



**CENRO DE INVESTIGACION Y ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO
POLITECNICO NACIONAL**

UNIDAD IRAPUATO

**“PRODUCCIÓN DE UNA LECTINA RECOMBINANTE DE FRIJOL
TÉPARI (*Phaseolus acutifolius*) CON EFECTO CITOTÓXICO
SOBRE CÉLULAS DE CÁNCER DE COLON”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

MAESTRO EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA

DANIA MARTÍNEZ ALARCÓN

DIRIGIDA POR

Dr. ALEJANDRO BLANCO LABRA

Y

Dra. TERESA GARCÍA GASCA

Guanajuato, México
Noviembre 2017



**CENRO DE INVESTIGACION Y ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO
POLITECNICO NACIONAL**

**“PRODUCCIÓN DE UNA LECTINA RECOMBINANTE DE
FRIJOL TÉPARI (*Phaseolus acutifolius*) CON EFECTO
CITOTÓXICO SOBRE CÉLULAS DE CÁNCER DE COLON”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

MAESTRO EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA

DANIA MARTÍNEZ ALARCÓN

DIRIGIDA POR

Dr. ALEJANDRO BLANCO LABRA

Y

Dra. TERESA GARCÍA GASCA

SINODALES

Dr. Alejandro Blanco Labra

Dra. Margarita Teresa de Jesús García Gasca

Dra. June Kilpatrick Simpson Williamson

Dr. Alfredo Herrera Estrella

Guanajuato, México
Agosto, 2017

El presente trabajo fue realizado en el Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV) Unidad Irapuato y la Universidad Autónoma de Querétaro bajo de codirección del Dr. Alejandro Blanco Labra y la Dra. Teresa García Gasca, con la colaboración de los doctores John Gatehouse, Elaine Fitches y Stefan Przyborski de la Universidad de Durham UK.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico a través de la beca 708416, que permitió realizar este proyecto.

A mis directores de tesis, Dra. Teresa García Gasca y Dr. Alejandro Blanco Labra, por darme la oportunidad de pertenecer a su equipo de trabajo y sentar en mí las bases de responsabilidad y deseos de superación, por impulsarme a seguir adelante en los momentos difíciles y nunca dejarme sola, pero sobre todo, quiero agradecerles por enseñarme a no conformarme y a tener confianza en mí misma. Con plena certeza puedo decir que es gracias a ustedes que hoy soy lo que soy, gracias a ustedes tengo grandes sueños y ambiciones poderosas que confié en que me permitirán llegar muy lejos en la vida. No me bastan las palabras para expresarles la dicha que siento de haber sido su estudiante, más que mis asesores, ustedes han sido parte de mi familia y siempre tendrán un lugar muy especial en mis memorias y en mi corazón. Espero algún día tener la fortuna de volver a trabajar juntos.

A mis sinodales, Dra. Simpson Williamson June y Dr. Herrera Estrella Alfredo. Quiero agradecer a ustedes por su confianza, entusiasmo y por sus valiosas aportaciones a este proyecto. Sin lugar a dudas, su pensamiento crítico y cuestionamientos, fueron piezas clave en la búsqueda de respuestas más allá de lo evidente.

A nuestros colaboradores, Dra. Fitches Elain, Dr. Gatehouse Jhon y Dr. Przyborski Stefan. Agradezco por darme la oportunidad de trabajar en sus laboratorios para compartir conmigo sus conocimientos y contribuir a la maduración de mis habilidades científicas.

A mi familia, por su apoyo y paciencia a lo largo del desarrollo de este proyecto y por nunca perder la fe en mí. Por ser mi fuente de inspiración y el motor que me impulsa a seguir adelante cada día.

A Rodrigo Escobar Díaz Guerrero, por ser un pilar en tiempos adversos y permitirme compartir alegrías y logros en los buenos momentos. Por permanecer siempre presente, incluso a la distancia, y estar dispuesto a cruzar el mundo para hacerme compañía mientras sigo en la búsqueda de mi camino.

A Carlos De Blas Pérez, por su ayuda y asesoramiento para la construcción de las simulaciones de la interacción lectina-carbohidrato.

A los técnicos Elizabeth Mendiola y Josué López por su asesoría y apoyo para la realización de experimentos.

Al personal administrativo, especialmente a Dora Anguiano, Diana Barbosa y José Eduardo Mejía por su apoyo incondicional para el trámite de las becas que hicieron posible realizar este proyecto.

A mis compañeros de los diferentes laboratorios donde se llevó a cabo este proyecto, por las experiencias compartidas, su apoyo y sus aportaciones.

A mis compañeros y amigos que estuvieron presentes en las etapas más representativas de mi formación, siempre dispuestos a apoyarme y alentarme a seguir adelante.

DEDICATORIA

Quiero dedicar este trabajo a la mujer que día a día me demuestra que hay que ser valiente y esforzarse por alcanzar nuestros sueños, que no hay esperanzas perdidas y que debemos seguir adelante pese a cualquier pronóstico.

Con todo mi amor para la mujer que me ha enseñado el fino arte de desafiar a la vida.

Gracias mamá.

INDICE GENERAL

Contenido	Página
ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE CUADROS	iv
ÍNDICE DE FIGURAS	v
RESUMEN	
1 INTRODUCCIÓN	1
2 ANTECEDENTES	2
2.1 LECTINAS	2
2.1.1 Estructura y reconocimiento de carbohidratos	2
2.1.2 Síntesis y procesamiento de lectinas	4
2.1.3 Clasificación de lectinas	6
2.1.4 Lectinas de leguminosas.....	7
2.2 LECTINAS DE LEGUMINOSAS Y CÁNCER.....	8
2.3 FRIJOL TÉPARI.....	10
2.4 LECTINAS DE FRIJOL TÉPARI.....	11
2.5 PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LECTINAS DE FRIJOL TÉPARI	13
2.6 PRODUCCIÓN DE LECTINAS RECOMBINANTES	14
2.7 LEVADURAS COMO SISTEMAS DE PRODUCCIÓN DE LECTINAS RECOMBINANTES...	16
3 JUSTIFICACIÓN	18
4 HIPÓTESIS	19
5 OBJETIVOS	20
5.1 GENERAL	20
5.2 ESPECÍFICOS	20
6 MATERIALES Y MÉTODOS	21
6.1 MATERIALES	21
6.1.1 Fracción concentrada de lectina (FCL) de frijol Tépari.....	21
6.1.2 Eritrocitos	21
6.1.3 <i>Pichia pastoris</i>	21
6.1.4 <i>Escherichia coli</i>	21
6.1.5 Anticuerpos	22
6.1.6 Plásmidos.....	22
6.2 MÉTODOS.....	22
6.2.1 Electroforesis de ácidos nucleicos	22

6.2.2	Electroforesis desnaturalizante de proteínas (SDS-PAGE)	23
6.2.3	Construcción del vector.....	23
6.2.4	Transformación de <i>Pichia pastoris</i>	24
6.2.5	Escrutinio de la producción	25
6.2.6	Preparación del preinóculo.....	25
6.2.7	Producción	26
6.2.8	Purificación.....	26
6.2.9	Cuantificación de proteína total.....	26
6.2.10	Determinación de tamaño molecular.....	26
6.2.11	Determinación de la secuencia polipeptídica	27
6.2.12	Determinación de la capacidad de oligomerización	27
6.2.13	Identificación de las glicosilaciones presentes en la lectina recombinante	27
6.2.14	Determinación de los residuos glicosilados	28
6.2.15	Determinación de actividad aglutinante	28
6.2.16	Determinación del efecto citotóxico.....	29
6.2.17	Identificación morfológica de la inducción de apoptosis.....	30
6.2.18	Monitoreo de la fragmentación del material genético como evidencia de apoptosis temprana.....	30
6.2.19	Análisis bioinformático	31
6.2.20	Elaboración de mutantes	31
6.2.21	Purificación y caracterización bioquímica de mutantes.....	33
6.2.22	Evaluación del efecto citotóxico de las mutantes	33
7	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	34
7.1	CLONACIÓN DEL GEN DE LA LECTINA EN EL VECTOR PGAPAZB.	34
7.2	TRANSFORMACIÓN DE <i>PICHIA PASTORIS</i>	36
7.3	FERMENTACIÓN	36
7.4	REPRODUCIBILIDAD DEL PROCESO.	39
7.5	CARACTERIZACIÓN DE LA LECTINA RECOMBINANTE	40
7.5.1	Contribución de la cola de histidinas al incremento de tamaño de la LR ...	41
7.5.2	Contribución al incremento de tamaño de la LR de los residuos provenientes del corte impreciso del factor- α	42
7.5.3	Caracterización de glicosilaciones y estimación de su contribución el incremento de tamaño en la LR	43
7.5.4	Conformación multimérica de la LR	46
7.6	ACTIVIDAD AGLUTINANTE Y CONFORMACIÓN MULTIMÉRICA DE LA LR	48
7.7	EFEECTO CITOTÓXICO SOBRE CÉLULAS DE CÁNCER	49
7.8	DETERMINACIÓN DEL EFECTO APOPTÓTICO DE LA LECTINA RECOMBINANTE	50
7.9	RELACIÓN MOLECULAR DEL EFECTO ANTICANCERÍGENO DE LR Y LN2	52
7.9.1	Identidad y evolución entre lectinas de leguminosas	53

7.9.2	Identificación de los posibles residuos responsables del efecto citotóxico LR y LN2.....	56
7.9.3	Posibles interacciones con ácido siálico.	57
7.9.4	Construcción de lectinas mutantes	58
7.9.5	Fermentación y purificación de mutantes.....	59
7.9.6	Caracterización de las mutantes	60
8	CONCLUSIONES	63
9	REFERENCIAS.....	65

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Sistemas de clasificación de lectinas	7
2	Concentración letal 50 de lectinas de leguminosas sobre líneas celulares de cáncer de colon.	10
3	Producción de lectinas vegetales mediante modificación genética de <i>Pichia pastoris</i>	17
4	Diseño de oligos para la construcción de mutantes	31
5	Análisis de las lectinas de leguminosas que muestran mayor porcentaje de identidad con la secuencia de la lectina recombinante	54

ÍNDICE DE FIGURAS

Cuadro		Página
1	Interacción entre DRC y glúcidos	3
2	Residuos responsables de las interacciones de PHA:L y PHA:E con azúcares y cationes	4
3	Interacciones entre monómeros y ligandos de la fitohemaglutinina de <i>Phaseolus vulgaris</i>	8
4	Planta de frijol Tépari	11
5	Perfil electroforético de la FCL	12
6	Esquema de la amplificación para construcción de mutantes.	32
7	Inserción del gen de la lectina en el vector pGAP α ZB.	35
8	Fusión de la secuencia codificante de la lectina con el "Factor- α ".	35
9	Transformación de <i>Pichia pastoris</i> e identificación de la producción de la proteína	36
10	Estimación de la producción total de lectina recombinante	37
11	Purificación de la lectina recombinante	39
12	Validación de la reproducibilidad del proceso	41
13	Comparación de la lectina recombinante con la FCL	42
14	Caracterización de las glicosilaciones presentes en la lectina recombinante	44
15	Identificación de la posición para la antena <i>N</i> -glucosúrica de LR	45
16	Evaluación de la capacidad de la LR para presentarse en forma oligomérica	47
17	Ensayo de actividad aglutinante	49
18	Efecto citotóxico de LR sobre células de cáncer de colon HT29	50
19	Identificación morfológica de apoptosis temprana	51
20	Monitoreo de la fragmentación del ADN	52
21	Análisis filogenético molecular de la evolución de lectinas de leguminosas	55
22	Alineamiento entre las secuencias de LR y leuco-aglutininas de leguminosas	56
23	Posibles interacciones entre ácido sálico y el DRC de la LR	57
24	Construcción de las mutantes y transformación de <i>P. pastoris</i>	58
25	Purificación de Mut103	59
26	Purificación de Mut132	60
27	Caracterización de las mutantes	61
28	Efecto de las mutaciones propuestas sobre la citotoxicidad de LR	62

GLOSARIO

Abreviación	Significado
FCL	Fracción Concentrada de Lectinas
LN1	Lectina Nativa 1
LN2	Lectina Nativa 2
LR	Lectina Recombinante
CL50	Concentración Letal 50

RESUMEN

Se ha demostrado que una fracción concentrada en lectinas (FCL) de frijol Tépari (*Phaseolus acutifolius*) presenta la capacidad de inducir muerte celular programada sobre diferentes tipos de células de cáncer humano, principalmente cáncer de colon y de mama. Dicho efecto, deriva del reconocimiento diferencial que exhiben las lectinas sobre glico-conjugados presentes en la membrana de células sanas y cancerosas, debido a que su interacción con estas últimas es mayor y disminuye el riesgo de daño colateral sobre tejidos circundantes. Al ser administradas de forma oral, las lectinas presentes en la FCL tienen la capacidad de atravesar el tracto gastrointestinal sin ser degradadas por las condiciones de pH y/o las enzimas presentes en estómago e intestino, por lo que han sido consideradas como potenciales agentes quimioterapéuticos para combatir transformaciones malignas del tracto gastrointestinal. Sin embargo, no se utilizan actualmente debido a que el proceso de obtención es costoso, lento y presenta muy bajos rendimientos. Por lo anterior, la finalidad del presente trabajo fue generar un sistema de producción heteróloga independiente del frijol, que constituya una plataforma de obtención continua y permita implementar estrategias que contribuyan a facilitar el proceso de purificación. Para ello, la secuencia codificante de una de las lectinas presuntamente responsables del efecto biológico de la FCL fue acoplada a una cola de hexahistidinas y fusionada en fase con el “factor- α ” de *S. cereviscea* bajo la regulación del promotor constitutivo PGAP. Este material genético se introdujo en la levadura *Pichia pastoris* que, a su vez fue transferida a cultivo líquido bajo condiciones controladas para favorecer la producción de la proteína. El rendimiento final obtenido fue de 316 mg de lectina recombinante (LR)/L de medio de cultivo. Posterior a la purificación se logró obtener una sola proteína de aproximadamente 30.8 kDa que contiene una antena N-glicosídica unida covalentemente a la asparagina¹³ de su secuencia polipeptídica y no posee O-glicosilaciones. Dicha lectina no mostró actividad aglutinante con eritrocitos frescos de conejo sin embargo, su actividad citotóxica sobre células de cáncer de colon se mantuvo similar a su homóloga nativa, con una concentración letal 50 (CL50) aproximada de 2.47 $\mu\text{g/mL}$, la cual es similar a la reportada para la FCL (2.71 $\mu\text{g/mL}$). Finalmente, mediante la elaboración de mutantes de la LR, se logró demostrar que la sustitución conservativa de los residuos Arg132 y Arg103 deriva en una importante disminución de su citotoxicidad sobre células de cáncer de colon, sugiriendo que dichos residuos son fundamentales para el reconocimiento de la lectina sobre los glicoconjugados de células tumorales. Las evidencias encontradas confirman que la estrategia seguida provee una alternativa exitosa para la obtención sintética de las lectinas de la FCL y además abren un abanico de posibilidades para el estudio de las interacciones que se establecen entre dichas lectinas y los glicoconjugados de células transformadas.

Palabras clave: Lectinas, lectina recombinante, *Pichia pastoris*, cáncer.

ABSTRACT

It has been shown that a concentrated fraction in lectins (FCL) of Tepari bean (*Phaseolus acutifolius*) has the ability to induce programmed cell death on different types of human cancer cells, mainly colon and breast cancer. This effect derives from the differential recognition exhibited by lectins on glyco-conjugates present on the membrane of healthy and cancerous cells, because their interaction with the latter is greater and decreases the risk of collateral damage on surrounding tissues. When administered orally, the lectins present in the FCL have the ability to cross the gastrointestinal tract without being degraded by the pH conditions and/or the enzymes present in stomach and intestine, so they have been considered as potential chemotherapeutic agents to fight malignant transformations of the gastrointestinal tract. However, they are not currently used because the procurement process is expensive, slow and has very low yields. Therefore, the purpose of this work was to generate an heterologous production system independent of beans, which constitutes a continuous obtaining platform and allows the implementation of strategies that contribute to facilitate the purification process. For this, the coding sequence of one of the lectins presumably responsible for the biological effect of FCL was coupled to a hexahistidine tail and fused in phase with the " α -factor" of *S. cereviscea* under the regulation of the constitutive PGAP promoter. This genetic material was introduced into the yeast *Pichia pastoris* which, in turn, was transferred to liquid culture under controlled conditions to favor the production of the protein. The final yield obtained was 316 mg of recombinant lectin (LR)/L of culture medium. After purification, it was possible to obtain a single protein of approximately 30.8 kDa that contains an *N*-glycosidic antenna covalently linked to asparagine13 of its polypeptide sequence and does not possess *O*-glycosylations. Said lectin showed no binding activity with fresh rabbit erythrocytes; however, its cytotoxic activity on colon cancer cells remained similar to its native counterpart, with a lethal concentration 50 (LC50) of approximately 2.47 $\mu\text{g} / \text{mL}$, which is similar to that reported for FCL (2.71 $\mu\text{g} / \text{mL}$). Finally, through the development of LR mutants, it was demonstrated that the conservative substitution of the Arg132 and Arg103 residues leads to a significant decrease in their cytotoxicity on colon cancer cells, suggesting that these residues are fundamental for the recognition of the lectin on the glycoconjugates of tumor cells. The evidences found confirm that the strategy followed provides a successful alternative for the synthetic obtaining of FCL lectins and also open a range of possibilities for the study of the interactions that are established between said lectins and the glycoconjugates of transformed cells.

Key words: Lectins, recombinant lectin, *Pichia pastoris*, cancer.

1 INTRODUCCIÓN

Cuando las células sanas sufren transformaciones malignas su maquinaria de glicosilación se ve frecuentemente alterada, lo que lleva a la exposición de glúcidos aberrantes en la superficie de su membrana celular (Dabelsteen, 1996). Algunas lectinas han mostrado tener la capacidad de reconocer dichos oligosacáridos aberrantes y adherirse a ellos para inducir muerte celular programada de forma diferencial entre células sanas y cancerosas. Por lo anterior, se considera que estas moléculas pueden contribuir a reducir los efectos secundarios que presentan la mayoría de los tratamientos quimioterapéuticos sobre tejidos no blanco (Díaz y col., 1999; De Mejía y Prisecaru, 2005; Ferriz-Martínez y col., 2010).

Nuestro grupo de investigación ha encontrado que una fracción concentrada de lectinas (FCL) de frijol Tépari (*Phaseolus acutifolius*) tiene la capacidad de reconocer y provocar la muerte de células de diferentes tipos de cáncer humano (García-Gasca y col., 2012). Estas lectinas presentan baja toxicidad (López-Sánchez y col., 2010; Ferriz-Martínez y col., 2015), e inhiben la tumorigénesis temprana en colon de ratas con cáncer inducido químicamente (Moreno-Celis y col., 2017). También se ha demostrado que, al ser administradas de forma oral, son capaces de atravesar el tracto gastrointestinal sin ser degradadas por las condiciones de pH y/o las enzimas presentes en estómago e intestino (Datos no publicados), lo cual resulta especialmente atractivo y coloca esta fracción de lectinas como un posible tratamiento para combatir transformaciones malignas del tracto gastro-intestinal.

Uno de los inconvenientes asociados al uso de las lectinas de frijol Tépari como medicamento es que, mediante los métodos convencionales de purificación, su porcentaje de recuperación es bajo y el proceso de obtención es lento y costoso. Por ello es imprescindible generar un sistema que permita su obtención a gran escala, sin comprometer su actividad biológica. El presente trabajo muestra una estrategia para la obtención de una lectina bioactiva de frijol Tépari mediante la modificación genética de *Pichia pastoris*.

2 ANTECEDENTES

2.1 Lectinas

Las lectinas son proteínas con al menos un dominio no catalítico capaz de unirse de manera reversible y específica a carbohidratos libres, o bien, enlazados a membranas celulares en forma de glicoproteínas, glicolípidos y polisacáridos (Sharon, 2007; Sharon y Lis, 2002; Tazaki y col., 1995). Su reconocimiento sobre dichos carbohidratos es altamente específico y les confiere a estas proteínas la facultad de aglutinar moléculas y células de forma diferencial (Branco y col., 2004; Ferriz-Martinez y col., 2015). En los últimos años han sido ampliamente utilizadas para la investigación de carbohidratos complejos y los cambios que ocurren en las interacciones celulares durante los procesos fisiológicos y patológicos, manifestando un amplio espectro de aplicaciones industriales y farmacológicas (Ferriz-Martínez y col., 2010).

2.1.1 Estructura y reconocimiento de carbohidratos

Las lectinas poseen estructuras complejas con múltiples dominios que pueden incluir o no grupos prostéticos tales como iones y glicosilaciones, pero su capacidad de unión a carbohidratos se atribuye esencialmente a un módulo típicamente globular, denominado dominio de reconocimiento de carbohidratos (DRC), el cual se encuentra definido por residuos conservados, que determinan su conformación y su función (Weis y Drickamer, 1996; Dodd y Drickamer, 2001). La selectividad del DRC está dada por una combinación entre puentes de hidrógeno con los grupos hidroxilo del azúcar y un embalaje con fuerzas de Van der Waals (Figura 1) que, a menudo, incluye también la cobertura de una cara hidrofóbica del azúcar contra las cadenas laterales de aminoácidos aromáticos (Weis y Drickamer, 1996). La afinidad de una lectina puede verse dramáticamente incrementada con el agrupamiento de sitios de unión individuales, por ejemplo, en oligómeros polipeptídicos de lectina. Además, la geometría de estos multímetros contribuye también a distinguir entre arreglos de polisacáridos de superficie celular y a reticular glicoconjugados (Dodd y Drickamer, 2001).

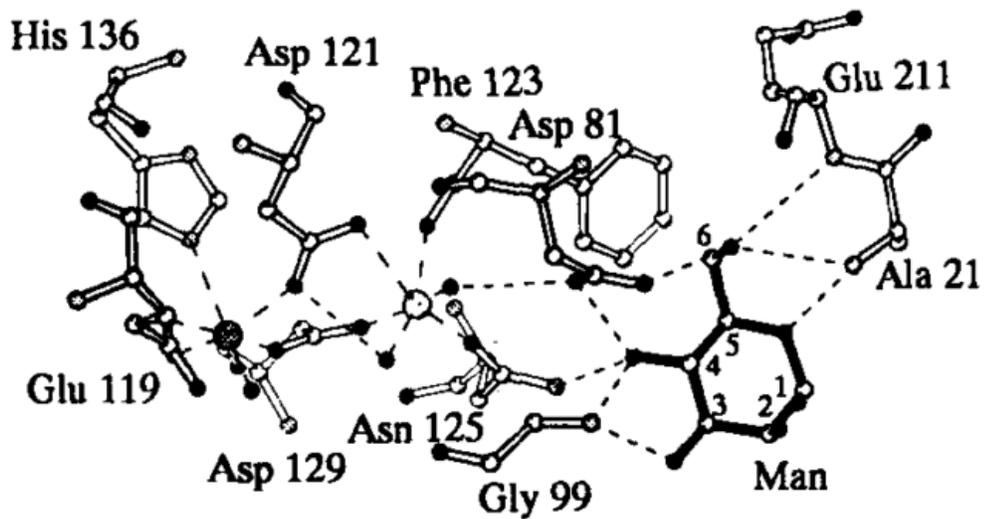


Figura 1. Interacción entre DRC y glúcidos. Vista estereoquímica de la proteína LOL1 unida a la manosa terminal de Man α 1,3Man β 1,4GlcNAc. Los átomos de carbono del residuo de galactosa se presentan numerados, la proteína se muestra con esqueleto abierto mientras que la estructura del azúcar se muestra con el esqueleto relleno. Los círculos blancos, grises y negros representan; carbono, oxígeno y nitrógeno respectivamente. Las líneas punteadas pequeñas representan puentes de hidrógeno, mientras que las líneas con rayas más grandes representan enlaces de coordinación (Weis y Drickamer, 1996).

El rápido avance en las técnicas cristalográficas, ha permitido caracterizar con precisión los DRC de algunas lectinas, tal es el caso de dos fitohemaglutininas de *Phaseolus vulgaris* (PHA:E y PHA:L), para las cuales se encontraron 7 residuos distribuidos a lo largo de su secuencia polipeptídica que convergen espacialmente en la misma hendidura y son responsables de establecer las interacciones con glicoconjugados. (Figura 2) (Dodd y Drickamer, 2001; Nagae y col., 2014).

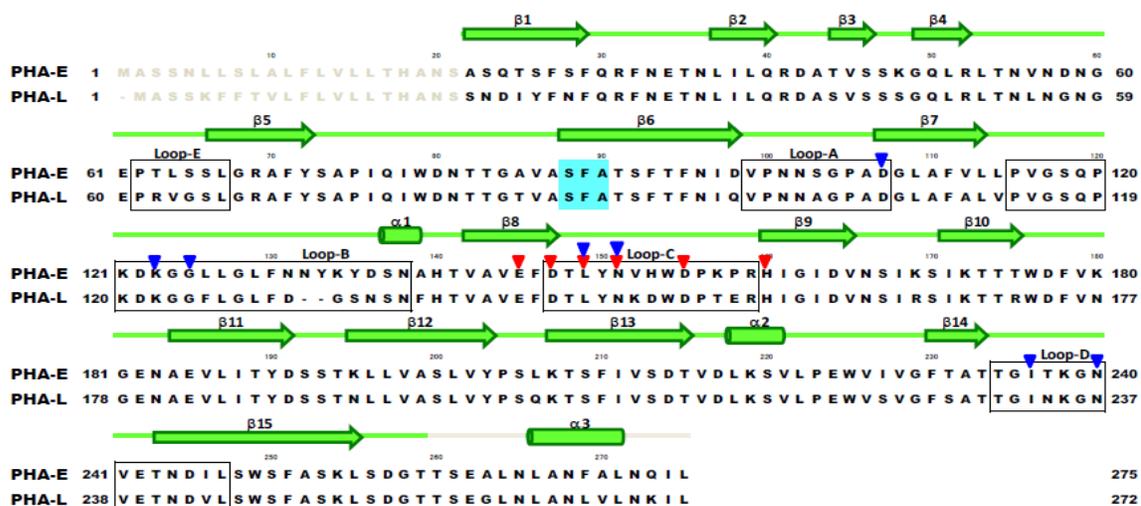


Figura 2: Residuos responsables de las interacciones de PHA:L y PHA:E con azúcares y cationes. Los residuos de aminoácidos implicados en la coordinación del metal y la unión de carbohidratos están indicados por triángulos rojos y azules, respectivamente (Nagae y col., 2014).

2.1.2 Síntesis y procesamiento de lectinas

Los organismos procariontes son relativamente sencillos en cuanto a la síntesis de proteínas se refiere, dado que no disponen de organelos celulares especializados en el post-procesamiento de proteínas complejas. Todas sus proteínas, incluyendo lectinas, son sintetizadas en el citosol, careciendo entonces de puentes disulfuro y modificaciones postraduccionales tales como glicosilaciones (Laursen y col., 2005; Lannoo y col., 2007).

Los eucariontes por otro lado, son significativamente más complejos. Al igual que en procariontes, todas sus proteínas comienzan a ser sintetizadas por ribosomas libres en el citoplasma (Alberts y col., 2002). Algunas de ellas terminan de ser sintetizadas y son descargadas ahí mismo, mientras que otras frenan su traducción debido a que contienen una secuencia conocida como “péptido señal”. El péptido señal es una secuencia hidrofóbica de entre 5 y 30 aminoácidos situada en el extremo *N*-terminal de las proteínas, cuyo destino final es formar parte de organelos celulares, membrana citoplasmática, o ser dirigidas a la vía secretora, durante el inicio de la traducción. Esta secuencia es reconocida por una partícula

de reconocimiento de la señal (SRP) que conduce al complejo ribosoma/proteína hacia la membrana externa del retículo endoplásmico, para acoplarse al receptor de SRP y formar un canal, por donde es introducida la proteína. Al reanudarse la traducción, la proteína en síntesis es dirigida hacia el lumen del RE en donde el “péptido señal” es escindido y comienzan los procesos involucrados en plegamiento y *N*-glicosilación de la proteína (Alberts y col., 2002; Cooper & Hausman, 2010).

Una vez que las proteínas han sido correctamente procesadas en RE, son embebidas en vesículas que las transportan al aparato de Golgi donde continúa la edición de sus antenas *N*-glicosídicas. Ahí tiene lugar el inicio de la *O*-glicosilación, el cual requiere la presencia de residuos de serina o treonina no fosforilados y depende además de la conformación estructural de la proteína ya plegada (Demain y Vaishnav, 2009). A pesar de ser procesos completamente independientes, la *N*-glicosilación no excluye que la *O*-glicosilación se produzca en la misma proteína (Shinder, 2014).

Existen considerables diferencias entre las lectinas eucariontes sintetizadas en RE y aquellas que han sido sintetizadas en el citoplasma. En primer lugar, el lumen del RE es un ambiente altamente oxidante que favorece la formación de enlaces disulfuro (S-S), mientras que el citosol mantiene los residuos de cisteína en su estado reducido (-SH) (Cooper y Hausman, 2010; Singh y col., 2014). Por otro lado, el RE, contiene proteínas accesorias que intervienen en el correcto plegamiento de sus estructuras (Cooper y Hausman, 2010) y dispone de proteasas, necesarias para realizar escisiones sobre los precursores de lectinas que necesitan ser procesadas a su forma funcional, como en el caso de ConA de *Canavalia ensiformis* (Cunningham y col., 1979). Además, es en el RE en donde comienza el proceso de *N*-glicosilación y, en consecuencia, solo las lectinas sintetizadas ahí presentan antenas *N*-glicosídicas en su estructura. Estas lectinas son particularmente resistentes a temperatura y cambios de pH debido a la estabilidad que les confieren los puentes disulfuro y las cadenas de glúcidos unidos a ellas (Halder y col., 2015).

Es importante resaltar que no todas las lectinas sintetizadas en RE se encuentran forzosamente glicosiladas. Para que la *N*-glicosilación tenga lugar, primero se requiere transferir un oligosacárido primario de 14 residuos (2 *N*-acetilglucosaminas, 3 glucosas y 9 manosas) a una secuencia definida como Asn-X-Ser-Thr donde X puede ser cualquier aminoácido excepto prolina. Dicha secuencia es mejor conocida como *tripleto* o *sequon* (Colangelo y col., 1999; Demain y Vaishnav, 2009).

Dada la diversidad de monosacáridos que constituyen los oligosacáridos de las lectinas y por la susceptibilidad de los eventos de glicosilación terminal, existe un importante grado de heterogeneidad estructural entre lectinas, incluso aunque su secuencia polipeptídica está altamente conservada entre especies (Wayne, 2013; Shinder, 2014). Esta heterogeneidad les confiere un gran número de funciones biológicas que pueden ser utilizadas para su clasificación.

2.1.3 Clasificación de lectinas

Las lectinas pueden ser encontradas en todos los reinos incluyendo virus, protozoarios, bacterias, animales y plantas (Branco y col., 2004; Lannoo y col., 2007). Éstas constituyen un grupo muy heterogéneo de proteínas que, si bien, comparten en común la capacidad de unirse selectivamente a carbohidratos, también son muy diferentes entre sí, tanto en estructura como en funciones (Dodd y Drickamer, 2001). A través de los años han surgido diferentes formas de clasificación con base en los siguientes criterios: origen taxonómico, localización celular, especificidad de reconocimiento de carbohidratos, funciones, estructura, entre otras (Lakhtin y col., 2011). Para la mayoría existen parámetros muy bien definidos que permiten considerar las lectinas presentes en todos los seres vivos, sin embargo, las clasificaciones con base en estructura son usualmente establecidas para un conjunto definido de organismos como por ejemplo, lectinas de plantas (Peumans y col., 2001) y lectinas de animales (Kilpatrick, 2002), siendo estas últimas las más comúnmente utilizadas. El Cuadro 1 reúne ejemplos de algunas de estas clasificaciones.

Cuadro 1. Sistemas de clasificación de lectinas

Parámetro	organismo	Familias de lectinas derivadas de la clasificación	Referencia
Localización celular	Todos	Lectinas extracelulares, lectinas intracelulares, lectinas unidas a RE, lectinas unidas a Golgi, lectinas citoplasmáticas, lectinas de unión a membrana, entre otras.	(Lakhtin y col., 2011)
Relaciones evolutivas en sus secuencias y estructuras	Todos	Lectinas tipo beta prisma (tipo B), lectinas dependientes de calcio (tipo C), lectina con dominio Ficolins-Fibrinogeno/colageno (tipo F), lectinas relacionadas con las lectinas de ajo (tipo G), Hyal adherinas (tipo H), lectinas de la superfamilia de las inmunoglobulinas (tipo I), lectinas tipo Jacob (tipo J), lectinas de semillas de leguminosas (tipo L), lectinas relacionadas con α -manosidasa (tipo M), Nucleótido, fosfohidrolasas (tipo N), lectinas tipo ricino (tipo R), lectinas tipo <i>Tachypleus tridentatus</i> (tipo T), aglutininas de germen de trigo (tipo W), lectinas de huevos de <i>Xanopus</i> (tipo X).	(Kumar y col., 2012)
Origen taxonómico	Todos	Lectinas de plantas, lectinas de animales, lectinas de bacterias.	(Lakhtin y col., 2011)
Especificidad a carbohidratos	Plantas y animales	Lectinas de unión a manosa, lectinas de unión a acetamido-2-deoxyglucosa, lectinas de unión galactosa, lectinas de unión a fucosa, entre otras.	(Goldstein y Hayes, 1978)
Función	Microorganismos	Hemagglutininas, adhesinas y toxinas	(Lakhtin y col., 2011)
	Animales	Galectinas, selectinas, collectinas y pentraxinas.	(Kilpatrick, 2002)
Estructura	Animales	Lectinas tipo C, galectinas, lectinas tipo P, lectinas tipo I, pentraxinas, lectinas de unión a heparina, lectinas e la familia de la calnexina y calreticulina, lectinas tipo M, lectinas tipo R, etc	(Kilpatrick, 2002)
	Vegetales	Amarantinas, lectinas tipo nictaba, hevainas, jacalinas, lectinas de leguminosas, lectinas aisladas de monocotiledóneas con afinidad por manosa, lectinas tipo ricino, entre otras.	(Peumans y col., 2001)

2.1.4 Lectinas de leguminosas

Las lectinas aisladas de leguminosas son la familia más grande y mejor caracterizada hasta el momento. Generalmente están constituidas por dos o cuatro subunidades de entre 25 y 30 kDa y presentan una gran homología entre sí (Torres-Arteaga, 2010). Cada subunidad está constituida por doce hojas β antiparalelas conectadas entre sí mediante α -hélices. La mayoría de las lectinas

de leguminosas contienen al menos un *N*-Glicano y son el único grupo de lectinas que contienen cationes divalentes con sitio específico para ligar Ca^{2+} , Mn^{2+} y Mg^{2+} . Estos metales intervienen en las interacciones entre los monómeros y son esenciales para favorecer la unión a carbohidratos (Figura 3) (Makela, 1957).

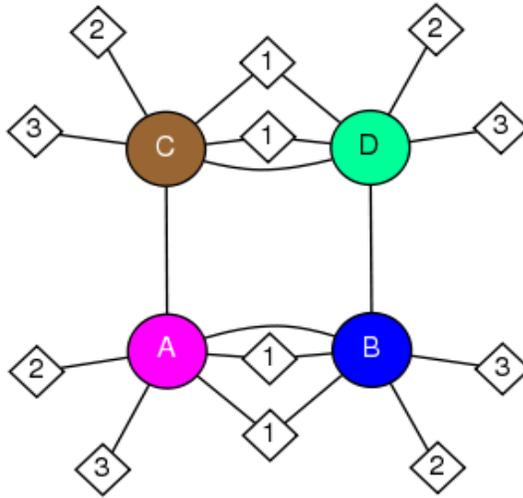


Figura 3. Interacciones entre monómeros y ligandos de la fitohemaglutinina de *Phaseolus vulgaris*. Los círculos representan los monómeros, $\diamond 1$ representa *N*-acetil-D-glucosamina, $\diamond 2$ representa Mn II, $\diamond 3$ representa Ca^{2+} (Hamelryck y col., 1996)

2.2 Lectinas de leguminosas y cáncer

Durante la transformación maligna, la biosíntesis de los oligosacáridos unidos a glicoproteínas de membrana está frecuentemente alterada por lo cual, algunas lectinas presentan la capacidad de adherirse selectivamente a la superficie de células malignas e inhibir su crecimiento y/o inducir su muerte (Dabelsteen, 1996). Es por ello que, en los últimos años, han sido consideradas como potenciales medicamentos contra diferentes tipos de neoplasias (Díaz-González y col., 1999; Checar cita Gonzalez de Mejía y Prisecaru, 2005). En este sentido, las lectinas de leguminosas han recibido mayor atención, debido a sus notables propiedades antitumorales en comparación con las de otras familias (Li y col., 2011).

Se sabe que las lectinas de leguminosas están facultadas para promover la muerte de células transformadas a través de la inducción de procesos tales como la inhibición de angiogénesis, activación del sistema inmune mediante la producción de linfocitos T y la inducción de cascadas pro-apoptóticas, aunque el mecanismo más habitualmente observado es este último (Díaz y col., 1999; González de Mejía y Prisecaru, 2005; Oliveira y col., 2011). Las cascadas pro-apoptóticas mediadas por lectinas pueden ser promovidas por dos mecanismos diferentes:

- a) A través de la unión de la lectina a porciones glicosiladas de receptores de muerte que conducen a activar la transducción de señales apoptóticas a través de la vía extrínseca (Faheina-Martins y col., 2012)
- b) Mediante la interacción de la lectina con la superficie celular, para posteriormente ser endocitada. Este mecanismo les permite, interaccionar directamente con la mitocondria en el interior celular y activar la vía de apoptosis intrínseca (Gastman y col., 2004; Chang y col., 2007; Liu y col., 2009)

Los efectos de las lectinas sobre líneas celulares transformadas son altamente específicos ya que dependen tanto de la fuente de obtención de la lectina como de la línea celular tratada (Ferriz-Martínez y col., 2010). En el caso de PHA:L, por ejemplo, se ha reportado que a una concentración de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, es capaz de inducir la muerte del 75% de células de cáncer de colon de la línea HCT-15, mientras que a esta misma concentración únicamente induce el 25 % de muerte en células de cáncer de colon de la línea SW837 (Kiss y col., 1997). Por otro lado, algunas lectinas que resultan tóxicas a altas concentraciones, tienen el efecto opuesto cuando son administradas en pequeñas dosis, tal es el caso de la lectina de trigo (WGA) y la concanavalina A (ConA), que promueven mitosis sobre células CaCo y HT-29 en concentraciones de 0.5-1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e inducen su muerte a concentraciones más altas (Ryder y col., 1994). El Cuadro 2 reúne información del efecto de algunas lectinas de leguminosas sobre diferentes líneas de cáncer.

Cuadro 2. Concentración letal 50 de lectinas de leguminosas sobre líneas celulares de cáncer de colon.

LECTINA	LINEA CELULAR TRATADA	CL50
WGA		>25 µg/mL
PNA	Células de cáncer de colon, línea HT-29	ND (>100 µg/mL)
UEA1		ND (>100 µg/mL)
ConA		>75 µg/mL
WGA		>10 µg/mL
PNA	Células de cáncer de colon, línea CaCo2	ND (>100 µg/mL)
UEA1		ND (>100 µg/mL)
ConA		>50 µg/mL
PHA;L de P vulgaris		>10 µg/mL
GSA	Células de cáncer de colon, línea HCT15	ND (>100 µg/mL)
ConA		>5 µg/mL
GNA		>5 µg/mL
PNA		ND (>100 µg/mL)
PHA;L de P vulgaris		~100 µg/mL
GSA		~ 100 µg/mL
ConA	Células de cáncer de colon, línea LoVo	>5 µg/mL
GNA		>50 µg/mL
PNA		ND (>100 µg/mL)
PHA;L de P vulgaris		ND (>100 µg/mL)
GSA	Células de cáncer de colon, línea SW837	ND (>100 µg/mL)
ConA		>50 µg/mL
GNA		>8 µg/mL
PNA		ND (>100 µg/mL)
PHA;L de P vulgaris		

*Datos tomados de Ryder y col., 1994 y Kiss y col., 1997. Las concentraciones letales 50 (CL50) no se reportan en los trabajos citados por lo cual, los números mostrados en la presente tabla representan estimaciones calculadas con base en los gráficos reportados.

En nuestro laboratorio se ha demostrado que las lectinas de frijol Tépari (*Phaseolus acutifolius*) tienen la capacidad de inducir apoptosis en líneas celulares de diferentes tipos de cáncer, sin embargo, algunas de estas líneas se ven más afectadas que otras (García-Gasca et al., 2012).

2.3 Frijol Tépari

El frijol Tépari (*Phaseolus acutifolius*) (Figura 4) es una especie de frijol poco común perteneciente a la familia de las *Fabacea*. Se trata de una planta anual de ciclo corto que alcanza su madurez entre 60 y 80 días después su germinación. Su

cultivo potencial se realiza preferentemente en áreas desérticas debido a que presenta una alta resistencia a la sequía, al calor y una gran adaptabilidad a altas concentraciones de sal (Espinoza-Núñez, 2015; Torres-Arteaga, 2010)

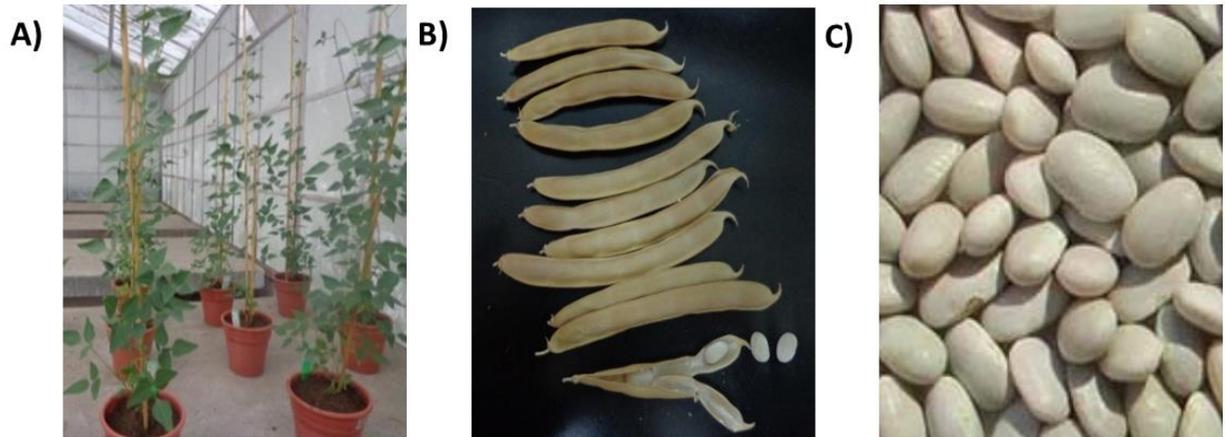


Figura 4. Planta de frijol Tépari. (A) planta de frijol Tépari. (B) hoja y vaina. (C) semilla. (Espinoza-Núñez, 2015).

2.4 Lectinas de frijol Tépari

Los estudios realizados por nuestro grupo de trabajo han encontrado que una fracción rica en lectinas (FCL) obtenida de la semilla de frijol Tépari (*Phaseolus acutifolius*), presenta un potente efecto citotóxico sobre células de diferentes tipos de cáncer humano y murino, entre los que destacan las líneas celulares de cáncer de colon y de mama (García-Gasca et al., 2012). La FCL es una fracción semipura que contiene múltiples proteínas (Figura 5), sin embargo, únicamente dos de ellas (LN1 y LN2) resultan positivas para tinción de glicosilaciones (Torres-Arteaga, 2010).

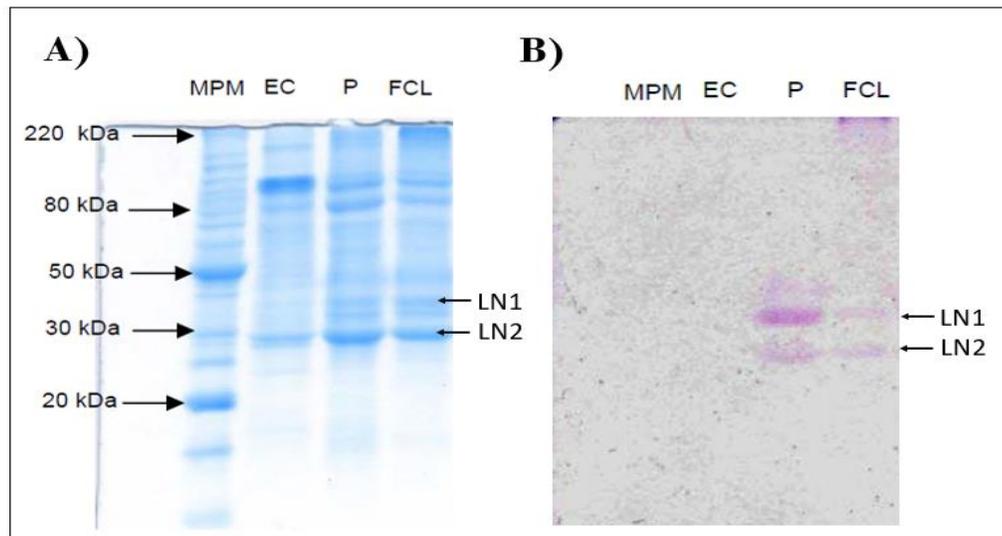


Figura 5. Perfil electroforético de la FCL. A) Perfil electroforético del proceso de purificación de la FCL teñido con azul de Coomasie. MPM son los marcadores de peso molecular, EC extracto crudo, P precipitado y dializado, FCL fracción concentrada de lectinas. B) Perfil electroforético del proceso de purificación de la FCL con tinción de PAS para glicoproteínas. Las proteínas de FCL que poseen glicosilaciones se señalan con flechas negras (LN1 y LN2) (Torres-Arteaga, 2010).

El efecto citotóxico de la FCL sobre fibroblastos murinos transformados (3T3/v-mos) fue 21 veces mayor que con respecto a su contraparte no transformada (3T3-L1), lo que significa que dichas lectinas presentan mayor afinidad para reconocer alteraciones en la superficie de células cancerosas y pueden inducir su muerte a concentraciones por debajo de la dosis necesaria para afectar células sanas (García-Gasca y col., 2012).

El estudio de toxicidad aguda y subcrónica de la FCL reveló buena tolerabilidad sin evidencia de toxicidad sistémica, analizando marcadores hepáticos, renales, pancreáticos y nutricios, al ser administrada por vía intragástrica en ratas a una dosis de 50 mg/kg de peso corporal. Dosis mayores (300 y 2000 mg/kg de peso corporal) presentaron signos clásicos de toxicidad por lectinas tales como diarrea, piloerección y aletargamiento, con total recuperación después de 48 h, en este estudio no se observaron alteraciones histopatológicas en colon, intestino delgado, estómago, hígado, riñones, corazón, pulmones, timo y bazo (López-Sánchez y col., 2010), sin embargo, estudios más recientes mostraron que bajo un esquema de

administración continuo durante 6 semanas existe atrofia en las vellosidades del intestino delgado y focos de cripta del colon así como una hipertrofia pancreática que se revierte después del período de recuperación de dos semanas (Alatorre-Cruz y col., datos no publicados), por lo que actualmente se están llevando a cabo estudios de co-administración con prebióticos para disminuir sus efectos adversos.

La FCL presenta resistencia a la digestión y conserva su actividad biológica incluso después de ser excretada, además es capaz de activar de forma diferencial células del sistema inmune a través del aumento de la relación linfocito-granulocitos y el número de folículos linfoides las placas intestinales de Peyer (Ferriz-Martinez et al., 2015, Alatorre-Cruz y col., datos no publicados).

En ratas con cáncer de colon inducido químicamente se ha observado que la FCL administrada a una dosis de 50 mg/kg de peso inhibe la tumorigénesis temprana y lesiones precancerígenas mediante la inducción de apoptosis y el bloqueo de la vía Akt (Moreno-Celis y col., 2017). Lo anterior resulta particularmente atractivo y coloca esta fracción como un posible tratamiento para combatir transformaciones malignas del tracto gastrointestinal. Sin embargo, una de las principales limitaciones ha sido la obtención de las lectinas bioactivas a partir de su fuente natural.

2.5 Purificación y caracterización de lectinas de frijol Tépari

Debido a la importancia del potencial efecto anticancerígeno que presenta la FCL, existe interés en su caracterización bioquímica y obtención por lo que se ha trabajado en su purificación mediante el uso de diversas estrategias. Una de las técnicas más utilizadas para la purificación de lectinas ha sido la cromatografía de afinidad a sefarosa-oligosacáridos. Sin embargo, debido a la naturaleza propia de la técnica no es posible efectuar la purificación total de una lectina partiendo de un extracto crudo, ya que el resultado deriva siempre en mezclas heterogéneas de diferentes lectinas con afinidad similar a la matriz de sefarosa-oligosacárido. Además, las lectinas bioactivas de frijol Tépari que han sido estudiadas en nuestro

laboratorio no presentan afinidad por los componentes de dichas columnas. Debido a lo anterior, se ha optado por acoplar cromatografías de exclusión de peso molecular y de intercambio iónico para su purificación parcial. Desafortunadamente estas estrategias proveen un bajo rendimiento (García-Gasca y col., 2012). Adicionalmente, estos procedimientos son tardados y costosos, por lo que no representan una estrategia eficiente para la obtención de lectinas bioactivas como fármacos. Por lo anterior, resulta necesario generar un sistema de producción heteróloga que permita incrementar el rendimiento de recuperación de las lectinas bioactivas de la FCL y que además, admita implementar estrategias que contribuyan facilitar su proceso de purificación.

2.6 Producción de lectinas recombinantes

La obtención heteróloga de proteínas podría facilitar el costo efectivo de la producción de lectinas bioactivas con fines farmacéuticos (Patel, 2014). Estos sistemas ofrecen rendimientos más altos en comparación a los mecanismos convencionales de purificación, reducen los costos, disminuyen el tiempo necesario para su obtención y proporcionan productos con propiedades más homogéneas y mejor definidas debido a que se tiene control y pleno conocimiento de la secuencia nucleotídica expresada, además permite el estudio de la relación, secuencia-función por medio de mutagénesis dirigida (Raemaekers y col., 1999; Lannoo y col., 2007; Araújo y col., 2015).

En el caso particular de las lectinas, la adecuada selección de un modelo para producción heteróloga resulta fundamental si se desean mantener las características originales del producto. Lo anterior, en función de que si bien su capacidad de reconocimiento de carbohidratos está dada por su DRC, hay que tener en consideración que algunos dominios aledaños, así como sus componentes no proteicos (tales como glicosilaciones), pueden interferir con la conformación final de su estructura o su capacidad de oligomerización, repercutiendo drásticamente sobre su actividad biológica (Weis y Drickamer, 1996).

En el 2015 como parte de su tesis de licenciatura, Martínez-Alarcón trató de producir heterológamente una de las lectinas presentes en la FCL de frijol Tépari mediante manipulación genética del mismo frijol Tépari, con la intención de mantener el patrón de glicosilaciones nativo para evitar alterar su estructura. Para ello, acopló la región codificante de una de las lectinas presentes en la FCL, la cual corresponde a la banda señalada como LN2 en el perfil electroforético de la misma (Figura 5), y se caracteriza por poseer menos actividad aglutinante que LN1, pero mayor efecto citotóxico sobre células tumorales. Desafortunadamente, a pesar de que la transformación se produjo con éxito y se logró identificar presencia de lectina recombinante en el medio de cultivo, ninguno de los individuos transgénicos fue capaz de llegar a la edad adulta o generar descendencia antes de morir, por lo que el rendimiento obtenido fue bajo y genera la necesidad de buscar modelos alternativos para la producción de estas lectinas.

Los modelos más importantes que se han propuesto hasta el momento para producción heteróloga de lectinas son bacterias y levaduras. Sin embargo, las bacterias se ven desfavorecidas para la producción de lectinas en razón de que son procariontes y no disponen de organelos celulares, para el procesamiento (Demain y Vaishnav, 2009). Otra desventaja de producir proteínas en bacterias es que, aquellas que presentan un gran tamaño o que son expresadas en altas concentraciones, tienden a formar agregados citoplasmáticos insolubles mejor conocidos como “cuerpos de inclusión” (Adar y col., 1997; Demain y Vaishnav, 2009; Singh y col., 2015). Además tienden a ser inactivas y con artefactos estructurales, tales como puentes disulfuro no nativos y cisteínas libres no habituales (Demain y Vaishnav, 2009). Las levaduras por otro lado, son organismos idóneos para la expresión heteróloga de proteínas eucariontes, puesto que combinan la fácil manipulación genética y rápido crecimiento, propio de los organismos procariontes, con una maquinaria subcelular necesaria para realizar modificaciones postraduccionales en forma similar a los organismos superiores (Romanos y col., 1992).

2.7 Levaduras como sistemas de producción de lectinas recombinantes

La comprensión molecular de la fisiología y genética de *S. cerevisiae*, propició que en un inicio se considerara como uno de los sistemas de expresión más promisorios para lectinas recombinantes. Sin embargo, en el caso de las glicoproteínas, existen múltiples inconvenientes asociados al empleo de este modelo, tales como la alta antigénicidad de sus glicosilaciones, la acumulación del producto dentro de vacuolas y citoplasma, el procesamiento incompleto de sus péptidos de señalización y el bajo rendimiento proporcionado por dicho sistema (Chrispeels y Maarten, 1993; Chao y Etzler, 1994; Raemaekers y col., 1999; Demain & Vaishnav, 2009). Debido a esto, *Saccharomyces* ha sido pobremente utilizada para expresión de glicoproteínas y ha sido sustituida por la levadura metiltrófica *Pichia pastoris*, la cual tiene la ventaja de no adicionar el residuo de α -1-3 manosa responsable de la alta naturaleza antigénica de las glicoproteínas secretadas por *S. cerevisiae* y, en su lugar, típicamente adiciona cadenas de Man8 GlcNAc2 y Man9 GlcNAc2 (Barnes & Thorner, 1986; Romanos y col., 1992; Córdoba Ruiz, y col., 2003).

P. pastoris no secreta altas cantidades de proteínas endógenas, por consiguiente las proteínas foráneas secretadas por el cultivo son relativamente puras (Cereghino y Cregg, 2000). Además, el contenido de carbohidratos para las cadenas *N*-oligosacárido en *P. pastoris* parece ser semejante, al menos en tamaño, a los oligosacáridos de los organismos superiores (Lannoo y col., 2007). Actualmente, existen numerosos trabajos que reportan la obtención de lectinas funcionales mediante la manipulación genética de *P. pastoris*. El Cuadro 3 presenta un resumen detallado de dichas investigaciones.

Cuadro 3. Producción de lectinas vegetales mediante modificación genética de *Pichia pastoris*

Lectina	Fuente de origen	Rendimiento	Referencia
PHA:E	<i>Phaseolus vulgaris</i>	0.4 - 1 mg/L	(Raemaekers y col., 1999)
GNA	<i>Galanthus nivalis</i>	1-2 mg/L	(Raemaekers y col., 1999)
ConA	<i>Canavalia brasiliensis lectin:</i>	ND	(Zhao y col., 2009)
Nicataba	<i>Nicotiana tabacum</i>	0.48-6.77 mg/L	(Lannoo y col., 2007)
Frutalina	<i>Artocarpus integrifolia</i>	18-20/L	(Oliveira y col., 2008)
PHA:E	<i>Phaseolus vulgaris</i>	100 mg/L	(Baumgartner y col., 2002)

3 JUSTIFICACIÓN

Nuestro grupo de trabajo ha encontrado que una fracción concentrada en lectinas (FCL) de frijol Tépari posee efecto citotóxico sobre diferentes líneas de cáncer humano. Los estudios *in vivo* muestran un efecto de inducción de apoptosis e inhibición de tumores en etapa temprana. La obtención de la FCL resulta tardada, costosa y con bajos rendimientos. Para que estas lectinas sean consideradas como potenciales medicamentos, es necesario generar un sistema sintético para su obtención a mayor escala, sin comprometer su actividad biológica, libre de isoformas y superando los porcentajes de recuperación y eficiencia de los procesos convencionales.

4 HIPÓTESIS

Es posible generar un sistema heterólogo de producción eficiente que permita obtener una de las lectinas presentes en la FCL de frijol Tépari sin comprometer su actividad biológica.

5 OBJETIVOS

5.1 General

Generar un sistema eficiente de producción continua para una de las lectinas responsables del efecto citotóxico de la FCL de frijol Tépari (*Phaseolus acutifolius*), mediante la modificación genética de *Pichia pastoris*, manteniendo su efecto citotóxico diferencial sobre células de cáncer de colon.

5.2 Específicos

- Diseñar una construcción genética que contenga el gen de la lectina acoplada al factor de secreción “ α -factor” de *Sacharomyces cereviceae* en el extremo 5” y una cola de polihistidinas en el extremo 3”.
- Llevar a cabo la transformación genética de *Pichia pastoris* con la construcción propuesta y realizar un escrutinio de los niveles de producción en 10 diferentes colonias.
- Seleccionar la colonia con mayor expresión de lectina y llevar a cabo una fermentación controlada.
- Determinar la presencia de la lectina recombinante en el medio de cultivo y cuantificar los niveles de expresión de la lectina
- Purificar la lectina recombinante y caracterizar sus propiedades estructurales.
- Evaluar la actividad aglutinante de la lectina obtenida.
- Evaluar su efecto citotóxico sobre células de cáncer de colon HT-29.
- Elaborar mutantes de la lectina recombinante, para avanzar en la comprensión de su mecanismo de acción
- Evaluar la pérdida de función de las lectinas mutantes derivada de los cambios efectuados en cada una de ellas.

6 MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Materiales

6.1.1 Fracción concentrada de lectina (FCL) de frijol Tépari.

La FCL (muestra de referencia). Brevemente, este material fue obtenido mediante su purificación a partir de semillas de frijol Tépari, empleando como solvente de extracción Tris-HCl pH 8.0 a 4°C, posteriormente se realizó una precipitación secuencial con sulfato de amonio al 40 y 60% de saturación y se corrió el extracto proteico en una cromatografía de exclusión de peso molecular con Sephadex G-75 (García-Gasca y col., 2012).

6.1.2 Eritrocitos

Para las pruebas de aglutinación se emplearon eritrocitos frescos de conejo, proporcionados por la Universidad de Durham, UK.

6.1.3 *Pichia pastoris*

Para la producción de las lectinas se utilizó la cepa SMDCC de *Pichia pastoris* la cual es una cepa que expresa una baja cantidad de proteasas y secreta pocas proteínas endógenas al medio de cultivo.

6.1.4 *Escherichia coli*

Para la elaboración de la construcción genética se utilizó la cepa TOP10 de *Escherichia coli*. Esta es una cepa comercial de Invitrogen Life Technologies diseñada para la clonación de alto rendimiento. Esta cepa posee una mutación que apoya la transfección eficiente de ADN metilado. Además, posee una mutación terminal-A1, que ayuda a reducir la actividad endonucleasa lo que repercute positivamente en el rendimiento de transformación y ayuda a reducir la recombinación no deseada.

6.1.5 Anticuerpos

Para la detección de la lectina recombinante en medio de cultivo, se emplearon anticuerpos monoclonales de ratón anti-His y anticuerpos secundarios anti ratón acoplados a peroxidasa de rábano de la casa comercial Novus Biological Europe (Science Park, CAM, UK).

6.1.6 Plásmidos

Se utilizó el plásmido pGAPZ α B de Invitrogen Life Technologies (Carlsbad, CA, EU.), el cual es un plásmido comercial que permite la transformación de *P. pastoris* mediante la recombinación de las secuencias que flanquean el *polylinker*, y en donde, la expresión de los productos clonados se encuentra regulada bajo la acción del promotor constitutivo GAP. Este vector contiene además, un péptido señal para secreción de proteínas de *Saccharomyces cerevisiae* (factor- α) que se traduce como un producto de fusión a la proteína en síntesis, para ser escindido posteriormente por las endopeptidasas presentes en el aparato de golgi de *P. pastoris*. Contiene sitios de replicación tanto para *E. coli* como para *P. pastoris* y un marcador de resistencia a zeocina. .

6.2 Métodos

6.2.1 Electroforesis de ácidos nucleicos

Todos los geles para ADN fueron preparados al 0.8% agarosa y 1% de bromuro de etidio con buffer de corrida TAE 1X. Se empleó Gel Red™, de Biotium (Hayward, CA, EU) como buffer de carga y Gene Ruler™ 1kb ADN de Thermo Fisher Cientific (Pittsburgh, PA, EU.), como marcador de peso molecular. Todas las electroforesis fueron corridas 30 min a 100 mV. Para visualizar el resultado de las corridas se usó un fotodocumentador Gel Doc EZ de la casa comercial Bio-Rad™ (Hercules, CA, EU.).

6.2.2 Electroforesis desnaturalizante de proteínas (SDS-PAGE)

Todas las SDS-PAGE se realizaron en geles de poliacrilamida al 12.5 y 17.5% con una corriente de 200 mV en un equipo Mini-Protean Tetra Electrophoresis Cell de Bio-Rad (Hercules, CA, EU.), usando un marcador de peso molecular de amplio rango. Para visualizar el resultado de las corridas, los geles fueron teñidos con azul de Coomassie durante toda la noche, posteriormente se retiró el exceso de colorante sumergiendo el gel en una solución de metanol/ácido acético (40%/10%, v/v) hasta obtener un perfil nítido de bandeo.

6.2.3 Construcción del vector

Para la clonación del gen de la lectina dentro del vector pGAPZαB se realizó una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando como templete una construcción generada durante la tesis de Martínez-Alarcón (2015), en donde se acopló un péptido señal de secreción de plantas en el extremo 5" y una cola de hexahistidinas en el extremo 3" de la región codificante de la lectina. Los nuevos primers (Da_Forward 5"-TATCTGCAGCATCAGCCAACGACATCTC-3", y Da_Reverse 5"-ATATCTAGACTAATGATGATGATGATGATGATGATTC-3") fueron diseñados para eliminar la región correspondiente al péptido señal y adicionar los sitios de corte PstI y XbaI a los flancos del gen de la lectina.

El resultado de la amplificación se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa según lo descrito con anterioridad. La banda fue cortada y purificada mediante el empleo de un kit comercial de BioLabs "Monarch DNA Gel Extraction #T1020G (Massachusetts, EU), según las indicaciones del fabricante. Tanto el producto obtenido como el vector pGAPZαB fueron digeridos con las enzimas PstI y XbaI a 37° C durante 3 h. Ambas digestiones se hicieron correr en un gel de agarosa al 0.8% y fueron purificadas a partir de las bandas correspondientes. Los productos obtenidos fueron ligados mediante el uso de la ligasa T4 de Fermentas (Ontario, Canadá), en relación 3:1. La reacción fue incubada a 25 °C por 1 h según las instrucciones del fabricante. EL producto de la ligación fue utilizado para transformar células electrocompetentes de *E. coli* TOP10 en un electroporador con

una resistencia de 100 Ohms?, capacitancia de 125 μ Fa y 1.8 Volts. Las células transformadas fueron recuperadas para su crecimiento en placas de medio LB con 15 μ g/mL de zeocina como agente seleccionador y fueron incubadas a 37 °C. A las 24 h, se realizó un escrutinio de clonas mediante PCR de colonia utilizando un juego de primers diseñados para hibridar en secuencias del vector pGAPZ α B que flanquean el sitio de inserción del gen (pGAP_Forward 5'-GTCCCTATTTCAATCAATTGAA-3" y 3"AOX1 5"-GCAAATGGCATTCTGACATCC-3").

Se seleccionó una de las colonias positivas para ser inoculada en medio LB líquido 15 μ g/mL de Zeocina como agente seleccionador. La colonia fue incubada a 37 °C y 200 rpm durante 24 h, posteriormente se centrifugó el cultivo a 11800 gs durante 10 min y se realizó una extracción de plásmidos mediante el uso del kit de la casa comercial de QIAGEN "Gel extraction (250)" (Hilden, Alemania).

Para verificar la inserción del gen dentro del vector se realizó una digestión con las enzimas PstI y XbaI a 37 °C durante 3 h. El resultado de la digestión se verificó en un gel de agarosa al 0.8% y, adicionalmente, se mandó secuenciar el plásmido obtenido al departamento de secuenciación de la universidad de Newcastle, UK.

6.2.4 Transformación de *Pichia pastoris*

Una vez confirmada la secuencia, se digirió el plásmido con la enzima AvrII a 37 °C durante 16 h. La completa linearización del plásmido fue confirmada mediante electroforesis de ácidos nucleicos. Posteriormente se precipitó el ADN con una solución de etanol al 100 % y acetato de amonio 5M a -20 °C durante 16 h. El ADN se centrifugó y se resuspendió en 20 μ L de agua estéril libre de nucleasas, para llevarlo a una concentración >5 μ g/ μ L, la concentración fue confirmada mediante el uso de un NanoDrop 2000c de Thermo Scientific (Hercules, CA, EU.) y electroforesis de ácidos nucleicos. Finalmente se procedió con la transformación de *P. pastoris* mediante el uso del kit Pichia EasyComp™ Transformation Kit de la casa comercial de Thermo Fisher Scientific (Pittsburgh, PA, EU.), según las

indicaciones descritas por el fabricante. Las células transformadas fueron recuperadas para su crecimiento en placas de medio YPG con 50 µg/mL como agente seleccionador y fueron incubadas a 30 °C durante 48 h.

6.2.5 Escrutinio de la producción

Transcurrido el periodo de incubación, se seleccionaron 10 de las colonias que obtenidas y se inoculó cada una en 10 mL de medio YPG líquido, se dejaron crecer 48 h, posteriormente se centrifugaron los cultivos a 11800 gs durante 10 min y el sobrenadante fue recuperado para su posterior análisis.

Para comprobar la presencia de lectina recombinante en los medios de cultivo, los perfiles electroforéticos de los sobrenadantes recolectados fueron transferidos a membranas de nitrocelulosa previamente activadas con TBS 1X. Las membranas fueron teñidas con rojo de Ponceau para evidenciar la posición de los marcadores de tamaño y posteriormente fueron sumergidas en solución de bloqueo (leche en polvo descremada en TBS al 0.1% de tween) durante 1 h. Al finalizar el bloqueo fueron incubadas durante toda la noche con una solución de anticuerpos monoclonales primarios anti-histidinas, en dilución 1:1000 preparados en solución de bloqueo. Al transcurrir 16 h se eliminaron los anticuerpos primarios y se incubaron las membranas durante 2 h en anticuerpos secundarios anti-cabra acoplados a fosfatasa alcalina. Finalmente, las membranas se revelaron empleando quimioluminiscencia. Como control positivo se utilizó GNA recombinante proporcionada por el laboratorio del Dr. Gatehouse de la Universidad de Durham UK

6.2.6 Preparación del preinóculo

Con base en los resultados obtenidos durante el escrutinio de la producción se seleccionó la clona que produjo mayor cantidad de lectina, la cual fue inoculada en 200 mL de medio YPG y se dejó crecer durante 48 h en agitación orbital a 200 rpm y 30 °C.

6.2.7 Producción

Para la producción se utilizó un bioreactor de 7 litros con biocontrolador ez-Control para cultivos microbianos de la casa comercial de Aplikon (Tewkesbury, UK). El preinóculo fue introducido en el reactor de manera gradual mediante el uso de una de las bombas del equipo. El medio se mantuvo a pH 5, 30 °C, con 30% de saturación de oxígeno y adición constante de nutrientes. Transcurridos 4 días el medio fue centrifugado para precipitar el paquete celular y el sobrenadante fue clarificado mediante filtraciones secuenciales con membranas de 100 y 45 µm.

6.2.8 Purificación

El sobrenadante clarificado fue diluido con buffer de fosfatos 4X pH: 7.4 en proporción 1:3 y se hizo fluir por columnas de níquel de 5 mL de la casa comercial Invitrogen (Carlsbad, CA, EU.). Posteriormente las columnas fueron lavadas con un gradiente ascendente de imidazol hasta recuperar el producto deseado. Las fracciones que contenían la lectina fueron dializadas y liofilizadas para su posterior análisis.

6.2.9 Cuantificación de proteína total

La concentración de proteína total en las muestras fue cuantificada por el método de Bradford (1976), utilizando el reactivo de la casa comercial SIGMA Chemical Co (St. Louis, MO, EU). El ensayo se realizó en placas de 96 pozos utilizando una curva patrón de albúmina sérica de bovino (ASB) de 1500 a 150 µg/mL. Tanto la curva como las muestras fueron incubadas 25 min a temperatura ambiente y leídas a 595 nm.

6.2.10 Determinación de tamaño molecular

Para determinar el tamaño molecular de la lectina recombinante y compararla con su homóloga nativa se realizó una SDS-PAGE en geles de poliacrilamida al 17% (Laemmli, 1970) utilizando marcador de tamaño de amplio espectro como referencia.

6.2.11 Determinación de la secuencia polipeptídica

El producto de la traducción, así como los residuos C y N terminales más frecuentes fueron determinados mediante nano-LC-MS/MS dependiente de datos estándar de péptidos trípticos y quimiotrípticos, generados a partir de la digestión de la muestra. Para ello, se utilizó un método de adquisición de espectrómetros de masas dependientes de datos. A lo largo de un gradiente de fase inversa utilizado para la separación de péptidos, los escáneres de MS fueron seguidos utilizando un espectro MS/MS a partir de precursores seleccionados. Las ventanas de exclusión móvil evitaron la readquisición de los mismos precursores durante un período fijo y permitieron recolectar datos de iones menos abundantes.

6.2.12 Determinación de la capacidad de oligomerización

La determinación de la capacidad de oligomerización del producto se determinó mediante electroforesis nativa en geles de poliacrilamida al 17%, como controles positivos se utilizaron 2 lectinas comerciales (PHA y GNA), además de la FCL que se obtuvo mediante purificación a partir de semillas de frijol Tépari por medio de cromatografía de exclusión de tamaño.

6.2.13 Identificación de las glicosilaciones presentes en la lectina recombinante

La desglicosilación de la proteína se llevó a cabo mediante combinaciones de 5 diferentes glicosidasas específicas para O y N -glicosilaciones utilizando el kit Glycoprotein Desglycosylation de la marca comercial de EMD Millipore (Massachusetts, EU), mediante la técnica descrita por el fabricante. La modificación de tamaño derivado de la desglicosilación de las muestras se determinó mediante su perfil electroforético en SDS-PAGE. Para validar dichos resultados, se utilizó la técnica de tinción con reactivo de Schiff-ácido periódico (PAS) de Sigma Chemical (St. Louis, MO, EU), según la técnica descrita por el proveedor. Las glicosidasas utilizadas fueron:

- N-Glicosidasa F: Esta enzima escinde todos los N-oligosacáridos, a menos que el núcleo α 1,3 se encuentre fucosilado.

No hay enzima comparable a la *N*-glicosidasa F para eliminar los azúcares intactos ligados a O. Los monosacáridos deben eliminarse mediante una serie de exoglicosidasas, hasta que sólo el núcleo de G β 1b1,3GalNAc permanezca unido.

- Endo- α -*N*-acetilgalactosaminidasa: Esta enzima separa núcleo común (Gal β 1,3GalNAca) de todas las O- glicosilaciones (solo funciona cuando no tiene adheridos más azucars al núcleo principal).

- α 2-3,6,8,9-Neuraminidasa: Esta enzima corta todos los ácidos siálicos que pudieran estar unidos al núcleo común de las O-Glicosilaciones.

- β 1,4-Galactosidasa: Esta enzima libera solamente galactosa terminal no reductora, unida en beta 1,4, a partir de O- glicosilaciones.

- β -*N*-Acetilglucosaminidasa: Esta enzima rompe todos los residuos de la *N*-acetilglucosamina unidos a β , no reductores, terminales de los O- glicosilaciones.

6.2.14 Determinación de los residuos glicosilados

Para la identificación de la posición de las antenas glúcidas, se utilizó nuevamente la técnica de nano-LC-MS/MS dependiente de datos estándar de péptidos trípticos a partir de muestras +/- tratamiento con enzimas desglicosilantes. Para la desglicosilación de las muestras se utilizó la metodología previamente descrita.

6.2.15 Determinación de actividad aglutinante

Para verificar la actividad aglutinante de la lectina sintética, se realizó un ensayo de aglutinación con eritrocitos frescos de conejo en placas de 96 pozos. Para el ensayo se utilizó PBS como control negativo y como controles positivos; la lectina GNA de *Galanthus nivalis*, adquirida en la casa comercial de sigma, la lectina PHA de *Phaseolus vulgaris*, también suministrada por sigma y la FCL de frijol Tépari, obtenida mediante cromatografía de exclusión de peso molecular. Se prepararon alícuotas de cada muestra en PBS a una concentración de 0.1 mg/mL. La concentración fue verificada mediante densitometría de banda en SDS-PAGE con una curva patrón de GNA a diferentes concentraciones.

En el primer pozo de cada serie se colocaron 100 μ L de cada muestra y en los demás pozos se colocaron 50 μ L de PBS 1X hasta el carril 12. Después se realizaron diluciones dobles seriadas a partir del primer carril, por lo que la cantidad total de proteína de cada muestra en el primer pozo disminuyó a 0.0025 mg totales. Una vez realizadas las diluciones, se colocaron 50 μ L de una solución al 2% de eritrocitos de conejo. Brevemente, se colectaron 5 mL de sangre fresca de conejo en un tubo heparinizado de 10 mL que contenía 5 mL de solución de Alsever´+anticoagulante en proporción 30:1 respectivamente. Se colectaron 40 μ L de la sangre disuelta en el tubo y se mezclaron con 1 mL de buffer PBS 1X, se centrifugó durante 30 s a 8000 rpm y se descartó el sobrenadante. El pellet obtenido fue resuspendido nuevamente en 1 mL de buffer PBS 1X.

La placa de 96 pozos se incubó a 37 °C y transcurridas 2 h se evaluó el resultado del experimento. Las unidades de aglutinación fueron calculadas de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$AE = \frac{2^n}{\text{mg}}$$

Donde AE es la actividad específica aglutinante expresada en unidades por mg de proteína (U/mg), n es la última dilución con aglutinación apreciable y mg es la cantidad de proteína total en el primer pozo (Jaffe, 1980)

6.2.16 Determinación del efecto citotóxico

Para la evaluación del efecto citotóxico se utilizaron líneas celulares humanas de cáncer de colon HT-29. Para el experimento se sembraron 10,000 células por pozo en placas de 48 pozos en 0.5 mL de medio DMEM suplementado al 10% con suero fetal bovino (SFB) y al 1% con L-glutamina. Las células fueron incubadas a 37 °C al 5% de CO₂ y una humedad relativa del 5%, se dejaron llegar al 80% de confluencia. Transcurridas 48 h, se cambió el medio de cultivo por DMEM adicionado con 2% SFB y 1% de L-glutamina con la finalidad de sincronizar las células. A las 24 h, se

retiró el medio y se administró DMEM suplementado al 0.5% con albúmina sérica de bovino (ASB), 1% glutamina y diferentes concentraciones de cada tratamiento, utilizando la fracción concentrada de lectinas como control positivo. Después de 24 h de incubación, el número celular se determinó cosechando las células con tripsina al 0.15% y contándolas con un hemocitómetro (García-Gasca y col., 2012).

6.2.17 Identificación morfológica de la inducción de apoptosis

Para determinar si la LR ejerce su efecto citotóxico a través de un mecanismo apoptótico como el que se ha reportado anteriormente para la FCL, se realizó un ensayo de citotoxicidad en células HT-29, con la dosis mínima de tratamiento (0.25 µg/mL) y se evaluó su morfología al microscopio 24 h posteriores al tratamiento. Para el experimento se utilizó PBS como control negativo y FCL como control positivo. Las células fueron incubadas 24 h y cosechadas para su análisis, posteriormente se evaluó su morfología al microscopio invertido con un objetivo 20X.

6.2.18 Monitoreo de la fragmentación del material genético como evidencia de apoptosis temprana

Se dejaron crecer los cultivos celulares de HT-29 al 80% de confluencia y fueron suministrados con 0.5 µg/mL de LR o FCL. Las muestras se extrajeron a las 4, 8, 12 y 24 h de iniciado el tratamiento, posteriormente fueron fijadas y teñidas mediante la técnica de túnel utilizando el kit "TUNEL Apoptosis Detection" de la casa Merck TM (NJ, EU), conforme a las indicaciones del fabricante. Al revelar el resultado del experimento las muestras fueron teñidas con el colorante DAPI, para poder observar las células sanas. El resultado del experimento se visualizó mediante microscopía de fluorescencia, con filtros verdes y azul/cyan para TUNEL y DAPI, respectivamente. Las imágenes fueron tomadas independientemente en escala de grises, el color y la superposición de las mismas se realizó de manera *in-silico*.

6.2.19 Análisis bioinformático

Para el análisis de secuencias se utilizó el programa "Multiple sequence alignment with hierarchical clustering" (Corpet, 1988)

Para la traducción de las secuencias nucleotídicas a código de aminoácidos y los análisis de restricción, se utilizó el programa "Serial Cloner" 2.1 ([http:// serie basics.free.fr / Home / Home.html](http://serie.basics.free.fr/Home/Home.html)).

Para la visualización de los modelos tridimensionales propuestos para la LR y las mutantes se utilizó el programa RaptorX (Källberg y col., 2012)

Para el modelado de las interacciones entre el DRC de la LR y el ácido sálico se utilizó el paquete UCSF Chimera (Pettersen y col., 2004).

6.2.20 Elaboración de mutantes

Para la construcción de las mutantes se realizaron mutaciones dirigidas mediante el diseño de oligos modificados, los cuales fueron utilizados para efectuar una amplificación inversa del vector previamente construido pGAPZαB+LN2, tal como se esquematiza en la Figura 6. Ambas modificaciones fueron introducidas cerca del extremo 5' de los cebadores reversos, las cuales se indican en rojo. Los juegos de oligos que se diseñaron para cada mutante se resumen en el Cuadro 4.

Cuadro 4. Diseño de oligos para la construcción de mutantes

Proteína	oligo derecho	oligo reverso
Mut103	F.mut103	R.mut103
	5'-GGTCTTCTAGGTCTGTTTCGACGGC-3'	5'-GCC TTG GTCTTTGGGCTTAGAGC - 3'
Mut132	F.mut132	R.mut132
	5'-CAGAGAGCGTCATATTGGCATCG - 3'	5'-GGGTCCCA gTc CTGGTTGTACAAG - 3'

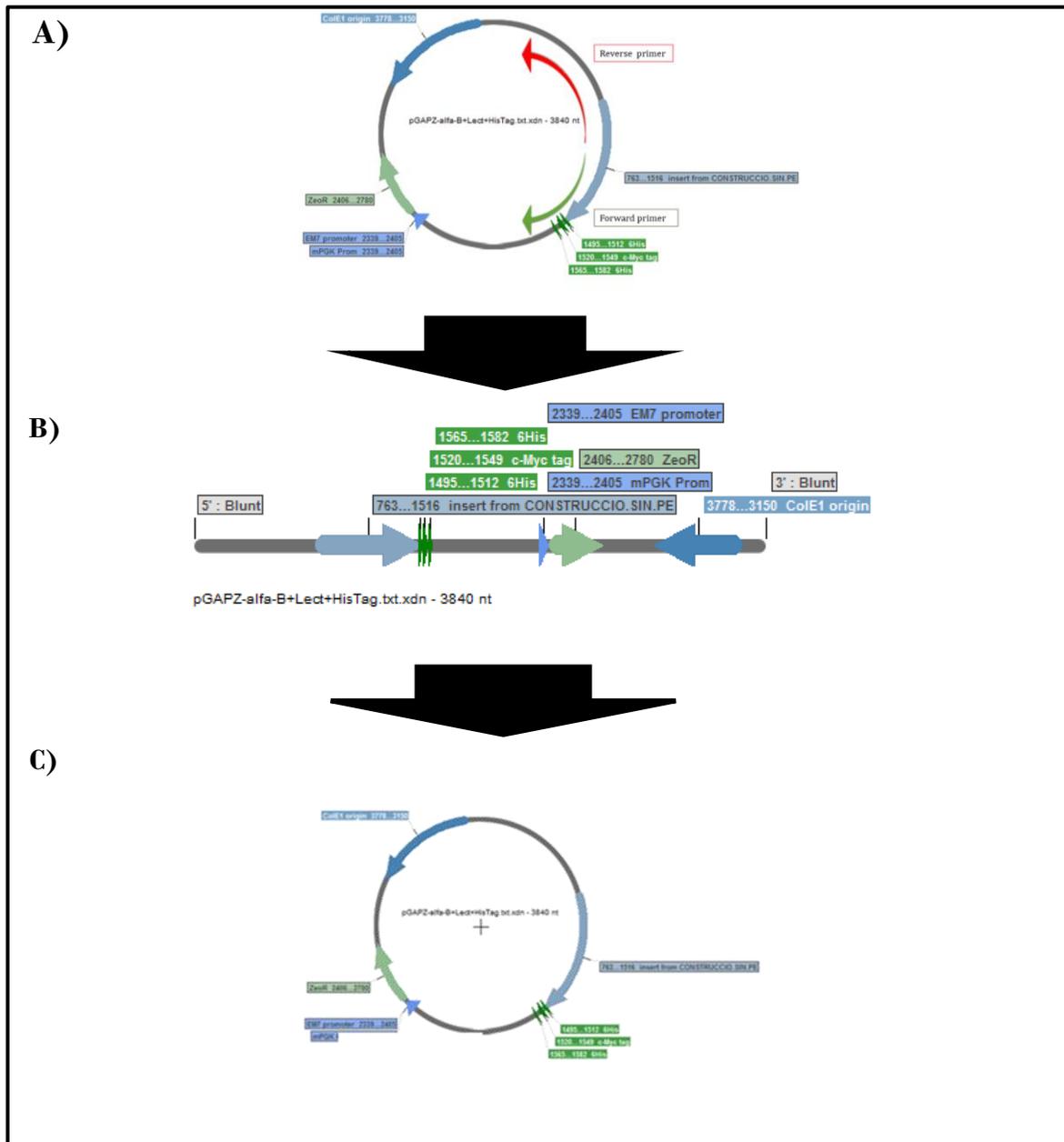


Figura 6. Esquema de la amplificación para construcción de mutantes. A) esquematización de la amplificación reversa de pGAPZ α B+LN2, la flecha verde representa el primer en sentido y la flecha roja el primer en antisentido. B) Resultado esperado de la amplificación. C) Religación del amplicon.

6.2.21 Purificación y caracterización bioquímica de mutantes

Para la purificación se siguió el mismo protocolo descrito en la sección 6.2.8. Para evaluar las discrepancias entre tamaño de las mutantes con respecto a la LR, los productos liofilizados de cada una de las proteínas fueron resuspendidos a una concentración de 1 mg/mL y corridos en geles de agarosa al 1 % durante una hora. La caracterización de sus antenas glucidas fue determinada mediante la metodología descrita en los apartados 6.2.13 y 6.2.14.

6.2.22 Evaluación del efecto citotóxico de las mutantes

Para la evaluación del efecto citotóxico se siguió el mismo protocolo descrito anteriormente para la LR en el apartado 6.2.16. En esta ocasión se utilizó la LR como control positivo.

7 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Clonación del gen de la lectina en el vector pGAP α ZB.

Para eliminar el “péptido señal de secreción en plantas” y adicionar los sitios de corte XbaI y PstI al gen de la lectina, se realizó una amplificación utilizando los oligos Da_F y Da_R bajo diferentes temperaturas de alineamiento (58 y 61° C). Los productos de la reacción fueron específicos y su tamaño (700 pb) fue consistente con el amplicón esperado (Figura 7A). El vector pGAP α ZB y las bandas correspondientes al producto de la amplificación fueron purificadas y digeridas con las enzimas XbaI y PstI. La completa digestión fue verificada mediante electroforesis en gel de agarosa (Figura 7B), a partir de donde se cortaron y purificaron nuevamente las bandas. Se obtuvo una concentración de 26.5 ng/ μ L para el inserto y de 6.7 ng/ μ L para el vector, con una relación 260/280 de 2.5 y 1.8 respectivamente. Este material genético fue ligado y utilizado para transformación genética de *E. coli*. A pesar de la mala calidad del inserto, fue posible recuperar >50 colonias, de las cuales, 10 fueron seleccionadas para realizar escrutinio de la transformación mediante PCR, para la cual, se utilizaron los oligos pGAP_F y 3”AOX1. El escrutinio reveló que todas las clonas analizadas contenían el gen de la lectina (Figura 7D). Para validar este resultado, se realizó una extracción plasmídica y el producto fue digerido empleando nuevamente las enzimas XbaI y PstI. El resultado se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa (Figura 7C), donde se puede observar dos bandas, que corresponden en tamaño al vector vacío y el inserto digerido, lo cual demuestra que tanto la ligación como la transformación de *E. coli* se efectuaron exitosamente. La posterior secuenciación del plásmido corroboró esta información y demostró que el marco de lectura del gen de la lectina se encontraba en fase con el “factor- α ” y que no se generaron mutaciones que deriven en interferencias durante la traducción del producto polipeptídico (Figura 8).

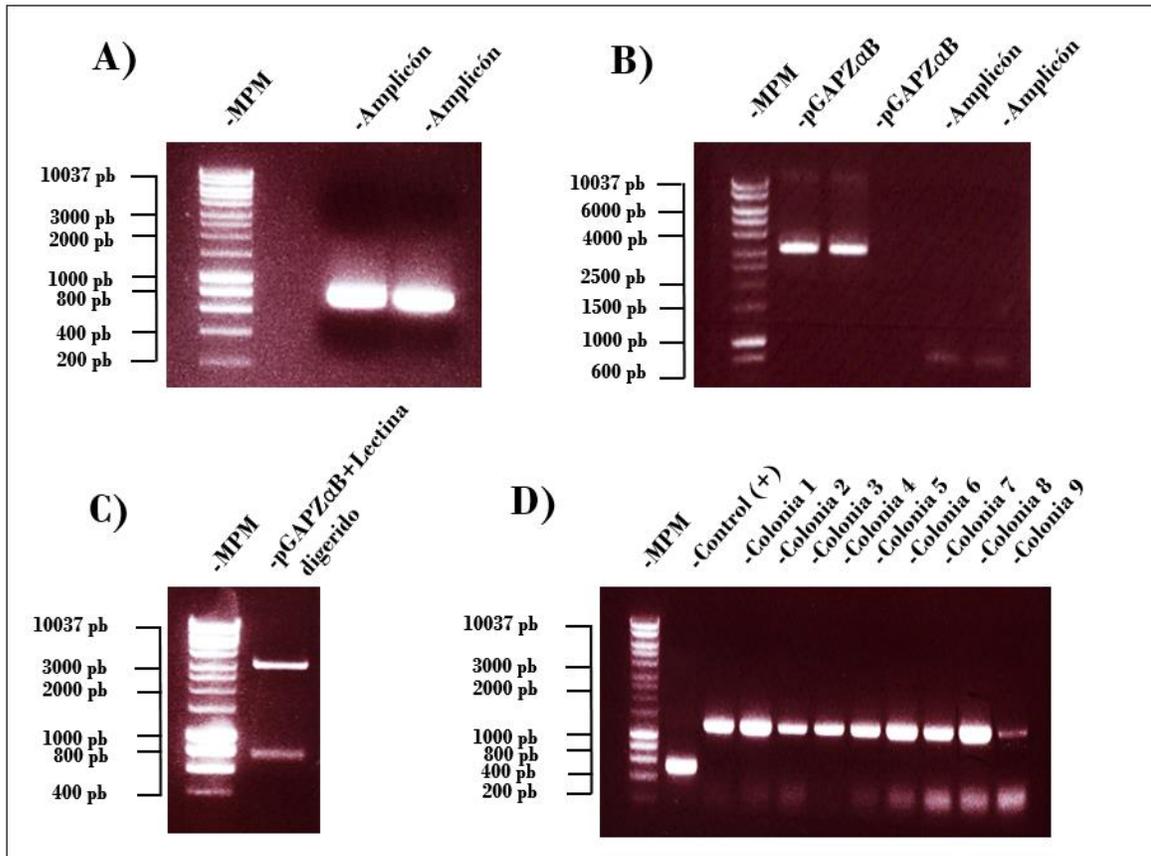


Figura 7. Inserción del gen de la lectina en el vector pGAPαZB. A) Electroforesis en gel de agarosa de los productos de la amplificación del gen de la lectina con los primers Da_F y Da_R. B) Digestión del inserto y del vector pGAPαZB. C) Productos obtenidos de la digestión del vector “pGAPαZB+LN2” con las enzimas PstI y XbaI. D) Escrutinio de la transformación mediante PCR de colonia.

```

SLFQSIGPYFNQLNNYFETMRFPSIFTAVLFAASSALAAPVNTTTEDETAQIPAEAVIGY
SDLEGDFDVAVL PFSNSTNGLLFINTT IASIAAKEEGVSLEKREAEAAA SANDISFNFQ
RFNETNLILQGDASVSSSGQLRLTNLNDNGEPTLSSLGRAFYSTPIQIWDSTTGAVASFA
TSFTFNIRVPNNAGPADGLAFALVPVGSKPKDRGGLLGLFDGSDSKAHTVAVEFDTLYNR
DWDPRERHIGIDVNSIKSIKTTPWDFVNGEDA EVLITYDSSTKLLVASLVYPSQKTSFIV
SDTVDLKSVLPEWVSVGF SATSGISKGNVETNDLLSWSFASKLS DGT TSEGLNHHHHHH*

```

Figura 8. Fusión de la secuencia codificante de la lectina con el “Factor-α”. En negro se muestra la región codificante para la LR mientras que en azul se muestran los aminoácidos resultantes de la traducción del “factor-α”. Las flechas rojas muestran los sitios de corte para la endopeptidasa Ste13 y la flecha negra el sitio de corte para endopeptidasa Kex2.

7.2 Transformación de *Pichia pastoris*

Una vez validada la secuencia, el plásmido fue procesado e introducido en *Pichia pastoris* mediante transformación química. Nueve de las colonias obtenidas fueron seleccionadas para realizar un ensayo de micro-fermentación en el cual se observó que 8 de ellas produjeron y excretaron la lectina exitosamente de las cuales, al menos 7 mostraron altos rendimientos (Figura 9). El rendimiento final de producción se calculó comparando la señal obtenida para cada una de las muestras con la señal generada por 500 ng del control positivo (GNA) mediante el uso del software “QuantityPro DR”, este osciló entre 2 y 32 $\mu\text{g/mL}$ siendo las colonias 5 y 10 las que presentaron menor y mayor producción respectivamente. Con base en este resultado, la colonia número 10 fue seleccionada para escalar el proceso de producción en bioreactores automáticos semi-industriales de 4.5 L.

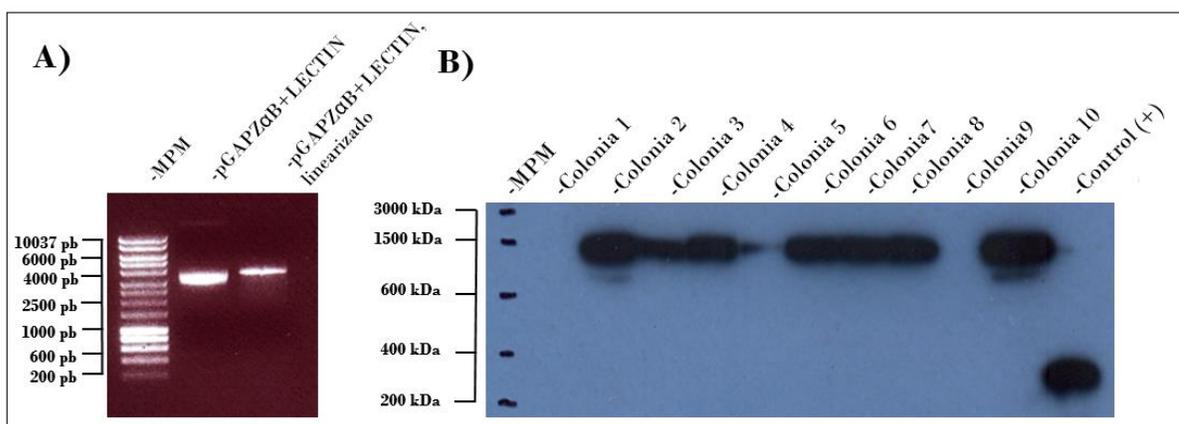


Figura 9. Transformación de *Pichia pastoris* y escrutinio de la producción de la proteína. A) linealización del plásmido “pGAP α ZB+LN2” para transformación química de *P. pastoris*. B) Western-blot con anticuerpos anti-His para identificación de la lectina recombinante en medio de cultivo. Carril 1; Marcador de tamaño. Carriles 2-11; colonias transformadas, Carril 12; 500 ng de GNA recombinante como control positivo

7.3 Fermentación

Para la producción, se inoculó la colonia seleccionada en un bioreactor automático de 7 L. Al transcurrir 96 h, se centrifugó el medio de cultivo para precipitar el paquete celular y el sobrenadante fue clarificado mediante filtraciones

secuenciales. Se obtuvieron 3.5 L de medio clarificado, a partir del cual se estimó la producción de lectina recombinante durante la fermentación mediante densitometría en SDS-PAGE, utilizando como estándar diferentes concentraciones de GNA con 100% de pureza, proveniente de la casa comercial de SIGMA (Figura 10). El rendimiento final obtenido fue de 316 ± 0.27 mg/L de lectina recombinante por cada litro de medio de cultivo, lo que significa que se produjeron un total de 1106 mg totales de lectina recombinante durante la fermentación.

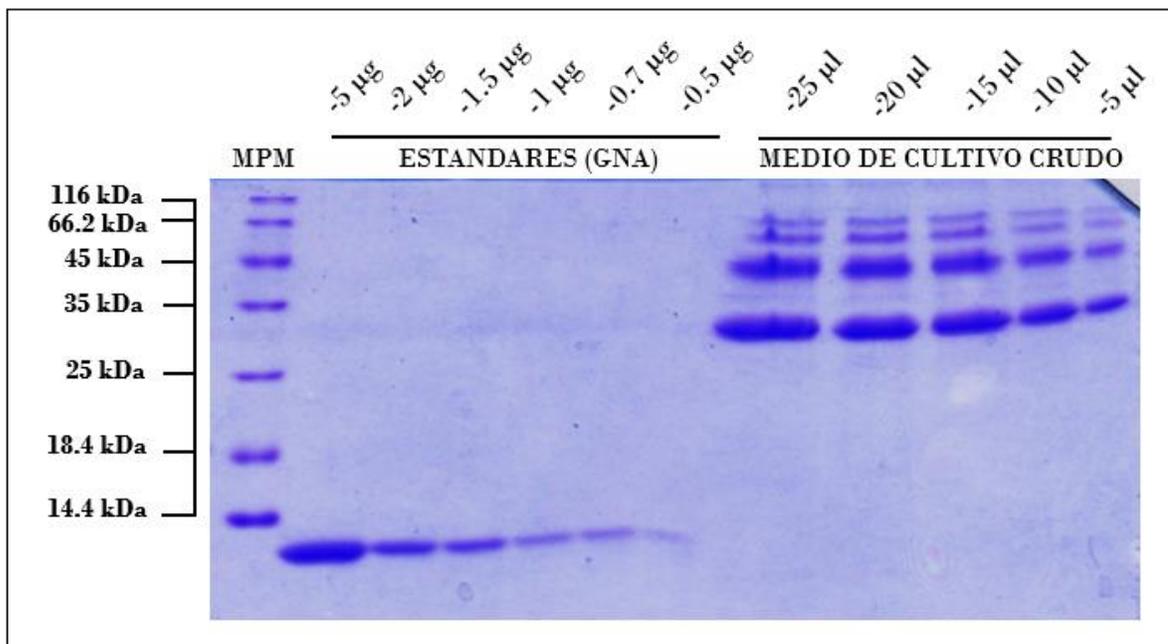


Figura 10. Estimación de la producción total de lectina recombinante. Carril 1; Marcador de tamaño. Carriles 2-7; Estándares de GNA-sigma en diferentes concentraciones. Carriles 8-12; Gradiente descendiente del medio de cultivo obtenido de la fermentación.

Debido a la alta concentración de LR en el medio de cultivo, fue necesario fraccionarlo en 24 lotes de 150 mL, los cuales fueron purificados independientemente mediante cromatografía de afinidad a níquel. Posterior a la purificación del primer lote, el medio de cultivo aún contenía una alta proporción de lectina, por lo que fue necesario purificar 4 veces cada lote para retirar la mayor cantidad de producto posible. La purificación del producto se realizó mediante lavados secuenciales con un gradiente ascendente de imidazol. En la Figura 11A se muestra uno de los cromatogramas obtenidos para la purificación de la lectina,

en el que se pueden observar dos picos muy predominantes correspondientes a las proteínas endógenas secretadas por *Pichia pastoris* que no presentan interacción con la columna y a la lectina recombinante eluída con un buffer 200 mM de imidazol (derecha a izquierda respectivamente). Por su parte, el pico del centro y el más pequeño corresponden a proteínas que presentan débil interacción con la columna aunque no se descarta que también contenga lectina recombinante débilmente unida a la matriz.

Para verificar el perfil electroforético de cada una de las fracciones recolectadas durante el proceso, se realizó una SDS-PAGE (Figura 11B) donde se puede apreciar que la cantidad de lectina en el medio crudo es superior a la cantidad que presenta la muestra recolectada en el primer lavado sin imidazol. No fue posible observar bandas en la fracción correspondiente a los lavados con 10 mM de imidazol, posiblemente debido a la baja concentración de proteínas en esta fracción. Finalmente, en el carril 6 se puede observar una sola banda de aproximadamente 30 kDa correspondientes a la lectina recombinante. Con la finalidad de verificar la pureza del producto, se cargó una concentración aproximada de 50 µg de proteína en el gel y no se observaron bandas adicionales ni productos de degradación.

En total, fueron necesarias 96 purificaciones (4 para cada lote) para extraer la mayor cantidad de lectina posible. Las eluciones obtenidas para cada lote, fueron agrupadas en una sola fracción y se verificó su pureza mediante SDS-PAGE (Figura 11C), ninguna de las fracciones mostro evidencia de contaminación así que todas fueron dializadas y liofilizadas.

De los 1106 mg producidos durante la fermentación, únicamente se recuperaron 850 mg de liofilizado, el resto de la lectina permaneció en el medio de cultivo, sin embargo, se determinó que no era conveniente continuarlo procesando debido a que su calidad e inocuidad se vieron comprometidas durante las purificaciones anteriores.

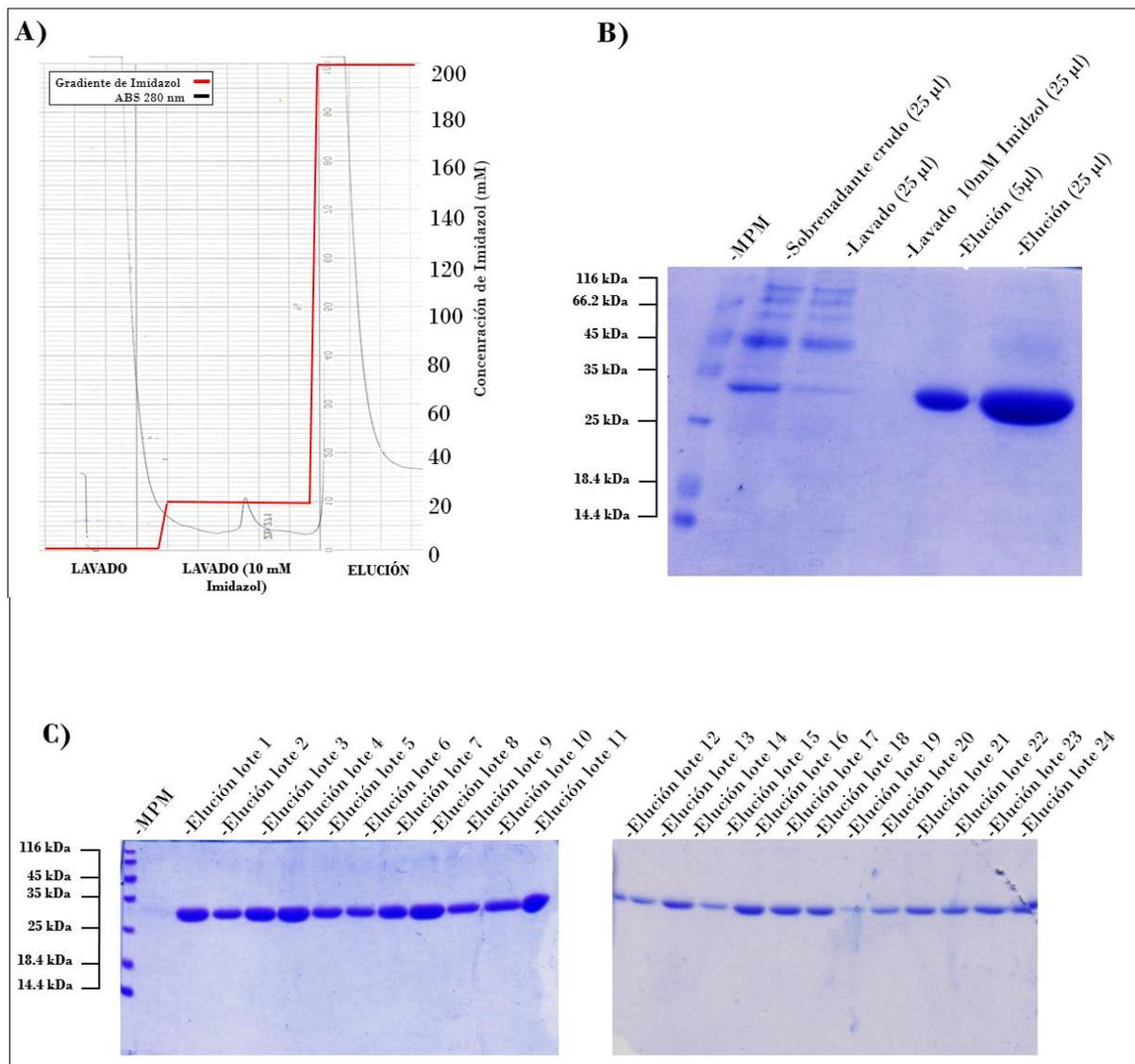


Figura 11. Purificación de la lectina recombinante. A) Cromatograma de la purificación de la lectina recombinante mediante cromatografía de afinidad a níquel. En rojo se muestra el gradiente de imidazol (0-200 mM) y en negro la absorbancia de la proteína a 280 nm. B) SDS-PAGE de los perfiles electroforéticos de cada una de las fracciones recolectadas durante la purificación. Carril 1; Marcador de tamaño. Carril 2; 25 µL de medio de cultivo crudo. Carril 3; 25 µL de lavado con buffer 0 mM de imidazol. Carril 4; 25 µL de lavado con buffer 10mM de imidazol. Carril 5; 5 µL de la elución de la proteína con buffer 200 mM de imidazol. Carril 6; 25 µL de la elución de la proteína con buffer 200 mM de imidazol. C) SDS-PAGE de las eluciones obtenidas para cada lote.

7.4 Reproducibilidad del proceso.

Como se mencionó con anterioridad, la producción de glicoproteínas en levaduras frecuentemente provee baja reproducibilidad, debido a que la edición de antenas

glúcidas se ve fuertemente afectada por la variación de las condiciones del cultivo durante la fermentación. Con la finalidad de evaluar la reproducibilidad de la metodología empleada, se inoculó una nueva fermentación utilizando la misma clona de *P. pastoris* previamente transformada.

El perfil electroforético del medio de cultivo en ambas fermentaciones fue muy similar (Figura 10 y 12B). En ambos casos la lectina recombinante se presentó como la banda más predominante, acompañada de otras 3 bandas intensas de mayor peso molecular y algunas otras proteínas en menor proporción, todas ellas correspondientes a proteínas endógenas de *P. pastoris*. El rendimiento final de la producción de lectina recombinante durante la segunda fermentación fue de 107 ± 0.019 mg/L por cada litro de medio de cultivo celular, mientras que durante la primera fermentación el rendimiento fue de 316 ± 0.27 mg/L. Sin embargo, es importante resaltar que la cantidad de biomasa derivada de la segunda fermentación fue al menos 50% menor, debido a que se frenó el proceso 24 h antes de lo sugerido, por lo cual el rendimiento expresado en función del volumen se vio mermado en casi un 70%. El tamaño de la lectina obtenida en ambos experimentos fue consistente (Figura 12C), por lo que se presume que no hubo variación en la edición de antenas glúcidas, al menos en cuanto a tamaño se refiere. Por su parte, el perfil de las fracciones recolectadas durante la purificación también mostró una alta homología con los recolectados anteriormente.

7.5 Caracterización de la lectina recombinante

Para comparar el peso molecular de la LR con su homóloga nativa, se realizó una SDS-PAGE (Figura 13). Fue posible determinar que el tamaño del producto recombinante es aproximadamente 2.5 kDa superior al de la lectina nativa denominada "LN2" que corresponde a la segunda banda de mayor peso en la FCL (Figura 13, Carril 3). La discrepancia de tamaño entre dichas lectinas se atribuye principalmente a la adición de 6 residuos de histidina en la secuencia polipeptídica, al corte impreciso del factor- α y a la adición de antenas glicosídicas de mayor

tamaño. El análisis detallado de cada uno de estos factores y su contribución al incremento de tamaño de la LR se describen posteriormente.

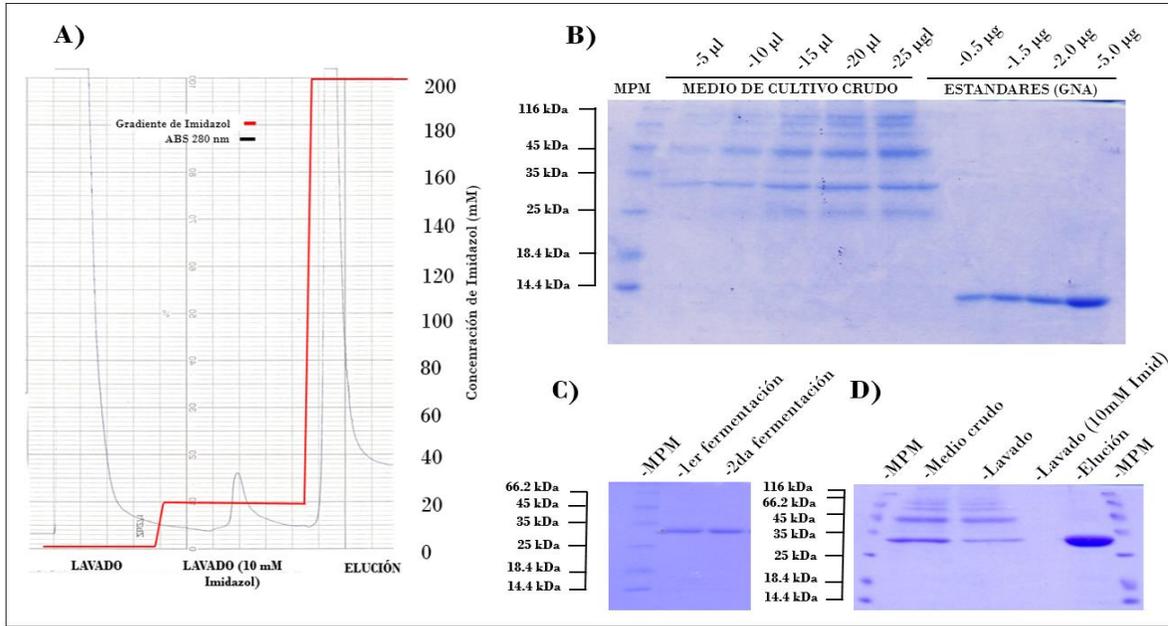


Figura 12. Validación de la reproducibilidad del proceso. A) Cromatograma de la purificación de la segunda fermentación. En rojo se muestra el gradiente de imidazol (0-200 mM) y en negro la absorbancia de la proteína a 280 nm. B) Estimación de la producción total de lectina recombinante durante la segunda fermentación. Carril 1; Marcador de tamaño. Carriles 2-6; Gradiente descendente del medio de cultivo obtenido de la fermentación. Carriles 8-12; Estándares de GNA-sigma en diferentes concentraciones. C) Comparación del perfil electroforético de las lectinas recombinantes producidas durante las 2 fermentaciones realizadas. D) SDS-PAGE de los perfiles electroforéticos de cada una de las fracciones recolectadas durante la purificación. Carril 1; Marcador de tamaño. Carril 2; 25 µL de medio de cultivo crudo. Carril 3; 25 µL de lavado con buffer 0 mM de imidazol. Carril 4; 25 µL de lavado con buffer 10mM de imidazol. Carril 5; 5 µL de la elución de la proteína con buffer 200 mM de imidazol.

7.5.1 Contribución de la cola de histidinas al incremento de tamaño de la LR

La adición de una cola histidinas en el extremo C-terminal de la lectina recombinante fue una estrategia empleada con la finalidad de simplificar el proceso de purificación de la proteína. Sin embargo, debido a su posición no se consideró factible utilizar endopeptidasas para remover dichos residuos. Dado lo anterior el producto final incluye la adición de 6 residuos de histidina a la secuencia de la lectina nativa que proveen un incremento de 840.92 Da al tamaño de la lectina nativa.

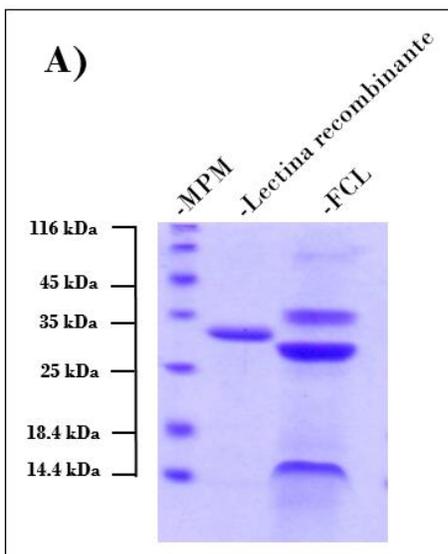


Figura 13. Comparación de la lectina recombinante con la FCL. SDS-PAGE de los perfiles electroforéticos de la lectina recombinante purificada y una fracción concentrada de lectinas que fue purificada a partir de semillas de frijol Tépari, mediante cromatografía de exclusión de tamaño. Carril 1; Marcador de tamaño. Carril 2; 5 μ g de lectina recombinante. Carril 3; 5 μ L de lavado con buffer 0 mM de Imidazol. Carril 4; 25 μ L de lavado con buffer 10mM de Imidazol. Carril 5; 5 μ L de la elución de la proteína con buffer 200 mM de Imidazol.

7.5.2 Contribución al incremento de tamaño de la LR de los residuos provenientes del corte impreciso del factor- α

El corte impreciso del factor- α es un evento comúnmente observado en proteínas cuando son producidas en *P. pastoris* a altas concentraciones debido a la incapacidad de las peptidasas para procesar la proteína que está en continua producción. Al ocurrir, este fenómeno provee residuos adicionales en el extremo *N*-terminal que pueden interferir con características tales como el tamaño. Así que, con la finalidad de conocer si este fenómeno tiene relación con el incremento de tamaño observado en la LR, procedimos a determinar la secuencia de su amino terminal para verificar si se efectuó el corte preciso del factor- α . Para ello, la muestra fue digerida de manera independiente con tripsina y quimotripsina. Los péptidos obtenidos fueron analizados mediante MS/MS dependiente de datos y se determinó que la posición en donde se llevó a cabo la escisión del factor- α fue SLEKR/EAEAAASANDISF, el cual, corresponde al sitio de corte de la enzima Kex2 y genera la adición de 6 residuos (señalados en rojo) al extremo *N*-terminal de la

proteína que derivan en un incremento estimado de 650.62 Da sobre el producto final.

7.5.3 Caracterización de glicosilaciones y estimación de su contribución al incremento de tamaño en la LR

Con el fin de caracterizar la composición de carbohidratos presentes en las antenas glicosídicas de la lectina recombinante y determinar si difieren o no con respecto a las de la lectina nativa, se realizó un abanico de reacciones enzimáticas utilizando 5 diferentes desglucosilasas, las cuales presentan actividad específica sobre diferentes oligosacáridos. Posteriormente, las muestras fueron corridas en SDS-PAGE para visualizar el resultado de las reacciones (Figura 14B). En ambas muestras el comportamiento fue muy similar, únicamente mostraron una disminución de tamaño al ser tratadas con *N*-Glicosidasa-F y con todas las enzimas juntas, lo cual sugiere que el único tipo de glicosilación presente en ambas muestras corresponde a *N*-glicosilaciones.

Es importante resaltar que las *O*-glicosilaciones en pequeñas proporciones pueden no generar una diferencia de tamaño perceptible mediante SDS-PAGE por lo que, para corroborar la inexistencia de dichas antenas en ambas lectinas, se realizó un ensayo de tinción de Schiff-PAS sobre las muestras previamente descritas (Figura 14A). La técnica de PAS, reveló que cuando la LR es tratada con la *N*-Glicosidasa-F, desaparece por completo la señal de detección de carbohidratos, mientras que cuando es tratada con *O*-glicosidasas, en diferentes combinaciones, no hay pérdida de intensidad en la señal. Por su parte, las lectinas superiores de la FCL, denominadas "LN1", continúan mostrando bandas violetas, incluso después de ser digeridas con todas las enzimas, lo cual sugiere que estas lectinas en particular poseen antenas *N*-glicosídicas con fucosa- α 1-3 enlazada a la *N*-acetilglucosamina que interactúa con la asparagina del polipéptido. Este tipo de arreglos son comúnmente encontrados en lectinas de origen vegetal y son resistentes a la acción de la *N*-Glicosidasa-F.

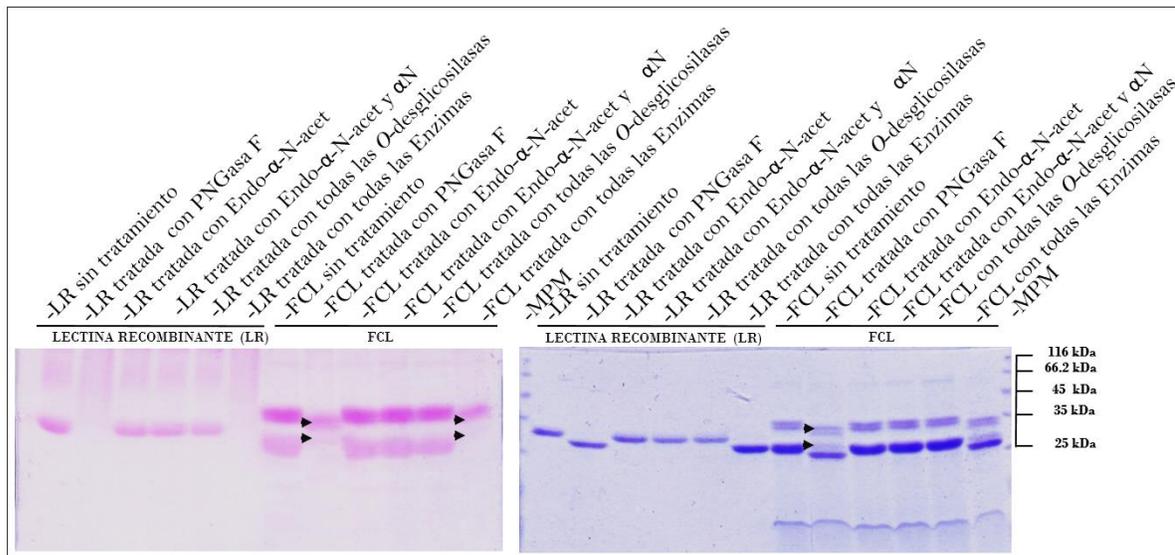


Figura 14. Caracterización las glicosilaciones presentes en la lectina recombinante. Del lado derecho de la figura se muestra un gel de electroforesis teñido con la técnica de Schiff-PAS, para detección de glicoproteínas. Carril 1; Lectina recombinante (LR) sin tratamiento. Carril 2; LR tratada con *N*-Glicosidasa F (PGNasaF). Carril 3; LR tratada con Endo- α -*N*-acetilgalactosaminidasa. Carril 4; LR tratada con Endo- α -*N*-acetilgalactosaminidasa y α 2-3,6,8,9-Neuraminidasa Carril 5; LR tratada con todas las *O*-desglicosilasas (β 1,4-Galactosidasa, Endo- α -*N*-acetilgalactosaminidasa, α 2-3,6,8,9-Neuraminidasa y β -*N*-Acetilglucosaminidasa) Carril 6; LR tratada con todas las *N*- y *O*-desglicosilasas (*N* - Glicosidasa F, β 1,4-Galactosidasa, Endo- α -*N*-acetilgalactosaminidasa, α 2-3,6,8,9-Neuraminidasa y β -*N*-Acetilglucosaminidasa). Carril 7; Fracción concentrada de lectinas de frijol tépari (FCL) sin tratamiento. Carril 8; FCL tratada con *N*-Glicosidasa F (PGNasaF). Carril 9; FCL tratada con Endo- α -*N*-acetilgalactosaminidasa. Carril 10; FCL tratada con Endo- α -*N*-acetilgalactosaminidasa y α 2-3,6,8,9-Neuraminidasa Carril 11; FCL tratada con todas las *O*-desglicosilasas (β 1,4-Galactosidasa, Endo- α -*N*-acetilgalactosaminidasa, α 2-3,6,8,9-Neuraminidasa y β -*N*-Acetilglucosaminidasa) Carril 12; FCL tratada con todas las *N*- y *O*-desglicosilasas (*N*-Glicosidasa F, β 1,4-Galactosidasa, Endo- α -*N*-acetilgalactosaminidasa, α 2-3,6,8,9-Neuraminidasa y β -*N*-Acetilglucosaminidasa). Del lado izquierdo de la figura, se muestra un gel de electroforesis teñido con la azul de Coomassie R-250 con la misma disposición de muestras que el gel de tenido con Schiff-PAS.

Contrario a lo observado en “LN1”, “LN2” parece no tener este tipo de arreglos ya que el tratamiento con *N*-Glicosidasa-F fue suficiente para remover por completo la señal violeta derivada de los carbohidratos presentes en las proteínas. En los carriles 9 y 13 del lado izquierdo de la Figura 14 se puede observar la persistencia de una tenue señal violeta de aproximadamente 26 kDa, que, como se puede verificar en el lado derecho, corresponde a la señal producida por los carbohidratos presentes en “LN2” que no alcanzaron a ser digeridos debido que el periodo de incubación de las muestras fue insuficiente. No obstante, la ausencia de señal violeta a la altura de donde se observa la mayor concentración de “LN2”

desglicosilada, apoya la idea de que esta lectina únicamente posee *N*-glicosilaciones las cuales carecen de fucosa- α 1-3 enlazada a *N*-acetilglucosamina.

Con base en el patrón de migración de cada una de las muestras, fue posible estimar que el incremento de tamaño derivado de sus antenas glicosídicas es de aproximadamente 2.48 y 1.84 kDa para la lectina recombinante y LN2 respectivamente. Además, gracias al programa NetGlyc.4 y se determinó que tanto "LN2" como la LR poseen un solo *sequon*, que se localiza en la posición 13-15 de su secuencia polipeptídica y en donde la asparagina¹³ es la que se encuentra glicosilada. Para la confirmación de la posición de las antenas glúcidos, se utilizó nuevamente la técnica de nano-LC-MS/MS dependiente de datos estándar de péptidos trípticos a partir de muestras +/- tratamiento con enzimas desglicosilantes. Este análisis mostró la presencia de Asparagina *N*-deamidada en el péptido NETN, que corresponde a las posiciones 13-16 de la LR. La deaminación es conocida por ser un subproducto de los tratamientos con PNGaseF al remover *N*-glicosilaciones.

La secuencia de la LR fue modelada *in silico* para localizar la disposición espacial de dicho residuo y a partir de la imagen generada se determinó que, al plegarse la proteína, la antena *N*-glicosídica se encuentra ubicada en el extremo superior izquierdo cerca de los extremos amino y carboxilo (Figura 15).

Los resultados mostrados permiten concluir que la lectina recombinante solo tiene una *N*-glicosilación, la cual se encuentra unida a la aspaagina-13 y que está glicosilación es 640 daltons superior en tamaño a la antena glicosídica de su homóloga nativa (LN2). Este incremento de tamaño, muy posiblemente se deba a la adición de residuos adicionales de manosa característicos de glicoproteínas de levaduras, sin embargo, dado que la diferencia de tamaño entre ambas antenas es inferior a 1 kDa, no se prevén importantes cambios estructurales derivados de esta modificación. No obstante, el análisis del tamaño de sus glicosilaciones, en conjunto con el incremento de tamaño derivado del corte impreciso del factor- α y la adición de 6 residuos de histidina en el extremo C-terminal, ayuda a elucidar de

mejor manera el motivo por el cual se aprecia una diferencia de 2.5 kDa en el perfil electroforético de LR con respecto LN2.

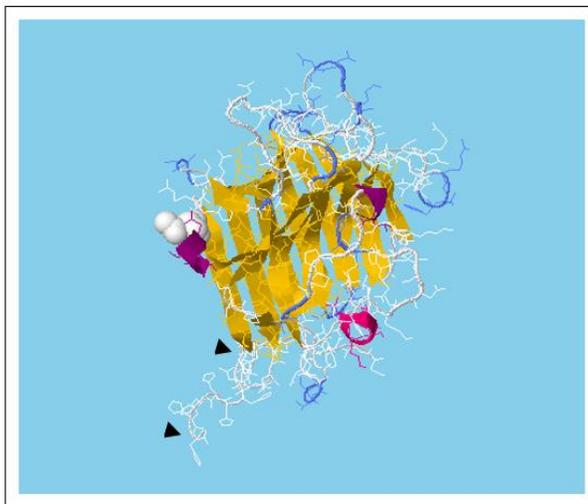


Figura 15. Identificación de la posición para la antena N-glicosídica de LR. En amarillo se muestran las hojas beta, en azul los bucles que interconectan su estructura y en rosa las alfa hélices. Los extremos amino y carboxilo terminales, están indicados con flechas negras mientras que la asparagina13 se representa como esferas blancas.

7.5.4 Conformación multimérica de la LR

Dado que las lectinas de leguminosas poseen un único sitio de reconocimiento de carbohidratos, la formación de oligómeros resulta imprescindible para ejercer su actividad tipo lectina. Con la finalidad de conocer si la expresión heteróloga de la LR perturbó su capacidad para formar agregados, se realizó una pareja de corridas electroforéticas bajo condiciones nativas y desnaturalizantes. Como controles positivos se utilizaron las lectinas GNA, PHA, FCL y la proteína BSA en todas ellas, caracterizadas por su capacidad de formar multímeros de sus estructuras. Es importante resaltar que GNA, LR y BSA, son productos con un alto grado de pureza que corresponden a una única proteína, mientras que PHA y FCL representan más bien fracciones proteicas semipuras que contienen 2 o más lectinas.

La Figura 16 muestra el resultado del experimento, en donde se puede apreciar que bajo condiciones nativas existe una clara modificación en el perfil electroforético de todas las proteínas analizadas. Si bien, el resultado no es

completamente claro para FCL y PHA (Figura 16B, carriles 1-3), para las muestras BSA, GNA y LR resulta bastante notoria la aparición de bandas adicionales de mayor peso molecular, las cuales no se presentan bajo condiciones desnaturalizantes (Figura 16 B, carriles 4-6).

Las dos bandas adicionales observadas en la muestra de la LR presumiblemente corresponden al dímero y tetrámero de dicha lectina, lo cual resulta consistente con reportes en donde se menciona que las lectinas aisladas de leguminosas se presentan de manera más abundante como dímeros y tetrámeros (Torres-Arteaga, 2010), aunque no se descarta la posibilidad de que el trímero se encuentre presente en menor proporción. Estas estimaciones fueron calculadas tomando en consideración el tamaño de los oligómeros de BSA y GNA, los cuales se encuentran reportados y caracterizados, sin embargo, se considera necesario repetir el experimento utilizando marcadores de tamaño específicos para electroforesis nativas.

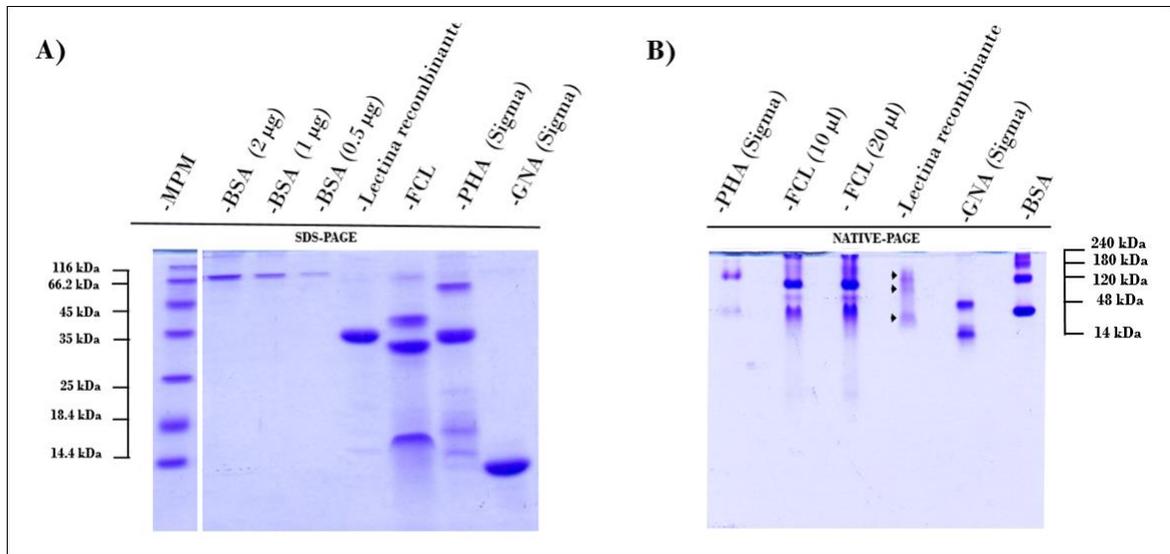


Figura 16. Evaluación de la capacidad de la LR para presentarse en forma oligomérica. A) SDS-PAGE de 5 diferentes proteínas que presentan capacidad de formar oligómeros de su estructura. Carril 1; marcador de peso molecular. Carril 2-4; 2, 1 y 0.5 µg de BSA respectivamente. Carriles 5-8; 5 µg de LR; FCL; PHA y GNA, respectivamente. B) NATIVE-PAGE de 5 diferentes proteínas que presentan capacidad de formar oligómeros de su estructura. Carril 1; 5 µg de PHA. Carriles 2-3; 5 y 10 µg de FCL, respectivamente. Carril 4; 5 µg de LR. Carril 5; 5 µg de GNA. Carril 6; 5 µg de BSA. Las proteínas GNA, BSA y PHA son reactivos comerciales que fueron adquiridos de la

casa comercial de Sigma, mientras que FCL refiere a la fracción concentrada de lectinas de frijol Tépari que fue obtenida mediante cromatografía de exclusión de tamaño.

7.6 Actividad aglutinante y conformación multimérica de la LR

Se determinó la actividad aglutinante de cada una de las lectinas analizadas y se encontró que tanto GNA como la FCL poseen 12800 UA/mg de proteína. Estos resultados concuerdan con la capacidad aglutinante reportada previamente para la FCL (Martínez-Alarcón, 2015), mientras que PHA presentó únicamente 8000 UA/mg de proteína. Por otro lado, y contrario a lo esperado, la lectina recombinante no mostró evidencia alguna de aglutinación (Figura 17).

Para tratar de elucidar el motivo por el cual, a pesar de ser capaz de formar oligómeros, la LR no tiene actividad aglutinante sobre eritrocitos, se realizó un análisis comparativo de la secuencia de la lectina recombinante con 2 isoformas de lectina presentes en PHA de *P. Vulgaris*. Se encontró que la secuencia de la lectina recombinante posee mayor similitud con la isoforma L de PHA, esta isoforma se caracteriza por ser leucoaglutinante mientras que la isoforma E es eritroaglutinante. Es importante resaltar que la muestra de PHA utilizada como control en el presente experimento contiene ambas isoformas (PHA:E y PHA:L) por lo que es probable que la aglutinación observada derive únicamente de la isoforma E. Lo anterior conduce a pensar que posiblemente las dos lectinas predominantes en la FCL (LN1 y LN2), corresponden en realidad a isoformas E y L de frijol Tépari, respectivamente. Esta hipótesis se vio respaldada por un ensayo realizado para ver el efecto de la FCL y la lectina recombinante sobre la mortalidad en insectos, en donde se confirmó una potente actividad antinsecticida solo para la FCL, misma que es característica de las lectinas con isoforma tipo E (Fitches y col., 2001).

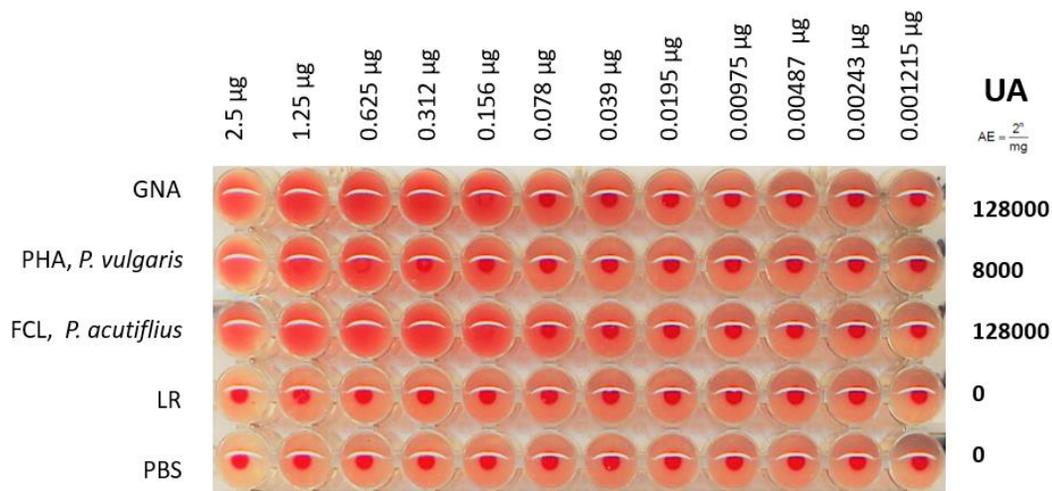


Figura 17. Ensayo de actividad aglutinante. Placa de diluciones dobles seriadas de 4 diferentes lectinas sobre eritrocitos de conejo frescos. Las manchas difusas en el fondo de las placas indican presencia de aglutinación, mientras que los puntos rojos indican lo contrario. Se utilizó PBS como control negativo y 2.5 µg de las lectinas PHA, GNA y FCL como controles positivos. Las proteínas GNA y PHA son reactivos comerciales que fueron adquiridos de la casa comercial de Sigma, mientras que FCL refiere a la fracción concentrada de lectinas de frijol Tépari que fue obtenida mediante cromatografía de exclusión de tamaño.

7.7 Efecto citotóxico sobre células de cáncer

El ensayo de citotoxicidad sobre la línea de cáncer de colón HT-29 reveló que las células presentan la misma tasa de mortalidad al ser tratadas con LR y FCL, lo cual sugiere que la lectina recombinante obtenida mediante modificación genética de *Pichia pastoris* mantiene su actividad citotóxica sobre células de cáncer y que dicha actividad, tal como como había sido señalado por Arteaga y col., (2016) no está relacionada con la capacidad de aglutinar eritrocitos. Su concentración letal 50 fue estimada 2.47+/-0.2 y 2.71+/-0.47 µg/mL para la lectina nativa y recombinante respectivamente. No obstante, la lectina recombinante se encontraba pura y se esperaba un mayor efecto.

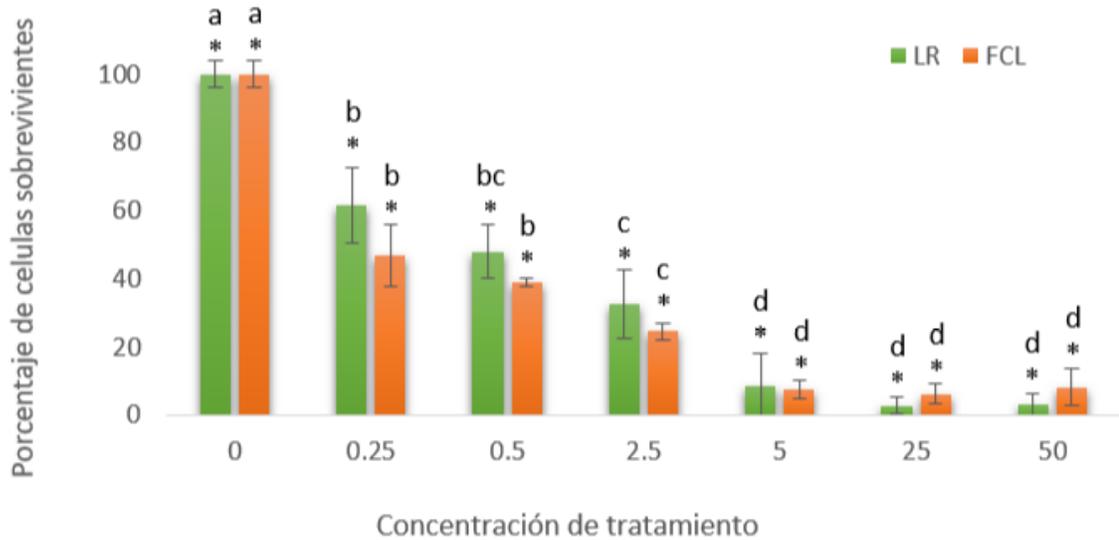


Figura 18. Efecto citotóxico de LR sobre células de cáncer de colon HT-29. El eje Y de la gráfica representa el porcentaje de células sobrevivientes con respecto al control negativo a las 24 h de tratamiento. El eje de las X representa la concentración de proteína utilizada en cada tratamiento. Los recuentos al microscopio se realizaron mediante el uso de un hematómetro a las 24 h de tratamiento. El experimento fue realizado por triplicado en 2 experimentos independientes. Los asteriscos muestran las diferencias significativas de las diferentes dosis (Dunnett, $p \leq 0.05$) con respecto al control (*). Las letras minúsculas indican los subconjuntos de tratamientos (Tukey, $p < 0.05$)

7.8 Determinación del efecto apoptótico de la lectina recombinante

Las imágenes obtenidas del experimento de citotoxicidad revelaron que tanto las células a las que se les administro FCL, como aquellas que fueron tratadas con LR, presentan una morfología característica de células en un estadio temprano de apoptosis. Las alteraciones más sobresalientes fueron las alteraciones de la estructura del citoesqueleto y la formación de cuerpos apoptóticos en la periferia celular (Figura 19B y 19C).

Las evidencias encontradas demuestran que el efecto citotóxico de la LR deriva de la inducción de un mecanismo apoptótico, acorde con los datos reportados en previamente para la FCL (Arteaga y col., 2010).

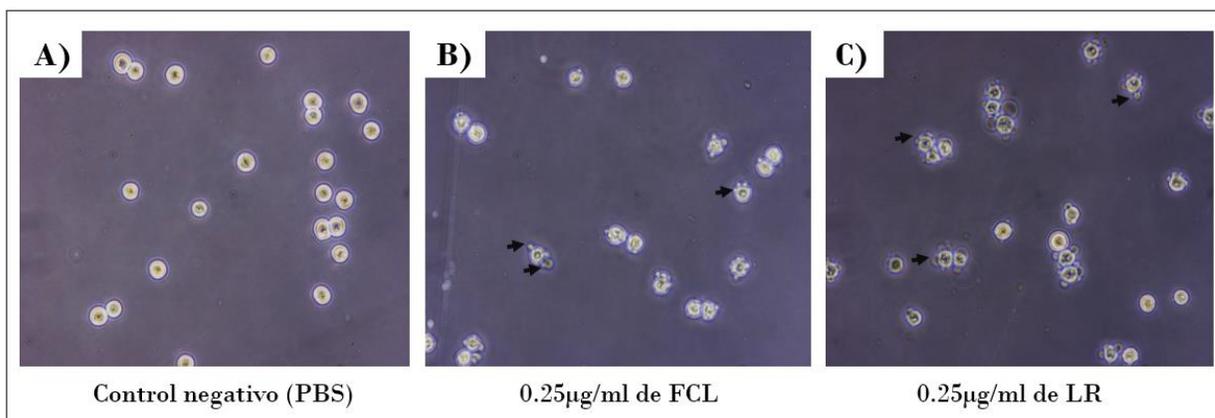


Figura 19. Identificación morfológica de apoptosis temprana. A) Morfología de las células HT-29 a 24 h de tratamiento con PBS observadas al microscopio con un aumento de 40X. B) Morfología de las células HT-29 a 24 h de tratamiento con FCL observadas al microscopio con un aumento de 40X. C) Morfología de las células HT-29 a 24h de tratamiento con lectina recombinante (LR) observadas al microscopio con un aumento de 40X.

Por su parte, la tinción de TUNEL permitió observar la fragmentación del DNA, que representa uno de los eventos característicos de células en apoptosis temprana. Este experimento, también reveló que la mayor parte de la fragmentación ocurre entre 0 y 4 h de comenzado el tratamiento, también fue posible apreciar fragmentación nuclear a las 8, 12 y 24 h. Adicionalmente, la comparación de la cantidad de células presentes en el panel 12 con respecto a los paneles superiores 8 y 4, aporta evidencia cualitativa que soporta los datos mostrados en el presente trabajo, en donde se reporta la disminución de la población de células HT-29 tratadas con FCL y LR a diferentes concentraciones.

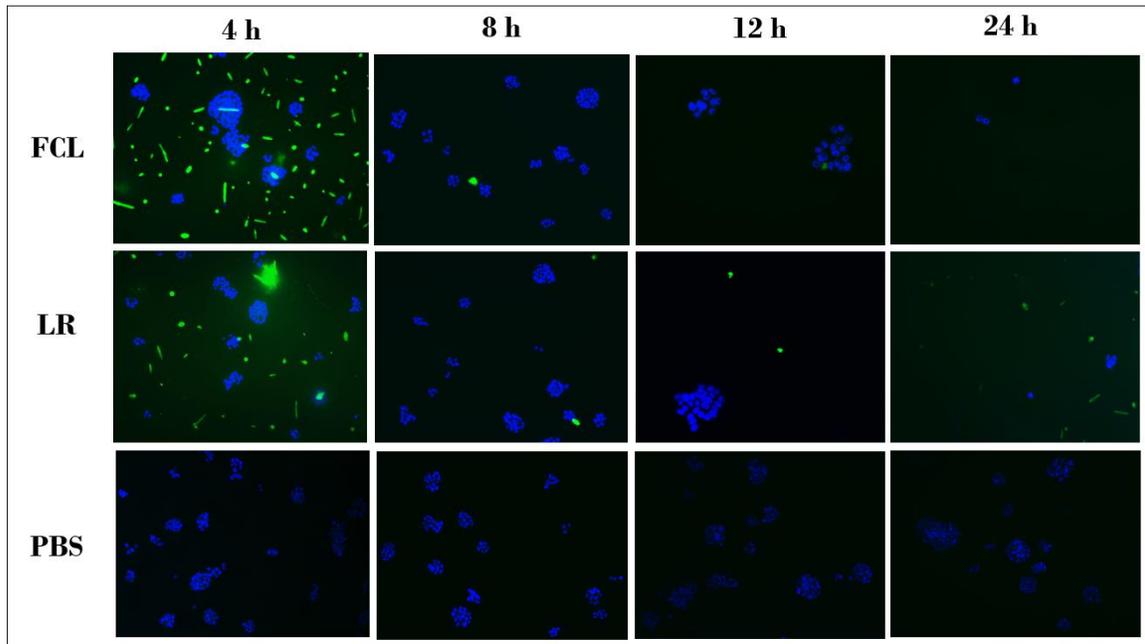


Figura 20. Monitoreo de la inducción de la apoptosis. Línea 1) Apoptosis temprana inducida por la FCL sobre células HT-29 en escala de tiempo. Línea 2) Apoptosis temprana inducida por la LR sobre células HT-29 en escala de tiempo. Línea 3) PBS como control negativo. Las columnas 1-4 representan las muestras analizadas a 4, 8, 12 y 24 h respectivamente. Las células apoptóticas se aprecian en tonalidades verdes mientras que las células viables se presentan de color azul. El resultado del experimento se visualizó mediante microscopía de fluorescencia, con filtros verdes y azul/cyan para TUNEL y DAPI, respectivamente. Las imágenes fueron tomadas independientemente en escala de grises, el color y la superposición de las mismas se realizó de manera *in-silico*.

7.9 Relación molecular del efecto anticancerígeno de LR y LN2

Si bien, las lectinas de leguminosas son consideradas como una familia de proteínas altamente conservada, las características y funciones de todas ellas difieren en gran medida, por lo cual, se cree que su actividad específica debe estar relacionada con pequeñas pero importantes diferencias entre ellas. En el caso de las lectinas de frijol Tépari, originalmente se consideró que su especificidad de reconocimiento de carbohidratos podría ser atribuida al patrón de glicosilaciones que les confiere la especie de origen (*Phaseolus acutifolius*), sin embargo, los resultados sugieren que su actividad podría no estar relacionada con la composición de su única antena glúcida, sino más bien, con sus secuencias polipeptídicas. Así que, una vez demostrado que el efecto citotóxico de LN2 se

mantuvo en la lectina recombinante, se abordó un nuevo enfoque para tratar de elucidar el dominio y/o residuos responsables de dicho efecto. Para ello, se analizaron las secuencias de lectinas de leguminosas mediante el uso de herramientas bioinformáticas, con lo cual, se logró identificar dos residuos presuntamente responsables de su efecto. Posteriormente se realizaron mutantes de proteína y se evaluó la pérdida de función derivada de dichas modificaciones.

7.9.1 Identidad y evolución entre lectinas de leguminosas

Se realizó una comparación entre las secuencias de lectinas provenientes de diferentes especies de leguminosas, considerando solo aquellas que mostraron mayor porcentaje de identidad con la de *P. acutifolius* (LN2). La información recabada mediante dicho análisis se presenta en el Cuadro 5 y en la Figura 21. Es posible apreciar que todas las lectinas pertenecientes al género *Phaseolus* tienen un porcentaje de identidad de 73%-83% y que dicho porcentaje desciende en relación al parentesco filogenético entre las especies analizadas.

Las tasas inferidas por análisis evolutivo muestran que la LN2, y por lo tanto LR, pertenecen al grupo de las fitohemglutininas del género *Phaseolus* (área sombreada). Concretamente, pertenecen al grupo de las leucoaglutininas. Lo anterior se deduce con base en la distancia evolutiva que presentan con estas proteínas y provee evidencia adicional en donde se propone que la lectina producida (LR) corresponde a una leucoaglutinina y por este motivo no presenta actividad aglutinante sobre eritrocitos.

Cuadro 5. Análisis de las lectinas de leguminosas que muestran mayor porcentaje de identidad con la secuencia de la lectina recombinante

nombre	Origen	identidad	N° de acceso	subtribu	Genero
Leucoaglutinina (PHA;L)	<i>P. vulgaris</i>	87.3%	P05087	<i>Phaseolinae</i>	<i>phaseolus</i>
Leucoaglutinina (PHA;L)	<i>P. costaricensis</i>	84.8%	Q5ZF34	<i>Phaseolinae</i>	<i>phaseolus</i>
Eritroaglutinina (PHA;E)	<i>P. coccineus</i>	84.2%	Q8RW23	<i>Phaseolinae</i>	<i>phaseolus</i>
Eritroaglutinina (PHA;E)	<i>P. vulgaris</i>	83.8%	P05088	<i>Phaseolinae</i>	<i>phaseolus</i>
Leucoaglutinina (PHA;L)	<i>P. coccineus</i>	83	Q8RVY4	<i>Phaseolinae</i>	<i>phaseolus</i>
Lectina III	<i>P. lunatus</i>	75.6	P93457	<i>Phaseolinae</i>	<i>phaseolus</i>
lectina	<i>P: augusti</i>	75.5%	Q5ZF98	<i>Phaseolinae</i>	<i>phaseolus</i>
lectina	<i>P: microcarpus</i>	75.2%	Q5ZEX3	<i>Phaseolinae</i>	<i>phaseolus</i>
lectina	<i>P: lunatus</i>	75%	CAB96391.1	<i>Phaseolinae</i>	<i>phaseolus</i>
lectina	<i>P: oligospermus</i>	75.2%	Q5ZEX2	<i>Phaseolinae</i>	<i>phaseolus</i>
Lectina	<i>P: maculatus</i>	74.8	Q5ZEW9	<i>Phaseolinae</i>	<i>phaseolus</i>
Lectina	<i>P. parvulus</i>	74.5	Q5ZEX0	<i>Phaseolinae</i>	<i>phaseolus</i>
Lectina	<i>P. filiformis</i>	73.7	Q5ZF30	<i>Phaseolinae</i>	<i>phaseolus</i>
lectina	<i>P. leptostachyus</i>	73.6%	Q5ZF31	<i>Phaseolinae</i>	<i>phaseolus</i>
Lectina	<i>P. leptostachyus</i>	73.6	Q5ZF31	<i>Phaseolinae</i>	<i>phaseolus</i>
lectina	<i>V. linearis</i>	73.6%	Q8L683	<i>Phaseolinae</i>	<i>vigna</i>
lectina	<i>V. aconitifolia</i>	70.4%	F6LXS9	<i>Phaseolinae</i>	<i>vigna</i>
Lectina	<i>G. soja</i>	63.6%	A0A0B2SDS5	<i>Glycininae</i>	<i>Glycine</i>
lectina	<i>G. max</i>	62.9%	D7F7K7	<i>Glycininae</i>	<i>Glycine</i>

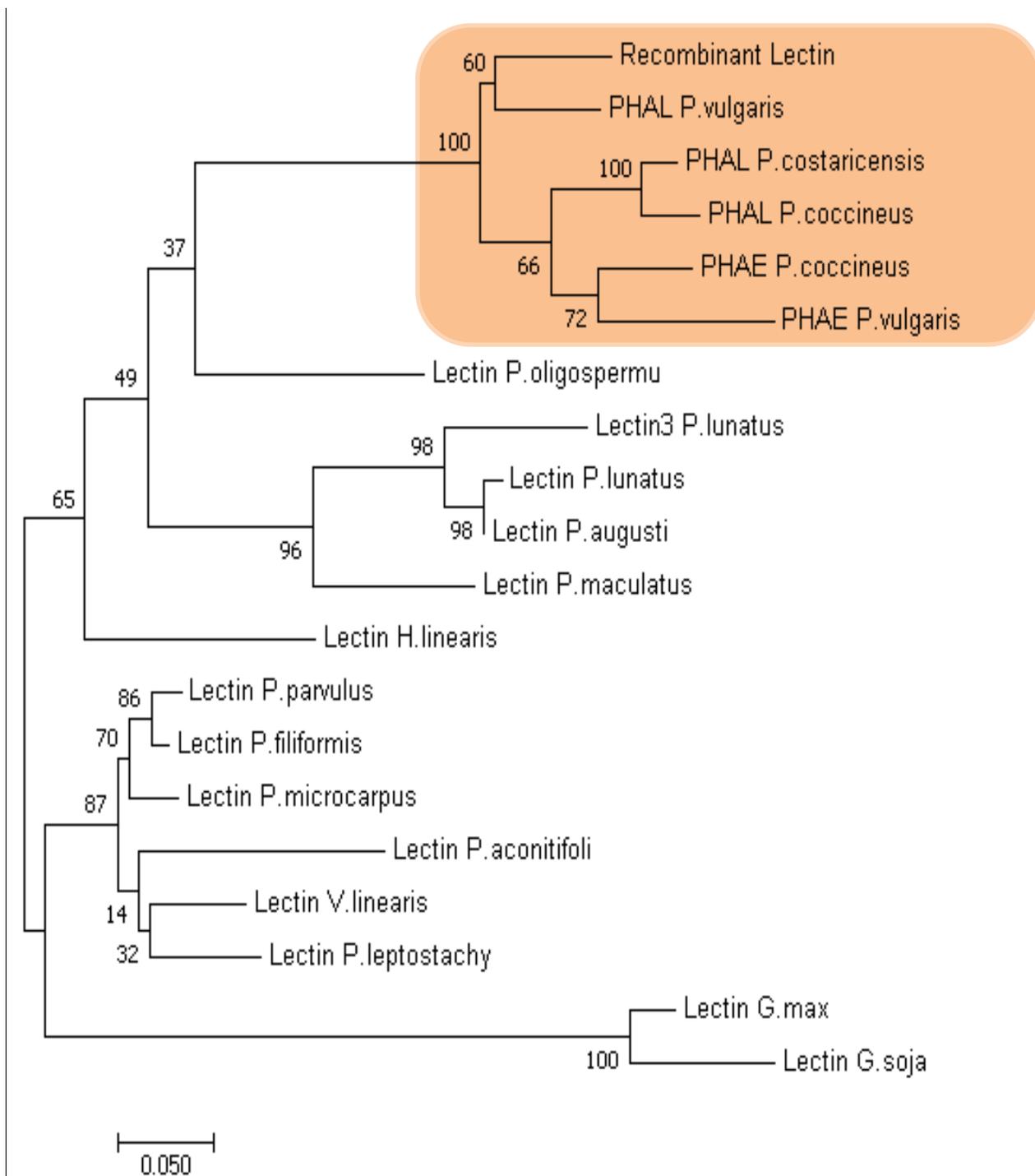


Figura 21. Análisis filogenético molecular de la evolución de lectinas de leguminosas. La historia evolutiva se infirió mediante el método de máxima verosimilitud basado en el algoritmo de Jones y col. (1992) con 1000 Bootstraps. Se muestra el árbol con mayor probabilidad. El porcentaje de árboles en los que los taxones asociados se agrupan, se muestra junto a las ramas. El árbol se dibuja a escala, con longitudes de ramificación medidas en el número de sustituciones por sitio. Los análisis evolutivos se realizaron en MEGA7 [2].

7.9.2 Identificación de los posibles residuos responsables del efecto citotóxico LR y LN2

Con base en el alineamiento múltiple de las secuencias de leucoaglutininas presentadas en Cuadro 5 y los resultados reportados por Nagae y col. (2014), se encontró que todas contienen exactamente el mismo DRC (Figura 22, triángulos negros), a excepción de la LN2 que en la posición 103 de contiene R en lugar de K, Esto resulta particularmente interesante ya que, si bien dichos aminoácidos no son muy diferentes entre sí, la literatura reporta que la mayoría de las proteínas pertenecientes a la familia de las siglectinas poseen un residuo de arginina sumamente conservado, responsable de formar puentes de sal con el ácido siálico presente en las antenas glicosídicas de sus ligandos. También se sabe que incluso una sustitución conservativa, de esta arginina (R) por lisina (K), deriva en una disminución de al menos 10 veces en su capacidad de reconocimiento de carbohidratos y en los casos más drásticos, desaparece por completo.

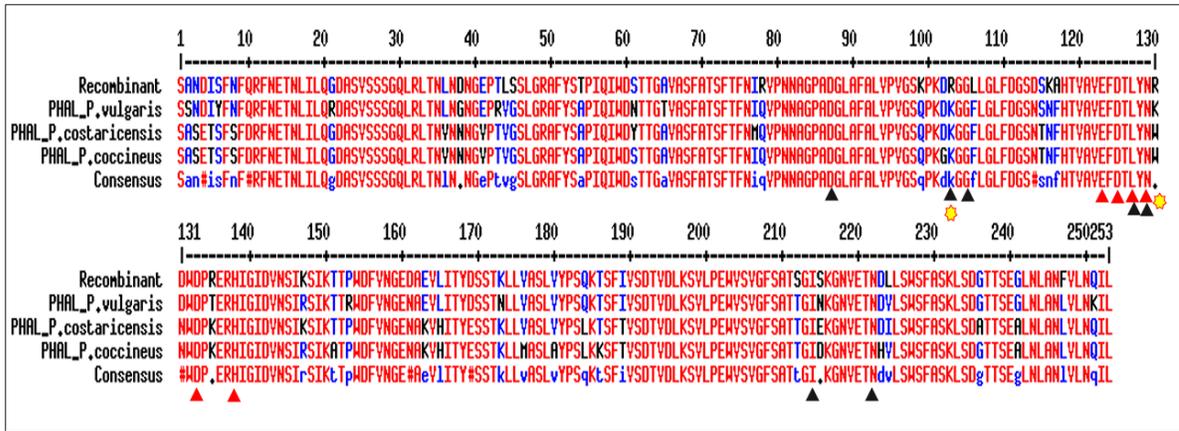


Figura 22. Alineamiento entre las secuencias de LR y leucoaglutininas de leguminosas. El alineamiento fue realizado mediante el empleo del programa “Multiple sequence alignment with hierarchical clustering” (Corpet, 1988). En rojo se muestran las regiones completamente conservadas, en azul las que se encuentran conservadas para la mayoría de secuencias y en negro las que no están conservadas. Los triángulos rojos indican los residuos responsables de establecer interacciones con los cationes metálicos, los triángulos rojos indican los residuos responsables de establecer interacción con los ligandos de las lectinas y los asteriscos amarillos muestran dos de los residuos presuntamente responsables del efecto citotóxico de LN2.

7.9.3 Posibles interacciones con ácido siálico.

El exceso de ácido siálico, es uno de los principales marcadores de glicosilaciones aberrantes en los receptores de muerte FAS y TRAIL expresados por células tumorales. Debido a ello, y en vista de la importancia de las argininas para su reconocimiento, se realizó un modelado de las posibles interacciones que puede establecer el ácido siálico con el DRC de LN2 (Figura 23). Este modelaje confirmó que debido a la orientación y carga de la Arg103, su interacción con ácido siálico es muy probable. Adicionalmente se identificó un nuevo residuo de arginina situado en la posición 132, que no se encuentra presente en las otras leucoaglutininas. Si bien, no parece tener una interacción directa con el ácido siálico, se encuentra en una posición adyacentemente a dos de los residuos involucrados en el reconocimiento de carbohidratos y justo entre los 7 residuos responsables de formar enlaces de coordinación con sus cationes metálicos, los cuales son fundamentales para las interacciones entre monómeros y, por lo tanto, para el reconocimiento de carbohidratos complejos. Por lo cual, no se descarta que este residuo también pueda estar contribuyendo a potenciar el efecto citotóxico de LN2.

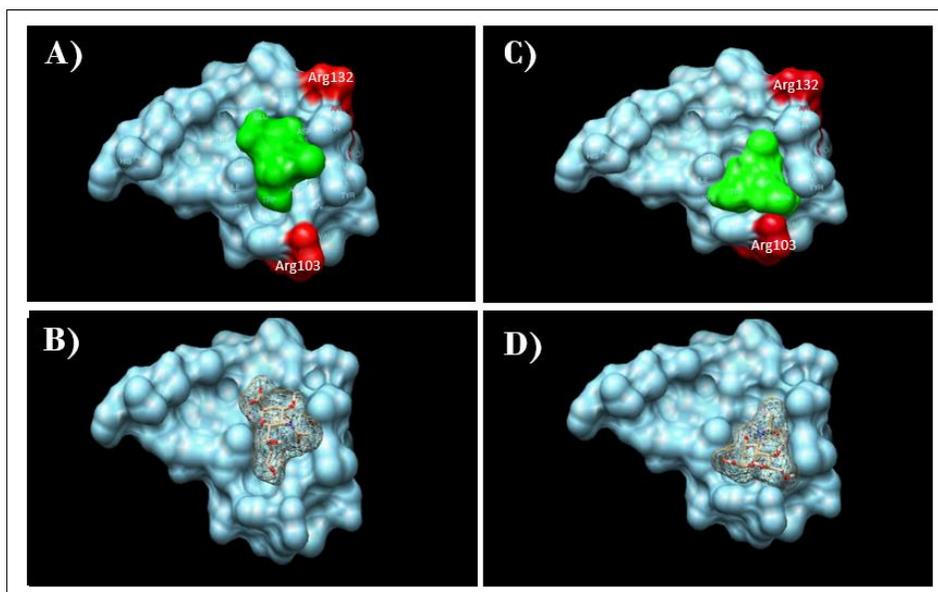


Figura 23. Posibles interacciones entre ácido siálico y el DRC de la LR. El alineamiento fue realizado mediante el empleo del programa “Chimera”. En azul se muestra la superficie de la LR, en verde la estructura del ácido siálico y en rojo los residuos de arginina 132 y 103.

7.9.4 Construcción de lectinas mutantes

Dada la evidencia mostrada con anterioridad, se elaboraron dos mutantes de LN2, en donde el residuo de Arg103 y Arg132 fueron sustituidos por Glutamina (Q). Para la modificación se utilizó una construcción elaborada previamente para producir la LR y se modificó la secuencia mediante mutagénesis dirigida, por medio de una amplificación inversa.

En la Figura 24A se observa el resultado de la amplificación, en donde se pueden distinguir claramente los amplicones de cada una de las mutantes cuando se utilizó una tm de 59° C. El tamaño aproximado de los amplicones es de 3000 pb debido a que la amplificación inversa conlleva a la amplificación del vector completo.

De la transformación de *P. pastoris*, las 4 colonias seleccionadas para el escrutinio de la producción de cada mutante fueron positivas (Figura 24B). Las colonias que mostraron menor producción fueron la 3 y 4 para mut 103 y mut 104 respectivamente, mientras que aquellas que mostraron mayor producción fueron las colonias 1 en ambos casos. Las bandas adicionales observadas en cada uno de los carriles corresponden a productos de degradación derivados de la gran cantidad de lectina producida. Con base en estos resultados se seleccionó la colonia número uno de cada mutante para escalar la producción.

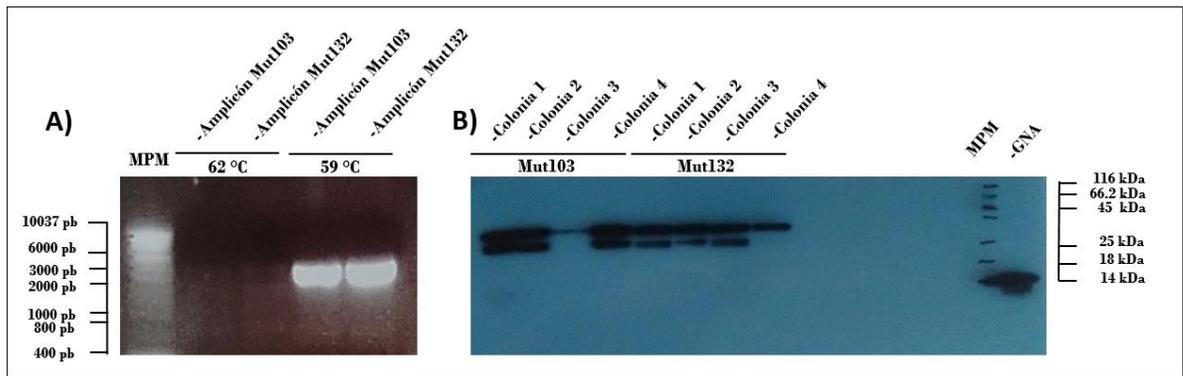


Figura 24. Construcción de las mutantes y transformación de *P. pastoris*. A) Electroforesis en gel de agarosa de la amplificación del vector pGAPαZB+LN2 mediante dos diferentes condiciones. Carril 1; marcador de tamaño molecular. Carriles 2-3; productos de las amplificaciones de mut103 y mut132 a 62°C. Carriles 4-5; productos de la amplificación de mut103 y mut132 a 59° C. B) Western blot con anticuerpos anti-His para identificación de las mutantes recombinantes en medio de cultivo.

Carriles 1-8; colonias transformadas de *P pastoris*, carriles 8-12 espacios vacíos. Carril 13; Marcador de tamaño molecular. Carril 12; 500 ng de GNA recombinante como control positivo.

7.9.5 Fermentación y purificación de mutantes

Para la producción de ambas mutantes se utilizó la misma metodología descrita para la LR. El rendimiento final obtenido fue de 205 y 184 mg/L para Mut103 y Mut132 respectivamente. El perfil electroforético del medio de cultivo obtenido para ambas fermentaciones fue muy similar al que mostró anteriormente la fermentación de la LR (Figuras 10, 25B y 26B) donde el producto recombinante se presenta como la banda más predominante.

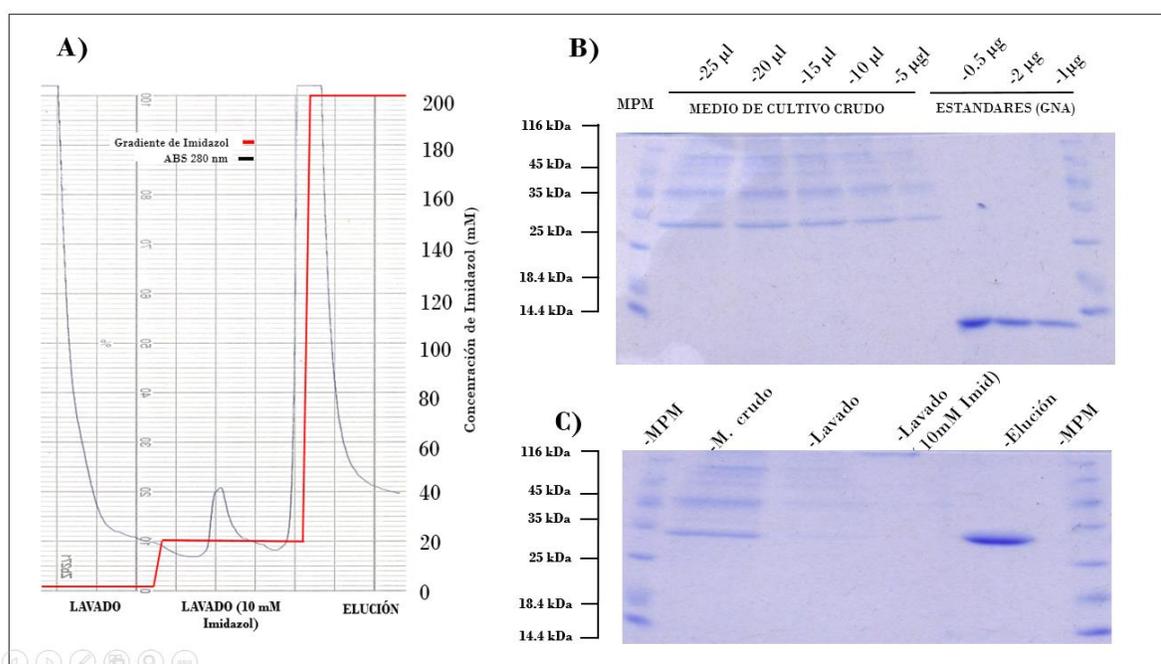


Figura 25. Purificación de Mut103. A) Cromatograma de la purificación. En rojo se muestra el gradiente de imidazol (0-200 mM) y en negro la absorbancia de la proteína a 280 nm. B) Estimación de la producción total de lectina recombinante durante la segunda fermentación. Carril 1; Marcador de tamaño. Carriles 2-6; Gradiente descendiente del medio de cultivo obtenido de la fermentación. Carriles 7-9; Estándares de GNA-sigma en diferentes concentraciones. C) Comparación del perfil electroforético de las lectinas recombinantes producidas durante las 2 fermentaciones realizadas. D) SDS-PAGE de los perfiles electroforéticos de cada una de las fracciones recolectadas durante la purificación. Carril 1; Marcador de tamaño. Carril 2; 25 µL de medio de cultivo crudo. Carril 3; 25 µL de lavado con buffer 0 mM de Imidazol. Carril 4; 25 µL de lavado con buffer 10mM de imidazol. Carril 5; 5 µL de la elución de la proteína con buffer 200 mM de imidazol.

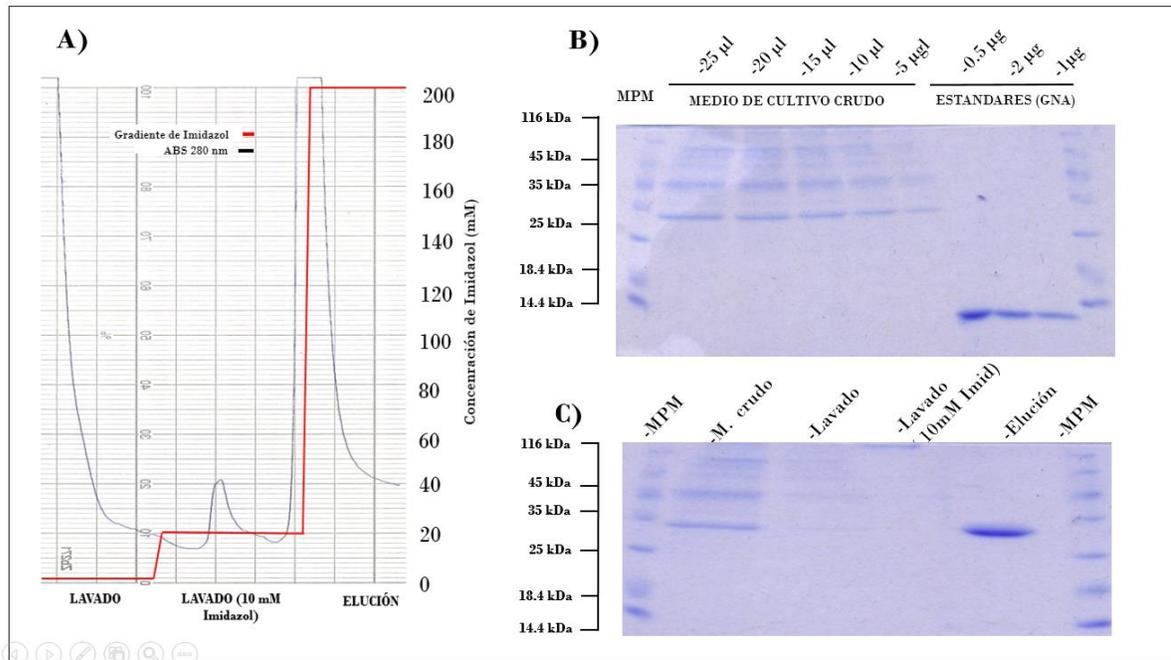


Figura 26. Purificación de Mut132. A) Cromatograma de la purificación. En rojo se muestra el gradiente de imidazol (0-200 mM) y en negro la absorbancia de la proteína a 280 nm. B) Estimación de la producción total de lectina recombinante durante la segunda fermentación. Carril 1; Marcador de tamaño. Carriles 2-6; Gradiente descendiente del medio de cultivo obtenido de la fermentación. Carriles 7-9; Estándares de GNA-sigma en diferentes concentraciones. C) Comparación del perfil electroforético de las lectinas recombinantes producidas durante las 2 fermentaciones realizadas. D) SDS-PAGE de los perfiles electroforéticos de cada una de las fracciones recolectadas durante la purificación. Carril 1; Marcador de tamaño. Carril 2; 25 µL de medio de cultivo crudo. Carril 3; 25 µL de lavado con buffer 0 mM de imidazol. Carril 4; 25 µL de lavado con buffer 10mM de imidazol. Carril 5; 5 µL de la elución de la proteína con buffer 200 mM de imidazol.

7.9.6 Caracterización de las mutantes

El análisis electroforético confirmó que ambas mutantes poseen el mismo tamaño que la LR producida previamente (~30 kDa), indicando con ello que las modificaciones realizadas en Mut103 y Mut132 no interfirieron con la edición de sus antenas glúcidas, al menos en cuanto a tamaño se refiere y que su extremo *N*-terminal posee la secuencia EAEAAA. Por su parte, la tinción de glicoproteínas reveló que al igual que la LR, las mutantes contienen una *N*-glicosilación en la posición número 13 y no contienen *O*-glicosilaciones, acorde a lo reportado previamente para la LR (Figura 27).

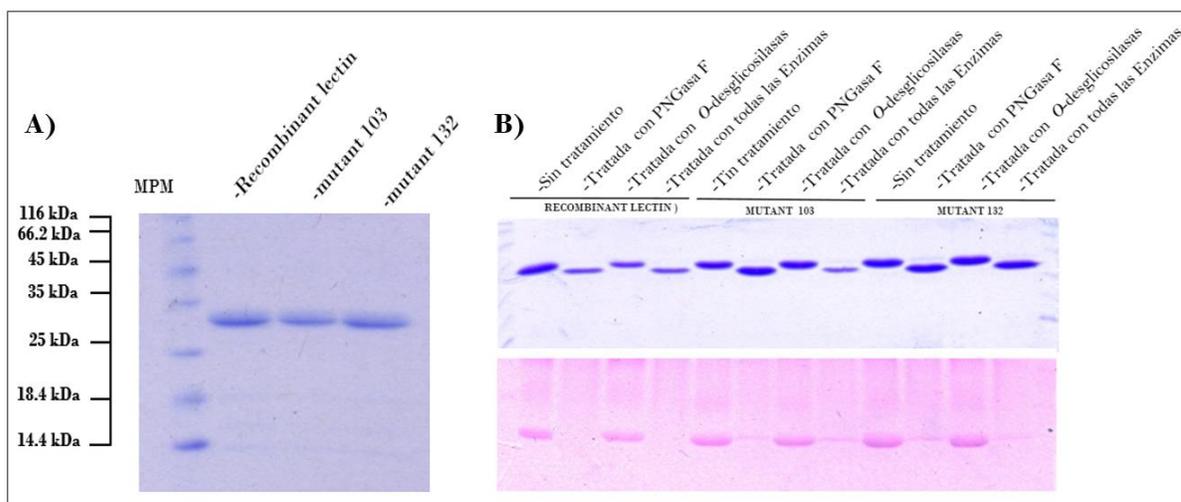


Figura 27. Caracterización de las mutantes. A) Comparación de tamaño entre LR y las mutantes. SDS-PAGE de los perfiles electroforéticos de la LR, Mut103 y Mut132. Carril 1; Marcador de tamaño. Carril 2; 5 μ g de lectina recombinante. Carril 3; 5 μ g de Mut103l. Carril 4; 5 μ g de Mut132. B) Identificación de las glicosilaciones presentes en la lectina recombinante. En la parte superior de la figura se muestra un gel de electroforesis teñido azul de Coomassie R-250. Carril 1; Lectina recombinante (LR) sin tratamiento. Carril 2; LR tratada con *N*-Glicosidasa F (PGNasaF). Carril 3; LR tratada con todas las *O*-desglicosilasas (β 1,4-Galactosidasa, Endo- α -*N*-acetilgalactosaminidasa, α 2-3,6,8,9-Neuraminidasa y β -*N*-Acetilglucosaminidasa) Carril 4; LR tratada con todas las *N*- y *O*-desglicosilasas (*N*-Glicosidasa F, β 1,4-Galactosidasa, Endo- α -*N*-acetilgalactosaminidasa, α 2-3,6,8,9-Neuraminidasa y β -*N*-Acetilglucosaminidasa). Carril 5; Mut103 sin tratamiento. Carril 6; Mut103 tratada con *N*-Glicosidasa F (PGNasaF). Carril 7; Mut103 tratada con todas las *O*-desglicosilasas (β 1,4-Galactosidasa, Endo- α -*N*-acetilgalactosaminidasa, α 2-3,6,8,9-Neuraminidasa y β -*N*-Acetilglucosaminidasa) Carril 8; Mut103 tratada con todas las *N*- y *O*-desglicosilasas (*N*-Glicosidasa F, β 1,4-Galactosidasa, Endo- α -*N*-acetilgalactosaminidasa, α 2-3,6,8,9-Neuraminidasa y β -*N*-Acetilglucosaminidasa). Carril 9; Mut132 sin tratamiento. Carril 10; Mut132 tratada con *N*-Glicosidasa F (PGNasaF). Carril 11; Mut132 tratada con todas las *O*-desglicosilasas (β 1,4-Galactosidasa, Endo- α -*N*-acetilgalactosaminidasa, α 2-3,6,8,9-Neuraminidasa y β -*N*-Acetilglucosaminidasa) Carril 12; Mut132 tratada con todas las *N*- y *O*-desglicosilasas (*N*-Glicosidasa F, β 1,4-Galactosidasa, Endo- α -*N*-acetilgalactosaminidasa, α 2-3,6,8,9-Neuraminidasa y β -*N*-Acetilglucosaminidasa). En la parte inferior de la figura se muestra un con la misma disposición de muestras teñidas con Schiff-PAS

Finalmente, el experimento de dosis respuesta con Mut103 y Mut132 sobre células HT-29 reveló que cada una de las mutaciones realizadas tuvo efectos negativos sobre el efecto citotóxico de la proteína y únicamente a las dosis más altas (50 μ g/mL) fueron capaces de alcanzar el 50% de muerte celular. Lo anterior resulta particularmente interesante y abre un abanico de posibilidades para el estudio de función de la LR, sin embargo, se considera necesario repetir este experimento para obtener duplicados biológicos que permitan realizar el análisis estadístico.

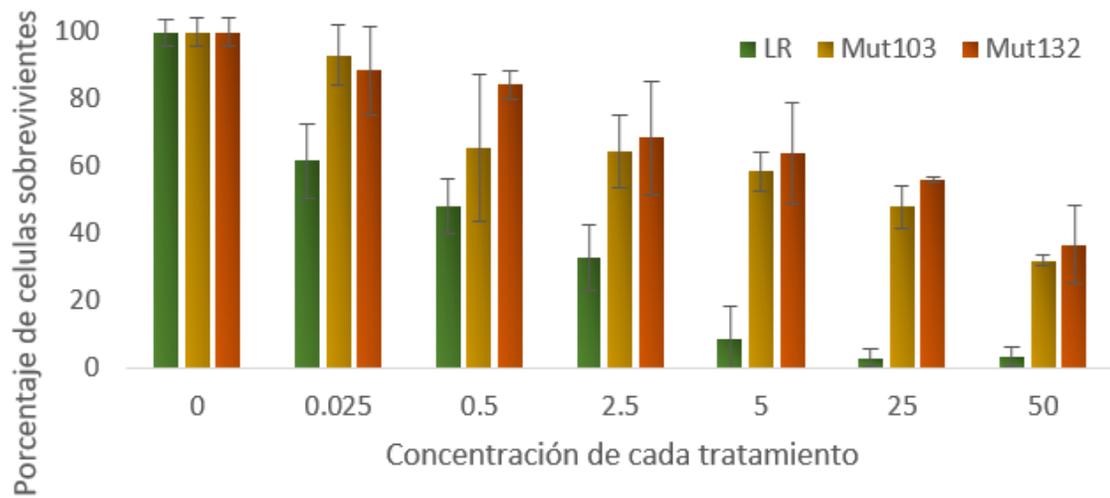


Figura 28. Efecto de las mutaciones propuestas sobre la citotoxicidad de LR. El eje Y de la gráfica representa el porcentaje de células sobrevivientes con respecto al control negativo a las 24 horas de tratamiento. El eje de las X representa la concentración de proteína utilizada para cada tratamiento. Las barras verdes corresponden al tratamiento con LR, mientras que las barras amarillas y naranjas corresponden a los tratamientos con Mut103 y Mut132 respectivamente. Los recuentos al microscopio se realizaron mediante el uso de un hematímetro a las 24 h de iniciado el tratamiento. El experimento fue realizado por triplicado.

8 CONCLUSIONES

Fue posible obtener una lectina recombinante de frijol Tépari mediante la metodología propuesta, con un rendimiento final de producción de 316 mg/L y el producto obtenido exhibió la misma actividad biológica de su homóloga nativa (LN2).

La lectina recombinante es aproximadamente 2.5 kDa más grande que LN2, esta diferencia de tamaño tiene lugar debido a la combinación de 3 principales factores, los cuales son; la adición de la cola de histidinas, el procesamiento incompleto de Factor- α y la presencia una antena *N*-glicosídica ligeramente más grande que la de LN2. No obstante, el producto mantiene su actividad citotóxica similar a la FCL, lo que sugiere que ninguna de ellas repercute de manera considerable sobre el plegamiento del DRC de la lectina.

A pesar de que la LR no posee actividad aglutinante sobre eritrocitos, su efectividad para inducir muerte celular sobre células de cáncer, en conjunto con los análisis filogenéticos y alineamiento de secuencias de lectinas emparentadas, sugieren que tanto LR como LN2 pertenecen en realidad a la familia de las leucoaglutininas y que la actividad eritroaglutinante de la FCL se debe exclusivamente a la proteína LN1.

El análisis de secuencias de lectinas en conjunto con los estudios realizados para las mutantes, revelaron que LN2 es la única lectina de leguminosa que posee residuos de arginina en las posiciones 103 y 132. La sustitución conservativa de estos por glutamina, deriva en una importante disminución del efecto citotóxico de la lectina recombinante, lo que sugiere que dichos residuos son importantes para el establecimiento de las interacciones lectina-ligando.

Por otra parte, la evidencia obtenida indica que el incremento de tamaño de la antena glicosídica de LR con respecto a LN2 no repercutió sobre la actividad biológica de la LR. Este resultado, dista ampliamente de lo esperado ya que

algunos autores afirman que las glicosilaciones de las lectinas son indispensables para su interacción con carbohidratos y se sabe que las glicosilaciones conferidas por levaduras a sus productos son considerablemente distintas a las de glicoproteínas vegetales. Lo anterior, aunado al hecho que el único *sequon* de LR y LN2 se encuentre en el extremo opuesto a sus DRC, parece indicar que, en este caso particular, sus antenas glicosídicas no intervienen directamente con el reconocimiento de carbohidratos, sin embargo, no se descarta que su ausencia o la presencia de una antena de mayor tamaño, derive en la pérdida significativa de su actividad biológica.

Los resultados expuestos en el presente trabajo demuestran que la estrategia propuesta permite producir sintéticamente una lectina recombinante de frijol Tépari con actividad citotóxica sobre células de cáncer. Esta metodología permite evadir los inconvenientes asociados a los sistemas de purificación tradicionales y provee mejores rendimientos. Futuros estudios se enfocarán en optimizar dicho procedimiento, así como en caracterizar los efectos de dicha lectina mediante estudios *in vivo*.

9 REFERENCIAS

- Adar, R., Streicher, H., Rozenblatt, S., & Sharon, N. (1997). Synthesis of soybean agglutinin in bacterial and mammalian cells. *European Journal of Biochemistry*, 689, 684–689.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2002). Intracellular Compartments and Protein Sorting. In *Molecular Biology of the Cell* (4th ed., pp. 723–730). New York: Garland Science.
- Ángeles-Zaragoza, M. (2010). *Caracterización del efecto citotóxico de un concentrado de lectina de frijol Tépari (Phaseolus acutifolius) sobre células de cáncer de colon (HT-29)*. Universidad Autónoma de Querétaro.
- Araújo, C. V., Lazzarotto, C. R., Aquino, C. C., Figueiredo, I. L., Costa, T. B., Oliveira Alves, L. A., ... Oriá, R. B. (2015). Alanyl-glutamine attenuates 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis in apolipoprotein E-deficient mice. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 48(6), 493–501. <https://doi.org/10.1590/1414-431X20144360>
- Arteaga IT, Guillén JLC, Olaya EM, Gasca TG, Zaragoza MVÁ, et al. (2016) Characterization of Two Non-Fetuin-Binding Lectins from Tepary Bean (*Phaseolus acutifolius*) Seeds with Differential Cytotoxicity on Colon Cancer Cells. *J Glycobiol* 5: 117. doi:10.4172/2168-958X.1000117
- Barnes, D. A., & Thorner, J. (1986). Genetic manipulation of *Saccharomyces cerevisiae* by use of the LYS2 gene. *Molecular and Cellular Biology*, 6(8), 2828–2838. <https://doi.org/10.1128/MCB.6.8.2828>.
- Baumgartner, P., Raemaekers, R. J. M., Durieux, A., Gatehouse, A., Davies, H., & Taylor, M. (2002). Large-scale production, purification, and characterisation of recombinant *Phaseolus vulgaris* phytohemagglutinin E-form expressed in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification*, 26(3), 394–405. [https://doi.org/10.1016/S1046-5928\(02\)00555-7](https://doi.org/10.1016/S1046-5928(02)00555-7)

Bradford MA (1976). Rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. *Anal Biochem* 72:248-252.

Branco, A. T., Bernabé, R. B., Dos Santos Ferreira, B., De Oliveira, M. V. V., Garcia, A. B., & De Souza Filho, G. A. (2004). Expression and purification of the recombinant SALT lectin from rice (*Oryza sativa* L.). *Protein Expression and Purification*, 33(1), 34–38. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2003.08.017>

Cereghino, J., & Cregg, J. M. (2000). Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiology Reviews*, 24, 45–66. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10640598>

Chang, C. P., Yang, M. C., Liu, H. S., Lin, Y. S., & Lei, H. Y. (2007). Concanavalin A induces autophagy in hepatoma cells and has a therapeutic effect in a murine in situ hepatoma model. *Hepatology*, 45(2), 286–296. <https://doi.org/10.1002/hep.21509>

Chao, Q., & Etzler, M. E. (1994). Incorrect targeting of plant vacuolar lectins in yeast. *Journal of Biological Chemistry*, 269(33), 20866–20871. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8063703>

Chrispeels, A. S., & Maarten, J. (1993). Identification of vacuolar sorting information in phytohemagglutinin, an unprocessed vacuolar protein. *Journal of Experimental Botany*, 44, 23–27.

Colangelo, J., Licon, V., Benen, J., Visser, J., Bergmann, C., & Orlando, R. (1999). Characterization of the glycosylation of recombinant endopolygalacturonase I from *Aspergillus niger*. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 13(14), 1448–1453. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0231\(19990730\)13:14<1448::AID-RCM665>3.0.CO;2-S](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0231(19990730)13:14<1448::AID-RCM665>3.0.CO;2-S)

Cooper, G. M., & Hausman, R. E. (2010). *La Célula* (5ta ed.). Marbán.

Córdoba-Ruiz, H., Algecira-Encizo, N., Poutou-Piñales, R., & Barrera-Avellaneda, L. (2003). *Pichia pastoris*, una alternativa para la producción de glicoproteínas

- humanas de uso terapéutico . Estrategias de fermentación. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 5(2), 1–16. Retrieved from <http://redalyc.uaemex.mx>
- Corpet, F. (1988). Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Research*, 16(22), 10881–90. <https://doi.org/10.1093/nar/16.22.10881>
- Cunningham, B. A., Hemperly, J. J., Hopp, T. P., & Edelman, G. M. (1979). Favin versus concanavalin A: Circularly permuted amino acid sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76(7), 3218–3222.
- Dabelsteen, E. (1996). Cell surface carbohydrates as prognostic markers in human carcinomas. *Journal of Pathology*, 179(4), 358–369. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9896\(199608\)179:4<358::AID-PATH564>3.0.CO;2-T](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9896(199608)179:4<358::AID-PATH564>3.0.CO;2-T)
- De Mejía, E. G., & Prisecaru, V. I. (2005). Lectins as bioactive plant proteins: a potential in cancer treatment. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45(6), 425–45. <https://doi.org/10.1080/10408390591034445>
- Demain, A. L., & Vaishnav, P. (2009). Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. *Biotechnology Advances*, 27(3), 297–306. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2009.01.008>
- Díaz, P. H., González, O. M., De Pablos Vélez, Y. R., & Ganem Báez, C. F. A. (1999). Aplicaciones de las lectinas. *Revista Cubana de Hematología, Inmunología Y Hemoterapia*, 15(2), 91–95. Retrieved from http://www.bvs.sld.cu/revistas/hih/vol15_2_99/hih02299.pdf
- Dodd, R. B., & Drickamer, K. (2001). Lectin-like proteins in model organisms: implications for evolution of carbohydrate-binding activity. *Glycobiology*, 11(5), 71R–9R. <https://doi.org/10.1093/glycob/11.5.71R>
- Espinoza-Núñez, A. (2015). *Transformación genética de frijol Tépari (Phaseolus acutifolius) mediada por Agrobacterium tumefaciens empleando genes de*

prueba. Tecnológico de celaya.

- Faheina-Martins, G. V., da Silveira, A. L., Cavalcanti, B. C., Ramos, M. V., Moraes, M. O., Pessoa, C., & Araújo, D. A. M. (2012). Antiproliferative effects of lectins from *Canavalia ensiformis* and *Canavalia brasiliensis* in human leukemia cell lines. *Toxicology in Vitro*, 26(7), 1161–1169. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2012.06.017>
- Ferriz-Martínez, R. A., Torres-Arteaga, I. C., Blanco-Labra, A., & García-Gasca, T. (2010). The role of plant lectins in cancer treatment. *New Approaches in the Treatment of Cancer*, (January 2011), 71–89. Retrieved from https://www.researchgate.net/publication/285472595_The_role_of_plant_lectins_in_cancer_treatment
- Ferriz-Martinez, R., Garciaa-Gasca, K., Torres-Arteaga, I., Rodriguez-Mendez, A. J., Guerrero-Carrillo, M. de J., Moreno-Celis, U., Garcia-Gasca, T. (2015). Tolerability assessment of a lectin fraction from Tepary bean seeds (*Phaseolus acutifolius*) orally administered to rats. *Toxicology Reports*, 2, 63–69. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2014.10.015>
- Fitches, E., Ilett, C., Gatehouse, A. M. R., Gatehouse, L. N., Greene, R., Edwards, J. P., & Gatehouse, J. A. (2001). The effects of *Phaseolus vulgaris* erythro- and leucoagglutinating isolectins (PHA-E and PHA-L) delivered via artificial diet and transgenic plants on the growth and development of tomato moth (*Lacanobia oleracea*) larvae; lectin binding to gut glycoprotein. *Journal of Insect Physiology*, 47(12), 1389–1398. [https://doi.org/10.1016/S0022-1910\(01\)00129-9](https://doi.org/10.1016/S0022-1910(01)00129-9)
- García-Gasca, T., Hernandez-rivera, E., Lopez-Martínez, J., Casta, A. L., Yllescas-gasca, L., Rodriguez, A. J., Blanco-labra, A. (2012). Effects of Tepary Bean (*Phaseolus acutifolius*) Protease Inhibitor and Semipure Lectin Fractions on Cancer Cells. *Nutrition and Cancer*, 64(8), 1269–1278. <https://doi.org/10.1080/01635581.2012.722246>
- Gastman, B., Wang, K., Han, J., Zhu, Z., Huang, X., Wang, G.-Q., ... Gorelik, E.

- (2004). A novel apoptotic pathway as defined by lectin cellular initiation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 316(1), 263–271. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.02.043>
- Goldstein, I. J., & Hayes, C. E. (1978). The Lectins: Carbohydrate-Binding Proteins of Plants and Animals. *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, 35(C), 127–340. [https://doi.org/10.1016/S0065-2318\(08\)60220-6](https://doi.org/10.1016/S0065-2318(08)60220-6)
- Halder, S., Surolia, A., & Mukhopadhyay, C. (2015). Impact of glycosylation on stability, structure and unfolding of soybean agglutinin (SBA): an insight from thermal perturbation molecular dynamics simulations. *Glycoconjugate Journal*, 32(6), 371–384. <https://doi.org/10.1007/s10719-015-9601-y>
- Hamelryck, T. W., Poortmans, F., Chrispeels, M. J., Wyns, L., & Loris, R. (1996). The Crystallographic Structure of Phytohemagglutinin-L *. *The Journal of Biological Chemistry*, 271(34), 20479–20485.
- Jaffe, W. (1980). Hemmagglutinins. In I. Liener (Ed.), *Toxic constituents of plant foodstuffs* (pp. 77–102). New York: academic press inc.
- Jones DT, Taylor WR & Thornton JM (1992) The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. *Computer Applications in the Biosciences* 8: 275-282.
- Källberg, M., Wang, H., Wang, S., Jian, P., Wang, Z., & Hui Lu, J. (2012). Template-based protein structure modeling using the RaptorX web server. *Nature Protocols*, 7, 1511–1522. Retrieved from <http://raptorx.uchicago.edu/%5Cn>
- Kilpatrick, D. C. (2002). Animal lectins: A historical introduction and overview. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1572(2–3), 187–197. [https://doi.org/10.1016/S0304-4165\(02\)00308-2](https://doi.org/10.1016/S0304-4165(02)00308-2)
- Kiss, R., Camby, I., Duckworth, C., Decker, R. De, Salmon, I., Pasteels, J., ... Yeaton, P. (1997). In vitro influence of Phaseolus vulgaris , Griffonia simplicifolia , concaavalin A , wheat germ , and peanut agglutinins on HCT- 15 , LoVo , and SW837 human colorectal cancer cell growth. *Gut*, 40, 253–261.

- Kumar, Kk., Reddy, Gs., Reddy, B., Shekar, Pc., Sumanthi, J., & Chandra, Kl. P. (2012). Biological role of lectins: A review. *Journal of Orofacial Sciences*, 4(1), 20. <https://doi.org/10.4103/0975-8844.99883>
- Laemmli UK (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. *Nature* 227,680-685.
- Lakhtin, V., Lakhtin, M., & Alyoshkin, V. (2011). Lectins of living organisms. The overview. *Anaerobe*, 17(6), 452–455. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2011.06.004>
- Lannoo, N., Vervecken, W., Proost, P., Rougé, P., & Van Damme, E. J. M. (2007). Expression of the nucleocytoplasmic tobacco lectin in the yeast *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification*, 53(2), 275–282. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2007.01.007>
- Laursen, B. S., Sørensen, H. P., Mortensen, K. K., & Sperling-Petersen, H. U. (2005). Initiation of protein synthesis in bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*: *MMBR*, 69(1), 101–23. <https://doi.org/10.1128/MMBR.69.1.101>
- Li, W., Yu, J., Xu, H., & Bao, J. (2011). Concanavalin A: A potential anti-neoplastic agent targeting apoptosis, autophagy and anti-angiogenesis for cancer therapeutics. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 414(2), 282–286. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.09.072>
- Liu, B., Li, C., Bian, H., Min, M., Chen, L., & Bao, J. (2009). Antiproliferative activity and apoptosis-inducing mechanism of Concanavalin A on human melanoma A375 cells. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 482(1–2), 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2008.12.003>
- Makela Olavi. (1957). *Studies on hemmagglutinins of leguminoseae seeds* (1st ed.). Helsinki: Mercatorin Kirjapaino.
- Martínez-Alarcón, D. (2015). *Rizo-secreción de una lectina recombinante con actividad biológica mediante la manipulación genética de frijol tépari*

(*Phaseolus acutifolius*). Universidad Autónoma de Querétaro.

- Nagae, M., Soga, K., & Morita, K. (2014). Phytohemagglutinin from *Phaseolus vulgaris* (PHA-E) displays a novel glycan recognition mode using a common legume lectin fold. *Glycobiology*, 24(4), 368–378. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwu004>
- Oliveira, C., Felix, W., Moreira, R. A., Teixeira, J. A., & Domingues, L. (2008). Expression of frutalin, an α -D-galactose-binding jacalin-related lectin, in the yeast *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification*, 60(2), 188–193. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2008.04.008>
- Oliveira, C., Nicolau, A., Teixeira, J. A., & Domingues, L. (2011). Cytotoxic effects of native and recombinant frutalin, a plant galactose-binding lectin, on HeLa cervical cancer cells. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2011, 9. <https://doi.org/10.1155/2011/568932>
- Patel, A. (2014). Isolation, characterization and production of a new recombinant lectin protein from leguminous plants. *Biochemical Compounds*, 2(1), 2. <https://doi.org/10.7243/2052-9341-2-2>
- Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., Meng, E. C., & Ferrin, T. E. (2004). UCSF Chimera?A visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of Computational Chemistry*, 25(13), 1605–1612. <https://doi.org/10.1002/jcc.20084>
- Pettersen, E., Goddard, T., Huang, C., Couch, G., Greenblatt, D., Meng, E., & Ferrin, T. (n.d.). UCSF Chimera Home Page. Retrieved August 30, 2017, from <http://www.rbvi.ucsf.edu/chimera/>
- Peumans WJ1, Van Damme EJ, Barre A, R. P. (2001). Classification of plant lectins in families of structurally and evolutionary related proteins. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 491, 27–54. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14533788>
- Pusztai A, Watt WB, Stewar JC (1987) Erythro- and lymphoagglutinins of *Phaseolus*

- acutifolius*. *Phytochemistry* 26: 1009-1013.
- Raemaekers, J. M., De Muro, L., Gatehouse, J. A., & Fordham-Skelton, A. P. (1999). Functional phytohemagglutinin (PHA) and *Galanthus nivalis* agglutinin (GNA) expressed in *Pichia pastoris*. Correct N-terminal processing and secretion of heterologous proteins expressed using the PHA-E signal peptide. *European Journal of Biochemistry*, 265(1), 394–403. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.1999.00749.x>
- Romanos, M. a, Scorer, C. a, & Clare, J. J. (1992). Foreign gene expression in yeast: a review. *Yeast*, 8(6), 423–488. <https://doi.org/10.1002/yea.320080602>
- Ryder, S. D., Smith, J. A., Rhodes, E. G., Parker, N., & Rhodes, J. M. (1994). Proliferative responses of HT29 and Caco2 human colorectal cancer cells to a panel of lectins. *Gastroenterology*, 106(1), 85–93. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8276212>
- Sharon, N. (2007). Lectins: carbohydrate-specific reagents and biological recognition molecules. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(5), 2753–2764. <https://doi.org/10.1074/JBC.X600004200>
- Sharon, N., & Lis, H. (2002). How proteins bind carbohydrates: Lessons from legume lectins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(22), 6586–6591. <https://doi.org/10.1021/jf020190s>
- Shinder, J. (2014). Glycosylation. Retrieved August 20, 2017, from <https://www.thermofisher.com/uk/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/protein-glycosylation.html#/legacy=www.piercenet.com>
- Singh, A., Upadhyay, V., & Panda, A. K. (2014). Solubilization and refolding of inclusion body proteins. *Insoluble Proteins: Methods and Protocols*, 99(4), 283–291. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2205-5_15
- Singh, A., Upadhyay, V., Upadhyay, A. K., Singh, S. M., & Panda, A. K. (2015). Protein recovery from inclusion bodies of *Escherichia coli* using mild

- solubilization process, 1–10. <https://doi.org/10.1186/s12934-015-0222-8>
- Tazaki, K., Yoshida, K., Shinohara, K., Koshihara, T., & Yamamoto, N. (1995). Expression of cDNA for a bark lectin of Robinia in transgenic tobacco plants. *FEBS Letters*, 377(1), 54–58. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(95\)01254-0](https://doi.org/10.1016/0014-5793(95)01254-0)
- Torres-Arteaga, I. C. (2010). *Purificación y caracterización parcial de una lectina de frijol tépari (Phaseolus acutifolius) con actividad citotóxica sobre células cancerígenas*. Universidad Autónoma de Querétaro.
- Wayne M. (2013). Glicoproteínas: Síntesis y Correlaciones Clínicas. Retrieved August 20, 2017, from <http://themedicalbiochemistrypage.org/es/glycoproteins-sp.php>
- Weis, W. I., & Drickamer, K. (1996). Structural basis of lectin-carbohydrate recognition. *Annual Review of Biochemistry*, 65, 441–473. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.65.070196.002301>
- Zhao, J. K., Wang, H. X., & Ng, T. B. (2009). Purification and characterization of a novel lectin from the toxic wild mushroom *Inocybe umbrinella*. *Toxicon*, 53(3), 360–366. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2008.12.009>