



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA**

**Purificación y caracterización fisicoquímica y estructural de
una lectina del mejillón *Mytilus edulis***

T E S I S

Para obtener el título de:

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

**P R E S E N T A:
MÓNICA VIÑAS CASAS**

Director de tesis:

Dra. Alejandra Hernández Santoyo

Asesor de tesis:

Q.F.B. Enrique Escalera Zúñiga

México, D.F. a Junio del 2005



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Esta tesis se realizó bajo la dirección de la Dra. Alejandra Hernández Santoyo, en el laboratorio de Bioquímica del Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.

AGRADECIMIENTOS

A mis Padres:
Dulce Ma. Casas y V. Rogelio Viñas
Por su amor, apoyo y comprensión
que me inspira a superarme.

A mis Hermanas:
Dulce y Katia
Por su cariño, ya que sin él hubiera
sido más difícil lograr mis metas.

A la Dra. **Alejandra Hernández S.**
Por su paciencia y guía al realizar
este trabajo.

A mis **AMIGOS** y compañeros por su compañía, sincera amistad y crítica
constructiva que me han ayudado a mejorar algunos aspectos de mi vida.

Todos somos ignorantes, la diferencia radica en que no todos ignoramos lo mismo.

Albert Einstein.

CONTENIDO

ABREVIATURAS	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
RESUMEN	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
1. INTRODUCCIÓN	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
2. MARCO TEÓRICO	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
2.1. Lectinas tipo-C.....	¡Error! Marcador no definido.
2.1.1 <i>Las colectinas.</i>	¡Error! Marcador no definido.
2.1.2 <i>Selectinas.</i>	¡Error! Marcador no definido.
2.1.3 <i>Receptores del tipo II.</i>	¡Error! Marcador no definido.
2.1.4 <i>Tipo I.</i>	¡Error! Marcador no definido.
2.2. Galectinas.	¡Error! Marcador no definido.
2.3. Lectinas en invertebrados marinos.	¡Error! Marcador no definido.
2.4. Descripción del Mejillón	¡Error! Marcador no definido.
3. OBJETIVO GENERAL.....	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
3.1. Objetivos específicos	¡Error! Marcador no definido.
4. HIPÓTESIS	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
5. MATERIALES Y MÉTODOS	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
5.1. Lista de material, equipo y reactivos utilizados.....	¡Error! Marcador no definido.
5.2. Extracción de la lectina.	¡Error! Marcador no definido.
5.3. Preparación de eritrocitos formalinizados	¡Error! Marcador no definido.
5.4. Cuantificación de la proteína purificada	¡Error! Marcador no definido.
5.5. Prueba de aglutinación.....	¡Error! Marcador no definido.
5.6. Purificación.....	¡Error! Marcador no definido.
5.6.1 <i>Preparación de la columna de afinidad.</i>	¡Error! Marcador no definido.
5.6.2 <i>Purificación de la lectina.</i>	¡Error! Marcador no definido.
5.7. Caracterización de la lectina purificada.....	¡Error! Marcador no definido.
5.7.1 <i>Prueba de afinidad.</i>	¡Error! Marcador no definido.
5.7.2 <i>Determinación del peso molecular.</i>	¡Error! Marcador no definido.
5.7.2.1 <i>Electroforésis SDS-PAGE</i>	¡Error! Marcador no definido.
5.7.2.2 <i>Espectrometría de masas MALDI-TOF</i>	¡Error! Marcador no definido.
5.7.3 <i>Determinación del punto isoeléctrico (pI).</i>	¡Error! Marcador no definido.
5.7.4 <i>Determinación de los valores óptimos de pH y temperatura. ...</i>	¡Error! Marcador no definido.

5.7.5. Estudios de calorimetría de titulación isotérmica.	¡Error! Marcador no definido.
5.7.6. Estudios de solubilidad y conducta de agregación	¡Error! Marcador no definido.
5.7.7. Determinación de la estructura secundaria.	¡Error! Marcador no definido.
5.7.8. Cristalización.....	¡Error! Marcador no definido.
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
6.1. Purificación de la lectina de <i>Mytilus edulis</i>	¡Error! Marcador no definido.
6.2. Estudios electroforéticos.....	¡Error! Marcador no definido.
6.2.1. Peso molecular (SDS-PAGE).....	¡Error! Marcador no definido.
6.2.2. Punto isoeléctrico (pI).....	¡Error! Marcador no definido.
6.3. Espectrometría de masas.....	¡Error! Marcador no definido.
6.4. Efecto del pH y la temperatura en la actividad de la lectina de <i>M. edulis</i>	¡Error! Marcador no definido.
6.5. Prueba de inhibición de la actividad de la lectina de <i>M. edulis</i> ...	¡Error! Marcador no definido.
6.6. Estudio de ITC de la lectina de <i>M. edulis</i>	¡Error! Marcador no definido.
6.7. Estudios de Dicroísmo Circular (DC).....	¡Error! Marcador no definido.
6.8. Comportamiento en solución y conducta de agregación.....	¡Error! Marcador no definido.
6.9. Cristalización.....	¡Error! Marcador no definido.
7. CONCLUSIONES	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
8. PERSPECTIVAS	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
9. BIBLIOGRAFÍA	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
APÉNDICE	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
FUNDAMENTOS DE LAS TÉCNICAS UTILIZADAS	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
1. Método de cuantificación. Protein Assay ESL (<i>Exact, Sensitive, Low interference</i>).	¡Error! Marcador no definido.
2. Electroforesis SDS-PAGE	¡Error! Marcador no definido.
3. Espectrometría de masas MALDI-TOF.....	¡Error! Marcador no definido.
4. Enfoque isoeléctrico (EI).	¡Error! Marcador no definido.
5. Dispersión dinámica de luz (DLS).....	¡Error! Marcador no definido.
6. Dicroísmo circular (DC).....	¡Error! Marcador no definido.

7. Calorimetría de titulación isotérmica (ITC). **¡Error! Marcador no definido.**
8. Cristalización..... **¡Error! Marcador no definido.**

ABREVIATURAS

Å: Ångstrom

AF : Amortiguador de fosfatos

AFS: Amortiguador de fosfatos salino

BSA: Albúmina de suero de bovino

CRD: Dominio de reconocimiento al carbohidrato

DC: Dicroísmo circular

DLS: Dispersión dinámica de luz

ECF: Eritrocitos de conejo formalinizados

EI: Enfoque isoeléctrico

ESL: Método de cuantificación de proteína, exacto, sensible y de baja interferencia

g: Fuerza centrífuga relativa

GlcNAc: N-acetil-glucosamina

ΔH: Entalpía

Ig: Inmunoglobulina Ig

ITC: Calorimetría de titulación isotérmica

K_b: Constante de unión

kDa: Kilodaltones

λ: Longitud de onda

LME: Lectina de *Mytilus edulis*

MALDI-TOF: Espectrometría de masas mediante ionización-desorción por láser asistidas por matriz acoplada a un analizador de tiempo de vuelo.

μL: microlitros

μmol: micromoles

mM: milimolar

mOsM: miliosmolar

MBL: Lectina que se une a manosa

MBP: Lectina que se une a manano

n: Estequiometría de reacción.

NK: natural killer

nm: nanómetros

PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida

pI: Punto isoelectrico

ÄS: Entropía

SDS: Dodecil sulfato de sodio

Tris: Tris (hidroximetil) amino-metano

U: Unidad de actividad

UV: Ultravioleta

RESUMEN

Las lectinas son proteínas no enzimáticas presentes en una gran variedad de organismos. Estas preferentemente se unen a un carbohidrato específico y juegan un papel importante en el reconocimiento celular. Debido a ésta capacidad, las lectinas pueden aglutinar eritrocitos, bacterias, virus y células cancerígenas por lo que resulta de gran importancia su estudio a partir de diferentes fuentes con el fin de encontrar propiedades y especificidades diferentes.

Las lectinas han sido ampliamente estudiadas, sin embargo, en invertebrados los estudios son pocos y en moluscos se reducen a estudios bioquímicos, siendo los fisicoquímicos y estructurales casi nulos. Dada la actividad tan alta que presentan las lectinas de moluscos y su aplicación tan amplia hacen que su estudio sea de gran importancia, enriqueciendo así el conocimiento de estas proteínas para resolver interrogantes respecto a su funcionamiento y las relaciones estructurales que guardan entre sí.

En este trabajo se diseñó el procedimiento para aislar y purificar una lectina del extracto de *Mytilus edulis*, utilizando eritrocitos (de conejo) como soporte de purificación. La lectina mostró ser una proteína altamente activa, que tiene afinidad por la rafinosa, con un punto isoeléctrico de 7.6 y una masa de 6.4 kDa. La temperatura y el pH óptimo de actividad fueron de 25 °C y 7.4 respectivamente. Se observó que la cisteína y el NaCl mejoran la actividad sin ser dependiente de ellos. Mediante estudios de dispersión dinámica de luz se determinó que la lectina tiende a formar agregados conforme aumenta la temperatura y que con la adición de la rafinosa estos agregados se solubilizan volviendo a agregarse cuando los sitios de unión de la lectina están totalmente saturados.

Por técnicas de dicroísmo circular, se observó que la estructura secundaria que predomina es la hoja beta.

Los estudios de calorimetría de titulación isotérmica (ITC) revelaron que la lectina tiene cinco sitios de unión dando un modelo matemático secuencial, el cual sugiere que la lectina presenta un reacomodo molecular para hacer disponible un sitio de unión y poder unir así otra molécula de rafinosa.

Se encontraron las condiciones óptimas para obtener cristales de la lectina, aunque aún falta hacerlos crecer para poder difractarlos.

1. INTRODUCCIÓN

Las lectinas son proteínas o glicoproteínas de origen no inmune, que se unen de forma específica y reversible a carbohidratos ya sean libres o que formen parte de estructuras más complejas; con capacidad para aglutinar células y precipitar glicoconjugados. Contienen al menos dos sitios de unión, de ahí que puedan enlazarse en primer lugar a un carbohidrato específico y en forma secundaria a una molécula glicosilada.¹

Están ampliamente distribuidas en la naturaleza. En las plantas se han detectado principalmente en los cotiledones y endospermos de las semillas y constituyen del 2 al 10 % del total de las proteínas de éstas. En los animales se han encontrado en mamíferos (ratas, hombre, etc.) y en invertebrados, tales como cangrejos, camarones, caracoles, lombrices y moluscos, en donde se localizan principalmente en la hemolinfa y órganos sexuales.¹

La aplicación de las lectinas es muy amplia e incluye que:

- a) Pueden formar complejos lectina-lectina, lectina-enzima y lectina-anticuerpo, lo que ha permitido el desarrollo de técnicas como la cromatografía de afinidad para la purificación de glicoproteínas, enzimas y de las propias lectinas.
- b) Las interacciones de las lectinas con células, pueden ser inhibidas por carbohidratos, por lo que se ha concluido que se unen a sacáridos de la superficie celular, por lo que se han convertido en útiles marcadores para emplearlos en técnicas histoquímicas y en microscopia electrónica, para estudiar la estructura y función de la membrana plasmática.
- c) Permiten estudiar cambios estructurales en los glicoconjugados presentes en las superficies celulares, y en ocasiones de esta forma detectar cambios morfológicos, y así analizar la distribución subcelular de epítopes y residuos terminales de glicoproteínas, además de detectar alteraciones en la expresión de moléculas presentes en la superficie celular.
- d) La aglutinación preferencial que muestran las lectinas con células transformadas permite la detección de transformaciones malignas en células. Además, se han realizado investigaciones para utilizar las lectinas y polímeros sintéticos enlazados a

ellas como agentes anticancerígenos *in vivo* e *in vitro*, ya que se ha visto que disminuyen el crecimiento de las células tumorales.

- e) Se utilizan para la inmunización contra virus productores de inmunodeficiencia y como medicamentos para prevenir metástasis.
- f) Las propiedades citotóxicas de algunas lectinas hacen también que éstas brinden interés como potenciales armas terapéuticas en el tratamiento del cáncer humano.
- g) Poseen propiedades mitogénicas que permiten que se utilicen en estudios que tienen como base la proliferación de linfocitos en cultivos.¹

Por todo lo anterior, este tipo de proteínas son herramientas muy valiosas debido a su amplia aplicación en varios campos de la ciencia, por lo que resulta de gran importancia su estudio a partir de diversas fuentes con el fin de encontrar propiedades y especificidades diferentes. A la fecha, la mayoría de los estudios sobre lectinas se han enfocado a aspectos bioquímicos y se han estudiado principalmente a partir de plantas y mamíferos. En cuanto a aspectos fisicoquímicos y estructurales, hay poca información, sobre todo de invertebrados marinos. En este proyecto se estudió desde un aspecto fisicoquímico y estructural a una lectina del molusco marino *Mytilus edulis*.

2. MARCO TEÓRICO

Hace 144 años un hombre llamado S. W. Mitchell describió la coagulación de la sangre como resultado de la actividad de una lectina del veneno de víbora. En 1898 se introdujo el término hemaglutinina por M. Elfstrand para proteínas de plantas que aglutinaban eritrocitos. Hasta entonces sólo se conocía la propiedad aglutinante de las lectinas y en 1913, se comenzó a purificarlas utilizando células. En 1919 se obtuvo el primer cristal de una lectina, la Concanavalina A (ConA), por J.B. Summer y en 1936 se descubrió su ligando. Cinco años después se descubrieron lectinas virales y a finales de los 30's se detectó una lectina específica para un grupo sanguíneo, pero sólo hasta 1952 se pudo descubrir la naturaleza de los carbohidratos presentes en los grupos sanguíneos, esto gracias a las lectinas. La primera lectina animal específica para el grupo A (1964) se encontró en la almeja *Saxidomus giganteus* y posteriormente se reportaron lectinas anti-A en el caracol *Helix pomatia* y especies relacionadas.²

A pesar de que se conocía la valiosa propiedad de este tipo de proteínas, el término "lectina" que describía a proteínas que se unen a carbohidratos se introdujo en 1954. Hasta entonces sólo se habían obtenido cristales de lectinas y fue hasta 1972 que G M Edelman y colaboradores determinaron la secuencia y la estructura tridimensional de una lectina, la concanavalina A.³ La primera estructura de una lectina animal, la resolvieron Lobsanov y colaboradores.⁴ Desde entonces se han elucidado varias estructuras de lectinas animales, tanto en su forma libre como en complejo con carbohidratos. A la fecha se conocen las estructuras tridimensionales de al menos un miembro de trece familias de lectinas animales.⁵ Sin embargo, en lo que respecta a la resolución de estructuras tridimensionales de lectinas de invertebrados, solamente se tienen la estructura de la SAP de *Limulus polyphemus*⁶, la CEL-I de *Cucumaria echinata*⁷, la CEL-III también de *C. echinata*⁸ y la Tachilectina-2 de *Tachypleus tridentatus*⁹. Y en lo que respecta a las lectinas de moluscos, solamente se ha logrado cristalizar la aglutinina de *H. pomatia*, aunque difractó a baja resolución y no se pudo resolver su estructura.¹⁰

A partir de la estructura primaria de las lectinas animales, Drickamer estableció la existencia de dos familias estructurales: las lectinas tipo-C (que requieren calcio para su actividad) y las tipo-S (sulfidrilo dependiente o que unen β -galactósidos). Ambas familias

tienen un dominio conservado de aproximadamente 120 residuos de aminoácidos, aunque los dominios del tipo-C y tipo-S son totalmente diferentes el uno del otro.¹¹

Existen lectinas calcio-dependientes que no están definidas dentro de la secuencia primaria tipo-C, y lectinas tipo-S (comúnmente conocidas como galectinas) que no son sulfidrilo dependientes.¹¹

Según la homología en su estructura primaria, las lectinas se clasifican en al menos 10 familias más, además de las lectinas tipo-C y las galectinas (tipo-S):¹¹

- *Tipo-I
 - *Tipo-P (receptores fosfomanosilo)
 - *Pentraxinas
 - *Lectinas del huevo.
 - *Calreticulina y calnexinas
 - *ERGIC-53 y VIP-36
 - *Discoidinas
 - *Aglutininas de la anguila (fuclectinas)
 - *Lectinas arexinas
 - Ficolinas
 - Taquilectinas 5A y 5B
 - Aglutininas de *Limas flavus*
- } Tipo fibrinógeno

2.1. Lectinas tipo-C.

Son calcio-dependientes, forman una familia extremadamente grande, integrada por miembros que tienen estructuras y funciones diversas. El calcio está implicado no sólo en el carbohidrato que se une en el sitio obligatorio, sino que contribuye al mantenimiento estructural del dominio de la lectina que es esencial para su actividad. Los dominios de reconocimiento al carbohidrato (CRDs) se incorporan en una variedad de contextos de la organización molecular (Figura 1). Este hecho puede reflejar la importancia del reconocimiento del carbohidrato en funciones biológicas diversas. Se pueden categorizar dos tipos de lectinas del tipo-C: lectinas solubles secretadas de las células y las lectinas transmembranales.

Las funciones representativas de las proteínas transmembranales son el reconocimiento molecular entre las células y la unión célula-célula. Las lectinas solubles contienen un solo dominio de lectina del tipo-C en el C-terminal.¹²⁻¹³

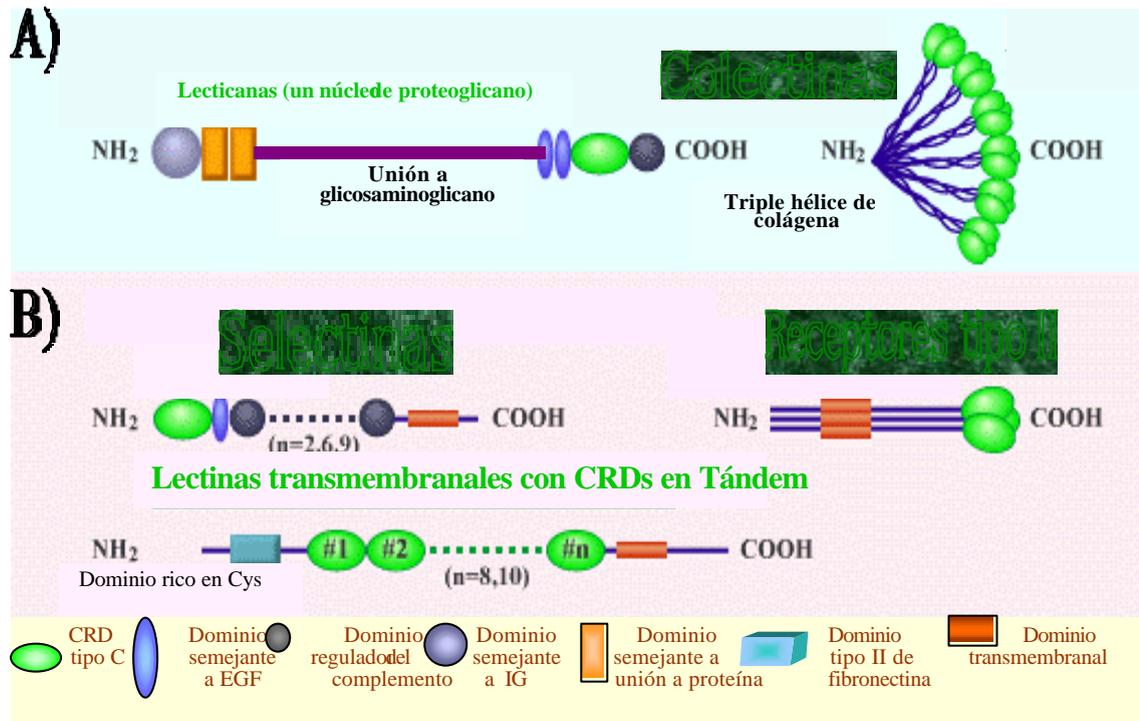


Figura 1. Organización molecular de las lectinas tipo C. A) Lectinas solubles: colectinas. B) Lectinas transmembranales: selectinas y receptores tipo II.

2.1.1 Las colectinas.

Son una subfamilia de las lectinas del tipo C específicas para manosa, son solubles y tienen una estructura única ya que tiene un dominio del tipo C y un dominio de colágeno que se supone está implicado en la inmunidad natural. Las colectinas incluyen proteínas del suero, proteína que se unen a manano (MBP) o proteína que se une a manosa (MBL), se unen además a la GlcNAc, fucosa y a la glucosa.

Se caracterizan por sus estructuras primarias inusuales y también por sus estructuras tridimensionales únicas (Figura 2). Contienen de 3 a 6 unidades estructurales idénticas, que son ligadas por acoplamiento al disulfuro en el N-terminal para formar tetrámeros.¹⁴

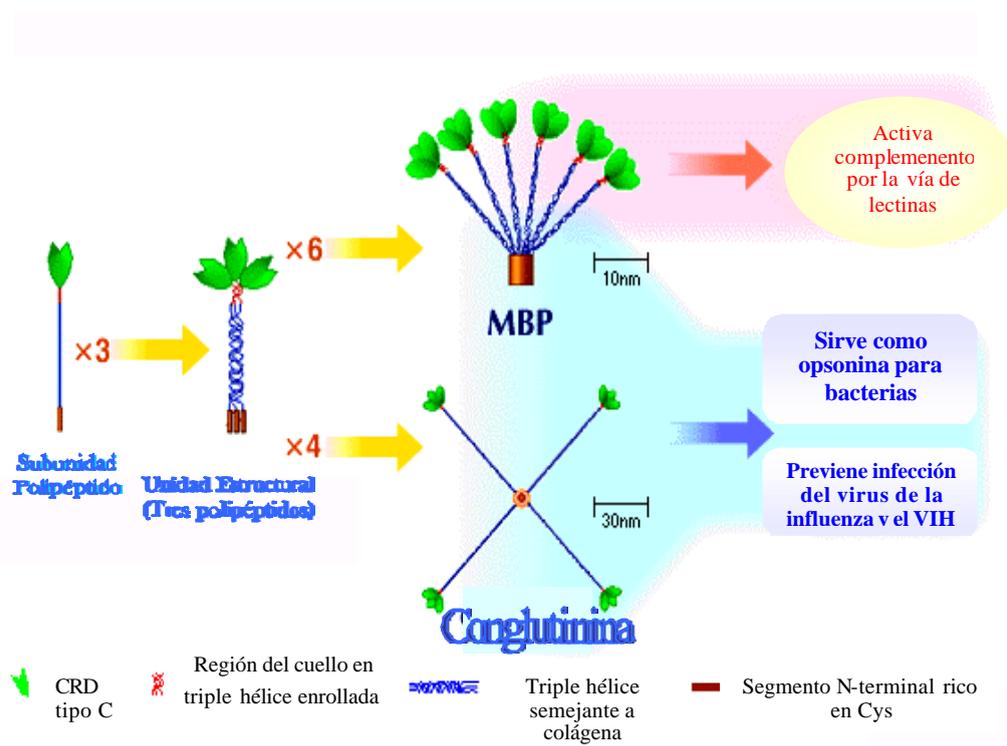


Figura 2. Estructuras moleculares y actividades biológicas de las colectinas: MBP y conglutininas. MBP no solamente se encuentra como hexámeros, sino también como trímeros, tetrameros y pentámeros de la unidad estructural. MBP consiste en 6 unidades estructurales que están montadas como un racimo. Las conglutininas consiste en unidades estructurales tetraméricas, están montados en forma de “X”.

Las colectinas desempeñan un papel importante en el sistema inmune. Se unen a los carbohidratos de los huéspedes presentes en la superficie de una gama de microorganismos, incluyendo bacterias, levaduras, hongos, protozoos y virus, además de que promueven la fagocitosis.¹⁴

Los experimentos *in vitro* demuestran que las colectinas secretadas tienen tres clases de actividad antiviral (Figura 3):

- Actúan como anticuerpos que neutralizan e inhiben el crecimiento viral en las células infectadas (inhibición viral directa).
- Fijan a las glicoproteínas y a los glicolípidos en el virión en las células infectadas y activan el camino de la lectina y del complemento, finalmente causando lisis (camino de activación del complemento).

c) Unen a las glicoproteínas y a los glicolípidos en el virión en las células infectadas y los endocitan (el camino de opsonización).

Se ha observado que MBL suministrado a personas MBL-deficientes es muy eficaz en la superación de susceptibilidad a las infecciones. Estos datos indican que en el futuro MBL será un fármaco útil para las personas inmunodeficientes y desempeñará un papel importante en resistencia a las infecciones virales o bacterianas.¹⁵⁻¹⁸

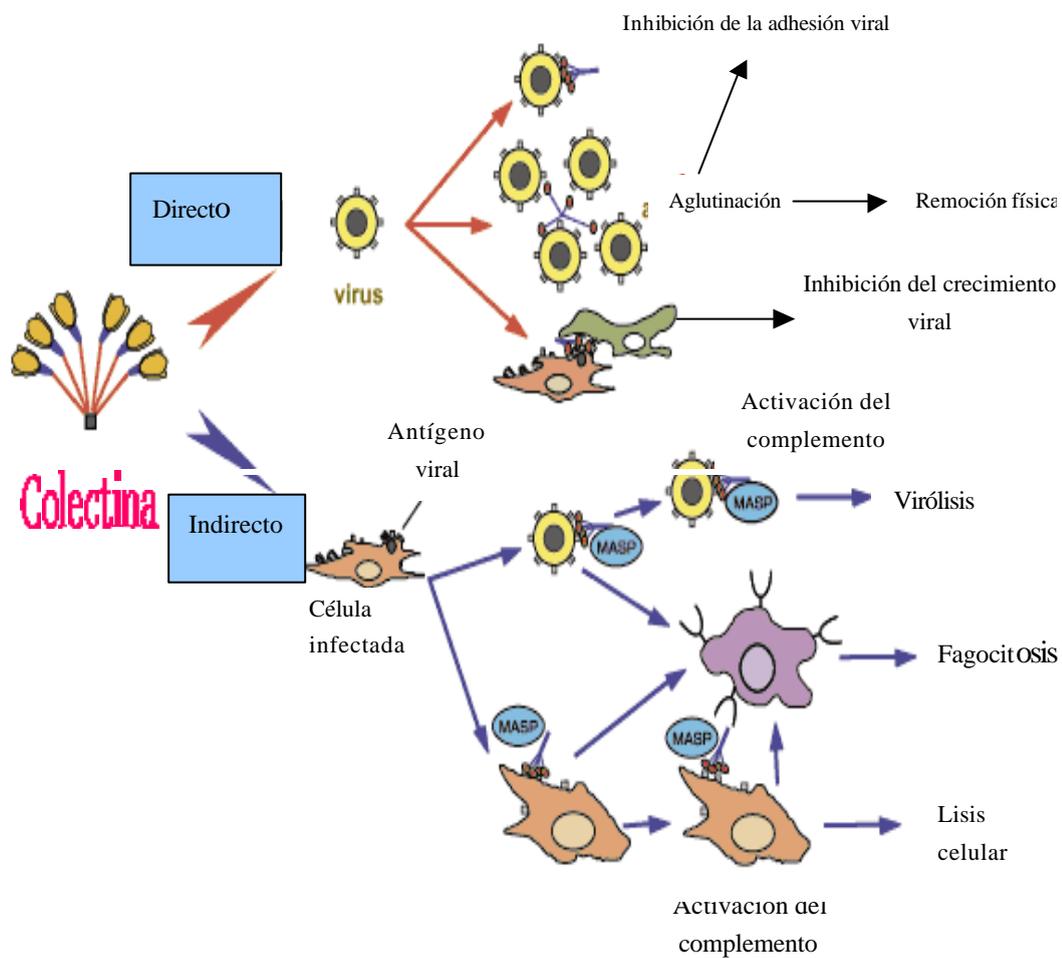


Figura 3. Actividad antiviral de las colectinas.

2.1.2. *Selectinas.*

Son lectinas transmembranales implicadas en la interacción adhesiva entre los leucocitos y las células endoteliales vasculares, paso importante requerido para la extravasación del leucocito. La selectina en el lado del leucocito se denomina selectina-L y se expresa generalmente en casi todos los leucocitos, mientras que al lado endotelial son llamadas selectinas-P (encontradas originalmente en plaquetas activadas, sin embargo, su expresión también se induce en endotelio vascular activado). Las selectinas E forman una subfamilia distinguida por su función específica en la adherencia del leucocito a las células endoteliales con el reconocimiento del sialil-LewisX (Figura 4).¹⁹

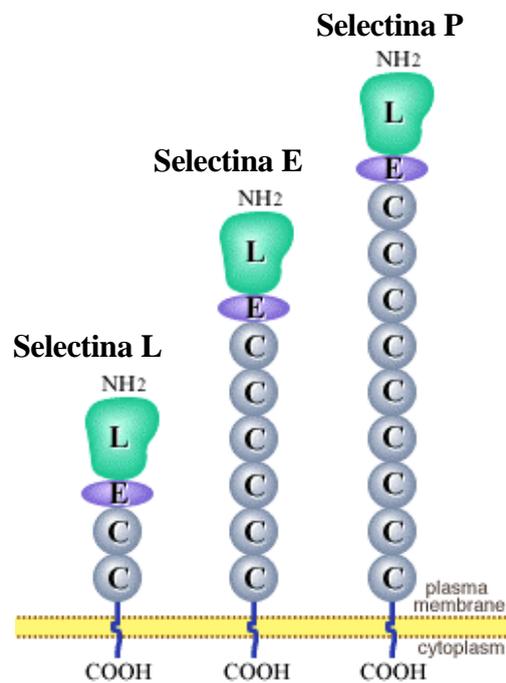


Figura 4. Tipos de selectinas.

La extravasación del leucocito es un proceso importante en el mecanismo de autodefensa en un sitio de inflamación, así como en el linfocito autoguiado hacia el blanco.

La adherencia de la selectina a la célula se basa en el reconocimiento del carbohidrato de la lectina calcio-dependiente. Básicamente los ligandos para la selectina-L se encuentran en

las células endoteliales mientras que los ligandos para la selectina-P y E se encuentran en leucocitos.²⁰⁻²¹

2.1.3. Receptores del tipo II.

Son el segundo tipo de lectinas del tipo-C transmembranales, tienen un solo dominio de transmembrana con un C-terminal extracelular y con el amino terminal citoplásmico. El CRD está situado en el C-terminal extracelular. Los ejemplos típicos de este grupo son el receptor de hepatocitos, la lectina específico del macrófago galactosa-N-acetilgalactosamina y los receptores de NK (natural killer).²²

2.1.4 Tipo I.

Son también lectinas tipo-C transmembranales con CRDs extracelular. El N-terminal extracelular tiene un dominio cisteínico seguido por un dominio del tipo II de la fibronectina, un CRDs en complemento, un dominio de transmembrana y un dominio citoplásmico C-terminal. Este grupo incluye los receptores superficiales de manosa de la célula en macrófagos y Dec-205 que es una molécula de la superficie de las células dendríticas (un tipo importante de antígeno que presentan las células).²²

2.2. Galectinas.

En general las galectinas son solubles y catión independientes en su actividad. Su localización histológica es diversa, no sólo en citoplasma sino también en núcleos, en superficies de la célula y en espacios extracelulares, dependiendo de la especie de galectina.

Su distribución biológica es amplia, no solamente se encuentra en vertebrados sino también en invertebrados como nematodos, insectos y esponjas, y recientemente se ha encontrado en la seta fungosa²³.

Se han demostrado una variedad de fenómenos biológicos de las galectinas como morfogénesis, metástasis, apoptosis, etc. Sin embargo, se sabe relativamente poco sobre el

mecanismo por el cual las galectinas ejercen estas funciones, particularmente en términos del reconocimiento al carbohidrato.

Las galectinas hasta el momento se pueden clasificar en tres tipos con base en su arquitectura estructural: proto, quimera y en complemento (Figura 5). Se propuso que las galectinas de mamíferos estén numeradas en orden a su descubrimiento (registro en GenBank). Según este sistema, se han depositado más de 10 galectinas de mamíferos²⁴.

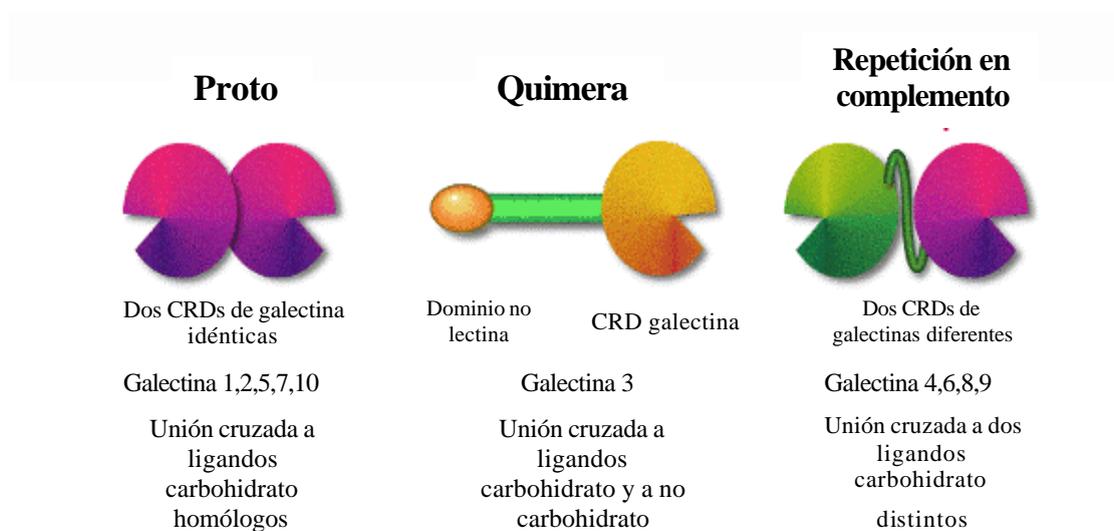


Figura 5. Tres tipos de arquitectura de las galectinas.

La primera galectina fue descubierta en 1975 por V. Teichberg *et al.* en extractos de la anguila eléctrica. Después de esta investigación un número de lectinas similares fueron identificadas en tejidos de polluelos, bovinos, del ser humano, de la rata, etc²³⁻²⁵.

Puesto que estas lectinas requieren generalmente un grupo tiol reductor para el mantenimiento de su actividad, K. Drickamer los señaló una vez como lectinas del "tipo S", pero no siempre es así ya que la galectina-3 descubierta por J. Wang no requirió del grupo tiol reductor para el mantenimiento de su actividad. Según el actual conocimiento, algunos residuos reactivos de cisteína son críticos para la inactivación oxidativa; estos residuos forman puentes disulfuro anormales que provocan un cambio drástico en la estructura tridimensional, conduciendo a la inactivación.

Aunque las galectinas de mamíferos carecen de secuencias convencionales de señal, alcanzan la superficie de la célula atando a los glicoconjugados adentro de la membrana del plasma y en la matriz extracelular. La mayoría de las galectinas contienen sitios de unión múltiples debido a la presencia de dos CRDs en un solo polipéptido o como resultado de la dimerización. La comparación de todas las secuencias de galectina revela la conservación de residuos hidrofóbicos en hebras β .²³⁻²⁵

2.3. Lectinas en invertebrados marinos.

A pesar de que un se han encontrado en invertebrados marinos lectinas de varios pesos moleculares, la información de sus estructuras hasta el momento es muy limitada. La mayoría de las lectinas con secuencias conocidas de aminoácido pertenecen a la familia tipo C, diferente de las lectinas de vertebrados de la misma familia, ya que las lectinas de tipo C en invertebrados marinos suelen contener varios dominios funcionales distintos. Cada CRD tiene un sitio que se une a carbohidratos, muchos de los cuales tienen especificidad hacia la galactosa o N-acetilgalactosamina.²⁶

Uno de los papeles más probables de las lectinas en los invertebrados marinos es la de actuar como factores humorales en el mecanismo de la defensa, al igual que las inmunoglobulinas en vertebrados, por ejemplo hay una activación de los fagocitos por la aglutinación de células ajenas que provocan las lectinas o el aumento de la producción de lectina en fluidos corporales después de la inyección de sustancias extrañas. Las lectinas de los moluscos reconocen carbohidratos de la superficie de bacterias en un proceso donde probablemente también se involucren proteínas de la superfamilia de las inmunoglobulinas Ig. Un receptor glicosilado presente en los fagocitos permite el anclaje del complejo por medio de otra lectina en la membrana citoplasmática promoviendo la fagocitosis (Figura 6a).²⁶⁻²⁷ Por otra parte, la actividad hemolítica directa se ha encontrado recientemente en una lectina que es específica para el ácido siálico en el cangrejo de herradura y una lectina con afinidad a galactosa en el pepino de mar (*Cucumaria echinata*). Después de unirse a las cadenas específicas del carbohidrato en la superficie del eritrocito, estas lectinas dañan la membrana de la célula produciendo su lisis (Figura 6b).²⁸

Estas lectinas pueden desempeñar un papel importante contra infecciones bacterianas o los enemigos naturales.

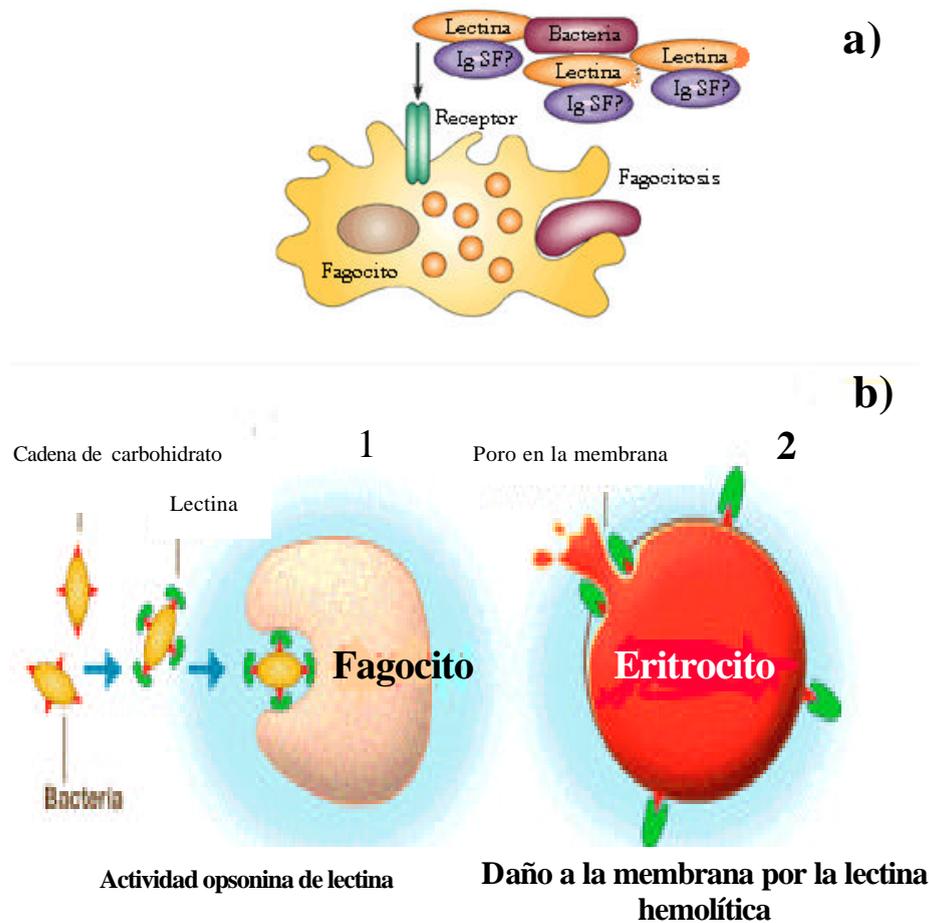


Figura 6. a) Mecanismo de acción de las lectinas en moluscos. b) Cuando una lectina aglutina bacterias promueve la fagocitosis (1). Después de unirse a los carbohidratos de la superficie del eritrocito, los lectinas dañan a la membrana (e.g., formando poros) conduciendo a la hemólisis (2).

2.4. Descripción del Mejillón

Los mejillones son moluscos bivalvos que viven fijos a las rocas desde la zona intermareal hasta los 10 m de profundidad y que pueden quedar al descubierto durante la marea baja, ocupando el mismo nivel de los "balanos" y las "lapas", con quienes compiten por el espacio. Es una especie típicamente filtradora, su crecimiento es rápido, y alcanzan de 5 a 12 cm de longitud pudiendo llegar a 20 cm en algunas especies, dependiendo de la cantidad de alimento disponible y de las condiciones ambientales que regulan su metabolismo, lo cual se aprovecha para cultivarlos. Son especies cosmopolitas que viven en

aguas tropicales y templadas; en las costas occidentales de México abundan el "mejillón común" (*Mytilus edulis*) y el de California (*Mytilus californianus*).

La concha de los mejillones está formada por dos valvas iguales de forma triangular, puntiaguda en un extremo y redondeada en el otro. La superficie de la concha es lisa, marcándose únicamente las líneas de crecimiento; su color es negro azulado; su parte interna es nacarada y de color violáceo (Figura 7).



Phylum: Mollusca

Clase: Bivalvia

Orden: Mytiloida

Suborden: Anisomyaria

Superfamilia: Mytilacea

Familia: Mytilidae

Subfamilia: Mytilinae

Género y especie: *Mytilus edulis*

Nombre común: Mejillón

Figura 7. Clasificación sistemática del mejillón, *Mytilus edulis*.

El ciclo reproductor del mejillón dura siete meses; son organismos unisexuales, es decir, existen individuos machos e individuos hembras. Cada hembra deposita entre 600 y un millón de huevecillos; su temporada de incubación es variable, dependiendo de la temperatura: se acorta con las altas y por el contrario, se alarga con las temperaturas bajas; sin embargo, en promedio dura de una a dos semanas, al cabo de las cuales nace una larva que nada durante 20 días y empieza a segregar una concha transparente y rudimentaria; en ese momento se fija sobre las rocas o en cualquier otro objeto que encuentre sumergido; la fijación la realiza mediante unos filamentos adhesivos llamados "bisos o barbas", formados por proteínas y segregados por una glándula especial.²⁹

3. OBJETIVO GENERAL

Purificar y caracterizar fisicoquímica y estructuralmente a una lectina presente en el extracto de *Mytilus edulis*.

3.1. Objetivos específicos

- Encontrar un método reproducible para la purificación de una lectina presente en el mejillón, *Mytilus edulis*.
- Caracterizar bioquímicamente a una lectina de *M. edulis* esto es, determinar el peso molecular, punto isoeléctrico, la estabilidad a diferentes temperaturas y pH.
- Realizar estudios de inhibición de la actividad de aglutinación con diferentes carbohidratos a fin de determinar cual azúcar reconoce y con este realizar los estudios de calorimetría.
- Elaborar análisis conformacionales de la lectina purificada utilizando técnicas de dicroísmo circular.
- Efectuar estudios del comportamiento de la lectina en solución y su conducta de agregación por técnicas de dispersión dinámica de luz.
- Determinar la estequiometría y termodinámica de unión, por técnicas de calorimetría de titulación isotérmica.
- Definir las condiciones óptimas de cristalización de la lectina purificada.

4. HIPÓTESIS

La actividad de la lectina de *Mytilus edulis* es mayor a la más alta reportada a la fecha. Esto puede ser el resultado de dos fenómenos:

- Que la unión de la lectina con su ligando sea secuencial, transformando así el sitio de unión permitiendo una mayor afinidad por el ligando.
- Que los fenómenos de agregación permitan un reacomodo de las moléculas favoreciendo la exposición de un mayor número de sitios de unión dando lugar a una especificidad mayor.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Lista de material, equipo y reactivos utilizados.

MATERIAL

Columna de vidrio con un diámetro de 1cm y una altura de 12cm.
Filtro millipore de 0.45 μm
Filtros anotop 10 de 0.2 μm (Whatman)
Geles de poliacrilamida con gradiente de pH 3-9
Kit Protein assay ESL de Roche
Marcadores Amersham biosciences para peso molecular (6214-16449) y punto isoeléctrico (3.5-9.3)
Mejillones comunes de la costa de Baja California
Membrana de diálisis spectra/por de laboratorios espectra de peso molecular 3500
Membrana de ultrafiltración de 5000 Da
Microgeles homogéneos SDS-poliacrilamida al 20%
Papel filtro Whatman 125 mm
Placas de microtitulación NUNC
Sangre de conejo
Sephadex G-50 hidratada, superfina de tamaño de partícula de 10-40 μm de Pharmacia Chemicals

EQUIPO

Balanza analítica OHAUS
Centrifuga BECKMAN modelo J2-21
Equipo de dispersión dinámica de luz DynaPro-801 con módulo de temperatura controlada y paquete computacional Dynamics versión 5
Equipo de electroforesis PHAST SYSTEM
Equipo de ultrafiltración AMICON de Millipore
Espectro polarímetro JASCOJ-700
Espectrofotómetro de masas OMNIFLES MALDI-TOF de Bruker- Daltonics
Homogenizador Polytron PT-MR 2100
Liofilizador Edwards
Microcalorímetro VP-ITC de Microcal
Microscopio óptico
Potenciómetro BECKMAN 360
Programa Venyamov y Vassilenko modificado por Sreerama

REACTIVOS

Ácido Hialurónico de SIGMA
Acetato de sodio anhidro al 99% de SIGMA -ALDRICH
Ácido (+)-10-canforsulfónico
Ácido acético al 99.70% grado reactivo de SIGMA-ALDRICH
Ácido galacturónico de SIGMA
Ácido N- acetilneuramínico de SIGMA

Ácido tricloroacético al 98% de ALDRICH
Ácido trifluoro acético de SIGMA
 α -D(+) fucosa de SIGMA
Agarosa de SIGMA
Agua destilada
 α -L- ramnosa de SIGMA
 α -lactosa de SIGMA
Arabinogalactan de SIGMA
Azida de sodio extrapura de MERCK
BSA de Pierce-perbio
Carboximetilcelulosa de SIGMA
D (-) arabinosa de SIGMA
D (-) fructuosa de SIGMA
D (+) glucosa de SIGMA
D (+) celobiosa de SIGMA
D (+) manosa de SIGMA
D (+) rafinosa pentahidratada de SIGMA
D (+) xilosa de SIGMA
D (+) galactosa de SIGMA
Dextrosa anhidra de SIGMA
D-manitol de SIGMA
D-sorbitol de SIGMA
Formaldehído al 37% de SIGMA
Fosfato de sodio dibásico al 99% de SIGMA
Fosfato de sodio monobásico al 99% de SIGMA
Fucoidan de SIGMA
Glurraldehído al 50% de SIGMA
HCl fumante al 37% de MERCK
Laminarin de SIGMA
L-cisteína SIGMA
Maltosa de SIGMA
Mannan de SIGMA
Metanol al 99.93% grado HPLC de ALDRICH
Metil- α - D- manopiranososa de SIGMA
N-acetil- D- galactosamina de SIGMA
N-acetil- D- glucosamina de SIGMA
NaCl al 99.5% de SIGMA-ALDRICH
NaOH grado reactivo de SIGMA
Quitosan de SIGMA
Salicin de SIGMA
Sucrosa de SIGMA
Xilan de SIGMA

5.2. Extracción de la lectina.

Para evitar la desnaturalización o alteración de la lectina, todos los pasos de purificación se realizaron a 4.0°C.

Los organismos completos de *Mytilus edulis* se molieron con un homogenizador de tejidos Polytron PT-MR 2100 en amortiguador de fosfatos 50 mM pH 7.4, una vez homogenizado se centrifugó por 30 min a 22,095 g, en una centrífuga BECKMAN Modelo J2-21, y se retiró el tejido. El sobrenadante se mantuvo a 4.0°C por 48 h, se centrifugó nuevamente y se le midió la actividad hemaglutinante.

5.3. Preparación de eritrocitos formalinizados

Se colectó sangre de conejo y se realizaron lavados con NaCl al 0.9%.

Se ajustaron 25 mL de formalina (formaldehído al 37%) a pH 5 con amortiguador de Fosfatos (AF) 0.7 M, pH 7.0 .

Se introdujo el formol en una membrana de diálisis llenándola hasta dos terceras partes, la cual se sumergió en 100 mL de una suspensión de eritrocitos (20% v/v en 50 mM AF que contiene 150 mM de NaCl). Se agitó suavemente por 12 h a 4.0 °C , pasado el tiempo la membrana se perforo liberándose el formaldehído, para fijar a los eritrocitos por 36 h a 4.0 °C con agitación suave (ECF).

Después de la fijación los ECF se precipitaron (15,000 g, 5 min a 4.0 °C) y se lavaron extensivamente con NaCl al 0.9%. Para unir los grupos aldehído libres presentes en la superficie celular los ECF se suspendieron (20% v/v) en AF 50 mM pH 7.5 con 150 mM de NaCl y 2% w/v de albúmina de suero bovino, y se incubaron por 24 h a 4.0 °C con agitación.

Finalmente los ECF se precipitaron (1,500 g, 5.0 min. 4.0 °C) y se lavaron extensivamente con NaCl al 0.9% , para formar una solución al 20% de ECF los cuales se guardaron a 4.0 °C en presencia de azida de sodio al 0.05%.³⁰

5.4. Cuantificación de la proteína purificada

Se utilizó el kit “Protein Assay ESL (*Exact, Sensitive, Low interference*)”.

Se realizó una curva de calibración utilizando albúmina de suero de bovino (BSA) con una concentración de 2 mg/mL realizando diluciones con el amortiguador de fosfatos pH 7.4, 50 mM.

Para la cuantificación de LME se utilizaron 50 μ L de Fosfatos 50 mM pH 7.4 y 50 μ L de proteína, a los cuales se le adicionaron respectivamente 100 μ L del reactivo A (solución de tartrato de cobre alcalino) incubando a temperatura ambiente por 5 min, transcurrido el tiempo se adicionó 1 mL del reactivo B (ácido ascórbico, solución de ácido disulfónico batocuprónico) mezclando muy bien y leyendo a los 30 s, a una longitud de onda (λ) de 485 nm.

5.5. Prueba de aglutinación

Para medir la actividad aglutinante de la lectina se utilizaron placas de microtitulación con fondo en forma de “U” y eritrocitos de conejo formalinizados, realizando diluciones seriadas 1:2. Se adicionaron 50 μ L de amortiguador de Fosfatos 50 mM pH 7.4; 50 μ L de proteína con diluciones seriadas (50 μ L) y 50 μ L de eritrocitos al 10%, utilizando como blanco el amortiguador, se incubaron las cajas a temperatura ambiente por 1 h y se evaluó la actividad aglutinante a simple vista y utilizando un microscopio.³¹ La actividad (U) se expreso como título (el recíproco de la dilución más alta que mostró aglutinación). La actividad específica (U/mg) fue expresada como título de lectina por miligramo de proteína.

5.6. Purificación

5.6.1 Preparación de la columna de afinidad.

Para la purificación de la lectina se utilizaron estromas de conejo, los cuales se había observado que reconocía la lectina del mejillón.

Se colectó sangre de conejo en solución Alsever y se centrifugó a 1000 g (BECKMAN modelo J2-21) durante 20 min.

Los eritrocitos se lavaron 3 veces en amortiguador de fosfatos isotónico (310 mOsM, pH 7.4), posteriormente se centrifugaron a 4,000 g durante 20 min. Las células se resuspendieron en amortiguador de fosfatos hipotónico (20 mOsM, pH 7.4).

Después se centrifugó a 20,000 g durante 40 min y se lavaron las células 3 veces con el amortiguador hipotónico y se liofilizaron.

Del liofilizado se tomaron 52 mg y se resuspendieron en 23 mL de AFS (Fosfatos 50 mM, 0.9% NaCl). Se mezclaron con 2.5 mL de solución de glutaraldehído al 25% ajustando el pH a 7.2 con solución de NaOH 2M.

Se incubaron por 16 h a 20 °C y después el material polimerizado se lavó extensivamente con AFS. A continuación se incubó con 25 mL de AFS con 1M de glicina durante toda la noche para neutralizar los grupos glutaraldehído libres.³²

El estroma particulado se mezcló con 1 g de Sephadex G-50 hidratada para crear una columna con un volumen de 10.5 mL.³²

5.6.2. Purificación de la lectina

El extracto se centrifugó y filtró en un equipo millipore de 0.45 µm, aplicando 5 mL de este extracto a la columna de afinidad previamente equilibrada con amortiguador de fosfatos 50 mM, pH 7.4.

Para eliminar las proteínas que no se unieron a los estromas se realizaron 3 lavados con el amortiguador de Fosfatos pH 7.4. Para eluir la proteína unida a los estromas se realizaron 3 lavados con cada uno de los siguientes amortiguadores: Fosfatos 50 mM pH 6, Fosfatos 50mM pH 2 (ajustado con HCl 6N) y azida de sodio al 0.05%. Primero se realizaron los lavados con pH 6, posteriormente se dejó en azida de sodio durante toda la noche, al día siguiente se terminaron los lavados con azida de sodio para finalmente eluir con pH 2.

La lectina se encontró en la fracción eluida con amortiguador de fosfatos pH 2 por lo que se ajustó su pH a 7.4, se concentró y dializó por ultrafiltración con una membrana de 5,000 kDa.

5.7. Caracterización de la lectina purificada

5.7.1. Prueba de afinidad.

Con el fin de encontrar un carbohidrato específico para la lectina purificada, se midió la actividad aglutinante de eritrocitos en presencia de diferentes carbohidratos; los cuales se

prepararon a una concentración 250 mM en amortiguador de fosfatos 50 mM pH 7.4 (ver Tabla 3).

Se utilizaron placas de microtitulación con fondo en forma de “U” en donde se colocaron 25µL del amortiguador de fosfatos pH 7.4 50 mM; 25, 50, 75, y 100 µL del carbohidrato realizando diluciones de 25, 37.5, 50 y 62.5 µL respectivamente; se le adicionó 25 µL de la proteína, se dejó reposar por 30 min y finalmente se agregaron 25 µL de eritrocitos al 10%. Se incubó a temperatura ambiente por 1 h y finalmente se evaluó la inhibición de la lectina.³³⁻³⁴

Se utilizaron dos blancos, uno contenía a la proteína con los eritrocitos (aglutinación) y el otro sólo el amortiguador. El resultado se expresó como la mínima concentración del carbohidrato que inhibió a la lectina en su actividad aglutinante.

5.7.2. Determinación del peso molecular.

5.7.2.1. Electroforesis SDS-PAGE

El peso molecular de la proteína pura se determinó por electroforesis en microgeles homogéneos de SDS-poliacrilamida al 20 %, en un sistema de electroforesis automatizado PHAST-SYSTEM siguiendo el protocolo de Pharmacia. Para determinar el peso molecular, se utilizaron patrones con pesos moleculares conocidos.

5.7.2.2 Espectrometría de masas MALDI-TOF .

El análisis del peso molecular de la lectina se realizó utilizando un equipo OMNIFLEX MALDI-TOF (matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight) de Bruker-Daltonics. Para esto la proteína se mezcló con ácido α -ciano-4-hidroxicinámico disuelto en una solución de 30 % acetonitrilo, 70 % agua y 0.1 % ácido trifluoroacético. Una pequeña gota de esta solución (1 µL) se dejó secar a vacío hasta que cristalizó. Posteriormente se analizó mediante la incidencia de un láser de 337.1 nm y con una aceleración de voltaje de 19 kV en modo lineal.

5.7.3. Determinación del punto isoeléctrico (pI).

Para determinar el punto isoeléctrico de LME, se utilizaron geles de poliacrilamida con gradiente de pH de 3-9 en un equipo de electroforesis automatizado PHAST-SYSTEM de Pharmacia; utilizando patrones con puntos isoeléctricos conocidos.

5.7.4. Determinación de los valores óptimos de pH y temperatura.

Se midió la actividad de aglutinación a los valores de pH que comúnmente tienen como óptimos la mayoría de las proteínas: 5.0, 7.4 y 8.0. Después se realizó a el pH óptimo pruebas de actividad a 3 diferentes temperaturas: 4.0, 18 y 25 °C, que son las que normalmente se utilizan para montar pruebas de cristalización.

5.7.5. Estudios de calorimetría de titulación isotérmica.

Para determinar los parámetros termodinámicos de la lectina pura de *Mytilus edulis*, se utilizó rafinosa como ligando, a una concentración de 8 mg/mL, la concentración final de la proteína para este estudio fue de 2.56 mg/mL; tanto el blanco como la muestra se filtraron y se desgasificaron, llevándose acabo el estudio a una temperatura de 30°C. Se realizaron 38 inyecciones de 5 µL de rafinosa con un espaciamiento de 300 s, por lo que se inyectaron en total 195 µL de rafinosa.

5.7.6. Estudios de solubilidad y conducta de agregación

La técnica de dispersión dinámica de la luz (DLS) permitió evaluar el comportamiento de la lectina en solución y su conducta de agregación analizando los cambios en polidispersidad, y peso molecular con respecto a factores como temperatura y concentración de ligando. Para este estudio se utilizó un equipo de dispersión dinámica de luz DynaPro-801 (Protein Solutions, Co.) y el paquete computacional Dynamics, versión 5.0, con módulo de temperatura controlada. La lectina pura se inyectó a través de filtros Anotop 10 de 0.2 µm (Wathman) en el equipo mencionado. La proteína se utilizó a una concentración de 2.59 mg/mL.

Para determinar el efecto de la adición del ligando en la proteína se utilizaron 1.4 mL de proteína a los cuales se le fueron adicionando cada 5 minutos concentraciones de ligando, simulando lo que sucede en el equipo de ITC, por lo que los puntos 0, 3, 6, 10, 12, 15, 18, 24, 29, 34, 36 y 38 (número de inyecciones) corresponden a la adición de rafinosa (Tabla 1), considerando que por punto se adicionan 5 μ L del ligando para llegar a una adición total de 195 μ L de rafinosa.

Tabla 1. Adición de rafinosa a la lectina de *Mytilus edulis*, simulando lo que se realizó en el estudio de calorimetría de titulación isotérmica.

Inyección	Rafinosa (μ moles)	Inyección	Rafinosa (μ moles)
0	0.00	18	1.21
3	0.20	24	1.61
6	0.40	29	1.95
10	0.67	34	2.28
12	0.80	36	2.42
15	1.00	38	2.55

5.7.7. Determinación de la estructura secundaria.

El contenido de estructura secundaria de la lectina pura se determinó por sus espectros de dicroísmo circular (DC). Dichos espectros se obtuvieron a 30°C en un espectropolarímetro JASCO J-700, el cual se calibró con ácido (+)-10-camforsulfónico. Los experimentos se realizaron en una celda de 1 mm para la región del ultravioleta (UV) lejano (183-260 nm). Los espectros se analizaron por medio de diferentes programas de desconvolución, esto con el fin de estimar el contenido de estructura secundaria de la proteína purificada.

Al igual que en DLS se adicionó rafinosa a la proteína en los siguientes puntos: 0, 3, 10, 18, 24, 36 y 38 (Tabla 1), tomando como primer valor a la proteína sin ligando.

Para determinar la clase estructural terciaria se utilizó el programa basado en el método de Venyaminov y Vassilenko el cual fue modificado por Sreerama (3D Cluster) para usarse con CDPro.³⁵⁻³⁶

5.7.8 *Cristalización*

La técnica que se utilizó para montar las pruebas de cristalización de la LME fue la difusión de vapor en gota colgante. Para lo que se utilizaron cajas limbro y el Kit 1 y 2 de Hampton Research. La concentración de proteína fue de 2.0 mg/mL. Se colocaron gotas de 10 μ L de los cuales 5.0 μ L correspondían a la proteína y 5.0 μ L al agente precipitante. Además, sólo se colocaron 400 mL del agente precipitante en el receptáculo inferior, con el fin de aumentar el tiempo para que se alcance la saturación. Estas pruebas se colocaron a 4.0 °C, en cámaras de temperatura controlada.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Purificación de la lectina de *Mytilus edulis*

Las lectinas han sido ampliamente estudiadas a partir de diferentes fuentes, sin embargo, existen muy pocos estudios fisicoquímicos y estructurales de lectinas de invertebrados marinos y de moluscos son casi nulos, aun cuando se sabe que sus actividades son muy altas. En un intento por profundizar en el conocimiento de este tipo de proteínas, en este trabajo se purificó y caracterizó fisicoquímica y estructuralmente a una lectina del mejillón *Mytilus edulis* (LME).

La purificación de LME se realizó por cromatografía de afinidad utilizando los estromas de conejo como soporte. En la Tabla 2 se puede observar que la actividad específica es muy alta, 14 veces más alta que la del alga *Codium giraffa* Silva³⁷, 4463 veces más alta que la de la esponja *Haliclona cratera*³⁸ y 184 veces más alta que la del *Trichogaster trichopterus*.³⁹ Durante el proceso de purificación se observó que la proteína tiende a agregarse fuertemente. Estos agregados se separaron en dos fracciones, una con una agregación tal que no pasó a través de filtros de 0.45 μm (fracción agregada) y la otra que si logra pasar (fracción soluble), cabe señalar que ambas fracciones están solubles aunque una más agregada que la otra. Ambas fracciones mostraron actividad aunque conforme se agrega la proteína, dicha actividad disminuye (Tabla 2). Por técnicas electroforéticas y de espectrometría de masas se comprobó que se trataba de la misma proteína, pero en diferentes estados de agregación.

Tabla 2. Purificación de la lectina de *Mytilus edulis*.

Paso de purificación	Proteína total (mg)	Actividad específica* (U/mg)	Purificación	Rendimiento (%)
Extracto total	2,031.70	75.04	1	100
Cromatografía de afinidad				
Soluble	0.25	2,195,795.40	29,260.77	0.01
Agregada	0.95	68,841.84	917.37	0.05

* La actividad (U) se expreso como título (el recíproco de la dilución más alta que mostró aglutinación). La actividad específica (U/mg) fue expresada como título de lectina por miligramo de proteína.

6.2. Estudios electroforéticos

6.2.1 *Peso molecular (SDS-PAGE)*

El peso molecular de la lectina de *M. edulis* se determinó por dos métodos: uno de estos fue la electroforesis SDS-PAGE que da una idea aproximada del peso molecular de la proteína. En la Figura 8 se puede apreciar que el peso molecular de la LME es de 13.086 kDa. Sin embargo este método no es muy preciso por lo que también se determinó por espectrometría de masas.



Figura 8. Gel de peso molecular SDS-PAGE homogéneo al 20%, de la lectina de *Mytilus edulis*. Los carriles 1 y 4 corresponden a los marcadores, y los carriles 5 y 6 son la lectina purificada de *Mytilus edulis*.

6.2.2 *Punto isoeléctrico (pI)*

El punto isoeléctrico de la LME fué de 7.60 (Figura 9) es decir, es básico; el pI para otras lectinas marinas es de: 6.00 para *Tridacna derasa*,⁴⁰ de 4.17-4.24 para *Cerianthus membranaceus*⁴¹ y de 4.20-4.60 para *Niphates erecta*.⁴² Por lo que esta lectina es la más básica reportada a la fecha.

Como el punto isoeléctrico es muy cercano al amortiguador de Fosfatos pH 7.40 (amortiguador en el que se mantiene a la lectina) podría explicarse el porque la lectina comienza a precipitarse en tan poco tiempo.

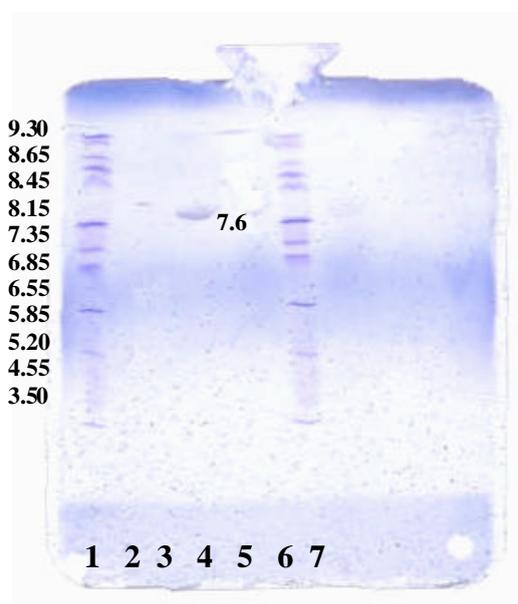


Figura 9. Gel de enfoque isoeléctrico de 3-9 de la lectina de *Mytilus edulis*. Los carriles 1 y 7 corresponden a los marcadores de pI; y el carril 4 corresponde a la proteína pura de *Mytilus edulis*.

6.3. Espectrometría de masas

Por técnicas de espectrometría de masas, se determinó el peso molecular de la LME, obteniéndose un valor de 6.450 kDa (Figura 10); comparando con SDS-PAGE donde el valor es de 13.086 kDa, se observa que se trata del monómero. Como se mencionó anteriormente, esta lectina sufre fuertes fenómenos de agregación y los agregados son tan fuertes que aún en condiciones desnaturizantes no se logra romper esta interacción. Debido a que para poder observar las bandas en SDS-PAGE se requiere una mayor concentración que en masas, al concentrar a la proteína se incrementa la agregación de la misma. En espectrometría de masas, se observa la fracción de 6.450 kDa y conforme se concentra la proteína empieza a aparecer la otra fracción (dímero).

Con este peso molecular LME se sitúa entre las lectinas más pequeñas provenientes de invertebrados marinos, siendo más pequeña que la lectina de *A. fulica*⁴³ cuyo peso es de 15 kDa o que el mejillón *C. grayanus* que tiene un peso molecular de 18 kDa.⁴⁴

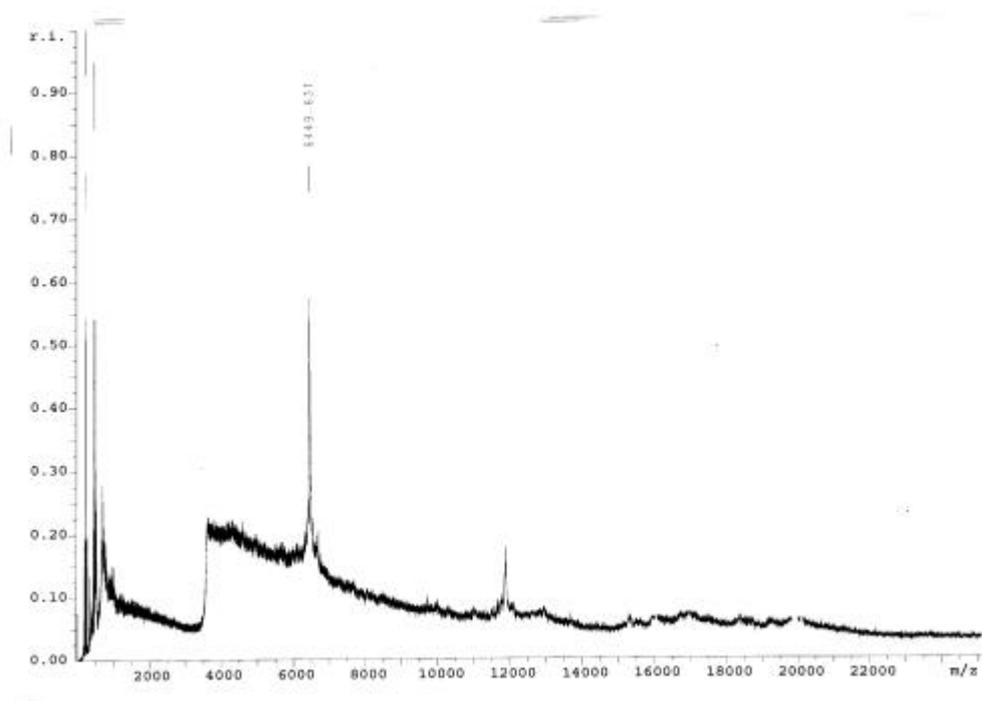


Figura 10. Espectro de masas de la lectina de *M. edulis*.

6.4. Efecto del pH y la temperatura en la actividad de la lectina de *M. edulis*.

En la Figura 11a se puede observar el efecto del pH en la actividad de la lectina purificada, se observó que el óptimo para su actividad es de 7.4. En los valores de 5.5 y 8.0 se observa disminución en la actividad debido a que en estos valores de pH la proteína tiende a precipitar rápidamente. En la Figura 11b y 11c se observa que al adicionar cisteína y NaCl respectivamente, la actividad se incrementa, obteniendo la mayor la actividad en presencia de cisteína. Cabe señalar que la actividad la estamos considerando de dos maneras: como el recíproco de la dilución más alta que mostró aglutinación (1:2, 1:4 etc) y como intensidad de la aglutinación, es decir, puede llegar hasta el título 1:3, y ser muy

fuerte la aglutinación o muy débil. En la Figura 11 se observa tanto el título hasta donde se obtuvo actividad como la fuerza de la misma.

Por otro lado, la temperatura también tiene un efecto marcado en la actividad de la lectina purificada (Figura 12). A temperaturas bajas (4°C) aumenta la actividad, llegando hasta un título de 1:8 pero la intensidad de la aglutinación se ve más marcada a 25°C. A 18°C la actividad es menor comparada con las otras dos temperaturas. Por otro lado, si se aprecian bien las Figuras 11a y 12 se puede ver que inicialmente la lectina tenía una actividad con título 1:8, cuando se hace la prueba a las tres diferentes temperaturas se observa como disminuyó su título a temperatura ambiente. Esto puede deberse a que conforme pasa el tiempo la lectina comienza a agregarse fuertemente por lo que disminuye su actividad, y las temperaturas bajas permiten deshacer un poco los agregados, como se observó posteriormente por dispersión dinámica de luz.

Los valores óptimos de pH y temperatura reportados para diferentes lectinas varía, dependiendo de la fuente marina, algunos de estos valores son; pH de 7.5 (25°C, Tris 50 mM, 253mM NaCl) para la lectina de *H. cratera*,³⁸ pH de 7.5 (4°C, Tris 25mM, 0.2M NaCl y 10mM CaCl₂) para la lectina obtenida de *M. modiolus*,⁴⁵ pH 6.0-8.5 (40°C, Fosfato 10mM y Tris-HCl 10mM) para la lectina de *K. pelamis*.⁴⁶ Observando estos datos se aprecia que los valores son muy cercanos y que sólo para la lectina de *K. pelamis* el rango es muy amplio.

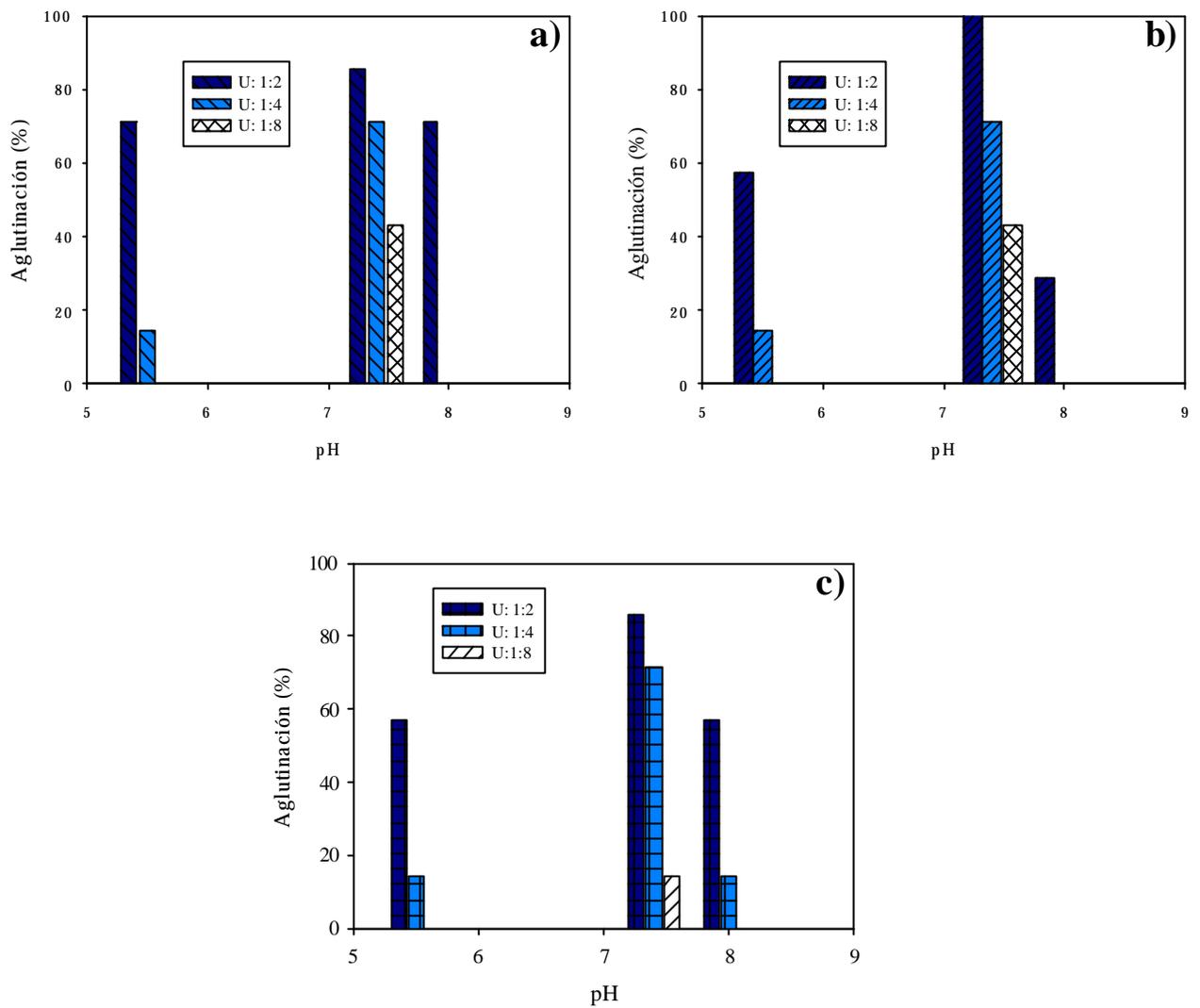


Figura 11. Efecto del pH en la actividad de la lectina de *Mytilus edulis*. a) Sin aditivo, b) Con 5mM de cisteína, c) Con 5mM de cisteína y 0.15M de NaCl. U: es la actividad que se expresa como título que es el recíproco de las más alta dilución que mostró aglutinación. El porcentaje de aglutinación se refiere a la intensidad de la aglutinación, por lo que el 100% corresponde a una aglutinación muy marcada que se observa a simple vista.

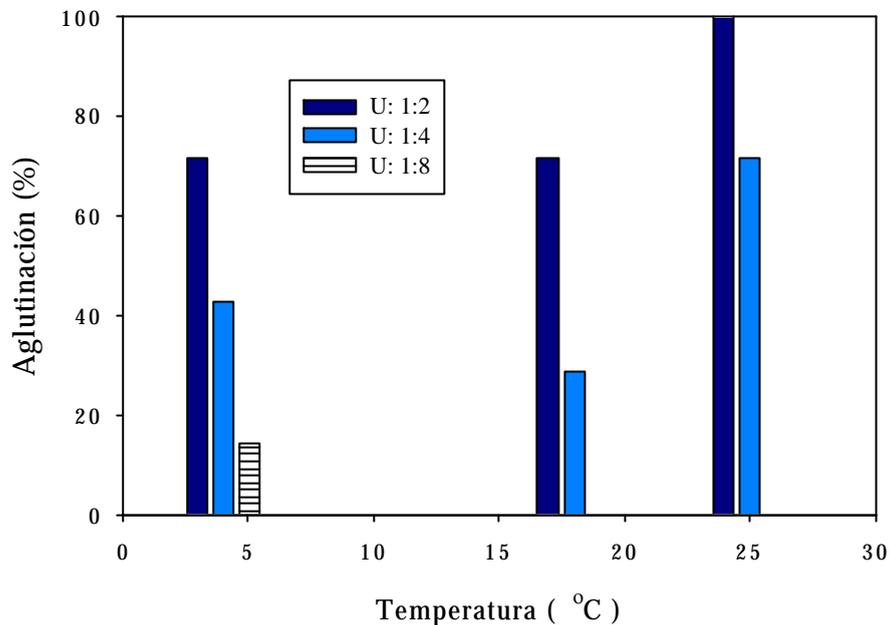


Figura 12. Efecto de la temperatura en la actividad de la lectina de *Mytilus edulis* a pH 7.4. U: es la actividad que se expresa como título que es el recíproco de la más alta dilución que mostró aglutinación. El porcentaje de aglutinación se refiere a la intensidad de la aglutinación, por lo que el 100% corresponde a una aglutinación muy marcada que se observa a simple vista.

6.5. Prueba de inhibición de la actividad de la lectina de *M. edulis*

Las pruebas de inhibición permitieron definir el carbohidrato que reconoce la lectina de *M. edulis*. En la Tabla 3 se observa que LME reconoce la D-(+)-galactosa, N-acetil-D-galactosamina y el ácido galacturónico a una mayor concentración (208 mM). La rafinosa pentahidratada (O- α -D-galactopiranosil [1 6], α -D-glucopiranosil [1 2], β -D-fructofuranosido) inhibió la actividad de la lectina con una concentración de 45 mM, siendo así el más afín, por lo que se decidió utilizar a este oligosacárido en los estudios de ITC.

La afinidad de la lectina por la rafinosa puede ser explicada por diferentes factores:

- a) Aspectos estructurales del oligosacárido. Todos los grupos hidroxilo de la rafinosa actúan tanto como donadores como aceptores en la formación de puentes de hidrógeno⁴⁷ (Figura 13).
- b) La interacción lectina-ligando que puede dividirse en dos tipos: aquellas que involucran cadenas de proteínas que se unen a glicosaminoglicanos (GAG), la mayoría mediadas por arreglos ordenados por contacto de carga superficial y aquellas que involucran N- y O-glicanos.⁴⁸
- c) En las interacciones que involucran N- y O-glicanos, los sitios de unión son de relativa baja afinidad y se encuentran en huecos poco profundos de la superficie de las proteínas. La selectividad se da mayoritariamente por medio de puentes de hidrógeno que involucran a los grupos hidroxilo de los carbohidratos, y por interacción hidrofóbica de los anillos de monosacáridos contra las cadenas laterales de los aminoácidos aromáticos; la selectividad también puede ser otorgada por puentes de hidrógeno de moléculas de agua o de iones divalentes y por la región de contacto real entre el sacárido y el polipéptido que involucra típicamente a sólo uno de los tres residuos de monosacárido. Como consecuencia de ello, estos sitios de unión tienden a ser de relativa baja afinidad, pero de gran especificidad. La habilidad de los sitios de baja afinidad para mediar interacciones biológicamente relevantes al parecer requiere de una multivalencia.⁴⁹⁻⁵⁰
- d) La estereoselectividad determinada por los puentes de hidrógeno se encuentra en que la supresión o la derivatización de cualquiera de los grupos polares clave conllevan a una inhibición completa de la unión⁵¹. La especificidad de una lectina también puede ser cambiada por un reacomodo de los puentes de hidrógeno⁵². Esta complementariedad estereoquímica puede ser esencial, pero no es suficiente para explicar la fuerte unión entre dos moléculas. En el caso de las interacciones lectina-carbohidrato, los determinantes de la especificidad se han estudiado tanto desde el punto de vista estructural, como desde el punto de vista de la base energética de su asociación.

Tabla 3. Inhibición de la lectina de *M. edulis*, utilizando diferentes carbohidratos preparados con amortiguador de fosfatos pH 7.4, 50mM.

Carbohidratos	Mínima concentración inhibitoria (mM)	Carbohidratos	Mínima concentración inhibitoria (mM)
Ácido galacturónico	208	D (+) xilosa	-
Ácido Hialuronico	-	Dextrosa	-
Ácido N- acetilneuramínico	-	D-manitol	-
α -D(+) fucosa	-	D-sorbitol	-
Agarosa	-	Fucoidan	-
α -L- ramnosa	-	Laminarina	-
α -lactosa	-	Maltosa	-
Arabinogalactano	-	Manano	-
Carboximetilcelulosa	-	Metil- α - D- manopiranososa	-
D (-) arabinosa	-	N-acetil- D- galactosamina	208
D (-) fructuosa	-	N-acetil- D- glucosamina	-
D (+) celobiosa	-	Quitosano	-
D (+) galactosa	208	Salicina	-
D (+) glucosa	-	Xilan	-
D (+) manosa	-	D (+) rafinosa	45

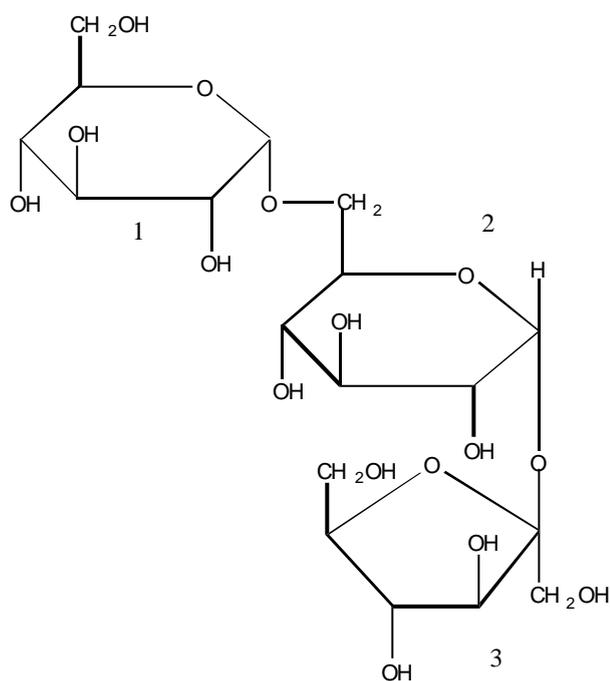


Figura 13. Estructura de la rafinosa donde el número 1 corresponde a la galactosa, el 2 a la glucosa y el 3 a la fructuosa.

6.6. Estudio de ITC de la lectina de *M. edulis*

Se realizaron los estudios de calorimetría de titulación isotérmica en presencia de rafinosa ya que fue el azúcar que mostró la mayor inhibición de la actividad aglutinante. La reacción calorimétrica puede observarse en la Figura 14. El modelo que mejor se ajustó a los datos obtenidos fue el de unión secuencial, ya que con él se obtuvo el menor valor de χ^2 .

El estudio revela cinco sitios de unión, de los cuales, por lo menos cuatro son de naturaleza exotérmica (K1, K2, K3 y K5), es decir al ponerse en contacto la lectina y la rafinosa lo hacen con un desprendimiento de calor. En la Tabla 4 podemos observar que los valores de ΔH y ΔS son muy altos, al calcular ΔG de acuerdo a la fórmula:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S$$

siendo T la temperatura a la cual se realizó el experimento (30 °C) expresada en K; obtenemos energías libre de Gibbs negativas, es decir la unión a esa temperatura se da espontáneamente.

Los valores de las constantes de unión a excepción de K4 y K5, disminuyen en el siguiente orden $K1 > K2 > K3$, revelando un reacomodo de las moléculas de la lectina exponiendo así más sitios de unión y por consiguiente aumentando la afinidad. La naturaleza de los datos indica una unión no cooperativa de los sitios, sin embargo no podemos hablar de cooperatividad sin calcular el coeficiente de Hill, el cual nos indicaría si es una cooperatividad positiva o negativa; en una unión secuencial el sitio de unión se transforma para que se puedan unir más moléculas de ligando, y entre más ligandos se unen la afinidad aumenta, entonces podríamos decir que la cooperatividad tiende a ser positiva (mayor afinidad).⁵⁸

Las constantes K1 a la K3 así ordenadas pueden reflejar que conforme la lectina va uniéndose moléculas de rafinosa a sus diferentes sitios de unión, es cada vez más difícil que otra molécula de ligando se una en otro sitio, esto se explica por la saturación de los sitios de unión, sin embargo la K3 con un signo negativo no es posible porque implicaría que la reacción tiende ir a la izquierda (predominando los reactivos) por consiguiente no habría unión, sin embargo como se ha mencionado anteriormente LME tiende a agregarse por lo que ese signo negativo se debe a los fenómenos de agregación que presenta la lectina, cabe señalar que hoy en día no hay un modelo matemático que lo explique y sería necesario la

caracterización del tipo de agregado para poder establecer una ecuación que se ajuste a la realidad.

El valor de K_5 , el cual es mayor a K_4 , e incluso a K_1 , podría reflejar que la proteína sufre un reacomodo molecular después de unir una molécula de rafinosa en su segundo sitio de unión, el cual ayuda a que otro sitio quede expuesto y disponible para poder aceptar otra molécula antes de su completa saturación.

Por el valor de n podemos decir que LEM es multivalente. Hasta la década de 1990 todas las lectinas animales eran naturalmente multivalentes, ya fuera por su estructura multisubunidad definida o por poseer múltiples sitios de unión a carbohidrato en un solo polipéptido⁵⁹, a la fecha se han descubierto lectinas (selectinas, siglecs)⁶⁰ las cuales sólo poseen un sitio CRD en sus dominios polipeptídicos extracelulares y hay lectinas que pueden poseer múltiples sitios de unión para ligandos múltiples como el receptor a manosa de los macrófagos, que no sólo se une a mananos, sino también, por medio de otro CRD distinto a residuos de GalNAc 4-O-sulfatados de las hormonas glicoproteicas de la pituitaria.⁶¹ Sin embargo, está surgiendo evidencia que indicaría que las moléculas se vuelven funcionalmente multiméricas ya sea por asociación no covalente o por el hacinamiento sobre superficies celulares.⁶²⁻⁶³ Las lectinas multivalentes pueden formar complejos entrecruzados con epítopos de carbohidrato multivalentes.⁶⁴ Los entrecruzados no lineales, sino de dos o tres dimensiones de tipo II, que son la mayoría insoluble, ocurren cuando las lectinas (como LEM) y/o los carbohidratos involucrados tienen una valencia mayor a dos. La formación de complejos entrecruzados de tipo II confiere especificidad adicional a las lectinas, ya que los complejos homogéneos entrecruzados se forman incluso en la presencia de mezclas de lectinas y carbohidratos o glicoproteínas.⁶⁵ Se piensa que esta especificidad adicional llega a ser importante cuando una lectina entrecruza glicoconjugados en la superficie celular, lo que comúnmente lleva a efectos de transducción de señales.⁶⁶

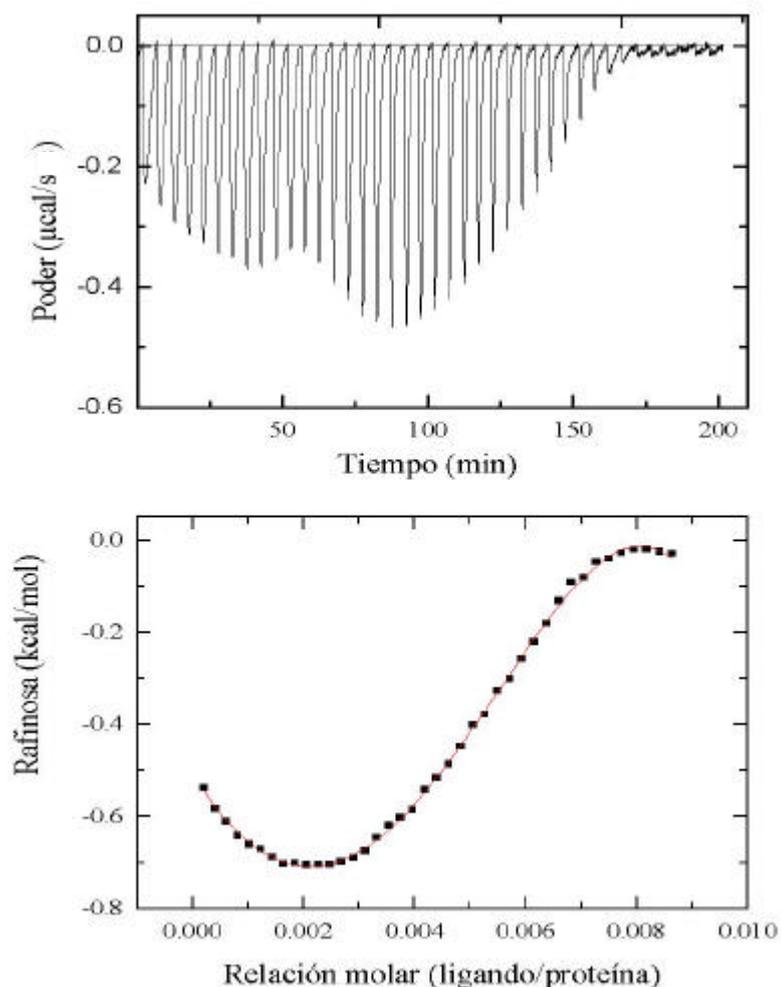


Figura 14. Termograma de la titulación de la lectina de *Mytilus edulis* con rafinosa.

Tabla 4. Perfil termodinámico de la unión secuencial de la lectina de *Mytilus edulis* con la rafinosa.

Estequiometría de reacción (n)	Constantes de unión (K_b)	Entalpía (ΔH)	Entropía (ΔS)	Energía libre de Gibbs (ΔG)
1	31.77±3.02	$-5.87 \times 10^2 \pm 9.11 \times 10^0$	5.26×10^0	-2.18×10^3
2	19.81±1.97	$-2.66 \times 10^5 \pm 3.90 \times 10^3$	-7.30×10^2	-4.47×10^4
3	-16.48±3.05	$-4.06 \times 10^8 \pm 4.30 \times 10^4$	----	----
4	21.26±5.12	$1.32 \times 10^9 \pm 1.80 \times 10^5$	4.37×10^6	-4.76×10^6
5	37.85±5.41	$-1.19 \times 10^9 \pm 2.30 \times 10^5$	5.67×10^7	-1.83×10^{10}

6.7. Estudios de Dicroísmo Circular (DC)

Se obtuvieron los espectros de la lectina purificada por técnicas de DC, sola y en presencia de su ligando para poder determinar si durante la unión con la rafinosa ocurría algún cambio conformacional (Figura 15). Los espectros fueron analizados con el programa de desconvolución de Hennessey-Johnson. para determinar el contenido de estructura secundaria (Tabla 5). El elemento de estructura secundaria que predomina es la hoja beta y la clase terciaria a la que pertenece es a la β . Se observó que la lectina no presenta cambios conformacionales derivados de la unión con su ligando, aunque existían variaciones pequeñas en el contenido de estructura secundaria.

Parece ser que la estructura de hoja beta predomina en invertebrados marinos tal es el caso de: la lectina de tipo C de la *Cucumaria echinata*⁵³, la lectina tipo R de la *Cucumaria echinata*⁸, la lectina del *Tachypleus tridentatus*⁹ y la lectina del tipo C de la *Polyandrocarpa misakiensis*,⁵⁴ por citar algunos.

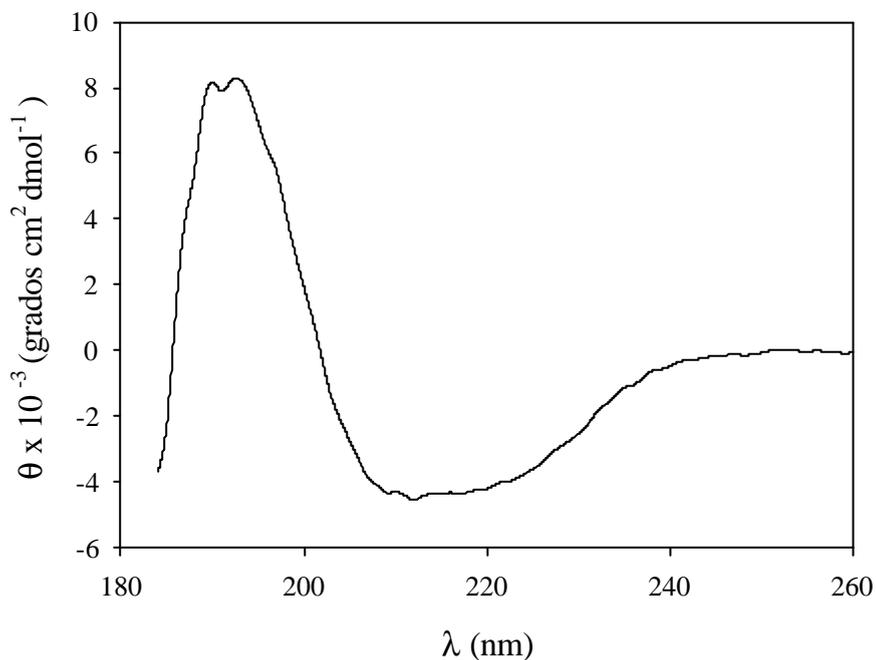


Figura 15. Espectro de dicroísmo circular en la región ultravioleta lejano de la lectina de *M. edulis*.

Tabla 5. Contenido de estructura secundaria de la lectina de *M. edulis* derivada de los espectros de dicroísmo circular expresado en porcentaje. LME es la proteína pura, y el número que sigue después del guión corresponde al número de inyección en el experimento de ITC.

	Rafinosa (μmol)	Hélice α	Hoja β	Giros	Otros	Clase estructural
LME	0.000	0.070	0.380	0.080	0.460	
LME -3	0.200	0.110	0.270	0.210	0.290	
LME -10	0.670	0.120	0.300	0.120	0.470	
LME -18	1.210	0.050	0.400	0.110	0.530	β
LME -24	1.610	0.080	0.310	0.100	0.460	
LME -36	2.420	0.070	0.320	0.003	0.610	
LME -38	2.550	0.090	0.280	0.090	0.370	

6.8. Comportamiento en solución y conducta de agregación

Por medio de estudios de dispersión dinámica de luz (DLS), se observó el efecto de la temperatura y la adición de rafinosa (simulando el estudio de ITC) en la agregación de la lectina, mediante el seguimiento de los cambios en su peso molecular y polidispersidad. Los resultados revelaron que la lectina tiende a agregarse fuertemente en solución. En la Figura 15 se observa que conforme aumenta la temperatura también aumenta la agregación de la lectina y su polidispersidad, obteniendo los valores más bajos a 4.0°C. Las diferentes barras implican las diferentes especies (estados de agregación) presentes en una condición dada.

Se puede observar (Figura 16a) que a 30°C, que es la temperatura a la que se realizaron los estudios de ITC, su peso molecular es de alrededor de 23,700 y 14,600 kDa, con una polidispersidad entre 18.5 y 20.3 nm (Figura 16b). A 25°C, temperatura en la que se realizaron las pruebas de actividad, se presenta una peso molecular de 18,500 y 14,600 kDa y una polidispersidad de 14.2 y 18.7 nm. Esto nos indica que la lectina es activa aun cuando forma agregados muy grandes. Resultados como éste han llevado al reciente incremento en el estudio de la influencia del volumen excluido en soluciones con alta concentración y del efecto del agrupamiento molecular, “macromolecular crowding”, en diferentes tipos de reacciones que conducen al ensamblaje de proteínas y complejos de proteínas. En general,

el agrupamiento de macromoléculas estabiliza la estructura de la proteína nativa y favorece la formación de complejos funcionales. Sin embargo, un sobreagrupamiento (“overcrowding”) puede incrementar la formación de agregados no funcionales.⁵⁵⁻⁵⁶ En otras proteínas de origen marino que hidrolizan carbohidratos se ha observado un comportamiento similar. Es decir, requieren estar agregadas para ser funcionales y cuando se llevan a su estado monomérico en presencia de algún poliol, pierden su actividad.⁵⁷

En la Figura 17 se observa el efecto del ligando (rafinosa) en el comportamiento en solución de LME. Al agregarse el ligando, la lectina empieza a desagregarse hasta una concentración de ligando cercana a 1.21 μmol en donde empieza a agregarse y a aparecer más especies (estados de agregación) al adicionarse los 175 μL de rafinosa, concentración a la cual la proteína saturó sus sitios de unión en ITC, la agregación vuelve a ser notoria.

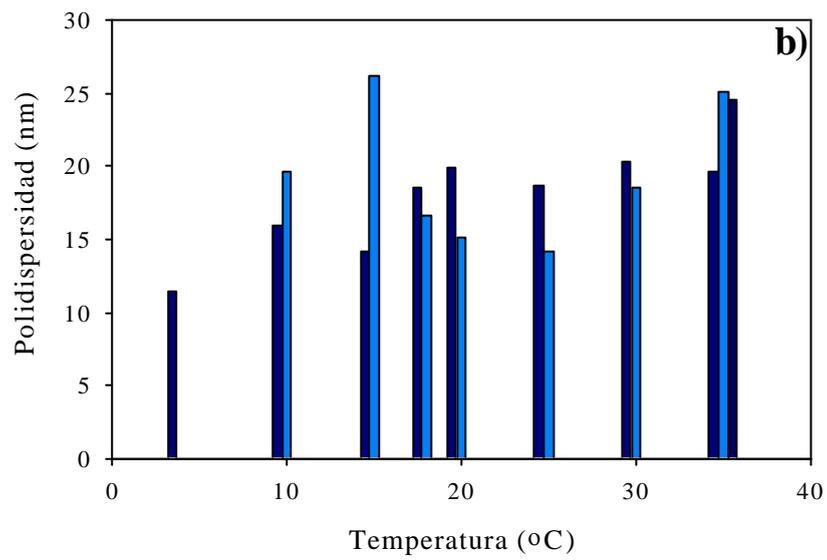
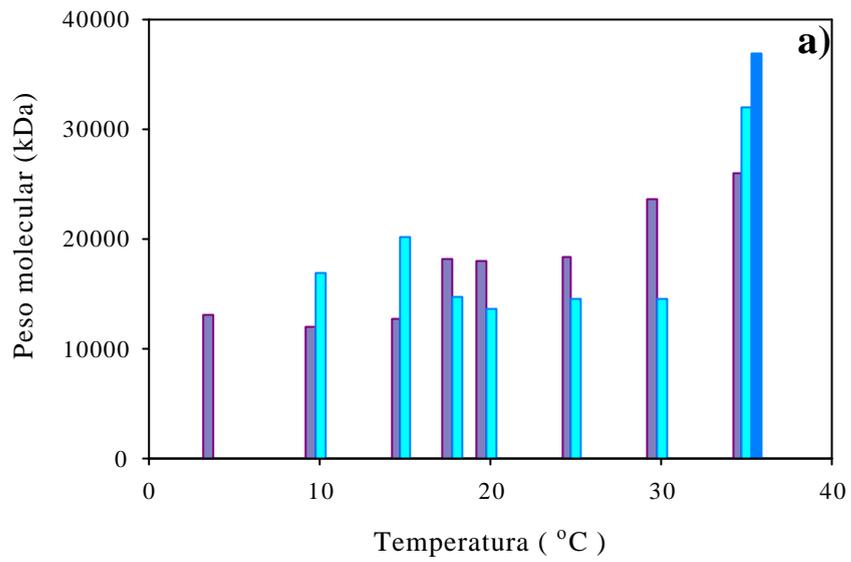


Figura 16. Efecto de la temperatura en a) la agregación y b) polidispersidad de la lectina de *Mytilus edulis*.

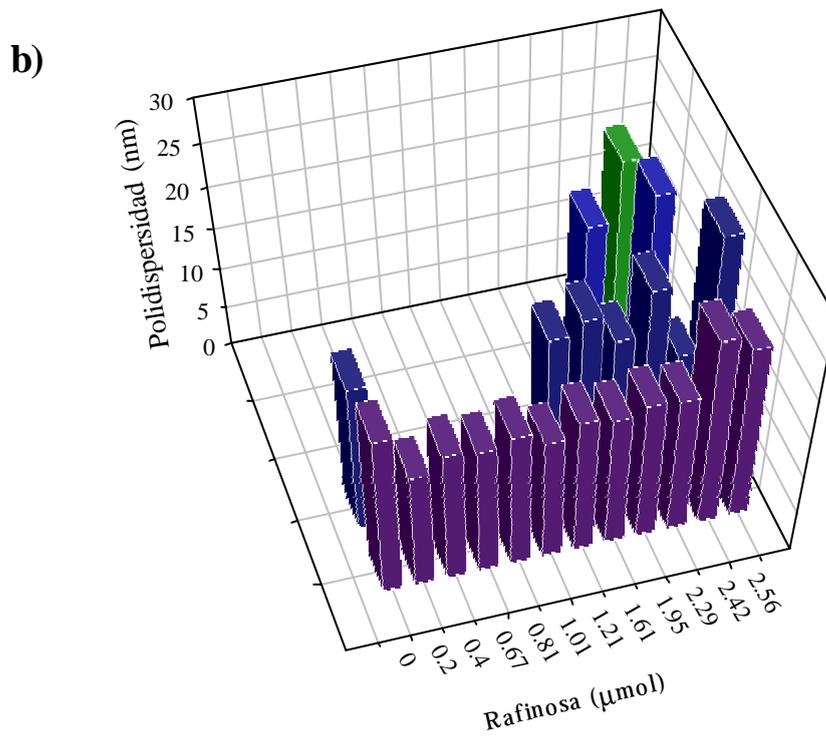
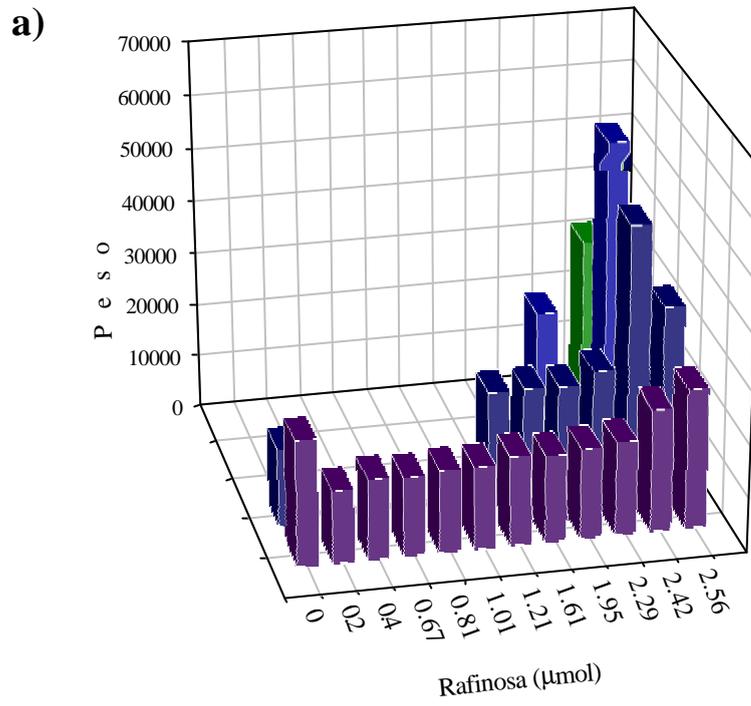


Figura 17. Efecto de la adición de ligando (Rafinosa) en a) la agregación y b) polidispersidad de la lectina de *Mytilus edulis*.

6.9 Cristalización

A la fecha se han obtenido microcristales de la LME en presencia de polietilenglicol (Figura 18). Esto debido a los fuertes procesos de agregación que presenta la lectina, que conducen a una saturación muy rápida. Si la saturación es muy rápida se forman precipitados amorfos, si es intermedia se forman microcristales, en cambio si esta velocidad es lenta se tiende a la formación de cristales bien definidos.

Para lograr obtener cristales con mayor tamaño y calidad es necesario que la saturación sea muy lenta. Una forma de lograrlo es utilizando aceites que disminuyan la velocidad de la difusión o modificando pH. También es posible aumentar el tamaño realizando sembrados de los cristales.

En muchos casos la cristalización en presencia del ligando, estabiliza a la proteína y da lugar a cristales más ordenados.

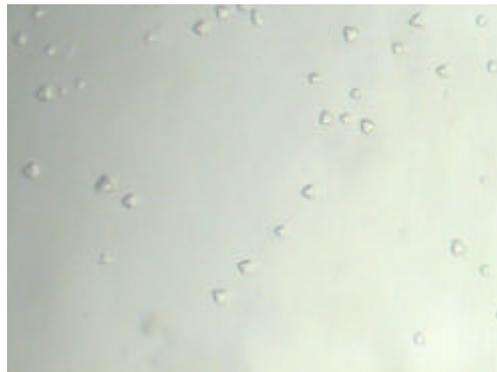


Figura 18. Cristales de la LME crecidos en la solución 38 del kit II de Hampton, que contiene 0.1M HEPES pH 7.5, 20% p/v polietilenglicol 10,000.

7. CONCLUSIONES

Del presente estudio, surgen una serie de conclusiones como son:

- La lectina de *Mytilus edulis* es la lectina con mayor actividad específica reportada a la fecha, tiene un pI básico y reconoce a la rafinosa como su ligando específico.
- Con un peso molecular de 6.450 kDa se sitúa como la lectina más pequeña reportada en invertebrados marinos.
- Su actividad es independiente del calcio y de la cisteína aunque en presencia de ésta última, la aglutinación es más fuerte.
- LME es activa aún formando agregados de pesos moleculares muy grandes, quizás esta agregación le ayuda a tener una actividad tan alta ya que le permite tener mas sitios de unión expuestos.
- El elemento de estructura secundaria que predomina es la hoja β , como la mayoría de las lectinas de invertebrados.
- La agregación de LME es afectada por el pH, temperatura y concentración de rafinosa, siendo 7.4, y 25°C los óptimos de pH y temperatura respectivamente.
- Los grupos hidroxilo presentes en la rafinosa favorecen la unión permitiendo que la lectina sea muy específica a este ligando y un reacomodo de los puentes de hidrógeno del ligando hacen que LME se desagregue para poder unirse a la rafinosa.
- Según los datos de ITC, el modelo que mejor se ajustó fue el de unión secuencial, con cinco sitios de unión, de los cuales, por lo menos cuatro son de naturaleza exotérmica
- La unión de la rafinosa a LME se da de manera espontánea y reversible.
- Su naturaleza multivalente podría permitirle mediar interacciones biológicamente relevantes en el sistema innato.

8. PERSPECTIVAS

Con el trabajo realizado se caracterizó una lectina presente en *M. edulis*, sin embargo no se logró mantenerla muy estable cuando está pura, ya que comienza a precipitarse paulatinamente y por consiguiente va perdiendo la actividad, por lo que aún no se cuenta con un conocimiento completo por lo que es preciso seguir estudiándola.

Un aspecto de gran importancia es encontrar las condiciones óptimas para mantenerla estable por más tiempo y encontrar un amortiguador idóneo para poder poner pruebas de cristalización, ya que el amortiguador donde se encuentra más estable (Fosfatos 50 mM, pH 7.4) interfiere con el montaje de cristales.

Por otro lado, considerando que se trata de una lectina con una actividad varias veces mayores a las reportadas de otras fuentes, determinar la estructura tridimensional de este tipo de lectina y hacer comparaciones con lectinas de diferente origen aportaría información relevante sobre los mecanismos de unión y relaciones estructura-función. Para lograr esto, es necesario continuar la búsqueda de condiciones apropiadas para la obtención de cristales apropiados para realizar los estudios de difracción de rayos X.

También es de suma importancia realizar estudios de cinética de unión y de agregación y correlacionarlos con los estructurales.

Resultaría de gran interés realizar estudios de actividad biológica como citotoxicidad, exámenes mitogénicos, inmunización, aglutinación de bacterias, etc.

Aún no se cuenta con una ecuación que explique la unión secuencial con lectinas que tienden a agregarse fuertemente, por lo que es indispensable realizar varios estudios de ITC con este tipo de proteínas para poder obtener un modelo matemático adecuado.

En general, es muy poco lo que se sabe de este tipo de proteínas por lo que hay una gran cantidad de estudios que sería de suma importancia realizar y que permitirían conocer y aplicar de manera eficiente este tipo de proteínas en diferentes áreas de la ciencia.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Hernández, D. P., Martín, G. O., Rodríguez de Pablos, V. Y. y Ganem, B. F. A. (1999) Aplicaciones de las lectinas. Revista cubana de hematología, inmunología y hemoterapia. **15** (2), 91-95 .
2. Rüdiger H, Siebert H-C, Solís D, Jimenez-Barbero, J., Romero, A., Lieth, C-W., Diaz-Maurino, T. y Gabius, H-J. (2000) Medicinal chemistry based on the sugar code: fundamentals of lectinology and experimental strategies with lectins as targets. Current medicinal chemistry. **7**(4), 389-416.
3. Edelman, G. M., Cunningham, B. A., Reece, G. N., Becker, J. W., Waxdal, M. W. y Wang, J. M. (1972) The covalent and three-dimensional structure of concanavalin A. Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A. **69**, 2580-2584.
4. Lobsanov, Y. D., Gitt, M. A., Leffler, H., Barondes, S. H. y Rini, J. M. (1993) X-ray crystal structure of the human dimeric S-Lac lectin, L-14-II, in complex with lactose at 2.9 resolution. Journal of biological chemistry. **268**, 27034-27038.
5. Loris, R. (2002) Principles of structures of animal and plant lectins. Biochimica et biophysica acta. **1572** (2-3), 198-208.
6. Shrive, A. K., Metcalfe, A. M., Cartwright, J. R. y Greenhough, T. K. (1999) C-reactive protein and SAP-like pentraxin are both present in *Limulus polyphemus* haemolymph: crystal structure of *Limulus* SAP. Journal of molecular biology. **290**, 997-1008.
7. Hatakeyama, T., Matsuo, N., Aoyagi, H., Sugawara, H., Uchida, T., Kurisu, G. y Kusunoki, N. (2002) Crystallization and preliminary crystallographic study of an invertebrate C-type lectin CEL-I, from the marine invertebrate *Cucumaria echinata*. Acta crystallographica D biological crystallography. **58**, 143-144.
8. Uchida, T., Yamasaki, T., Eto, S., Sugawara, H., Kurisu, G., Nakagawa, A., Kusunoki, M. y Hatakeyama, T. (2004) Crystal structure of the hemolytic lectin CEL-III isolated from the marine invertebrate *Cucumaria echinata*: implications of domain structure for its membrane pore-formation mechanism. The journal of biological chemistry. **279**, 37133-37141.
9. Beisel, H.G., Kawabata, S.I., Iwanaga, S., Huber, R. y Bode. W. (1999) Tachylectin-2: crystal structure of a specific GlcNAc/GalNAc-binding lectin involved in the innate

immunity host defense of the Japanese horseshoe crab *Tachypleus tridentatus*. The journal of the European Molecular Biology Organization. **18**, 2313-2322.

10. Lisgarten, J. N., Pitts, J. E., Palmer, R. A., Reynolds, C. D., Dao-Thi, M. H., Van Driessche, E. y Beeckmans, S. (1999) Crystallization of *Helix pomatia* agglutinin (HPA), a protein from the edible snail. Acta crystallographica D biological crystallography. **55**, 1903-1905.

11. Kilpatrick, D. C. (2002) Animal lectins: an historical introduction and overview. Biochimica et biophysica acta. **1572**, 187-197.

12. Drickamer, K. (1988) Two distinct classes of carbohydrate-recognition domains in animal lectins. Journal of biological chemistry. **263**, 9557-9560.

13. Kimura, T., Imai, Y. e Irimura, T., (1995) Calcium-dependent conformation of a mouse macrophage calcium-type lectin. Journal of biological chemistry. **270**, 16056–16062.

14. Lu-J. (1997) Collectins: collectors of microorganisms for the innate immune system. BioEssays. **19**, 509-518.

15. Kawasaki, N., Itoh, N. y Kawasaki, T. (1994) Gene organization and 5'-flanking region sequence of conglutinin: a C-type mammalian lectin containing a collagen-like domain. Biochemical and biophysical research communications **198**, 597-604.

16. Ikeda, K., Sannoh, T., Kawasaki, T., Kawasaki, N. y Yamashina, I. (1987) Serum lectin with known structure activates complement through the classical pathway. Journal of biological chemistry. **262**, 7451-7454.

17. Kawasaki, T. (1999) Structure and biology of mannan-binding protein, MBP, an important component of innate immunity. Biochimica et biophysica acta. **1473**, (1), 186-95.

18. Valdimarsson, H., Stefansson, M., Vikingsdottir, T., Arason, G.J., Koch, C., Thiel, S. y Jensenius, J.C. (1998) Reconstitution of opsonizing activity by infusion of mannan-binding lectin (MBL) to MBL-deficient humans. Scandinavian journal of immunology. **48**, (2), 116-23.

19. Dietmar Vestweber y James E. Blanks (1999) Mechanisms that regulate the function of the selectins and their ligands. Physiological reviews. **79** (1), 181-213.

20. Imai, Y., Lasky, L.A. y Rosen, S.D. (1993) Sulphation requirement for GlyCAM-1, an endothelial ligand for L-selectin. Nature. **361**, 555-557.

21. Imai, Y., Singer, M.S., Fennie, C., Lasky, L.A. y Rosen S.D. (1991) Identification of a carbohydrate-based endothelial ligand for a lymphocyte homing receptor. *Journal of cell biology*. **113**: 1213-1221.
22. East, L. e Isacke, C.M. (2002) The mannose receptor family. *Biochimica et biophysica acta*. **1572** (2-3); 364-386.
23. Barondes, S.H., Castronovo, V., Cooper, D.N.W., Cummings, R.D., Drickamer, K., Feizi, T., Gitt, M.A., Hirabayashi, J., Hughes, C., Kasai, K., Lefler, H. Liu, F., Lotan, R., Mercurio, A.M., Monsigny, M., Pillai, S., Poirer, F., Raz, A., Rigby, P.W.J., Rini, J.W. y Wang, J.L. (1994) Galectins: a family of animal beta-galactoside-binding lectins. *Cell*. **76** (4), 597-598.
24. Barondes, S.H.; Cooper, DN., Gitt, M.A. y Leffler, H. (1994) Galectins. Structure and function of a large family of animal lectins. *Journal of biological chemistry*. **269** (33); 20807-20810.
25. Cooper, D.N.W. y Barondes, S.H. (1990) Evidence for export of a muscle lectin from cytosol to extracellular matrix and for a novel secretory mechanism. *Journal of cell science*. **110**, 1681-1691.
26. Du Pasquier, L. (2001) The immune system of invertebrates and vertebrates. *Comparative biochemistry and physiology*. **129B**, 1-15.
27. Yakovleva, N.V., Samoilovick, M. P. y Gorbushin, A. M. (2001) The diversity of strategies of defense from pathogens in molluscs. *J. Evolutionary biochemistry and physiology*. **37**(4), 258-367.
28. Hatakeyama, T., Nagatomo, H. y Yamasaki, N. (1995) Interaction of the hemolytic lectin CEL-III from the marine invertebrate *Cucumaria echinata* with the erythrocyte membrane. *Journal of biological chemistry*. **270**, 3560-3564.
29. Cifuentes Lemus, J.L., Torres G. P. y Frías M. M. [libro en línea] El océano y sus recursos. Creado [(2003)], [Fecha de consulta: 15-Febrero-2004], [Organización: Omega] http://omega.ilce.edu.mx:3000/sites/ciencia/volumen2/ciencia3/087/htm/sec_13.htm
30. Fragkiadakis, G.A. (2000) Isolation of lectins from hemolymph of decapod crustaceans by adsorption on formalinized erythrocytes. *Journal of biochemical and biophysical methods*. **44**, 109-114.

31. Nowak, T. P. y Barondes S. H. (1975) Purification with formalinized horse erythrocytes as the affinity adsorbent. *Biochimica et biophysica acta*. **393**, 115-123.
32. Ochoa, J. L. y Kristiansen, T. (1978) Stroma: as an affinity adsorbent for non-inhibitable lectins. *Federation of European biochemical Societies letters*. **90**, (1), 145-148.
33. Fabregas, J., Llovo, J. y Muñoz A. (1988) Agglutination activity of algal extracts against spermatozoa of the fish *Diplofus sagus* L. *Nippon Suisan Gakkaishi*. **54**, 2121-2126.
34. Rogers, D.J. y Topliss, J.A. (1983) Purification and characterisation of an Antisialic acid agglutinin from the red alga *Soliera chordalis*. *Botánica marina*. **24**, 301-305.
35. Sreerama, N. y Woody, R.W. (2000) Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra: comparison of CONTIN, SELCON, and CDSSTR methods with an expanded reference set. *Analytical biochemistry*. **287** (2); 252-560.
36. Venyaminov, S. Yu. y Vassilenko, K.S. (1994) Determination of protein tertiary structure class from circular dichroism spectra. *Analytical biochemistry*. **222** (1); 176-184.
37. Álvarez, H. S. De Lara-Isassi, G., Arreguín, E. R., Arreguín, B., Hernández, S.A. y Rodríguez, R.A. (1999) Isolation and partial characterization of giraffine, a lectin from the Mexican endemic alga *Codium giraffa* Silva. *Botánica marina*. **42**, 573-580.
38. Pajic, I., Kljajic, Z., Dogovic, N., Sladic, D., Juranic, Z. y Gasic, M. J. (2002) A novel lectin from the sponge *Haliclona cratera*: isolation, characterization and biological activity. *Comparative biochemistry and physiology*. **132C**, 213-221.
39. Fock, W.L., Chen, C.L., Lam, T.J y Sin, Y.M. (2000) Isolation and characterization of a serum lectin from blue gourami, *Trichogaster trichopterus* (Pallus). *Fish and shellfish immunology*. **10**, 489-504.
40. Odo. S; Kamino, K; Kanai, S., Maruyama, T. y Harayama, S. (1995) Biochemical characterization of a Ca(2+)-dependent lectin from the hemolymph of a photosymbiotic marine bivalve, *Tridacna derasa* (Roding). *Journal of biochemistry*. (Tokio). **117** (5), 965-973.
41. Koch, O. M., Lee, C.K. y Uhlenbruck, G. (1982) Cerianthin lectins: a new group of agglutinins from *Cerianthus membranaceus* (Singapore). *Immunology*. **163** (1), 53-62.
42. O'Keefe, B. R., Beutler,, J.A., Cardellina, J.H., Gulakowski, R.J., Krepps, B.L., McMahan, J.B., Sowder, R.C., Henderson, L.E., Pannell, L.K., Pomponi, S.A. y Boyd M.R. (1997) Isolation and characterization of niphatevirin, a human- immunodeficiency-

virus-inhibitory glycoprotein from the marine sponge *Niphates erecta*. European journal of biochemistry. **245**, 47-53.

43. Biswas, C, Sinha, D. y Mandal, C. (2000) Investigation on interaction of Achatinin, a 9-O-acetyl sialic acid-binding lectin, with lipopolysaccharide in the innate immunity of *Achatina fulica* snails. Molecular immunology. **37**; 745-754.

44. Belogortseva, N.I., Molchanova, V. I., Kurika, A.V., Skobun, A.S. y Glazkova, V.E. (1998) Isolation and characterization of new GalNAc/Gal-specific lectin from the sea mussel *Crenomytilus grayanus*. Comparative biochemistry and physiology. **119C** (1), 45-50.

45. Tunkijjanukij, S., Mikkelsen, H.V. y Olafsen, J.A. (1997) A heterogeneous sialic acid-binding lectin with affinity for bacterial LPS from Horse Mussel (*Modiolus modiolus*) hemolymph. Comparative biochemistry and physiology. **117B**, (2), 273-286.

46. Jung, W-K., Park, P-J. y Kim, S-K. (2003) Purification and characterization of a new lectin from the hard roe of skipjack tuna, *Katsuwonus pelamis*. The International journal of biochemistry & cell biology. **35**, 255-265.

47. Berman, H. M. (1970) The crystal structure of a trisaccharide, raffinose pentahydrate. Acta crystallographica. **B26**, 290-297.

48. Varki, A., Cummings, R., Esko, J., Freeze, H., Hart, G. y Marth, J. (1999) *Essentials of Glycobiology*. The Consortium of Glycobiology Editors. La Jolla. 653 págs.

49. Rini, J.M. (1995) Lectin structure. Annual review of biophysics and biomolecular structure. **24**, 551-577.

50. Weis, W. I. y Drickamer, K. (1996) Structural basis of lectin-carbohydrate recognition. Annual review of biochemistry. **65**: 441-473.

51. Schwarz, F. P., Misquith, S. y Surolia, A. (1996) Effect of substituent on the thermodynamics of D-glucopyranoside binding to concanavalin A, pea (*Pisum sativum*) lectin and lentil (*Lens culinaris*) lectin. The biochemical journal **316**, 123-129.

52. Iobst, S.T. y Drickamer, K. (1994) Binding of sugar ligands to Ca²⁺ dependent-animal lectins: II Generation of high affinity galactose binding by site-directed mutagenesis. Journal of biological chemistry. **269**, 15512-15519.

53. Sugawara, H. Kusunoki, M., Kurisu, G., Fujimoto, T., Aoyagi, H. y Hatakeyama, T. (2004) Characteristic recognition of N-acetylgalactosamine by an invertebrate C-type lectin,

CEL-I, revealed by X-ray crystallographic analysis. Journal of biological chemistry. **279**, 45219-45225.

54. Poget, S.F., Legge, G.B., Proctor, M.R., Butler, P.J.G., Bycroft M. y William, R.L. (1999) The structure of a tunicate C-type lectin from *Polyandrocarpa misakiensis* complexed with D-galactose. Journal of molecular biology. **290**, 867-879.

55. Hall, D. y Milton, A. P. (2003) Macromolecular crowding: quantitative and semiquantitative successes, quantitative changes. Biochimica et biophysica acta. **1649**, 127-139.

56. Milton, A. P. (2000) Implications of macromolecular crowding for protein assembly. Current opinion in structural biology. **10**, 34-39.

57. Hernández, S.A., Rojo-Domínguez, A., García-Hernández, E. y Rodríguez-Romero, A. (2000) Physicochemical properties and behavior in solution of three cellulases from *Haliotis fulgens*. Protein and peptide letters. **7**(6), 389-396.

58. Koshland, D.E, Nemethy, G. y Filmer, D. (1966) Comparison of experimental binding data and theoretical models in proteins conining subunits. Biochemistry. **5**, 365-385.

59. Sharon, N. (1993) Lectin-carbohydrate complexes of plants and animals: an atomic view. Trends in biochemical sciences. **18**, 221-226

60. McEver, R. P., Moore, K. L. y Cummings, R. D. (1995) Leukocyte trafficking mediated by selectin-carbohydrate interactions. The journal of biological chemistry. **270**, 11025-11028.

61. Kornfeld, S. (1992) Structure and function of the mannose 6-phosphate/insulinlike growth factor II receptors. Annual review of biochemistry. **61**, 307-330.

62. Lee, Y. C. (1992) Biochemistry of carbohydrate-protein interaction. Journal of the Federation of American Societies for experimental biology. **6**, 3193-3200.

63. Drickamer, K. y Taylor, M. E. (1993) Biology of animal lectins. Annual review of cell biology. **9**, 237-264.

64. Brewer, C. F. (1996) Multivalent lectin-carbohydrate cross-linking interactions. Chemtracts of biochemistry and molecular biology. **6**, 165-179.

65. Gupta, D. y Brewer, C. F. (1994) Homogeneous aggregation of the 14-kDa α -galactoside specific vertebrate lectin complex with asialofetuin in mixed systems. Biochemistry. **33**, 5526-5530.

66. Heldin, C. H. (1995) Dimerization of cell surface receptors in signal transduction. *Cell* **80**, 213-223.
67. Matsushita, M., Irino, T., Komoda, T., y Sakagishi, Y. (1993) Determination of proteins by a reverse biuret method combined with the copper-bathocuproine chelate reaction. *Clinica chimica acta*. **216** (1-2), 103-111.
68. Bollag, D.M. y Edelstein, S.J. (1991) Protein methods. Library of Congress. Wiley-Liss. New York. 227 págs.
69. Ewing, G.W. (1979) Métodos instrumentales de análisis químicos. Mc Graw Hill. México. 592 págs.
70. Jena, S. y Bohidar, H. (1993) Determination of absolute polydispersity and molecular weight distribution for high molecular weight polymers from dynamic light scattering. *Journal of chemical physics*. **99**, 673-681.
71. Bishop, J. y Martin, J. (1991) A light scattering method for qualitatively monitoring aggregation rates in macromolecular systems. *Journal of crystal growth*. **110**, 164-170.
72. Georgalis, Y. y Shueler, J. (1995) Protein crystallization screening through scattering techniques. *Advances in colloid and interface science*. **58**, 57-86.
73. Sidhartha, J. y Himadri, B. (1993) Determination of absolute polydispersity and molecular weight distribution of high molecular weight polymers from dynamic light scattering. *Journal of chemical physics*. **99**, 673-681.
74. Alva, R. [en línea] Dicroísmo circular. [Creado: Marzo 2001], [Fecha de consulta: 13-Febrero-2003], [Organización: Galeón] <http://www.galeon.com/scienceducation/Dicroismo.htm>
75. Brunet, E. [en línea] Determinación estructural , Lección 21. [Creado: 7-Febrero-2003], (Fecha de consulta: 13-Febrero- 2004), [Organización: UAM] http://www.uam.es/departamentos/ciencias/qorg/docencia_red/go/121/funem.html.
76. Kelly, S. y Price, N. (1997) The application of circular dichroism to studies of protein folding and unfolding. *Biochimica et biophysica acta*. **1338**, 161-185.
77. Dam, T. K y Brewer, C. F. (2002) Thermodynamic Studies of Lectin-Carbohydrate Interactions by Isothermal Titration Calorimetry. *Chemical reviews*. **102**, 387-429.
78. Mc Pherson, A. (1999) Crystallization of biological macromolecules. Cold Spring Harbor Laboratory. 327-337.

APÉNDICE

FUNDAMENTOS DE LAS TÉCNICAS UTILIZADAS

1. Método de cuantificación. Protein Assay ESL (*Exact, Sensitive, Low interference*).

Es una optimización del procedimiento derivado de Matsushita⁶⁷ en el que se utiliza una reacción parecida a la de biuret, donde el Cu^{+2} está inicialmente acomplejado con la proteína en un medio alcalino. Cuando hay un exceso de Cu^{+2} , la fracción que no es acomplejada por la proteína es reducida a Cu^{+1} con ácido ascórbico, formándose el complejo Cu^{+1} -batocuproína, el cual tiene un máximo de absorción a 485 nm. La magnitud de la señal es inversamente proporcional a la cantidad de enlaces peptídicos, en contraste con otros métodos de cuantificación que son afectados por las cadenas laterales de los aminoácidos. Por esto, la variación entre diferentes proteínas es muy baja. Este método permite determinar concentraciones de proteína en un intervalo de 20 a 800 $\mu\text{g/mL}$.

2. Electroforesis SDS-PAGE

La técnica de SDS-PAGE separa a las proteínas basándose principalmente en sus pesos moleculares, teniendo la ventaja de romper proteínas complejas, compuestas de más de una subunidad y de hacer que el polipéptido monomérico migre de acuerdo a su peso molecular.

En las separaciones con electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS, la migración esta determinada no por la carga eléctrica intrínseca de los polipéptidos sino por su peso molecular. El dodecil sulfato de sodio (SDS) es un detergente aniónico que desnaturaliza las proteínas envolviendo su cadena hidrofóbica alrededor del polipéptido. Para la mayoría de las proteínas el SDS se une a una razón aproximada de 1.4 g / g de proteína, confiriendo una carga negativa neta al polipéptido en proporción con su longitud. El SDS también rompe puentes de hidrógeno, bloquea interacciones hidrofóbicas y despliega sustancialmente las moléculas de proteína minimizando las diferencias en forma molecular por eliminación de sus estructuras secundarias y terciarias.

Las proteínas pueden ser totalmente desplegadas cuando se emplea un agente reductor tal como el β -mercaptoetanol, el cual puede romper puentes disulfuro entre residuos

cisteína. Los polipéptidos desnaturalizados por SDS y reducidos son cadenas flexibles con carga negativa uniforme por unidad de longitud. Por lo tanto debido a que el peso molecular es una función lineal de la longitud de la cadena del péptido, en los geles de electroforesis las proteínas se separan por su peso molecular.⁶⁸

3. Espectrometría de masas MALDI-TOF

En los espectrómetros de masas, las moléculas se ionizan y posteriormente se aceleran a través del vacío mediante un campo eléctrico (Figura 19). Pocas moléculas de un compuesto se introducen en el espectrómetro mediante un dispositivo apropiado (cámara de introducción), se convierten en iones (ionización) y adquieren una relación masa/carga (m/z). La relación m/z obliga a las moléculas que la han adquirido a describir una trayectoria propia dentro del espectrómetro (deflexión) que se encuentra a alto vacío. Los iones de una relación m/z determinada son así detectados (detección) separadamente de los de otras relaciones m/z . La calibración adecuada del instrumento permite medir la relación m/z y por tanto la masa molecular de cada ion que alcanza el detector.⁶⁹

Para determinar la masa molecular de la proteína y establecer su pureza se utilizó la técnica de espectrometría de masas llamada espectrometría de masas mediante ionización-desorción por láser asistidas por matriz acoplada a un analizador de tiempo de vuelo (MALDI-TOF).

En la técnica de MALDI un haz de láser pulsado golpea una muestra sólida calentándola y vaporizándola, ionizando así los compuestos con una mínima descomposición. Las proteínas se mezclan con una matriz que absorbe el calor del haz de láser. La muestra de proteína se seca junto con la matriz. La mayoría de las proteínas forma cristales y el láser se dirige hacia los cristales o agregados individuales. La matriz se ioniza, se suelta de la superficie y transfiere energía a la proteína cristalina, lo que causa su ionización y separación de la superficie.

Los espectros son relativamente simples, conteniendo sólo un pico mayor que corresponde al ión molecular cargado singularmente y tal vez el ión cargado doblemente. Para proteínas oligoméricas el pico mayor normalmente es el del monómero con picos

menores para los oligómeros. Con un espectrómetro TOF no hay límite mayor para el rango de masas por lo que pueden medirse masas de más de 100 kDa.

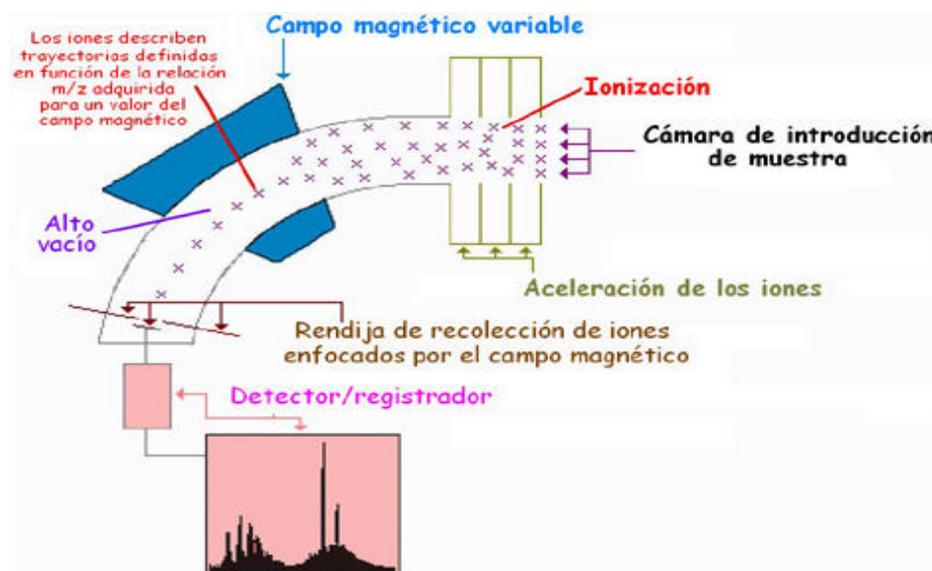


Figura 19. Esquema sencillo de un espectrofotómetro de masas.

4. Enfoque isoelectrico (EI).

El enfoque isoelectrico es una técnica que separa a las proteínas de acuerdo a su carga neta o punto isoelectrico (pI). La separación se lleva a cabo por un posicionamiento de la proteína en un gradiente de pH generado por un campo eléctrico. Bajo estas condiciones la proteína migra hasta que alcanza una posición en el gradiente de pH el cual es una carga neta o un punto isoelectrico igual a cero. Las proteínas son anfóteras; tienen carga positiva, negativa o cero dependiendo de la composición de sus aminoácidos y el pH de su alrededor. La carga neta de una proteína es la suma de todas las cargas positivas o negativas de sus aminoácidos y sus grupos amino y carboxilo terminales.

En esta técnica se establece electroquímicamente un gradiente de pH en un gel de poliacrilamida que contiene anfóteras. Cuando se aplica un voltaje a través de las anfóteras, las anfóteras con pI bajos (carga negativa) migran hacia el ánodo y las anfóteras con los pI más altos (carga positiva) migran hacia al cátodo.⁶⁸

5. Dispersión dinámica de luz (DLS)

La dispersión dinámica de luz es una técnica que permite medir el coeficiente de difusión traslacional (D_T) de una molécula o agregados en solución. Con técnicas de DLS es posible determinar el coeficiente de difusión, el radio hidrodinámico, el peso molecular y la polidispersidad de la proteína.

Las partículas en solución se desplazan debido a que presentan movimientos brownianos. Esta movilidad está relacionada con el coeficiente de difusión y éste con el radio de la partícula. Iluminando la partícula con un rayo láser, la intensidad de la luz dispersada a un ángulo dado puede ser seguida en el tiempo. Como la partícula se mueve, la señal medida fluctuará. Midiendo las fluctuaciones y el camino en el cual ellas cambian, el coeficiente de difusión de las partículas y a partir de éste, el radio de la partícula pueden ser determinados con la ecuación de Stokes-Einstein. La dispersión de luz monocromática causada por las partículas en movimiento presentará fluctuaciones en su intensidad debido al movimiento browniano de las moléculas o agregados en solución .

El análisis del decaimiento de la función de autocorrelación, es decir la medición de las fluctuaciones de la intensidad en función del tiempo correspondiente a la señal de la intensidad dispersada, proporcionará información cuantitativa acerca del comportamiento en solución de los agregados moleculares. D_T se relaciona con el radio hidrodinámico (R_H), a través de la ecuación de Stokes-Einstein: $D_T = \frac{K_B T}{6\pi\eta R_H}$, donde k_B es la constante de Boltzmann, η es la viscosidad de la solución, T es la temperatura absoluta y R_H el radio hidrodinámico .

También es posible determinar el peso molecular por medio de la ecuación de Mark Houwink: $D_T = A_0 M^u$, ésta considera la relación directamente proporcional del coeficiente de difusión traslacional con el peso molecular M , elevado a una potencia específica. Así, la constante de proporcionalidad que surge de esta ecuación toma en cuenta las propiedades del disolvente y se representa por A_0 . Esta ecuación requiere de una estimación adecuada del factor de estructura (u), que para el caso particular de proteínas esféricas tiene un valor de 0.33 y se aplica también a modelos cuasi-esféricos.⁷⁰⁻⁷³

6. Dicroísmo circular (DC).

La teoría de dicroísmo circular fue desarrollada por Biot y Fresnel (Neumann y Snatzke, 1990). Un rayo de luz polarizado en un plano puede considerarse formado por dos componentes polarizados circularmente, 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 diferenciales en ambos componentes circularmente polarizados de la luz, y estos fenómenos provocan una rotación del plano de polarización en un ángulo α y la distorsión de este plano genera una elipse.⁷⁴

La rotación del plano y la diferente absorción de los componentes circularmente polarizados (dicroísmo circular) varían de acuerdo con la longitud de onda, pudiéndose obtener espectros de estos fenómenos, esto es, gráficas de la rotación o elipticidad contra la longitud de onda. Los espectros de dicroísmo circular se obtienen generalmente en las regiones del ultravioleta cercano (250 a 350 nm) y lejano (180 a 250 nm) de la radiación electromagnética. En la región del ultravioleta cercano, los cromóforos más importantes son los grupos aromáticos de las cadenas laterales de triptofano, tirosina, y fenilalanina. Ya que la asimetría en estos grupos químicos, se debe exclusivamente a su entorno y como los residuos aromáticos se encuentran distribuidos en toda la macromolécula, los espectros en esta región son un reflejo de la conformación global de la proteína. Además las señales en esta región son extremadamente sensibles a los cambios en la conformación.⁷⁵

Los espectros de dicroísmo en la región del ultravioleta lejano, se deben principalmente a los enlaces amida que unen los residuos de los aminoácidos entre sí. La asimetría de estos cromóforos se debe al arreglo espacial de la cadena principal de la proteína, por lo cual, las señales de dicroísmo circular se pueden interpretar en términos del contenido de estructura secundaria presentes, es decir, del porcentaje de residuos que se encuentran en alguna conformación estructural (hélices α , hojas β , giros y otros tipos estructurales).

El análisis del espectro de dicroísmo circular de una proteína cualquiera consiste en encontrar la combinación lineal de los 5 espectros base que logra reproducir el perfil de la mejor manera posible del espectro experimental. Una vez logrado esto y considerando que las señales son aditivas, se suma el producto del contenido de cada estructura secundaria de los espectros base por su coeficiente en la combinación lineal. Los resultados de esta adición representan la estimación experimental de los porcentajes de los residuos en cada una de las estructuras secundarias de la conformación de la proteína problema. Para realizar este análisis, Hennessey y Johnson utilizaron como base de datos, los espectros de un conjunto de proteínas cuya estructura tridimensional era conocida y determinada. A partir de estos espectros, se demostró que basta la combinación lineal de 5 espectros base, para describir perfectamente los espectros experimentales. Además, se determinó que a cada uno de los 5 espectros base puede asignársele un contenido de estructura secundaria⁷⁶ (Figura 20).

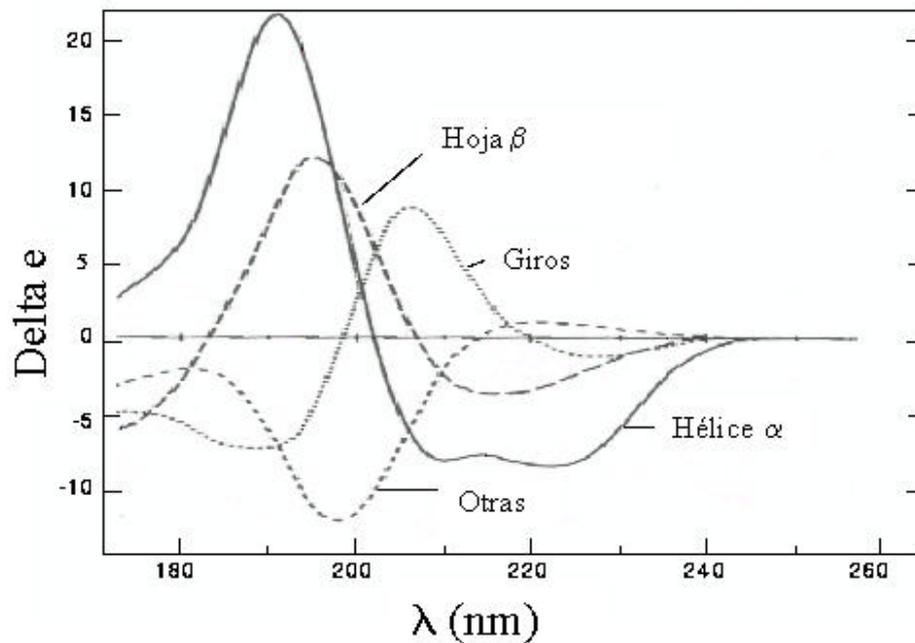


Figura 20. Espectros característicos de cada una de las contribuciones a la estructura secundaria, hélice alfa, hoja beta, giros y al azar.

7. Calorimetría de titulación isotérmica (ITC).

La calorimetría de titulación isotérmica es una técnica termodinámica que mide una reacción química iniciada por la adición de un ligando, convirtiéndose en el método más

valioso para la caracterización de las interacciones biomoleculares. Cuando las sustancias se unen se genera o absorbe calor. La medición de este calor permite determinar correctamente las constantes de unión (K_B), la estequiometría de reacción (n), entalpía (ΔH) y entropía (ΔS), por lo que provee un perfil termodinámico completo de la interacción molecular en un simple experimento. Los parámetros de unión se determinan por un análisis lineal de mínimos cuadrados de la isoterma.

En los experimentos de ITC una jeringa contiene el ligando, la solución es titulada en una celda que contiene a la macromolécula en solución a temperatura constante (Figura 21). Cuando el ligando es inyectado en la celda los dos materiales interactúan y entonces se libera o absorbe calor directamente proporcional a la cantidad de sitios de unión.⁷⁷

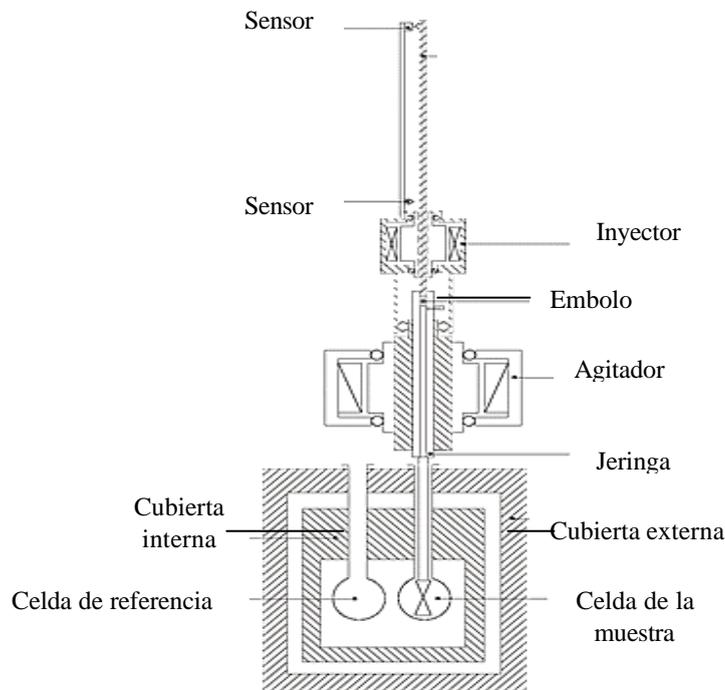


Figura 21. Diagrama de las celdas y jeringa del ITC. La jeringa esta en agitación durante el experimento. El émbolo es controlado por la computadora e inyecta volúmenes precisos de ligando.

La aplicación de ITC es variada y algunos ejemplos donde se utiliza son: interacciones entre proteínas con macromoléculas y ligandos; proteína-proteína, proteína -péptido, ácido nucleico-ligando (fármaco), proteína-ácido nucleico; metales unidos a moléculas, receptor -

ligando; papel del agua en sistemas biológicos; interacciones hormona-receptor, enzima-sustrato, anticuerpo-antígeno; carbohidratos unidos a macromoléculas, etc.

8. Cristalización

Para el análisis estructural por rayos X se requiere que la molécula sea cristalizada en forma adecuada para la obtención de datos. Esto es, obtener cristales mayores a los 0.2mm, que difracten adecuadamente los rayos X y que posean la suficiente estabilidad para que sus patrones de difracción no decaigan durante el tiempo que dura el experimento. De hecho, la obtención de los cristales es la etapa más crítica para la determinación de la estructura tridimensional de proteínas por el método de difracción de rayos X.

Para inducir la cristalización es necesario llevar muy lentamente el sistema soluto-disolvente a un estado de solubilidad mínima y así alcanzar un grado limitado de supersaturación. Para lograr esto es necesario considerar todas las variables que afectan la cristalización como son: concentración de la proteína, temperatura, pH, fuerza iónica, aditivos específicos y agentes precipitantes.⁷⁸

El método de difusión de vapor es el más popular y ha demostrado ser el más útil para el estudio de numerosas condiciones con cantidades mínimas de proteína. Existen dos técnicas que utilizan la difusión de vapor: la de la “gota asentada” y la de la “gota suspendida”. Esta última se utilizó para intentar la cristalización de la LME. Con este método, la solución de proteína y el agente precipitante se colocan en cubreobjetos siliconizados. Por otro lado, a un pozo o recipiente pequeño (generalmente se usan cajas Limbro) se agrega 1 mL de la solución de agente precipitante a una concentración del doble de la que se encuentra en la solución de la proteína y se le aplica grasa de vacío en la parte superior del pozo. El cubreobjetos se coloca arriba del pozo, de tal forma que la gota de proteína queda suspendida en el interior y finalmente se sella con la grasa. Estas condiciones pueden modificarse a fin de optimizarlas y lograr obtener cristales apropiados para los estudios de difracción de rayos X.