependent Lectins from the Marine Invertebrate, *Cucumaria echinata*, *J. Biochem.* 116 (1994) 209–214.
- [38] T. Hatakeyama, M. Furukawa, H. Nagatomo, N. Yamasaki, T. Mori, Oligomerization of the hemolytic lectin CEL-III from the marine invertebrate *Cucumaria echinata* induced by the binding of carbohydrate ligands., *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 16915–20.
- [39] N.I. Belogortseva, V.I. Molchanova, A. V. Kurika, A.S. Skobun, V.E. Glazkova, Isolation and characterization of new GalNAc/Gal-specific lectin from the sea mussel *Crenomytilus grayanus*, *Comp. Biochem. Physiol. - C Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* 119 (1998) 45–50.
- [40] . Fujii, N. Dohmae, K. Takio, S.M.A. Kawsar, R. Matsumoto, I. Hasan, Y. Koide, R.A. Kanaly, H. Yasumitsu, Y. Ogawa, S. Sugawara, M. Hosono, K. Nitta, J. Hamako, T. Matsui, Y. Ozeki, A lectin from the mussel *Mytilus galloprovincialis* has a highly novel primary structure and induces glycan-mediated cytotoxicity of globotriaosylceramide-expressing lymphoma cells, *J. Biol. Chem.* 287 (2012) 44772–44783.
- [41] I. V. Chikalovets, S.N. Kovalchuk, A.P. Litovchenko, V.I. Molchanova, M. V. Pivkin, O. V. Chernikov, A new Gal/GalNAc-specific lectin from the mussel *Mytilus trossulus*: Structure, tissue specificity, antimicrobial and antifungal activity, *Fish Shellfish Immunol.* 50 (2016) 27–33.
- [42] Z. Xue, Y. Pang, X. Liu, Z. Zheng, R. Xiao, M. Jin, Y. Han, P. Su, L. Lv, J. Wang, Q. Li, First evidence of protein G-binding protein in the most primitive vertebrate: Serum lectin from lamprey (*Lampetra japonica*), *Dev. Comp. Immunol.* 41 (2013) 618–630.
- [43] M.H. Ali, B. Imperiali, Protein oligomerization: How and why, *Bioorganic Med. Chem.* 13 (2005) 5013–5020.
- [44] H. Unno, S. Goda, T. Hatakeyama, Hemolytic lectin cel-iii heptamerizes via a large structural transition from α -helices to a β -barrel during the transmembrane pore formation process, *J. Biol. Chem.* 289 (2014) 12805–12812.

- [45] D. Terada, F. Kawai, H. Noguchi, S. Unzai, I. Hasan, Y. Fujii, S.-Y. Park, Y. Ozeki, J.R.H. Tame, Crystal structure of MytiLec, a galactose-binding lectin from the mussel *Mytilus galloprovincialis* with cytotoxicity against certain cancer cell types, *Sci. Rep.* 6 (2016) 28344.
- [46] M. Jakób, J. Lubkowski, B.R. O’Keefe, A. Wlodawer, Structure of a lectin from the sea mussel *Crenomytilus grayanus* (CGL), *Acta Crystallogr. Sect. Struct. Biol. Commun.* 71 (2015) 1429–1436.
- [47] S.N. Kovalchuk, I. V. Chikalovets, O. V. Chernikov, V.I. Molchanova, W. Li, V.A. Rasskazov, P.A. Lukyanov, CDNA cloning and structural characterization of a lectin from the mussel *Crenomytilus grayanus* with a unique amino acid sequence and antibacterial activity, *Fish Shellfish Immunol.* 35 (2013) 1320–1324.
- [48] E. Garcia-Maldonado, P. Cano-Sanchez, A. Hernandez-Santoyo, *Fish & Shell fish Immunology Molecular and functional characterization of a glycosylated Galactose- Binding lectin from Mytilus californianus*, 66 (2017) 564–574.
- [49] E. Pales Espinosa, M. Perrigault, B. Allam, Identification and molecular characterization of a mucosal lectin (MeML) from the blue mussel *Mytilus edulis* and its potential role in particle capture., *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* 156 (2010) 495–501.
- [50] I. Hasan, M. Gerdol, Y. Fujii, S. Rajia, Y. Koide, D. Yamamoto, S. Kawsar, Y. Ozeki, cDNA and Gene Structure of MytiLec-1, A Bacteriostatic R-Type Lectin from the Mediterranean Mussel (*Mytilus galloprovincialis*), *Mar. Drugs.* 14 (2016) 92.
- [51] Curiel Ramírez, Sergio y Cáceres Martínez Jorge (2005) Asentamiento y dispersión de Mejillones en Baja California; México Tesis doctoral Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE) Baja California México
- [52] C.-L. Yao, G.N. Somero, Thermal stress and cellular signaling processes in hemocytes of native (*Mytilus californianus*) and invasive (*M. galloprovincialis*) mussels: Cell cycle regulation and DNA repair, *Comp. Biochem. Physiol. Part A Mol. Integr. Physiol.* 165 (2013) 159–168.

- [53] G.A. Fragkiadakis, Isolation of lectins from hemolymph of decapod crustaceans by adsorption on formalinized erythrocytes, *J. Biochem. Biophys. Methods.* 44 (2000) 109–114.
- [54] W. Rittidach, N. Pajit, P. Utarabhand, Purification and characterization of a lectin from the banana shrimp *Fenneropenaeus merguensis* hemolymph, *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 1770 (2007) 106–114.
- [55] P.K. Smith, R.I. Krohn, G.T. Hermanson, A.K. Mallia, F.H. Gartner, M.D. Provenzano, E.K. Fujimoto, N.M. Goetze, B.J. Olson, D.C. Klenk, Measurement of protein using bicinchoninic acid., *Anal. Biochem.* 150 (1985) 76–85.
- [56] V.P. Robles, F. Batista, *Proteómica: hacia el entendimiento del lenguaje de las proteínas*, Una Vent. Al Quehacer Científico. (2007) 97–108.
- [57] Boivin, S., Kozak, S., Meijers, R. (2013) Optimization of protein purification and characterization using Thermofluor screens, *Protein Expr. Purif.* 91, 192-206.
- [58] Ericsson U.B., Hallberg B.M., Detitta G.T., Dekker N., Nordlund P. (2006) Thermofluor-based high-throughput stability optimization of proteins for structural studies. *Anal Biochem.* 357(2):289-98.
- [59] T. Sata, C. Zuber, J. Roth, Lectin-digoxigenin conjugates: A new hapten system for glycoconjugate cytochemistry, *Histochemistry.* 94 (1990) 1–11.
- [60] T. Naganuma, T. Ogawa, J. Hirabayashi, K. Kasai, H. Kamiya, K. Muramoto, Isolation, characterization and molecular evolution of a novel pearl shell lectin from a marine bivalve, *Pteria penguin*, *Mol. Divers.* 10 (2006) 607–618.
- [61] C. Meléndez-González, M.J. Muria-González, A.L. Anaya, B.E. Hernández-Bautista, S. Hernández-Ortega, M.C. González, A.E. Glenn, R.T. Hanlin, M.L. Macias-Rubalcava, Acremoxanthone E , a Novel Member of Heterodimeric Polyketides with a Bicyclo [3 . 2 . 2] nonene Ring , Produced by *Acremonium camptosporum* W . plants from the El Eden Ecological Reserve in the state of Quintana Roo , Mexico . describe the isolation , s, *Chem. Divers.* 12 (2015) 133–147.
- [62] J.J.S. García, L. Ortiz-frade, E. Martínez-klimova, J.C.G. Ramos, M. Flores-alamo, T.R. Apan, E.I. Klimova, Synthesis , Electrochemistry and Antitumor

- Activity of 1 ' H , Azabenzimidazoles, 15 (2014) 44–56.
- [63] P. Chomczynski, Single-Step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium Extraction, 159 (1987) 156–159.
- [64] C. No, SMARTer ® RACE 5 ' / 3 ' Kit User Manual, 634859 (n.d.) 1–30.
- [65] McPherson, A (2009) Introduction to the Crystallization of Biological Macromolecules. Chapter 1. In Current Topics in Membranes, Volume 63. Elsevier
- [66] Minor, W., Cymborowski, M., Otwinowski, Z., & Chruszcz, M. (2006). *HKL - 3000: the integration of data reduction and structure solution – from diffraction images to an initial model in minutes. Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography*, 62(8), 859–866.
- [67] Afonine, P. V., Grosse-Kunstleve, R. W., Echols, N., Headd, J. J., Moriarty, N. W., Mustyakimov, M., Adams, P. D. (2012). Towards automated crystallographic structure refinement with phenix.refine. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 68(4), 352–367.
- [68] Emsley, P., & Cowtan, K. (2004). Coot: Model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 60(12 I), 2126–2132
- [69] Chen, V. B., Arendall, W. B., Headd, J. J., Keedy, D. A., Immormino, R. M., Kapral, G. J., Richardson, D. C. (2010). MolProbity: All-atom structure validation for macromolecular crystallography. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 66(1), 12–21.
- [70] Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., Meng, E. C., & Ferrin, T. E. (2004). UCSF Chimera - A visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of Computational Chemistry*, 25(13), 1605–1612.
- [71] Laskowski, R. A., Hutchinson, E. G., Michie, A. D., Wallace, A. C., Jones, M. L., & Thornton, J. M. (1997). PDBsum: A Web-based database of summaries and analyses of all PDB structures. *Trends in Biochemical Sciences*, 22(12), 488–490.

- [72] Krissinel, E., & Henrick, K. (2007). Inference of Macromolecular Assemblies from Crystalline State. *Journal of Molecular Biology*, 372(3), 774–797.
- [73] K.P. Murphy, Calorimetry, (2002), Encyclopedia of life sciences, Mcmillan Publishers Ltd, Nature Publishing Group 1–4.
- [74] Adrian Velazquez-Campoy, Stephanie A. Leavitt, and Ernesto Freire (2015) Characterization of Protein-Protein Interactions by Isothermal Titration Calorimetry. Chapter 11 In Protein-Protein Interactions, Methods and Applications. Cheryl L. Meyerkord and Haian Fu (Editors) [Schmidtchen, F.P. (2012) Isothermal Titration Calorimetry in Supramolecular. In Supramolecular Chemistry: From Molecules to Nanomaterials John Wiley & Sons, Ltd
- [75] M. King, Blood group antigens on human erythrocytes-distribution, structure and possible functions, *Biochim. Biophys. Acta.* 1197 (1994) 15–44.
- [76] Silva, H. C., Nagano, C. S., Souza, L. A. G., Nascimento, K. S., Isidro, R., Delatorre, P., Cavada, B. S. (2012). Purification and primary structure determination of a galactose-specific lectin from *Vatairea guianensis* Aublet seeds that exhibits vasorelaxant effect. *Process Biochemistry*, 47(12), 2347-2355.
- [77] Ynalvez, R., A., Fuentes, L.M., Sanchez, C. V. (2011). Comparison and Temperature Study of Lectin Activities in Texas Live Oak (*Quercus fusiformis*) Crude extracts. *Journal of Plant Sciences*, 6, 124-134.
- [78] He, S., Shi, J., Ma, Y., Xue, S. J., Zhang, H., & Zhao, S. (2014). Kinetics for the thermal stability of lectin from black turtle bean. *Journal of Food Engineering*, 142, 132–137.
- [79] D. Terada, A.R.D. Voet, H. Noguchi, K. Kamata, M. Ohki, Y. Fujii, D. Yamamoto, Y. Ozeki, J.R.H. Tame, K.Y.J. Zhang, Computational design of a symmetrical β -trefoil lectin with cancer cell binding activity, *Sci. Rep.* (2017) 1–13. doi:10.1038/s41598-017-06332-7.
- [80] J.-H. Liao, C.-T.H. Chien, H.-Y. Wu, K.-F. Huang, I. Wang, M.-R. Ho, I.-F. Tu, I.-M. Lee, W. Li, Y.-L. Shih, C.-Y. Wu, P.A. Lukyanov, S.-T.D. Hsu, S.-H. Wu, A Multivalent Marine Lectin from *Crenomytilus grayanus* Possesses Anti-cancer Activity through Recognizing Globotriose Gb3, *J. Am. Chem. Soc.* 138 (2016)

4787–4795. doi:10.1021/jacs.6b00111.

- [81] H. Stepan, M. Pabst, F. Altmann, H. Geyer, R. Geyer, E. Staudacher, O-Glycosylation of snails, *Glycoconj. J.* 29 (2012) 189–198.
- [82] M. Gutternigg, S. Bürgmayr, G. Pörtl, J. Rudolf, E. Staudacher, Neutral N-glycan patterns of the gastropods *Limax maximus*, *Cepaea hortensis*, *Planorbarius corneus*, *Arianta arbustorum* and *Achatina fulica*, *Glycoconj. J.* 24 (2007) 475–489.
- [83] Gupta R, et al. Prediction of N-glycosylation sites in human proteins. 2004 <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>
- [84] S. Kaushik, D. Mohanty, A. Surolia, Role of glycosylation in structure and stability of *Erythrina corallodendron* lectin (EcorL): A molecular dynamics study, *Protein Sci.* 20 (2011) 465–481.
- [85] Matthews BW. 1968. Solvent content of protein crystals. *J Mol Biol* 1968; 33:491-497.
- [86] A.G. Murzin, A.M. Lesk, C. Chothia, β -Trefoil fold, *J. Mol. Biol.* 223 (1992) 531–543
- [87] H. Ghazarian, B. Idoni, S.B. Oppenheimer, A glycobiology review: carbohydrates, lectins and implications in cancer therapeutics., *Acta Histochem.* 113 (2011) 236–47.
- [88] Kelly, S. M.; Jess, T.; Price, N.; 2005. How to study proteins by circular dichroism. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 1751(2), 119-139
- [89] L. Whitmore, B.A. Wallace, DICHROWEB, an online server for protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopic data., *Nucleic Acids Res.* 32 (2004), 668-673.
- [90] N. Sreerama, R.W. Woody, Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra: comparison of CONTIN, SELCON, and CDSSTR methods with an expanded reference set., *Anal. Biochem.* 287 (2000) 252–260.

ANEXO 1

Analisis bioinformático y elaboración de un árbol filogenético neighbor joining (NJ) de los miembros de la familia de lectinas Mytilidae

Se realizó una búsqueda de los Homólogos de MCL con la herramienta BLAST de la página <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> del <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> ncbi (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthom). Los dominios fueron identificados utilizando la herramienta de búsqueda de dominios conservados Domain search program (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) y el servidor SMART (http://smart.embl-heidelberg.de/smart/set_mode.cgi?NORMAL=1). Se realizó un alineamiento múltiple con los homólogos más cercanos utilizando PRALINE (<http://www.ibi.vu.nl/programs/pralinewww/>) y la versión 7.0 de MAFFT (<https://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>). La predicción de los modelos 3D de las secuencias de MGL 2, 3, 4 y 5 se hicieron con el servidor ROSETTA (<http://www.rosetta.org/submit.jsp>). De los alineamientos múltiples obtenidos en MAFFT se generó un archivo formato .Pdb para visualizarlo en el servidor en línea T Rex.

Resultados de análisis bioinformático y árbol filogenético (NJ)

El análisis de la secuencia de MCL (ALJ322152.1) en BLAST no mostró dominios conservados y no tiene similitud con galectinas como esperábamos, esto debido al reconocimiento que tiene por galactósidos, además de que las galectinas es una de las familias más reportadas para invertebrados marinos. Los homólogos más cercanos encontrados en la búsqueda fueron las secuencias de las lectinas previamente reportadas sin clasificar de los bivalvos *M. galloprovincialis*, *C. grayanus* y *M. trossulus*, las cuales están enlistados en la siguiente tabla.

Tabla 18. Homólogos de MCL encontrados en BLAST

Lectina	Codigos de acceso	Organismo
MGL 5	BAU68218	<i>Mytilus galloprovincialis</i>
MGL 4	PDB, 3WMU PDB, 3WMV	<i>Mytilus galloprovincialis</i>
MGL	B3EWR1.1	<i>Mytilus galloprovincialis</i>
CGL 2	PDB, 5DUY	<i>Crenomytilus grayanus</i>
CGL	AEY80387.1	<i>Crenomytilus grayanus</i>
CGL3	PDB, 58FS	<i>Crenomytilus grayanus</i>
MTL	AKI29293.1	<i>Mytilus trossulus</i>
MGL3	AJQ21527.1	<i>Mytilus galloprovincialis</i>
MGL2	AJQ21526.1	<i>Mytilus galloprovincialis</i>

La búsqueda de dominios conservados con la herramienta SMART de la página del NCBI, no identificó ningún dominio conservado en la secuencia de MCL. Para los alineamientos múltiples con los diferentes homólogos omitimos los fragmentos adicionales con los que cuentan las secuencias de MGL 2, 3 y 5, estos extremos adicionales son descritos por Hasan y colaboradores [50], estos se presentan en el material genético, pero no han podido ser aislados del mejillón. Los fragmentos adicionales que forman parte de MGL 2 y 3 forman parte de un dominio formador de poro tipo-aerolisina. El resultado del alineamiento múltiple en PRALINE mostró que todas las secuencias poseen un valor alto de conservación (7-10), siendo cero para el valor más bajo y 10 para la región más conservada en los alineamientos.

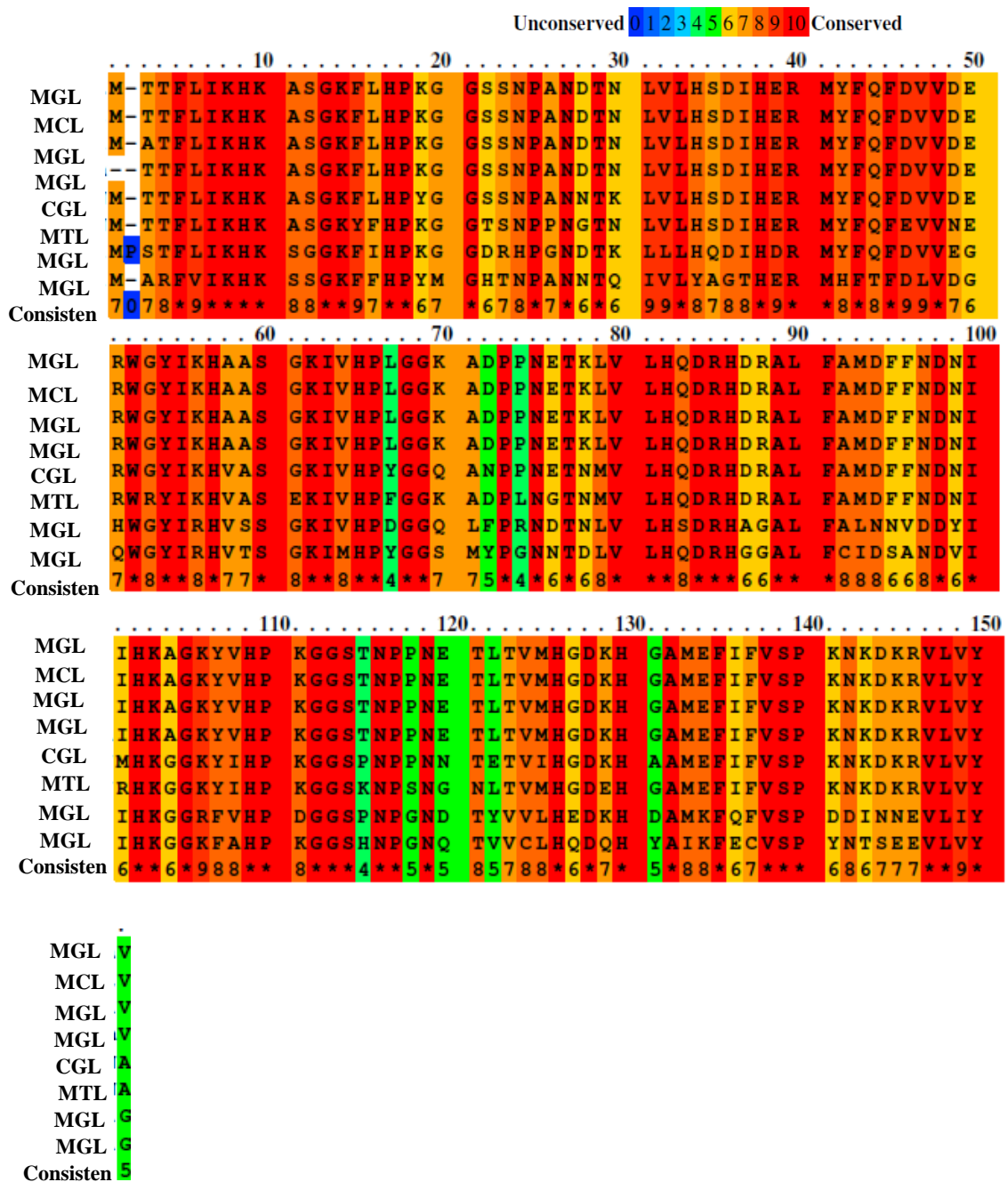


Figura 34. Alineamiento múltiple en PRALINE. Se muestran las regiones conservadas de los homólogos más cercanos de MCL.

Para la construcción del árbol filogenético utilizamos las secuencias de todos los miembros de la familia Mytilidae usando el método de Neighbor Joining-Saitou and Nei (1987) y un Bootstrap de 1000 replicas.

Obtuvimos un árbol sin raíces que muestra dos grandes grupos monofiléticos y a MGL 4 como el miembro más alejado o más ancestral. Uno de estos grandes grupos que es el que tiene más similitud con MGL4, está compuesto por MTL, CGL y MGL 2. Es interesante observar que CGL comparte mayor similitud con MGL 2 y 3 que pertenecen al mejillon *M. galloprovincialis*. El Segundo grupo monofilético está compuesto por MCL, MGL y MGL5. Sin embargo, MCL es más cercano al más ancestral del árbol (MGL 4). De este análisis es posible suponer que los miembros más ancestrales están más cercanos a MGL 4 y los miembros más recientes son MGL 2 y 3, los cuales tienen en común un dominio adicional, que corresponde a un dominio formador de poro de tipo-aerolisina, que le permite a estas lectinas neutralizar patógenos de una forma más eficiente, lo que puede representar una ventaja evolutiva comparado con las actividades biológicas reportadas para las demás lectinas, que solo tienen la capacidad de aglutinar. MGL 5 al igual que MGL 2 y 3 también posee un fragmento adicional y también aparece como un miembro más reciente.

La estructura del gen de MGL 5 le permite codificar dos cadenas polipeptídicas una de 167 aminoácidos y otra de 150. De igual forma, el gen de MCL contiene un fragmento adicional de 30 aminoácidos que le permite codificar una cadena polipeptídica más grande. Cuando este fragmento adicional se utiliza para ser modelado en Robetta, este servidor utiliza como molde una glicosil transferasa. Es posible que la organización genómica de estos organismos pueda generar proteínas con diferentes funciones o cuyas expresiones dependen de ciertas circunstancias. También es probable que las proteínas que se codifican a partir del mismo transcrito tengan funciones complementarias y puedan trabajar juntas en una respuesta inmune más eficiente. Es importante mencionar que lo sugerido anteriormente requiere de análisis bioinformáticos más rigurosos y estudios proteómicos que respalden lo anterior.

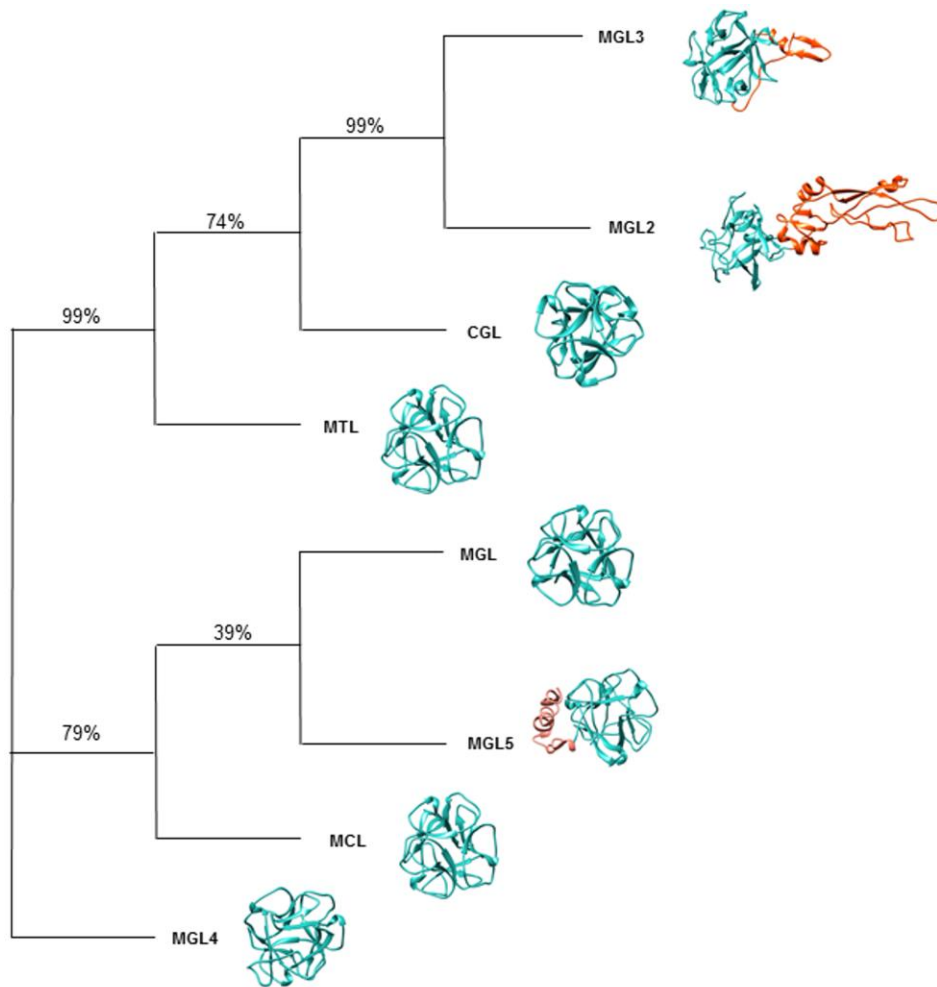


Figura 35. Arbol filogenético Neighbor Joining de los homólogos más cercanos de MCL.

ANEXO 2

Estudios de dicroísmo circular en el UV-lejano

La aplicación de la espectroscopía de dicroísmo circular (DC), en la determinación de la estructura secundaria de proteínas, se basa en la quiralidad de los aminoácidos que la conforman. Esta técnica utiliza las propiedades de la luz polarizada formada por dos componentes polarizados circulares, uno a la derecha y el otro a la izquierda. Estos componentes están en fase y son de la misma amplitud. Al pasar por un medio ópticamente activo, cada componente interactúa de manera diferente con los centros quirales de las moléculas presentes. La interacción de la radiación con la muestra induce un desfase y un cambio de magnitud en ambos componentes de la luz circularmente polarizados. Estos fenómenos provocan una rotación del plano de polarización en un ángulo α y la distorsión de este plano genera una elipse. La rotación del plano y la diferente absorción de los componentes circularmente polarizados varían de acuerdo con la longitud de onda incidente, pudiéndose obtener un espectro de la rotación o elipticidad contra la longitud de onda (λ) [88]. Los espectros de dicroísmo circular se suelen obtener en las regiones del ultravioleta cercano (250 a 350 nm) y lejano (180 a 250 nm). En la región cercana, los cromóforos más importantes son los anillos aromáticos de las cadenas laterales de triptófano, tirosina y fenilalanina. Mientras que la absorción en la región del ultravioleta lejano, se debe a los enlaces peptídicos; su asimetría se debe al arreglo espacial de la cadena principal de la proteína, por lo cual, las señales se pueden interpretar en términos del contenido de estructura secundaria (hélices, hojas beta, y zonas desestructuradas) [88].

Para este estudio, las proteínas se dializaron contra un amortiguador de fosfatos 10 mM, pH 7.4. Las mediciones de DC de la proteína se llevaron a cabo en un espectropolarímetro J-720 (Jasco Inc., USA) con el que se colectó la señal en el espectro UV-lejano desde 185 hasta 260 nm a 20°C utilizando una velocidad de barrido de 20 nm/min, un ancho de banda de 1.0 nm y un tiempo de respuesta de 1 s, en una celda de cuarzo con 0.1 cm de longitud de paso de luz. La concentración de proteína utilizada fue de 0.25 mg/mL. Los valores obtenidos en grados fueron normalizados mediante la sustracción de la señal del amortiguador correspondiente (blanco) bajo las

mismas condiciones. Los espectros fueron expresados como dicroísmo circular molar ($\Delta\epsilon$) en $M^{-1}cm^{-1}$, utilizando la siguiente fórmula:

$$\Delta\epsilon = \theta\lambda \times 0.1 \times MRW / L \times C \times 3298$$

Donde:

$\Delta\epsilon$ = Dicroísmo circular molar ($M^{-1}cm^{-1}$)

$\theta\lambda$ = Elipticidad en milirados a la longitud de onda correspondiente

MRW = Masa media por residuo (Da) que se calcula: masa molecular de la proteína (Da)/(número de aminoácidos-1)

L = paso de luz (cm)

C = concentración de la proteína (g/ml)

Los resultados obtenidos se expresaron como elipticidad molar por residuo medio ($[\theta]$ grados $cm^2 dmol^{-1}$). La estimación del contenido de estructura secundaria se obtuvo mediante el análisis de los espectros con el servidor DichroWeb [89], utilizando el algoritmo de Provencher y Glockner [90].

Resultados de los estudios de dicroísmo circular en el UV lejano en MCL

Los estudios de dicroísmo circular en el UV-lejano (190-260 nm) mostraron que MCL contiene 38.2 % de hebras β , 6.2 % de hélices y 22.5 % de giros, por lo que se trata de una proteína con un alto contenido de hebras β (Figura 36). Estos valores son comparables con los que se reportaron para CGL [47] y el pepino de mar *Cucumaria echinata* CEL-III [44] y coinciden con lo observado en su estructura terciaria.

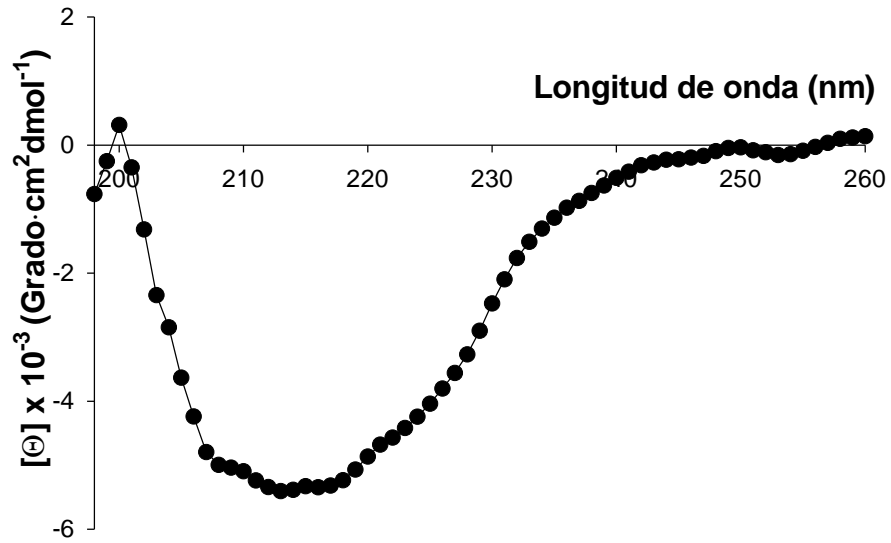


Figura 36. Espectro de dicroísmo circular en el UV lejano de MCL. El espectro se realizó a una concentración de proteína de 0.25 mg/mL en amortiguador de fosfato de sodio 10 mM pH 7.4.

ANEXO 3

Molecular and functional characterization of a glycosylated Galactose-Binding lectin from *Mytilus californianus*.

Garcia-Maldonado E., Cano-Sanchez P. and Hernández-Santoyo A.

Fish and Shellfish Immunology