



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL Y FUNCIONAL DE
UNA LECTINA DE LA LIEBRE MARINA *Aplysia Californica***

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA DE ALIMENTOS**

PRESENTA

MARIEL BARJAU AGUILAR



MÉXICO, D.F.

2015



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: Sobeida Sánchez Nieto

VOCAL: Profesor: Carolina Peña Montes

SECRETARIO: Profesor: Alejandra Hernández Santoyo

1er. SUPLENTE: Profesor: Laura Carmona Salazar

2º SUPLENTE: Profesor: Perla Deyanira Maldonado Jiménez

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA DE BIOMACROMOLÉCULAS, INSTITUTO DE QUÍMICA, UNAM.

ASESOR DEL TEMA:

Dra. ALEJANDRA HERNÁNDEZ SANTOYO

SUSTENTANTE

MARIEL BARJAU AGUILAR

RESUMEN

Las lectinas son proteínas de origen no inmune que poseen al menos un dominio capaz de unir específica y reversiblemente mono u oligosacáridos. Son moléculas que participan en uno de los principales mecanismos de defensa empleado por invertebrados marinos, ya que al carecer de un sistema inmune mediado por anticuerpos dependen exclusivamente de la respuesta inmune innata para defenderse de patógenos. Estas proteínas están relacionadas con procesos de aglutinación, actividad citotóxica, anticancerígena y hemólisis entre otras.

En el presente estudio se purificó y caracterizó a una lectina del molusco marino *Aplysia californica*. La purificación se realizó por cromatografía de afinidad utilizando una resina de *p*-Aminobenzil-1-tio-D-galactopiranosido. Se logró secuenciar a la proteína que mostró una masa de 26.4 kDa. Esta lectina reconoce galactósidos, mostrando la mayor afinidad para la β -lactosa con una concentración mínima inhibitoria de 1.15 $\mu\text{g/mL}$ mientras que con la D(+) galactosa y la α -lactosa fue de 13.41 $\mu\text{g/mL}$, tiene una fuerte tendencia a agregarse irreversiblemente a concentraciones mayores a 97 $\mu\text{g/mL}$, por lo que requiere aditivos como el polipropilenglicol P400 para mantenerla activa y estable a mayores concentraciones .

Por técnicas de fluorometría diferencial de barrido, se observó que la lectina pura aumenta su estabilidad en presencia de diversos aditivos, principalmente de naturaleza hidrofóbica, algunos iones y con su ligando, los que inducen la oligomerización ordenada de la proteína.

Con la secuencia de la lectina de *Aplysica californica* se obtuvo un modelo estructural que muestra la presencia de dos dominios, uno de reconocimiento de carbohidratos (Dominio 1) y el otro de oligomerización (Dominio 2). El primero está bien estructurado con un predominio de hojas β , mientras que el segundo está desestructurado, siendo probablemente el responsable de la inestabilidad de la proteína. La proteína presenta un gran número de cisteínas expuestas y de sitios potenciales de glicosilación que pueden estar favoreciendo la oligomerización. Por acoplamiento molecular se observó que la lectina tiene 3 sitios de reconocimiento de carbohidratos.

CONTENIDO

RESUMEN.....	3
CONTENIDO	4
ABREVIATURAS	6
1. INTRODUCCION	7
2. MARCO TEÓRICO.....	8
2.1. ESTRUCTURA DE LOS CARBOHIDRATOS.....	8
2.2. LECTINAS.....	8
2.2.1. <i>Especificidad de las lectinas</i>	9
2.2.2. <i>Clasificación de las lectinas de animales con base en las secuencias de los DRC</i>	11
Lectinas Tipo C	13
Lectinas Tipo F	13
Lectinas Tipo R	13
Lectinas Tipo I.....	14
Galectinas.....	14
2.3. FUNCIONES DE LAS LECTINAS ANIMALES.....	15
2.4. APLICACIONES BIOTECNOLÓGICAS DE LAS LECTINAS	15
2.5. ASPECTOS BIOLÓGICOS DE <i>APLYSIA CALIFORNICA</i>	16
3.0 ANTECEDENTES	18
3.1. LECTINAS EN INVERTEBRADOS MARINOS	18
2.5. LECTINAS EN MOLUSCOS DEL GÉNERO <i>APLYSIA</i>	22
4.0 HIPÓTESIS	23
5.0 OBJETIVO GENERAL.....	23
5.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
6.0 DISEÑO EXPERIMENTAL	23
6.1. ORGANISMO DE ESTUDIO.....	24
6.2. OBTENCIÓN DE EXTRACTO.....	24
6.3. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA LECTINA	24
6.3.1. <i>Formalinización de eritrocitos de conejo</i>	24
6.3.2. <i>Pruebas de actividad hemaglutinante</i>	25
6.4. PURIFICACIÓN	26
6.5. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNA.....	27
6.5.1. <i>Curva de calibración</i>	27
6.6. ELECTROFORESIS SDS-PAGE	28
6.6.1. <i>Tinción con nitrato de plata</i>	29
6.7. DETERMINACIÓN DE LA ESTABILIDAD DE LA LECTINA.....	29
6.8. PRUEBAS DE ESPECIFICIDAD.....	32
6.9. SECUENCIACIÓN DE LA LECTINA DE <i>APLYSIA CALIFORNICA</i>	32
6.10. BIOINFORMÁTICA.....	33

6.10.1 Modelado de la estructura de la lectina de <i>A. californica</i>	33
6.10.2. Análisis de la estructura.....	33
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	34
7.1 VERIFICACIÓN DE LA PRESENCIA DE LA ACTIVIDAD HEMAGLUTINANTE EN EXTRACTOS DE <i>APLYSIA CALIFORNICA</i>	34
7.2 PURIFICACIÓN.....	35
7.3. PRUEBAS DE ESPECIFICIDAD.....	36
7.4. ESTUDIOS DE ESTABILIDAD TÉRMICA UTILIZANDO FLUOROMETRÍA DIFERENCIAL DE BARRIDO.....	38
7.5. SECUENCIACIÓN DE LA LECTINA DE <i>APLYSIA CALIFORNICA</i>	45
7.6. ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO.....	46
7.6.1. Modelo estructural de la lectina de <i>Aplysia californica</i>	46
7.6.2 Análisis de la agregación de la lectina.....	48
7.6.3. Análisis de los sitios de glicosilación de la lectina de <i>A. californica</i>	49
7.6.4. Análisis de los sitios de unión a azúcares por acoplamiento molecular (<i>Docking</i>).....	51
7.6.5. Sitios de unión a iones.....	53
7.6.6. Análisis de cisteínas.....	53
8.0 CONCLUSIONES.....	55
9.0 PERSPECTIVAS.....	56
10. REFERENCIAS.....	57

ABREVIATURAS

AF: Amortiguador de fosfatos 50 mM pH 7.4, 150 mM de NaCl

BCA: Ácido bicinconínico

BSA: Albúmina de suero de bovino

CMI: Concentración mínima inhibitoria

Da: Daltones

DRC: Dominio de reconocimiento a carbohidratos

DTT: Ditioneitol

ECF: Eritrocitos de conejo formalinizados

FDB: Fluorimetría diferencial de barrido

G: Gravedades

GalNAc: N-acetil galactosamina

Glc: Glucosa

GlcNAc: N-acetil glucosamina

kDa: kilo daltones

Man: Manosa

nm: Nanómetros

PEG: Polietilenglicol

PPG-P400: Polipropilenglicol P400

SDS-PAGE: Electroforesis en gel de poli(acrilamida) en presencia de dodecilo sulfato de sodio

T_m: Temperatura de fusión, temperatura a la que la mitad de las moléculas de proteína en solución están desplegadas y la mitad plegadas

U: Unidad de actividad

pI: Punto isoeléctrico

1. INTRODUCCION

Las lectinas son moléculas que participan en uno de los principales mecanismos de defensa empleado por invertebrados marinos, ya que al carecer de un sistema inmune mediado por anticuerpos dependen exclusivamente de la respuesta inmune innata para defenderse de patógenos [1]. Estas proteínas aunque forman parte del sistema inmune de muchos organismos son de origen distinto a las inmunoglobulinas y reconocen carbohidratos sin modificarlos. Actualmente la definición más aceptada de lo que es una lectina es la propuesta por Peumans y Van Damme en 1995 [2]: las lectinas son proteínas de origen no inmune que poseen al menos un dominio no catalítico capaz de unir específica y reversiblemente mono u oligosacáridos, y cuya estructura puede o no presentar cualquier otro dominio protéico. Según su estructura se diferencian tres tipos principales de lectinas: a) Merolectinas. Son proteínas constituídas por un único dominio estructural que alberga un solo sitio de unión a carbohidratos. Estas lectinas no poseen actividad hemoaglutinante. b) Hololectinas. Estas lectinas poseen dos o más dominios del mismo tipo estructural y funcional. Al menos dos de estos dominios deben presentar actividad de unión a carbohidratos por lo que son capaces de aglutinar células o precipitar glicoconjugados. c) Quimerolectinas. Estas proteínas además de poseer un dominio de unión a carbohidratos, presentan otro(s) dominio(s) con una actividad biológica distinta del reconocimiento de carbohidratos (por ejemplo con actividad enzimática, inactivadora de ribosomas, etc). Dependiendo del número y topología de los sitios de unión a carbohidratos [2], estas lectinas pueden presentar o no actividad hemoaglutinante. Además, están relacionadas con procesos de aglutinación, actividad citotóxica en bacterias y hemólisis [3].

A pesar de que existen numerosos estudios de lectinas tanto vegetales como animales, en invertebrados han sido poco estudiadas y existen pocos artículos que las describen parcialmente y sólo unos cuantos llegan a un análisis estructural de dichas proteínas [4]. Un caso interesante de analizar son las lectinas del molusco marino *Aplysia californica*. En estudios previos en el laboratorio de Química de Biomacromoléculas del Instituto de Química, UNAM se detectó en este molusco la

presencia de una lectina que reconoce galactosa. Sin embargo, la lectina presentó una fuerte tendencia a agregarse bajo las condiciones experimentales perdiendo rápidamente la actividad y precipitando [5]. Con el fin de encontrar las condiciones que permitieran estudiar a nivel estructural y funcional a la lectina de *A. californica*, en el presente estudio se analizaron nuevas estrategias de purificación y de estabilidad de la proteína.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Estructura de los carbohidratos

Los carbohidratos son las moléculas orgánicas más abundantes de la naturaleza y debido a su importancia energética, la mayoría de los organismos son capaces de sintetizarlos y metabolizarlos. La heterogeneidad de los carbohidratos en los sistemas vivos es el resultado de las propiedades de los mismos. Esto es su capacidad de formar enlaces glicosídicos entre diferentes azúcares, sus características estructurales, la presencia o ausencia de ramificaciones y la existencia de anómeros. Como consecuencia de toda esta variabilidad, los glicopolímeros de membrana (moléculas proteicas unidas por un enlace covalente a un carbohidrato), funcionan como moléculas de señalización, reconocimiento y adhesión para proteínas involucradas en distintas funciones metabólicas [6]

2.2. Lectinas

Las lectinas (del latín *lectus*, pasado participio de *legere*, que significa seleccionar) son proteínas (no enzimas ni anticuerpos) que tienen la capacidad de reconocer y unirse de manera selectiva a carbohidratos principalmente complejos, presentes en glicolípidos y glicoproteínas y en menor medida a monosacáridos libres. La interacción de las lectinas con un determinado carbohidrato puede ser tan específica como la interacción antígeno-anticuerpo o enzima-sustrato [1,2,6].

Las lectinas se encontraron y describieron inicialmente en plantas, sin embargo, a la fecha se han aislado también de microorganismos y animales [7]. Algo interesante que se ha observado en lectinas de plantas y animales es que no presentan

homología en secuencia sin embargo, su función y especificidad es similar. Esto sugiere que los genes de estas lectinas co-evolucionaron y destaca la importancia de la interacción lectina carbohidrato en los sistemas vivos. La que se observa en el reconocimiento célula-célula, crecimiento celular, diferenciación, respuesta inmune, procesos inflamatorios, interacciones hospedero-patógeno, plegamiento de glicoproteínas de membrana, entre otras [1,2,6-8]. En los últimos años se ha determinado la estructura primaria y terciaria de diversas lectinas lo que ha permitido observar que lectinas de diferentes fuentes no tienen similitud en estructura primaria, pero comparten similitudes en estructura terciaria. Estudios estructurales en lectinas de animales sugieren que la unión a carbohidratos por parte de las lectinas está limitada por una secuencia de aminoácidos conocida como el Dominio de Reconocimiento de Carbohidratos (DRC). El DRC reconoce el extremo no reductor del carbohidrato de las glicoproteínas y glicolípidos de la membrana celular y tiene la capacidad de discriminar entre diferentes anómeros [6,7].

2.2.1. Especificidad de las lectinas

Las interacciones proteína carbohidrato son la base de numerosos procesos biológicos tanto normales como patológicos. Ellos incluyen la síntesis enzimática y degradación de oligo y polisacáridos, clasificación de glicoconjugados transporte de carbohidratos en las células vivas y de sus derivados en organelos subcelulares, la respuesta inmunológica a los antígenos de carbohidrato, y la migración de leucocitos a los sitios de inflamación. Estas interacciones también juegan un papel clave en una variedad de fenómenos de adhesión celular, entre ellos la fijación de parásitos, hongos, bacterias y virus a las células huésped, el primer paso en la iniciación de la infección. La alta selectividad requerida para esta unión, así como la unión de una variedad de toxinas microbianas a las células, es proporcionada por un ajuste estereoquímico específico entre moléculas complementarias, uno un portador de información biológica (tales como carbohidratos complejos) y el otro capaz de decodificar dicha información (proteínas que unen carbohidratos como las lectinas) [9].

El estudio de las interacciones con los carbohidratos es importante para establecer el papel de los carbohidratos de la superficie celular que son esenciales para muchos eventos que suceden en cascada en las paredes celulares. Las lectinas se unen a carbohidratos con bajas afinidades que van de concentraciones molares a milimolares, incluso cuando tienen altas especificidades. La naturaleza supera las barreras de las afinidades de unión débil con la llamada multivalencia, en la que los parches de azúcares mejoran las afinidades de unión de la lectina de manera exponencial, haciendo que dichas interacciones sean fisiológicamente relevantes [10].

La selectividad en la interacción lectina-carbohidrato tiene lugar por la interacción estereoquímica y específica entre moléculas complementarias. Las lectinas se unen a sus ligandos principalmente por enlaces de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas, aunque pueden ocurrir interacciones iónicas y de coordinación con iones metálicos como el calcio, algo muy observado en lectinas calcio dependientes donde la interacción con el azúcar no es directa sino por medio de un ión Ca^{2+} . También se ha observado la interacción por medio de apilamiento de anillos y las interacciones catión- π . Los puentes de hidrógeno son los responsables de la especificidad de la interacción, estos tienen lugar entre los grupos hidroxilo del carbohidrato y la cadena lateral de aminoácidos, siendo los más comunes la asparagina, glutamina, arginina, serina y los ácidos glutámico y aspártico. El hidroxilo del carbohidrato puede fungir como donador y aceptor de electrones ya que tiene pares de electrones desapareados. Cuando actúa como donador de electrones tiene la ventaja de tener libertad de rotación sobre el ángulo formado por el C-OH permitiendo una mejor interacción con el grupo aceptor de electrones dándole a la lectina la especificidad [9,11-13]. Se ha observado que la afinidad se incrementa dramáticamente cuando la proteína se oligomeriza exponiendo un mayor número de sitios de unión. La geometría de dichos oligómeros ayuda a establecer la capacidad de las lectinas de distinguir arreglos superficiales de polisacáridos en algunos casos y para entrecruzar glicoconjugados en otros [11].

2.2.2. Clasificación de las lectinas de animales con base en las secuencias de los DRC

Debido a la gran diversidad de las lectinas, éstas se han clasificado de varias formas, ya sea de acuerdo a su fuente de origen, estructura, en el número de DRC, afinidad a ciertos carbohidratos y requerimiento a iones divalente y recientemente de acuerdo a la homología de la secuencia de los DRC. Para los fines del presente estudio, nos centraremos en esta última clasificación y enfocándonos únicamente en las lectinas de origen animal.

En las últimas décadas, el interés por las lectinas animales se ha incrementado en gran medida después de determinar que actúan como mediadores de reconocimiento celular en sistemas biológicos. Se han identificado actividades de lectinas con especificidades por mono o oligosacáridos (fucosa, galactosa, manosa, N-aceilglucosamina, N-acetilgalactosamina, ácido N-acetilneuramínico y heparina). La mayoría de ellos muestran especificidad celular y regulación del desarrollo. Algunas de ellas están implicadas en señalización de eventos intracelulares (lectinas nucleares) o en la superficie celular. En 1988 se pensaba que pertenecían a una o dos familias estructurales primarias, las lectinas tipo C y tipo S (actualmente conocidas como galectinas). Sin embargo, ahora está claro que la actividad de lectina animales se encuentra en asociación con una asombrosa diversidad de estructuras primarias. Se sabe que existen, al menos 15 familias estructurales, en la actualidad (Tabla 1) [14]. Descritas en el servidor de lectinas animales desarrollado por Drickamer [15]

Tabla 1. Clasificación y generalidades de las familias de lectinas animales [14].

Familia	Ligando típico	Localización en la célula	Funciones
Calnexina y calreticulina	Glc ₁ Man ₉	Retículo Endoplásmico	Elección de proteínas y chaperonas
Lectinas tipo-M relacionadas con las α-manosidasas	Man ₈	Retículo Endoplásmico	Asociadas a la degradación de glicoproteínas
Lectinas tipo-L (pentraxinas)	Varios	Retículo Endoplásmico, Golgi	Elección de proteínas
Lectinas tipo-P	Man6-fosfato, receptores de fosfomanosil	Vía secretora	Elección de proteínas post-Golgi, Transporte de glicoproteínas, marcado de enzimas.
Lectinas tipo-C (colectinas, selectinas, otros)	Manósidos, galactósidos, ácido siálico, otros	Membrana celular y extracelular	Adhesión celular (selectina), eliminación de glicoproteínas, sistema de defensa innato (colectina)
Lectinas tipo S (Galectinas)	β-Galactocidos	Citoplasma y extracelular	Entrecruzamiento de azúcares en la matriz extracelular.
Lectinas tipo-I (Siglec-1,-2,-3 otros)	Ácido siálico y otros glicosamino glicanos	Membrana celular	Adhesión celular.
Lectinas tipo-R (receptor de manosa de macrófagos, discoidinas)	Varios	Golgi, membrana celular.	Blanco de enzimas, regulador de hormonas glicoproteicas.
Lectinas F-box (Fbs1, Fbs2, Fbg3, otras)	GlcNAc ₂	Citoplasma	Degradación de proteínas mal plegadas.
Lectinas tipo fibrinógeno (Ficolinas, taquilectinas 5 ^a y 5B)	GlcNAc, GalNAc	Membrana celular y extracelular	Respuesta inmune innata.
Lectinas tipo Quitinasa (CHI3L1, CI3L4, Ym1, Ym2)	Quito-oligosacáridos	Extracelular	Metabolismo de Colágeno.
Lectinas tipo-F (Aglutininas Eel, fuclectinas)	Oligosacáridos con Fucosa terminal	Extracelular	Respuesta inmune innata.
Intelectinas (Lectina endotelial HL-1, Eglyctina)	Gal, galactofuranosas pentosas	Membrana celular y extracelular	Respuesta inmune innata, Fertilización y embriogénesis.
Anexinas (Anexina IV,V,VI)	Glicosaminoglicanos, heparina y heparan sulfato)	Membrana celular	Adesión celular, formación de vesículas secretoras apicales

Para fines de este trabajo, se describirán más a detalle algunas familias de estas lectinas.

Lectinas Tipo C

Las lectinas Tipo-C generalmente se localizan en la membrana celular y extracelularmente. Éstas requieren la presencia del ion divalente Calcio para el reconocimiento del azúcar porque estabiliza su estructura mediante la formación de enlaces coordinados con la superficie de la proteína y el grupo hidroxilo clave para el reconocimiento del azúcar. El DRC de estas lectinas está caracterizado estructuralmente por dos hélices alfa y dos hojas beta antiparalelas, con varios giros; en uno de ellos, se encuentra el sitio de unión del carbohidrato, así como los dos sitios de coordinación del Calcio, pequeñas variaciones en esta región darán como resultado diferencias en la especificidad de la lectina.

Los residuos de aminoácidos presentes en el DRC de las lectinas Tipo C, tienen la capacidad de formar puentes de hidrógeno con los grupos hidroxilo del azúcar, dando mayor estabilidad y fuerza a la interacción, por lo que entre mayor sea el número de estos residuos así como la extensión del sitio de unión, la afinidad hacia el azúcar será mayor y tendrá la capacidad de reconocer oligosacáridos de mayor tamaño [15, 6].

Lectinas Tipo F

Esta familia de lectinas extracelulares, forman parte del sistema de defensa innato. Se han reportado principalmente en el hemolinfa de invertebrados, como el cangrejo japonés *Tachypleus tridentatus*. Se ha observado que esta lectina tiende a unir residuos de fucosa terminales, algunas mediante un dominio de unión Tipo C por lo que el reconocimiento de la fucosa es dependiente de calcio y la presencia de un residuo de histidina, sin embargo, existen otras como la lectina del erizo de mar *Strongylocentrotus purpuratus*, posee dominios de tipo F sin histidina pero con diversas cisteínas [15,6].

Lectinas Tipo R

Las lectinas tipo R están presentes tanto en procariontes como en eucariontes, la proteína modelo de este grupo es la ricina, que fue la primer lectina reportada. Esta posee dos subunidades: la subunidad A lleva a cabo actividades citotóxicas al

remover un fragmento de RNA ribosomal inhibiendo, así, la síntesis de proteínas. Por otro lado, la subunidad B, que consiste en el DRC el cual está formado por una estructura de trébol beta con tres dominios: α , β y γ [6,8]. Este se caracteriza por la presencia de varios residuos aromáticos en uno o dos dominios, los cuales interaccionan con la forma cíclica del ligando, en su mayoría manosa y en menor frecuencia galactosa, mientras que los residuos hidrofílicos forman puentes hidrógeno con los grupos hidroxilo de los carbohidratos. En algunos casos se ha observado que en cada dominio existe un DRC, aumentando la probabilidad de la formación de interacciones múltiples con un solo glicano o con un azúcar de mayor tamaño [15, 6]

Lectinas Tipo I

Estas lectinas forman parte de la familia de las inmunoglobulinas al poseer un DRC similar a éstas, el cual está formado por dos hojas- β unidas covalentemente por un puente disulfuro. Se encuentran ampliamente distribuidas en virus, bacterias y organismos multicelulares. Las lectinas Tipo I se caracterizan por ser proteínas transmembranales y por reconocer el ácido siálico y sus derivados [15,6,16].

Galectinas

Es una familia de lectinas altamente conservada y distribuida principalmente en invertebrados marinos, que se caracteriza por su afinidad a los β -galactósidos. Las galectinas participan en procesos del desarrollo, adhesión celular, regulación del sistema inmune tanto adaptativo en el caso de vertebrados como innato en el caso de invertebrados.

Recientemente, se han identificado secuencias de galectinas de bivalvos y gasterópodos, las cuales se ha observado están menos diversificadas que las de los vertebrados, ya que sólo se han encontrado como máximo cuatro diferentes galectinas en la mayoría de las especies de moluscos marinos, mientras que en mamíferos se han reportado más de doce. También se ha visto, que la expresión de las galectinas está regulada por procesos infecciosos, lo cual nos habla de su importancia en la respuesta inmune y, por ende, que sea una proteína conservada.

Las galectinas de moluscos marinos, se han clasificado en dos grupos, dependiendo del número de DRC's: Las galectinas tipo 2-DRC y las 4-DRC. Las primeras, se caracterizan por tener una secuencia entre 280-300 aminoácidos de un peso molecular de 32 kDa, con dos DRC's similares pero no idénticos unidos por un péptido de entre 10 y 15 aminoácidos. Mientras que la galectina tipo 4-DRC, se caracteriza por tener una secuencia entre 560 residuos de aminoácidos y un peso molecular de 64 kDa, cuyos DRC's, son similares y la secuencia de aminoácidos que lo une tiene una longitud aproximada de 17 residuos.

El análisis filogenético de las secuencias de 2-DRC de galectinas de bivalvos y gasterópodos, mostró que forman dos cladas monofiléticas y resulta interesante observar que la divergencia de ambas galectinas concuerda con la divergencia de los *taxa* de bivalvos y gasterópodos [15,6,17,18].

2.3. Funciones de las lectinas animales.

Mientras que las lectinas animales, sin duda cumplen una variedad de funciones, muchas podrían considerarse en términos generales como moléculas de reconocimiento dentro del sistema inmunológico. Más específicamente, las lectinas han sido implicados en la primera línea de defensa contra patógenos, en el traslado de glicoconjugados en la célula, como chaperonas durante la síntesis de glicoproteínas, mediación de endocitos, regulación del crecimiento celular, como puente extracelular, interacciones célula-célula, acción antiinflamatoria, compactación de desechos celulares, pueden activar la respuesta inmune antiviral, pero también pueden ayudar a la entrada de los virus en la membrana celular [19].

2.4. Aplicaciones biotecnológicas de las lectinas

Las lectinas pueden tener diversas aplicaciones, tanto en la industria farmacéutica como en la de alimentos.

Se pueden utilizar para [20-23]:

- Purificar y caracterizar glicoproteínas
- Identificación y separación de células

- Para la investigación de carbohidratos en células, organelos subcelulares, en histoquímica y citoquímica
- Mapeo de rutas neuronales
- Estimulación mitogénica de linfocitos
- Purgado de la médula ósea durante los trasplantes
- Estudios de biosíntesis de glicoproteínas.
- Son utilizadas como marcadores de membrana para la caracterización de células sanas y cancerígenas de diversos tipos porque son capaces de discernir entre sutiles diferencias entre los patrones de carbohidratos de membrana de las mismas. Por lo tanto, pueden dar un diagnóstico certero de cáncer.
- Para terapias dirigidas contra células cancerígenas porque es posible acoplar un fármaco para una terapia, además de que poseen actividad antitumoral y promueven la mitosis de células sanas.
- Algunas lectinas, poseen actividad antimicrobiana, porque al reconocer los carbohidratos de membrana aglutinan las células de microorganismos.
- Específicamente las lectinas de invertebrados marinos, por su actividad antimicrobiana, pueden ser utilizadas para la prevención y tratamiento de enfermedades relacionadas con la producción de cultivos acuícolas de importancia comercial como el camarón.
- Es posible aprovechar la selectividad de ciertas lectinas para aplicaciones biotecnológicas y bioquímicas para el diseño de columnas de cromatografía de afinidad para la purificación de glicoconjugados.

2.5. Aspectos biológicos de *Aplysia californica*

A. californica también conocida como liebre de mar es un molusco que pertenece a la clase *Gastropoda*, orden *Anaspidea* y familia *Aplysiidae*; puede crecer hasta 40 cm y pesar 2.3 kg, sin embargo el promedio oscila alrededor de 20 cm y 1 kg. Este molusco, no posee concha externa pero posee una interna que protege órganos vitales como el corazón; habita en zonas intermareales y sublitorales entre las costas del pacífico que abarcan las regiones bentónicas del norte del estado de California,

USA y la península de Baja California, México. Posee pigmentos que van de café a morado, dependiendo del alga de que se alimente, como mecanismo de defensa químico excreta tinta color púrpura, la cual posee diversos compuestos para su protección, entre ellos lectinas. Este organismo se alimenta principalmente de algas verdes y rojas, muchos de los metabolitos secundarios que las algas contienen, son acumulados por *Aplysia* para ser utilizados como mecanismo de defensa química, gasta la mayoría del tiempo alimentándose, consume aproximadamente un tercio de su peso corporal al día, generando una velocidad de crecimiento acelerada. Por ende, se puede localizar fácilmente entre los campos de algas y pastos marinos, donde también, puede esconderse de sus principales depredadores, como focas, pulpos y anguilas, entre otros [24-27].

A. californica (Figura 1), son hermafroditas, al reproducirse un individuo actúa como el donador de esperma y una sola hembra puede poner alrededor de 478 millones de huevos en 27 ovoposiciones en un periodo de un mes, posteriormente, acomoda los huevos en forma de cordones y los fija al sustrato. La fertilización de los mismos puede llevarse a cabo en cuestión de horas, o bien, hasta 15 días después, por lo que resulta de gran importancia que los huevos tengan un mecanismo de defensa adecuado para seguir siendo viables, estos mecanismos, los brinda la madre por medio de una mucosa que secreta al poner los huevos, siendo vital para el éxito de la descendencia [24]. Se han reportado la presencia de lectinas tanto en las gónadas, mucosa y los huevos de otras especies del género *Aplysia*, entre ellos de *Aplysia depilans*, *kurodai* y *dactyломela* [28-30].

El primer molusco al que se le secuenció el genoma fue a *A. californica* [31], esto es particularmente importante porque se trata de un molusco modelo que puede ayudar a estudiar la evolución de invertebrados, desarrollo, poliploidía y toxicidad. Sin embargo, para lo que se ha utilizado más es para estudios neurológicos debido a que posee el sistema nervioso más primitivo, con pocas neuronas (sólo 20000 en vez de las 10^{12} que tienen los mamíferos). Además, dichas neuronas son muy grandes desde 0.1-1 mm de diámetro lo que las convierte en las células somáticas más grandes del reino animal; sólo los huevos son más grandes. Las neuronas de *Aplysia* son tan grandes que las estructuras subcelulares se pueden disectar

fácilmente, el ADN y los anticuerpos pueden ser fácilmente inyectados en ellas. Además se han utilizado para el estudio del aprendizaje y la memoria [31-33].



Figura 1. Liebre marina, *Aplysia californica*.

3.0 ANTECEDENTES

3.1. Lectinas en invertebrados marinos

Los invertebrados, no poseen un sistema inmune adaptativo, es decir, que tenga la capacidad de generar inmunoglobulinas específicas contra diversos patógenos. Por lo que diversos crustáceos y moluscos, reconocen Patrones Moleculares Asociados a Patógenos (PAMPs) que, generalmente, son peptidoglicanos mediante Receptores de Patrones de Reconocimiento altamente conservados entre las especies, entre los cuales se destacan las lectinas, que inactivan a las células microbianas mediante aglutinación de las mismas y posiblemente por cambios de hidrofobicidad de la membrana celular al interaccionar con las lectinas [34-36].

En invertebrados marinos se han reportado a la fecha lectinas de las familias: tipo C, L, P, Calnexina, Intelectinas, galectinas y tipo R, así como las lectinas aisladas del cangrejo *Tachypleus tridentatus* las cuales están involucradas en los procesos de coagulación del hemolinfa como mecanismo de defensa [37]. De estas lectinas, las más comunes son las tipo C [38]. A la fecha se han aislado un gran

número de lectinas de otros invertebrados marinos, de las cuales no se ha caracterizado su secuencia o su estructura terciaria, sin embargo se han reportado sus especificidades, tal es el caso de la lectina de *Octopus maya*, una lectina oligomérica de 66 kDa, para la cual se reportó especificidad por galactosamina sin dependencia por cationes divalentes [39].

Específicamente en invertebrados marinos, las lectinas juegan un papel importante en la respuesta innata reconociendo y uniendo de forma específica diferentes carbohidratos que están presentes en las membranas de patógenos a través de sus dominios de reconocimiento a carbohidratos, una característica particular es la capacidad de formar oligómeros, como la lectina del crustáceo *Macrobrachium rosenbergii*, la cual se determinó que es un homodímero de 19 kDa, tiene especificidad por ácido sialico, la presencia de cationes divalentes es esencial para que lleve a cabo su actividad aglutinante y en presencia de agentes reductores como ditioetritol pierde por completo su actividad, lo que sugiere que el oligómero es estabilizado por puentes disulfuro para llevar a cabo su actividad aglutinante [40], también se encontró que tiene la capacidad de aglutinar bacterias como *Aeromonas sp.* a una concentración de 0.1 µg/mL de proteína por cada 2×10^5 células [41].

Los mecanismos de oligomerización de estas proteínas pueden estar mediados por diversas interacciones como puentes disulfuro, interacciones electrostáticas e interacciones hidrofóbicas, las cuales favorecen la unión de más sitios de reconocimiento a carbohidratos facilitando la interacción con los azúcares de las membranas de los patógenos al contar con más sitios de unión disponibles [42], muchos de estos mecanismos también involucran cambios conformacionales en donde se exponen regiones hidrofóbicas que permiten la formación de oligómeros, como es el caso de la lectina CEL-III del pepino de mar *Cucumaria echinata* [43], la cual mediante un mecanismo de oligomerización desencadenado por el reconocimiento a su respectivo ligando (N-acetilgalactosamina). Una vez que Cel-III reconoce su ligando a través de sus dominios de reconocimiento a carbohidrato (ambos de tipo ricina) un tercer dominio, llamado dominio de oligomerización, sufre un cambio conformacional que ocasiona la exposición de residuos hidrofóbicos al

desplegar por completo las hélices que lo conformaban, formando interacciones beta-beta con las hélices desplegadas de los demás monómeros que se encuentran también reconociendo azúcares en la membrana, lo que permite la formación de un poro constituido por siete subunidades y de esta forma permitiéndole penetrar la bicapa lipídica de las membranas de los patógenos produciendo hemólisis [44]. Este mecanismo de oligomerización se corroboró mediante experimentos de microscopia confocal de fluorescencia en glicoliposomas y eritrocitos de conejo donde se demostró que la oligomerización estaba mediada por el reconocimiento de su ligando [45-47].

También se han aislado dos lectinas de los organismos *Mytilus galloprovincialis* y *Crenomytilus grayanus* con masas de 17 y 18 kDa, respectivamente, con la capacidad de aglutinar eritrocitos de todos los tipos sanguíneos humanos y que debido a su especificidad por N-acetilgalactosamina y galactosa las ubicaría dentro de la familia de las galectinas, sin embargo el análisis de la secuencia no mostró identidad con galectinas o alguna lectina reportada con anterioridad en invertebrados y vertebrados. Se generó un modelo estructural a partir de la secuencia de aminoácidos y se encontró que posee un plegamiento similar al de la ricina, también se evaluó la capacidad antimicrobiana de esta lectina [38,48], ya que se reportó con anterioridad que posee la capacidad de inhibir el crecimiento de bacterias gram-positivas y gram-negativas lo que ubica a estas lectinas como miembros de una nueva familia de lectinas, las cuales poseen en su secuencia de aminoácidos tres repeticiones de péptidos de 6.14 kDa, lo que sugiere que esta simetría en su secuencia provenga de un péptido ancestral común.

En vertebrados sin mandíbula como *Lamprea japónica*, se identificó y aisló de su suero, una lectina perteneciente a la familia de las intelectinas, con una secuencia de 334 aminoácidos, que además presenta homología con otras intelectinas de mamíferos y organismos marinos, esta lectina tiene la capacidad de oligomerizarse y formar tetrámeros, mecanismo que permite aglutinar bacterias gram-positivas, bacterias gram-negativas y hongos, lo que sugiere, que esta lectina, juega un papel importante en la defensa contra patógenos del sistema de circulación de la lamprea.

Mediante experimentos de interacción, se encontró que esta intelectina era inhibida competitivamente por la proteína G, en presencia de inmunoglobulinas, indicando que la región Fc de la Ig y la intelectina, se unen a la proteína G en el mismo sitio. Esto sugiere que la estructura terciaria de ambas proteínas, es similar; aún más importante, es resaltar que en estos organismos carentes de un sistema de defensa adaptativo, participan moléculas como esta intelectina, capaz de llevar a cabo funciones similares a las de las inmunoglobulinas [49].

Lectinas en moluscos

El phylum *mollusca* es uno de los más grandes e importantes del reino animal, hay cerca de 200,000 especies distribuidas en medios terrestres, de agua dulce y ambientes marinos [50]. Estos organismos carecen de un sistema inmune adaptativo, sin embargo tienen estrategias muy sofisticadas y únicas en su inmunidad innata para defenderse de una gran variedad de patógenos [51]. La primera lectina que se identificó en los moluscos tenía una especificidad por ácido sialico y se obtuvo de la babosa *Limax flavus* [52] y desde entonces, un gran número de lectinas se han aislado, siendo las tipo C las más estudiadas [53], seguidas de las galectinas que son de suma importancia por estar involucradas en la respuesta inmune de estos organismos [17, 18].

Algunos ejemplos de familias de lectinas identificadas en moluscos son:

Lectinas Tipo C en el pepino de mar *Apostichopus japonicus* y la ostra *Crassostrea gigas*, las cuales actúan como Receptores de Patrones de Reconocimiento asociados en la respuesta inmune de estos organismos [54,55]. Específicamente, la lectina del pepino de mar, presenta actividad antimicrobiana contra organismos Gram negativos entre ellos *Listonella anguillarum*, *Escherichia coli* y Gram positivo *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus* [54]. También la lectina del abulón *Haliotis discus hannai* presenta actividad antimicrobiana contra patógenos como: *Edwardsiella tarda*, *Vibrio/Listonella anguillarum* C312, y *Streptococcus iniae* [13]. Lectinas tipo I en la almeja de Manila (*Venerupis philippinarum*), la cual está involucrada en las interacciones célula –célula además de la regulación de funciones celulares en el sistema de defensa innato del

organismo [56, 16]. Se han reportado lectinas afines a N-acetilgalactosamina, en el caracol terrestre *Helix pomatia*, la cual es transferida de la madre a los huevos durante el desarrollo de los mismos como mecanismo de defensa ante microorganismos. Se ha visto que en otras especies de caracoles como *Biomphalaria glabrata*, el caracol marino *pomacea scalaris* y en *Aplysia kurodai* poseen lectinas tipo- C y afines a galactosa respectivamente, con la misma función [15,30].

2.5. Lectinas en moluscos del género *Aplysia*

Desde 1980, diversos investigadores han reportado la presencia de lectinas o bien, aglutininas en algunas especies del género *Aplysia*, sin embargo, el papel que éstas juegan biológicamente, no se ha logrado comprender del todo.

Algunos estudios realizados con *Aplysia depilans*, describen la presencia de una lectina afín a galactosa, presente tanto en las gónadas, como en los huevos de este organismo, cuya concentración aumenta conforme aumenta su edad, lo cual se relaciona con la madurez del sistema inmune del animal [28].

También, se ha reportado la presencia de lectinas, no sólo con actividad hemaglutinante sino antimicrobiana tanto en el hemolinfa, manto y tinta de *A. Dactylorella*, *kurodai*, *californica* entre otras [29-30].

Durante 2010, en el laboratorio de Biomacromoléculas del Instituto de Química, UNAM, se realizaron experimentos con una lectina de *Aplysia californica* afín a D (+) Galactosa, α -Lactosa, Trehalosa, L-manosa, D(+) Rafinosa, Ácido D-galacturónico, entre otros carbohidratos. La cual se purificó con una resina de afinidad de p-Aminobenzil-1-tio -D-galactopiranosido, en amortiguador de fosfatos 50 mM, utilizando un perfil de pH ácido (7.4, 4 y 2), sin embargo, la lectina presentó una gran tendencia a agregarse bajo las condiciones del experimento [5] y, por el pH utilizado para su obtención, es posible que la proteína se desnaturalizara.

Con el fin de estudiar más a fondo los mecanismos que lleva a cabo la lectina, así como su función biológica, es necesario optimizar la técnica de purificación de la lectina, así como encontrar las condiciones ideales de trabajo para mantenerla activa y estable.

4.0 HIPÓTESIS

Las características estructurales de la lectina de *Aplysia californica*, favorecen la oligomerización de la misma, dando como resultado variaciones en su actividad y estabilidad.

5.0 OBJETIVO GENERAL

Caracterizar estructural y funcionalmente a una lectina del organismo marino *Aplysia californica*.

5.1. Objetivos específicos

- 1) Optimizar la técnica de purificación de una lectina del molusco marino *Aplysia californica*.
- 2) Con la lectina pura determinar:
 - Las condiciones ideales para mantener estable y activa a la proteína
 - La especificidad de la lectina
 - La secuencia
- 3) Obtener un modelo estructural con base en la secuencia de la lectina y analizar las posibles causas de su baja estabilidad.

6.0 DISEÑO EXPERIMENTAL

6.1. Organismo de estudio

En el presente estudio se utilizaron organismos adultos de entre 10-15 cm de longitud del molusco *Aplysia californica* colectados en Ensenada, Baja California, México. Dichos organismos se transportaron vivos hasta el instituto de Química, UNAM donde se congelaron a -55 °C hasta su uso.

6.2. Obtención de extracto

Para evitar la desnaturalización de la lectina, todos los pasos de purificación se realizaron a 4°C. El organismo completo de *A. californica* se homogeneizó en un amortiguador de fosfatos 50 mM pH 7.4, 150 mM NaCl y 1.5 mM PMSF. El extracto obtenido se centrifugó a 30,000 x g por 30 minutos a 4°C, en una centrifuga Beckman Rotor JA-14. El sobrenadante fue conservado a 4°C para su posterior purificación.

6.3. Determinación de la actividad de la lectina

La mayoría de las lectinas son di o polivalentes, lo que permite que al reconocer a su ligando en la pared celular de los eritrocitos, se formen complejos de entrecruzamientos que se observa al aglutinar este tipo de células [57]. Aprovechando esta característica, la actividad de la lectina de *A. californica* se determinará mediante pruebas de hemaglutinación de eritrocitos de conejo formalinizados.

6.3.1. Formalización de eritrocitos de conejo

Para sensibilizar y hacer más resistentes a los eritrocitos de conejo que se utilizaron en las pruebas de actividad, estos se formalizaron siguiendo el protocolo reportado por Fragkiadakis [57]. Se colectó sangre de conejo en una solución de NaCl 0.9% y se centrifugó a 3,000 x g por 20 min. Se realizaron varios lavados con la solución de NaCl hasta obtener un sobrenadante transparente.

Los eritrocitos se suspendieron en un amortiguador de fosfatos 50 mM pH 7.4, 150mM NaCl (AF) para obtener una solución 20 % v/v. Por cada 100 mL de esta solución de eritrocitos, se prepararon 25 mL de formalina (Formaldehido 37 %) a pH

5.0 usando un amortiguador de fosfatos 0.7 M, pH 7.0. Esta solución fue colocada en una bolsa de diálisis con tamaño de corte de 12.5 kDa. La bolsa se sumergió en los eritrocitos y se dejó interaccionar por 12 h a 4°C con agitación suave. Posteriormente, la bolsa se perforó y se liberó el formol restante dejando interaccionar la solución de formaldehído por 36 h más a 4°C con agitación suave.

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

6.3.2. Pruebas de actividad hemaglutinante

Para este ensayo, se utilizó una placa de 96 micropozos con fondo de “U”. Se colocaron 50 µL de amortiguador AF, en cada pozo de una hilera de la placa. En el primer pozo se adicionó 50 µL de la muestra, se mezcló con el amortiguador y se tomaron 50 microlitros y se pasaron al segundo pozo haciendo los mismo hasta llegar al último pozo (dilución seriada 1:2). Posteriormente, a cada pozo se le adicionaron 50 µL de la solución de eritrocitos formalinizados al 2 % y se incubó la placa a 37°C sin agitación por 1 h. Al mismo tiempo se corrió un control positivo adicionando una lectina comercial en lugar de la muestra y que se sabe aglutina eritrocitos y un control negativo en donde se adicionó el amortiguador de fosfatos en lugar de la muestra (Figura 3).

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

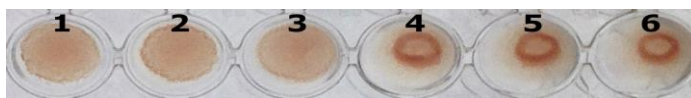


Figura 2. Actividad hemaglutinante Utilizando eritrocitos de conejo formalinizados. Pozo 1 a 3: Control positivo lectina comercial. Pozo 4 a 6: control negativo.

6.4. Purificación

La lectina de *A. californica* se purificó utilizando una cromatografía de afinidad en columna. La resina utilizada fue de *p*-aminobenzil-1-tio-D-galactopiranosido. Esta resina se seleccionó con base en los resultados obtenidos por Guinea-Ramírez [5].

La columna se equilibró con 20 volúmenes de amortiguador AF. Posteriormente se recircularon 50 mL del extracto en un flujo continuo por 12 h., con el fin de permitir la interacción de la lectina con la resina y se logre la unión de la mayor cantidad posible. Después, se lavó la columna con amortiguador AF con 0.5 M de NaCl, esto con el fin de eliminar todas las proteínas que no reconozcan a la resina. Para eluir a la proteína unida a la resina se utilizó el mismo amortiguador de fosfatos con 200 mM de D (+) galactosa colectando fracciones de 2.0 mL. Dichas fracciones se dializaron exhaustivamente utilizando una membrana con tamaño de corte de 3500 Da para eliminar la galactosa y poder medirle la actividad hemaglutinante

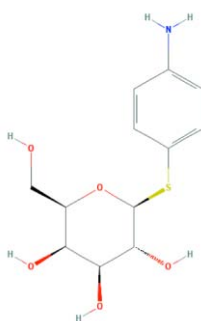


Figura 3. Estructura del azúcar unido a la agarosa (resina de afinidad de *p*-aminobenzil-1-tio -D-galactopiranosido) con la que se purificó a la lectina de *A. californica*.

6.5. Cuantificación de proteína

La concentración de proteína total se determinó utilizando el kit BCA Thermoscientific basado en el método de Smith y Krohn [58]. Este reactivo es muy sensible en la determinación espectrofotométrica de la concentración de proteína en soluciones acuosas. Este sistema de reactivos combina la reacción de proteínas con Cu^{+2} en un medio alcalino (produciendo Cu^{+1}), con un reactivo altamente selectivo y sensible de detección para Cu^{+1} llamado ácido bicinconínico. El color púrpura del producto de la reacción es formado por la interacción de dos moléculas de BCA con un ion cuproso (Cu^{+1}), este es soluble en agua y exhibe una fuerte absorbancia a 562 nm.

La cantidad de proteína contenida en la muestra se determinó interpolando el dato de absorbancia en una curva de calibración elaborada con estándares de albúmina de bovino a diferentes concentraciones.

6.5.1. Curva de calibración

Para el análisis de las muestras y la construcción de la curva de calibración, se siguió el protocolo de PIERCE, reduciendo los volúmenes a la mitad.

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

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

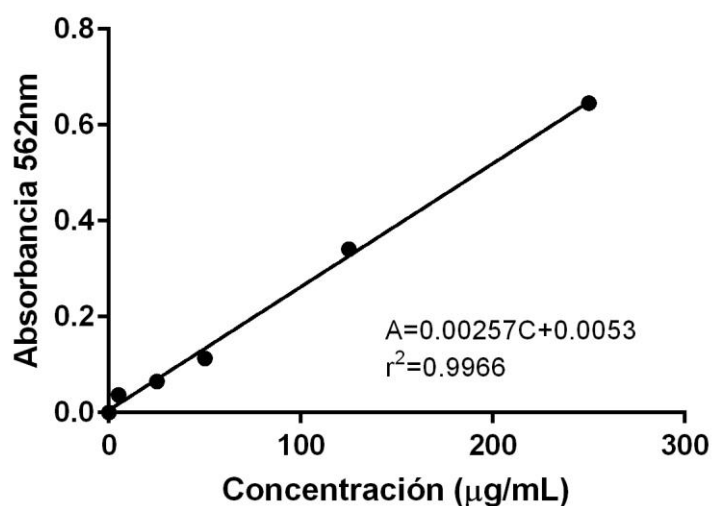


Figura 4. Curva de calibración de proteína utilizando el método de BCA a 60 °C y albúmina de suero de bovino como estándar.

6.6. Electroforesis SDS-PAGE

La electroforesis es un método que se fundamenta en la separación de proteínas sobre un gel poroso, con base en su carga y masa moleculares, ante la aplicación de una corriente eléctrica. Dicha separación se realizó utilizando geles de poliacrilamida al 12% en condiciones desnaturizantes por la presencia del detergente dodecil sulfato de sodio (SDS). Para ello 6 µg de la lectina se desnaturizaron y redujeron al colocar a cada una de estas muestras a ebullición por 30 min en presencia de una solución amortiguadora 2X (glicerol 20 mL, 2-mercaptoetanol 10 mL, SDS 5 g, tris base 1.51 g, azul de bromofenol 0.01 g y agua para aforar a 100 mL). La separación se realizó utilizando una corriente constante de 90 V por 30 min y después una hora a 120 V en amortiguador de electroforesis 1X (Tris base 3.025 g, 30.25 g, glicina 14.4 g, 144 g, SDS 1.0 g, aforado a 1L con agua destilada, para tener un amortiguador de electroforesis 10X), en un sistema electroforético de BioRad® (Mini-PROTEAN®TGXTM) [59]. Como referencia de migración se utilizó el marcador de masa molecular de 200 kDa a 6.5 kDa (SDS-PAGE Molecular weight Standards BioRad®, Broad Range No. 161-0317).

6.6.1. Tinción con nitrato de plata

La tinción con nitrato de plata, es una técnica utilizada para la visualización de las proteínas en geles de poliacrilamida; proceso que se fundamenta en la reducción del ion plata a su forma metálica, uniéndose con los grupos amino de las proteínas particularmente con el amino- ϵ de la lisina [60] y con los sulfuros de las cisteínas y metioninas [61]; es muy utilizado por su elevada sensibilidad, de 10 a 50 veces más que el azul de Coomasie R-250 [62].

La realización de la tinción de plata para observar las bandas de proteína en el gel se inició con la colocación del gel en 25 mL de solución fijadora durante 1h (40 % etanol, 10 % ácido acético y agua destilada). Transcurrido el tiempo se retiró la solución fijadora y se añadieron 25 mL de solución incubadora (30 % etanol, 4.1 % acetato de sodio anhidro, 0.2 % tiosulfato de sodio pentahidratado, 0.5 % glutaraldehído y agua destilada) en donde se dejó por 30 min como mínimo y 12 h máximo. Al finalizar el tiempo se lavó el gel con 5 recambios con 50 mL de agua destilada con agitación suave, durante 3 min. cada uno. Se eliminó el agua destilada para aplicar 25 mL de solución de nitrato de plata (0.1% nitrato de plata, 20 % etanol, 0.027 % formaldehído y agua destilada) por un periodo de 20 min; finalizado el tiempo se lavó el gel con H₂O destilada y se secó perfectamente con papel sin tocar el gel, esto para retirar el exceso de plata que pudiese haber quedado. Luego se aplicó la solución reveladora, 25 mL, (2.5 % carbonato de sodio, 20 % etanol, 0.037 % formaldehído y agua destilada). Una vez que aparecieron las bandas de proteína con una intensidad adecuada, se detuvo la reacción con la solución de frenado (1.86 % EDTA, 20 % etanol y agua destilada) [63].

6.7. Determinación de la estabilidad de la lectina

Debido a que se observó una fuerte tendencia a oligomerizar por parte de la lectina de *A. californica* y que este proceso llevaba a la pérdida de actividad de la proteína, se realizaron estudios de estabilidad utilizando la técnica de Fluorimetría Diferencial de Barrido (FDB). Esta técnica se basa en exponer a la macromolécula a un incremento en temperatura en un intervalo que puede ir de 5 a 95°C, en presencia de un marcador fluorescente como el SYPRO® Orange y de un agente del cual se

desea evaluar su efecto sobre la estabilidad de la proteína. La macromolécula al ser expuesta al gradiente de temperatura tiende a desplegarse haciendo que las regiones hidrofóbicas se espongan y puedan interactuar con el agente fluorescente que al unirse a estas regiones, presenta una máxima emisión a 570nm [64].

Para el análisis se llevó a la lectina a una concentración de 0.15 mg/mL y se le adicionó 1µL de SYPRO® Orange para tener una dilución final de 1:1000. Posteriormente se colocaron 10 µL de la proteína en cada pozo de la placa de reacción MicroAmp Fast de Applied Biosystems® y se añadieron 10 µL de cada una de las soluciones de los kits de a) Solubilidad-estabilidad, b) Aditivos y c) pH y sales amortiguadoras a probar. Los tres kits se adquirieron de Hampton Research® y cada uno de ellos consta de 96 soluciones. Posteriormente se cubrió la placa con adhesivos ópticos de Applied Biosystems® y se centrifugaron por 2 min. a 300 rpm a 25°C y se procedió a someter las muestras a un gradiente de temperatura que inició con la exposición a 25°C por 2 min, seguido de un incremento del 1% la temperatura en forma continua hasta llegar a 98°C permaneciendo en dicha temperatura por 15 s; para esto se utilizó un equipo Real-Time PCR System StepOne™. Terminado el ciclo se colectaron los datos de la curva de fusión de la derivada negativa (dRFU)/dT de cada uno de los datos. El punto medio de inflexión de la curva al que se denomina Tm (Temperatura en la que se ha desnaturalizado el 50 % de la proteína) se obtuvo utilizando la ecuación de Boltzmann (Figura 4). Para posteriormente obtener la fluorescencia contra la temperatura normalizada. Valores de Tm mayores indican que la proteína ha ganado estabilidad y reduce su flexibilidad conformacional.

$$I = \left[A + \frac{(B-A)}{1 + e^{(T_m - T)/C}} \right]$$

Figura 5. Representación matemática de la ecuación de Boltzmann. Donde I es igual a la intensidad de fluorescencia a la temperatura T; A intensidad de fluorescencia pretransicional; B intensidad de fluorescencia postransicional; C factor de la pendiente [65].

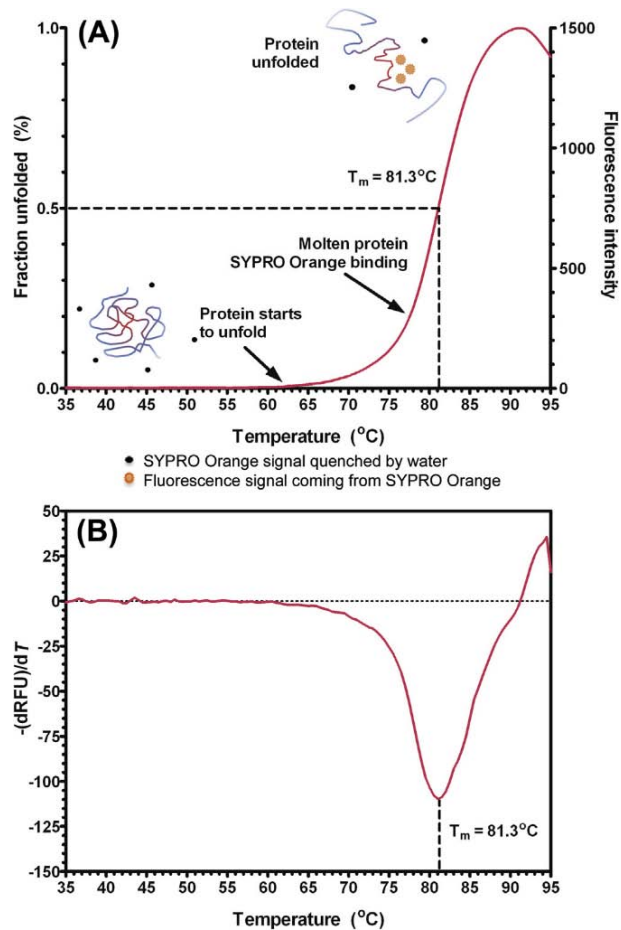


Figura 6. Ensayo de desnaturalización térmica típico usando termofluorescencia. (A) Curva de fusión de la glucosa isomerasa en 100 mM de Tris-HCl pH 8.5. La solución de proteína se calentó en presencia de SYPRO Orange. Cuando la proteína empieza a desnaturalizarse, la sonda fluorescente se une al núcleo hidrofóbico de la proteína incrementando la fluorescencia. La máxima fluorescencia se obtiene cuando la proteína se despliega por completo, después la señal del SYPRO Orange decrece cuando el fluoróforo se disocia de la proteína. Una señal residual de este se explica por la interacción con agregados de proteína. Generalmente, la señal de fluorescencia es graficada como una función de la temperatura que genera una curva sigmoide que permite determinar la fracción de proteína desplegada. El punto de inflexión corresponde a la temperatura de fusión (T_m) en la cuál el 50% de la proteína está desplegada. En este caso la T_m fue de 81.3 °C. (B) Representación alternativa de la curva de fusión utilizando la primera derivada de los datos crudos $-(dRFU)/dT$ de los datos crudos. La T_m corresponde con el ápice. Tomado de Boivin et al, 2013 [64].

6.8. Pruebas de Especificidad

La determinación de la especificidad de la lectina, es decir, qué azúcares reconoce se basa en la inhibición de la actividad hemaglutinante en presencia de su ligando. En este ensayo se utilizaron placas de 96 micropozos con fondo en “U”, en las que se colocaron 25 μ L de amortiguador Bis-Tris/HCl 50 mM pH 7.4 con 150 mM de NaCl. En el primer pozo se cargaron 25 μ L de la solución del carbohidrato (Tabla 2) y se realizaron 12 diluciones seriadas 1:2. Posteriormente se colocaron 25 μ L de la lectina pura con una concentración de 0.2 mg/mL en cada pozo. La placa se incubó por 1 h a 20 °C para permitir la interacción de la proteína con el azúcar, transcurrido este tiempo se agregó en cada pozo 25 μ L de ECF al 2 % y se incubó la placa por una hora a 37°C.

Para cada azúcar se elaboró un blanco positivo, el cual consistía en sustituir el volumen de la lectina con el amortiguador de fosfatos (no hay eritroaglutinación) y un blanco negativo el cual contenía 50 μ L del amortiguador, 25 μ L de la lectina y 25 μ L de ECF al 2 % (se observa eritroaglutinación), los cuales fueron sometidos a las mismas condiciones que las muestras.

Después de la incubación, se procedió a estimar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), esto es, la concentración de azúcar mínima que produce inhibición de la eritroaglutinación.

6.9. Secuenciación de la lectina de *Aplysia californica*

Con el fin de obtener la secuencia de la lectina pura, se realizó una electroforesis en condiciones desnaturizantes utilizando un gel de poliacrilamida al 12 % y la tinción con Azul de Coomassie. Una vez revelada la banda, esta se cortó y se envió al Consorcio de Proteómica de la Universidad de Arizona, USA. En dicho laboratorio realizaron una digestión enzimática con tripsina y la posterior identificación de los fragmentos peptídicos por espectrometría de masas. Es interesante notar que ya se cuenta con el genoma completo de *A. californica* que está disponible en el National Center of Biotechnology Information (NCBI) con el código AASC00000000.3

6.10. Bioinformática

6.10.1 Modelado de la estructura de la lectina de *A. californica*

Una vez obtenida la secuencia de la lectina, esta se envió al servidor Robetta [66]. para obtener un modelo de la estructura terciaria de la proteína Este servidor ofrece un servicio de predicción de la estructura terciaria de proteínas ab initio y por homología con otras estructuras. Primero inicia con la búsqueda de homólogos estructurales utilizando BLAST o PSI-BLAST [67], después analiza dominios individuales o plegamientos independientes mediante la búsqueda de familias estructurales en la base de datos Pfam. Los dominios con homología estructural son utilizados como referencia para crear diversos modelos; y aquel que posea la energía más baja, es el que se tomará como la estructura final. La conformación de la cadena principal del modelo fue calculada analizando los ángulos de torsión phi y psi utilizando Rampage [68] y la calidad fue evaluada con Molprobitry [69]. Para visualizar los modelos obtenidos se utilizó el programa Chimera 1.8.1 [70] y COOT [71].

6.10.2. Análisis de la estructura

Con el fin de entender el comportamiento de la lectina de *A. californica*, se analizó tanto la secuencia como el modelo de la estructura terciaria con diferentes servidores como son el PDBsum [72] y el servidor Expasy [73]. Sabiendo que la lectina presenta una gran tendencia a agregarse, se utilizaron los servidores: PASTA 2.0 [74] y Aggrescan [75], el primero permite conocer las regiones de la proteína que tienden a agregarse en forma de fibras amiloides y el segundo, permite reconocer los sitios de agregación en general. Para detectar los posibles sitios de glicosilación, se utilizó el servidor Glycosylation Predictor [76] y para el acoplamiento molecular (Docking) de la lectina con su ligando se utilizó el servidor SwissDock [77]. Finalmente, se realizó un análisis de los posibles sitios de coordinación de iones con el servidor COACH [78].

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Verificación de la presencia de la actividad hemaglutinante en extractos de *Aplysia californica*.

Como primer paso, para la purificación y caracterización de la lectina de *A. californica* se realizaron pruebas de actividad con el extracto del organismo entero, así como con la tinta y el hemolinfa (Figura 7). Observamos que la mayor actividad se obtiene utilizando el organismo entero en amortiguador AF. Otro punto que resultó clave para obtener un extracto con actividad, fue seleccionar a los organismos adultos (10-15 cm), lo cual puede estar relacionado con el desarrollo de su sistema de defensa o bien que la lectina se encuentre en las gónadas del organismo, como es en el caso de la lectina de *Aplysia depilans* [28]. Es importante mencionar que los invertebrados marinos carecen de un sistema de defensa adaptativo, por lo que su respuesta inmune se basa principalmente en componentes celulares como los hemocitos y en un gran número de proteínas que forman parte de un componente humoral. Dichas proteínas entre las que se encuentran las lectinas, juegan un papel importante en la defensa de estos organismos ya que tienen la capacidad de reconocer los antígenos de superficie que son expresados en bacterias como los lipopolisacáridos y llevar a cabo mecanismos de aglutinación y de hemólisis. Anteriormente se consideraba que una respuesta innata era inespecífica, hecho que se ha replanteado, ya que la alta especificidad de las lectinas demuestra que la única diferencia entre la respuesta inmune innata y la respuesta inmune adaptativa es que esta última posee una memoria [79-83]. Una vez detectada y bajo que condiciones de extracción se obtenía la actividad de la lectina, se procedió con la purificación de la misma.

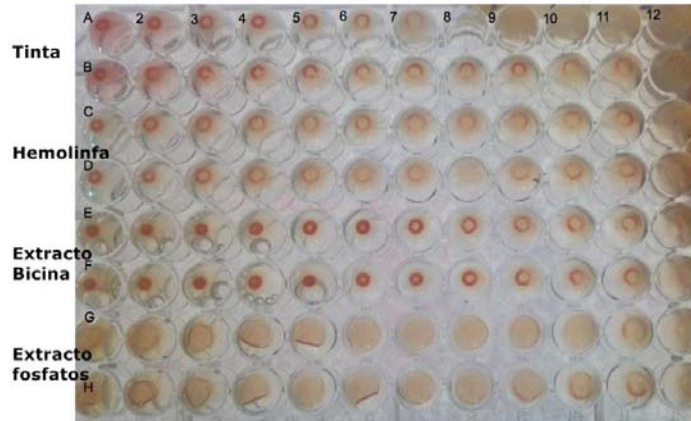


Figura 7. Evaluación de la actividad eritroaglutinante en *A. californica* en la tinta que excreta, en el hemolinfa y en el extracto del organismo completo. Fila A y B: Tinta, Fila C y D: Hemolinfa, Fila E y F: Extracto en Bicina/NaOH 50 mM pH 9, 150 mM NaCl y 2Mm MgCl₂. Fila G y H: Extracto en Fosfatos 50 mM pH 7.4, 150 mM NaCl.

7.2 Purificación

La lectina de *Aplysia californica*, se purificó en un solo paso utilizando una resina de afinidad de *p*-Aminobenzil-1-tio-D-galactopiranosido unido a agarosa. Esta resina es reconocida por lectinas cuya especificidad es hacia galactósidos. En estudios previos en el laboratorio se había purificado esta lectina eluyendo con un gradiente de pH [5]; sin embargo, como la proteína era muy afín a la resina, esta sólo eluía con un pH de 2.0 por lo que al ser tan bajo el pH, se piensa, que quizá este era el motivo de la inestabilidad de la proteína reportada por Guinea en 2011 [5]. Por lo anterior, se optó por modificar la forma de purificación, esta vez, eluyendo con su ligando, es decir galactosa.

Una vez eluida la lectina con galactosa y dializada, se verificó su pureza por electroforesis en condiciones desnaturalizantes, observando una sola banda que corresponde a una masa de aproximadamente 24 kDa (Figura 8). Algo interesante que se observa, es que la masa era cuatro veces mayor a la reportada por Guinea en 2011 [5], sin embargo la actividad y la especificidad era la misma. Es muy

probable que debido a las condiciones extremas de elución, la proteína se haya hidrolizado, manteniendo el sitio de reconocimiento intacto, de ahí que no pierda la actividad. Por lo que nuestro método de purificación permite obtener a la lectina pura y completa. El intervalo de masa observado en lectinas es muy amplio y abarca desde masas pequeñas como 4.7 kDa de la heveína del árbol *Hevea brasiliensis* [83], hasta masas tan grandes como 400 kDa como la observada en la lectina de la bacteria *Limulus polyphemus* [84].

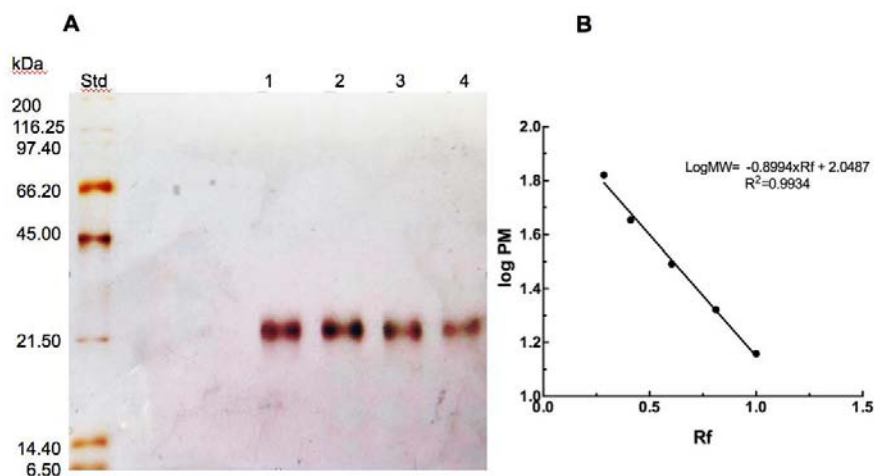


Figura 8. Separación electroforética de la lectina purificada. Lectina de *A. californica* eluida en Bis-Tris 50 mM con 150 mM de NaCl. Carril 1,2: Lectina eluida con ligando 2mg/mL en Bis-Tris/HCl pH 7.5 10mM con 50 mM de NaCl. Carril 3,4 adicionado 1% de Polipropilenglicol P400. B) Regresión lineal obtenida de los estándares de peso molecular del carril Std, para el cálculo de la masa molecular de la lectina.

7.3. Pruebas de especificidad

Al analizar la especificidad de la lectina pura, se observó que su especificidad es hacia galactósidos, mostrando la mayor afinidad por la β -Lactosa (Figura 9 y Tabla 2). Esta lectina tiene la capacidad de reconocer los dos anómeros de la lactosa, sin embargo, tiene preferencia por el anómero beta. Comparando las CMI de la lectina de *Aplysia californica*, con las de otros invertebrados marinos, se observa que la D (+) Galactosa inhibe a la lectina con una CMI 13.41 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y sólo es superada por una lectina de la esponja de mar con una CMI de 6.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ [85], lo mismo sucede

en el caso de la inhibición con α -Lactosa. Sin embargo, es importante destacar la gran afinidad que tiene la lectina de *Aplysia californica* por la β -Lactosa y la capacidad de reconocer ambos anómeros en comparación a todas las otras lectinas mostradas en la Tabla 2.

Tabla 2. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de los galactósidos reconocidos por la lectina de *A. californica* y valores reportados para otras lectinas de origen marino

Azúcar	CMI ($\mu\text{g/mL}$)			
	Lectina de <i>Aplysia californica</i>	Lectina del bagre <i>Clarias batrachus</i> [86]	Lectina de la esponja de mar <i>Halichondria okadai</i> [85]	Lectina del pepino de mar <i>Apostichopus japonicus</i> [87]
D(+) Galactosa	13.41	25	6.25	111.6
β -Lactosa	1.15	No inhibe	ND	ND
α -Lactosa	13.41	No inhibe	3.13	180.0

ND: No determinada

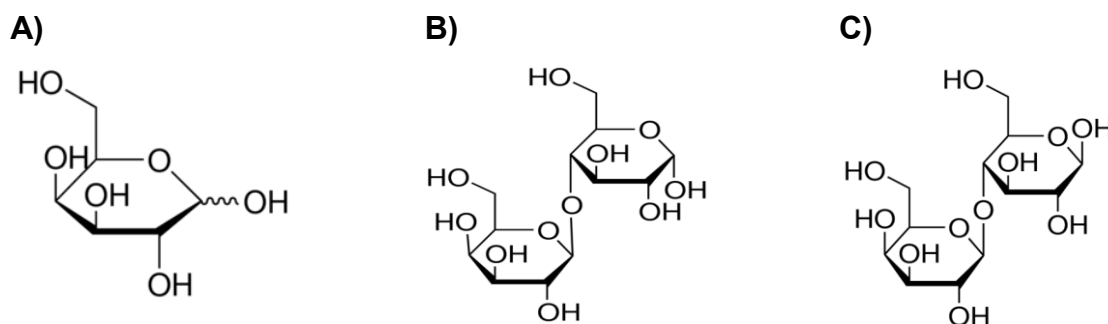


Figura 9. Estructura molecular de los carbohidratos reconocidos por la lectina de *A. californica*. A) D (+) Galactosa, B) β -Lactosa y C) α -Lactosa.

Durante el proceso de purificación se observó que empleando el amortiguador de fosfatos 50 mM pH 7.4 y 150 mM NaCl (AF), que es donde, se observó la mayor actividad aglutinante, la proteína tendía a agregarse rápida e irreversiblemente,

perdiendo su actividad en periodos de tiempo muy cortos. Se observó además que este proceso tenía una fuerte dependencia de la concentración de proteína. Cuando ésta excedía los 97 µg/mL, la proteína se agregaba, perdía la actividad y precipitaba. Por lo anterior, y considerando, que en la resina de afinidad, la lectina se concentraba y al eluir, se alcanzaban concentraciones cercanas a 1 mg/mL, se decidió recibir a la proteína en un amortiguador, para que inmediatamente se redujera la concentración a aproximadamente 97 µg/mL. Con la finalidad, de encontrar una condición, que nos permitiera mantener a la proteína activa y estable, aún a concentraciones mayores a la mencionada, se realizó una optimización de la técnica de purificación con ayuda de ensayos de Fluorometría Diferencial de Barrido.

7.4. Estudios de estabilidad térmica utilizando Fluorometría Diferencial de Barrido

Con el fin de estudiar la estabilidad de *A. californica* se utilizaron 2 kits, que contienen cada uno 96 soluciones, que permiten evaluar el efecto de agentes solubilizantes, diversos iones y pH y sales amortiguadoras. Con este ensayo se obtuvieron los valores de T_m (Temperatura de fusión, es la temperatura a la que la mitad de las moléculas están desplegadas y la mitad plegadas) bajo diferentes condiciones. Se observó que la T_m de la lectina, bajo las condiciones en las que se estaba trabajando, era muy baja (24.5°C) lo que muestra su poca estabilidad y explica su comportamiento y pérdida de actividad.

Al emplear el kit de pH y sales amortiguadoras, se identificó que la proteína es sensible tanto al pH, como a las sales utilizadas para preparar los amortiguadores (Figura 10). A valores de pH menores a 6.8, la T_m disminuye drásticamente; los óptimos para su estabilidad son a valores de pH entre 8.8 y 9. Es interesante notar, que a un mismo pH (7.4), pero variando la sal del amortiguador, el cambio en estabilidad es impresionante: 24.5 °C con el amortiguador AF a 82 °C con Bicina/NaOH. Además, se observó que el amortiguador Bis-Tris/HCl fue el que favoreció más la estabilidad de la lectina, incrementando su T_m hasta 84 °C, sin embargo, un incremento en la estabilidad, no necesariamente implica un incremento en la actividad.

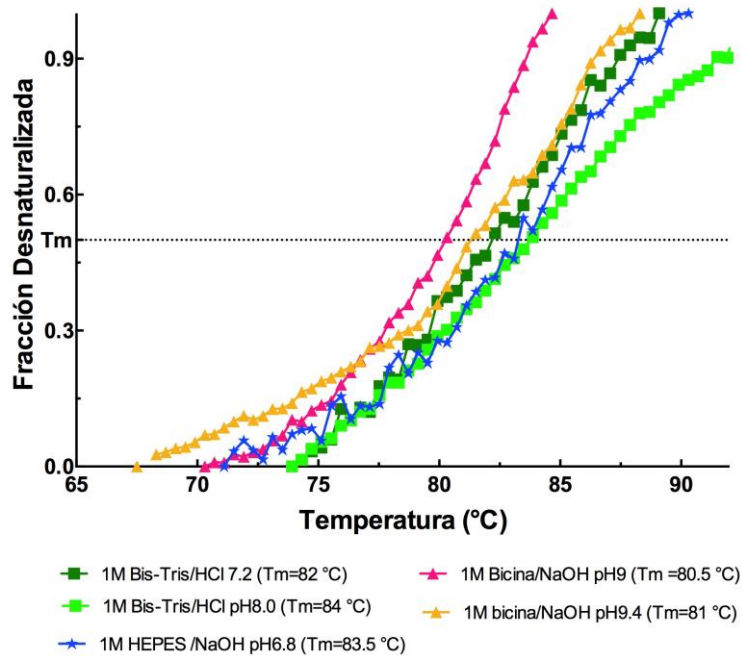


Figura 10. Estabilidad de la lectina de *A. californica* en diferentes condiciones de pH y sales amortiguadoras. Sólo se muestran las condiciones que incrementaron la T_m de la lectina a valores arriba de 80 °C.

La estabilidad estructural no tiene necesariamente una relación directa con la estabilidad funcional. Muchas proteínas logran una mayor estabilidad estructural mediante mecanismos de oligomerización, que le permiten proteger zonas lábiles [88,89], sin embargo, es necesario poder controlar este proceso a fin de evitar la pérdida de actividad. Por lo anterior, se decidió verificar lo que ocurría con la actividad al incrementar la estabilidad, para esto se eligió el amortiguador de Bicina/NaOH a pH 9.0, debido al comportamiento de la función sigmoïdal y el valor obtenido de la T_m (80°C), y al Bis-Tris/HCl pH 8.0 que fue el que aumentó la estabilidad de la lectina, lo que se reflejó en un incremento de la T_m, hasta un valor de 84 °C (Figura 10). Se observó que con el amortiguador de Bicina, la actividad casi se perdió por completo, mientras que con Bis-Tris disminuía 50%. La actividad mayor, se observó con las condiciones iniciales (amortiguador AF), sin embargo, la estabilidad es muy baja, por lo que se pierde fácilmente (Tabla 3). Es posible que esta actividad tan alta sea el resultado de la oligomerización que sufre la proteína al

extraerla de su medio natural, lo que permite una mayor exposición de sitios de reconocimiento de carbohidratos [89, 90, 91]. Esto es algo favorable, sin embargo, se debe encontrar una condición que impida que el proceso de oligomerización continúe de manera descontrolada, provocando la precipitación de la proteína. Es importante notar, que en ocasiones, es necesario sacrificar un poco de actividad con tal de lograr una mayor estabilidad, que nos permita estudiar a esta proteína, esta condición la tenemos con el amortiguador de Bis-Tris, por lo anterior, se decidió trabajar con esta sal.

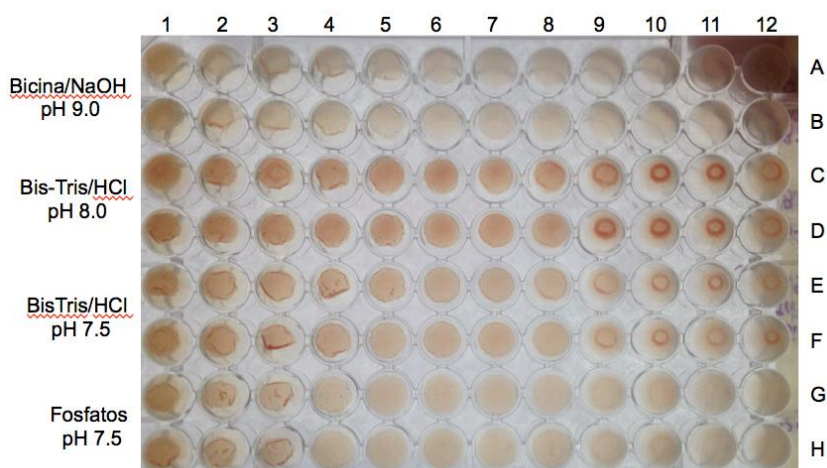


Figura 11. Actividad de la lectina de *A. californica* en diferentes amortiguadores. Fila A y B: En Bicina/NaOH 50 mM pH 9.0. Fila C y D: En Bis-Tris/HCl 50 mM pH 8.0, Fila E y F: En Bis-Tris/HCl 50 mM pH 7.5, Fila G y H: En Fosfatos 50 mM pH 7.4. Todos los amortiguadores contenían 150 mM NaCl.

Tabla 3. Actividad de la lectina de *Aplysia californica* en diferentes amortiguadores (Ver Figura 10).

Amortiguador	Dilución con actividad	Actividad (U/mL)	Actividad específica (U/μg de proteína)
Bicina pH 9.0	1: 32	320	5.09
Bis-Tris pH8.0	1:256	2560	40.72
Bis-Tris pH 7.5	1:256	2560	40.72
Fosfatos pH 7.5	1:512	5120	81.44

Es importante mencionar que la lectina de *Aplysia californica*, destaca por la alta actividad hemaglutinante que posee aún diluída, lo cual se ve reflejada en los valores de actividad específica. En amortiguador Bis-Tris, la lectina resulta ser casi nueve veces más activa que la lectina comercial del trigo utilizada como control positivo (Tabla 4). Con respecto a los valores reportados en la literatura para otros invertebrados marinos, se encontró que posee valores de actividad hematoaglutinante con sangre de conejo, mayores que la lectina del bagre y el pepino de mar [86,87], sin embargo, la actividad específica de la lectina de gónada de *Aplysia kurodai* es mayor [30], y cuando la lectina de *Aplysia californica* está en amortiguador de fosfatos, ésta la supera.

Tabla 4. Valores reportados de actividad específica de algunas lectinas con afinidad por galactosa.

Organismo	Actividad específica (U/ μ g de proteína)
Lectina de esponja marina <i>Halichondria okadai</i> [86]	0.748
Lectina del pepino de mar <i>Holothuria scabra</i> [87].	32
Lectina de gonada <i>Aplysia kurodai</i> [30]	64
Lectina comercial de Trigo <i>Triticum vulgare</i> [92].	4.6

Por otro lado, se evaluó el efecto de diferentes aditivos en la estabilidad de la proteína pura. Se observó que la lectina es más estable en presencia de algunos disolventes orgánicos y polioles (Figura 12), indicativo de su hidrofobicidad. Se sabe que, los compuestos orgánicos no volátiles y polioles (Polietilenglicol y polipropilenglicol P400), tiene la propiedad de alterar la solubilidad de las proteínas al interaccionar con ellas y modificar las características físicas del disolvente, debido a que disminuyen la viscosidad del agua a concentraciones bajas, lo cual los hace excelentes reactivos para cristalización [93]. Se ha reportado que aditivos como el Glicerol y el PEG en concentraciones entre 5-10 % w/v evitan la pérdida de actividad enzimática, aumentan el valor de T_m y controlan la agregación irreversible de las proteínas [94,95], al disminuir la tensión superficial del agua hidrata las regiones hidrofóbicas de las proteínas de manera ordenada [95], por lo que cuando la proteína se desnaturaliza y las regiones hidrofóbicas quedan expuestas, este

ordenamiento es mayor evitando así las interacciones proteína-proteína [96]. Es importante mencionar, que el aumento en la estabilidad no necesariamente incrementará la solubilidad de la proteína, por lo que es necesario tener establecida una concentración óptima del aditivo [95]. También se ha observado que ciertos iones como el Co^{+2} , Na^{+1} , Mg^{+2} , Ca^{+2} , Zn^{+2} o Ni^{+2} , entre otros, favorecen la estabilidad de proteínas al coordinarse principalmente con aminoácidos ácidos (glutámico o aspártico) o con Histidina estabilizando zonas flexibles, como son las asas y en otros casos, favorecen la actividad de las proteínas. Es decir, pueden tener una función catalítica o una función estructural [97].

Por otro lado, los aditivos orgánicos volátiles (alcoholes), cambian la polaridad del medio y podrían estar formando interacciones tipo puente hidrógeno con los residuos polares de la molécula [98], entre ellos cisteínas, tirosina o la serina, generando un menor número de interacciones inter e intramoleculares, disminuyendo así, la agregación, sin embargo, si las lectinas tienen en su DRC aminoácidos de este tipo, la actividad se verá disminuída.

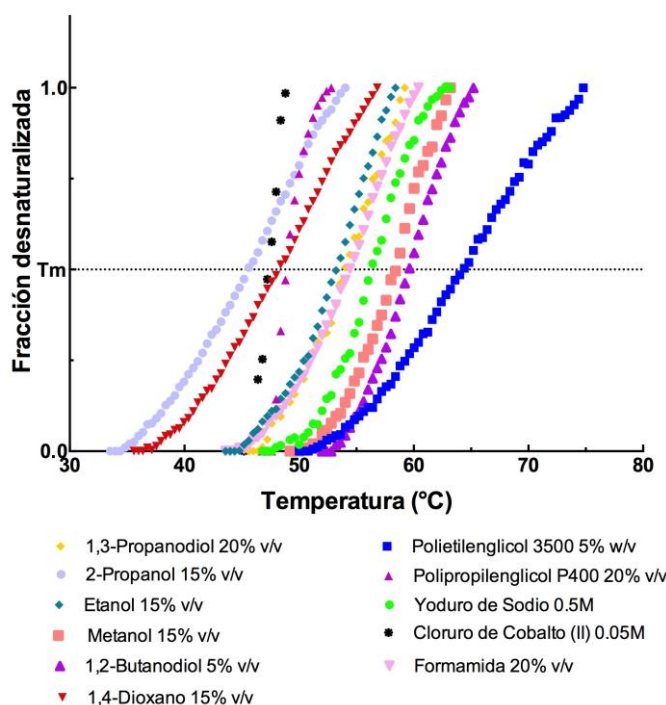


Figura 12. Efecto de diferentes aditivos en la estabilidad térmica de la lectina de *A. californica*. Se muestran las condiciones del kit de aditivos de Hampton Research® que favorecieron la estabilidad de la lectina.

Para determinar si las condiciones de mayor estabilidad correspondían a las de mayor actividad, se realizaron pruebas de actividad hemaglutinante en presencia de algunos de estos aditivos disponibles en el laboratorio (Tabla 5). Observamos que en presencia de metanol, etanol y 2-Propanol, la actividad disminuía a la mitad y después de 72 h la actividad se perdía por completo. En presencia de Polietilenglicol 3500 al 5 % y Polipropilenglicol P400 al 1 % la lectina permaneció estable y activa alrededor de una semana. Finalmente, en presencia de Cloruro de cobalto la lectina incrementó su actividad al triple (120 U/ μ g) con 10 mM de CoCl_2 , mientras que con 2 mM y 5 mM de esta sal, la actividad se incrementó al doble (81.44 U/ μ g). Sin embargo, después de 24 horas la actividad se pierde y se observó a la proteína precipitada [98]. También se intentó purificar a la proteína en presencia de este ión a una baja concentración (1 mM) pero se observó que la proteína formaba oligómeros de gran tamaño que se quedaban atrapados en la matriz, por lo que no se siguió utilizando. Esto sugiere que quizás la lectina se estabilizó mediante mecanismos de oligomerización, los cuales en un principio le confieren mayor actividad a la lectina al exponer más sitios de reconocimiento, pero si el proceso no se detiene, la proteína pierde la actividad y precipita. Cabe señalar que en el medio marino se encuentran cantidades altas de diversos iones (Tabla 6) algunos son requeridos por las proteínas para su función.

Tabla 5. Actividad de la lectina de *A. californica* en presencia de distintos aditivos

Tipo de aditivo	Aditivo	Dilución	Actividad (U/mL)	Actividad específica (U/ μ g)
	Control	1:256	2560	40.72
Orgánico volátil	Metanol 10%	1:128	1280	20.36
	Etanol 10%	1:128	1280	20.36
	2-Propanol 10%	1:128	1280	20.36
Poliol	Etilenglicol 10%	1:256	2560	40.72
Polímero	Polietilenglicol 3500 5%	1:256	2560	40.72
Orgánico no volátil	Polipropilenglicol P400 5%	1:256	2560	40.72
Ión multivalente	Cobalto 5 y 2 mM	1:512	5120	81.44

Tabla 6. Concentración de algunos iones divalentes presentes en el agua del Océano Pacífico [99].

Ion divalente	Concentración (mg/L)
Calcio	400
Magnesio	1.26
Hierro	4×10^{-3}
Cobalto	2.5×10^{-4}
Zinc	1.4×10^{-4}

Debido a que se ha reportado que las lectinas se estabilizan en presencia de su ligando [100], se realizó un ensayo de termofluorescencia en presencia de algunos galactosidos. En la Figura 13, se puede observar el incremento de la T_m en presencia de galactosa y de ambos anómeros de la lactosa. En presencia de la D(+) Galactosa y α -Lactosa la T_m se incrementa 6°C , mientras que en presencia de β -Lactosa el incremento es de 2.5°C . Es interesante notar que aún cuando en presencia de la α -Lactosa y de galactosa el valor de la T_m es prácticamente el mismo, la desnaturalización se inicia antes en presencia de α -Lactosa, por lo que el ligando que favorece la estabilidad de la lectina es la galactosa.

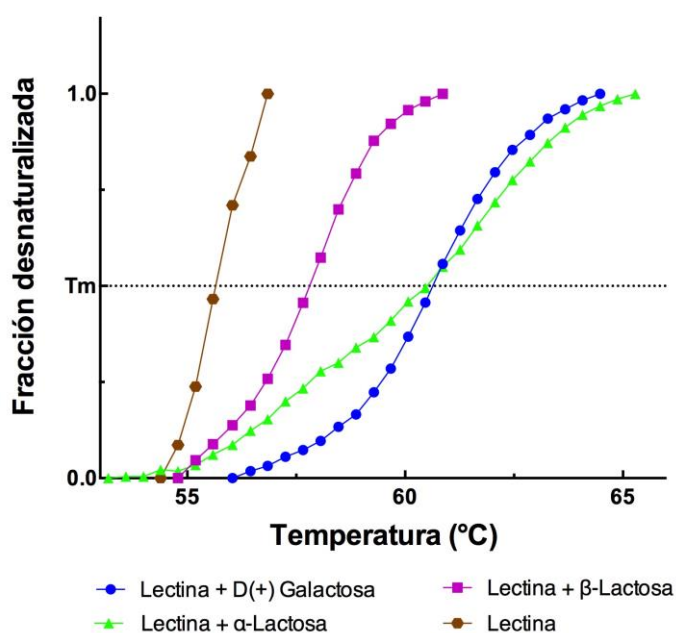


Figura 13. Efecto de los ligandos que reconoce la lectina de *A. californica* en su estabilidad.

7.5. Secuenciación de la lectina de *Aplysia californica*

Una vez determinada la pureza de la lectina, se determinó su secuencia de aminoácidos por espectrometría de masas. La secuencia obtenida se muestra en la Figura 14. La lectina consta de 238 aminoácidos y está reportada en el análisis del genoma de *Aplysia californica*, esta secuencia está depositada en el NCBI con el número de referencia: XP_005099808.1, en donde, está reportada como una proteína de función desconocida. Su masa molecular fue determinada a partir de su secuencia con el servidor ProtParam [73] es de 26422.8, el punto isoeléctrico (pI) de 5.05 y el coeficiente de extinción Abs 0.1% de $2.067 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ a 280 nm. Además, se determinó en el mismo servidor el índice de inestabilidad, que fue de 46.7, lo que significa que la proteína es inestable (arriba de 40 se consideran inestables).

1	11	21	31	41
MNTAAVILAL	LSVLAATQAC	PDECDTIRVE	SWNYKYAEKV	VQGVSYVNM
51	61	71	81	91
TVVDRQSEAA	CTLGESFGYQ	KATLWVDQGC	RADFKFCFCH	LPVRPTECQL
101	111	121	131	141
LRVESWNYKY	AEKMVTGAAL	FINMTVEDRQ	SAASCDLDKS	FGFYENSTV
151	161	171	181	191
WVDNGCRADF	NICYVQGASS	TTTVNVSSWN	YKYATKILPS	SSCIYSMRVA
201	211	221	231	
NQQSAAPCTL	GSTYGFLANT	MWVSDGCRAD	FSVSYYSV	

Figura 14. Secuencia de la lectina de *Aplysia californica*. Código NCBI XP_005099808.1.

Es sabido que una proteína tiende a precipitarse cuando está a un pH cercano a su punto isoeléctrico, sin embargo, en el presente estudio se trabajó a un pH de 7.4, por lo que no fue la cercanía con el pI lo que provocó la inestabilidad de la proteína, sino que debe ser otro el motivo, es posible que la proteína posea parches hidrofóbicos que en medio acuoso la desestabilicen o bien zonas altamente desestructuradas.

7.6. Análisis bioinformático

7.6.1. Modelo estructural de la lectina de *Aplysia californica*

Con el fin de conocer aspectos estructurales de la lectina de *A. californica*, e intentar encontrar una explicación del comportamiento de inestabilidad de la misma, se obtuvo el modelo de la estructura terciaria de la proteína utilizando el servidor Robetta [66]. Este servidor proporcionó 5 modelos con la menor energía libre global requerida para favorecer termodinámicamente el plegamiento de la proteína. Tres de ellos, tenían una puntuación de 0, lo que indicaba que era poco probable que esa estructura correspondiera con la real. Los dos modelos restantes, se analizaron con Molprobit y COOT [69,71] para determinar cuál tenía la mejor estereoquímica, y los menores errores estructurales. En todos los modelos, se observaron dos dominios: Uno, que comprende los residuos del 1 al 151 (Dominio 1) y el segundo, que comprende del residuo 152 al 238 (Dominio 2) (Figura 15 A). Es importante señalar, que aún el mejor modelo tuvo una puntuación de confianza de 0.15 para el dominio 1 (dominio N terminal), mientras que para el dominio 2 (dominio C terminal) la puntuación fue de 0.08. Esto implica que hay una mayor confianza en la estructura del dominio N terminal, que en el C terminal. Sin embargo, los valores de confianza son muy bajos. Esto se debe a que no hay ningún modelo en el Protein Data Bank (PDB) que tenga una alta homología con la secuencia de la proteína de *A. californica*. Por lo que se trata de una proteína con un plegamiento diferente. En casos como éste, en donde, no se puede realizar una predicción por homología, el servidor Robetta realiza un modelo *ab initio*. El modelo obtenido, presenta una predominancia de hebras beta en su estructura y apenas una pequeña hélice en el extremo amino terminal (Figura 15 A y B). El Dominio 2, es el que presenta zonas altamente desestructuradas, que pueden favorecer la agregación de la proteína, al ser zonas muy flexibles que interactúan fácilmente con otras secciones desestructuradas de otros monómeros de la misma proteína [100].

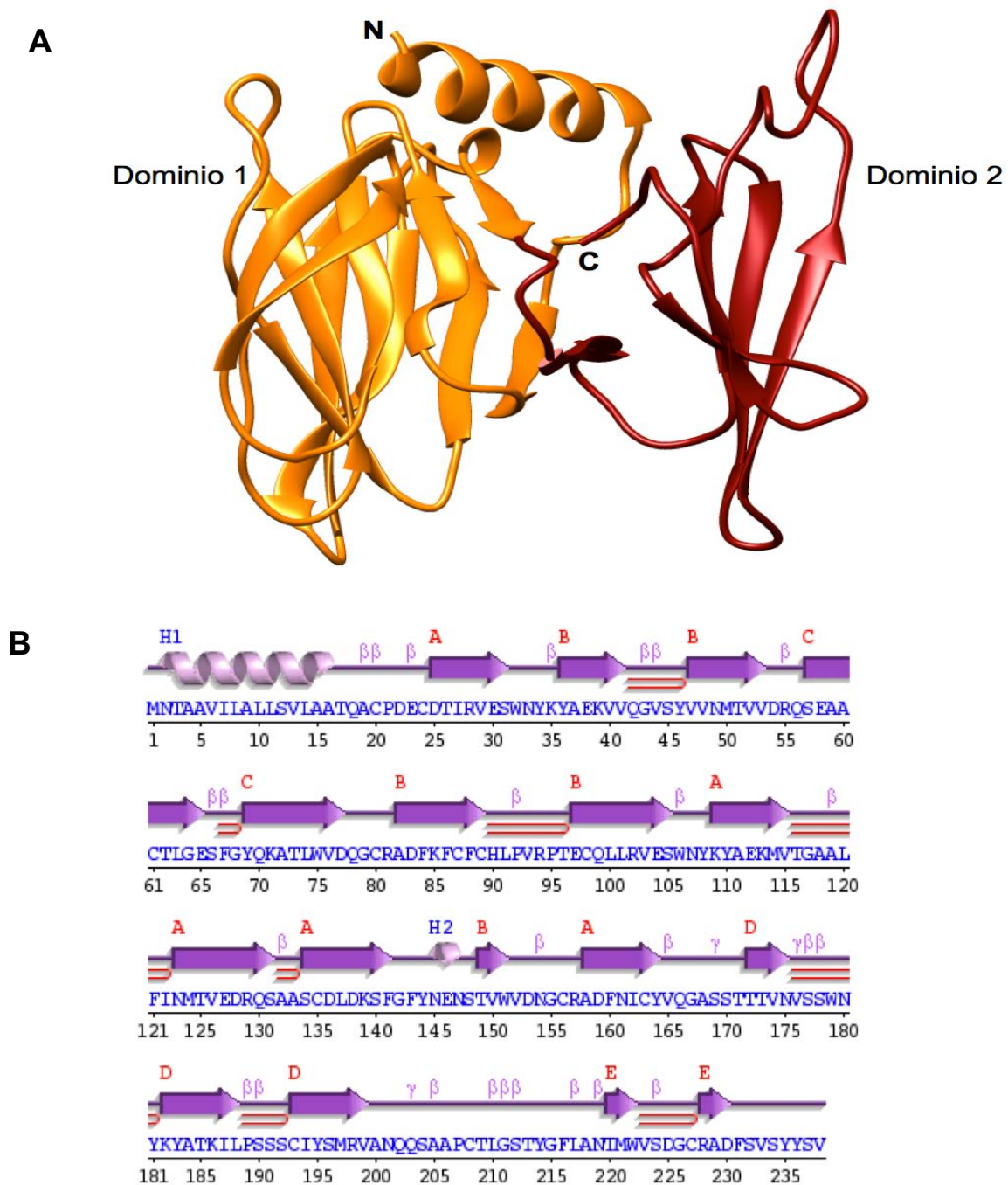


Figura 15. Modelo estructural de la lectina de *A. californica* obtenido con el servidor Robetta. A) Modelo donde se muestran los dos dominios que forman a la proteína B) Contenido de estructura secundaria donde se observa que predominan las hebras β .

7.6.2 Análisis de la agregación de la lectina.

Durante todo el proceso de purificación y caracterización de la lectina de *A. californica*, se observó la fuerte tendencia que esta mostraba para oligomerizarse. Por lo anterior, se determinaron los segmentos de la proteína que favorecían dicho comportamiento. Para ello, se utilizaron dos servidores: Uno que analiza los segmentos de una proteína que tienden a agregarse de una forma un tanto ordenada, dando lugar a fibras amiloides y el otro, que identifica en general puntos importantes dentro de la secuencia de una proteína que favorecen la agregación en general. En el primer caso, se utilizó el servidor PASTA 2.0 [74]. Este servidor detectó la presencia de 2 zonas que favorecen este tipo de agregación (Figura 16 A zona marcada en azul), ambas localizadas en el Dominio 1. La más factible, que inicie este proceso, es la hélice que se encuentra en el extremo amino terminal, ya que está expuesta. Para que las hebras pudieran interactuar con otra molécula, se requeriría que la proteína sufriera un cambio conformacional que le permitiera exponer esta zona. Este tipo de cambios conformacionales no son imposibles, de hecho, se ha observado en proteínas de varios organismos marinos que al interactuar con su ligando se induce este tipo de comportamientos. Tal es el caso de la lectina CEL-III del pepino de mar *Cucumaria echinata* [43], en donde, se inicia un mecanismo de oligomerización, desencadenado por el reconocimiento de su ligando (N-acetilgalactosamina). Esta proteína está formada por dos Dominios de Reconocimiento de Carbohidratos y uno de oligomerización, una vez que reconoce su ligando, a través de sus DRC el tercer dominio, llamado dominio de oligomerización, sufre un cambio conformacional, que ocasiona la exposición de residuos hidrofóbicos, formando interacciones beta-beta con las zonas desplegadas de los demás monómeros, que se encuentran también reconociendo azúcares en la membrana, lo que permite, la formación de un poro constituido por siete subunidades que le permite penetrar la bicapa lipídica de las membranas de los patógenos, produciendo hemólisis.

El segundo servidor, Aggrescan [75] detectó 10 sitios potenciales que pueden inducir la agregación de la proteína, estos se pueden observar en verde en la Figura 16 B y

C. En este caso, la mayoría de los sitios de agregación se localizan en el Dominio 2, lo que sugiere, que este dominio es el de oligomerización.

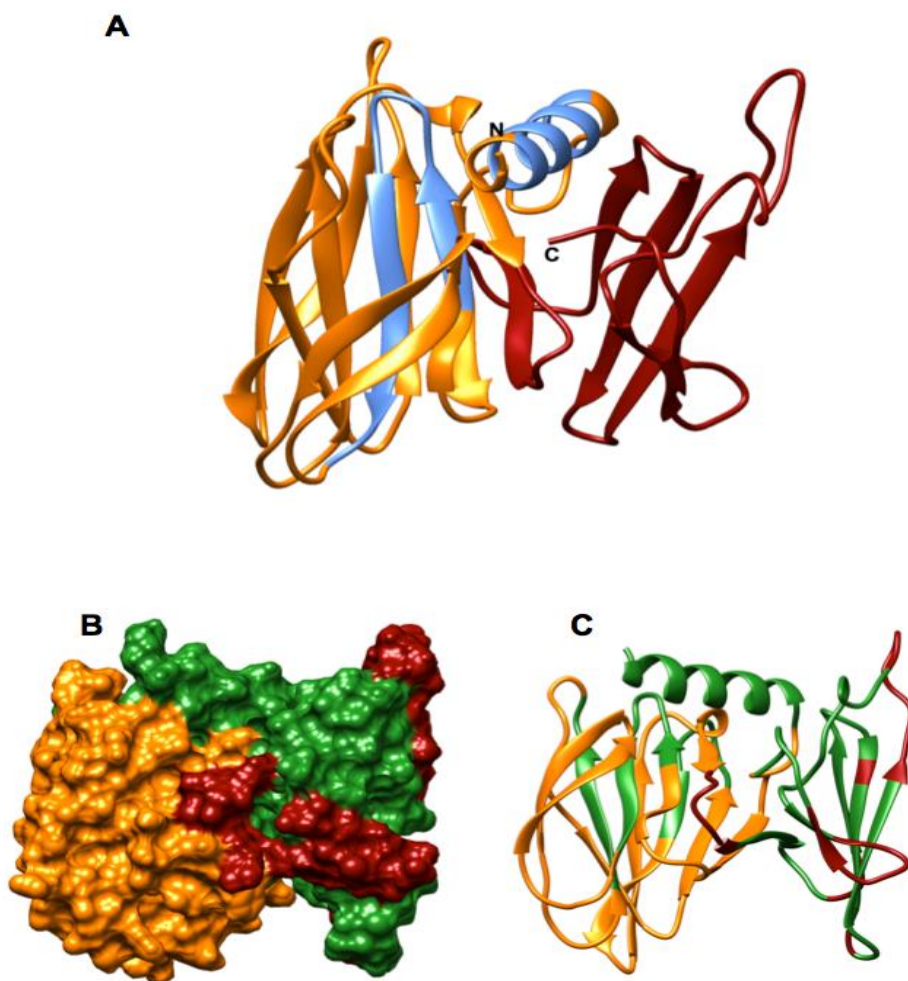


Figura 16. Determinantes estructurales de la agregación de la lectina de *A. californica*. A) Sitios potenciales para la formación de fibras como determinó el servidor PASTA están marcados en azul y B) sitios de agregación detectados por el servidor Aggrescan marcados en verde.

7.6.3. Análisis de los sitios de glicosilación de la lectina de *A. californica*

Otro factor que puede favorecer la agregación de la proteína, es la presencia de glicosilaciones. Este tipo de modificaciones postraduccionales, favorecen la agregación al favorecer las interacciones azúcar-azúcar o bien azúcar-proteína. Mientras mayor es el grado de glicosilación, mayor la tendencia a agregarse. Al hacer el análisis de los posibles sitios de glicosilación, utilizando el servidor Glycosylation Predictor [76] se observó que la proteína tiene 20 posibles sitios de glicosilación y que predominan las O-glicosilaciones, con 15 posibles sitios. Este tipo de glicosilación puede ocurrir en residuos como la serina y la treonina. Los 5 sitios restantes corresponden a posibles N-glicosilaciones, que ocurren en residuos de asparagina. Como se observa en la Figura 17, el mayor número de sitios de glicosilación se encuentran en el Dominio 2 con 11 sitios para O-glicosilaciones y 3 para N glicosilaciones, mientras que en el Dominio 1 sólo hay 4 sitios para O-Glicosilaciones y 2 para N-Glicosilaciones [101-103]. Debido al gran número de sitios de glicosilación detectados y aunado a su poca estructura, el Dominio 2 debe ser muy poco estable y el responsable de la agregación de la lectina. Por lo anterior, sería importante en un futuro determinar el contenido de azúcares totales presentes en la lectina.

Es importante destacar, que las N-Glicosilaciones son el resultado de modificaciones postraduccionales que sufren las proteínas y pueden ser de suma importancia para llevar a cabo la función biológica de las mismas. Este tipo de modificaciones, están relacionadas con varios fenómenos como las interacciones patógeno-hospedero, asociaciones simbióticas, adhesión celular, reconocimiento célula-célula, desarrollo embrionario, desarrollo y diferenciación. Se ha observado también, que la glicosilación puede favorecer la estabilidad en proteínas extremófilas y, que en un gran número de proteínas si se desglicosilan pierden o disminuyen notablemente su actividad. En lectinas pueden favorecer la especificidad de las mismas, es por eso que un gran número de ellas están glicosiladas [101-103].

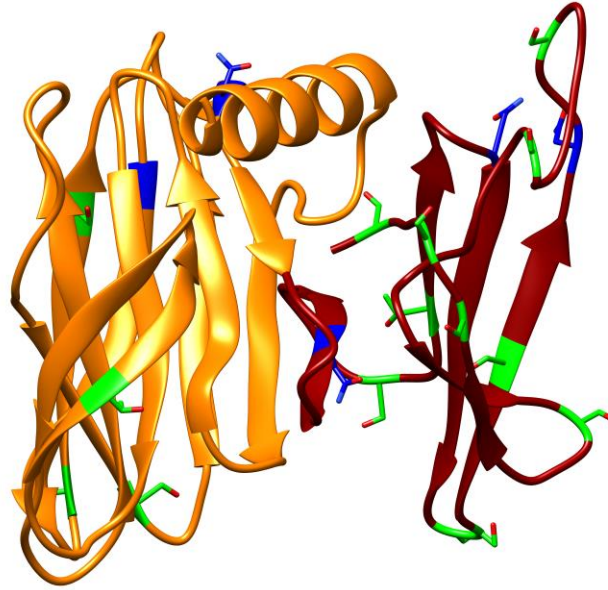


Figura 17. Posibles sitios de glicosilación presentes en la lectina de *A. californica* obtenidos con el servidor Glycosylation Predictor [76]. En verde, se pueden observar que el mayor número de sitios se localizan en el Dominio 2.

7.6.4. Análisis de los sitios de unión a azúcares por acoplamiento molecular (Docking)

Con el fin de conocer los posibles sitios de reconocimientos de carbohidratos, se realizó un acoplamiento molecular (Docking) de la galactosa en el modelo obtenido por Robetta. Dicho acoplamiento, se realizó con el servidor SwissDock [77]. En la Figura 18, se observan los 3 sitios que mostraron la puntuación más alta. El que tiene la puntuación más alta (Sitio 1), se localiza en el Dominio 1, el segundo (Sitio 2) en puntuación, se localiza en la interface entre los Dominios 1 y 2 y el tercero (Sitio 3), está en el Dominio 2. Es interesante notar, que en los tres sitios, en el fondo del bolsillo, que forma el sitio de reconocimiento, se encuentran aminoácidos hidrofóbicos y en la parte más superficial, se localizan aminoácidos hidrofílicos. El Sitio 1, que mostró la mayor puntuación, es el que tiene más interacciones que estabilizan esta unión, en él, se pueden observar interacciones hidrofóbicas en la base, puentes de hidrógeno en la parte externa, además de interacciones catión-pi y

de apilamiento de anillos, este tipo de interacciones son comunes en el reconocimiento de su ligando por lectinas [9,11,13].

Durante la purificación y caracterización de esta lectina, la actividad se siguió por medio de pruebas de aglutinación de eritrocitos de conejo, este tipo de actividad sólo se puede observar si la lectina presenta al menos 2 sitios de reconocimiento, para así poder formar los entrecruzamientos y aglutinar. Si sólo presenta un sitio, no puede aglutinar [1,7], por lo que al menos, los dos primeros sitios deben estar presentes en la lectina. Sin embargo, y dada la actividad tan alta que presenta esta lectina es posible, que tenga los 3 sitios y que el tercero favorezca la oligomerización de la lectina, organizándola de tal forma, que permita la exposición de un mayor número de sitios de reconocimiento, como ocurre con la lectina del pepino de mar [44]. Es interesante notar, que los ligandos están unidos en sitios que favorecen la estabilidad de la lectina, al inmovilizar las zonas flexibles, como las asas y la hélice del amino terminal, impidiendo la agregación desordenada y favoreciendo la oligomerización ordenada. Es por esto, que en presencia de su ligando, la lectina es estable, como se observó incluso en la termofluorescencia y además es posible concentrarla lo que sin su ligando es imposible.

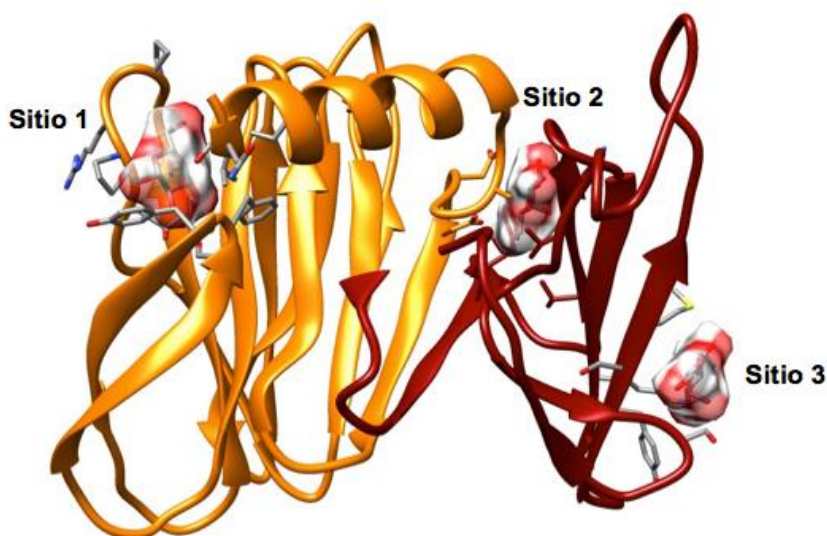


Figura 18. Acoplamiento molecular de la lectina con su ligando, galactosa obtenido con el servidor SwissDock. Se observan 3 DRC.

7.6.5. Sitios de unión a iones

Para detectar que tipo de iones o ligandos puede reconocer la lectina de *A. californica*, la secuencia se sometió a un análisis con el servidor COACH [78]. Este servidor determinó que la lectina tenía la capacidad de unir cationes divalentes, como Ca^{2+} , Mg^{2+} y Co^{2+} , además puede unir galactósidos y glucósidos. Para verificar si la lectina era catión dependiente, se hicieron pruebas de actividad con y sin Ca^{2+} y Co^{2+} . Se observó, que si bien, la actividad se incrementa en presencia de estos iones, no se pierde en ausencia de ellos. Por lo que dichos iones, deben tener una función estructural más que catalítica. Se ha observado que en general, estos iones estabilizan zonas muy flexibles como las asas por medio de enlaces de coordinación que dependiendo del ión, puede ser con aminoácidos ácidos o histidinas, dándole una mayor estabilidad a la proteína [97, 104-105]. Esto corrobora, lo observado en la termofluorescencia en presencia de Co^{2+} . Además, este servidor detectó como sitio de unión a galactósidos el Sitio 1, determinado en el acoplamiento molecular, lo que corrobora éste como el más probable.

7.6.6. Análisis de cisteínas

Un aspecto interesante de la estructura de *A. californica*, es la presencia de un gran número de cisteínas, 13 en total, ocho de ellas localizadas en el Dominio 1 y cinco en el Dominio 2. Cuatro de ellas, localizadas en el dominio 1 están a distancia apropiada para poder establecer 2 puentes disulfuro (Figura 19). Sin embargo, se requiere hacer un ensayo que nos permita detectar el número de cisteínas libres para corroborar esto [106,107]. De existir, le darían mayor estabilidad al Dominio 1. Sin embargo, la existencia de tantas cisteínas libres (nueve) puede provocar inestabilidad en la proteína, ya que se trata de aminoácidos muy reactivos que pueden estar interaccionando y formar enlaces disulfuro con otros monómeros de la misma proteína, provocando interacciones covalentes y por ende agregación irreversible [83,84, 108,109]. Por lo anterior, quizás sea necesario agregar un agente reductor como el ditioneitol (DTT) para impedir este tipo de interacciones.

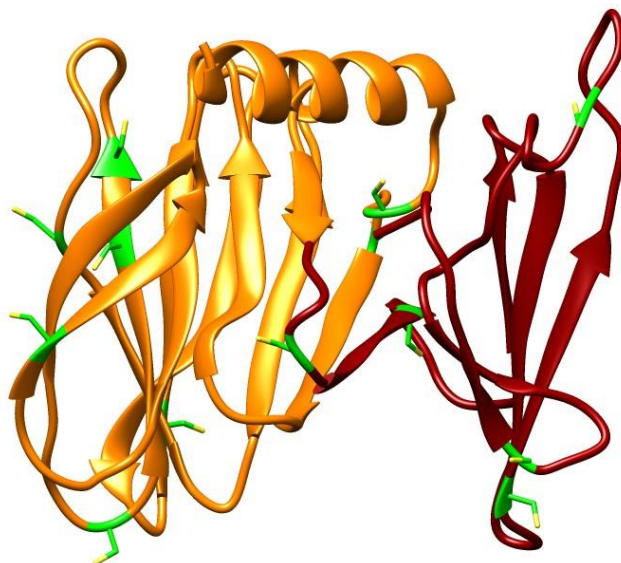


Figura 19. Cisteínas presentes en la estructura de *A. californica*.

Con lo anterior, se logró entender el motivo de la fuerte tendencia a oligomerizar por parte de la lectina de *A. californica*, que ocurre principalmente por la presencia del Dominio 2, que posee poca estructura ordenada. Dicha oligomerización, se podría controlar, adicionando al amortiguador, que sería el Bis-Tris pH 7.4 un agente reductor, polipropilenglicol P400 y Cloruro de sodio, sin embargo aún falta probarlo.

8.0 CONCLUSIONES

En el presente estudio se logró la optimización de la purificación de la lectina de *A. californica*, de tal modo, que se logró obtener por primera vez a la proteína completa, que según la secuencia obtenida, posee una masa de 26.4 kDa y pI de 5.05.

La lectina tiene fuerte tendencia a oligomerizarse, siendo más activa en su forma oligomérica, el reto es controlar dicho proceso, lo que puede lograrse en presencia de polietilenglicol, polipropilenglicol P400 y con su ligando.

Mediante un modelo estructural obtenido a partir de la secuencia obtenida, se observó que:

- Presenta dos dominios: El primero, es probablemente el de reconocimiento del ligando y el segundo, es el de oligomerización.
- Tiene un gran número de sitios posibles de oligomerización, sobretodo en el Dominio 2.
- Tiene un gran número de cisteínas expuestas y de sitios potenciales de glicosilación, que pueden estar favoreciendo la oligomerización.
- Puede coordinar cationes divalentes y azúcares.
- Mediante estudios de acoplamiento molecular, se detectaron 3 posibles sitios de unión a su ligando, galactosa, lo que explica su alta actividad.

9.0 PERSPECTIVAS

- Localizar el órgano donde se encuentra la mayor concentración de la lectina de *Aplysia californica*, con el fin de prevenir la agregación generada al interaccionar con otros componentes del extracto crudo, así como para conocer con mayor exactitud su función biológica.
- Realizar experimentos de FDB y actividad, utilizando agentes reductores y oxidantes, con el fin de observar el efecto de estos sobre los residuos de cisteína presentes y en la oligomerización.
- Determinar el número de cisteínas libres con la reacción de Ellman.
- Determinar los óptimos de pH y temperatura para la actividad de la lectina.
- Realizar estudios de interacción de la proteína con distintos ligandos por calorimetría de titulación isotérmica.
- Realizar estudios de actividad antimicrobiana y con líneas celulares de cáncer.
- Realizar estudios de Dispersión Dinámica de Luz, con el fin de estudiar los mecanismos de oligomerización, que sigue esta lectina y la forma de controlarlos.
- De ser posible, cristalizar la proteína para la obtención de la estructura cristalográfica de la misma por difracción de rayos X.
- Una vez estandariza la purificación realizar una tabla de rendimiento de la purificación.

10. REFERENCIAS

- [1] Goldstein, I.J., Hughes, R.C., Monsigny, M., Osawa, T. (1980) Sharon N., What should be called a lectin?. *Nature*. 285, 285-266.
- [2] Peumans, W.J., Van Damme, E.J. (1995) Lectins as plant defense proteins. *Physiol*. 109, 347-352.
- [3] Loker, E.S., Adema, C.M., Zhang, S.M., Kepler, T.B. (2004) Invertebrate immune systems not homogeneous, not simple, not well understood. *Immunol Rev*. 198, 10-24.
- [4] Gorbushin, A.M., Borisova, E.A. (2015) Lectin-like molecules in transcriptome of *Littorina littorea* hemocytes. *Dev Comp Immunol*. 48, 210-220.
- [5] Guinea-Ramírez, B.B. (2011) Purificación y Caracterización de una Lectina de *Aplysia californica*. Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, UNAM.
- [6] Ghazarian, H., Idoni, B., Oppenheimer, S.B. (2011) A glycobiology review: carbohydrates, lectins and implications in cancer therapeutics. *Acta Histochem*. 113, 236-247.
- [7] Sharon, N., Lis, H. (2004) History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. *Glycobiology*. 14, 53R-62R.
- [8] Gorelik, E., Galili, U., Raz, A. (2001) On the role of cell surface carbohydrates and their binding proteins (lectins) in tumor metastasis. *Cancer Metastasis Rev*. 20, 245–277.
- [9] Sharon, N. (2006) Atomic Basis of Protein–carbohydrate Interactions: An Overview. Edited by the Royal Chemical Society. *Protein-Carbohydrate Interactions in Infectious Diseases*, 1-5.2
- [10] Vasu, K. S., Naresh, K., Bagul, R. S., Jayaraman, N., Sood, A. K. (2012) Detection of sugar-lectin interactions by multivalent dendritic sugar functionalized single-walled carbon nanotubes. *Applied Physics Letters* 101, 053701

- [11] Weis, W.I., Drickamer, K. (1996) Structural basis of lectin-carbohydrate recognition. *Annu Rev Biochem.* 65, 441-473.
- [12] Imberty, A., Pérez, S. (2000) Structure, conformation, and dynamics of bioactive oligosaccharides: theoretical approaches and experimental validations. *Chem Rev.* 100, 4567-4588.
- [13] Sörme, P., Arnoux, P., Kahl-Knutsson, B., Leffler, H., Rini, J.M., Nilsson, U.J. (2005) Structural and thermodynamic studies on cation- π interactions in lectin-ligand complexes: high-affinity galectin-3 inhibitors through fine-tuning of an arginine-arene interaction. *J Am Chem Soc.* 127, 1737-1743.
- [14] Gupta, G.S. (2012) *Animal lectins: form, function and Clinical Applications.* Springer-Verlag. London. 1108 pp.
- [15] Drickamer, K. A genomics resource for animal lectins. Imperial College London. <https://www.imperial.ac.uk/animalllectins/default.html>
- [16] Angata, T., Brinkman-Van der Linden, E. (2002) I-type lectins. *Biochim Biophys Acta.* 1572, 294-316.
- [17] Vasta, G.R., Feng, C., Bianchet, M.A., Bachvaroff, T.R., Tasumi, S. (2015) Structural, functional, and evolutionary aspects of galectins in aquatic mollusks: From a sweet tooth to the Trojan horse. *Fish Shellfish Immunol.* 46, 94-106
- [18] Rabinovich, G.A. (1999) Galectins: an evolutionarily conserved family of animal lectins with multifunctional properties; a trip from the gene to clinical therapy. *Cell Death Differ.* 6, 711-721.
- [19] Kilpatrick, D.C. (2002) Animal lectins: a historical introduction and overview. *Biochimica et Biophysica Acta* 1572, 187-197
- [20] Sharon, N., Lis, H. (2004) History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. *Glycobiology* 14, 53R-62R
- [21] Ambrosi, M., Cameron, N.R., Davis, B.G., (2004) Lectins: tools for the molecular understanding of the glycode. *Org Biomol Chem.* 3, 1593-608.

- [22] Mody, R., Joshi, S., Chaney, W. (1995) Use of lectins as diagnostic and therapeutic tools for cancer. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 33, 1-10.
- [23] Lakhtin, V., Lakhtin, M., Alyoshkin, V. (2011) Lectins of living organisms. The overview. *Anaerobe*. 17, 452-455.
- [24] Dice, S. (2014) *Aplysia californica*, Animal Diversity Web. Museo de zoología, Universidad de Michigan http://animaldiversity.org/accounts/Aplysia_californica/
- [25] Carefoot, T.H. (1987) *Aplysia*: Its biology and ecology. In: *Oceanography and Marine Biology. An annual review*, Vol 25. Aberdeen University press. 167-284 pp
- [26] Derby, C.D., Aggio, J.F. (2011) The neuroecology of chemical defenses. *Integr Comp Biol*. 51, 771-780.
- [27] Kicklighter, C.E., Derby, C.D. (2006) Multiple components in ink of the sea hare *Aplysia californica* are aversive to the sea anemone *Anthopleura sola*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol*. 334, 256-268
- [28] Gilboa-Garber, N., Susswein, A.J., Mizrahi, L., Avichezer, D. (1985) Purification and characterization of the gonad lectin of *Aplysia depilans*. *FEBS Lett*. 181, 267-270.
- [29] Melo, V.M., Duarte, A.B., Carvalho, A.F., Siebra, E.A., Vasconcelos, I.M. (2000) Purification of a novel antibacterial and haemagglutinating protein from the purple gland of the sea hare, *Aplysia dactylomela* Rang, 1828. *Toxicon*, 38, 1415-1427.
- [30] Kawsar, S.M., Matsumoto, R., Fujii, Y., Yasumitsu, H., Dogasaki, C., Hosono, M., Nitta, K., Hamako, J., Matsui, T., Kojima, N., Ozeki, Y. (2009) Purification and biochemical characterization of a D-galactose binding lectin from Japanese sea hare (*Aplysia kurodai*) eggs. *Biochemistry (Mosc)*. 74, 709-716.
- [31] Moroz, L.L., Ju, J., Russo, J.J., Puthanveetti, S., Kohn, A., Medina, M., Walsh, P.J., Birren, B., Lander, E.S., Kandel, E.R. Sequencing the *Aplysia* Genome: a model for single cell, real-time and comparative genomics. <http://neurobase.rc.ufl.edu/aplysia>

- [32] Hawkins, R.D., Kandel, E.R., Bailey, C.H. (2006) Molecular mechanisms of memory storage in *Aplysia*. Biol Bull. 210, 174-191.
- [33] Kempell, A.T., Fieber, L.A. (2015) Aging in Sensory and Motor Neurons Results in Learning Failure in *Aplysia californica*. PLoS One. 10, e0127056.
- [34] Vazquez, L., Sierra, C., Juárez, S., Agundis, C., Zavala, A., Zenteno, E. (1998) Mecanismos de inmunidad en crustáceos. Interciencia 23, 344-348.
- [35] Vargas-Albores, F., Ortega-Rubio, A. (1994) El sistema inmune humoral de los insectos. Tóp. Inv. Pos. 4, 21-28.
- [36] Loker, E.S., Adema, C.M., Zhang, S.M., Kepler, T.B. (2004) Invertebrate immune systems not homogeneous, not simple, not well understood. Immunol Rev. 198, 10-24.
- [37] Iwanaga, S., Lee, B.L. (2005) Recent advances in the Innate Immunity of Invertebrate animals. J. Biochem. Mol. Biol. 38, 128-50
- [38] Kovalchuk, S.N., Chikalovets, I.V., Chernikov, O.V., Molchanova, V.I., Li, W., Rasskazov V.A., Lukyanov, P.A. (2013) cDNA cloning and structural characterization of a lectin from the mussel *Crenomytilus grayanus* with a unique amino acid sequence and antibacterial activity. Fish. Shellfish. Immunol. 35, 1320-1324.
- [39] Alpuche, J., Pereyra, A., Mendoza-Hernandez, G., Agundis, C., Rosas, C., Zenteno, E. (2010) Purification and partial characterization of an agglutinin from Octopus maya serum, Comp. Biochem. Phys. B 156, 1-5.
- [40] Vázquez, L., Massó, F., Rosas, P., Montaña, L.F., Zenteno, E. (1993) Purification and characterization of a lectin from *Macrobrachium rosenbergii* (crustacea, decapoda) hemolymph, Comp. Biochem. Physiol. B. 105, 617-623.
- [41] Vázquez, L., Jaramillo, L., Lascrain, R., Cooper, E.L., Rosas, P., Zenteno, E. (1996) Bacterial Agglutination by the Sialic Acid Specific Serum Lectin From *Macrobrachium rosenbergii*, Comp. Biochem. Physiol. B. 133, 355-359.

- [42] Hatakeyama, T., Kohzaki, H., Nagatomo, H., Yamasaki, N. (1994) Purification and characterization of four Ca^{2+} -dependent lectins from the marine invertebrate, *Cucumaria echinata*. J. Biochem. 116, 209-214.
- [43] Hatakeyama, T., Furukawa, M., Nagatomo, H., Yamasaki, N., Mori T. (1996) Oligomerization of the hemolytic lectin CEL-III from the marine invertebrate *Cucumaria echinata* induced by the binding of carbohydrate ligands. J. Biol. Chem. 271, 16915-16920.
- [44] Unno, H., Goda, S., Hatakeyama, T. (2014) Hemolytic Lectin CEL-III Heptamerizes via a Large Structural Transition from α -Helices to a β -Barrel during the Transmembrane Pore Formation Process. J. Biol. Chem. 18, 12805-12812.
- [45] Hatakeyama, T., Unno, H., Kouzuma, Y., Uchida, T., Eto, S., Hidemura, H., Kato, N., Yonekura, M., Kusunoki, M. (2007) C-type lectin-like carbohydrate recognition of the hemolytic lectin CEL-III containing ricintype-trefoil folds. J. Biol. Chem. 282, 37826–37835.
- [46] Uchida, T., Yamasaki, T., Eto, S., Sugawara, H., Kurisu G., Nakagawa A., Kusunoki, M., 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 mechanism. J. Biol. Chem. 279, 37133-37141.
- [47] Hatakeyama, T., Unno, H., Kouzuma, Y., Uchida, T., Eto, S., Hidemura, H., Kato, N., Yonekura, M., Kusunoki, M. (2007) C-type lectin-like carbohydrate recognition of the hemolytic lectin CEL-III containing ricintype-trefoil folds. J. Biol. Chem. 282, 37826–37835.
- [48] Belogortseva, N.I., Molchanova, V.I., Kurika, A.V., Skobun, A.S., Glazkova, V.E. (1998) Isolation and Characterization of New GalNAc/Gal-Specific Lectin from the Sea Mussel *Crenomytilus Grayanus*. Comp. Biochem. Physiol. C. Pharmacol. Toxicol. Endocrinol. 119, 45-50.
- [49] Xue, Z., Pang, Y., Liu, X., Zheng, Z., Xiao, R., Jin, M., Han, Y., Su, P., Lv, L., Wang, J., Li, QW. (2013) First evidence of protein G-binding protein in the most

primitive vertebrate: Serum lectin from lamprey (*Lamprea japonica*). Dev. Comp. Immunol. 41, 618-630.

[50] Zuschin, M. (2009) Book Review of “Phylogeny and Evolution of the Mollusca” by Ponder, W.F. & Lindberg, D.R. Marine Ecology: an evolutionary perspective 30, 269

[51] Loker, E.S., Adema, C.M., Zhang, S.M., Kepler, T.B. (2004) Invertebrate immune systems not homogeneous, not simple, not well understood. Immunol Rev. 198, 10-24.

[52] Miller RL, Collawn JF Jr, Fish WW. (1982) Purification and macromolecular properties of a sialic acid-specific lectin from the slug *Limax flavus*. J Biol Chem. 257, 7574-7580.

[53] L Wang, L Wang, M Huang, H Zhang, L Song. (2011) The immune role of C-type lectins in molluscs. ISJ 8: 241-246

[54] Wei, X., Liu, X., Yang, J., Wang, S., Sun, G., Yang, J. (2015) Critical roles of sea cucumber C-type lectin in non-self recognition and bacterial clearance. Fish Shellfish Immunol. 45, 791-799.

[55] Li, H., Zhang, H., Jiang, S., Wang, W., Xin, L., Wang, H., Wang, L., Song, L. (2015) A single-CRD C-type lectin from oyster *Crassostrea gigas* mediates immune recognition and pathogen elimination with a potential role in the activation of complement system. Fish Shellfish Immunol. 44, 566-575.

[56] Yokoyama, K., Sato, M., Haneda, T., Yamazaki, K., Kitano, T., Umetsu, K. (2014) An N-acetyllactosamine-specific lectin, PFA, isolated from a moth (*Phalera flavescens*), structurally resembles an invertebrate-type lysozyme. Insect Biochem Mol Biol. 54, 106-111.

[57] Fragkiadakis, G. A. (2000) Isolation of lectins from hemolymph of decapod crustaceans by adsorption on formalinized erythrocytes. J Biochem Biophys Methods. 44, 109-114.

[58] Smith, P.K., Krohn, R.L. (1985) Measure of protein using bicinchoninic acid. Anal. Biochem. 150, 76-85.

- [59] Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- [60] Dion, A. S., Pomenti, A. A. (1983) Ammoniacal silver staining of proteins: Mechanism of glutaraldehyde enhancement. *Anal. Biochem.* 129, 490-496.
- [61] Heukeshoven, J., Dernick, R. (1985) Simplified method for silver staining of proteins in polyacrylamide gels and the mechanism of silver staining. *Electrophoresis* 6, 103-112.
- [62] Walker, J. M. (2002) *The protein protocols handbook*. 2Da Edición. Human Press. pp. 711-730.
- [63] Merril, C.R., Dunau, M.L., Goldman, D. (1981) A rapid sensitive silver stain for polypeptides in polyacrylamide gels. *Anal Biochem.* 110, 201-207.
- [64] Boivin, S., Kozak, S., Meijers, R. (2013) Optimization of protein purification and characterization using Thermofluor screens. *Protein Expr Purif.* 91,192-206.
- [65] Ericsson, U.B., Hallberg, B.M., Detitta, G.T., Dekker, N., Nordlund, P. (2006) Thermofluor-based high-throughput stability optimization of proteins for structural studies. *Anal Biochem.* 357, 289-98.
- [66] Kim, D.E., Chivian, D., Baker, D. (2004) Protein structure prediction and analysis using the Robetta server. *Nucleic Acids Res.* 32(Web Server issue), W526-31.
- [67] Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J. (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol.* 215, 403-10.
- [68] Lovell, S.C., Davis, I.W., Arendall, W.B. 3rd, de Bakker, P.I., Word, J.M., Prisant, M.G., Richardson, J.S., Richardson, D.C. (2003) Structure validation by Calpha geometry: phi,psi and Cbeta deviation. *Proteins.* 50, 437-450.
- [69] Chen, V.B., Arendall, W.B. 3rd, Headd, J.J., Keedy, D.A., Immormino, R.M., Kapral, G.J., Murray, L.W., Richardson JS, Richardson DC. (2010) MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 66, 12-21.

- [70] Pettersen, E.F., Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, Ferrin TE. (2004) UCSF Chimera-a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem.* 25, 1605-1612.
- [71] Emsley, P., Lohkamp, B., Scott, W.G., Cowtan, K. (2010) Features and development of Coot. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 66, 486-501.
- [72] de Beer, T.A., Berka, K., Thornton, J.M., Laskowski, R.A. (2014) PDBsum additions. *Nucleic Acids Res.* 42(Database issue), D292-296.
- [73] Artimo, P., Jonnalagedda, M., Arnold, K., Baratin, D., Csardi, G., de Castro, E., Duvaud, S., Flegel, V., Fortier, A., Gasteiger, E., Grosdidier, A., Hernandez, C., Ioannidis, V., Kuznetsov, D., Liechti, R., Moretti, S., Mostaguir, K., Redaschi, N., Rossier, G., Xenarios, I., Stockinger, H. (2012) ExPASy: SIB bioinformatics resource portal, *Nucleic Acids Res*, 40(W1), W597-W603,
- [74] Walsh, I., Seno, F., Tosatto, S.C.E., Trovato, A. (2014) PASTA2: An improved server for protein aggregation prediction. *Nucleic Acids Research*, 42(Web Server issue), W301-307.
- [75] Conchillo-Solé, O., de Groot, N.S., Avilés, F.X., Vendrell, J., Daura, X., Ventura, S. (2007) AGGRESCAN: a server for the prediction and evaluation of "hot spots" of aggregation in polypeptides. *BMC Bioinformatics.* 8, 65.
- [76] Hamby, S.E., Hirst, J.D. (2008) Prediction of Glycosylation Sites Using Random Forests. *BMC Bioinformatics*, 9, 500.
- [77] Grosdidier, A., Zoete, V., Michielin, O. (2011) SwissDock, a protein-small molecule docking web service based on EADock DSS. *Nucleic Acids Res.* 39 (Web Server issue), W270-277.
- [78] Yang, J., Roy, A., Zhang, Y. (2013) Protein-ligand binding site recognition using complementary binding-specific substructure comparison and sequence profile alignment. *Bioinformatics*, 29, 2588-2595.

- [79] Cooper, E.L. (2010) Evolution of immune systems from self/not self to danger to artificial immune systems (AIS). *Phys. Life Rev.* 7, 55-78.
- [80] Boraschi, D. (2014) How Innate and Adaptive Immunity Work. In: *Nanoparticles and the Immune System, Safety and Effects*. Boraschi, D. and Duschi, A. (Eds). Academic Press 1-7 pp.
- [81] Kurtz, J. (2004) Memory in the innate and adaptive immune systems. *Microbes Infect.* 6, 1410-1417.
- [82] Kurtz, J., Franz, K. (2003) Evidence for memory in invertebrate immunity. *Nature* 425, 37-38.
- [83] Rodríguez-Romero, A., Ravichandran, K.G., Soriano-García, M. (1991) Crystal structure of hevein at 2.8 Å resolution. *FEBS Lett.* 291, 307-309.
- [84] Gilbride, K.J., Pistole, T.G. (1979) Isolation and characterization of a bacterial agglutinin in the serum of *Limulus polyphemus*. *Prog Clin Biol Res.* 29, 525-535.
- [85] Kawsar, S.M., Fujii, Y., Matsumoto, R., Ichikawa, T., Tateno, H., Hirabayashi, J., Yasumitsu, H., Dogasaki, C., Hosono, M., Nitta, K., Hamako, J., Matsui, T., Ozeki, Y. (2008) Isolation, purification, characterization and glycan-binding profile of a D-galactoside specific lectin from the marine sponge, *Halichondria okadai*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* 150, 349-357.
- [86] Dutta, S., Sinha, B., Bhattacharya, B., Chatterjee, B., Mazumder, S. (2005) Characterization of a galactose binding serum lectin from the Indian catfish, *Clarias batrachus*: possible involvement of fish lectins in differential recognition of pathogens. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* 141, 76-84.
- [87] Wei, X., Liu, X., Yang, J., Wang, S., Sun, G., Yang, J. (2015) Critical roles of sea cucumber C-type lectin in non-self recognition and bacterial clearance. *Fish Shellfish Immunol.* 45, 791-799.
- [88] Ali, M.H., Imperiali, B. (2005) Protein oligomerization: How and why. *Bioorg Med Chem.* 13, 5013-5020.

- [89] Reed, C.J., Lewis, H., Trejo, E., Winston, V. and Evilia, C (2013) Protein Adaptations in Archaeal Extremophiles. *Archaea*, Article ID 373275, 14 pp.
- [90] Gotte, G., Libonati, M. (2014) Protein Oligomerization, Oligomerization of Chemical and Biological Compounds, Claire Lesieur (Ed.), ISBN: 978-953-51-1617-2.
- [91]. Garnham, C.P., Campbell, R.L., Walker, V.K., Davies, P.L. (2011) Novel dimeric β -helical model of an ice nucleation protein with bridged active sites. *BMC Struct Biol.* 11, 36.
- [92] LeVine, D., Kaplan, M.J., Greenaway, P.J. (1972) The purification and characterization of wheat-germ agglutinin. *Biochem. J.* 129, 847-856.
- [93] Patel, S., Cudney, B., McPherson, A. (1995) Polymeric precipitants for the crystallization of macromolecules. *Biochem Biophys Res Commun.* 207, 819-828.
- [94] Back, J.F., Oakenfull, D., Smith, M.B., (1979) Increased thermal stability of proteins in the presence of sugars and polyols. *Biochemistry* 18, 5191–5196.
- [95] Parsegian, V.A., Rand, R.P., Rau, D.C., 2000. Osmotic stress, crowding, preferential hydration and binding: a comparison of perspectives. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97, 3987–3992.
- [96] Kumar, V., Chari, R. (2011) Modulation of the thermodynamic stability of proteins by polyols: Significance of polyol hydrophobicity and impact on the chemical potential of water. *Int J Pharm.* 413, 19-28.
- [97] Palm-Espling, M.E., Niemiec, M.S., Wittung-Stafshede, P. (2012) Role of metal in folding and stability of copper proteins in vitro. *Biochim Biophys Acta.* 1823, 1594-1603.
- [99] Miyakane, M. (2005) *The Composition of Sea-Water Comparative and Descriptive Oceanography.* Harvad University Press, USA C 4 Pag. 80-88.
- [100] Stepanenko, O., Fonin, A., Stepanenko, O., Kuznetsova, I., Turoverov, K. (2012) *Ligand-Binding Proteins: Structure, Stability and Practical Application*, Protein Structure, Dr. Eshel Faraggi (Ed.), ISBN: 978-953-51-0555-8, InTech, Available from: <http://www.intechopen.com/books/proteinstructure/ligand-binding-proteins-structure-stability-and-practical-application>

[100] Uversky, V.N. (2011) Intrinsically disordered proteins from A to Z. *Int J Biochem Cell Biol.* 43, 1090-1103.

[101] Lisowska, E., Jaskiewicz, E. (2012) Protein Glycosylation, an Overview. In: *eLS.* John Wiley & Sons, Ltd: Chichester. DOI: 10.1002/9780470015902.a006211.pub3

[102] Spiro, R.G. (2002) Protein glycosylation: nature, distribution, enzymatic formation, and disease implications of glycopeptide bonds. *Glycobiology.* 12, 43R-56R.

[103] Kaushik, S., Mohanty, D., Surolia, A. (2011) Role of glycosylation in structure and stability of *Erythrina corallodendron* lectin (EcorL): a molecular dynamics study. *Protein Sci.* 20, 465-481.

[104] Zeng, J., Gao, X., Dai, Z., Tang, B., Tang, X.F. (2014) Effects of metal ions on stability and activity of hyperthermophilic pyrolysin and further stabilization of this enzyme by modification of a Ca²⁺-binding site. *Appl Environ Microbiol.* 80, 2763-2772.

[105] Bortolato, M., Besson, F., Roux, B. (1999) Role of metal ions on the secondary and quaternary structure of alkaline phosphatase from bovine intestinal mucosa. *Proteins.* 37, 310-318.

[106] Habeeb, A. (1972) Reaction of protein sulfhydryl group with Ellmans reagent. *Enzymology.* 34, 457-464.

[107] Mertens, M.D., Bierwisch, A., Li, T., Gütschow, M., Thiermann, H., Wille, T., Elsingerhorst, P.W. (2015) A novel fluorogenic probe for the investigation of free thiols: application to kinetic measurements of acetylcholinesterase activity. *Toxicol Lett.* S0378-4274, 30076

[108] Huh, J.H., White, A.J., Brych, S.R., Franey, H., Matsumura, M. (2013) The identification of free cysteine residues within antibodies and a potential role for free cysteine residues in covalent aggregation because of agitation stress. *J Pharm Sci.* 102, 1701-11

[109] Brych, S.R., Gokarn, Y.R., Hultgen, H., Stevenson, R.J., Rajan, R., Matsumura, M. (2010) Characterization of antibody aggregation: role of buried, unpaired cysteines in particle formation. *J Pharm Sci.* 99, 764-781.