

Universidad Autónoma de Madrid
Facultad de Ciencias
Departamento de Biología Molecular



Divergencias en las propiedades moleculares y modo de unión a ligandos de diferentes galectinas humanas

TESIS DOCTORAL



ELIZA BUZAMET



Consejo Superior de Investigaciones Científicas
Instituto de Química-Física Rocasolano
Departamento de Química Física Biológica

Madrid, España, 2012

Universidad Autónoma de Madrid
Facultad de Ciencias
Departamento de Biología Molecular



**Divergencias en las propiedades moleculares y
modo de unión a ligandos de diferentes
galectinas humanas**

*Memoria presentada por Eliza Buzamet
para optar al grado de Doctor en Biología Molecular*

Directora de Tesis: Dra. Dolores Solís

A Lola

AGRADECIMIENTOS

La primera persona que merece mi más sincero agradecimiento es la Dra. Dolores Solís (Lola), la directora de esta Tesis. Gracias por ofrecerme la oportunidad de trabajar en su grupo, por su paciencia y por transmitirme sus conocimientos y hacer posible que mi trabajo en estos años haya sido fructífero. Agradezco también el empujón que me ha dado para aprender español lo más rápido posible y las pequeñas lecciones de gramática española, aunque seguro que aún me queda mucho por aprender...

A la Dra. Margarita Menéndez, por sus valiosos consejos y por ayudarme siempre en mi trabajo.

Al Dr. Fernando Díaz, por enseñarme a trabajar en el mundo de los “aceleradores de partículas”. También a Benet y a Rubén, por ayudarme con los experimentos de SAXS y el análisis de los resultados.

Al Dr. José Abad-Rodríguez, por permitirme trabajar en su laboratorio del Hospital Nacional de Paraplégicos de Toledo y también a Natalia, por introducirme en el interesante y complejo mundo de las neuronas y por su enorme paciencia en enseñarme a manejar las neuronas.

Al Dr. José Antonio Bengoechea, a Quique y a toda la gente del Laboratorio de Patología Microbiana de la Fundación Caubet-Cimera de Mallorca, por haberme ayudado a mejorar mis conocimientos de microbiología y aprender un poco más sobre las funciones que pueden tener “mis galectinas”.

Al Prof. Hans-Joaquim Gabius del “Institut für Physiologische Chemie” de la Universidad de Munich, por sus consejos y su ayuda en el trabajo de esta Tesis.

Al Dr. Pedro Bonay, por aceptar ser mi tutor para esta Tesis y por su tiempo.

A la Unión Europea por financiar la beca Marie Curie, de la que he disfrutado durante 3 años para realizar el trabajo de esta Tesis.

Quiero agradecer a todas mis compañeras de trabajo, Noemí, Laura, Mariasun, Lara, Gloria, Mónica, Palma, Cristina, por haberme ayudado y/o aguantado durante todos estos años.

A Javi, por animarme y por enseñarme a utilizar un espectrómetro de masas. También a Juan, por preocuparse por nosotras y por las pequeñas ayudas en mi trabajo ¡Que majos!

A todos mis amigos que me han ayudado, animado, aguantado, odiado o querido, y también estoy agradecida a toda la gente que me ha hecho sentir en España como en mi propia casa.

A Nicolás, mi novio, por haberme aguantado y/o querido durante los últimos 5 años...

*Gracias a todos,
Eliza*

ÍNDICE

1. Introducción	1
1.1. Los carbohidratos – marcadores de reconocimiento biológico.....	1
1.2. Lectinas – definición y funciones biológicas.....	2
1.3. Características estructurales y termodinámicas de las interacciones proteína-carbohidrato.....	5
1.4. Lectinas animales.....	8
1.5. Galectinas – una familia de lectinas específicas de β -galactósidos.....	10
1.5.1. Clasificación de las galectinas.....	11
1.5.2. Estructura y modo de unión a carbohidratos de las galectinas.....	13
1.5.3. Susceptibilidad de las galectinas a la oxidación.....	16
1.5.4. Localización y papel biológico de las galectinas.....	16
1.5.4.1. Galectinas en el sistema inmune e infección.....	18
1.5.4.2. Galectinas en el sistema nervioso.....	20
2. Objetivos	23
3. Materiales y métodos	25
3.1. Preparación de las galectinas.....	25
3.2. Espectrometría de masas.....	25
3.3. Cromatografía de exclusión molecular.....	26
3.4. Ultracentrifugación analítica.....	27
3.5. Dicroísmo circular y experimentos de desnaturalización térmica.....	28
3.6. Difracción de rayos X a ángulos pequeños (SAXS).....	29
3.7. Ensayos de unión con galectinas marcadas con ^{125}I	33
3.7.1. Marcaje de proteínas con ^{125}I	33
3.7.2. Preparación de fibrinógeno y asialofibrinógeno.....	33
3.7.3. Ensayos de unión a asialofibrina inmovilizada en pocillos de polivinilo.....	34
3.7.4. Ensayos de unión a lactosa-agarosa.....	36
3.8. Cromatografía de afinidad.....	36
3.9. Calorimetría de valoración isoterma.....	37
3.10. Estudios de la actividad de las galectinas sobre bacterias.....	38
3.10.1. Cultivos de bacterias y ensayos de actividad bactericida.....	38
3.10.2. Estudio de la permeabilidad de la membrana bacteriana mediante fluorimetría.....	39
3.11. Estudio de la actividad de las galectinas sobre la diferenciación neuronal.....	40
3.11.1. Aislamiento y cultivo primario de neuronas hipocampales.....	40
3.11.2. Inmunocitoquímica de las neuronas.....	40

3.12. Métodos colorimétricos.....	41
3.12.1. Determinación de la concentración de proteína.....	41
3.12.2. Determinación de la concentración de hexosas.....	42
3.12.3. Determinación de ácido siálico.....	42
3.13. Electroforesis en geles de poliacrilamida.....	42
4. Resultados.....	45
4.1. Masa molecular.....	46
4.2. Plegamiento y estabilidad térmica.....	47
4.2.1. Estructura secundaria.....	47
4.2.2. Análisis de la estructura terciaria.....	51
4.2.3. Estabilidad térmica.....	57
4.3. Estructura cuaternaria y comportamiento hidrodinámico.....	60
4.3.1. Equilibrio de sedimentación.....	60
4.3.2. Cromatografía de filtración en gel.....	62
4.3.3. Velocidad de sedimentación.....	63
4.4. Modelado de hG4 y hG4V mediante SAXS.....	66
4.5. Parámetros termodinámicos de la unión de ligandos.....	72
4.6. Ensayos de unión e inhibición con ¹²⁵ I-hG4-N y ¹²⁵ I-hG4-C.....	75
4.7. Ensayos de la actividad bactericida de las galectinas.....	79
4.7.1. Efecto de las galectinas sobre la estabilidad de la membrana bacteriana.....	82
4.8. Caracterización de hG1 oxidada.....	83
4.9. Efecto de hG1 nativa y oxidada sobre el crecimiento neuronal <i>in vitro</i>	88
5. Discusión.....	91
5.1. Propiedades hidrodinámicas y estructura global de hG4 y hG8.....	91
5.2. Intercomunicación entre dominios en las galectinas.....	93
5.3. Arquitectura del sitio de unión y reconocimiento de ligandos.....	95
5.4. Plasticidad del CRD y efecto de la unión de ligandos.....	97
5.5. Diversidad funcional de las galectinas.....	98
6. Conclusiones.....	101
7. Bibliografía.....	103
Abreviaturas.....	121
Anexo I	
Anexo II	

Resumen

Crosslinking of glycan ligands on the cell surface by endogenous lectins triggers biosignaling and mediates cell-cell interactions, the family of adhesion/growth regulatory galectins in particular being key players in many physiological and pathological processes. Because of the participation of galectins in basic cellular functions (apoptosis, cellular recognition, triggering of transmembrane signaling cascades, etc.), they play key roles in cancer and immune and inflammatory processes. Therefore, the systematic characterization of the structure, stability and ligand recognition of the different galectins is fundamental for understanding their biological functions. The class of galectins exhibiting a tandem-repeat-type design contains two different carbohydrate-recognition domains (CRDs) covalently connected by a linker peptide. This characteristic CRD arrangement enables the members of this category to specifically bind and crosslink different glycan targets, thus operating as dual fine-tuned sensors of galactose-containing glycans.

In this Thesis, we have investigated the structural organization in solution and thermal stability of the human tandem-repeat-type galectins 4 and 8, in comparison with human galectins 1 (proto-type) and 3 (chimera-type), using a combination of biophysical approaches, including gel filtration chromatography, analytical ultracentrifugation and circular dichroism. The properties of natural and tailored variants and of isolated CRDs have been examined in parallel, in order to evaluate the influence of the linker on the protein's properties and to discern divergences between domains. Using small-angle X-ray scattering, the structure of galectin-4 in solution has been modeled at low resolution. This model is the first depiction of the overall shape of a tandem-repeat-type galectin. In addition, the topological features and thermodynamic parameters of ligand binding have been inspected using isothermal titration calorimetry and binding/inhibition radioassays.

Some similarities but also significant differences that may bring about the appearance of functional divergences are observed, not only between galectins, but also between the CRDs of a given galectin. As testing system of the galectin's functionality, their possible bactericidal activity has been investigated. The results reveal a remarkable synergistic activity of certain galectins with antimicrobial peptides, the efficiency of galectin-1 in particular increasing noticeably upon oxidation. Therefore, the mechanism of oxidation of this galectin and the activity of reduced and oxidized variants on neuronal growth, a main biological target of oxidized galectin-1, has been examined.

Overall, the results illustrate the occurrence of fine-tuned molecular properties for each particular galectin, which underlie the functional plasticity of this lectin family.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Los carbohidratos - marcadores de reconocimiento biológico

Hasta hace no mucho tiempo, los carbohidratos eran considerados como simples fuentes de energía o como elementos estructurales. Sin embargo, hoy en día es sabido que juegan un papel fundamental como marcadores de reconocimiento.

Los carbohidratos se encuentran abundantemente en las células y espacios extracelulares, unidos a lípidos, a proteínas, o en forma de largas cadenas de glicosaminoglicanos cargados, ya sea libres o unidos a pequeños núcleos proteicos. Es evidente que la presencia de estos carbohidratos modifica sensiblemente las propiedades químico físicas de estas moléculas, como la masa, carga eléctrica, solubilidad, etc. Pero además, los carbohidratos en sí sirven como señales de reconocimiento en innumerables procesos biológicos, tanto normales como patológicos.

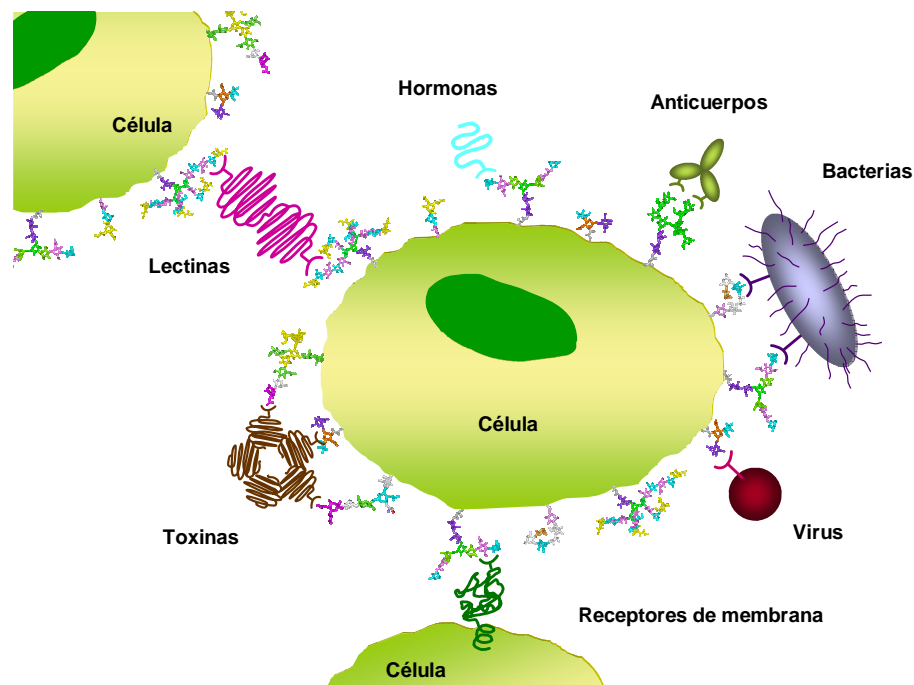


Figura 1.1. Diferentes interacciones proteína-carbohidrato en la superficie celular.

La unión de proteínas receptoras a los carbohidratos de la superficie celular facilita el reconocimiento y adhesión intercelular, mediando numerosos procesos, como la organización tisular, la inflamación o el cáncer. Además, los carbohidratos sirven como señales de reconocimiento para anticuerpos, hormonas, toxinas y receptores presentes en la superficie de virus y bacterias (Figura 1.1). En todos estos procesos, los carbohidratos actúan codificando información que es decodificada por receptores específicos (Gabiús *et al.*, 2004). La capacidad de los carbohidratos para codificar información biológica deriva de su enorme diversidad estructural. De hecho, el número de estructuras que se pueden formar a partir de un determinado número de residuos es enormemente superior en el caso de los carbohidratos que para péptidos u oligonucleótidos. La base principal de esta diversidad

radica en la posibilidad de adoptar dos configuraciones anoméricas (α o β) y de formar enlaces vía diferentes posiciones (1→1, 2, 3, 4, 6 para hexopiranosas). Así, dos restos de un mismo monosacárido se pueden unir de 11 formas diferentes, formando isómeros que presentan diferentes estructuras tridimensionales y actividades biológicas. Además, un monosacárido puede estar implicado en más de dos enlaces glicosídicos, dando lugar a la formación de estructuras ramificadas, una propiedad que es exclusiva de los carbohidratos. Finalmente, la introducción de sustituciones específicas, como la acetilación, fosforilación o sulfatación, aumenta aún más la diversidad estructural. Por otra parte, mientras la conformación de silla de un monosacárido es relativamente rígida, el ángulo de torsión alrededor del enlace glicosídico puede variar, de modo que una estructura primaria bien definida puede adoptar diversas conformaciones en solución en las que la orientación relativa de los monosacáridos es diferente.

Como ya se ha mencionado, esta diversidad estructural de los carbohidratos les confiere un enorme potencial para almacenar información biológica. Transformar este potencial en un glicocódigo operativo implica la existencia de un eficiente mecanismo de decodificación (Gabius *et al.*, 2011). La abundante presencia de carbohidratos en la superficie celular puede facilitar que la interacción entre carbohidratos de células vecinas juegue un papel en los procesos de reconocimiento y adhesión intercelular. Sin embargo, es el reconocimiento de los carbohidratos por proteínas receptoras lo que permite explotar en toda su dimensión el potencial de los carbohidratos como codificadores de información. Las proteínas capaces de descifrar el glicocódigo son las lectinas.

1.2. Lectinas - definición y funciones biológicas

El primer estudio sobre una lectina data de 1888, cuando Hermman Stillmark describió el fenómeno de hemaglutinación inducido por un factor proteico presente en los extractos de semillas de ricino (*Ricinus communis*), denominado ricina (Stillmark, 1888). Este estudio reveló además cierta selectividad en la aglutinación por ricina de glóbulos rojos procedentes de diferentes animales. La habilidad de ésta y otras hemaglutininas para distinguir entre diferentes grupos sanguíneos llevó posteriormente a Boyd y Shapleigh (1954) a proponer el nombre de lectina (del latín *legere* = seleccionar o escoger).

Originalmente, se hacía referencia a las lectinas como “sustancias de tipo anticuerpo” (Boyd y Shapleigh, 1954) debido a su exquisita especificidad de unión. Sin embargo, a excepción de las lectinas animales de tipo I, que estructuralmente pertenecen a la superfamilia de las inmunoglobulinas (Gabius, 1997), las lectinas no presentan similitud estructural con los anticuerpos. Además, aunque es conocido que las lectinas pueden ser inducidas por infección viral, estrés salino o sequía, por ejemplo, la biosíntesis de las lectinas, al contrario que la de las inmunoglobulinas, no requiere un estímulo del sistema inmune. Otro aspecto

importante es que las lectinas no modifican químicamente los carbohidratos que unen. Esta premisa obliga a excluir explícitamente en la definición de lectina a las glicosiltransferasas, glicosidasas y otras enzimas que modifican la estructura de los carbohidratos a los que reconocen. Esta restricción es también necesaria debido a que ciertas glicosidasas son capaces de aglutinar células a baja temperatura, como consecuencia de que su unión a la superficie de la célula se realiza más rápidamente que la hidrólisis de los enlaces glicosídicos. Aunque se han descrito lectinas modulares que poseen dominios catalíticos, la actividad enzimática tiene lugar en un sitio independiente del sitio de unión a carbohidratos. Por todo ello, la definición más aceptada actualmente es la propuesta por [Peumans y Van Damme \(1995\)](#): las lectinas son proteínas de origen no inmune que poseen al menos un dominio no catalítico capaz de unir específica- y reversiblemente mono- u oligosacáridos y cuya estructura puede o no presentar otros dominios proteicos.

Numerosos procesos biológicos están mediados por la unión de carbohidratos por lectinas. En plantas, las lectinas controlan la germinación, el transporte y almacenamiento de azúcares y participan en la protección contra insectos y microorganismos dañinos ([Janzen et al., 1976](#); [Barkai-Golan et al., 1978](#)). En la simbiosis entre leguminosas y bacterias fijadoras de nitrógeno, una lectina presente en las raíces de la planta reconoce específicamente los lipo-quitos oligosacáridos especie-específicos de *Rhizobium*, denominados factores Nod, facilitando el anclaje de la bacteria ([Kalsi y Etzler, 2000](#)).

El reconocimiento de carbohidratos por lectinas es el medio de fijación usado por numerosas bacterias, virus, toxinas, hongos y protozoos ([Vasta, 2009](#)). En la superficie de muchas bacterias hay presentes lectinas (adhesinas) que facilitan la adhesión y colonización al unirse a glicoconjugados de la membrana de la célula huésped. En algunos casos, la especificidad de unión explica el tropismo hacia un tejido del organismo ([Holgerson et al., 2009](#)). Por ejemplo, la infección del tracto urinario por un serotipo específico de *Escherichia coli* depende de la unión a manosa. Otra clase de lectinas bacterianas son las toxinas secretadas, importantes en la patogenicidad. Como ejemplos se pueden citar la toxina A de *Clostridium difficile*, la toxina del cólera (*Vibrio cholerae*) o las toxinas enterotoxigénicas de *E. coli*, que actúan sobre las células epiteliales del intestino.

En la década de los 50 se demostró por primera vez que el virus de la gripe reconoce carbohidratos específicos en la célula huésped. La hemaglutinina del virus se une a los residuos de ácido siálico de los oligosacáridos de la superficie de la célula ([Weis et al., 1988](#)). Por el contrario, en otros casos son lectinas de la célula huésped las que están involucradas en la unión del virus. Por ejemplo, las lectinas de tipo C DC-SIGN, presente en células dendríticas, y L-SIGN, presente en células endoteliales de hígado y nódulos linfáticos, entre otros tejidos, pueden mediar la adhesión del VIH-1, virus Sindbis, citomegalovirus humano, virus de la hepatitis C y virus Ebola, a través de la unión de

estructuras ricas en manosa presentes en el virus (Alvarez *et al.*, 2002), mientras que el receptor de manosa-6-fosfato puede mediar la unión del virus de la varicela-zóster (Zhu *et al.*, 1995).

La primera lectina identificada en animales fue el receptor de asialoglicoproteínas del hígado (Stockert *et al.*, 1974). Este receptor reconoce residuos terminales de galactosa en glicoproteínas séricas que han sufrido pérdida del ácido siálico terminal por un proceso de envejecimiento, eliminando estas glicoproteínas del torrente sanguíneo. Posteriormente, se identificaron otras lectinas involucradas en el tráfico intracelular de proteínas, como el receptor de manosa-6-fosfato, cuya función es la de dirigir las enzimas lisosomales (Dahms *et al.*, 1989). A finales de los 80, la evidencia acumulada demostró además que algunas lectinas actúan como chaperonas. Por ejemplo, la calnexina, una lectina integral de membrana del retículo endoplásmico, funciona en paralelo con la calreticulina, su homólogo soluble, como parte del sistema de control de calidad que asegura el plegamiento correcto de glicoproteínas destinadas a la superficie celular (Trombetta y Helenius, 1998). Hoy en día es sabido que el reconocimiento de carbohidratos por lectinas endógenas juega un papel clave en innumerables procesos biológicos, como la regulación de la síntesis de proteínas, la diferenciación celular o la activación de cascadas de señalización que conducen, por ejemplo, a la apoptosis (muerte celular programada). Intervienen también en el reconocimiento y adhesión intercelular, en procesos como la fecundación y el desarrollo embrionario o en la formación de tumores y la diseminación de células cancerígenas desde un tumor inicial a otros tejidos. Además, participan a diferentes niveles en los procesos de inflamación y defensa del organismo.

Diferentes lectinas endógenas se unen a carbohidratos presentes en la superficie de microorganismos patógenos provocando su encapsulación y muerte, proceso llamado lectinofagocitosis (Ofek y Sharon, 1988). Entre dichas lectinas cabe citar el receptor de macrófagos específico de manosa, la lectina dectin-1, específica de β -1,3/1,6 glucanos presentes en hongos, o las lectinas solubles específicas de manosa (MBPs) de la familia de las colectinas, que reconocen microorganismos que presentan manosa en su superficie diferenciándolos de las estructuras de oligo-manosa de las glicoproteínas endógenas. Las α/θ -defensinas, parte del sistema inmune innato, son también pequeñas lectinas con selectividad hacia glicanos de la superficie de los patógenos (Lehrer, 2009).

La maduración tímica, activación, migración y apoptosis de células T está también regulada por la interacción específica con lectinas endógenas, como las selectinas y las galectinas. Existen evidencias de que la expresión de estas lectinas, así como la de las glicosiltransferasas y glicosidasas que actúan sobre sus ligandos, se regula de forma positiva o negativa durante diferentes fases del inicio, desarrollo y finalización de la respuesta inmune (Van Kooyk y Rabinovich, 2008). Las selectinas también regulan la unión de leucocitos a las

células endoteliales, iniciando la fase de diapédesis que lleva eventualmente a su extravasación.

La participación de lectinas en todos estos procesos ha hecho que se hayan convertido en un importante objetivo de la industria biomédica para el desarrollo, por ejemplo, de terapias antiadhesión contra microorganismos patógenos (Aronson *et al.*, 1979; Zinger-Yoshovich *et al.*, 2010; Anderluh *et al.*, 2012). Es evidente que el desarrollo de estas terapias ha de estar basado en un conocimiento detallado de las características estructurales y termodinámicas del reconocimiento de carbohidratos por lectinas.

1.3. Características estructurales y termodinámicas de las interacciones proteína-carbohidrato

Las características básicas de las interacciones proteína-carbohidrato derivan de las propiedades químicas de los carbohidratos (Figura 1.2). La abundante presencia en éstos de grupos hidroxilo facilita la formación de múltiples enlaces de hidrógeno. Por otra parte, la presencia de regiones no polares constituidas por grupos C-H facilita el establecimiento de interacciones hidrofóbicas, mientras que otros grupos no-polares del azúcar, como los restos metilo de grupos acetamida, pueden también participar en contactos de van der Waals. Además, los azúcares cargados negativamente (conteniendo grupos carboxilato, sulfato o fosfato) pueden intervenir en fuertes interacciones electrostáticas.

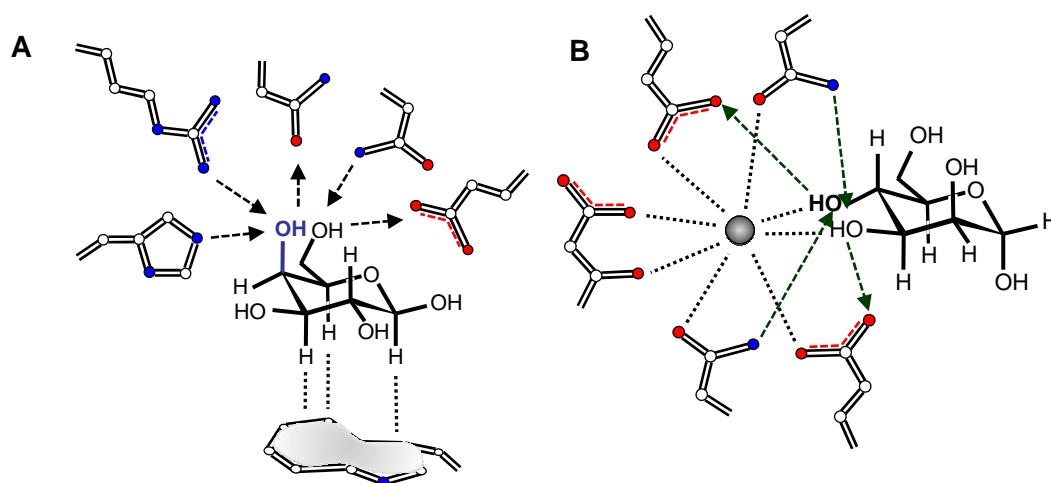


Figura 1.2. Ilustración de las características atómicas básicas de las interacciones proteína-carbohidrato. Las flechas indican la capacidad de los grupos hidroxilo para participar en la formación de enlaces de hidrógeno y señalan desde el donador hacia el aceptor. **A)** Se resalta la formación de una zona alifática C-H (en este caso para β -D-galactosa) que establece una interacción CH- π con un residuo aromático situado adecuadamente (Trp en este caso). **B)** Lectina de tipo C en la que un ión Ca^{2+} (esfera gris) establece contactos con 2 grupos hidroxilo del azúcar (en este caso α -D-manosa).

Correspondiendo a las características de los carbohidratos, los sitios de unión en las proteínas contienen numerosos aminoácidos polares que participan en la formación de una precisa red de enlaces de hidrógeno con el azúcar. Normalmente, sólo algunos grupos

hidroxilo del azúcar están implicados en los principales enlaces de hidrógeno, mientras que otros hidroxilos participan en enlaces más débiles o están expuestos al solvente y no interactúan con la proteína (Figura 1.2). Además, los sitios de unión contienen comúnmente residuos de Trp, Tyr o, menos frecuentemente, Phe, que establecen interacciones CH- π con la cara hidrofóbica del azúcar (Figura 1.2 A). Dos requisitos esenciales para que se den estas interacciones son que el azúcar y los anillos aromáticos estén dispuestos cara a cara y a una distancia menor de 4 Å. En los sitios de unión de proteínas que reconocen carbohidratos cargados negativamente abundan residuos de Arg y Lys cargados positivamente, lo que demuestra la importancia de las interacciones carga-carga. Por último, en algunos casos hay cationes divalentes como Ca²⁺ y Mn²⁺ implicados en el reconocimiento, ya sea indirectamente, configurando el sitio de unión (por ejemplo, en lectinas de leguminosas como la concanavalina A), o por unión directa al carbohidrato, como ocurre para las lectinas de tipo C (Figura 1.2 B) (Weis y Drickamer, 1996). En ambos casos, la presencia de estos iones es necesaria para mantener la capacidad de unión a carbohidratos.

El agua juega también un papel importante en las interacciones proteína-carbohidrato. En algunos casos, las moléculas de agua intervienen directamente uniendo los grupos hidroxilo del azúcar con las cadenas laterales del sitio de unión (Tschampel y Woods, 2003). Por otra parte, en ausencia de un ligando el sitio de unión está ocupado por moléculas de agua que estabilizan, a través de una red de enlaces de hidrógeno, la orientación de los residuos involucrados en la unión, como se observa por ejemplo en la estructura cristalina de la galectina-1 humana (mutante C2S; Figura 1.3 A), de modo que, generalmente, no son necesarios desplazamientos importantes de las cadenas laterales para la unión del ligando. Algunas de estas moléculas de agua ocupan posiciones estratégicas para acomodar los grupos hidroxilo clave implicados en el reconocimiento (Figura 1.3 B) (López-Lucendo *et al.*, 2004). Es interesante mencionar que si se calcula la probabilidad de albergar moléculas de agua en diferentes posiciones del sitio de unión (*water sites*, WS), las posiciones que presentan mayor probabilidad son generalmente aquellas reservadas para los grupos hidroxilo del carbohidrato en el complejo (Di Lella *et al.*, 2007). De este modo, estudiando las propiedades de los WS en la proteína libre es posible predecir la configuración del ligando unido (Roldos *et al.*, 2011).

Al unirse el ligando se produce una reorganización significativa del disolvente a lo largo de las superficies de contacto. En algunos casos, las moléculas de agua estrechamente unidas al sitio de unión tienen que ser desplazadas para permitir el contacto adecuado y lo mismo ocurre con aquellas moléculas de agua que en el azúcar libre están unidas a los grupos hidroxilo implicados en la interacción. Esta reorganización del disolvente contribuye a la energía libre de Gibbs y, por lo tanto, a la afinidad de la unión. Ésta es el corolario de los

cambios de entalpía y entropía derivados de los diferentes eventos asociados al proceso de reconocimiento (Solís *et al.*, 2009). Los cambios de entalpía incluyen, por un lado, la contribución favorable de los contactos específicos proteína-carbohidrato y de los nuevos enlaces de hidrógeno generados entre moléculas de agua tras la desolvatación de la proteína y el carbohidrato y, por otro lado, la contribución desfavorable de la rotura de las interacciones proteína-agua y carbohidrato-agua. Otros eventos importantes que afectan a la entropía de unión son las restricciones en la libertad traslacional y rotacional del ligando y la pérdida de libertad conformacional del carbohidrato y también de la proteína como consecuencia de la formación del complejo. Aunque el sitio de unión pueda tener una organización predeterminada y la proteína sea por tanto capaz de unir el ligando sin cambios conformacionales importantes en el sitio de unión, cualquier posible cambio en la flexibilidad y movilidad interna de la proteína también puede afectar a la termodinámica de la unión (López-Lucendo *et al.*, 2004). Como se deduce de los diferentes factores enumerados, las interacciones proteína-carbohidrato se caracterizan por una compensación entalpía-entropía que tiene como resultado interacciones relativamente débiles en comparación con otras interacciones, por ejemplo proteína-proteína. Así, las constantes de disociación para la mayoría de las interacciones lectina-monosacárido están en el rango de milimolar.

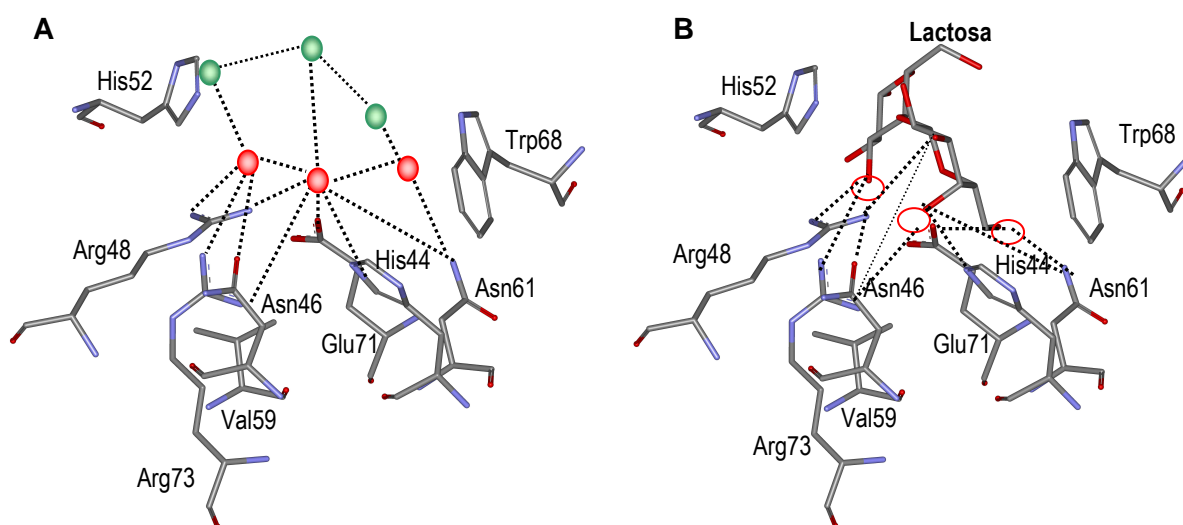


Figura 1.3. Representación del sitio de unión a carbohidratos en el mutante C2S de la galectina-1 humana. **A)** Sitio de unión en la proteína libre, representando en rojo las moléculas de agua que ocupan las posiciones de los grupos hidroxilo O4, O6 de la galactosa y O3 de la glucosa en el complejo con lactosa y en verde las moléculas de agua que estabilizan las anteriores. **B)** Sitio de unión en el complejo con lactosa; los 3 hidroxilos clave se sitúan en posiciones ocupadas anteriormente por moléculas de agua.

Algunas lectinas presentan subsitios capaces de acomodar otros monosacáridos además del monosacárido unido en el sitio primario, estableciendo de este modo contactos adicionales en la unión de oligosacáridos e incrementando la afinidad. La acomodación de residuos en los subsitios secundarios no sólo está favorecida entálpicamente, sino que, además la penalización entrópica es menor porque la movilidad y libertad conformacional

del oligosacárido ya ha sido restringida, al menos en parte, tras su unión al sitio primario. Otro mecanismo empleado por las lectinas para aumentar la afinidad en el reconocimiento es la multivalencia (Dam *et al.*, 2002; Brewer *et al.*, 2002; Lee y Lee, 2000). Muchas lectinas son oligoméricas y por lo tanto contienen varios dominios de unión a carbohidratos. La unión simultánea de los diferentes dominios a ligandos multivalentes, como los de la superficie celular, aumenta la potencia de la unión (Earl *et al.*, 2011).

1.4. Lectinas animales

Las lectinas animales fueron descubiertas incluso antes que las de plantas, aunque se desconocía su capacidad de unir carbohidratos específicamente. En 1902, Flexner y Nouguchi describieron la capacidad del veneno de serpiente de cascabel para aglutinar y lisar eritrocitos y leucocitos (Flexner y Noguchi, 1902). Antes, en 1853, Charcot y Robin habían observado la presencia de estructuras cristalinas en tejidos patológicos, y estructuras similares fueron observadas por Leyden en 1872 en el esputo de personas asmáticas. Estas formas cristalinas, que se encuentran comúnmente asociadas a las inflamaciones mediadas por eosinófilos, llegaron a ser conocidas como cristales Charcot-Leyden. Mucho después se descubrió que estos cristales están formados por una proteína que reconoce específicamente carbohidratos, la galectina-10 (Swaminathan *et al.*, 1999).

La primera clasificación de lectinas animales fue propuesta por Drickamer (Drickamer, 1989), basándose en motivos conservados en la secuencia de aminoácidos del dominio de unión a carbohidratos, CRD (del inglés, *carbohydrate recognition domain*), de dos grupos de lectinas: el primer grupo requería Ca^{2+} para el reconocimiento de carbohidratos y por esta razón se las denominó lectinas de tipo C y el segundo grupo requería tioles libres para mantener la actividad por lo que se las denominó lectinas de tipo S. Posteriormente, se fueron identificando otras familias de lectinas (Tabla 1.1), además de algunas lectinas que no pertenecen a estas familias, denominadas “lectinas huérfanas”. Las diferentes familias de lectinas se distinguen por presentar especificidades de unión y actividades biológicas características. El tipo de plegamiento que presenta el CRD es también diverso, existiendo más de 12 tipos identificados hasta el momento. Una observación interesante es la de que algunos de estos plegamientos se dan también en lectinas de plantas, como el trébol β , característico de las toxinas de tipo AB (p. ej. ricina) o el sándwich β , típico de las lectinas de leguminosas, como la concanavalina A. El plegamiento tipo sándwich β se observó de hecho por primera vez en la estructura cristalina de la concanavalina A, la primera resuelta para una lectina (Hardman y Ainsworth, 1972). Básicamente consiste en una estructura de tipo “jelly roll”, formada por dos láminas β (frontal y dorsal) unidas por un núcleo hidrofóbico.

Tabla 1.1. Principales familias de lectinas animales						
Familia	Ejemplos	Plegamiento del CRD	Especificidad	Localización	Ejemplos de funciones	
Tipo C	Selectinas, colectinas	Tipo C	Diversa	Extracelular, membrana celular	Inmunidad innata, adhesión celular	
Tipo F	FBP32	Barril β	Oligosacáridos terminados en Fuc	Extracelular	Inmunidad innata	
Tipo I (siglecs)	CD33, sialoadhesina, siglec-5	Tipo Ig	Ácido siálico	Membrana celular	Adhesión celular	
Tipo L	ERGIC-53, VIP-36	Sándwich β	Diversa	Retículo endoplásmico, Golgi	Transporte intracelular de glicoproteínas	
Tipo M	EDEM 1,2,3, Mnl1	Barril α/β	Man ₈	Retículo endoplásmico	Control del plegamiento de glicoproteínas	
Tipo P	Receptores de manosa-6-fosfato	Tipo P	Man-6-P	Golgi, endosomas	Transporte intracelular de glicoproteínas	
Tipo R	Receptor de manosa en macrófagos	Trébol β	Diversa	Membrana celular, Golgi	Transporte de enzimas y hormonas	
Tipo S (galectinas)	Galectina 1-15	Sándwich β	β -galactósidos	Extracelular, citoplasma, núcleo	Organización de tejidos Regulación de la respuesta inmune	
Calnexina	Calnexina, calreticulina	Sándwich β	Glc ₁ Man ₉	Retículo endoplásmico	Plegamiento de glicoproteínas (chaperonas)	
Pentraxinas	Proteína C-reactiva, SAP	Sándwich β	Diversa	Extracelular	Defensa del organismo	
Intelectinas	Intelectina-1, -2	Tipo fibrinógeno	Gal, galactofuranosa	Extracelular, membrana celular	Inmunidad innata Fecundación y embriogénesis	
Ficolinas	M, L y H	Tipo fibrinógeno	GlcNAc, GalNAc	Extracelular, membrana celular	Inmunidad innata	
Tipo quitinasa	YKL-40, Ym1	Barril (α/β) ₈	Quito-oligosacáridos	Extracelular	Metabolismo del colágeno	
Lectinas F-box	Fbs1	Sándwich β	GlcNAc ₂	Citoplasma	Degradación de proteínas incorrectamente plegadas	

Este mismo plegamiento se encuentra también en diversas proteínas que interaccionan con azúcares, como las enzimas β -D-glucanasa (Keitel *et al.*, 1993), PNGasa F y celobiohidrolasa I (Divne *et al.*, 1994) y dos miembros de la familia de las espermadhesinas (Romao *et al.*, 1997; Varela *et al.*, 1997). La similitud en la topología de proteínas tan diversas parece ser el resultado de un proceso de evolución convergente. Una de las familias de lectinas animales que han adoptado este plegamiento es la familia de las galectinas.

1.5. Galectinas – una familia de lectinas específicas de β -galactósidos

Las galectinas constituyen una familia de lectinas animales específicas de β -galactósidos extremadamente conservada a través de la evolución, desde esponjas, a insectos, peces, aves y mamíferos (Cooper, 2002). La presencia de galectinas en organismos tan divergentes evolutivamente (Figura 1.4) indica la existencia de un ascendiente común en el origen de los animales multicelulares (Kasai y Hirabayashi, 1996). Se han encontrado también galectinas en hongos multicelulares y genes que codifican para posibles galectinas en plantas (p. ej. *Arabidopsis thaliana*) e incluso en virus (p. ej. adenovirus). En mamíferos se han caracterizado hasta la fecha 14 galectinas diferentes, las cuales se numeran según el orden de su descubrimiento (Barondes *et al.*, 1994; Gabius y Wu, 2006). En el hombre se han encontrado nueve miembros de esta familia y se han identificado en el genoma humano otros ocho genes relacionados.

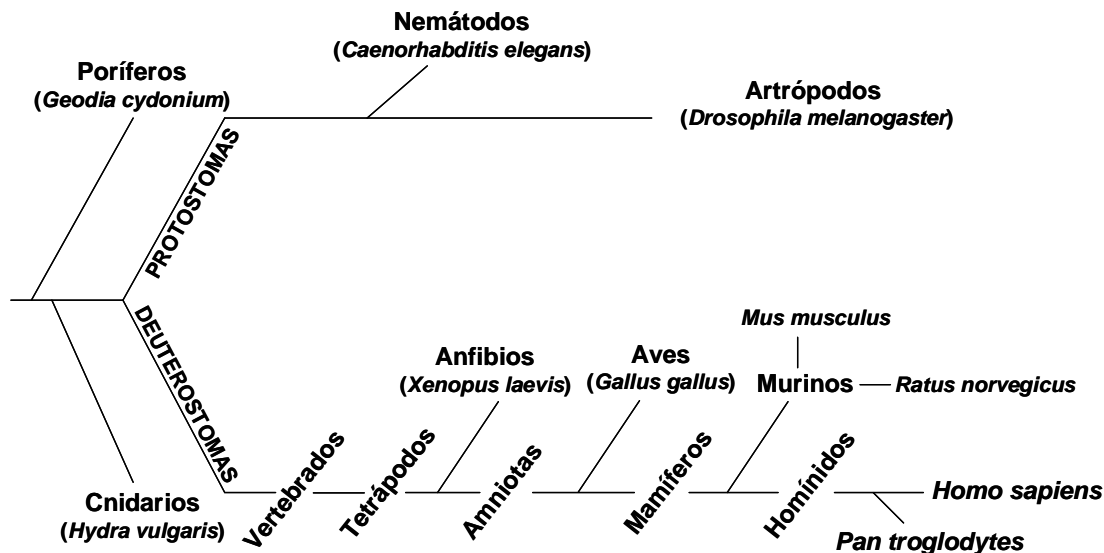


Figura 1.4. Representación esquemática de la presencia de galectinas en diferentes especies del árbol filogenético de los metazoos.

El primer miembro de esta familia de lectinas fue aislado de anguila eléctrica en 1975 (Teichberg *et al.*, 1975) y en 1976 se aislaron las primeras galectinas de vertebrados a partir de corazón y pulmón de vaca (De Waard *et al.*, 1976). La elección de eritrocitos adecuados

fue crucial para poder demostrar la actividad hemaglutinante de estas proteínas. Así, los eritrocitos tripsinizados de conejo, que contienen más residuos terminales de galactosa que los eritrocitos humanos, son fácilmente aglutinados por la mayoría de las galectinas, mientras que los eritrocitos humanos requieren tratamiento con neuraminidasa para mejorar su aglutinabilidad (Cummings y Liu, 2009). Como la actividad de unión a carbohidratos de diversas galectinas se pierde en ausencia de un agente reductor, la presencia de grupos SH libres parecía ser esencial, de ahí que inicialmente se clasificaron como lectinas de tipo S. Estudios posteriores han demostrado que los grupos SH no están directamente implicados en la unión del carbohidrato (Hirabayashi y Kasai, 1991), sino que en el caso de algunas galectinas son importantes para el mantenimiento de una conformación activa. Inicialmente, los miembros de esta familia de lectinas tenían nombres muy diversos como lectina S-lac, galaptina o proteína de unión a IgE, hasta que en 1994 se acuñó el término galectina (Barondes *et al.*, 1994).

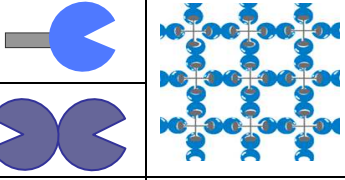
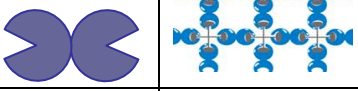
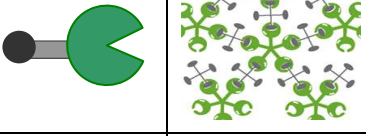
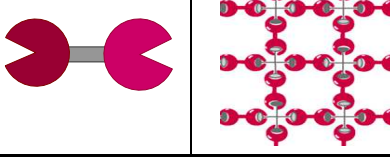
1.5.1. Clasificación de las galectinas

Todas las galectinas contienen un CRD de aproximadamente 135-140 aminoácidos, filogenéticamente intacto desde invertebrados inferiores a mamíferos. Sin embargo, el número y disposición de los CRDs, así como la presencia de otros dominios, varían de unas galectinas a otras. En base a estas características estructurales, las galectinas de mamíferos se clasifican en tres grupos diferentes (Hirabayashi y Kasai, 1993) (Tabla 1.2).

Las galectinas de tipo proto están compuestas por un único CRD. La más estudiada es la galectina-1, la primera galectina descubierta y la más ampliamente distribuida en diferentes tejidos, como músculo cardíaco, hígado, riñón, placenta, córnea, timo, bazo, neuronas motoras y sensoriales, ganglios linfáticos y células inmunes (Rabinovich y Rubinstein, 2001). La mayoría de las galectinas de tipo proto, como la galectina-1, se asocian formando homodímeros, mientras que las galectinas 5, encontrada en rata, y 10 son monoméricas. La galectina-10, conocida como proteína cristalina Charcot-Leyden, merece una mención especial ya que parece unir mejor β -manósidos que β -galactósidos.

Las galectinas de tipo quimera están compuestas por un CRD situado en la región carboxilo-terminal y una región amino-terminal con capacidad de unir otros ligandos, como polipéptidos y oligonucleótidos. Esta región se compone de 110-130 aminoácidos, dependiendo de la especie, y tiene una estructura relativamente flexible que contiene múltiples repeticiones homólogas, cada una de las cuales incluye una secuencia de tipo Pro-Gly-Ala-Tyr-Pro-Gly, seguida de tres aminoácidos adicionales.

Tabla 1.2. Clasificación de las galectinas

Tipo	Ejemplos	Formación de redes
Proto	Monoméricas: Galectinas 5 y 10	
	Diméricas: Galectinas 1, 2, 7, 13, 14, 15*	
Quimera	Galectina-3	
Tándem-repetido	Galectinas 4, 6, 8, 9, 12	

*Aunque sólo se han caracterizado hasta la fecha 14 galectinas de mamíferos, la existencia de la galectina-15 se debe a la denominación de la proteína específica del cristalino GRIFIN (galectin-related interfiber protein) como galectina-11 y su posterior exclusión de la familia al comprobarse que carece de capacidad de unión a carbohidratos; es decir, no existe una galectina-11.

El único miembro de este tipo es la galectina-3, previamente conocida como antígeno Mac-2 o proteína de unión a IgE (identificada en macrófagos activados, basófilos, mastocitos y ciertas células tumorales) (Rabinovich y Rubinstein, 2001), CBP-35 (identificada en fibroblastos de ratón), ϵ -BP (en células de leucemia basofílica de rata), RL-29 (en tejido pulmonar de rata), HL-29 (en tejido pulmonar humano) y L-34 (en fibroblastos embrionarios transformados de rata) (Dumic *et al.*, 2006). La unión de ligandos multivalentes induce la oligomerización de la galectina a través del dominio N-terminal formando pentámeros (Brewer *et al.*, 2002; Ahmad *et al.*, 2004), de modo que las funciones biológicas de esta galectina dependen tanto del entrecruzamiento de ligandos como de su oligomerización.

Las galectinas de tipo tándem-repetido están compuestas por dos CRDs distintos, unidos covalentemente entre sí por un péptido conector o *linker* compuesto generalmente por un mínimo de 20 aminoácidos, lo que les confiere la propiedad de interactuar con carbohidratos diferentes. La estructura del *linker* pudiera desempeñar un papel importante, determinando la proximidad y orientación de los CRDs, e influyendo por tanto en la capacidad de entrecruzar ligandos de estas galectinas (Earl *et al.*, 2011). Se considera que cuanto más largo es el *linker* más fácilmente puede darse el entrecruzamiento. Además se ha propuesto que uno de los CRDs puede tener una mayor especificidad y dirigir el reconocimiento, mientras el otro serviría para permitir el entrecruzamiento (Sato *et al.*, 2002; Carlsson *et al.*, 2007; Miyanishi *et al.*, 2007).

La diferente organización estructural de los tres grupos de galectinas hace pensar que sus funciones biológicas son también diferentes. Así, las galectinas de tipo proto diméricas son capaces de entrecruzar glicoconjugados idénticos o de naturaleza muy similar. Además, en el caso de oligosacáridos ramificados, estos pueden actuar de puente entre los dímeros de galectina. Por otra parte, las galectinas de tipo tándem-repetido pueden entrecruzar glicoconjugados no necesariamente iguales, mientras que la galectina-3, de tipo quimera, puede hacer de puente entre glicoconjugados y otro tipo de biomoléculas y, además, oligomeriza al unirse a carbohidratos multivalentes. De esta forma, las galectinas son capaces de formar diferentes tipos de redes con glicoconjugados polivalentes (Tabla 1.2) (Brewer *et al.*, 2002). Mientras que las redes que forma la galectina-1 son generalmente homogéneas y organizadas, la galectina-3 puede formar estructuras heterogéneas y desorganizadas (Ahmad *et al.*, 2004).

Se han encontrado galectinas en muchas otras especies que presentan analogía con las de mamíferos y que, en algunos casos, se denominan en función de dicha analogía. Por ejemplo, en pollo hay tres galectinas de tipo proto CG-1A, CG-1B y CG-2, una de tipo quimera, CG-3 y una de tipo tándem-repetido, CG-8. Existe además un número de proteínas relacionadas con las galectinas, que presentan homología con éstas pero no unen carbohidratos, o al menos no unen β -galactósidos. Una característica común de estas proteínas es la de presentar mutaciones de residuos altamente conservados en las galectinas, implicados en la unión a carbohidratos. De ahí que, aunque presenten el plegamiento típico de las galectinas, no son capaces de unir β -galactósidos (Zhou *et al.*, 2008). Un ejemplo son las proteínas GRIFIN, PP-13 y la proteína de oveja ovgal11, relacionadas con la galectina-10, que pueden ser consideradas como una subfamilia de esta galectina. Es interesante destacar que el homólogo de la proteína GRIFIN en el pez cebra *Danio rerio*, DrGRIFIN, es una proteína funcional que sí es capaz de unir β -galactósidos.

1.5.2. Estructura y modo de unión a carbohidratos de las galectinas

Las estructuras cristalinas que han sido resueltas para diferentes galectinas nativas y mutantes, tanto en forma libre como unidas a distintos ligandos, han proporcionado una detallada información de la relación estructura-función. El CRD de las galectinas adopta una estructura en forma de sándwich β , formado por una lámina antiparalela cóncava de seis hebras (S1-S6) y otra convexa de cinco (F1-F5). A lo largo de la secuencia, las hebras están ordenadas S1-F2-S3-S4-S5-S6-F3-F4-F5-S2-F1, con lazos de longitud variable que las conectan. Algunas galectinas contienen una hebra F0 extra al principio de la secuencia de aminoácidos. La lámina cóncava forma una hendidura donde se une el carbohidrato. En las galectinas diméricas, como las galectinas 1, 2 y 7, las subunidades están relacionadas por un eje binario de rotación, perpendicular a las láminas β , aunque la orientación relativa de

las subunidades es diferente (Figura 1.5). En el caso de las galectinas 1 y 2, la dimerización conduce a la formación de una lámina β extendida en la que los sitios de unión se sitúan en los extremos, en un mismo lado del dímero, mientras que el dímero de la galectina-7 se forma por contactos entre las láminas F1-F5, con los sitios de unión situados en los lados opuestos. Esta diferente disposición de los sitios de unión puede tener consecuencias en el reconocimiento de ligandos.

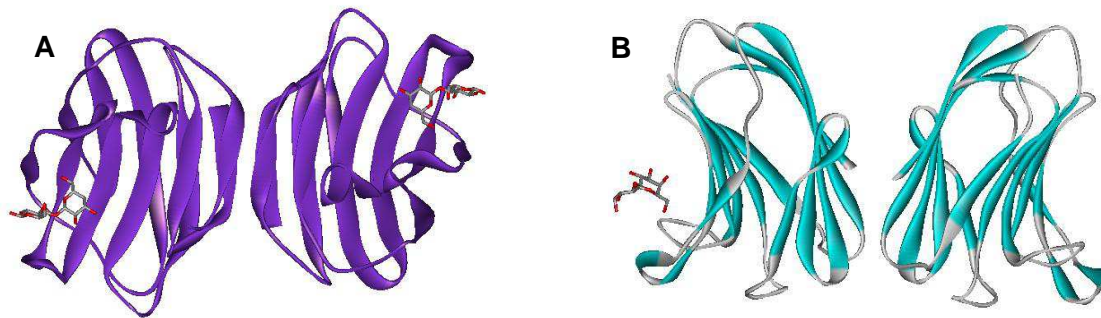


Figura 1.5. Estructura cristalina del dímero de la galectina-1 humana (PDB: 1GZW) (A) y de la galectina-7 humana (PDB: 1BKZ) (B) en complejo con lactosa.

En el anexo I, Figura I.1, se muestra el alineamiento de la secuencia de aminoácidos de los CRDs de las galectinas de mamíferos. La identidad de secuencia entre diferentes galectinas oscila entre el 20 y el 40% (Oda *et al.*, 1993), mientras que para una misma galectina procedente de diferentes especies de mamíferos la identidad es del 80-90%, por lo que es posible identificar fácilmente la lectina equivalente en distintos mamíferos. Las estructuras cristalográficas demuestran claramente que los aminoácidos más conservados desempeñan funciones clave en el reconocimiento de carbohidratos. En el caso de la galectina-1, éstos son: His44, Asn46, Arg48, Val59, Asn61, Trp68, Glu71 y Arg73 (Figura 1.3). Estos residuos forman una red de enlaces de hidrógeno con los grupos hidroxilo del azúcar implicados en la interacción, mientras que en ausencia de un ligando, la posición de las cadenas laterales está estabilizada por una red de enlaces de hidrógeno con moléculas de agua que ocupan posiciones reservadas para los grupos hidroxilo del carbohidrato (Figura 1.3 A) (López-Lucendo *et al.*, 2004).

En general, los grupos hidroxilo clave en la unión de lactosa a las galectinas son los OH-4 y OH-6 de la unidad de galactosa y OH-3 de la glucosa, de forma que los contactos están casi exclusivamente restringidos a un lado de la molécula. En el caso de la *N*-acetillactosamina, el grupo acetamido de la *N*-acetilglucosamina también participa en contactos de van der Waals con la proteína. Por el contrario, el otro lado de la molécula de azúcar (es decir, las posiciones 2 y 3 de la galactosa y 6 de la glucosa) no está implicado, o sólo débilmente, en la interacción. Por otra parte, la cadena lateral de un residuo de Trp, presente en el sitio de unión de todas las galectinas, establece una interacción CH- π con la cara no polar de la galactosa. Este residuo es crítico para distinguir entre galactosa y glucosa, ya que

únicamente la disposición del grupo OH-4 axial de la galactosa permite establecer el contacto CH- π (Di Lella *et al.*, 2007; Meynier *et al.*, 2009). Aunque este Trp está absolutamente conservado en la familia de las galectinas, estudios de mutagénesis dirigida han demostrado que la actividad de la lectina se conserva tras su sustitución por tirosina o fenilalanina (Hirabayashi y Kasai, 1991).

Se ha resuelto la estructura cristalina de numerosas lectinas de tipo proto pero hasta la fecha no ha sido posible determinar la estructura tridimensional de ninguna galectina de tipo quimera o tándem-repetido completa, debido a la dificultad de estas proteínas para cristalizar. No obstante, sí ha podido resolverse la estructura cristalina del CRD de la galectina-3 humana (PDB: 1A3K, Seetharaman *et al.*, 1998) y del dominio N-terminal de la galectina-4 de ratón (PDB: 3I8T, Krejcirikova *et al.*, 2011) y de las galectinas 8 (PDB: 3AP5, no publicado) y 9 humanas (PDB: 3LSD, Solís *et al.*, 2010). Además, la estructura en solución del dominio C-terminal de las galectinas 4 (PDB: 1X50, no publicado), 8 (PDB: 2YRO, no publicado) y 9 (PDB: 3NV1, Yoshida *et al.*, 2010) humanas se ha resuelto por espectroscopía de RMN. Todas estas estructuras confirman la gran homología existente en el plegamiento del CRD y el sitio de unión a carbohidratos de las galectinas, aunque también revelan la existencia de pequeñas variaciones en la arquitectura del sitio de unión que se traducen en diferentes capacidades de unión.

Así, las galectinas muestran diferencias en su capacidad de unión a secuencias Gal β 1,4GlcNAc, Gal β 1,3GlcNAc o Gal β 1,3GalNAc. Además, las sustituciones en las posiciones 2 y 3 de la galactosa, por ejemplo por ácido siálico, pueden tener efectos muy distintos dependiendo de la galectina: en algunos casos, estas sustituciones generan interacciones favorables con el sitio de unión que tienen como resultado un aumento de la afinidad, mientras que en otros casos no se dan estas interacciones o incluso pueden existir impedimentos estéricos que dificultan la interacción. Por ejemplo, la galectina-2 muestra una afinidad significativamente reducida por oligosacáridos sializados, mientras que la galectina-1 se une a glicanos sializados α 2-3, pero no α 2-6, y la galectina-3 se une a algunos carbohidratos terminados en ácido siálico unido tanto α 2-3 como α 2-6. Sin embargo, la sulfatación del OH-3 de la galactosa aumenta significativamente la afinidad de unión para la galectina-2, mientras que la sulfatación en OH-4 u OH-6 inhibe la unión. Por otra parte, algunas galectinas pueden acomodar residuos de galactosa internos como los que se encuentran en la poli-*N*-acetillactosamina o en estructuras relacionadas con los grupos sanguíneos. Todas estas diferencias de las galectinas tienen como resultado variaciones significativas en su especificidad de unión a oligosacáridos. Además, las diferencias en la orientación, flexibilidad y distancia entre los CRDs en galectinas bivalentes o multiméricas tienen también consecuencias en el reconocimiento de ligandos y, por lo tanto, en su

actividad biológica sobre, por ejemplo, distintos tipos celulares (Dam y Brewer, 2010; Rabinovich *et al.*, 2007).

1.5.3. Susceptibilidad de las galectinas a la oxidación

Algunas galectinas pierden rápidamente su capacidad de unión a carbohidratos en ausencia de un agente reductor. El CRD de muchas galectinas contiene residuos de cisteína libres, una característica que puede estar relacionada con el hecho de que muchas de ellas se localizan en el citoplasma, un medio muy reductor. El ejemplo más llamativo es probablemente la galectina-1, la galectina más lábil en este aspecto, que contiene seis cisteínas (en las posiciones 2, 16, 42, 60, 88 y 130), en una secuencia de 135 aminoácidos. Es importante mencionar que la presencia de lactosa estabiliza la galectina en ausencia de agentes reductores. La sensibilidad de la galectina-1 a la inactivación oxidativa es especialmente importante dada la relevancia funcional de esta galectina dentro del microentorno inflamatorio (véase más adelante), donde el riesgo de oxidación es extremadamente alto (Ilarregui y Rabinovich, 2010). Por otra parte, se ha descrito que la galectina-1 oxidada adquiere la capacidad de regeneración neuronal (Inagaki *et al.*, 2000). Se ha propuesto que la desaparición de la capacidad de unión a carbohidratos en la galectina-1 oxidada es debida a un cambio conformacional en la proteína por formación de enlaces disulfuro intramoleculares, predominantemente Cys2-Cys130, Cys16-Cys88 y Cys42-Cys60 (Tracey *et al.*, 1992). De hecho, la sustitución de las cisteínas por serina en mutantes de galectina-1 parece prolongar la actividad de la lectina y hacerla más resistente a la oxidación en comparación con la forma nativa, sin afectar a la capacidad de unión a carbohidratos (Hirabayashi y Kasai, 1991; Nishi *et al.*, 2008). Sin embargo, el análisis de la estructura cristalina indica que la formación de algunos de estos enlaces, por ejemplo Cys42-Cys60, no parece posible sin que haya una desnaturalización previa de la proteína. En el caso de la galectina de pollo CG-1B oxidada, se ha observado la formación de un puente disulfuro intermolecular entre los residuos Cys7 de subunidades adyacentes en el homodímero, además de un disulfuro intramolecular entre Cys2 y Cys7, en la interfase del dímero, que conduce a la disociación de esta población de moléculas (López-Lucendo *et al.*, 2009). Por otra parte, se ha descrito que la inactivación de la galectina de anguila eléctrica, que no contiene cisteínas, se produce por oxidación del triptófano presente en el sitio de unión a un oxindol (Levi y Teichberg, 1985). Por lo tanto, los mecanismos de oxidación parecen variar de unas galectinas a otras.

1.5.4. Localización y papel biológico de las galectinas

Las galectinas son sintetizadas como proteínas citosólicas, pero también se localizan en el núcleo o asociadas a la membrana mitocondrial. Además, aunque carecen de péptido señal y nunca se han encontrado en la vía secretora del Golgi-retículo endoplásmico, son

secretadas al exterior de las células, asociándose a glicoproteínas y glicolípidos de la superficie celular o de la matriz extracelular circundante. Ciertos estudios sugieren que el mecanismo de secreción de algunas galectinas implica la formación de exovesículas generadas por cambios morfológicos en la membrana celular (Blanc y Vidal, 2010; Barrès *et al.*, 2010). Algunas galectinas se expresan en una gran variedad de tejidos (p. ej. las galectinas 1 y 3), como se mencionó en el apartado 1.5.1, mientras que otras son más específicas, como, por ejemplo, las galectinas 4 y 6, que se expresan en el tracto gastrointestinal (Gitt *et al.*, 1998). La expresión de las galectinas está además modulada durante la diferenciación celular y en el desarrollo de tejidos y cambia en diferentes estados fisiológicos y patológicos y en respuesta a agentes inflamatorios o infecciosos. Así, la concentración intracelular de galectinas puede aumentar hasta 10 veces en situaciones patológicas o de estrés (Rabinovich y Rubinstein, 2001). Por otra parte, la expresión de muchas galectinas se ve alterada en procesos cancerosos. Por ejemplo, los niveles séricos de las galectinas 2, 4 y 8 aumentan más de 30 veces en pacientes con cáncer, en particular en aquellos con metástasis (Barrow *et al.*, 2011). La galectina-1 está relacionada positivamente con la progresión maligna de gliomas, tumores de próstata, colon, mama o tumores cervicales (Wu *et al.*, 2009) y lo mismo ocurre con las galectinas 3, 4, 7 y 9 en determinados tumores. De hecho, la galectina-9 fue aislada y clonada por primera vez de tejidos tumorales de pacientes con linfoma de Hodgkin (Tureci *et al.*, 1997). Experimentos *in vivo* con galectina-9 han mostrado una inhibición del sistema inmune, promoviendo la enfermedad (Thijssen *et al.*, 2007). Por el contrario, la expresión en células cancerosas de determinadas galectinas disminuye con respecto a los niveles encontrados en células normales (Irie *et al.*, 2005; Yamauchi *et al.*, 2006). También pueden observarse alteraciones en los patrones de localización. Por ejemplo, la galectina-8, que normalmente se expresa a niveles bajos en el tracto gastrointestinal, en el colon sano se detecta tanto en el núcleo como en citoplasma, mientras que en el cáncer de colon se encuentra sólo en citoplasma (Nagy *et al.*, 2002).

La función de una galectina determinada varía según su localización (Stillman *et al.*, 2005). Algunas galectinas actúan en el interior del núcleo, regulando el procesamiento del ARNm y la transcripción mediante interacciones con proteínas implicadas en dichos procesos. En el citoplasma regulan la apoptosis, inhibiéndola o promoviéndola según los casos. Las funciones extracelulares de las galectinas incluyen la regulación de interacciones célula-célula o célula-matriz extracelular y la activación de cascadas de señalización que conducen, por ejemplo, a la secreción de citoquinas, la división celular o la apoptosis. Es muy interesante la observación de que algunas galectinas presentan actividades contrarias dependiendo de su localización. Por ejemplo, la galectina-3 actúa intracelularmente como factor anti-apoptótico (Dumic *et al.*, 2006), mientras que en los espacios extracelulares

muestra actividad pro-apoptótica (Califice *et al.*, 2004). Estos efectos antagónicos parecen estar regulados por la fosforilación de la Ser6 que actúa como un interruptor de “encendido/apagado” sobre la unión de la galectina-3 a sus ligandos (Mazurek *et al.*, 2000). Así, la sustitución de la Ser6 por Ala disminuye la actividad anti-apoptótica intracelular de la galectina-3 (Yoshii *et al.*, 2002).

La participación de las galectinas en estas funciones celulares básicas hace que jueguen un importante papel en el cáncer, interviniendo en la transformación neoplásica, el desarrollo y supervivencia de tumores, la angiogénesis y la metástasis. Además, las galectinas participan en los procesos de inflamación y defensa del organismo.

1.5.4.1. Galectinas en el sistema inmune e infección

En los últimos años se ha reconocido un papel fundamental de las galectinas en la regulación de la respuesta inmune e inflamatoria, donde operan a diferentes niveles modulando, por ejemplo, la activación de las células del sistema inmune y la liberación de citoquinas y promoviendo la fagocitosis por macrófagos y la invasión por neutrófilos de tejidos infectados (Tabla 1.3). Además intervienen en el desarrollo de la inflamación aguda y crónica asociada con alergias, enfermedades autoinmunes, aterosclerosis y cáncer. Por todo ello, las galectinas atraen un creciente interés como posibles dianas para el desarrollo de nuevos métodos diagnósticos y terapéuticos del cáncer y en la prevención y tratamiento de procesos inflamatorios e infecciosos (Stillman *et al.*, 2005).

Las galectinas se expresan en prácticamente todas las células del sistema inmune, incluyendo, linfocitos (Baum *et al.*, 1995), neutrófilos (Truong *et al.*, 1993), monocitos y macrófagos (Liu *et al.*, 1995), mastocitos (Craig *et al.*, 1995), células dendríticas y células endoteliales (Flotte *et al.*, 1983). La galectina-9 se encuentra también en células fundamentales para la respuesta inflamatoria, como células endoteliales (Imaizumi *et al.*, 2002), células T (Matsumoto *et al.*, 1998) y fibroblastos (Asakura *et al.*, 2002). De hecho, la galectina-9 humana fue originalmente identificada como un quimioatrayente específico de eosinófilos producido y liberado por las células T activadas (Matsumoto *et al.*, 1998). Por otra parte, la expresión de la galectina-10 aumenta considerablemente durante la diferenciación de eosinófilos y neutrófilos, sugiriendo un posible papel en la diferenciación de las células mieloides.

Las galectinas 1 y 2 regulan la homeostasis de las células T, modulando su proliferación y apoptosis así como la producción de citoquinas. La galectina-4 también regula la activación de células T, mientras que la galectina-3 actúa de manera dual, protegiendo las células T de la apoptosis o estimulando la muerte de estas células, dependiendo, como ya se ha mencionado, de si actúa intracelular o extracelularmente. La galectina-9 también induce la apoptosis de timocitos (Wada *et al.*, 1997) y células T periféricas (Kashio *et al.*, 2003).

Además, esta galectina prolonga la supervivencia de los eosinófilos, favoreciendo su actividad proinflamatoria en enfermedades alérgicas, y también juega un papel importante en la atenuación de la inflamación autoinmune.

Tabla 1.3. Principales funciones de las galectinas en la regulación de la respuesta inmune

Galectina	Lugar de expresión en el sistema inmune	Efecto inmunoregulador
1	Organos linfoides, células T, macrófagos activados y células endoteliales	Induce la apoptosis de timocitos inmaduros y células T activadas Modula la producción de citoquinas e inhibe el proceso inflamatorio agudo
2	Células T	Regula la homeostasis y apoptosis de células T y la producción de citoquinas
3	Todas las células del sistema inmune	Promueve la fagocitosis por macrófagos Modula la producción de citoquinas Induce la migración de monocitos y macrófagos Regula la apoptosis de células T y timocitos
4	Células T, linfocitos, neutrófilos	Regula la apoptosis de células T
7	Células epiteliales	Promueve la apoptosis de los queratinocitos
8	Neutrófilos	Modula las funciones de los neutrófilos asociadas con la invasión microbiana Modula la supervivencia de células T
9	Células endoteliales, células T activadas por antígenos, fibroblastos	Aumenta la apoptosis de timocitos y células T Quimioatrayente de eosinófilos
10	Eosinófilos, basófilos y células T	Regula la función de células T
12	Eosinófilos y basófilos	Participa en el control del ciclo celular Induce estado de activación alternativa en macrófagos
13	Placenta, bazo	Activa células del sistema inmune durante el embarazo
14	Eosinófilos	Promueve la adhesión durante la infección y alergias

La presencia de niveles aumentados de las galectinas-3 y -9 en la membrana sinovial inflamada de pacientes con artritis reumatoide sugiere que estas proteínas desempeñan un papel clave en el desarrollo de esta enfermedad (Forsman *et al.*, 2011). Experimentos en ratones apuntan que la galectina-9 podría mejorar el proceso artritogénico e inducir una disminución de las citoquinas pro-inflamatorias (Seki *et al.*, 2008). La galectina-1 presenta una actividad anti-inflamatoria demostrada en modelos experimentales de colitis (Santucci *et al.*, 2003), artritis (Rabinovich *et al.*, 1999), diabetes (Perone *et al.*, 2006), encefalomiелitis autoinmune (Offner *et al.*, 1990) y uveitis (Toscano *et al.*, 2006).

Además, se ha observado que la supresión experimental de los genes de las galectinas 1 y 9 empeora las patologías autoinmunes. Por el contrario, la falta del gen que codifica para la galectina-3 reduce la inflamación en ratones modelo con esclerosis múltiple y artritis (Toscano *et al.*, 2007; Zhu *et al.*, 2005). Por otra parte, también se han detectado autoanticuerpos frente a las galectinas 1, 3, 8 y 9 en diferentes enfermedades autoinmunes. Por ejemplo, en el suero de pacientes con lupus eritematoso se han detectado anticuerpos anti-galectina-8 que actúan bloqueando el efecto apoptótico de esta galectina sobre las células T (Massardo *et al.*, 2009).

Las galectinas desempeñan también papeles clave en las interacciones patógeno-huésped y regulan la magnitud y calidad de la respuesta inmune tras la infección. Algunas galectinas reconocen específicamente los carbohidratos presentes en la superficie de diferentes patógenos. Por ejemplo, la galectina-1 reconoce los N-glicanos del virus Nipah, que provoca encefalitis tanto en animales como en el ser humano, aumentando la respuesta inmune y ejerciendo efectos antivirales (Levroney *et al.*, 2005). En el tracto intestinal, las galectinas 4 y 8 reconocen selectivamente y destruyen algunas cepas de *Escherichia coli* que expresan antígenos similares a los de los grupos sanguíneos humanos (Davicino *et al.*, 2011).

Por otra parte, se ha observado que la infección por bacterias modula la expresión de diferentes galectinas, las cuales, a su vez, regulan la respuesta inflamatoria (Vasta, 2009). Por ejemplo, la expresión de la galectina-3 aumenta en infecciones por *Trypanosoma cruzi* (Silva-Monteiro *et al.*, 2007) o *Streptococcus pneumoniae* (Farnworth *et al.*, 2008), favoreciendo la fagocitosis (Karlsson *et al.*, 2009; Farnworth *et al.*, 2008). La galectina-1 muestra un efecto supresor de la inflamación inducida por la infección bacteriana, al igual que la galectina-9, aunque las dos proteínas intervienen en fases diferentes de la respuesta inflamatoria (Iqbal *et al.*, 2011), ya que reconocen ligandos diferentes y utilizan vías distintas de apoptosis a nivel intracelular (Bi *et al.*, 2008).

1.5.4.2. Galectinas en el sistema nervioso

Varias galectinas endógenas, en particular las galectinas 1, 3, 8 y 9, son expresadas en la sustancia blanca cerebral y están involucradas en diferentes enfermedades neurológicas, como la esclerosis múltiple, habiéndose descrito una expresión aumentada de estas galectinas en esta enfermedad. A nivel celular, las galectinas están localizadas en macrófagos, astrocitos y células endoteliales y su expresión y localización varía en función del estado fisiopatológico de las células en las que se encuentran.

La galectina-1 es importante en el desarrollo embrionario de las neuronas sensoriales primarias y sus conexiones sinápticas en la médula espinal (Puche *et al.*, 1996; Tenne-Brown *et al.*, 1998) y su expresión (o alteraciones en la expresión) está estrechamente correlacionada con enfermedades neurológicas y con el éxito de regeneración después de

una lesión (McGraw *et al.*, 2005). El nivel de autoanticuerpos contra la galectina es además significativamente mayor en pacientes con trastornos neurológicos que en controles sanos (Lutomski *et al.*, 1997). Después de una isquemia, la expresión de la galectina-1 en el hipocampo de ratas se encuentra aumentada, especialmente en las neuronas que han sido resistentes a la lesión (Kurushima *et al.*, 2005). La galectina-1 induce la diferenciación de los astrocitos, aparentemente promoviendo la defosforilación por la tirosina-fosfatasa de diversas proteínas (Sasaki *et al.*, 2004), y la activación de los macrófagos, produciendo un factor neurotrófico que desempeña un importante papel en la supervivencia, diferenciación y plasticidad sináptica de las neuronas. Estos efectos dependen de la actividad de unión a carbohidratos. No se ha observado ningún efecto directo de la galectina-1 nativa sobre las neuronas.

Tras una lesión axonal, la galectina-1 se exterioriza de los axones en crecimiento, oxidándose y promoviendo la regeneración axonal (Horie y Kadoya, 2000; McGraw *et al.*, 2004; Miura *et al.*, 2004). Este efecto no se observa en neuronas aisladas (Horie *et al.*, 1999), lo que sugiere que está mediado por las células que se encuentran alrededor de los axones, como las células de Schwann (Fukaya *et al.*, 2003), las cuales intervienen reclutando macrófagos, fibroblastos y células perineuronales (Horie *et al.*, 2004). En concreto, los macrófagos son potenciales candidatos, que al ser estimulados por la galectina-1 oxidada, actuarían secretando un factor que promueve la regeneración axonal (Horie *et al.*, 2004). Un estudio preclínico utilizando ratas a las que se seccionaron los nervios ciáticos ha demostrado que la administración en el sitio seccionado de galectina-1 oxidada restaura la función nerviosa (Kadoya y Horie, 2005). Igualmente, la administración de galectina-1 oxidada a ratones transgénicos utilizados como modelo retrasa el inicio de enfermedades neuronales (Chang-Hong *et al.*, 2005). Se ha identificado una variante natural de la galectina-1 que carece de los seis primeros aminoácidos del extremo N-terminal. Esta variante es monomérica en condiciones tanto reductoras como oxidantes y se cree que también promueve la regeneración axonal (Miura *et al.*, 2004).

Por lo que respecta a la galectina-3, ésta se expresa principalmente en las células gliales, pero también se ha encontrado en las neuronas sensoriales de rata, donde promueve su adhesión y crecimiento. Esta galectina se expresa también en macrófagos activados y células de Schwann. Su expresión aumenta después de una lesión ciática, por lo que se ha sugerido que está involucrada en el éxito de la regeneración neuronal periférica, aunque existen estudios que demuestran que la galectina-3 podría estar también implicada en la degeneración neuronal (Narciso *et al.*, 2009) o en los procesos inflamatorios que conducen a lesión neuronal en meningitis neumocócica (Bellac *et al.*, 2007).

2. OBJETIVOS

2. Objetivos

El importante papel que juegan las galectinas en numerosas enfermedades inflamatorias y autoinmunes, procesos infecciosos y en el cáncer, ha convertido a estas lectinas en importantes dianas para el desarrollo de nuevas estrategias diagnósticas y terapéuticas (Yang *et al.*, 2008). En el diagnóstico clínico, las galectinas pueden emplearse como herramientas en la detección de transformaciones malignas. Así, por ejemplo, la sobreexpresión de una determinada galectina en tumores o en los tejidos que les rodean puede considerarse un signo de su progresión maligna, a menudo relacionado con una gran difusión de células tumorales (metástasis), y asociarse con un pronóstico desfavorable para el paciente. La inhibición de la expresión de dicha galectina podría producir un retraso en la migración de células cancerosas, dentro del mismo tejido (por ejemplo en gliomas) o bien a distancia (metástasis del melanoma), y aumentar la sensibilidad de las células cancerosas a la apoptosis y en consecuencia a los fármacos citotóxicos (Camby *et al.*, 2006; Lefranc *et al.*, 2005). Una aproximación alternativa es el desarrollo de compuestos capaces de inhibir las galectinas selectivamente, los cuales podrían ser utilizados en asociación con agentes citotóxicos (Camby *et al.* 2006). Del mismo modo, las galectinas pueden utilizarse en el desarrollo de nuevos tratamientos para diferentes enfermedades inflamatorias y autoinmunes como, por ejemplo, artritis reumatoide, asma, dermatitis atópica, colitis (Rabinovich *et al.*, 1999; Santucci *et al.*, 2003), algunas patologías neurodegenerativas (Chang-Hong *et al.*, 2005; Kadoya y Horie, 2005) y distrofias musculares (Goldring *et al.*, 2002). Es evidente que el diseño de inhibidores selectivos de galectinas o el desarrollo de variantes de galectinas y miméticos ha de estar basado en un conocimiento detallado de la estructura, estabilidad y modo de unión a carbohidratos de los diferentes miembros de esta familia de lectinas. Aunque algunas de ellas han sido extensamente investigadas, como es el caso por ejemplo de la galectina-1 (Camby *et al.*, 2006), la información de que se dispone sobre otras galectinas, como son las galectinas de tipo tándem repetido, es mucho más limitada.

Por ello, el primer gran objetivo de esta Tesis Doctoral es la caracterización de la organización estructural y estabilidad de dos galectinas humanas de tipo tándem-repetido, las galectinas 4 y 8, en comparación con las galectinas 1 y 3 de tipo proto y quimera, respectivamente, y el análisis de las bases estructurales y termodinámicas de la unión de ligandos. Esta información puede ayudar a comprender las divergencias funcionales entre diferentes galectinas. En esta línea, otro objetivo del trabajo es el estudio comparativo de la actividad biológica de las galectinas en uno de los sistemas en los que se ha descrito su participación, la infección bacteriana, explorando al mismo tiempo posibles mecanismos de acción no descritos hasta la fecha.

Finalmente, dado el importante papel que la galectina-1 juega en el desarrollo de patologías neurodegenerativas, así como en la regeneración del sistema nervioso central y periférico tras una lesión cuando se encuentra en forma oxidada, hemos reexaminado el mecanismo de oxidación de esta galectina y comparado la posible actividad de diferentes variantes nativas y oxidadas sobre un modelo de neuronas aisladas.

En concreto, los objetivos propuestos son los siguientes:

1. Estudio de la organización estructural, propiedades hidrodinámicas y estabilidad térmica, en ausencia y en presencia de ligandos, de las galectinas humanas 4 y 8 de tipo tándem-repetido, en comparación con las galectinas 1, de tipo proto, y 3, de tipo quimera.
2. Obtención de un modelo a baja resolución para la estructura completa de una galectina de tipo tándem-repetido, en concreto la galectina-4 humana, mediante SAXS.
3. Análisis del reconocimiento de carbohidratos por las galectinas 4 y 8. Determinación de los parámetros termodinámicos.
4. Estudio de la posible acción bactericida de diferentes galectinas, *per se* o en sinergia con péptidos antimicrobianos, y de su mecanismo de acción.
5. Obtención y caracterización de galectina-1 oxidada y estudio del mecanismo de oxidación. Examen de la posible actividad de diferentes variantes de la galectina-1 (nativa y oxidada) sobre el crecimiento neuronal *in vitro*.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Preparación de las galectinas

Las galectinas utilizadas fueron expresadas en *E. coli* y purificadas por cromatografía de afinidad en lactosa-Sepharosa 4B, como se ha descrito anteriormente (Kaltner *et al.*, 2008), en el laboratorio del Prof. H.-J. Gabius (*Institut für Physiologische Chemie, Ludwig-Maximilians-Universität, Munich, Alemania*).

Para su utilización, las galectinas se dializaron exhaustivamente (6 cambios cada 4 horas a 4 °C) frente a tampón fosfato sódico 5 mM, pH 7,2, NaCl 0,2 M (PBS), conteniendo β -mercaptoetanol 4 mM (PBS $_{\beta}$) o DTT 2 mM (PBS $_{\text{DTT}}$). La concentración de proteína se determinó midiendo la absorbancia a 280 nm y utilizando el coeficiente de extinción calculado para cada galectina a partir de su secuencia de aminoácidos, mediante la herramienta Protparam disponible en <http://web.expasy.org/protparam>.

3.2. Espectrometría de masas

La masa molecular y homogeneidad de las galectinas se analizó mediante espectrometría de masas en el Servicio de Espectrometría de Masas del Instituto de Química-Física Rocasolano (CSIC). Se utilizó un espectrómetro *Voyager-DETM PRO* (Applied Biosystems) equipado con un láser de nitrógeno ($\lambda = 337$ nm, anchura de pulso 10 ns y frecuencia de 3 Hz) y una fuente iónica con extracción retardada. La ionización de las muestras se llevó a cabo por MALDI (*ionización y desorción por láser asistida por matriz*) (Hillenkamp *et al.*, 1991). En esta técnica, la muestra se preincuba con una matriz y la mezcla sólida resultante se irradia con un láser pulsante cuya energía es absorbida por la matriz, lo que provoca su ionización y la de las moléculas estudiadas. En nuestro caso, la matriz utilizada fue ácido sinapínico 10 mg/ml en TFA al 0,3%:acetonitrilo 70:30. Los iones positivos generados por la desorción láser fueron introducidos en un analizador de tiempo de vuelo (TOF) (longitud del tubo 1,3 m) en el cual los iones se aceleraron con un voltaje de 25 kV, dejándolos volar libremente hacia el detector. Todos los espectros se obtuvieron trabajando en modo lineal y recogiendo una media de 500 disparos. Se utilizó un calibrado externo, empleando distintos calibrantes según la masa molecular de cada muestra: enolasa y anhidrasa carbónica para el rango entre 29 y 46 kDa, y apomioglobina (caballo) y tiorredoxina (*E. Coli*) para el rango entre 11 y 29 kDa.

La secuencia de las proteínas expresadas y, en su caso, las mutaciones introducidas se chequearon mediante el análisis de su huella peptídica. El análisis se llevó a cabo en el Servicio de Proteómica del Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares. Esta técnica consiste en digerir la proteína con una proteasa específica y analizar la masa de los péptidos resultantes mediante espectrometría de masas. Previamente a la digestión, las galectinas se desnaturalizaron en presencia de urea 9 M, se redujeron con DTT 10 mM y se

incubaron con iodoacetamida 80 mM, para bloquear las cisteínas libres, durante 30 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Después se añadió β -mercaptoetanol en concentración final 0,1 M y las muestras se dializaron exhaustivamente frente a bicarbonato amónico 50 mM. A continuación, las galectinas se digirieron con tripsina porcina 20 ng/ μ l (Promega) durante 14 horas a 25 °C. Una alícuota de la solución de digestión se mezcló con un volumen igual de ácido α -ciano-4-hidroxicinámico (Brucker-Daltonics) a 0,2 g/l en acetonitrilo al 50 % y ácido trifluoroacético al 0,15 %. Esta mezcla se depositó en un portamuestras AnchorChip (Brucker-Daltonics) y se dejó secar a temperatura ambiente. Los espectros se adquirieron en modo ión positivo a una frecuencia del láser de 50 Hz y se hizo la media de 300-1000 espectros individuales. La calibración de los espectros se realizó utilizando valores de m/z calculados para los péptidos de la galectina analizada.

En algunos casos se obtuvieron espectros de fragmentación (MS/MS) de las masas de interés. Un espectrómetro de masas tándem está compuesto por dos analizadores separados por una celda de colisión. El primer analizador se utiliza para aislar un solo ión molecular que entra en la cámara de colisión donde se induce su fragmentación. Los fragmentos resultantes se analizan directamente en el segundo analizador de masas.

Los datos de MALDI-MS (MS-MS) se obtuvieron utilizando un espectrómetro de masas Ultraflex TOF (Bruker-Daltonics), equipado con un dispositivo LIFT-MS/MS (Suckau *et al.*, 2003). Para el análisis de los péptidos en modalidad tándem-TOF, los precursores se aceleraron con 8 kV y se seleccionaron en la puerta de entrada de iones. Los fragmentos iónicos generados por la descomposición inducida por láser de los respectivos péptidos fueron acelerados a continuación con un voltaje de 19 kV en la célula LIFT y se determinaron las masas después de pasar por el reflector de iones. Los datos de masa fueron analizados manualmente utilizando el programa flexAnalysis (Bruker-Daltonics). La calibración se realizó utilizando espectros de fragmentación obtenidos para una mezcla de péptidos entre 800-3200 m/z.

3.3. Cromatografía de exclusión molecular

Se utilizó un sistema FPLC (Pharmacia) equipado con una columna de Superosa 12 10/300 GL (GE; Healthcare, volumen de vacío 7,8 ml), un detector UV Uvicord S2 LKB y un registro integrador Shimadzu C-R3A. La columna se equilibró con PBS _{β /DTT} conteniendo azida sódica al 0,02 % y lactosa 0,1 M. La proteína se eluyó a un flujo de 0,5 ml/min.

La columna se calibró en las mismas condiciones cromatográficas con los siguientes controles (Sigma): azul dextrano (2000 kDa), β -amilasa (200 kDa), alcohol deshidrogenasa (150 kDa), BSA (66 kDa), anhidrasa carbónica (29 kDa), citocromo C (12,4 kDa), aprotinina (6,5 kDa), vitamina B12 (1,36 kDa) y timidina (0,24 kDa), construyéndose una recta patrón

para el cálculo de las masas moleculares aparentes de las muestras a partir de sus tiempos de elución.

3.4. Ultracentrifugación analítica

La ultracentrifugación analítica permite determinar la masa molecular, forma global aproximada y grado de homogeneidad de las muestras en solución, sin interacción con ninguna matriz o superficie, así como caracterizar procesos de asociación cuando la masa molecular del complejo resultante difiere significativamente de la de los componentes aislados (Rivas *et al.*, 1999; Alcorlo *et al.*, 2009). Desde un punto de vista experimental existen dos aproximaciones básicas para estudiar un sistema: equilibrio de sedimentación y velocidad de sedimentación. La diferencia fundamental entre ambas radica en la velocidad del campo centrífugo aplicado (ω).

El equilibrio de sedimentación es una técnica termodinámica en la que las macromoléculas estudiadas son sometidas a la acción de un campo centrífugo moderado ($\omega < 30.000$ rpm), lo que permite alcanzar un equilibrio entre las partículas que se mueven hacia el fondo de la célula (acción de la fuerza centrífuga) y las que difunden (compensación del gradiente de concentración creado por la centrifugación) en cada posición radial, generándose un gradiente de concentración de tipo exponencial. Esta técnica permite obtener información sobre la masa molecular promedio de las partículas en disolución, la homogeneidad de la muestra y las constantes de equilibrio y estequiometría de los complejos en procesos de asociación (Rivas *et al.*, 1999; Alcorlo *et al.*, 2009).

La técnica de velocidad de sedimentación se basa en el comportamiento hidrodinámico de la partícula que sedimenta, que está relacionado, a su vez, con la masa y con la forma de la misma. En los experimentos de velocidad, las moléculas son sometidas a un campo centrífugo elevado ($\omega \geq 45.000$ rpm) y su desplazamiento genera un frente en movimiento que da lugar a un transporte neto de la masa hacia el fondo de la célula, ya que la fuerza de sedimentación es mayor que la de difusión. La determinación de los coeficientes de sedimentación permite el modelado de la forma hidrodinámica de las proteínas (Lebowitz *et al.*, 2002).

En este trabajo hemos utilizado ambas aproximaciones, equilibrio de sedimentación y velocidad de sedimentación, para caracterizar las diferentes galectinas estudiadas, utilizando una centrífuga analítica *Optima-XLA* (Beckman Instruments, Inc.) equipada con un sistema óptico de detección UV-VIS.

Los experimentos de equilibrio de sedimentación se llevaron a cabo en células de doble sector con ventanas de cuarzo de 12 mm de paso óptico y en un rotor *An50Ti* (Beckman) con un cuerpo central de seis agujeros. Los ensayos se realizaron a 20 °C, utilizando

concentraciones de proteína entre 0,1 y 1 mg/ml y velocidades de 15.000, 18.000 y 26.000 rpm. Con el volumen de muestra utilizado (80 μ l), el equilibrio se alcanzó en 12 horas. La masa molecular aparente promedio se calculó ajustando los datos experimentales a la ecuación matemática que describe la distribución radial del gradiente de concentración en el equilibrio para una especie ideal (Minton, 1994), utilizando el programa HeteroAnalysis (www.biotech.uconn.edu).

Los experimentos de velocidad de sedimentación se llevaron a cabo a 20 °C, utilizando muestras de proteína con una absorbancia a 280 nm de 0,5 y un volumen de 400 μ l, y aplicando una velocidad de 45.000 rpm. Los coeficientes de sedimentación se calcularon a partir del ajuste de los perfiles de sedimentación utilizando el programa *SEDFIT* (Schuck y Rossmann, 2000). El valor del coeficiente de sedimentación en agua a 20 °C ($s_{20,w}$) se calculó mediante el programa *SEDNTERP* (Laue, 1997) y el modelado hidrodinámico de la proteína se llevó a cabo con este mismo programa, utilizando para el volumen específico parcial y grado de hidratación de la proteína los valores calculados a partir de la composición de aminoácidos. Los coeficientes de sedimentación teóricos para las galectinas se calcularon a partir de las estructuras disponibles utilizando el programa HYDROPRO, que calcula los parámetros hidrodinámicos de las macromoléculas a partir de las coordenadas atómicas (coordenadas PDB) de una estructura determinada (García de la Torre *et al.*, 2000).

3.5. Dicroísmo circular y experimentos de desnaturalización térmica

El dicroísmo circular (DC) es una técnica espectroscópica que proporciona información sobre la estructura secundaria y el plegamiento de moléculas ópticamente activas y permite monitorizar cambios en dicha estructura.

El espectro de DC de una proteína en el UV lejano (180-250 nm) es el resultado de la contribución de los diferentes elementos de estructura secundaria (hélices α , láminas β , giros, etc) que contiene (Brahms y Brahms, 1980), cada uno de los cuales contribuye al espectro total con una señal característica.

En la región del UV cercano (250-350 nm) los cromóforos más importantes son los grupos aromáticos de triptófano, tirosina y fenilalanina y los enlaces disulfuro (Strickland, 1974; Kahn, 1979). Ya que la asimetría en estos cromóforos se debe exclusivamente a su entorno, los espectros en esta región son un reflejo de la conformación global de la proteína (estructura terciaria y cuaternaria), particularmente cuando los residuos aromáticos se encuentran distribuidos por toda la molécula.

Los espectros de DC se registraron en un espectropolarímetro JASCO J-810 equipado con un sistema Peltier de control de temperatura, utilizando un tiempo de respuesta de 4

segundos, una velocidad de barrido de 50 nm/minuto y recogiendo datos cada 0,2 nm. Para las medidas en el UV-lejano se utilizó una concentración de proteína de 0,2 mg/ml y cubetas de cuarzo de 0,1 cm de paso óptico, mientras que en el UV-cercano se utilizó una concentración del orden de 1 mg/ml y cubetas de 1 cm de paso óptico. Todos los espectros se registraron, al menos, por triplicado y para cada uno de ellos se recogieron cuatro acumulaciones con el fin de obtener una buena relación señal/ruido. La recogida de los datos experimentales y el análisis de los mismos se realizaron con el programa *Spectra Manager* (Jasco). Las muestras de proteína se dializaron exhaustivamente frente a PBS_β/DTT y el espectro del tampón se restó del espectro de la proteína. Los datos experimentales corregidos se transformaron en elipticidades molares, por molécula o por residuo, teniendo en cuenta la masa molecular y el número de aminoácidos de la galectina.

La estabilidad térmica de las galectinas se investigó por DC midiendo las variaciones inducidas por el aumento de la temperatura (desde 20 °C hasta 90 °C) en la elipticidad de la proteína a una longitud de onda determinada. Los experimentos se realizaron a velocidad de calentamiento constante (40 °C/h) y las variaciones en la elipticidad se registraron cada 0,2 °C, recogándose espectros cada 5 °C de aumento de la temperatura. En todos los casos se realizaron barridos en paralelo con el tampón para descontar su contribución de los perfiles obtenidos. Estos se ajustaron mediante modelos específicos según el perfil de desnaturalización, determinándose de esta forma la temperatura media de transición para cada galectina (Campanero-Rhodes *et al.*, 2005).

3.6. Difracción de rayos X a ángulos pequeños (SAXS)

La técnica de SAXS proporciona información de alta precisión (1-2 nm) sobre el tamaño, la forma y los cambios conformacionales de las proteínas u otras macromoléculas en solución. Su utilización apenas está limitada por el tamaño de la partícula, pudiendo aplicarse tanto a proteínas pequeñas como a grandes estructuras supramoleculares, como ribosomas o virus. Los experimentos de SAXS presentan además la ventaja de ser rápidos, requieren poco volumen de muestra y permiten analizar cambios estructurales inducidos por variaciones en las condiciones del medio o la unión de ligandos, tanto en condiciones de equilibrio como a tiempo real. Los resultados de SAXS pueden, además, complementar y/o corroborar los modelos obtenidos por cristalografía, microscopía electrónica, RMN o técnicas bioinformáticas (Doniach, 2001; Putnam *et al.*, 2007; Mertens y Svergun, 2010).

En un experimento de SAXS, las moléculas en solución son expuestas a una fuente de rayos X de intensidad elevada y la radiación dispersada, I , es registrada por un detector a valores pequeños del ángulo formado entre el haz incidente y el dispersado, definido como 2θ (Figura 3.1). En disoluciones diluidas, y debido a la distribución al azar de las partículas en solución, la dispersión tiene lugar con simetría radial y la intensidad de la radiación

dispersada depende de la amplitud del vector de dispersión (s), definido como $2(\sin \theta)/\lambda$. Cuando las muestras son monodispersas, el valor de la intensidad dispersada tras sustraer la contribución del solvente es proporcional a la dispersión de una sola partícula promediada sobre todas las orientaciones posibles (Svergun, 1992). Por este motivo, y a diferencia de la cristalografía de rayos X, los espectros de SAXS carecen de la información relativa a la fase y su transformada de Fourier inversa proporciona la función de distribución de pares de distancias entre dos puntos de la partícula, $P(r)$, pero no la estructura tridimensional (Koch et al., 2003). Además, los perfiles de dispersión permiten obtener de forma directa una serie de parámetros importantes relacionados con el tamaño, estado de oligomerización y forma global de la molécula estudiada, como son la masa molecular, la longitud máxima de la partícula (D_{max}) y el radio de giro (R_g), relacionado con la distribución de masas dentro de la partícula.

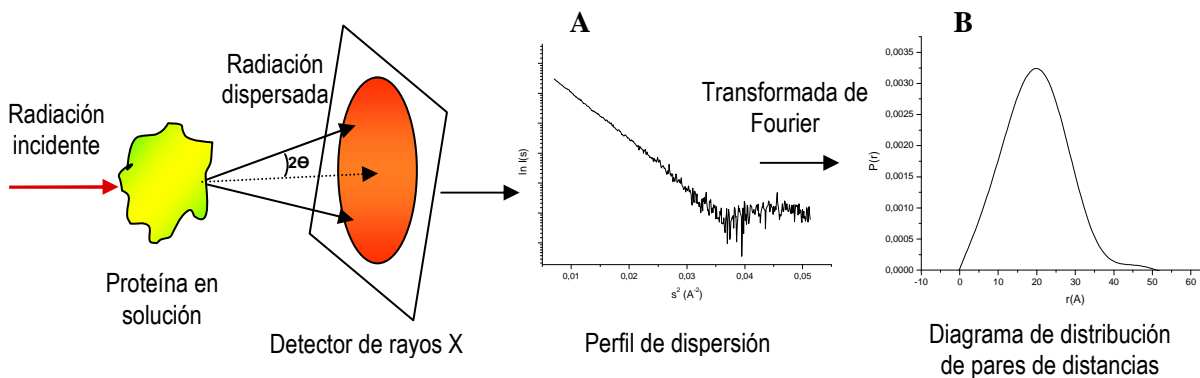


Figura 3.1. Representación esquemática de un experimento típico de SAXS. **A)** Perfil de dispersión de SAXS de una partícula. **B)** Distribución de pares de distancias de la partícula.

El método más sencillo para estimar de forma rápida R_g y la intensidad dispersada a ángulo cero, $I(0)$, es la aproximación de Guinier (Guinier, 1939), según la cual, para una solución monodispersa de macromoléculas globulares, la intensidad de la radiación dispersada a valores pequeños de s viene dada por la ecuación:

$$I(s) = I(0) \exp\left(-\frac{4\pi^2}{3} R_g^2 s^2\right) \quad (1)$$

Representado $\ln I(s)$ vs s^2 (representación de Guinier) es posible calcular R_g e $I(0)$ a partir de la pendiente y ordenada en el origen, respectivamente, de la región lineal de la curva. Valores de $s \leq 0,207/R_g$ son una estimación razonable del límite superior del valor del vector de dispersión en los ajustes de Guinier. Esta representación es, además, un buen indicador del estado de la muestra y el procesado de los datos.

A pesar del problema de las fases, el avance de los métodos computacionales ha hecho posible la determinación de modelos tridimensionales fiables a partir de los datos de SAXS. El valor mínimo de s de los datos registrados para alcanzar la resolución necesaria para una

partícula con longitud D_{max} puede estimarse en $s \leq 1/2D_{max}$. Cuando se carece de información estructural complementaria, se pueden generar modelos *ab initio* con una resolución en el rango de los nanómetros y obtener información sobre las características estructurales de sistemas flexibles. El hecho de que estructuras diferentes puedan tener perfiles de dispersión similares, junto a la imposibilidad de obtener soluciones únicas para un perfil de SAXS, hacen necesario combinar los métodos de modelado *ab initio* con algoritmos matemáticos que faciliten el tratamiento de los datos y la búsqueda de modelos más precisos, comparando los perfiles de dispersión calculados para cada uno de ellos con los datos experimentales. DALAI_GA, GASVOR, DAMMIN y DAMMIF son algunos de los métodos *ab initio* más utilizados. Todos ellos generan modelos tridimensionales a baja/media resolución formados por esferas idénticas (Chacón *et al.*, 2000; Svergun, 2001; Svergun, 1999; Franke y Svergun, 2009). Por otro lado, la combinación de SAXS con datos estructurales o modelos a alta resolución permite evaluar la información obtenida y determinar la organización de complejos macromoleculares o proteínas modulares, mediante la comparación de los perfiles teóricos de dispersión, calculados para las estructuras o modelos a alta resolución propuestos, con los datos experimentales. Además de los procedimientos de modelado basados en el ajuste de las estructuras a alta resolución en los modelos *ab initio* generados por SAXS, es posible realizar un modelado directo de los elementos de estructura frente al perfil de dispersión utilizando métodos de cuerpo rígido que, como en el caso de BUNCH (Petoukhov y Svergun, 2005), pueden aportar información aproximada de los fragmentos que faltan cuando la información estructural es parcial.

Los experimentos de SAXS se realizaron en los laboratorios de radiación sincrotrón de Daresbury (estación 2.1; *Daresbury Laboratory SRS*, Reino Unido) y Grenoble (línea BM16; *ESRF Laboratory*, Francia). La cámara de medida se situó para cubrir un rango del vector de dispersión comprendido entre 0,001 y 0,060 \AA^{-1} y el calibrado de la radiación se realizó utilizando colágeno de cola de rata (Andreu *et al.*, 1992). Las medidas de dispersión se realizaron a 4 °C, a concentraciones de proteína comprendidas entre 4 y 7 mg/ml, utilizando una célula móvil para minimizar la degradación de la muestra por efecto de la radiación, y se midieron varios ciclos de 15-60 segundos cada uno. La proteína se dializó previamente en PBS_p y se utilizó el tampón de la última diálisis para registrar el espectro del solvente. Antes de registrar los espectros, las muestras de proteína se centrifugaron a 50.000 rpm durante 20 minutos a 4 °C en una centrífuga Beckman TL-100 (rotor TLA-100.3) para sedimentar posibles agregados, descartándose el tercio final del volumen de la muestra.

Antes de procesar los datos experimentales, estos se dimensionaron y calibraron con el programa creado por el "Collaborative Computational Project for Fiber Diffraction and Solution Scattering" (<http://www.ccp13.ac.uk/>). Las series de datos que indicaban degradación de la muestra por efecto de la radiación se descartaron y, tras promediar las

medidas, se restó la contribución del tampón para obtener el perfil de dispersión de la proteína. Utilizando la representación de Guinier se examinó la calidad de los datos y se obtuvo una primera estimación de R_g e $I(0)$.

Las curvas experimentales se analizaron con AutoGNOM (Svergun, 1992), que utiliza todo el perfil de dispersión, para obtener estimaciones más precisas de R_g e $I(0)$ y calcular D_{max} y $P(r)$. El valor de D_{max} se determinó empíricamente a partir de la calidad del ajuste de la transformada de Fourier de $P(r)$ a los datos experimentales, para un rango dado de valores de D_{max} . Tras normalizar los espectros dividiendo por $I(0)$, para eliminar la dependencia con respecto a la intensidad del haz incidente, se utilizó el programa DAMMIF (Chacón *et al.*, 1998; Chacón *et al.*, 2000) para generar modelos tridimensionales *ab initio* formados por esferas idénticas. Para cada proteína se generaron 10 posibles modelos cuya similitud estructural se analizó comparándolos con SUPCOMB (Kozin y Svergun, 2001). Los modelos que mostraban menores discrepancias se consideraron como el conjunto más probable y los más divergentes se descartaron. Las estructuras seleccionadas se promediaron con DAMMAVER (Volkov y Svergun, 2003) y se filtraron con DAMFILT para obtener el modelo definitivo, utilizando el 70% del volumen de exclusión de DAMMAVER como valor de corte (Volkov y Svergun, 2003).

Para el dominio N-terminal de la galectina-4 se construyeron modelos a alta resolución, en ausencia y en presencia de lactosa, con el programa SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org/>), utilizando la opción *Alignment Mode* que se basa en el alineamiento de las secuencias de la proteína problema y la empleada como molde, en este caso la estructura cristalina del dominio N-terminal de la galectina-4 de rata (PDB: 2DYC). Los modelos obtenidos se evaluaron con la opción *Structure Assessment* del programa SWISS-MODEL. El modelado basado en cuerpos rígidos se realizó con el programa BUNCH (Peutkhov y Svergun, 2005), para encontrar la posición y orientación de las estructuras y modelos a alta resolución de los CRDs y las posibles conformaciones del péptido conector que mejor describen el perfil experimental de los datos de SAXS. Los modelos de BUNCH se ajustaron automáticamente dentro de los modelos de esferas generados por DAMMIF, utilizando SUPCOMB (Kozin y Svergun, 2001). La compatibilidad entre los modelos así generados (baja y alta resolución) y el comportamiento hidrodinámico de la proteína se analizó también comparando el coeficiente de sedimentación obtenido por velocidad de sedimentación con los valores teóricos calculados utilizando los programas HYDRO (modelo de esferas) e HYDROPRO (modelos a resolución atómica) (García de la Torre *et al.*, 1994; García de la Torre *et al.*, 2000).

3.7. Ensayos de unión con galectinas marcadas con ^{125}I

3.7.1. Marcaje de proteínas con ^{125}I

Las galectinas se marcaron utilizando Na^{125}I en medio oxidante, proporcionado por IODO-GEN (1,3,4,6-tetracloro-3,6-difenil acetileno carbamida, Pierce). Para ello, las galectinas se dializaron durante 4 horas a 4 °C frente a PBS en ausencia de agentes reductores y en presencia de lactosa 0,1 M, inmediatamente antes del marcaje. En condiciones alcalinas suaves (pH 7,2-7,5), el ^{125}I se oxida formando yodo catiónico, $^{125}\text{I}^+$, y estos cationes se incorporan en la posición *orto* del grupo hidroxilo de las tirosinas. Una segunda incorporación de ^{125}I da lugar a diyodotirosina.

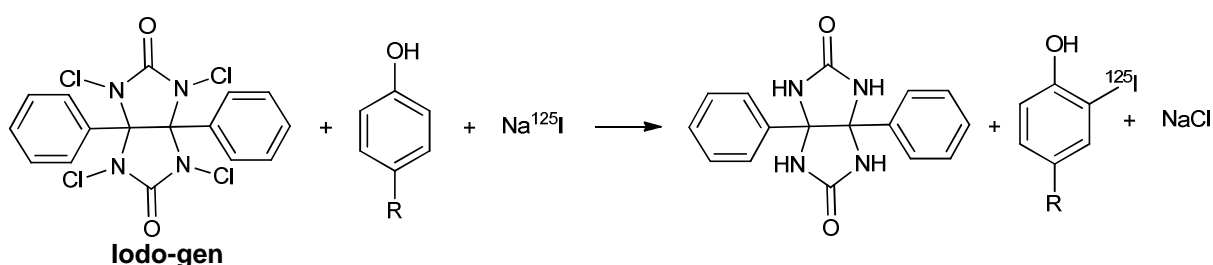


Figura 3.2. Reacción de yodación de tirosinas en presencia de Iodo-gen.

El marcaje se llevó a cabo en microtubos de polipropileno conteniendo IODO-GEN. Para ello se formó previamente una película de reactivo en el microtubo añadiendo 100 μl de una solución de IODO-GEN 0,5 mg/ml en cloroformo (Panreac) y evaporando posteriormente a sequedad en un desecador a vacío. Inmediatamente antes de su utilización, la película se lavó con 100 μl de PBS y a continuación se añadieron 100 μl de la disolución de proteína y 10 μl de una solución de ^{125}I 20 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$ en NaOH. Después de 15 minutos a 20 °C con agitación ocasional, la mezcla se extrajo del microtubo y se le añadieron 100 μl de yoduro potásico 2,75 mM (Panreac) para diluir el ^{125}I no incorporado a la proteína. Finalmente, el yodo libre se separó de la proteína por cromatografía de exclusión molecular, en una columna de Sephadex G-25 (PD-10, Pharmacia) bloqueada con albúmina de suero bovino (BSA, Sigma GmbH) al 3% en PBS y posteriormente equilibrada con dos volúmenes de PBS $_{\beta}$. Se recogieron fracciones de 1 ml y se midió la radiactividad de las fracciones en un contador LKB Minigamma Counter. Las fracciones que contenían la proteína marcada se reunieron y conservaron a -20 °C hasta su utilización.

3.7.2. Preparación de fibrinógeno y asialofibrinógeno

Se ha utilizado fibrinógeno bovino (Sigma) dializado previamente de forma exhaustiva a 4 °C frente a tampón PBS. La concentración de fibrinógeno se determinó espectrofotométricamente midiendo la absorbancia a 280 nm y 320 nm y utilizando el coeficiente de extinción $E^{1\%}_{280\text{ nm}} - E^{1\%}_{320\text{ nm}} = 1,506$ (Mihalyi, 1968). Para determinar el

porcentaje de proteína coagulable, a 1 ml de una solución de fibrinógeno de concentración exactamente conocida (alrededor de 1 mg/ml) en tampón Tris-HCl 10 mM, pH 7,8, NaCl 0,15 M, se le añadieron 20 µl de una solución de trombina bovina (Sigma), 100 NIH/ml en citrato sódico 50 mM, pH 6,5, NaCl 0,15 M. Se agitó rápidamente y se dejó coagular durante 2 horas a 20 °C, al cabo de las cuales se retiró el coágulo procurando eliminar la mayor cantidad posible de líquido de su interior. Se determinó espectrofotométricamente la concentración de proteína que quedó sin coagular en el sobrenadante y a partir de ese valor y el de la concentración inicial de fibrinógeno se calculó el porcentaje de proteína coagulable.

Para obtener asialofibrinógeno, una solución de fibrinógeno en tampón imidazol-HCl 5 mM, pH 6,3, NaCl 0,15 M, se incubó con neuraminidasa de *Clostridium perfringens* (Sigma, 0,005 U/mg de fibrinógeno), durante 3 horas a 37 °C (Díaz-Mauriño *et al.*, 1982). La concentración del asialofibrinógeno y su coagulabilidad se determinaron igual que para el fibrinógeno. La cantidad de ácido *N*-acetil-neuramínico liberado se determinó colorimétricamente (véase apartado 3.12.3) y como control se determinó también la cantidad de siálico liberado por hidrólisis ácida total del fibrinógeno de partida y del asialofibrinógeno obtenido. Dicha hidrólisis se llevó a cabo con H₂SO₄ 0,05 N, durante 90 minutos a 80 °C.

3.7.3. Ensayos de unión a asialofibrina inmovilizada en pocillos de polivinilo

La afinidad de las galectinas por diferentes ligandos se evaluó determinando la capacidad de éstos para inhibir la unión de la lectina marcada con ¹²⁵I a asialofibrina. Para ello, se prepararon películas de asialofibrina en placas de 96 pocillos de polivinilo (Costar), en las que se aplicaron por pocillo 40 µl de asialofibrinógeno 2,5 mg/ml y 10 µl de trombina 20 U/ml en PBS. Después de incubar durante 16 horas a 37 °C, se lavó la placa 5 veces con PBS y se bloqueó incubando 1 hora a 37 °C con 200 µl por pocillo de BSA al 3% o, alternativamente, de Tween al 2,5%. Transcurrido este tiempo, se retiró la solución de bloqueante y en cada pocillo se añadieron 50 µl de la solución de ¹²⁵I-galectina en PBS_β conteniendo aproximadamente 20.000 cpm, en ausencia o presencia de diferentes concentraciones de inhibidor. Tras incubación durante 2 horas a 20 °C, se retiró la solución de los pocillos, se lavó la placa cinco veces con PBS y la cantidad de ¹²⁵I-galectina unida se determinó midiendo la radiactividad en el pocillo con un contador LKB mini-gamma.

Para determinar la constante aparente de disociación (K_d), se utilizaron concentraciones para cada carbohidrato capaces de producir idealmente el 10-75% de inhibición de la unión de la lectina a asialofibrina. El porcentaje de unión inespecífica se determinó midiendo la unión en presencia de lactosa 0,1 M. El valor de la K_d se calculó a partir de la representación de la inversa de la fracción de galectina unida frente a la concentración del inhibidor (Rivera-Sagredo *et al.*, 1991) teniendo en cuenta que:

$$[P_T] = [P] + [PL_1] + [PL_2] \quad (2)$$

donde P_T es la proteína total, L_1 es el ligando en fase sólida y L_2 es el inhibidor en solución, y que

$$K_1 = \frac{[P] \cdot [L_1]}{[PL_1]} \Rightarrow [P] = \frac{K_1 \cdot [PL_1]}{[L_1]} \quad (3)$$

$$K_2 = \frac{[P] \cdot [L_2]}{[PL_2]} \Rightarrow [PL_2] = \frac{[P] \cdot [L_2]}{K_2} = K_1 \cdot \frac{[PL_1]}{[L_1]} \cdot \frac{[L_2]}{K_2} \quad (4)$$

La ecuación (2) puede ser sustituida en términos de las constantes de disociación de los complejos con el ligando inmovilizado (K_1) y en solución (K_2) resultando:

$$[P_T] = K_1 \cdot \frac{[PL_1]}{[L_1]} + [PL_1] + K_1 \cdot \frac{[PL_1]}{[L_1]} \cdot \frac{[L_2]}{K_2} \quad (5)$$

Dividiendo por $[PL_1]$ y reagrupando tendremos

$$\frac{[P_T]}{[PL_1]} = 1 + \frac{K_1}{[L_1]} + \frac{K_1}{K_2 \cdot [L_1]} \cdot [L_2] \quad (6)$$

Las concentraciones de los ligandos $[L_1]$ y $[L_2]$ pueden ser consideradas iguales a la cantidad total presente en el ensayo ya que éstas son mucho más altas que la de la proteína. Por lo tanto, la ecuación (6) es la ecuación de una recta, $y = y_0 + mx$, donde

$$y_0 = 1 + \frac{K_1}{[L_1]} \quad (7)$$

$$y \quad m = \frac{K_1}{K_2 \cdot [L_1]} \Rightarrow \frac{K_1}{[L_1]} = mK_2 \quad (8)$$

sustituyendo $K_1/[L_1]$ en la ecuación (7) tendremos

$$y_0 = 1 + mK_2 \Rightarrow K_2 = \frac{y_0 - 1}{m} \quad (9)$$

Por lo tanto, volviendo a la ecuación (6), la representación gráfica de la inversa de la fracción de galectina unida al ligando en fase sólida frente a la concentración del inhibidor debe ajustarse a una línea recta a partir de cuya pendiente y ordenada en el origen puede calcularse la constante de disociación para el inhibidor (Rivera-Sagredo *et al.*, 1991).

3.7.4. Ensayos de unión a lactosa-agarosa

50 μ l de una suspensión 1:5 de lactosa-agarosa (Sigma) en PBS se incubaron con las galectinas marcadas radiactivamente (\sim 20.000 cpm) en ausencia o en presencia de diferentes concentraciones de inhibidor (0,1-10 mM concentración final). Después de 2 horas de incubación a 20 °C con agitación ocasional, se midió la radiactividad en el sobrenadante. Para determinar el porcentaje de galectina unida inespecíficamente se realizaron ensayos paralelos en presencia de lactosa 0,1 M. Las constantes aparentes de disociación se calcularon a partir de la representación de la inversa de la fracción de galectina unida frente a la concentración del inhibidor, como se ha descrito en el apartado anterior.

3.8. Cromatografía de afinidad

Las cromatografías de afinidad se llevaron a cabo en columnas de 3 ml de asialofetuina-Sepharosa, preparada como se describe a continuación.

Con objeto de eliminar los grupos imidocarbonato presentes en el gel que pudieran dar lugar a interacciones inespecíficas durante el proceso cromatográfico (Tercero y Díaz-Mauriño, 1988), la Sepharosa 4B activada con bromuro de cianógeno (Pharmacia) se suspendió primero en HCl 0,1 M (200 ml/g de Sepharosa), incubando durante 1 hora a 20 °C. Transcurrido este tiempo, el gel se separó por filtración y se lavó primero abundantemente con agua destilada y después con una pequeña cantidad de tampón NaHCO₃ 0,1 M, pH 8,3, NaCl 1 M, mezclándose finalmente con un volumen aproximadamente igual de una solución de asialofetuina (5-10 mg/ml) en el tampón anterior. Esta mezcla se efectuó inmediatamente después de lavar el gel con bicarbonato, ya que al pH de éste los grupos cianato de la Sepharosa que van a reaccionar con la proteína son muy inestables. La reacción se llevo a cabo con agitación rotatoria suave durante 17 horas a 4 °C. Posteriormente, el gel se separó del sobrenadante por filtración, se lavó con la misma disolución de bicarbonato y se incubó con etanolamina 1 M, pH 9, con agitación rotatoria suave durante 2 horas a 20 °C, para neutralizar los grupos activos que pudieran permanecer en el gel. Después del bloqueo, el gel se lavó con PBS. La cantidad de proteína inmovilizada en el gel (2,5-4,5 mg/ml) se calculó espectrofotométricamente por diferencia entre la cantidad inicial de proteína añadida y la que se detecta en el sobrenadante de la mezcla de reacción y en los lavados.

La columna de asialofetuina-Sepharosa se equilibró a 20 °C con PBS o PBS _{β} y se aplicaron 100 μ l de la disolución de galectina (1 mg/ml) en el mismo tampón. La elución se monitorizó midiendo la absorbancia a 280 nm con un detector de UV Uvicord S2 (LKB) y utilizando un registro integrador Shimadzu C-R3A. La proteína retenida en la columna se eluyó con PBS/PBS _{β} conteniendo lactosa 0,1 M. Todas las cromatografías se realizaron a un flujo de 0,25 ml/min, utilizando una bomba peristáltica LKB Pump P1 (Pharmacia).

3.9. Calorimetría de valoración isoterma

La calorimetría de valoración isoterma (ITC) permite estudiar la energética de una reacción o de interacciones moleculares (unión de ligandos, interacciones enzima-substrato e interacciones multicomponentes), midiendo el calor absorbido o emitido en el proceso. Es la técnica experimental más directa para determinar los parámetros termodinámicos asociados a la formación de un complejo proteína-ligando (Wiseman *et al.*, 1989; Freire *et al.*, 1990; Todd y Gómez, 2001).

Un calorímetro consta de dos células idénticas, una de las cuales se utiliza como célula de muestra y la otra como referencia. La técnica consiste en medir el calor producido o absorbido al inyectar, en pasos sucesivos, uno de los componentes (generalmente el ligando) en la solución del otro (generalmente la proteína) situado en la célula de muestra. El calor absorbido o producido tras cada inyección genera una diferencia de temperatura entre ambas células que se compensa automáticamente mediante un sistema de retroalimentación, obteniéndose una serie de picos cuya integral corresponde al calor producido/absorbido como consecuencia de la reacción (Figura 3.3). A medida que aumenta el grado de saturación de la proteína por el ligando la intensidad de los picos disminuye, hasta alcanzar un valor constante que corresponde al calor de dilución del ligando. Este calor de dilución se cuantifica mediante valoraciones en paralelo, en las que la disolución del ligando se inyecta sobre la célula de reacción conteniendo el tampón en el que se halle la proteína, y es descontado del calor total para obtener el calor debido a la interacción.

Finalmente, los datos se ajustan a una curva de unión utilizando el modelo más apropiado, obteniéndose los valores de n , ΔH y K para cada clase de sitios de unión, siendo n el número de sitios, ΔH la entalpía de unión y K la constante de asociación. El valor de la entropía de interacción, ΔS se calcula a partir de estos parámetros teniendo en cuenta que:

$$\Delta G = - RT \ln K = \Delta H - T \Delta S \quad (10)$$

donde ΔG es la variación de energía libre de Gibbs, R es la constante de gases y T la temperatura absoluta.

Para llevar a cabo los experimentos de ITC, las galectinas se dializaron exhaustivamente frente a PBS_p y el tampón de la última diálisis se utilizó para preparar la disolución del azúcar. Éste se añadió a la disolución de galectina, presente en la célula de reacción en concentraciones de aproximadamente 150 μ M, en una serie de inyecciones cuyo volumen se ajustó en función del experimento. Los experimentos se llevaron a cabo en un microcalorímetro MCS-ITC (MicroCal Inc.).

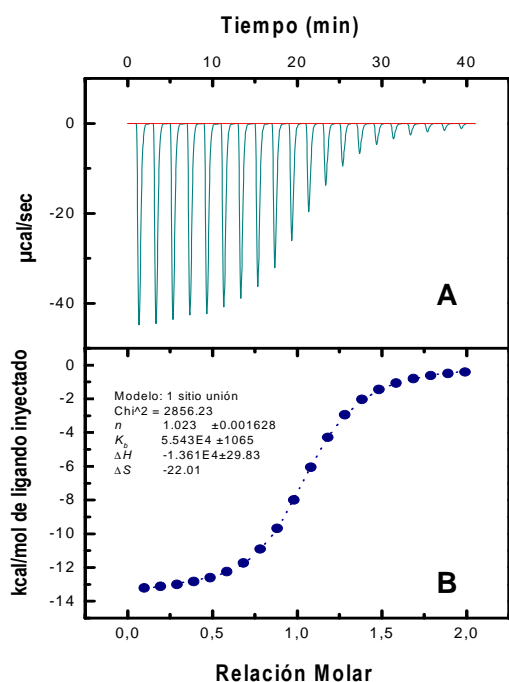


Figura 3.3. Valoración calorimétrica de una proteína por un ligando. A) Datos experimentales obtenidos para una serie de inyecciones de 4 μ l espaciadas cada 5 minutos. Los símbolos en B) representan el calor producido por mol de ligando adicionado en cada inyección, obtenido al integrar los sucesivos picos. El ajuste de estos datos por mínimos cuadrados no lineales, utilizando en este caso un modelo de una sola clase de sitios de unión (curva azul), genera los parámetros que se detallan en el inserto.

3.10. Estudios de la actividad de las galectinas sobre bacterias

3.10.1. Cultivos de bacterias y ensayos de actividad bactericida

La actividad bactericida de los péptidos antimicrobianos polimixina B (PxB) (Sigma), el péptido de neutrófilos humanos hAD-1 (Sigma) y la β -defensina humana hBD-2 (PeproTech) (Anexo II, Figura II.1A,B,C), así como la de las galectinas solas o en combinación con los péptidos, se ha investigado mediante el método de difusión radial (método de difusión en agar) (Figura 3.4). Este método consiste en la difusión del compuesto investigado por un medio agarizado al que se han incorporado las bacterias previamente crecidas hasta aproximadamente la mitad de la fase exponencial, produciendo un halo de inhibición alrededor del pocillo sólo en el caso de que el compuesto tenga actividad bactericida. El tamaño del halo depende de la actividad relativa del compuesto (Lehrer *et al.*, 1991; Bengoechea *et al.*, 2004).



Figura 3.4. Ensayo de actividad bactericida empleando el método de difusión radial.

Estos ensayos se realizaron en Laboratorio de Patogénesis Microbiana de la Fundación Caubet-Cimera, Bunyola, Mallorca, bajo la supervisión del Dr. José Antonio Bengoechea.

500 µl de cultivo de bacteria a 37 °C se diluyeron en 4,5 ml de medio Luria Bertani (LB) (triptona 10 g/l, extracto de levadura 5 g/l y NaCl 10 g/l, ajustado a pH 7,5 con NaOH) y se incubaron a 37 °C con agitación hasta la fase exponencial. Posteriormente se ajustó con PBS a una $DO_{540nm} = 0,3$, valor de turbidez estimado para una concentración de 10^8 UFC/ml. 180 µl de esta dilución se añadieron a 30 ml de gel de medio mínimo [Hepes 2 mM, pH 7,2; TSB (caldo de tripticasa de soja, del inglés “*trypticase soy broth*”, (Oxoid) 3 mg/ml; Agarosa SeaPlaque® (Lonza) al 1%]] atemperado (aproximadamente a 50 °C), consiguiendo así aproximadamente $6 \cdot 10^5$ UFC de bacteria por mililitro de gel. Este gel se vertió en una placa Petri cuadrada de 10 x 10 x 1,5 cm. Una vez solidificado se realizaron orificios de 2-3 mm de diámetro y en cada orificio se aplicaron 10 µl de la muestra correspondiente, incubando durante 3 horas a 37 °C. Como el gel de medio mínimo contiene una cantidad limitada de nutrientes, las bacterias sólo pueden llegar a duplicarse 6-8 veces. Transcurrido este tiempo, se añadieron 30 ml de gel de medio rico (TSB al 3% y Agarosa SeaPlaque al 1%) previamente atemperado (aproximadamente 50 °C). Se dejó solidificar y posteriormente se incubó a 37 °C. Este medio permite un desarrollo más intenso de las colonias bacterianas. Para evaluar la actividad de cada muestra, se midió el diámetro de los halos de inhibición formados alrededor de cada pocillo, restando el diámetro del pocillo.

Los ensayos se realizaron utilizando diferentes concentraciones de las muestras para determinar la concentración inhibitoria mínima (MIC, *minimal inhibitory concentration*), es decir, la concentración más pequeña de la muestra capaz de inhibir el crecimiento de las bacterias.

3.10.2. Estudio de la permeabilidad de la membrana bacteriana mediante fluorimetría

Para determinar cómo las galectinas pueden afectar la membrana externa de las bacterias, hemos utilizado el método de adsorción de NPN (1-N-fenil-naftilamina).

NPN es una sonda hidrofóbica fluorescente, sin carga iónica, cuya intensidad aumenta cuando se transfiere de un medio hidrofílico a otro hidrofóbico (Campos *et al.*, 2006). En las bacterias Gram-negativas, la membrana externa es una barrera permeable que excluye compuestos hidrofóbicos como el NPN. En cambio, cuando la membrana está desestabilizada la sonda NPN es capaz de cruzarla, emitiendo una mayor fluorescencia (Bengoechea, *et al.*, 1996; Vaara, 1996; Loh *et al.*, 1984).

Para determinar la permeabilidad de la membrana externa al NPN, se crecieron las bacterias en LB a 37 °C hasta alcanzar una DO_{600} de 0,5. Entonces se centrifugaron durante

20 minutos a 3000 x g y 4 °C, se lavaron dos veces con HEPES 5 M, pH 7,5 y se resuspendieron en HEPES 5 M, pH 7,5 o en HEPES 5 M con 5 µM CCCP (carbonil cianuro m-clorofenilhidrazona, inhibidor de las bombas de flujo) para obtener una suspensión de 10⁸ bacterias/ml. A continuación, se recogió 1 ml de esta suspensión y se añadió NPN (Sigma) a una concentración final de 10 µM. Para examinar el efecto sobre la membrana se utilizó una concentración final de 0,5 a 10 µg/ml de la galectina-1. La variación de fluorescencia con el tiempo se monitorizó con un espectrofluorofotómetro LS 55 de Perkin Elmer, utilizando como longitud de onda de excitación 350 nm y para la de emisión 420 nm. Las medidas se realizaron por duplicado y se llevaron a cabo al menos 3 experimentos independientes.

3.11. Estudio de la actividad de las galectinas sobre la diferenciación neuronal

En este ensayo, se prepararon cultivos primarios de células de hipocampo para estudiar el crecimiento de neuritas y axones bajo la influencia de diferentes galectinas humanas (Goslin y Banker, 1989; Kopitz *et al.*, 2004). Las neuronas utilizadas en el estudio provenían del hipocampo de embriones de rata de 17 a 19 días de gestación (E17...E19). Los animales fueron facilitados por el animalario del Hospital Nacional de Paraplégicos de Toledo. Todos los reactivos empleados, a menos que se indique lo contrario, se obtuvieron de Gibco-Invitrogen.

3.11.1. Aislamiento y cultivo primario de neuronas hipocampales

Para la obtención de las neuronas embrionarias, se sacrificaron ratas preñadas por eterización y dislocación cervical. Los embriones se extrajeron por cesárea y se decapitaron para obtener los cerebros. Los hipocampos se diseccionaron de los hemisferios cerebrales, se lavaron 3-4 veces con 3 ml de HBSS (*Hank's Balanced Salt Solution*, solución salina equilibrada) y se incubaron con una solución de tripsina al 0,25 % durante 15 minutos a 37 °C. Después de 4 lavados adicionales con 5 ml de HBSS, el tejido se disgregó por pipeteo repetido (pipeta Pasteur de vidrio con la punta estrechada) en un volumen final de 3 ml de HBSS. Por último, se realizó un recuento celular con una cámara de Neubauer. El número de células depende de la edad de los embriones, de forma aproximada oscila entre 10⁵ y 4·10⁵ células para embriones E17 y E19, respectivamente.

3.11.2. Inmunocitoquímica de las neuronas

Las neuronas se sembraron en cubreobjetos previamente incubados durante 24 horas a 37 °C con polilisina (Fisher) 0,1 mg/ml o galectinas 0,1 mg/ml y dispuestos en placas conteniendo MEM-Horse [(50 ml de suero de caballo, 15 ml de glucosa al 20 % y 5 ml de L-glutamina 100X - en 500 ml de MEM (medio mínimo esencial para la supervivencia de las neuronas)]. Las células se incubaron entre 1 y 3 días a 37 °C y en atmósfera de CO₂ al 5%.

Para el análisis posterior, las células se fijaron en los cubreobjetos con paraformaldehído al 4%, incubando 15 minutos a 20 °C, y los grupos aldehído en exceso se redujeron incubando 5 minutos a 20 °C con cloruro de amonio 50 mM en PBS. La membrana se permeabilizó con Tritón X-100 (Sigma) al 0,1% en PBS durante 5 minutos a 20 °C, tras lo cual los cubres se lavaron varias veces con PBS. Para evitar la unión inespecífica a la membrana neuronal, se realizó un bloqueo con BSA al 2% durante 30 minutos a 20 °C.

Posteriormente se procedió al marcaje para inmunofluorescencia. Primero, se incubaron las muestras con el anticuerpo policlonal de conejo anti-tubulina (Sigma-Aldrich) diluido 1:2000 en PBS, durante 30 minutos a 20 °C. Tras 3 lavados con PBS de 5 minutos, se realizó un doble marcaje incubando las muestras durante 40 minutos a 20 °C con el anticuerpo secundario anti-conejo acoplado al fluoróforo Alexa Fluor 488 (1:1000 diluido en PBS) junto con faloidina acoplada al fluoróforo "Texas-red" (1:1000 en PBS), que se une específicamente a los filamentos de actina. Tras 3 lavados de 5 minutos con PBS, las preparaciones se montaron sobre portaobjetos con medio para fluorescencia Mowiol-DABCO [6 g de glicerol, 2,4 g de Mowiol®, 12 ml de Tris 0,2 M, pH 6,8 y DABCO (Sigma) al 2,5% en 6 ml de agua destilada].

Para la visualización del crecimiento de neuritas y axones en diferentes condiciones, se hicieron fotografías con un microscopio de fluorescencia Leica DM 5000B acoplado a una cámara digital. Se fotografiaron 10 campos aleatorios de cada muestra con un aumento de 40X. Las fotografías obtenidas se analizaron posteriormente utilizando el programa ImageJ, con el que se contaron el número de neuritas totales por célula y la longitud promedio de las neuritas y axones. La cuantificación se realizó a partir de tres experimentos independientes, con dos réplicas en cada caso.

3.12. Métodos colorimétricos

3.12.1. Determinación de la concentración de proteína

La determinación colorimétrica de la concentración de proteína se llevó a cabo mediante el método de Bradford ([Bradford, 1976](#)), en placas de poliestireno de 96 pocillos (Costar). El método se basa en la unión de un colorante, el azul de Coomassie G-250, a las proteínas. La solución del colorante libre es de color rojizo (máxima absorción a 465 nm) y cambia a azul cuando está unido a la proteína (máxima absorción a 595 nm). La unión es un proceso rápido (aproximadamente 2 minutos) y el complejo colorante-proteína se mantiene estable hasta una hora después de formarse.

A 120 µl de una solución que contenía entre 2 y 8 µg de proteína se añadieron 80 µl de reactivo Bradford (Bio-Rad) (100 mg de azul de Coomassie disueltos en una mezcla de 100 ml de ácido fosfórico al 85% y 50 ml de etanol al 95 %) diluido 1:1 con agua destilada. Se agitó

e incubó 10 minutos a 20 °C y se midió la absorbancia a 595 nm en un lector de placas Bio-Rad 3550. La concentración de proteína se calculó interpolando los valores de absorbancia de las muestras en una recta patrón obtenida utilizando concentraciones conocidas de BSA.

3.12.2. Determinación de la concentración de hexosas

La concentración de hexosas se determinó por el método del fenol-sulfúrico (Dubois *et al.*, 1951), en placas de poliestireno de 96 pocillos (Costar). El método se basa en la formación de un complejo fenólico, coloreado (naranja-amarillo) y estable, resultado de la interacción entre el fenol y los carbohidratos, altamente reactivos como consecuencia de la hidrólisis de los enlaces glicosídicos por la adición enérgica de ácido sulfúrico concentrado, lo que genera calor.

A 25 µl de una disolución conteniendo de 0,5 a 3 µg de azúcar se añadieron 25 µl de fenol al 4% y, a continuación, 200 µl de ácido sulfúrico concentrado de forma enérgica. Se agitó y se midió la absorbancia a 490 nm en un lector de placas Bio-Rad 3550. La concentración de hexosas se calculó interpolando los valores de absorbancia en una recta patrón obtenida con concentraciones conocidas de lactosa (Scharlau).

3.12.3. Determinación de ácido siálico

La determinación de ácido siálico se llevó a cabo por el método de Horgan (Horgan, 1981). A 400 µl de una solución conteniendo entre 0,5 y 10 µg de ácido siálico, en tubo Pirex con cierre hermético, se añadieron 100 µl de ácido peryódico 25 mM en HCl 0,125 M, recién preparado, y se incubó durante 30 minutos a 37 °C. A continuación se añadieron 80 µl de arsenito sódico al 2% en HCl 0,5 M y se esperó hasta la desaparición del color amarillo producido. Entonces se añadieron 800 µl de ácido tiobarbitúrico 0,1 M, pH 9, agitando enérgicamente. Se introdujeron los tubos en un baño de agua a 100 °C durante 10 minutos y se enfriaron posteriormente durante 2 minutos en un baño de hielo. Después se incubó durante 2 minutos a 37 °C antes de extraer el color producido con 1 ml de una solución de *n*-butanol:HCl 10,5 N (94,3:5,7 v/v), agitando enérgicamente y centrifugando 20 minutos a 5000 rpm. Finalmente se midió la absorbancia de la fase orgánica a 549 nm. La cantidad de ácido siálico liberado se calculó interpolando los valores de absorbancia obtenidos en una recta patrón construida con concentraciones conocidas de ácido *N*-acetil neuramínico (Sigma).

3.13. Electroforesis en geles de poliacrilamida

La electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE) se llevó a cabo según el método descrito por Laemmli (Laemmli, 1970), utilizando un sistema SE 250 Mighty Small II (Hoefer Scientific Instruments) asociado a una fuente de

voltaje y amperaje variable (EPS 500/400, Pharmacia). La electroforesis en condiciones reductoras se realizó añadiendo al tampón de muestra [Tris-HCl 0,05 M, pH 6,8, conteniendo glicerol al 10 %, SDS al 10% (w/v) y azul de bromofenol al 0,1% (w/v)] β -mercaptoetanol en concentración 0,2 M final e incubando las muestras 3 minutos a 100 °C.

Se utilizaron geles al 15% de concentración de acrilamida, para los que, de forma general, la relación entre los valores del logaritmo del peso molecular y la movilidad electroforética es lineal para proteínas comprendidas entre 12 y 55 kDa. Para el control de la movilidad electroforética se utilizó un kit comercial (Bio-Rad) compuesto por proteínas de masa molecular conocida: fosforilasa b (97,4 kDa), BSA (66,2 kDa), ovoalbúmina (45 kDa), anhidrasa carbónica (31 kDa), inhibidor de tripsina (21,5 kDa), lisozima (14,4 kDa) y aprotinina (6,5 kDa). Las bandas de proteína se detectaron mediante tinción con azul de Coomassie R250 (Fluka) al 0,25% en metanol/acético/agua (45:5:50 v/v/v).

4. RESULTADOS

En esta Tesis se han investigado las propiedades moleculares y modo de unión a ligandos de dos galectinas de tipo tándem-repetido, las galectinas humanas 4 y 8, en comparación con las galectinas humanas 1 y 3, de tipo proto y quimera, respectivamente. Con objeto de examinar el papel del péptido que une covalentemente los dos CRDs presentes en este tipo de galectinas y de determinar posibles divergencias entre ambos dominios, se han estudiado diferentes variantes naturales y mutantes de las galectinas (Figura 4.1), así como los CRDs aislados. En concreto, además de la galectina-4 humana (hG4), se ha estudiado un mutante que contiene sólo una parte del péptido conector (hG4V (Kopitz *et al.*, 2011)) y los dos CRDs expresados por separado (hG4-N y hG4-C). En el caso de la galectina-8, además de la forma predominante (hG8), se ha estudiado un mutante natural que se expresa en células del líquido sinovial de pacientes con artritis reumatoide y miastenia gravis (Pál *et al.*, 2012), en el que la fenilalanina en posición 19 está reemplazada por una tirosina (hG8F19Y), el dominio N-terminal de ambas variantes, y una tercera variante, también natural, que presenta un péptido conector más extendido (hG8L) (Figura 4.1). Todas estas proteínas han sido producidas de forma recombinante y purificadas en el laboratorio del Prof. H.-J. Gabius.

```

1                                     60
hG4  MAYVPAPGYQ PTYNPTLPYQ QPIPGGLNVG MSVYIQGVAS EHKRFFVNF VVGQD--PGS
hG4V MAYVPAPGYQ PTYNPTLPYQ QPIPGGLNVG MSVYIQGVAS EHKRFFVNF VVGQD--PGS
hG8  MMLSLNQLQN IYNPVLPFV GTIPDQLDPG TLIVIRGHVP SDADRFQVDL QNGSSMKPRA
hG8L MMLSLNQLQN IYNPVLPFV GTIPDQLDPG TLIVIRGHVP SDADRFQVDL QNGSSMKPRA

61                                     120
hG4  DVAFHFNPRF DGWDKVFNT LQGGKWSSEE RKRSMPFKKG AAFELVFIVL AEHYKVVVNG
hG4V DVAFHFNPRF DGWDKVFNT LQGGKWSSEE RKRSMPFKKG AAFELVFIVL AEHYKVVVNG
hG8  DVAFHFNPRF KRAGCIVCNT LINEKWSREE ITYDTPFKRE KSFEIVIMVL KDKFQAVNG
hG8L DVAFHFNPRF KRAGCIVCNT LINEKWSREE ITYDTPFKRE KSFEIVIMVL KDKFQAVNG

121                                    180
hG4  NPFYEGHRL PLQMVTHLQV DGDQLQSQIN FIGGQPLRPQ GPPMPPYPG PGHCHQQLNS
hG4V NPFYEGHRL PLQMVTHLQV DGDQLQSQIN FIGG----- -----S
hG8  KHTLLYGHRI GPEKIDTLGI YGKVNHSIG FFSDDLQST QASSLE-LTE ISRENVPKSG
hG8L KHTLLYGHRI GPEKIDTLGI YGKVNHSIG FFSDDLQST QASSLE-LTE ISRENVPKSG

181                                    240
hG4  LPTMEGPPT- ----- ---FNPVPVY FGRLQGGTLTA
hG4V LPTMEGPPT- ----- ---FNPVPVY FGRLQGGTLTA
hG8  TPQL----- -----RLLPF AARLNTPMGP
hG8L TPQLPSNRGG DISKIAPRTV YTKSKDSTVN HTLTCTKIPP MNYVSKRLPF AARLNTPMGP

241                                    300
hG4  RRTIIKGYV PPTGKSFAIN FKVSSGDIA LHINPRMGNG TVVRNSLLNG SWGSEKKIT
hG4V RRTIIKGYV PPTGKSFAIN FKVSSGDIA LHINPRMGNG TVVRNSLLNG SWGSEKKIT
hG8  GRTVVVKGEV NANAKSFNVD LLAGKSKDIA LHLNPRNLNIK AFVRNSFLQE SWGEEERNIT
hG8L GRTVVVKGEV NANAKSFNVD LLAGKSKDIA LHLNPRNLNIK AFVRNSFLQE SWGEEERNIT

301                                    360
hG4  HNPFGPGQFF DLSIRCGLDR FKVYANGQHL FDFAHRLSAF QRVDTLEIQG DVTLSSVQI
hG4V HNPFGPGQFF DLSIRCGLDR FKVYANGQHL FDFAHRLSAF QRVDTLEIQG DVTLSSVQI
hG8  SFPPSPGMYF EMLIYCDVRE FKVAVNGVHS LEYKHRFKEL SSIDTLEING DIHLLEVRWS
hG8L SLPPSPGMYF EMLIYCDVRE FKVAVNGVHS LEYKHRFKEL SSIDTLEING DIHLLEVRWS

```

Figura 4.1. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de las galectinas de tipo tándem-repetido hG4, hG4V, hG8 y hG8L. En cada una se resalta la parte de la secuencia que constituye el péptido conector y que comprende 43, 17, 34 y 74 aminoácidos, respectivamente.

4.1. Masa molecular

Como primer paso en la caracterización de las galectinas, la masa molecular de las proteínas expresadas se ha comprobado mediante espectrometría de masas (Figura 4.2).

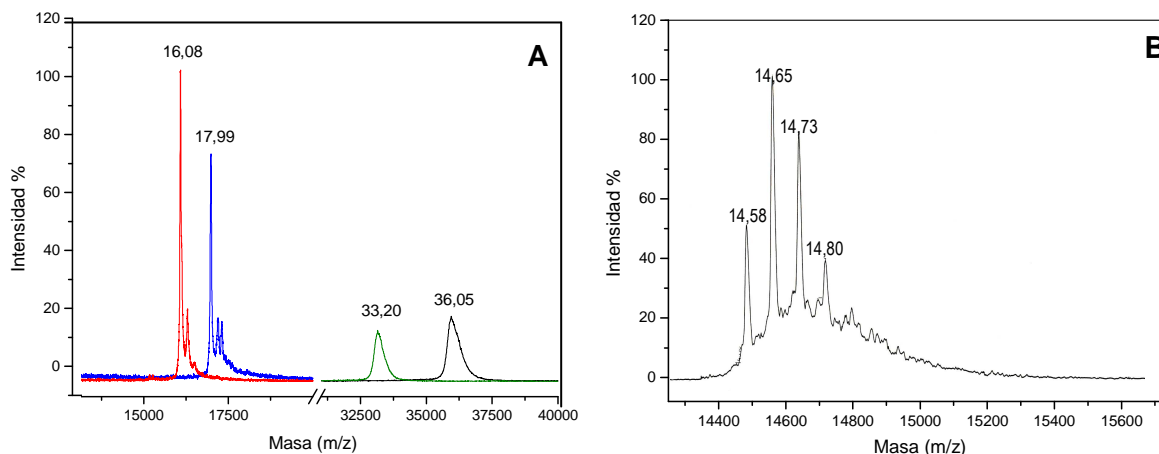


Figura 4.2. Espectros de masas (MALDI-TOF) obtenidos para hG4 (negro), hG4V (verde), hG4-N (azul) y hG4-C (rojo) (A), mostrando un pico mayoritario, y para hG1 (B), en el que se observan diferentes picos con incrementos de m/z de $\sim 76,2$ Da, correspondientes a la formación de disulfuros mixtos con β -mercaptoetanol.

En general, los espectros de masas revelan la presencia de un pico mayoritario (Figura 4.2A) cuya masa es igual o superior a la calculada a partir de la secuencia de aminoácidos (Tabla 4.1), lo que probablemente es el resultado de la formación de disulfuros mixtos con β -mercaptoetanol (incremento de m/z = 76,1) y/o la alquilación de residuos, fundamentalmente cisteínas, por iodoacetamida (incremento de m/z = 57,05), como ya se ha demostrado en el caso de la galectina de pollo CG-3 (Kaltner *et al.*, 2011).

Tabla 4.1. Masa observada por MALDI-TOF y masa calculada a partir de la secuencia de aminoácidos		
Galectina	Masa obtenida por MS (kDa*)	Masa calculada (Da)
hG4	36,05	35.941,1
hG4V	33,20	33.123,8
hG4-N	17,99	16.987,3
hG4-C	16,08	16.080,3
hG8	36,00	35.676,9
hG8-N	18,17	18.063,1
hG8F19Y	36,01	35.692,4
hG8F19Y-N	18,19	18.079,3
hG1	14,58	14.583,2
hG3	26,10	26.152,0

*Error: $\pm 0,05\%$

Estos dos compuestos se utilizan normalmente en los tampones para mantener las galectinas en su conformación activa. Para la galectina-1, se observa claramente la presencia de especies con diferentes grados de modificación (Figura 4.2B). En algunos casos se observan además picos minoritarios a valores más altos de m/z , que corresponden a aductos de la proteína con la matriz de ácido sinapínico (Figura 4.1A). En la Tabla 4.1 se recopilan los valores de masa obtenidos para los picos observados al valor más bajo de m/z .

4.2. Plegamiento y estabilidad térmica

4.2.1. Estructura secundaria

La estructura secundaria de las galectinas y los posibles cambios inducidos por la unión de ligandos se han investigado mediante dicroísmo circular (DC) en el ultravioleta lejano. En todos los casos, los espectros indican la presencia de estructura β , compatible con el característico sándwich β observado en todas las estructuras resueltas hasta la fecha para diferentes galectinas. Debido a la composición del tampón utilizado, no ha sido posible realizar medidas a longitudes de onda por debajo de 200 nm, por lo que no se ha podido calcular de forma fiable el contenido en estructura secundaria. En cualquier caso, las diferencias existentes en los espectros parecen indicar características particulares para cada galectina y/o CRD.

Respecto a hG4, hG4V y los dominios hG4-N y hG4-C aislados, los espectros presentan una banda de elipticidad negativa centrada en 217-218 nm, pero la intensidad de la señal normalizada por mol de residuo, difiere de unas proteínas a otras (Figura 4.3A). En particular, la intensidad para el dominio C-terminal es significativamente mayor que para el dominio N-terminal, observándose además una pequeña diferencia en la posición del mínimo (Tabla 4.2). Estas diferencias pueden estar relacionadas con variaciones en la longitud de los lazos y/o hebras de ambos dominios. En el caso de la proteína completa, la elipticidad es intermedia a la observada para los dominios aislados, lo que en principio parece compatible con un valor promedio y sugiere que el péptido conector no contribuye significativamente al espectro. Esta conclusión parece confirmarse cuando se comparan los espectros normalizados por mol de proteína (Figura 4.3C), observándose que el espectro de hG4 es equivalente a la suma de los espectros de los dominios N-terminal y C-terminal aislados (Figura 4.3C). De acuerdo también con esta conclusión, el espectro de hG4V, en la que se ha eliminado una parte del péptido conector, es comparable con el de la proteína completa.

En todos los casos, los espectros muestran una disminución de la elipticidad en presencia de lactosa con respecto a la observada en ausencia del ligando (Figura 4.3B,D). Esta disminución es mayor para el dominio N-terminal que para el C-terminal, produciéndose además un desplazamiento de 2 nm del mínimo para hG4-N que no se observa en el caso

de hG4-C (Tabla 4.2), lo que indica que la unión de lactosa induce diferentes cambios en la estructura y/o dinámica interna de los dos dominios.

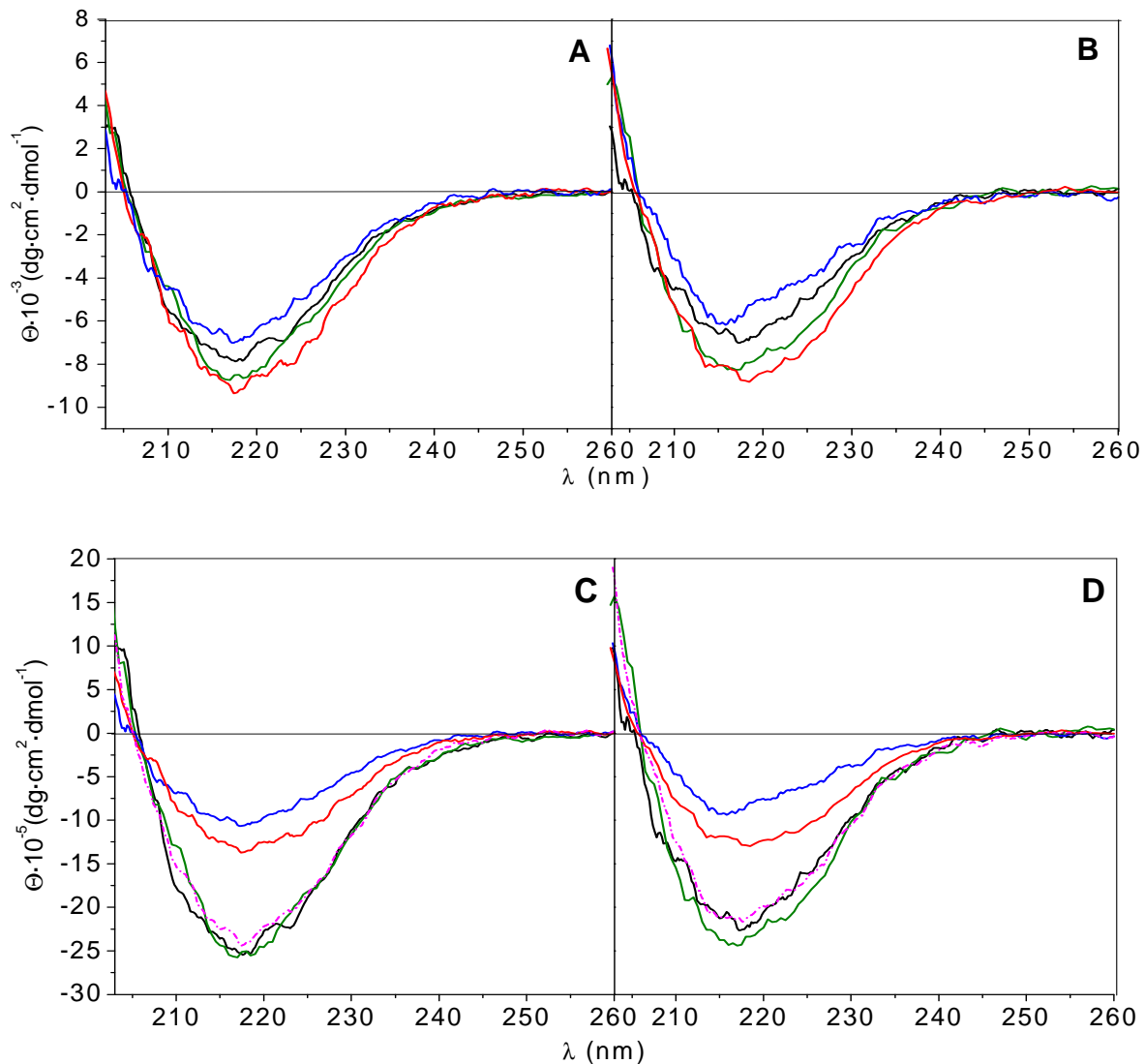


Figura 4.3. Espectros de DC en el UV-lejano de hG4 (negro), hG4V (verde), hG4-N (azul) y hG4-C (rojo) en ausencia (A,C) y en presencia (B,D) de lactosa 0,1 M. Los paneles A y B muestran los espectros normalizados por mol de residuo, mientras que los paneles C y D muestran los mismos espectros normalizados por mol de molécula. La línea de puntos representa la suma de los espectros obtenidos para los dominios N-terminal y C-terminal. Las medidas se realizaron a una concentración de proteína de 0,2 mg/ml, en tampón PBS_β y a 20 °C.

Los espectros obtenidos para hG8, hG8F19Y y hG8L son también similares una vez normalizados por mol de proteína (Figura 4.4A), lo que de nuevo indica que la longitud del péptido conector no influye significativamente en el contenido de estructura secundaria. Únicamente se observa para hG8L un ligero ensanchamiento de la banda a longitud de onda por debajo de los 210 nm. Como cabría esperar, la intensidad de la elipticidad observada para los dominios N-terminales, tanto de hG8 como de hG8F19Y, es aproximadamente la mitad de la elipticidad de la proteína completa. En presencia de lactosa 0,1 M no se aprecian cambios significativos en elipticidad en ninguna de las proteínas y lo mismo ocurre para los

dominios N-terminales en presencia de 3'-sialil-lactosa, un ligando conocido de la galectina-8 (Ideo *et al.*, 2003) (Figura 4.4B,C). Sin embargo, la intensidad de la señal disminuye claramente en presencia de 3'-sialil-lactosa para hG8 y hG8F19Y (Tabla 4.2), lo que sugiere que la unión de este ligando a la galectina-8 tiene efectos sobre la organización estructural del dominio C-terminal y/o del péptido conector. Curiosamente, este efecto no se observa para hG8L, lo que apunta a un importante papel del péptido conector en los cambios inducidos por la unión de 3'-sialil-lactosa.

Tabla 4.2. Características de los espectros de DC en el UV-lejano en ausencia (-) y en presencia de lactosa (Lac) 0.1 M o 3'-sialil-lactosa (3'SL) 1 mM

Galectina	Posición del mínimo (nm)			Mínimo de elipticidad por mol de molécula $\cdot 10^{-5}$ (dg \cdot cm 2 \cdot dmol $^{-1}$)			Variación de elipticidad +/- ligando
	-	Lac	3'SL	-	Lac	3'SL	
hG4	217,4	217,5		-25,3	-22,6		2,7
hG4V	217,4	217,1		-25,8	-24,3		1,5
hG4-N	217,2	215,2		-10,5	-9,5		1,0
hG4-C	217,7	218,1		-13,5	-12,8		0,7
hG8	218	218	218,1	-30,8	-29,8	-21,6	1,0 / 9,2
hG8F19Y	218	218	218	-29,8	-29,8	-24,5	0,0 / 5,3
hG8-N	218	218	218,6	-15,2	-14,1	-13,4	1,1 / 1,8
hG8F19Y-N	218	218	220	-12,8	-14,9	-12,3	-2,1 / 0,5
hG8L	218	218	218	-30,3	-28,6	-30,4	1,7 / -0,1
hG1	215	215		-11,8 ^a	-11,8 ^a		0,0
hG3	217,4	219,2		-25,06	-23,7		1,36
hG3Tr	222,8	222,8		-13,8	-13,9		0,1

^a Valores de elipticidad por monómero de hG1

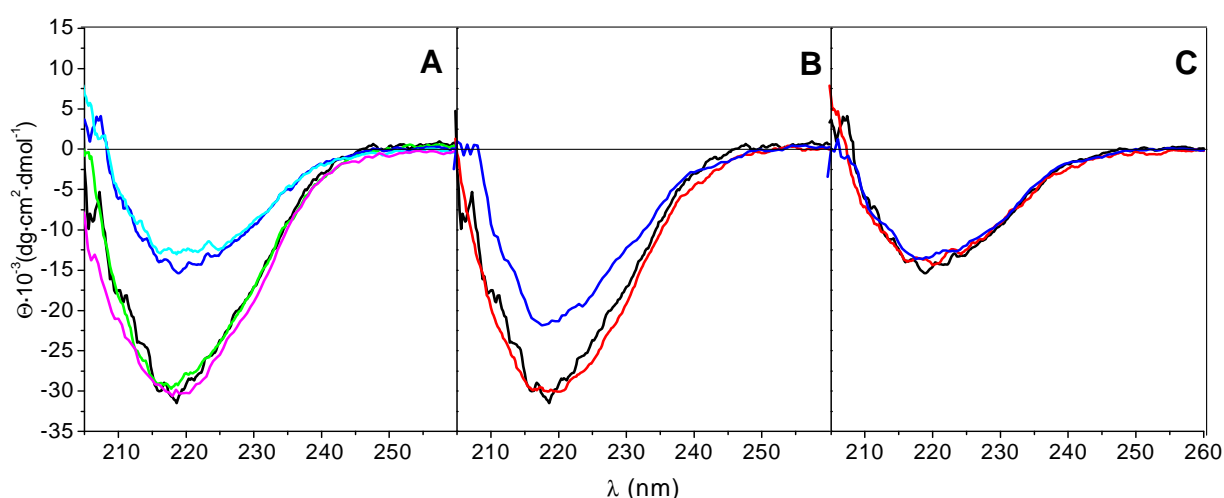


Figura 4.4. Espectros de DC en el UV-lejano, normalizados por mol de proteína, de hG8 (negro), hG8F18Y (verde), hG8L (rosa) hG8-N (azul) y hG8F19Y-N (cyan) en ausencia de ligando (A); hG8 en ausencia (negro) y en presencia de lactosa 0,1 M (rojo) o 3'-sialil-lactosa 1 mM (azul) (B); y hG8-N en ausencia de ligando (negro) y en presencia de lactosa 0,1 M (rojo) o 3'-sialil-lactosa 1 mM (azul) (C). Las medidas se realizaron a una concentración de proteína de 0,2 mg/ml en tampón PBS_β, a 20 °C.

La similitud en la posición de la banda, alrededor de 218 nm, e intensidad de la señal de elipticidad observada en los espectros de hG4 y hG8 pudiera hacer pensar que ésta es una constante para todas las galectinas. Sin embargo, cuando se comparan los espectros con los obtenidos para las galectinas 1 y 3 se observan claras diferencias. En concreto, para hG1 la banda negativa está centrada a 215 nm, mientras que en el caso de hG3 se sitúa a 220 nm y para hG3Tr, una variante truncada de la galectina-3 que contiene únicamente el CRD, a 224 nm (Figura 4.5). La intensidad de la señal para el monómero de hG1 es comparable a la que se observa para los dominios de las galectinas 4 y 8 aislados o para la galectina-3 truncada (Tabla 4.2). Es interesante destacar la importante contribución del dominio N-terminal de hG3 al espectro, que se hace evidente al comparar los espectros de hG3 y hG3Tr, lo que revela un alto contenido en estructura secundaria de esta parte de la proteína. En concreto, la diferencia entre ambos espectros indica que la región N-terminal debe presentar una banda de elipticidad negativa centrada alrededor de 210 nm. Por último, tanto para hG1 como para hG3 y hG3Tr, no se observan diferencias apreciables en los espectros obtenidos en ausencia o presencia de lactosa, como también ocurre en el caso de hG8 pero no para hG4.

En resumen, los espectros de DC en el UV-lejano de las galectinas estudiadas demuestran la existencia de pequeñas diferencias tanto entre las diferentes galectinas, como entre los CRDs de una misma galectina, que pueden ser atribuibles a variaciones en la longitud y/o número de hebras en las láminas β , orientación relativa de las láminas en el sándwich β , longitud de los lazos, etc. Del mismo modo, la unión de ligandos tiene efectos diferentes dependiendo de la galectina y también del ligando.

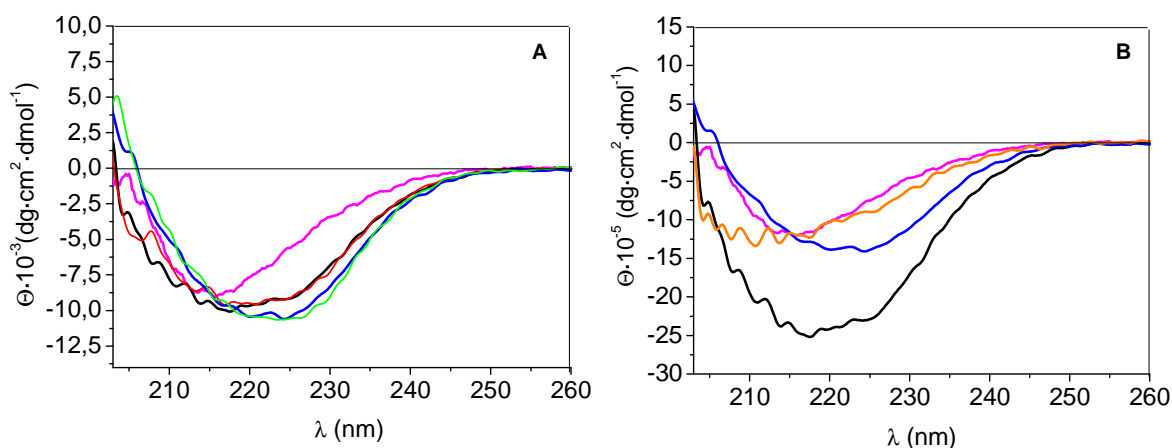


Figura 4.5. Espectros de DC en el UV-lejano de hG3 en ausencia (negro) y en presencia (rojo) de lactosa 0,1 M y de hG3Tr en ausencia (azul) y en presencia (verde) de lactosa 0,1 M, en comparación con hG1 libre (rosa) normalizados por mol de residuo (A) y por mol de proteína (B). El espectro de diferencia entre hG3 y hG3Tr se muestra en naranja. Las medidas se realizaron a una concentración de proteína de 0,2 mg/ml en tampón PBS_p, a 20 °C.

4.2.2. Análisis de la estructura terciaria

El entorno de los aminoácidos aromáticos en la estructura terciaria de las galectinas y los posibles cambios inducidos por la unión de ligandos se han investigado por DC en el UV-cercano. De nuevo, la comparación de los espectros revela tanto similitudes como diferencias entre las galectinas estudiadas.

En el caso de hG4, el espectro presenta una banda de elipticidad negativa centrada alrededor de 273 nm, posiblemente asignable a tirosinas, y una región de elipticidad positiva, desde 277 nm a 305 nm, con un hombro a 283 nm y un claro máximo a 289-291 nm, atribuible a triptófano (Figura 4.6A).

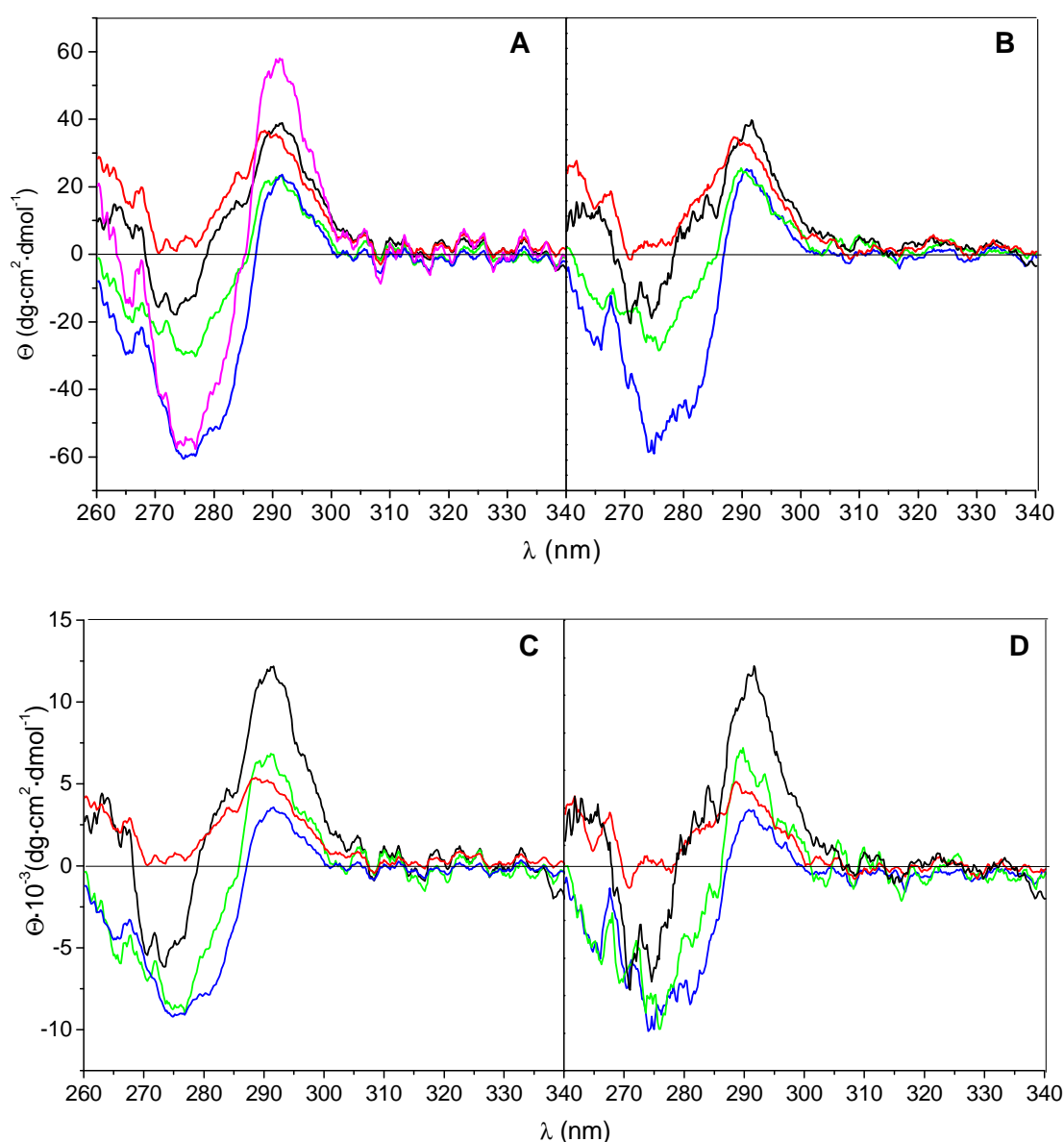


Figura 4.6. Espectros de DC en el UV-cercano de hG4 (negro), hG4V (verde), hG4-N (azul) y hG4-C (rojo) y suma de los espectros de los dominios N- y C-terminales (rosa) en ausencia (A,C) y en presencia (B,D) de lactosa 0,1 M, normalizados por mol de residuo (A,B) y por mol de proteína (C,D). Las medidas se realizaron a una concentración de proteína de 1 mg/ml, en tampón PBS_β, a 20 °C.

La elipticidad en ambas regiones, negativa y positiva, varía significativamente en hG4V, observándose además un desplazamiento de 3 nm en la posición del mínimo (Tabla 4.3) y un cambio de signo en la elipticidad entre 260 y 270 nm, posiblemente debido a una variación en el entorno de fenilalaninas.

Tabla 4.3. Características de los espectros de DC en el UV-cercano en ausencia (-) y en presencia de lactosa (Lac) 0,1 M o 3'-sialil-lactosa (3'SL) 1 mM										
Galectina	Mínimo				Máximo					
	Posición (nm)		Elipticidad por mol de molécula $\cdot 10^{-3}$ ($\text{dg}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{dmol}^{-1}$)		Posición (nm)			Elipticidad por mol de molécula $\cdot 10^{-3}$ ($\text{dg}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{dmol}^{-1}$)		
	-	Lac	-	Lac	-	Lac	3'SL	-	Lac	3'SL
hG4	273	271	-5,4	-8,34	291	291		12,5	14,1	
hG4V	276	275	-8,6	-10,1	289	289		6,67	7,7	
hG4-N	275	275	-9,1	-10,3	291	291		3,5	4,1	
hG4-C	273	271	0,33	-0,81	289	288		5,3	5,8	
hG8*					272 291	273 291	272 290	14,5 9,1	15,5 14,8	20,2 14,8
hG8F19Y*					274 291	274 291	272 290	12,2 8,0	13,9 13,6	17,2 14,9
hG8-N*					272 291	276 290	274 290	7,2 4,2	8,8 6,9	11,4 8,6
hG8F19Y-N*					274 292	274 292	273 290	6,4 4,3	8,0 6,8	10,2 9,1
hG8L*					276 290	275 290	275 290	8,4 6,6	11,8 11,0	15,1 10,4
hG1*					275 290	276 290		11,9 6,6	9,7 8,1	
hG3	276	275	-5,1	-6,8	292	293		3,9	4,3	
hG3Tr					293	290		2,4	3,9	

*Se dan los valores correspondientes al máximo de elipticidad a ~275 y ~290 nm.

Teniendo en cuenta que la única diferencia entre hG4V y hG4, en cuanto a contenido en aminoácidos aromáticos se refiere, es la ausencia de una tirosina, los espectros obtenidos parecen indicar que la eliminación de parte del péptido conector altera el entorno de fenilalaninas, tirosinas y triptófanos dentro de la estructura terciaria de la proteína. Al comparar el espectro de hG4V con el de los CRDs aislados, normalizados por mol de proteína (Figura 4.6C), se observa que la banda de elipticidad negativa en el mutante es

similar a la del dominio N-terminal aislado, mientras que la elipticidad del dominio C-terminal en esta región es igual o superior a cero. Esta diferencia en los espectros de ambos dominios puede estar relacionada con el menor contenido en Phe+Tyr de hG4-C (11+4) frente a hG4-N (12+9). Por otra parte, todas las proteínas muestran una banda positiva alrededor de 290 nm, atribuible a Trp, cuya intensidad decrece en el orden hG4>hG4V>hG4-C>hG4-N. hG4-C, en concreto, sólo contiene un residuo de triptófano localizado en el sitio de unión, por lo que cabría esperar que la banda a 289 nm sea sensible a la presencia de lactosa. De hecho, así ocurre no sólo para hG4-C sino para todas las proteínas, aumentando la elipticidad en un 9-17%, según los casos (Tabla 4.3). Asimismo, los espectros presentan un aumento de la elipticidad negativa en la región de 270-275 nm en presencia de lactosa, con un llamativo aumento en la estructura fina de fenilalaninas y especialmente tirosinas, lo que indica que ambos dominios son muy sensibles a la unión del ligando.

Los espectros de DC en el UV-cercano de hG8 se caracterizan por una amplia región positiva entre 260 y 300 nm sobre la que se observan diversos picos, a 264, 272, 282 y 291 nm, debidos a la estructura fina de fenilalaninas, tirosinas y triptófanos (Figura 4.7). El espectro es sensible a la sustitución de la fenilalanina 19 por tirosina, disminuyendo en diferentes grados la intensidad de los picos a 264-282 nm, mientras que el pico a 291 nm permanece prácticamente invariable. Comparando los espectros de hG8 y hG8F19Y con los de sus correspondientes dominios N-terminales, normalizados por mol de proteína (Figura 4.7C,D), se observa que para los dominios hay una menor definición de la estructura fina entre 264 y 282 nm. Por otra parte, el espectro de hG8L es también diferente, presentando picos a 265, 270, ~ 280 y 290 nm (Figura 4.7A,C) y una intensidad de la señal menor que la observada para hG8 y hG8F19Y, y más semejante a la obtenida para los dominios N-terminales aislados (Figura 4.7C,D).

En presencia de lactosa, se observa un aumento significativo en la intensidad de los picos a 282 y 291 nm, tanto para hG8 y hG8F19Y como para los dominios aislados (Tabla 4.3), mientras que el aumento de los picos a 264 y 272 nm es mucho menor o incluso nulo (Figura 4.8). Sin embargo, sí se observa un aumento importante en esta zona para hG8L (Tabla 4.3), lo que en principio sugiere que la unión de lactosa induce una pérdida general de flexibilidad y/o dinámica interna de esta proteína, aparentemente asociada a la mayor longitud del péptido conector.

Del mismo modo, en presencia de 3'-sialil-lactosa se produce un aumento de elipticidad en todo el espectro para todas las variantes y dominios, sensiblemente mayor que el inducido por la unión de lactosa. La única excepción es el pico a 291 nm en el espectro de las proteínas completas: tanto para hG8 y hG8F19Y como para hG8L la señal de esta banda aumenta de modo parecido con la unión de lactosa y sialil-lactosa (Tabla 4.3).

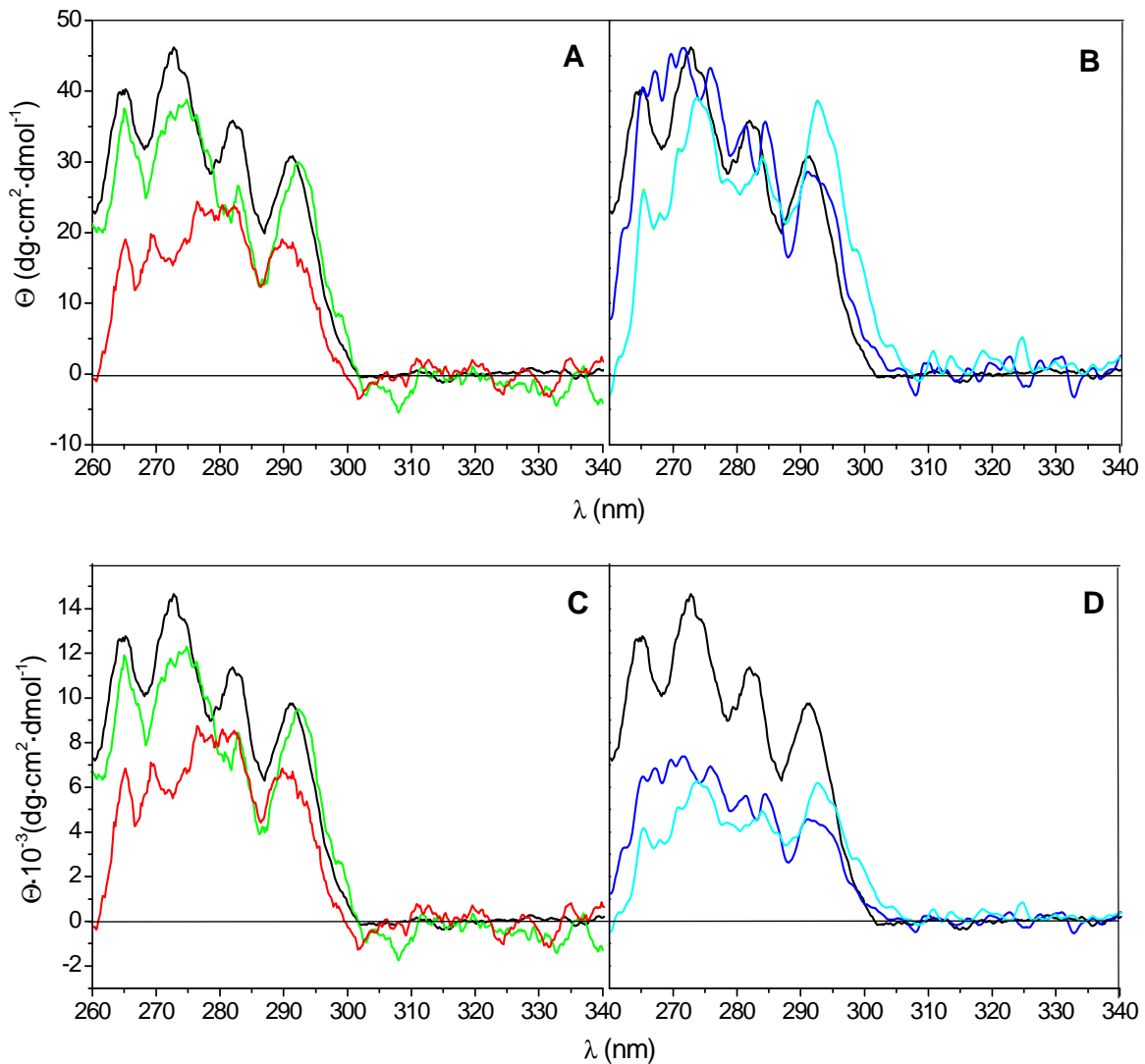


Figura 4.7. Espectros de DC en el UV-cercano de hG8 (negro), hG8F19Y (verde) y hG8L (rojo), y los dominios hG8N (azul) y hG8F19YN (cian) normalizados por mol de residuo (A,B) y por mol de proteína (C,D). Los espectros se obtuvieron a una concentración de 1 mg/ml en PBS_β y a 20 °C.

Sin embargo, en el caso de los dominios N-terminales aislados, el aumento de la señal de esta banda en presencia de 3'-sialil-lactosa es significativamente mayor que en presencia de lactosa. Este resultado pone claramente de manifiesto que el dominio N-terminal de la galectina-8 une la lactosa sializada (Figura 4.8B,D).

Es interesante comparar los espectros de las galectinas 4 y 8, los cuales muestran características claramente diferentes, con los de las galectinas 1 y 3, pertenecientes a los otros dos grupos estructurales de las galectinas.

En el caso de hG1, el espectro muestra una amplia región de elipticidad positiva entre 260 y 300 nm, con abundante estructura fina (Figura 4.9A), semejante a la observada para hG8.

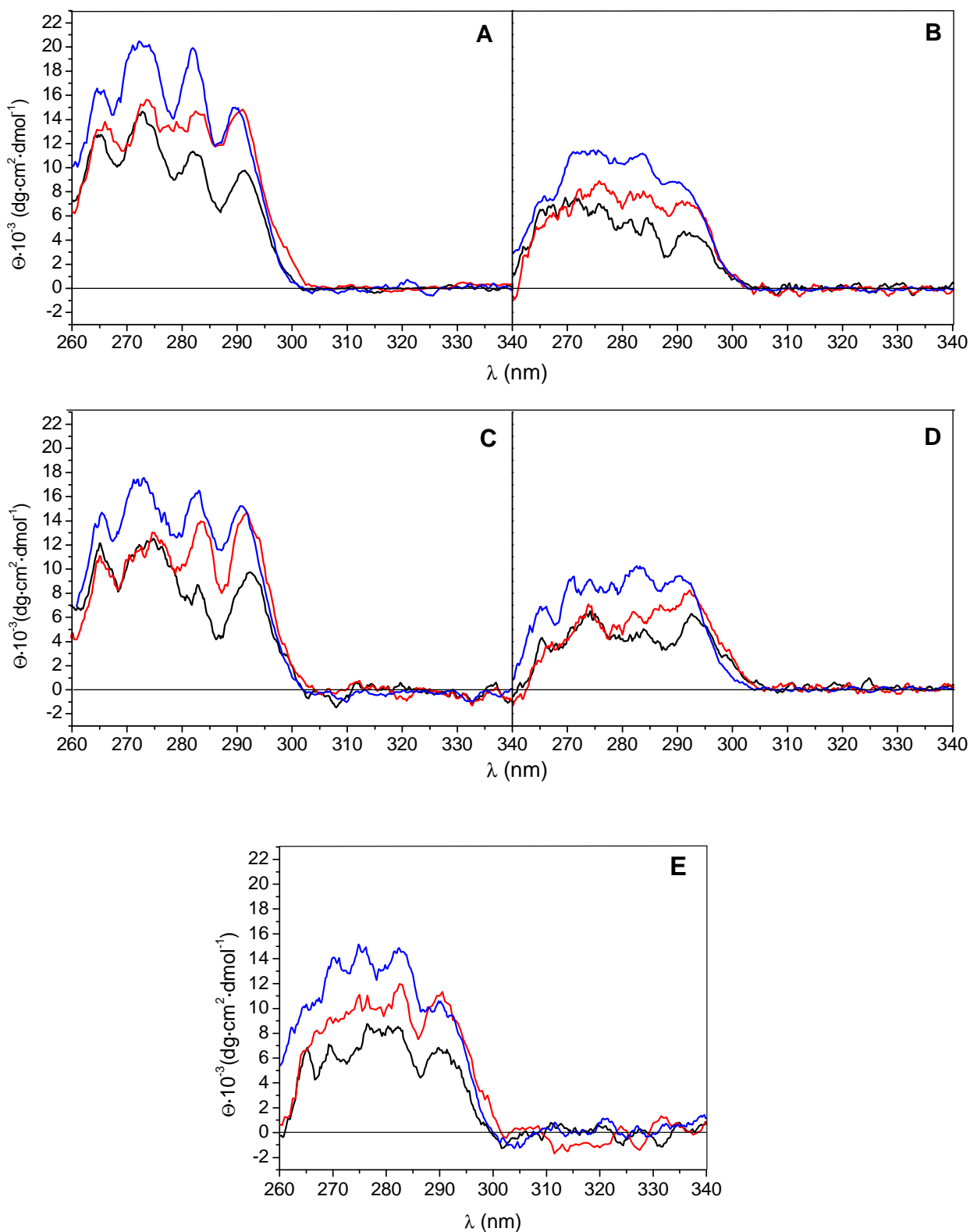


Figura 4.8. Espectros de DC en el UV-cercano, normalizados por mol de proteína, de hG8 (A), hG8-N (B), hG8F19Y (C), hG8F19Y-N (D) y hG8L (E). Los espectros se obtuvieron a una concentración de 1 mg/ml en PBS_β a 20 °C, en ausencia de ligando (negro) y en presencia de lactosa 0,1 M (rojo) o 3'SL 1 mM (azul).

En presencia de lactosa, la señal a 290 nm, atribuible al único triptófano que contiene esta proteína y que está localizado en el sitio de unión, aumenta. Sin embargo, la elipticidad a

284 nm apenas varía con la unión del ligando, mientras la intensidad de las bandas en la región de las fenilalaninas (260-280 nm) disminuye de manera significativa. Esta disminución sugiere que el núcleo hidrofóbico del sándwich β , en el cual todos los residuos de fenilalanina de hG1 están acomodados, es muy sensible a la unión del ligando.

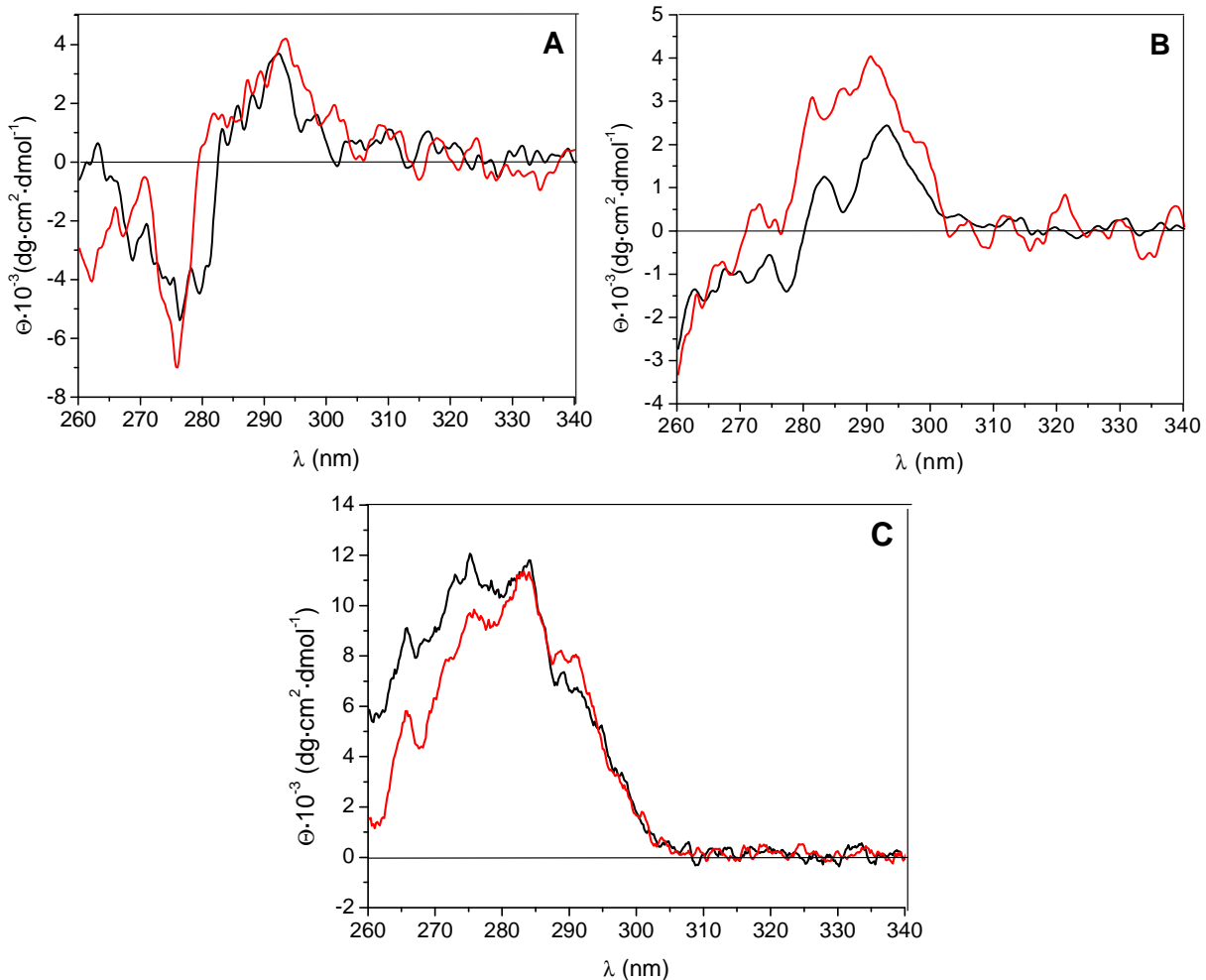


Figura 4.9. Espectros de DC en el UV-cercano de hG3 (A) y hG3Tr (B) hG1 (C) en ausencia (negro) y en presencia (rojo) de lactosa 0,1 M, normalizados por mol de proteína. Las medidas se realizaron a una concentración de 1 mg/ml, en tampón PBS_p a 20 °C.

En el caso de hG3, sin embargo, el espectro se caracteriza por una región positiva entre 283 y 300 nm y otra negativa, entre 260 y 283 nm (Figura 4.9B), como ocurre para hG4. Esta región negativa está estrechamente relacionada con la presencia del dominio N-terminal, ya que su intensidad es mucho menor en la variante truncada (hG3Tr) (Tabla 4.3 y Figura 4.9C). De hecho, el espectro de hG3Tr está dominado por una amplia región de elipticidad positiva entre 280 y 300 nm, con diferentes picos atribuibles a la estructura fina de tirosinas y del único triptófano. En presencia de lactosa, la intensidad de la señal en esta región aumenta notablemente, lo que sugiere que se produce una significativa reorganización del CRD para acomodar el ligando. En el caso de la proteína completa, sin embargo, los cambios son mucho menores y parecen afectar en mayor medida a la región de las

fenilalaninas, donde la elipticidad cambia de signo con la unión de lactosa. Teniendo en cuenta que esta zona del espectro de hG3Tr no se altera por la unión del ligando, los cambios observados en hG3 parecen ser atribuibles a la región N-terminal, y apuntan a la existencia de interacciones entre esta región y el CRD que se ven afectadas por la unión de lactosa. Y viceversa, como resultado de estas interacciones entre los dominios N- y C-terminales, los cambios inducidos en el CRD por la unión del ligando en la proteína completa son mucho menores que en el CRD aislado.

4.2.3. Estabilidad térmica

La estabilidad térmica de las galectinas y los cambios inducidos en su estructura por la temperatura, en ausencia y en presencia de ligandos, han sido investigados por dicroísmo circular en el UV-lejano. Para todas las galectinas investigadas se observan variaciones en el espectro al aumentar la temperatura, que indican la pérdida de estructura β , si bien los cambios observados no son iguales para todas ellas (Figura 4.10).

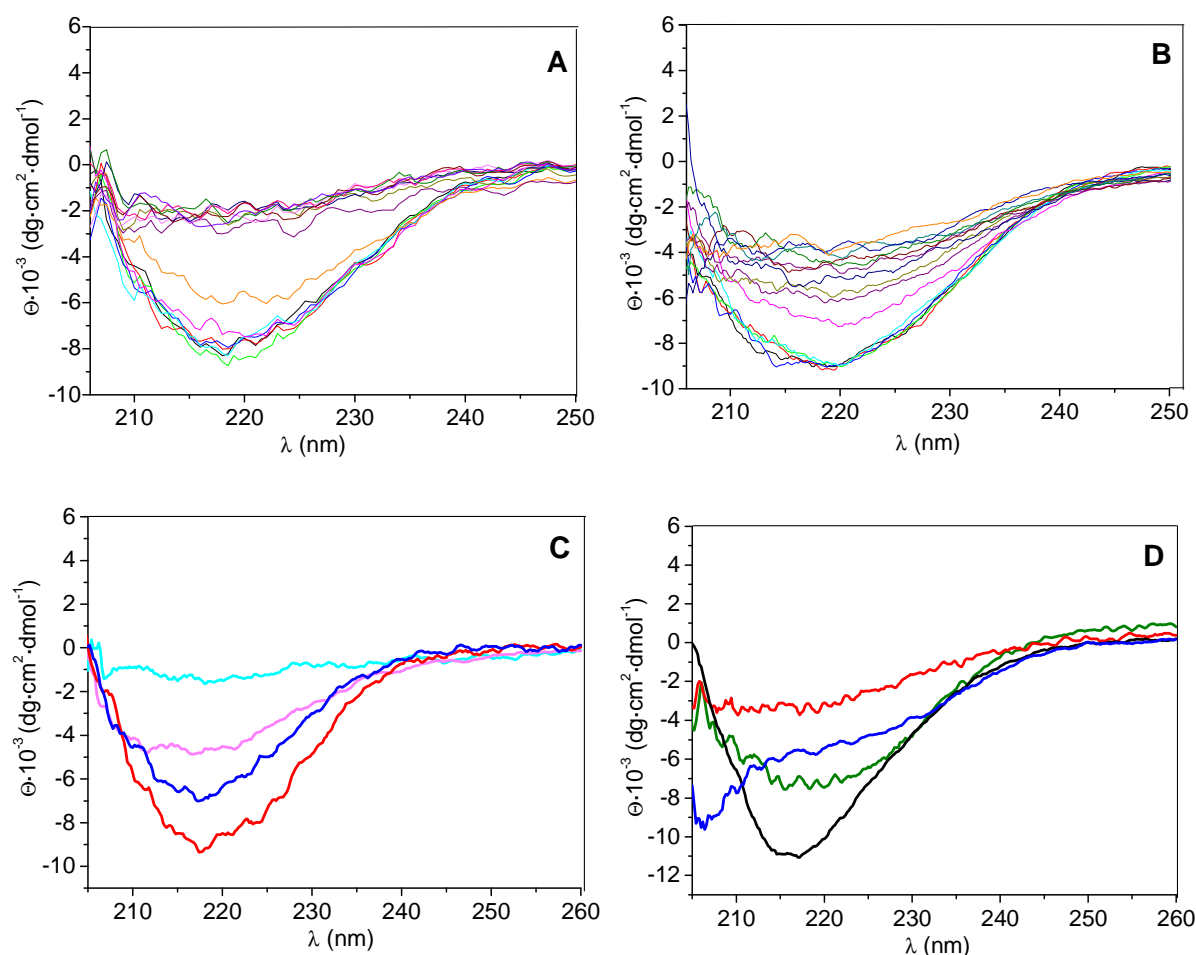


Figura 4.10. Cambios en el espectro de DC en el UV-lejano de hG8 (A) y hG8L (B) al aumentar la temperatura de 20 a 90 °C. Los espectros se recogieron cada 5 °C a una concentración de proteína de 0,2 mg/ml en tampón PBS $_{\beta}$. Los paneles C y D muestran los espectros obtenidos a 20 °C y 90 °C para los dominios hG4-N (azul y cyan), y hG4-C (rojo y rosa) (C) y para hG3 (verde y rojo) y hG1 (negro y azul) (D). Los espectros están normalizados por mol de residuo.

La desnaturalización de las galectinas 4 y 8 conduce en mayor o menor grado a su precipitación y los espectros muestran la consiguiente disminución en elipticidad negativa en la región de 205-240 nm, además de un desplazamiento en el mínimo de la banda que indica la aparición de estructura al azar (Figura 4.10A) (Whitmore y Wallace, 2008; Charalambous *et al.*, 2009). Este mismo comportamiento se observa para los CRDs N-terminales aislados de ambas galectinas. Sin embargo, en el caso de hG4-C, la proteína desnaturalizada presenta todavía un 40% de elipticidad, aunque el mínimo se desplaza 3 nm con respecto a la proteína nativa, lo que sugiere que en este caso se conserva parte de la estructura β (Figura 4.10C).

HG3 muestra un comportamiento similar al de hG4 y hG8, tanto en la forma nativa como en la troncada, con disminución drástica de elipticidad y precipitación de la proteína tras la desnaturalización térmica (Figura 4.10D). Por el contrario, hG1 se diferencia de las demás galectinas ya que la proteína desnaturalizada no precipita, el espectro revela claramente la aparición de estructura al azar y la desnaturalización es reversible parcialmente al disminuir de nuevo la temperatura.

Midiendo la variación de elipticidad a una longitud de onda determinada con el aumento de temperatura, es posible examinar los perfiles de desnaturalización para cada galectina y estimar la temperatura aparente de la transición ($T_{1/2}$), definida como la temperatura a la que la intensidad de los espectros decae a la mitad de sus valores iniciales. En general, los perfiles revelan que la desnaturalización se produce en una sola etapa, excepto en el caso de hG8L que sigue un proceso bifásico. En la Tabla 4.4 se recogen las temperaturas aparentes de transición para las diferentes galectinas y en la Figura 4.11 se muestra el perfil de desnaturalización de hG4 (Figura 4.11A), representativo de los perfiles monofásicos, comparado con el de hG8L (Figura 4.11B).

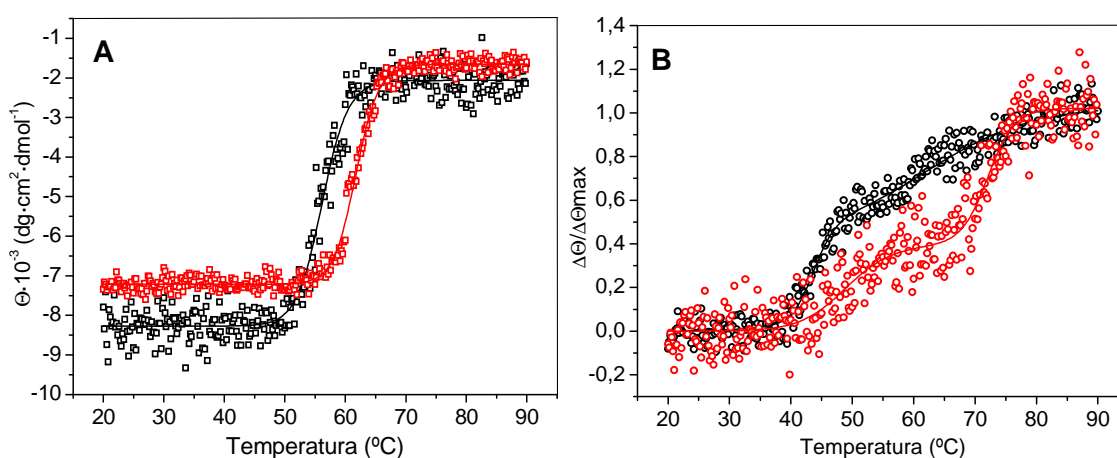


Figura 4.11. Perfiles de desnaturalización térmica de hG4 (A) y hG8L (B) en ausencia (negro) y en presencia de lactosa 0,1 M (rojo) obtenidos registrando la variación de elipticidad a 215 nm, a una concentración de proteína de 0,2 mg/ml en tampón PBS β . Las líneas continuas corresponden a los perfiles teóricos calculados mediante el ajuste de los datos experimentales a un modelo de una sola transición (A) o de dos transiciones independientes (B).

Como se aprecia claramente en los espectros registrados a temperaturas crecientes, la pérdida de estructura asociada a la desnaturalización térmica de hG8L (Figura 4.10B) se produce de forma mucho más progresiva que para las demás galectinas, lo que es debido a la existencia de dos transiciones diferentes, con $T_{1/2}$ de 43,8 y 62,7 °C, respectivamente (Tabla 4.4). Estas dos transiciones podrían asignarse en principio a los dos CRDs diferentes que contiene esta galectina. Sin embargo, en el caso de hG8, hG4 o hG4V, en las que la longitud del péptido conector es menor, sólo se observa una transición, lo que indica que la desnaturalización de los dos dominios no se produce de forma independiente en estos casos.

Como se puede observar en la Tabla 4.4, hG4, hG4V y hG4-N presentan temperaturas de transición parecidas, mientras que el dominio C-terminal es menos estable. Sin embargo, la desnaturalización de este dominio tiene lugar en un intervalo de temperatura más amplio que en el caso del dominio N-terminal y especialmente de la proteína completa; es decir, la pendiente del perfil de desnaturalización es menor, como se recoge en la Tabla 4.4, lo que indica una menor cooperatividad en la desnaturalización. Por su parte, la estabilidad térmica de hG8 es significativamente menor que la de hG4, siendo el dominio N-terminal aislado algo más estable que la proteína completa. Sorprendentemente, el mutante hG8F19Y es más estable que la proteína salvaje, lo que no ocurre para el dominio N-terminal del mutante con respecto a hG8-N.

Tabla 4.4. Temperatura de transición y cooperatividad del proceso de desnaturalización térmica de las galectinas en ausencia (-) y en presencia de lactosa (Lac) 0,1 M o 3'-sialil-lactosa (3'SL) 1 mM						
Galectina	$T_{1/2}$			Pendiente (HD) x 10 ⁻¹		
	-	Lac	3'SL	-	Lac	3'SL
hG4	56,1 ± 0,1	61,7 ± 0,1		10 ± 0,4	11 ± 0,3	
hG4V	56,1 ± 0,1	62,3 ± 0,1		10 ± 0,5	12 ± 0,6	
hG4-N	56,6 ± 0,1	62,5 ± 0,1		7 ± 0,3	9 ± 0,5	
hG4-C	52,3 ± 0,2	59,6 ± 0,2		4 ± 0,2	5 ± 0,2	
hG8	51,4 ± 0,1	60,6 ± 0,06	55,6 ± 0,1	13 ± 0,6	18 ± 1	10 ± 0,7
hG8-N	53,4 ± 0,1	62,5 ± 0,1	64,0 ± 0,1	11 ± 0,6	15 ± 0,8	20 ± 2
hG8F19Y	53,9 ± 0,1	61,3 ± 0,06	58,3 ± 0,07	9 ± 0,4	15 ± 0,6	12 ± 0,4
hG8F19Y-N	53 ± 0,1	62,5 ± 0,1	63,7 ± 0,1	10 ± 0,6	14 ± 0,9	14 ± 0,9
hG8L	*43,8 ± 0,2 **62,7 ± 1,3	*55,2 ± 0,55 **69,2 ± 0,45	*49 ± 0,8 **72,1 ± 0,3	*11 ± 1,7 **2 ± 0,3	*8 ± 0,9 **9 ± 1,2	*15 ± 0,9 **10 ± 1,5
hG1	71,1 ± 0,2	78,5 ± 0,1		6,4 ± 0,2	8 ± 4	
hG3	61,6 ± 0,06	71,8 ± 0,07		17 ± 0,7	19 ± 1	
hG3Tr	65,8 ± 0,04	74,5 ± 0,02		19 ± 0,6	20 ± 1,6	

*/**, temperatura de transición/pendiente de la primera (*) y segunda (**) fase de desnaturalización

En general, la estabilidad de las diferentes variantes y dominios de las dos galectinas de tipo tándem-repetido es claramente inferior a la de la galectina-3, tanto la proteína completa como la variante truncada, y, muy especialmente, de la galectina-1, la más estable de todas las estudiadas. Es interesante destacar que la variante truncada de la galectina-3, hG3Tr es más estable que la proteína completa, con una diferencia en la $T_{1/2}$ de 4,2 °C, lo que indica que la región N-terminal disminuye la estabilidad de la proteína frente a la temperatura.

La estabilidad de todas las galectinas estudiadas aumenta en mayor o menor grado en presencia de lactosa, lo que está de acuerdo con que sólo las proteínas nativas, y no las desnaturalizadas, son capaces de unir este ligando. El aumento de estabilidad es en general mayor para las diferentes formas de la galectina-8 estudiadas que para las de la galectina-4, lo que podría ser consecuencia de una mayor afinidad de la galectina-8 por la lactosa, y/o reflejar diferencias en los cambios estructurales inducidos por unión del ligando. Para la galectina-8 se observa también un aumento de la estabilidad en presencia 3'-sialil-lactosa 1 mM. El aumento es considerablemente mayor para el dominio N-terminal aislado que para la proteína completa, tanto en el caso de la galectina salvaje como para el mutante F19Y. De hecho, el aumento de estabilidad inducido por la unión de sialil-lactosa sobre hG8 y hG8F19Y es menor que el observado en presencia de lactosa, mientras que en el caso de los dominios ocurre lo contrario, lo que sugiere que es el dominio N-terminal el que une de forma predominante la lactosa sializada. Si además se compara el efecto de la sialil-lactosa sobre las dos transiciones que presenta hG8L, los resultados apuntan a que la segunda transición es debida a la desnaturalización del dominio N-terminal, mientras que la primera, mucho menos estabilizada por este ligando, podría asignarse a la desnaturalización del dominio C-terminal. Es decir, al igual que se observa para la galectina-4, el dominio N-terminal parece ser más estable frente a la temperatura que el C-terminal.

4.3. Estructura cuaternaria y comportamiento hidrodinámico

4.3.1. Equilibrio de sedimentación

El estado de asociación de las galectinas se analizó por ultracentrifugación analítica, mediante experimentos de equilibrio de sedimentación. Los resultados obtenidos indican una masa molecular aparente ($M_{w,app}$) compatible con la de un monómero (Tabla 4.5), si bien existe una cierta dependencia de $M_{w,app}$ con la velocidad (Figura 4.12), más acusada en el caso de hG8 y hG8-N, observándose valores menores a medida que la velocidad aumenta. Esta pauta revela la existencia de cierta heterogeneidad y tendencia a la autoasociación. Un comportamiento similar se observa en presencia de lactosa.

Tabla 4.5. Masa molecular obtenida por equilibrio de sedimentación para las diferentes galectinas en ausencia (-) y en presencia de lactosa (Lac) 0,1 M. Como referencia se muestra también la masa calculada a partir de la secuencia de aminoácidos

Galectina	$M_{w,app}$ (kDa)		Masa calculada (Da)
	-	Lac	
hG4	36,4 ± 1.0	35,1 ± 0.5	35.941,1
hG4V	35,4 ± 0.8	31,9 ± 1.2	33.123,8
hG4-N	18,1 ± 0.7	19,6 ± 0.5	16.987,3
hG4-C	19,0 ± 0.6	18,1 ± 0.6	16.080,3
hG8	33,1 ± 1.7	32,8 ± 1,4	35.676,9
hG8-N	22,5 ± 1,5	20,4 ± 1,7	18.063,1
hG8F19Y	36,4 ± 1,0	36,0 ± 1,5	35.692,4
hG8F19Y-N	20,5 ± 0,7	20,5 ± 2,1	18.079,3
hG1	27,3 ± 1,5	27,8 ± 1,3	14.583,1
hG3	25,7 ± 1,4	24,9 ± 0,9	26.152,0
hG3Tr	18,9 ± 0,4	16,5 ± 0,3	15.160,3

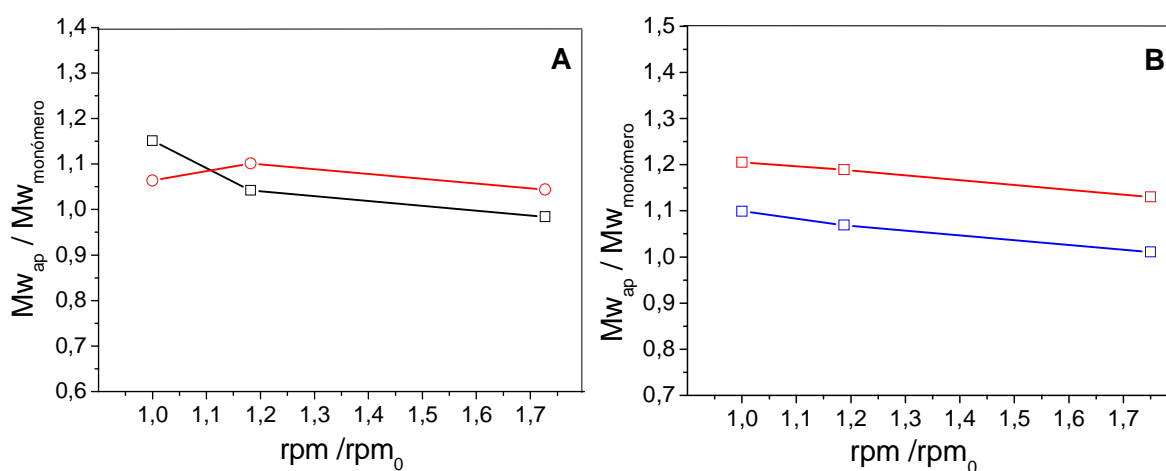


Figura 4.12. Influencia de la velocidad del rotor sobre la masa molecular aparente de hG4 (\square), hG4V (\circ) (A); hG4-N (\square) y hG4-C (\square) (B).

Por el contrario, para hG1 se obtiene una masa molecular promedio aparente correspondiente a un dímero, tanto en ausencia como en presencia de lactosa, en todo el rango de concentración de proteína estudiado e independientemente de la velocidad del rotor, mientras que hG3 y hG3Tr se comportan mayoritariamente como monómeros.

4.3.2. Cromatografía de filtración en gel

El comportamiento hidrodinámico de las galectinas se ha investigado en una primera aproximación por cromatografía de filtración en gel, utilizando una columna de Superosa 12 cuya matriz tiene como base un polímero de galactosa (agarosa). Por esta razón, los análisis se realizaron en presencia de lactosa 0,1 M, para impedir una posible interacción de las galectinas con la matriz. En la Tabla 4.6 se muestran los tiempos de elución obtenidos para las diferentes galectinas.

Galectina	Tiempo de elución (minutos)	Masa correspondiente al tiempo de elución (kDa)	Masa calculada (Da)
hG4	29.2 ± 0,3	18,3	35.941,1
hG4V	29.0 ± 0,4	18,8	33.123,8
hG4-N	30.7 ± 0,2	11,2	16.987,3
hG4-C	33.0 ± 0,5	5,6	16.080,3
hG8	27 ± 0,2	34,5	35.676,9
hG8-N	29,5 ± 0,1	18,5	18.063,1
hG8F19Y	27 ± 0,2	34,5	35.692,4
hG8F19Y-N	29,5 ± 0,1	18,5	18.079,3
hG1	27 ± 0,2	34,5	29.168,0
hG3	29,2 ± 0,1	18,3	26.152,0
hG3Tr	29,5 ± 0,1	18,5	15.160,3

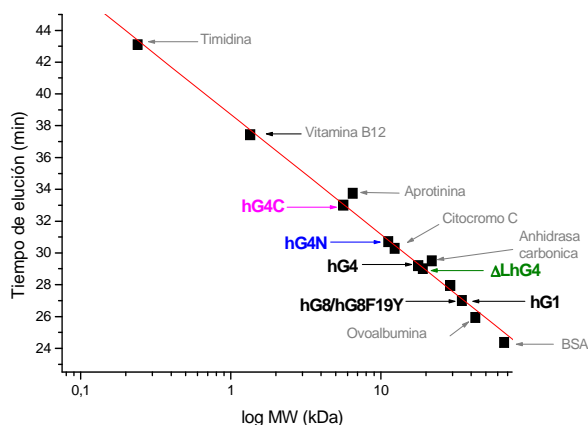


Figura 4.13. Calibrado de la columna de Superosa 12, utilizando como marcadores BSA (66 kDa), ovoalbúmina (42,7 kDa), anhidrasa carbónica (29 kDa), citocromo C (12,4 kDa), aprotinina (6,5 kDa), Vitamina B12 (1,35 kDa) y timidina (0,24 kDa). Se indican también los tiempos de elución de las galectinas estudiadas y la masa molecular correspondiente, según el calibrado, a dichos tiempos de elución.

HG4 y hG4V muestran un comportamiento atípico, eluyendo a tiempos mayores de los esperados. En concreto, ambas proteínas eluyen a un tiempo de ~29 minutos, el cual, según la recta patrón construida con diferentes proteínas globulares de masa molecular y radio de Stokes conocidos (Figura 4.13), correspondería a una proteína de ~18 kDa (Tabla 4.6). Por el contrario, hG1 eluye a un tiempo de 27,2 ± 0,1 minutos, el cual se corresponde con una masa molecular de aproximadamente 30 kDa, en perfecto acuerdo con la masa calculada para un homodímero a partir de la secuencia de aminoácidos y la determinada por equilibrio de sedimentación. Cuando se analiza el comportamiento de los dominios de hG4 aislados se observa que el dominio C-terminal eluye a un tiempo que correspondería al de una proteína globular de 5,65 kDa, mientras que la desviación observada en el caso de hG4-N es mucho menor (17,8 kDa). En conjunto, estos resultados sugieren que existe algún tipo de interacción del dominio C-terminal de hG4 con la resina, posiblemente no mediada por el sitio de unión a carbohidratos, que provoca un retraso en la elución de hG4-C y de las

proteínas completas hG4 y hG4V. Esta interacción del dominio C-terminal con la columna no parece darse en el caso de la galectina-8, ya que los tiempos de elución tanto de hG8 como de hG8F19Y se aproximan a los esperados para su masa molecular (34,6 kDa), como también ocurre para los correspondientes dominios N-terminales aislados.

Finalmente, cabe destacar que aunque el tiempo de elución del CRD de la galectina-3 (hG3Tr) es similar al observado para los dominios N-terminales de las galectinas 4 y especialmente 8, la proteína completa eluye a un tiempo claramente superior al esperado, lo que de nuevo sugiere la existencia de algún tipo de interacción de la región amino-terminal de esta proteína con la matriz.

En cualquier caso, los resultados obtenidos apuntan a que ninguna de las galectinas estudiadas, y en particular las dos galectinas de tipo tándem-repetido, presentan un radio de Stokes mucho mayor del esperado para proteínas globulares con la misma masa molecular, ya que ello estaría asociado con una disminución en el tiempo de elución. Con objeto de comprobar estas observaciones, el comportamiento hidrodinámico de las galectinas se ha investigado mediante experimentos de velocidad de sedimentación.

4.3.3. Velocidad de sedimentación

Los experimentos de velocidad de sedimentación se llevaron a cabo en ausencia y en presencia de lactosa 0,1 M, para examinar un posible efecto de la unión de este ligando en el comportamiento hidrodinámico de las proteínas. Todas las proteínas sedimentan como un único pico mayoritario (Figura 4.14) con el coeficiente de sedimentación que se indica en la Tabla 4.7. En algunos casos puede apreciarse también la presencia de especies minoritarias con mayor coeficiente de sedimentación, lo que confirma la existencia de cierta autoasociación. Los valores de s obtenidos para el pico mayoritario de hG4, hG4V, hG8 y hG8F19Y en ausencia de lactosa son muy similares y sólo ligeramente superiores al de hG1. Los dominios hG4-N y hG4-C presentan coeficientes de sedimentación similares entre sí y también al obtenido para el CRD aislado de hG3, dentro del error experimental, y algo menores que los obtenidos para el dominio N-terminal de hG8 y hG8F19Y, en consonancia con la mayor masa molecular de estos últimos. En presencia de lactosa, estas diferencias en los valores de s para los dominios se reducen, mientras que para las galectinas de tipo tándem-repetido completas los coeficientes siguen siendo similares entre sí. El efecto de la unión del ligando en el comportamiento de las proteínas se observa más claramente comparando los valores de $s_{20,w}^0$, una vez corregidos los efectos de densidad y viscosidad del solvente. En la mayoría de los casos, los valores de $s_{20,w}^0$ obtenidos en ausencia y en presencia de lactosa son iguales, dentro del error experimental. Sin embargo, para los dominios N y C de la galectina-4 se observa un aumento pequeño pero significativo en el valor de $s_{20,w}^0$ en presencia del ligando y lo mismo se observa en el caso de hG3. Esto indica

que las moléculas son más compactas, por lo que sedimentan más de prisa al tener menor fricción.

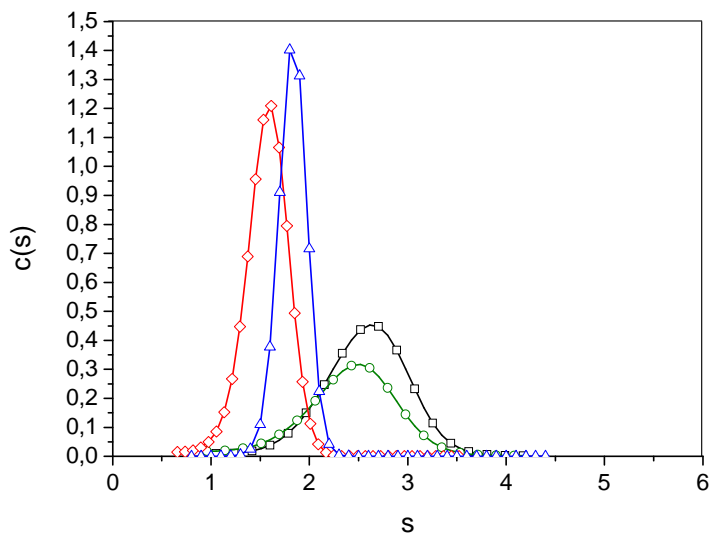


Figura 4.14. Perfiles de distribución de los coeficientes de sedimentación de hG4 (negro), hG4V (verde), hG4-N (azul) y hG4-C (rojo). Las medidas se realizaron a 20 °C y 45000 rpm en PBS_p.

Un comportamiento opuesto se observa para hG1, para la que el valor de $s_{20,w}^0$ disminuye ligeramente en presencia del ligando.

Tabla 4.7. Coeficientes de sedimentación obtenidos para las diferentes galectinas en ausencia (-) y en presencia de lactosa (Lac) 0,1 M				
Galectina	Coefficiente de sedimentación			
	PBS		PBS + Lac 0,1M	
	s	$s_{20,w}^0$	s	$s_{20,w}^0$
hG4	2,7 ± 0,1	2,8	2,3 ± 0,4	2,75
hG4V	2,6 ± 0,1	2,7	2,25 ± 0,1	2,7
hG4-N	1,80 ± 0,05	1,8	1,7 ± 0,1	2,0
hG4-C	1,70 ± 0,1	1,7	1,6 ± 0,06	1,9
hG8	2,6 ± 0,2	2,7	2,3 ± 0,1	2,6
hG8-N	1,92 ± 0,1	2,0	1,8 ± 0,1	2,1
hG8F19Y	2,65 ± 0,1	2,8	2,3 ± 0,35	2,75
hG8F19Y-N	1,98 ± 0,2	2,1	1,7 ± 0,1	2,1
hG1	2,5 ± 0,1	2,6	1,9 ± 0,1	2,4
hG3	2,09 ± 0,1	2,2	1,9 ± 0,23	2,4
hG3-Tr	1,68 ± 0,1	1,8	1,5 ± 0,4	1,8

A partir de $s_{20,w}^0$ y de la masa molecular de las proteínas, se ha calculado la relación entre el coeficiente de fricción experimental (f) y el coeficiente de fricción mínimo (f_0) para una partícula esférica, anhidra y compacta, con la masa de la galectina investigada (Tabla 4.8). Los valores de f/f_0 obtenidos para las galectinas 4 y 8 oscilan entre 1,3 y 1,42, lo que refleja

una forma elongada. Para los dominios aislados, los valores de f/f_0 obtenidos son menores, aproximándose al de una esfera, especialmente en el caso de hG8-N y hG8F19Y-N, mientras que para el homodímero de hG1 la relación es también de 1,3.

Tabla 4.8. Valores de f/f_0 obtenidos a partir de $s_{20,w}^0$ para las galectinas en ausencia (-) o presencia de lactosa (Lac) 0,1 M y aproximación de la forma de las proteínas a un elipsoide de revolución prolato u oblató. Los parámetros se han calculado utilizando el método de Teller.

Galectina	f/f_0		Dimensiones axiales											
			Modelo prolato						Modelo oblató					
	a/b		2a		2b		a/b		2a		2b			
	-	Lac	-	Lac	-	Lac	-	Lac	-	Lac	-	Lac	-	Lac
hG4	1,33	1,37	3,9	4,45	12,5	13,6	3,2	3,05	4,2	4,8	8,1	8,5	1,9	1,8
hG4V	1,3	1,32	3,55	3,8	11,4	11,9	3,2	3,1	3,75	4,0	7,6	7,8	2,0	1,9
hG4-N	1,24	1,12	2,8	1,15	7,7	4,3	2,8	3,7	2,9	1,15	5,6	4,1	1,94	3,6
hG4-C	1,27	1,15	3,1	1,45	8,2	4,9	2,6	3,4	3,25	1,46	5,7	4,35	1,75	3,0
hG8	1,37	1,42	4,07	4,70	12,9	14,2	3,17	3,02	4,35	5,11	8,27	8,73	1,90	1,70
hG8F19Y	1,34	1,36	3,76	3,94	12,3	12,6	3,26	3,21	3,99	4,20	8,05	8,18	2,01	1,94
hG8-N	1,12	1,07	2,95	2,24	7,14	5,93	2,41	2,65	3,08	2,29	5,04	4,57	1,63	1,99
hG8F19Y-N	1,09	1,04	2,52	2,57	6,44	6,51	2,54	2,53	2,60	2,65	4,77	4,80	1,83	1,81
hG1	1,3	1,65	3,2	7,7	10,3	18,6	3,2	2,4	5,4	9,1	7,1	9,9	2,1	1,08

A partir de estos valores es posible hacer una aproximación de la forma de la molécula a un elipsoide oblató o prolato, con las dimensiones axiales que se muestran en la Tabla 4.8. Es interesante observar que, en general e independientemente del modelo, el eje más corto (b) es muy similar para las diferentes galectinas, mientras que las diferencias son mucho mayores para el eje más largo (a), lo que sugiere que la forma hidrodinámica de todas ellas es semejante y difiere básicamente en la longitud de la molécula. La única excepción es la de hG4-N y hG4-C en presencia de lactosa, para las que los elipsoides serían menos elongados. Cabría esperar, por tanto, que las galectinas 4 y 8 presenten una estructura similar a la de hG1, aunque algo más alargada.

Dicho de otro modo, los resultados obtenidos en los experimentos de velocidad de sedimentación apuntan a que no hay una gran diferencia en la forma global de las galectinas 4 y 8 con respecto a la galectina-1, aparte de un aumento de la longitud proporcional a la masa. Ésta podría ser una característica general de las galectinas de tipo tándem-repetido.

4.4. Modelado de hG4 y hG4V mediante SAXS

La técnica de SAXS aporta una metodología poderosa para investigar la estructura de macromoléculas en solución y la organización de dominios en proteínas modulares, particularmente en aquellos casos en los que las estructuras a alta resolución de los dominios aislados permiten evaluar las soluciones más probables (Jacques y Trewella, 2010; Putnam *et al.*, 2007; Mertens y Svergun, 2010). En esta Tesis, se ha investigado mediante SAXS la forma de las envolturas moleculares y la disposición de los CRDs de hG4 y el mutante hG4V.

En las Figuras 4.15A y 4.17A se muestran los perfiles de dispersión de SAXS de hG4 y hG4V, respectivamente, obtenidos tanto en ausencia como en presencia de lactosa 0,1 M.

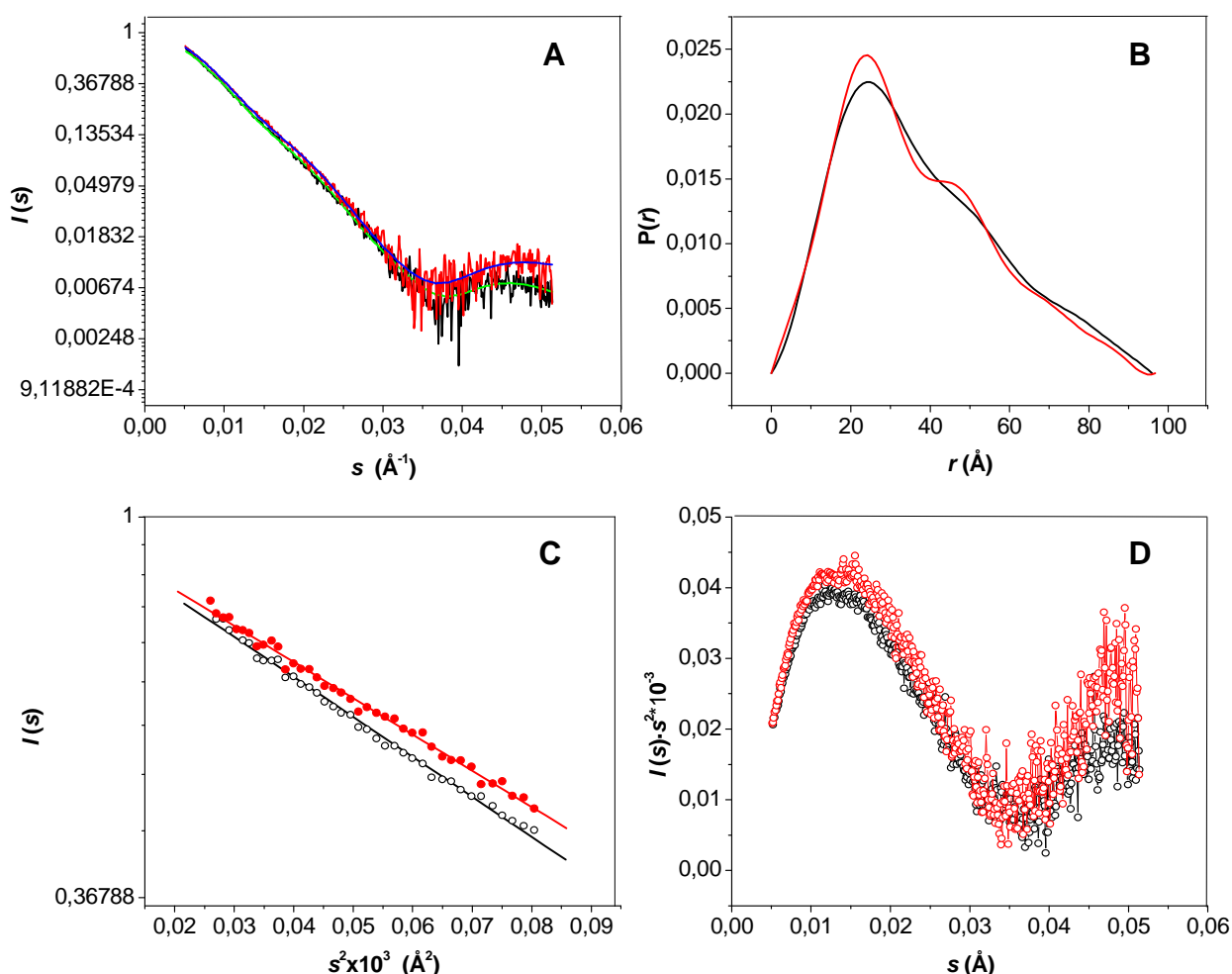


Figura 4.15. Perfiles de dispersión de SAXS de hG4 en ausencia (negro) y en presencia (rojo) de lactosa. **A)** Superposición de los perfiles de dispersión experimentales y los perfiles calculados para el modelo generado por BUNCH en ausencia (verde) y en presencia (azul) de lactosa; **B)** Distribución de pares de distancias obtenida con el programa AutoGNOM a partir de los datos de SAXS; **C)** Representación de Guinier; **D)** Representación gráfica de Kratky. Las medidas se realizaron a una concentración de proteína de 4-7 mg/ml.

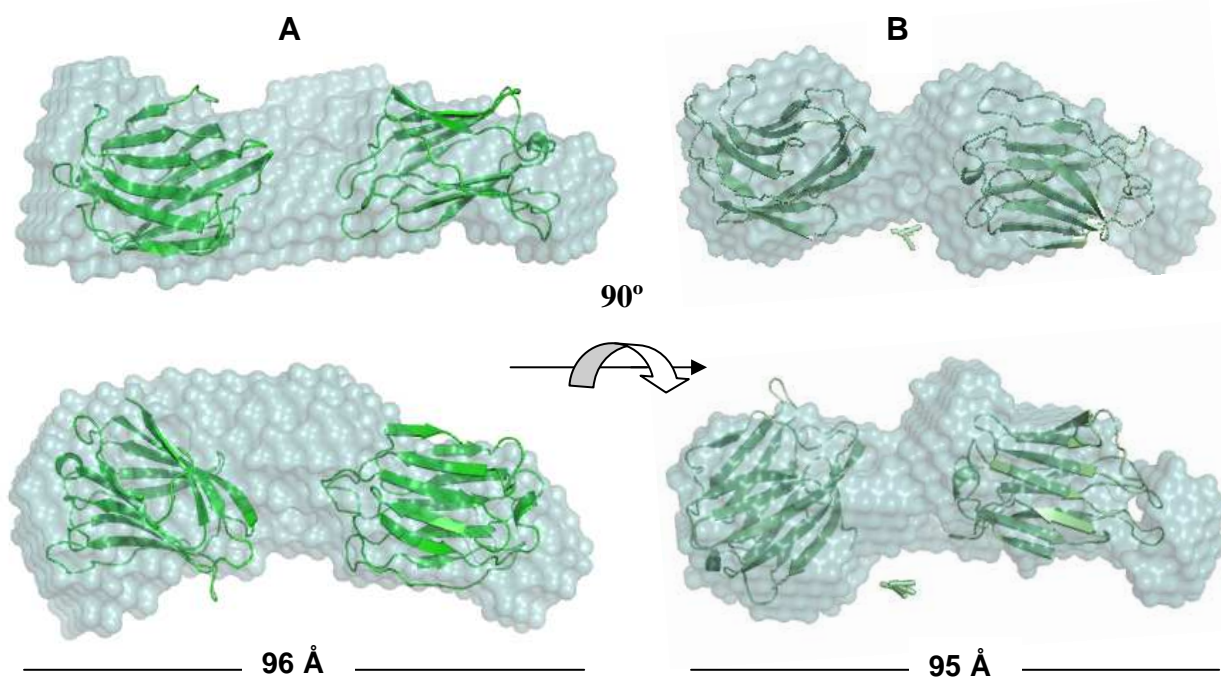


Figura 4.16. Modelo de esferas generado para hG4 con el programa DAMMIF a partir del perfil de dispersión normalizado de SAXS y acoplamiento del modelo generado por BUNCH, en ausencia (**A**) y en presencia de lactosa 0,1 M (**B**). Las distancias que se muestran en la parte inferior indican la longitud del modelo de esferas.

La linealidad de la representación de Guinier a ángulos bajos (Figuras 4.15C y 4.17C) es consistente con la ausencia de agregación e interferencias entre moléculas en las muestras, y las representaciones de Kratky (Figuras 4.15D y 4.17D) son características de proteínas con un plegamiento compacto. Los parámetros estructurales como radio de giro (R_g), distancia máxima intrapartícula (D_{max}) y volumen excluido o volumen de Porod (V), calculados con los programas incluidos en el paquete ATSAS (Konarev *et al.*, 2006), se muestran en la Tabla 4.9. Como demuestran sus volúmenes excluidos las dos variantes de la galectina 4 son monómeros en disolución, en concordancia con los resultados obtenidos por ultracentrifugación analítica (Tabla 4.5).

Tabla 4.9. Parámetros estructurales en solución de hG4 y hG4V obtenidos con los programas de evaluación automática AutoRg, AutoGNOM y AutoPOROD

Proteína	Lactosa	D_{max} (Å)	R_g (Å)		Volumen (Å ³)	Masa estimada (kDa)	Masa calculada (kDa)
			Guinier	GNOM			
hG4	-	95,9	28,3	29,7	53874	33,7	35,9
hG4	+	94,3	26,9	28,8	53870	33,7	
hG4V	-	80,2	23,1	23,5	52708	32,9	33,1
hG4V	+	82,2	23,2	23,9	48735	30,5	

La forma de las funciones de distribución de pares de distancias es típica de proteínas/partículas multidomínios (Mertens y Svergun, 2010) y muestra un máximo en torno

a 24-25 Å y dos hombros a distancias mayores, cuya definición aumenta ligeramente en presencia de lactosa (Figuras 4.15B y 4.17B). La unión de lactosa a hG4 induce, asimismo, una pequeña disminución en los valores de D_{max} y R_g (Figura 4.15B,C) consistente con una ligera compactación de la molécula tras la formación del complejo. Por otro lado, la ausencia de los primeros 26 aminoácidos del péptido conector en hG4V da lugar a una reducción significativa de R_g y D_{max} en comparación con hG4, como se muestra en la Tabla 4.9.

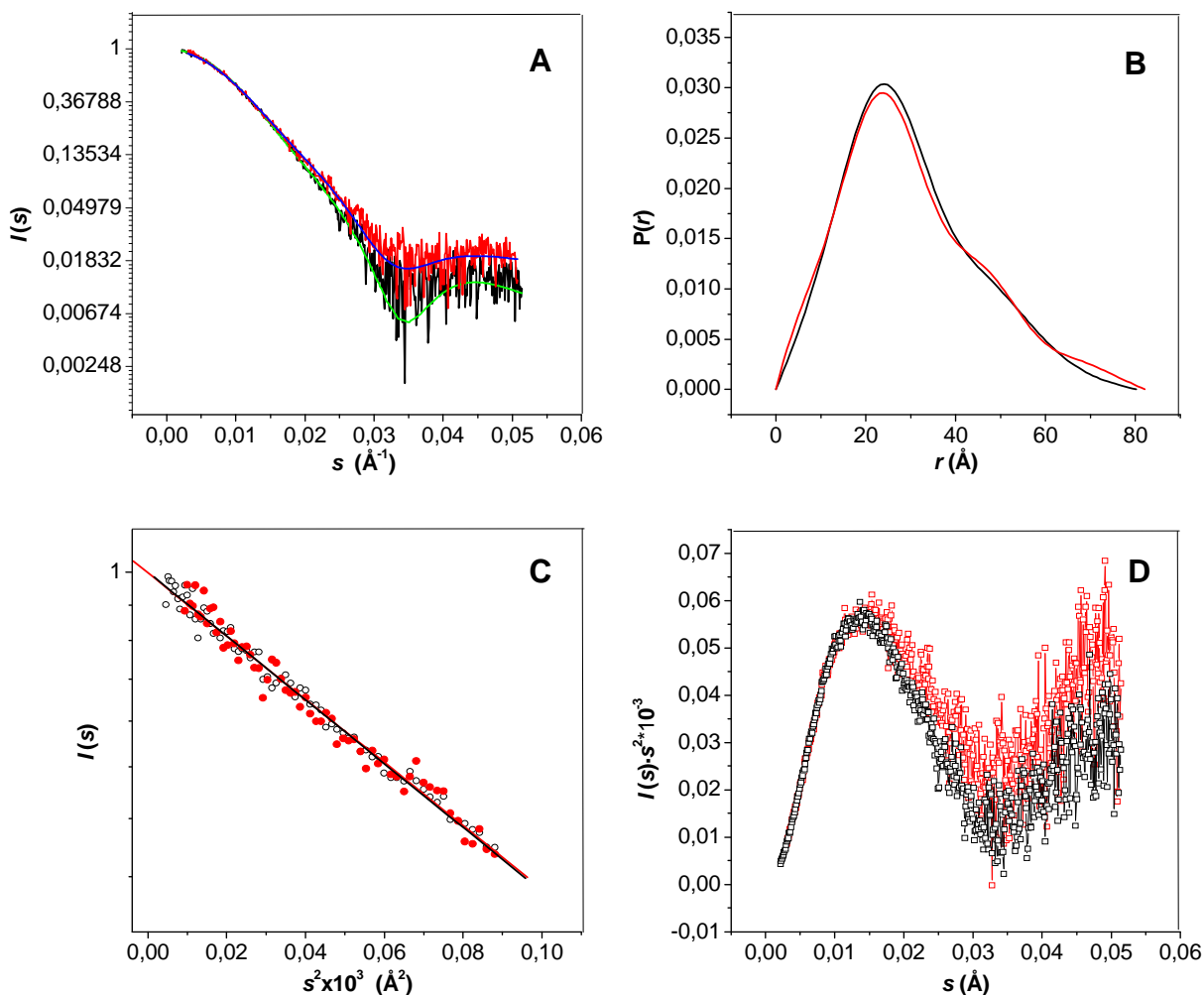


Figura 4.17. Perfiles de dispersión de SAXS de hG4V en ausencia (negro) y en presencia (rojo) de lactosa. **A)** Superposición de los perfiles de dispersión experimentales y los perfiles calculados para el modelo generado por BUNCH en ausencia (verde) y en presencia (azul) de lactosa; **B)** Distribución de pares de distancias obtenida con el programa AutoGNOM a partir de los datos de SAXS; **C)** Representación de Guinier; **D)** Representación gráfica de Kratky. Las medidas se realizaron a una concentración de proteína de 4-7 mg/ml.

Como primera aproximación a las estructuras de hG4 y hG4V, se generaron modelos de esferas *ab initio* basados en los datos de SAXS utilizando DAMMIF. Las envueltas moleculares de los modelos más probables están representadas en las Figuras 4.16 y 4.18, respectivamente. Los parámetros hidrodinámicos teóricos (radio de Stokes, R_s , y $s_{20,w}^0$) de

ambos modelos coinciden con los obtenidos por velocidad de sedimentación (Tabla 4.10), lo que apoya su fiabilidad.

Tabla 4.10. Parámetros estructurales e hidrodinámicos de los modelos basados en los datos de SAXS en comparación con los datos experimentales obtenidos por SAXS y los parámetros obtenidos por velocidad de sedimentación (vs)						
		SAXS		Modelos <i>ab initio</i> (DAMMIF)	Modelos a alta resolución (BUNCH)	VS
		Guinier	AutoGNOM	Hydro	Hydropro	
hG4						
R _g (Å)	28,3	29,7	28,6	28,3		
R _s (Å)			30,2	30,6		
D _{max} (Å)		95,9	96	94	125 ^a /81 ^b	
s (S)					2,7	
s ⁰ _{20,w} (S)			2,77	2,8	2,8	
hG4 + Lac						
R _g (Å)	27,5	28,8	28,1	27,2		
R _s (Å)			29,8	29,4		
D _{max} (Å)		94,3	95	96,3	136 ^a /85 ^b	
s (S)					2,3	
s ⁰ _{20,w} (S)			2,8	2,83	2,75	
hG4V						
R _g (Å)	23,1	23,5	22,9	22,7		
R _s			26,8	27,4		
D _{max} (Å)		80,2	80	78,4	114 ^a /76 ^b	
s (S)					2,6	
s ⁰ _{20,w} (S)			2,87	2,79	2,7	
hG4V + Lac						
R _g (Å)	23,2	23,9	24,0	24,1		
R _s			27,3	28,5		
D _{max} (Å)		82,2	81	82,2	119 ^a /78 ^b	
s (S)					2,25	
s ⁰ _{20,w} (S)			2,8	2,7	2,7	

^{a/b}, Longitud del eje más largo en un elipsoide de revolución prolato^a y oblató^b (Véase Tabla 4.8)

El modelo de hG4 muestra una molécula alargada, con una longitud aproximada de 96 Å (Figura 4.16A), lo que sugiere una disposición extendida de los dos CRDs, y la unión de lactosa parece incrementar la definición de ambos dominios (Figura 4.16B). Resultados similares se obtuvieron para hG4V, aunque el tamaño de la molécula es menor (~ 80 Å) (Figura 4.18), como era de esperar tras comparar la función de distribución de pares de distancias de hG4 y hG4V (Figuras 4.15B y 4.17B).

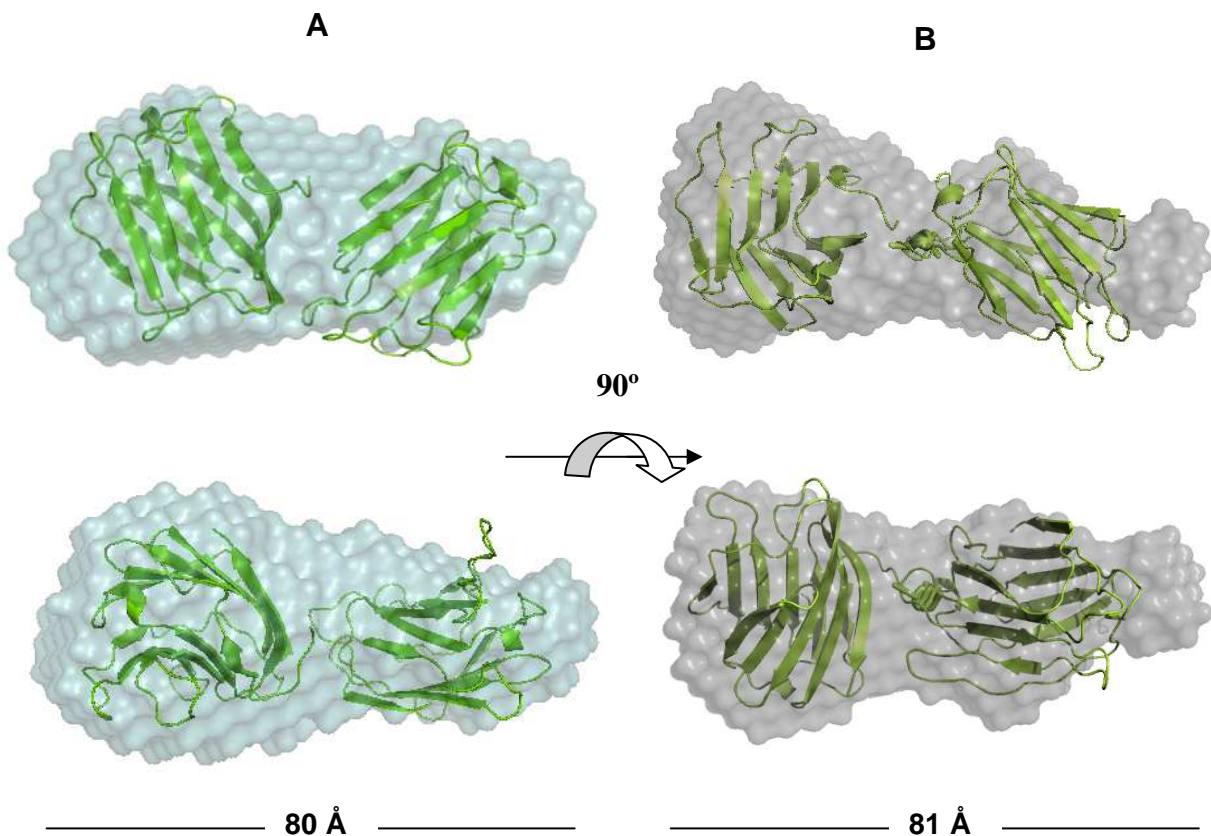


Figura 4.18. Modelo de esferas generado para hG4V con el programa DAMMIF a partir del perfil de dispersión normalizado de SAXS y acoplamiento del modelo generado por BUNCH, en ausencia (A) y en presencia de lactosa 0,1 M (B). Las distancias que se muestran en la parte inferior indican la longitud del modelo de esferas.

En paralelo con el modelado *ab initio*, se realizó un modelado utilizando las estructuras a alta resolución de hG4-N y hG4-C como cuerpos rígidos, con el objetivo de encontrar las posiciones y orientaciones relativas de los dominios y la posible configuración del péptido conector que mejor describen los datos experimentales de SAXS. El modelado se llevó a cabo con BUNCH (Petoukhov y Svergun, 2005) utilizando la estructura obtenida por RMN para el dominio C-terminal (PDB: 1X50) y los modelos construidos para hG4-N con Swiss-Model, empleando como molde las estructuras cristalográficas del dominio N-terminal de la galectina-4 de ratón (rG4) en ausencia (PDB: 2DYC) y en presencia de lactosa (PDB: 3I8T).

	1	10	20	30	40	50	60
hG4-N	AYVPAPGYQPTYNPTLPYYQPIPGGLNVGMSVYIQGVASEHMKRFFVNFVVGQDPGSDVA						
3I8T	AYVPAPGYQPTYNPTLPYKRPIPGGLSVGMSVYIQGMAKENRRFHVNFVAVGQDDGADVA						
Consensus	AYVPAPGYQPTYNPTLPYkrPIPGGLnVGMSVYIQGmAkEnRrRFhVNFaVGQDdGadVA						
	61	70	80	90	100	110	120
hG4-N	FHFNPRFDGMDKVVFNTHQGGKMGSEERKRSMPFKKGAFELVFIVLAEHYKAVVNGNPF						
3I8T	FHFNPRFDGMDKVVFNTHQSGQMGKEEKKKSMPFQKGFELVFHVMPPEHYKVVVNGNSF						
Consensus	FHFNPRFDGMDKVVFNTHQgGqMGKEEKrSMPFqKGaaFELVFIV\$aEHYKaVVNGNpF						
	121	130	140	151			
hG4-N	YEYGHRLPLQMYTHLQVGDGLQSQINFIIGG						
3I8T	YEYGHRLPVQMYTHLQVGDGLELQSQINFLGG						
Consensus	YEYGHRLPLQMYTHLQVGDGL#LQSQINFIIGG						

Figura 4.19. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos del dominio N-terminal de hG4 y rG4 (PDB 3I8T).

En las Figuras 4.19 y 4.20 se muestra el alineamiento de la secuencia de aminoácidos de hG4-N y rG4 y el modelo construido en presencia de lactosa, mostrando los residuos que forman el sitio de unión.

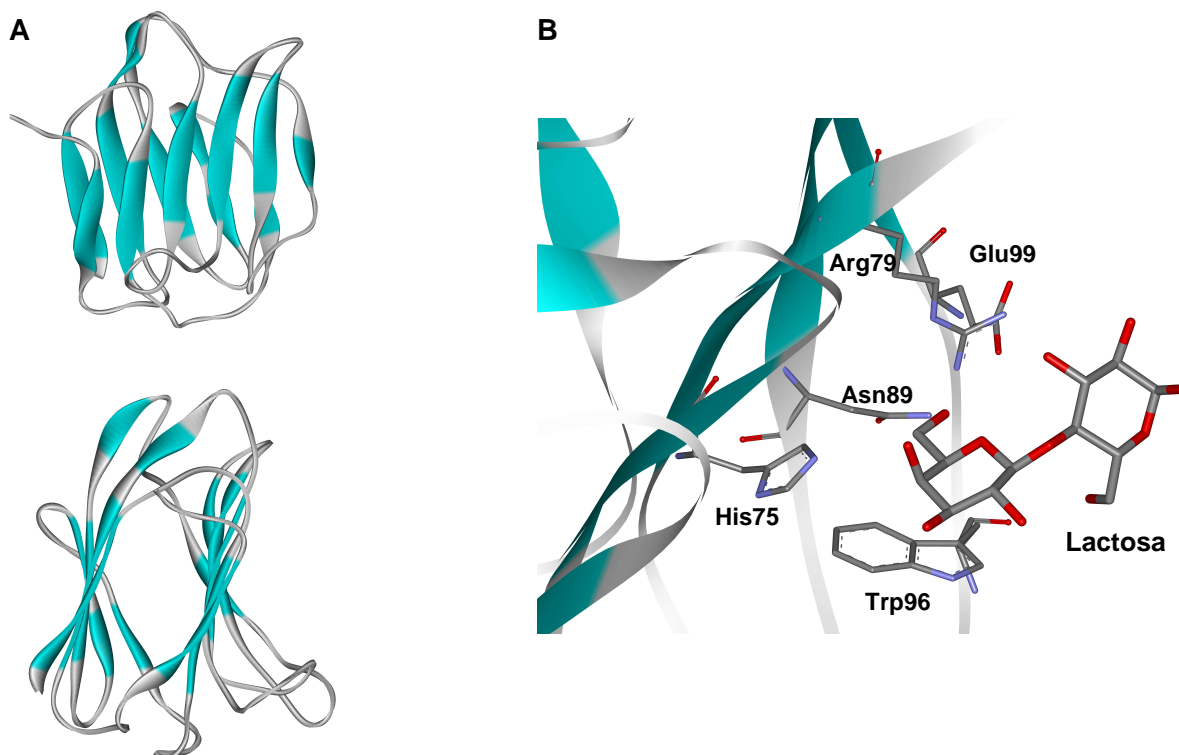


Figura 4.20. Modelo obtenido para hG4-N utilizando como molde la estructura de rG4-N libre. **A)** Vista frontal y lateral del sándwich β ; **B)** Sitio de unión a carbohidratos mostrando los residuos conservados, implicados en el reconocimiento.

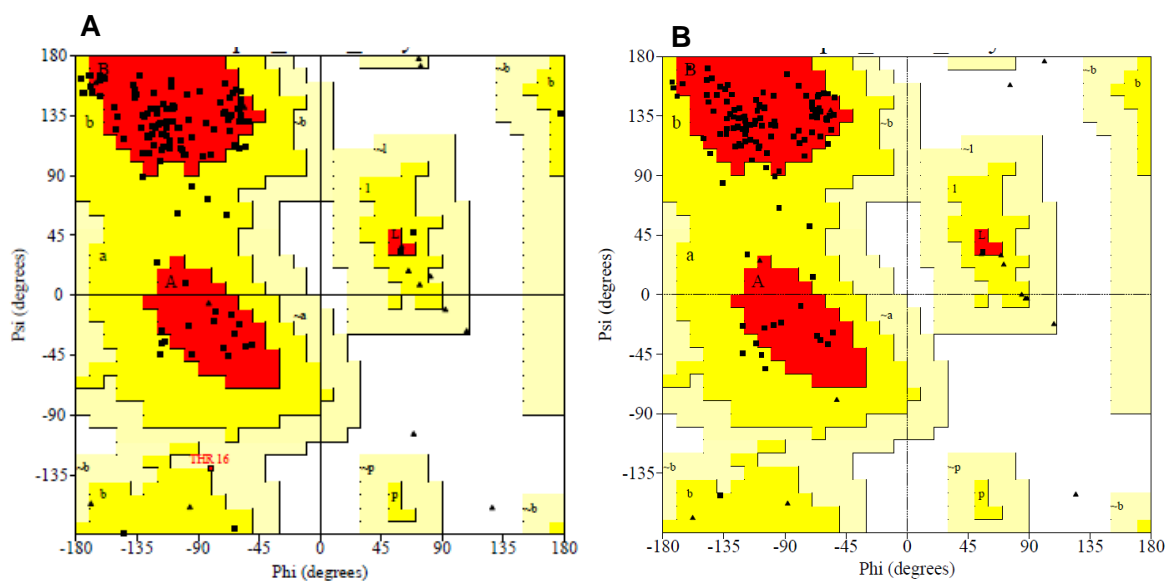


Figura 4.21. Representación de Ramachandran del modelo atómico obtenido para el dominio N-terminal de la galectina-4 humana en presencia (**A**) y en ausencia de lactosa (**B**). Los residuos de glicina se representan como triángulos y el resto como cuadrados. En rojo: residuos en regiones permitidas; amarillo: residuos en regiones adicionales permitidas amarillo claro: residuos en regiones generosamente permitidas; blanco: residuos en regiones prohibidas.

Como cabría esperar, entre ambos modelos sólo se observan algunas diferencias en la orientación de ciertas cadenas laterales. Los dos muestran una buena estereoquímica, como puede verse en la correspondiente representación de Ramachandran obtenida con *PROCHECK* (Figura 4.21), según la cual un 84,2 % de los residuos se encuentran en las regiones altamente permitidas, frente a un 86,7 % en el caso de la estructura cristalina utilizada como molde.

En las Figuras 4.16 y 4.18 se muestran los modelos generados por BUNCH para hG4 y hG4V, respectivamente, y su acoplamiento en los correspondientes modelos *ab initio* obtenidos con DAMMIF, tanto en ausencia como en presencia de lactosa. La excelente correlación entre los espectros de SAXS y los perfiles teóricos de dispersión calculados por BUNCH (Figuras 4.15A y 4.17A), y la concordancia observada entre los valores calculados con Hydropro para R_g , D_{max} , R_s y $s_{20,w}^0$ y los valores experimentales (Tabla 4.10) apoyan la validez de los modelos propuestos.

El conjunto de los resultados obtenidos sugiere que el segmento que une los dos CRDs se encuentra empaquetado entre ambos módulos, en la zona de los modelos *ab initio* no ocupada por los CRDs. No obstante, dada la longitud y el elevado contenido en prolinas de la región conectora, ésta podría conferir una cierta variabilidad a la orientación relativa de los CRDs dentro de la molécula, particularmente en el caso de hG4. Esta capacidad podría verse limitada por la unión de lactosa, considerando las diferencias observadas en la región situada entre ambos dominios en los modelos *ab initio* generados para las formas libre y unida de hG4.

4.5. Parámetros termodinámicos de la unión de ligandos

Los parámetros termodinámicos de la unión de diversos ligandos a las galectinas 4 y 8 se han caracterizado mediante calorimetría de valoración isoterma (ITC). En el caso de hG4, los azúcares estudiados han sido lactosa, tiodigalactósido (TDG), un ligando para el que se ha observado en diferentes galectinas una mayor afinidad que la que muestran por lactosa, y ditiogalactósido (DTDG), este último como posible cabeza de serie para el desarrollo de una nueva generación de inhibidores específicos no hidrolizables (Figura 4.22B-D). Los tioglicósidos están presentes en la naturaleza y son relativamente estables y resistentes a la hidrólisis ácida y enzimática. En particular, se ha propuesto que el tiodigalactósido podría ser utilizado como agente inmunoterapéutico, solo o en combinación con una vacuna frente a células cancerosas, ya que se ha comprobado que disminuye el crecimiento tumoral en ratones (Stannard *et al.*, 2010). En vista de la bioactividad que también se ha observado para el digalactosil-disulfuro (André *et al.*, 2006), hemos examinado la unión a hG4 de DTDG en comparación con TDG y lactosa.

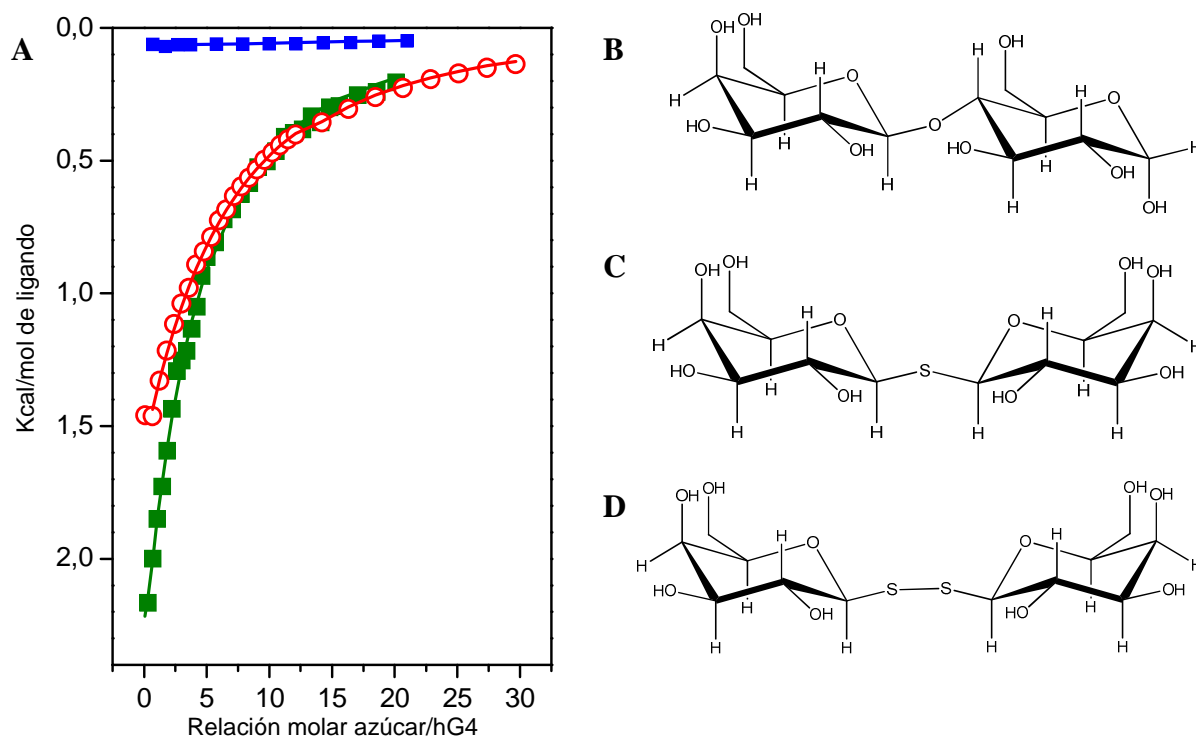


Figura 4.22. A) Valoración calorimétrica de hG4 con lactosa (○,B) tiodigalactósido (■,C) y ditiogalactósido (■,D). Se utilizaron disoluciones de hG4 a concentraciones entre 117 y 155 μM , dializada frente a PBS_{β} . En la valoración con DTDG, el agente reductor se eliminó de la última diálisis para evitar la reducción del glicosildisulfuro. Las líneas continuas corresponden al ajuste de los datos experimentales a un modelo de una sola clase de sitios de unión.

Aunque se ha demostrado que el DTDG es un ligando efectivo para la lectina específica de galactósidos procedente de *Viscum album* (VAA), utilizada como control (Martín-Santamaría *et al.*, 2011), el análisis por ITC indica que la afinidad de hG4 hacia este ligando es casi nula, ya que el calor producido en la valoración es insignificante y comparable con el producido por la simple dilución del ligando (Figura 4.22A). Por el contrario, los datos obtenidos en la valoración con TDG, como control positivo, pueden ajustarse a un modelo de una sola clase de sitios de unión sin ninguna evidencia de cooperatividad (asumiendo dos sitios de unión equivalentes e independientes por molécula), con constante de asociación de $1210 \pm 30 \text{ M}^{-1}$ ($\Delta G = -4,19 \pm 0,02 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$) y valores estimados de entalpía/entropía de $-9,54 \pm 0,2 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}/-17,9 \pm 0,7 \text{ cal}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$. La lactosa se une de modo similar, con una afinidad relativamente baja ($K_a = 585 \pm 8 \text{ M}^{-1}$; $\Delta G = -3,76 \pm 0,01 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$) y valores de ΔH y ΔS de $-10,3 \pm 0,5 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ y $-22 \pm 1,7 \text{ cal}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$, respectivamente. Es decir, según los resultados de ITC, no se aprecian diferencias significativas en la afinidad por lactosa de los dos CRDs, N- y C-terminales, de la galectina-4. No obstante, hay que tener en cuenta que las condiciones utilizadas en la valoración no son las adecuadas para determinar de forma precisa los parámetros termodinámicos en este rango de afinidades. Para ello, sería necesario que el valor de $K_a \times [\text{hG4}] \times n$ fuera al menos

igual o superior a 1 (Wiseman *et al.*, 1989), lo que implica concentraciones de hG4 superiores a 0,8 mM, que no son alcanzables dada la limitada solubilidad de esta galectina. En cualquier caso, los parámetros termodinámicos indican que la interacción está favorecida entálpicamente y penalizada entrópicamente, lo que es típico en las interacciones lectina-carbohidrato (Solís *et al.*, 2009).

En el caso de la valoración de hG8 con lactosa, los resultados son muy diferentes (Figura 4.23A), ya que los datos obtenidos no pueden ajustarse a un modelo de una sola clase de sitios de unión y es necesario emplear un modelo de dos clases de sitios independientes y con diferente afinidad. El mismo comportamiento se observa para el mutante hG8F18Y, con la única diferencia de un ligero aumento en la K_a del sitio de unión de baja afinidad (Tabla 4.11). La valoración con lactosa de hG8-N y hG8F19Y-N, indica claramente que el dominio N-terminal es el responsable de la alta afinidad por este ligando. La presencia del dominio C-terminal parece disminuir ligeramente la afinidad del sitio de unión del dominio N-terminal. Además, la variación de entalpía observada para la unión de hG8F19Y-N es algo inferior que para la proteína completa, y también en comparación con hG8-N, lo que indica que la penalización entrópica en la unión de lactosa al dominio N-terminal del mutante es menor.

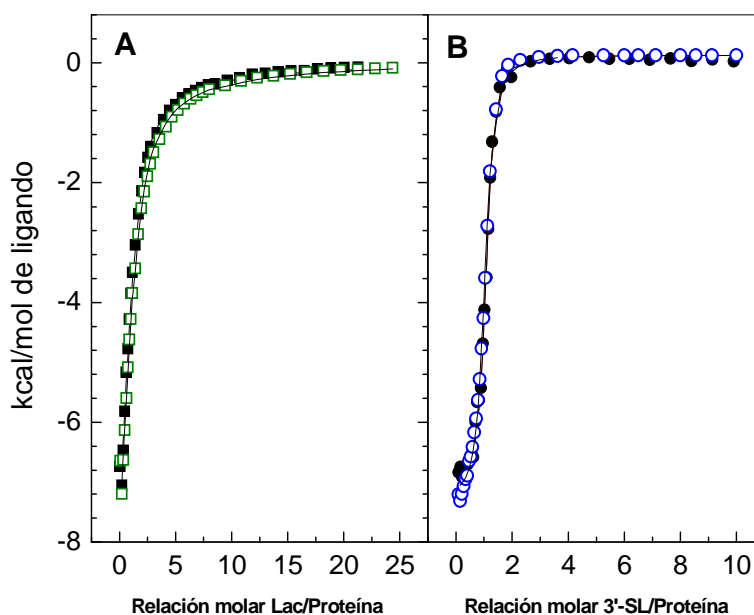


Figura 4.23. Valoración calorimétrica de hG8 (■) y hG8F19Y (□) con lactosa (A) y de hG8 (●) y hG8N (○) con 3'-sialil-lactosa (B). Las líneas continuas corresponden al ajuste de los datos experimentales a un modelo de una (B) y dos (A) clases de sitios de unión.

Por otra parte, el análisis termodinámico de la unión de 3'-sialil lactosa a hG8 y hG8F19Y revela que sólo uno de los dos sitios de unión a carbohidratos parece acomodar este azúcar, siendo además la afinidad de este sitio 20 veces mayor que la del sitio de alta afinidad para la lactosa (Figura 4.23B y Tabla 4.11). La valoración de los dominios N-terminales aislados, tanto de hG8 (Figura 4.23B) como de hG8F19Y, demuestra sin ninguna duda que el sitio

responsable de la unión a sialil-lactosa es el del dominio N-terminal, mientras que el dominio C-terminal no parece unir este ligando. Por otra parte, aunque las diferencias son pequeñas, parece existir una ligera tendencia a que la afinidad del dominio N-terminal aislado sea menor que en la proteína completa, a pesar de que la variación de entalpía sea más favorable, especialmente en el caso de hG8F19Y-N. Esto indica una mayor penalización entrópica en la unión de 3'-sialil-lactosa a los dominios aislados, que puede estar relacionada, por ejemplo, con una mayor pérdida de flexibilidad global del dominio. La existencia de cambios globales en el CRD como consecuencia de la unión del ligando, y no sólo locales en el sitio de unión, se ha observado para hG1 por RMN y cálculos de dinámica molecular (Nesmelova *et al.*, 2010). De hecho, los datos experimentales obtenidos por ITC para la unión de lactosa a hG1 se ajustan a un modelo de unión secuencial (Tabla 4.11), compatible con la existencia de cooperatividad negativa, como indican los experimentos de RMN antes mencionados. Es decir, la unión de lactosa al primer sitio induce cambios conformacionales globales que se transmiten a través del sandwich β al segundo sitio de unión.

Tabla 4.11. Parámetros termodinámicos de la unión de lactosa y 3'-sialil-lactosa a la galectina 8. Como referencia se incluyen los parámetros obtenidos para la valoración de hG1 con lactosa, utilizando un ajuste a un modelo de unión secuencial

	Lactosa				3'-sialil-lactosa	
	$K_1 \cdot 10^{-4} (M^{-1})$	ΔH_1 (kcal·mol ⁻¹)	$K_2 (M^{-1})$	ΔH_2 (kcal·mol ⁻¹)	$K_1 \cdot 10^{-5} (M^{-1})$	ΔH_1 (kcal·mol ⁻¹)
hG8	(1,1 ± 0,3)	-11,05 ± 1	300 ± 150	-9,5 ± 2	(2,5 ± 0,2)	-12,8 ± 0,1
hG8-N	(1,4 ± 0,1)	-11,4 ± 0,2	-	-	(2,3 ± 0,2)	-13,1 ± 0,1
hG8F19Y	(1,1 ± 0,1)	-11,7 ± 0,5	460 ± 170	-10,5 ± 0,9	(2,3 ± 0,2)	-11,7 ± 0,1
hG8F19Y-N	(1,4 ± 0,1)	-10,2 ± 0,2	-	-	(2,1 ± 0,2)	-12,8 ± 0,1
hG1	(2,0 ± 1,0)	-6 ± 1	1670 ± 70	-20,7 ± 0,5	-	-

4.6. Ensayos de unión e inhibición con ¹²⁵I-hG4-N y ¹²⁵I-hG4-C

Para evaluar la afinidad de la unión a lactosa, TDG y DTDG de los dos CRDs de hG4 por separado, hemos examinado la capacidad de estos azúcares para inhibir la unión de los dominios aislados, marcados radiactivamente con ¹²⁵I (actividad específica 0,57 y 0,35 mCi/mg para hG4-N y hG4-C, respectivamente), a un ligando inmovilizado en fase sólida. La capacidad de unión de las proteínas marcadas se examinó previamente utilizando diferentes ligandos, con objeto de establecer las condiciones óptimas de ensayo para cada una. En concreto, para hG4-N los mejores resultados se obtuvieron al ensayar la unión a lactosa-agarosa, mientras que para hG4-C el ligando elegido fue asialofibrina inmovilizada en pocillos de polivinilo. Una vez seleccionado el sistema más adecuado, se determinó la unión

de las proteínas marcadas en presencia de concentraciones crecientes de lactosa, TDG o DTDG. Las constantes de asociación aparentes (Tabla 4.12) se calcularon a partir de la representación de la inversa de la fracción de lectina unida al ligando *versus* la concentración de inhibidor (Solís *et al.*, 1994). En la Figura 4.24 se muestran resultados representativos de la inhibición de la unión de hG4-C a asialofibrina por lactosa, TDG y DTDG.

Tabla 4.12. Constantes de asociación aparentes para la unión de diferentes análogos de lactosa a hG4-N y hG4-C. Como referencia, se muestran también los valores obtenidos previamente para galectina-1 bovina (Solís *et al.*, 1994)

Compuesto	hG4-N		hG4-C		bG1	
	hG4-N K_a (M^{-1})	K_a relativa	hG4-C K_a (M^{-1})	K_a relativa	G1 bovina K_a (M^{-1})	K_a relativa
Lactosa	775	1	340	1	1515	1
N-acetil-lactosamina	870	1,1	832	2,4	5000	3,3
Tiodigalactósido	1186	1,5	518	1,5	ND	-
Ditiodigalactósico	< 100	< 0,1	< 100	< 0,3	ND	-
Metil- β -lactósido (MBL)	714	0,9	495	1,4	1219	0,8
2'-desoxi-MBL	1351	1,7	ND	-	1538	1,0
2'-O-metil-MBL	500	0,65	ND	-	4545	3
3'-desoxi-MBL	181	0,2	ND	-	413	0,3
3'-O-metil-MBL	2632	3,4	529	1,5	1163	0,75

ND, no determinado

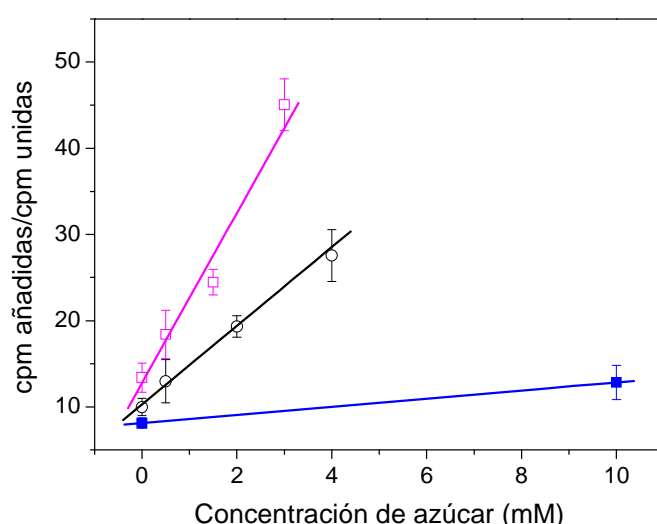


Figura 4.24. Potencial inhibidor de la lactosa (○), TDG (□) y DTDG (■) en la unión de ^{125}I -hG4-C a asialofibrina. La unión de la proteína marcada a asialofibrina (100 μ g) se midió en ausencia y en presencia de diferentes concentraciones del azúcar investigado.

Las constantes de asociación obtenidas para la unión de lactosa a hG4-N y hG4-C son del mismo orden, con valores de $775 \pm 40 M^{-1}$ y $340 \pm 60 M^{-1}$, respectivamente, lo que confirma que no existen diferencias importantes en la afinidad de ambos dominios por este ligando y

valida el ajuste de los datos de ITC a un modelo de una sola clase de sitios de unión. Lo mismo ocurre en el caso del TDG, para el que se observa un aumento de afinidad en ambos dominios con respecto a la lactosa (Tabla 4.12). Sin embargo, DTDG es un ligando muy pobre tanto para hG4-N como hG4-C, observándose menos del 25 % de inhibición de la unión a la mayor concentración utilizada (10 mM).

Estudios de RMN realizados en paralelo han proporcionado una base estructural para explicar el diferente comportamiento del TDG y el DTDG (Martín-Santamaria *et al.*, 2011). Según estos estudios, el TDG interactúa con las galectinas a través de las dos unidades de galactosa, mimetizando el modo de unión de la lactosa/*N*-acetil-lactosamina. En el caso del DTDG, sin embargo, sólo un residuo del azúcar está en contacto con el sitio de unión, mientras que el segundo queda completamente expuesto al solvente, debido a la disposición espacial impuesta por el enlace disulfuro que une ambas galactosas. En el caso de las galectinas, esta limitación en el número de contactos tiene un impacto muy negativo en la afinidad, lo que no ocurre, por ejemplo, para otras lectinas específicas de galactosa como la aglutinina de *Viscum album*. Esta selectividad podría explotarse en el desarrollo de inhibidores específicos de ésta y otras RIPs (*ribosome inactivating proteins*) de tipo AB sin afectar la actividad de las galectinas endógenas.

En resumen, los resultados obtenidos no revelan grandes diferencias en la unión de lactosa, TDG y DTDG a los dos CRDs, N- y C-terminales de la galectina-4, al menos en lo que se refiere a afinidad.

Como se ha descrito en la Introducción, los grupos hidroxilo clave en la unión de lactosa a las galectinas son los OH-4 y OH-6 de la unidad de galactosa y el OH-3 de la glucosa, mientras que las posiciones 2 y 3 de la galactosa no están implicadas, o sólo débilmente en la interacción. Sin embargo, las sustituciones en estas posiciones pueden tener efectos muy distintos dependiendo de la galectina. Con objeto de examinar este aspecto en concreto del sitio de unión de los dominios N- y C-terminales de hG4, hemos utilizado la técnica de "mapeo químico". Esta técnica se basa en la modificación específica del azúcar en posiciones seleccionadas y la evaluación de las propiedades de unión de los derivados en comparación con el compuesto original. En este caso, se ha investigado la afinidad de los desoxi y *O*-metil derivados en posiciones 2' y 3' del metil- β -lactósido. El potencial de unión de estos derivados se muestra en la Figura 4.25.

En concreto, la sustitución por hidrógeno de un grupo hidroxilo anula la posibilidad de formar enlaces de hidrógeno en dicha posición. Por ello, si el grupo hidroxilo sustituido está involucrado en la formación de enlaces de hidrógeno con la proteína, la desoxigenación produce una disminución de la afinidad de unión. Los *O*-metil derivados pueden actuar como aceptores de hidrógeno, por lo que su comportamiento proporciona información sobre la participación del grupo hidroxilo como donador y/o aceptor. Estos derivados proporcionan

también información sobre los requerimientos estéricos del sitio de unión, ya que el volumen del grupo metilo puede generar impedimentos estéricos. Por otro lado, este grupo puede también generar interacciones no-polares con la proteína, incrementando la afinidad de la unión. De esta manera, es posible analizar la contribución de un determinado grupo hidroxilo a la unión e incluso delinear la topografía y distribución de regiones no polares en el sitio de unión. Esta información puede ser de gran utilidad para el diseño de ligandos específicos de alta afinidad para una determinada galectina.

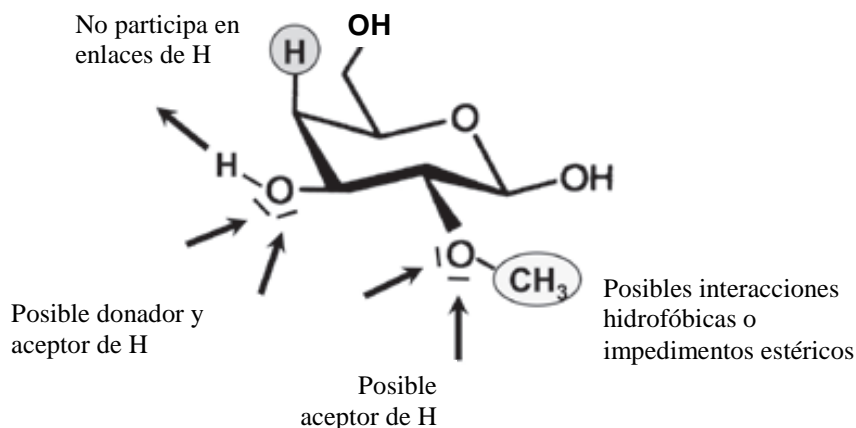


Figura 4.25. Capacidades de unión de los diferentes grupos funcionales en derivados sintéticos de carbohidratos. Las flechas indican la capacidad de participar en la formación de enlaces de hidrógeno y apuntan desde donador hacia aceptor.

La afinidad de hG4-N por los derivados en las posiciones 2 y 3 de la galactosa se investigó en ensayos de inhibición similares a los descritos anteriormente. Como se muestra en la Tabla 4.12, las modificaciones en la posición 2 tienen sólo un pequeño efecto sobre la afinidad por el derivado. La introducción de un grupo metilo en esta posición no produce un aumento de la afinidad, lo que sí ocurre para la galectina-1 bovina (Solís *et al.*, 1994). Sin embargo, la posición 3 es más sensible a las modificaciones. La desoxigenación, provoca una clara disminución de la K_a , lo que sugiere la participación del OH-3' en contactos con la proteína, mientras que la O-metilación tiene como resultado un aumento de 3-4 veces en la afinidad, lo que no se observa por ejemplo en el caso de la galectina-1. Un estudio similar de la afinidad de hG4-C por el metil- β -lactósido y su 3'-O-metil derivado demuestra que para este dominio la metilación en esta posición tampoco resulta en un aumento de la K_a .

Con objeto de encontrar una base estructural para el diferente comportamiento de ambos dominios, hemos examinado con detalle la estructura del complejo del dominio N-terminal de la galectina-4 de ratón (rG4-N) con lactosa, en comparación con el modelo construido para hG4-N y la estructura disponible para hG4-C.

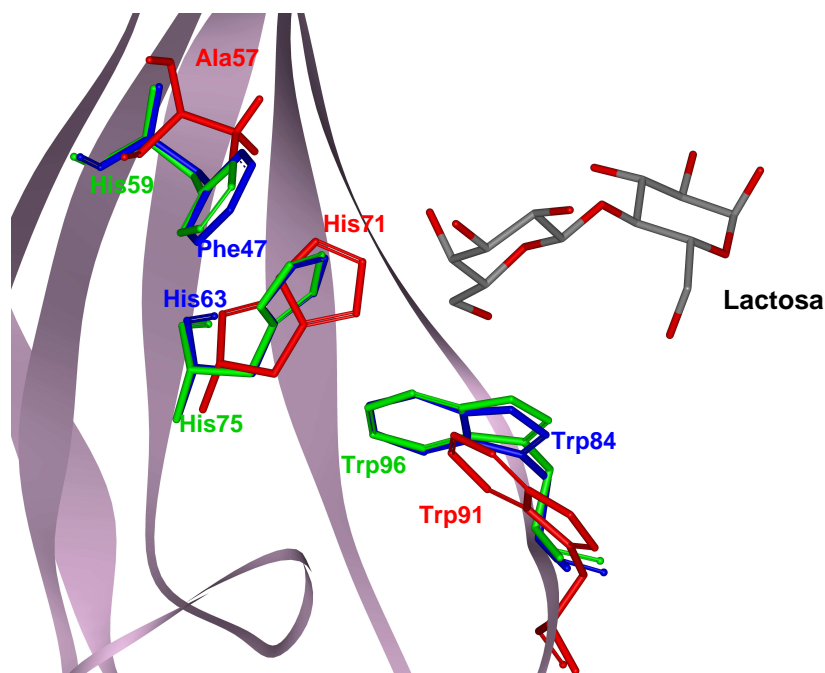


Figura 4.26. Superposición de los sitios de unión de hG4-N, hG4-C y rG4-N en complejo con lactosa, señalando los residuos posiblemente implicados en contactos con la posición 3 de la galactosa. Como referencia también se muestra el residuo de Trp que forma la base del sitio de unión.

En el complejo rG4-N-lactosa, el grupo hidroxilo en la posición 3 de la galactosa está situado a 4,38 Å de la His75, con la que podría establecer un enlace de H mediado por una molécula de agua. Esta His se conserva en el sitio de unión tanto de hG4-N (His63) como de hG4-C (His71). Por otra parte, en rG4-N existe otra histidina (His59), algo más alejada del OH-3' (a 6,3 Å), que en el caso de hG4-N está reemplazada por una fenilalanina (Phe47). Esta fenilalanina está en la posición adecuada para establecer una interacción hidrofóbica con un grupo metilo en la posición 3 de la galactosa (Figura 4.26), conduciendo a un aumento de la afinidad. En hG4-C, sin embargo, en esta posición se encuentra una alanina (Ala57), disminuyendo de forma importante la intensidad de un posible contacto hidrofóbico. Esta sustitución de Phe por Ala explicaría por tanto la diferente afinidad observada para hG4-N y hG4-C por el 3'-O-metil derivado del metil β-lactósido.

4.7. Actividad bactericida de las galectinas

Como se ha descrito en la Introducción, las galectinas juegan un importante papel en la regulación de los procesos de inflamación y defensa del organismo e intervienen a diferentes niveles en las interacciones patógeno-hospedador. Aunque algunos estudios muestran que ciertas lectinas del sistema inmune innato podrían afectar directamente a la viabilidad de los patógenos (Thiel *et al.*, 1997; Cash *et al.*, 2006; Kohatsu *et al.*, 2006), no está claro si las galectinas ejercen esta actividad. En este trabajo hemos investigado la posible acción bactericida de las galectinas hG4 y hG8, per se o en sinergia con péptidos antimicrobianos, en comparación con las galectinas 1 y 3. Los péptidos antimicrobianos

constituyen una primera línea de defensa del organismo frente a patógenos. Estos péptidos se encuentran en todos los organismos vivos, incluyendo bacterias, plantas, insectos y vertebrados, donde son componentes integrales del sistema inmune (Zasloff, 2002). En los mamíferos son producidos principalmente en superficies externas, como la piel y los pulmones, o permanecen almacenados en los neutrófilos (Hoffmann *et al.*, 1999). Su síntesis, por lo general, es inducida como respuesta a infecciones (Baeuerle y Henkel, 1994), aunque algunos péptidos, como las histatinas y la β -defensina-1 humana, son producidos de manera constitutiva.

La susceptibilidad de una bacteria a un agente bactericida se determina generalmente midiendo la concentración más pequeña de dicho agente que inhibe el crecimiento de la bacteria *in vitro* (MIC, del inglés, *minimal inhibitory concentration*). En nuestro caso, la actividad de las galectinas sobre la bacteria Gram-negativa *Pseudomonas aeruginosa* (PA01) se ha evaluado mediante el método de difusión radial descrito en el apartado de Materiales y Métodos, incubando la bacteria con diferentes concentraciones de las galectinas (5, 10 y 20 $\mu\text{g/ml}$), en ausencia y en presencia de los péptidos antimicrobianos polimixina B (PxB), el péptido de neutrófilos humano (hAD-1) y la β -defensina-2 (hBD-2), en concentraciones no bactericidas. En ausencia de péptidos antimicrobianos, no se observa actividad bactericida alguna de las galectinas, incluso a la concentración más alta utilizada. Sin embargo, la actividad bactericida de los péptidos sí se ve afectada, en algunos casos de forma espectacular, en presencia de determinadas galectinas.

En la Tabla 4.13 se muestra el MIC obtenido para los péptidos antimicrobianos investigados en ausencia y en presencia de una concentración de 20 $\mu\text{g/ml}$ de diferentes galectinas, y la actividad bactericida relativa, referida a la del péptido solo. Una primera observación es que el efecto de las galectinas sobre la actividad es similar para los tres péptidos, con la única excepción del diferente aumento de actividad producido por hG3 sobre PxB y hAD-1 (véase más adelante). Sin embargo, el efecto es muy diferente dependiendo de la galectina.

En concreto, en el caso de hG4 y hG8, mientras que esta última produce un aumento significativo pero moderado de la actividad bactericida de los péptidos (11-12 veces), el efecto producido por hG4 es muy superior, produciendo un aumento de la actividad de > 2000 veces. Sin embargo, los dos dominios de hG4 aislados no muestran ningún efecto relevante, lo que indica que es necesaria la galectina completa para ejercer actividad bactericida en sinergia con los péptidos antimicrobianos. De acuerdo con esta observación, se ha sugerido que las galectinas de tipo tándem-repetido podrían utilizar un dominio para el reconocimiento de la bacteria y el otro para su destrucción (Stowell *et al.*, 2010). El aumento de la actividad bactericida producido por hG1 es similar al observado para hG8, mientras que la galectina-7 humana, que es también de tipo proto homodimérica pero dimeriza a

traves de una región de la molécula diferente a la utilizada por hG1, muestra un efecto todavía menor (~3,5 veces, no mostrado).

Tabla 4.13. MIC obtenida para los péptidos antimicrobianos PxB, hAD-1 y hBD-2 sobre PA01 en ausencia (-) y en presencia de diferentes galectinas

Galectina	PxB(µg/ml)		hAD-1(µg/ml)		hBD-2(µg/ml)	
	MIC (µg/ml)	Actividad relativa	MIC (µg/ml)	Actividad relativa	MIC (µg/ml)	Actividad relativa
-	1,64	1	9,88	1	16,0	1
hG4	0,0007	2,3 x 10 ³	0,0043	2,3 x 10 ³	ND	ND
hG4-N	2,54	0,65	15,3	0,65	23,8	0,7
hG4-C	1,70	0,96	10,24	0,96	15,77	1,0
hG8	0,14	11,4	0,8192	12,1	1,43	11,2
hG1	0,15	11,3	0,87	11,3	1,36	11,7
hG1ox	0,0007	2,3 x 10 ³	0,0018	5,5 x 10 ³	ND	ND
hG3	0,0028	587	0,0038	2,6 x 10 ³	ND	ND
hG3Tr	0,34	4,8	2,05	4,8	3,30	4,8

ND: no determinado; el error en todos los casos es inferior al 0,6%

En el caso de hG3, por el contrario, la proteína completa es 50 veces más eficaz que hG1 en potenciar la actividad bactericida de PxB y 230 veces para hAD-1, siendo éste el único caso en el que el efecto sobre uno y otro péptido es distinto. Los valores de MIC obtenidos para hG3Tr son, sin embargo, incluso mayores que los correspondientes valores para hG1, lo que indica claramente la importancia del dominio N-terminal en la actividad efectora de hG3 sobre los péptidos. Una posible explicación es la capacidad de hG3 de formar pentámeros a través del dominio N-terminal como consecuencia de la unión de ligandos multivalentes, aunque no puede excluirse una interacción directa de este dominio con los péptidos y/o bacterias.

Resumiendo, todas las galectinas investigadas son capaces de potenciar la actividad bactericida de los péptidos antimicrobianos, aunque el efecto varía en gran medida dependiendo de la galectina, aumentando su eficacia en el orden: hG4-N < hG4-C < hG3Tr < hG1 ≈ hG8 < hG3 ≤ hG4.

Se ha descrito que la expresión y secreción extracelular de las defensinas así como la de las galectinas aumenta en respuesta a la infección, por ejemplo en la mucosa y lumen intestinal (Bibiloni y Schiffrin, 2010). De acuerdo con los resultados obtenidos, hG8 y en especial hG4, ambas expresadas en la mucosa intestinal, podrían estar implicadas en la regulación de la microbiota intestinal. Sin embargo, en el caso de hG1, su secreción a un entorno oxidante puede conducir a la conversión de la forma nativa en una forma oxidada que, como se ha

descrito en la Introducción, exhibe actividades biológicas distintas a las de la proteína nativa. Por esta razón, se ha investigado también el posible efecto de hG1 oxidada sobre la actividad bactericida de PxB y hAD-1. Los resultados revelan una reducción en el MIC de ambos péptidos de 200 y 490 veces, respectivamente, con respecto al observado en presencia de hG1 nativa. Este resultado apoya aún más un posible papel de las galectinas en sinergia con las defensinas endógenas en la respuesta frente a patógenos.

4.7.1. Efecto de las galectinas sobre la estabilidad de la membrana bacteriana

Como primer paso para esclarecer el mecanismo por el que las galectinas potencian la actividad bactericida de los péptidos antimicrobianos, se ha investigado un posible efecto de hG1 sobre la membrana externa de las bacterias, utilizando el método de adsorción de NPN (1-N-fenil-naftilamina). En presencia de 0,5 µg/ml de hG1, la permeabilidad de la membrana bacteriana de PA01 a la sonda fluorescente es similar a la observada en ausencia de galectina (Figura 4.27). Sin embargo, al aumentar la concentración final de hG1 a 1 µg/ml se observa un claro aumento de la fluorescencia que indica mayor transferencia de NPN del medio extracelular a un entorno hidrofóbico, y este aumento es todavía mayor a concentraciones de 10 µg/ml (Figura 4.27). Estos resultados evidencian una desestabilización de la membrana bacteriana, inducida por hG1, que facilita que la sonda fluorescente atraviese la membrana. Al añadir a continuación una disolución de CaCl₂ 10 µM el efecto revierte, lo que indica un posible origen electrostático. Este efecto del Ca²⁺ es similar al que ejerce sobre la unión de los péptidos antimicrobianos a la superficie bacteriana.

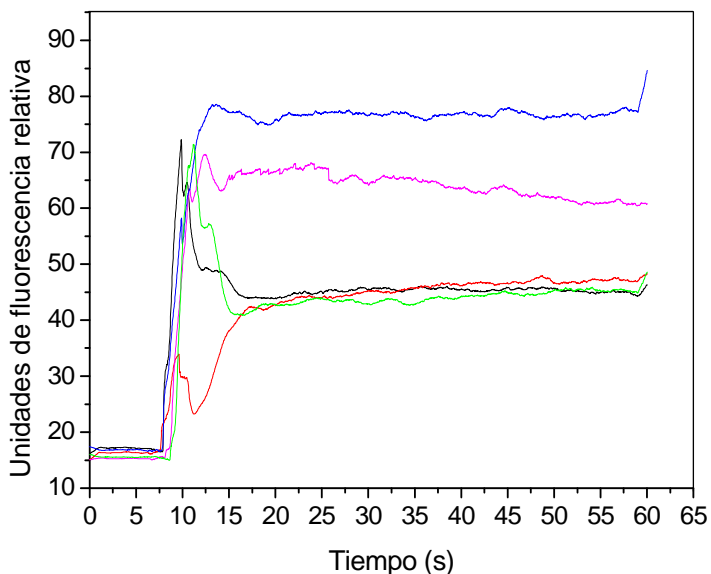


Figura 4.27. Desestabilización de la membrana de *P. aeruginosa* por hG1. El aumento de la fluorescencia de NPN 10 µM con el tiempo, en presencia de una concentración de 10⁸ bacterias/ml, se registró tras la adición de hG1 0,5 µg/ml (espectro rojo), 1 µg/ml (rosa) y 10 µg/ml - (azul)/+ CaCl₂ 10 µM (verde).

Se ha propuesto que la interacción electrostática entre los péptidos catiónicos y los fosfolípidos de la superficie bacteriana facilitan su unión y posterior inserción en la membrana, formando poros y conduciendo finalmente a la ruptura de la membrana. Una

desestabilización adicional de la membrana inducida por las galectinas lógicamente tendrá como consecuencia un efecto sinérgico, aumentando la actividad bactericida de los péptidos antimicrobianos. En todo caso, los resultados obtenidos sobre el efecto de hG1 en la desestabilización de la membrana invitan a realizar ensayos similares con las demás galectinas, con objeto de determinar si esta desestabilización tiene lugar en todos los casos o los mecanismos difieren dependiendo de la galectina.

4.8. Caracterización de hG1 oxidada

Teniendo en cuenta las diferencias observadas en la acción efectora de hG1 nativa y oxidada sobre la actividad bactericida de los péptidos antimicrobianos y las aparentes contradicciones existentes entre el mecanismo de oxidación propuesto inicialmente y los datos estructurales conocidos con posterioridad, se ha investigado de nuevo los cambios que se producen en hG1 como consecuencia de la oxidación.

Tras eliminar por diálisis (4 horas) frente a PBS el agente reductor del medio, se comprobó la pérdida de la capacidad de unión a carbohidratos por cromatografía de afinidad en asialofetuina-Sepharosa y se investigó la organización estructural de la galectina-1 oxidada. En la Tabla 4.14 se recogen los datos obtenidos mediante espectrometría de masas, electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) y cromatografía de filtración en gel (FPLC), en comparación con la forma nativa. El comportamiento en filtración en gel de hG1 recién oxidada (es decir, inmediatamente después de la diálisis) indica que inicialmente se comporta como un dímero, al igual que la proteína nativa. Sin embargo, con el tiempo se observa la aparición de material agregado.

Tabla 4.14. Análisis comparativo de hG1 oxidada vs nativa mediante MS, SDS-PAGE y FPLC					
		Agente reductor	Masa en MS (kDa)	Movilidad en SDS-PAGE	Tiempo de elución en FPLC (min)
hG1 reducida		β -mercaptoetanol (β ME)	14,66 (+1 β ME) 14,73 (+2 β ME) 14,81 (+3 β ME)	\approx 14,5 kDa	27,0
		DTT	14,58		
hG1 oxidada	Recién oxidada	Ninguno	14,58	\approx 14,5 kDa	26,6
	Envejecida (5 días)				26,8 + material agregado

Simultáneamente, el espectro de DC en el UV lejano de hG1 oxidada sufre una disminución de la intensidad de la señal y un desplazamiento progresivo con el tiempo del mínimo, hasta alrededor de 210 nm (Figura 4.28A). Del mismo modo, el espectro en el UV cercano

muestra una pérdida progresiva de elipticidad positiva en la región de 260-300 nm, característica de hG1 nativa (Figura 4.28B).

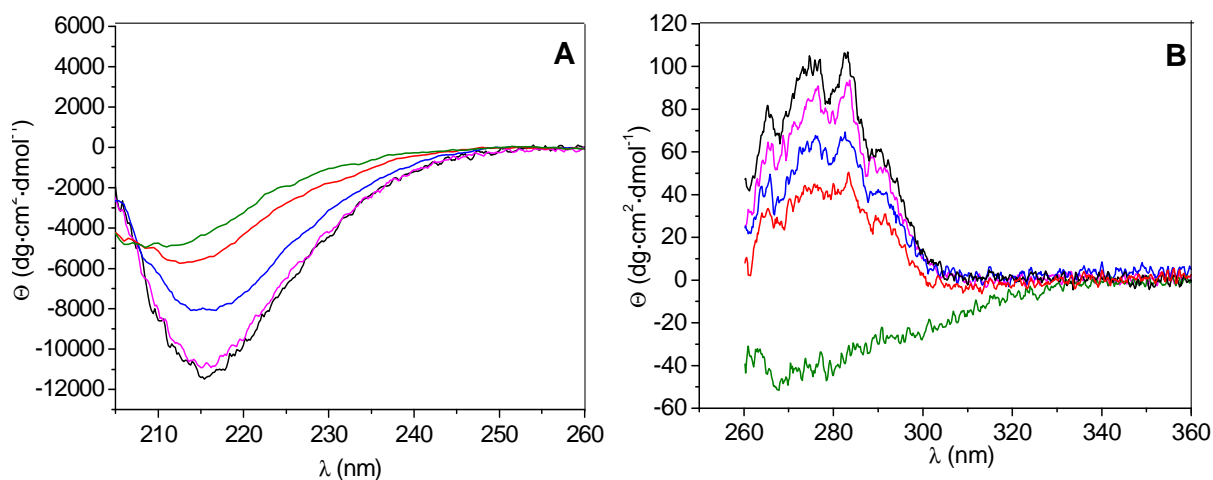


Figura 4.28. Espectros de DC en el UV-lejano (A) y cercano (B) de hG1 nativa (negro), recién oxidada (rosa) y transcurrido 1 (azul), 3 (rojo) y 7 días (verde) tras la eliminación del agente reductor.

Estos cambios en el UV lejano y cercano revelan una desaparición con el tiempo de la estructura secundaria y terciaria en hG1 oxidada. Sin embargo, hay que destacar que en la proteína recién oxidada sólo se observa una mínima variación en los espectros, a pesar de que ya se ha producido la pérdida de la capacidad de unión a carbohidratos. Este hecho apunta a la existencia de una especie oxidada inicial que posteriormente sufre nuevas modificaciones. Estudios preliminares por filtración en gel indican que el tratamiento de esta especie inicial con iodoacetamida (en ausencia de agentes desnaturalizantes) protege a la proteína de una posterior oxidación, lo que recomienda continuar con nuevos estudios en esta línea. En este trabajo, nos hemos centrado en la identificación de los posibles enlaces disulfuro presentes en esta forma inicial de hG1 oxidada. Para ello se ha analizado su huella peptídica inmediatamente después de la oxidación, en comparación con la de hG1 nativa, bloqueando previamente las cisteínas todavía libres con iodoacetamida en presencia de urea pero sin reducción previa (véase el protocolo descrito en el apartado 3.2). En la Figura 4.29 se muestran los principales picos obtenidos y en la Tabla 4.15 se detalla la intensidad de dichos picos (normalizada según se indica en la Tabla) y su asignación a péptidos concretos de la proteína.

Como se muestra en la Figura 4.30, hG1 contiene 6 cisteínas en las posiciones 2, 16, 42, 60, 88 y 130. En la huella peptídica de hG1 nativa tras alquilación con IAA se detectan 4 de los 5 péptidos que contienen estas cisteínas alquiladas, a saber, los péptidos 1-18, 37-48, 49-63 y 74-99, aunque con intensidades muy distintas (Tabla 4.15). La única cisteína que no se observa es la Cys130.

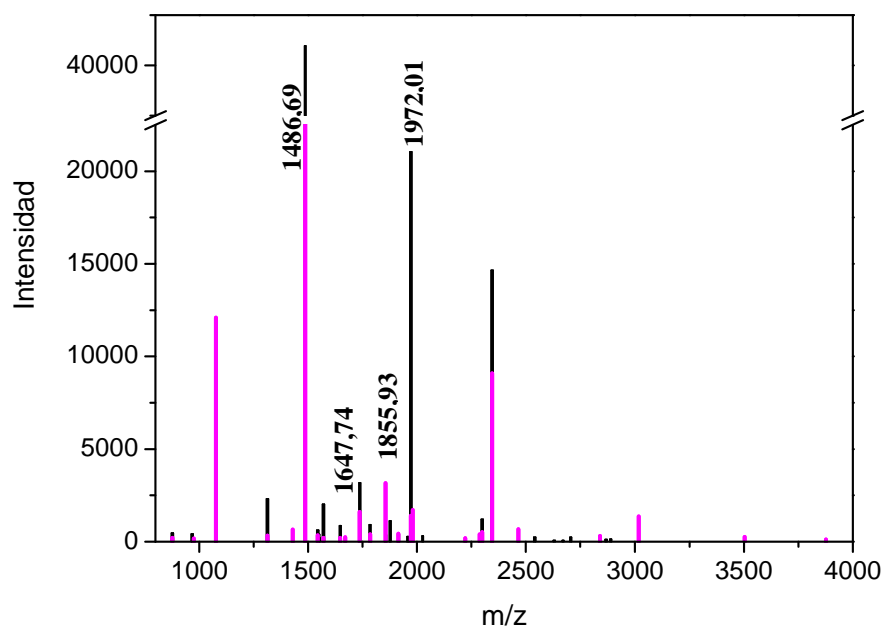


Figura 4.29. Análisis de la huella peptídica de hG1 nativa (negro) y recién oxidada (rosa).

1-50	ACGLVASNLN LK PGECLRVR GEVAPDAKSF VLNLGKDSNN LCLHFNPRFN
51-100	AHGDANTIV C NSKDGGAWGT EQREAVFPFQ PG SVAEVCIT FDQANLTVKL
101-130	PDGYEFKFPN RLNLEAINY M AADGDFKIK CVAFD

Figura 4.30. Secuencia de hG1 señalando la posición de las seis cisteínas (rojo) de la molécula y los péptidos identificados por huella peptídica.

En hG1 oxidada también se observan los péptidos que contienen las cisteínas 2, 16, 42 y 60 alquiladas, si bien la intensidad de los picos en todos los casos es menor. En especial, la intensidad del péptido de masa 1972,007 Da, que corresponde al péptido 1-18 con las dos cisteínas, 2 y 16, alquiladas disminuye 15 veces en la galectina oxidada. Por otra parte, se detectan nuevos picos cuyas masas son compatibles con la formación de enlaces disulfuro entre las cisteínas 2/16-60, 2/16-130, 42-60 y 42-130, en orden de intensidad creciente. Sólo los disulfuros Cys2-Cys130 y Cys42-Cys60 habían sido descritos anteriormente. Por el contrario, el disulfuro Cys16-Cys88, también descrito, no ha sido detectado en nuestro análisis. En la huella peptídica de hG1 recién oxidada se detecta además un importante aumento en la intensidad del pico a m/z 1855,93, que puede asignarse tentativamente al péptido 1-18 con un disulfuro intramolecular 2-16.

Para confirmar la identidad de este péptido, se llevó a cabo un análisis por espectrometría de masas en tándem MS/MS (Figura 4.31). La mayoría de los iones detectados corresponden a péptidos internos formados por una combinación de fragmentaciones de las series *b* e *y*.

Tabla 4.15. Péptidos de hG1 y hG1ox detectados por análisis de la huella peptídica. La intensidad de los picos se ha normalizado tomando como referencia el péptido 64-73 (m/z 1076,47), el cual no contiene ningún residuo susceptible de oxidación

hG1			hG1 oxidada		
m/z	Aminoácidos	Intensidad	m/z	Aminoácidos	Intensidad
877,511	29-36	456,417	877,485	29-36	203,499
968,468	100-107	412,882			
1076,470	64-73	12092,244	1076,470	64-73	12092,237
			1429,682	37-48	656,617
1486,690	37-48 Cys-CAM 42	40966,982	1486,697	37-48 Cys-CAM 42	23585,951
1647,746	49-63 Cys-CAM 60	864,596	1647,770	49-63 Cys-CAM 60	199,930
1784,841	112-127	901,382	1784,830	112-127	400,052
1855,930		365,866	1855,949	1-18 Disulfuro 2-16	3163,772
1914,970	1-18 1 Cys-CAM	414,416	1914,986	1-18 1 Cys-CAM	424,435
1972,007	1-18 2 Cys-CAM	21026,417	1972,001	1-18 2 Cys-CAM	1397,810
			1980,862	37-48 + 130-134	1721,507
2026,008	112-129 1 MC	319,490			
			2288,150	29-48 1MC	398,231
2299,091	108-127 1 MC	1197,989	2299,113	108-127 1 MC	512,906
2345,180	29-48 1 MC Cys-CAM 42	14645,826	2345,180	29-48 1 MC Cys-CAM 42	9086,455
			2466,181	1-18 1Cys-CAM + 130-134	684,046
2705,175	49-73 1MC Cys-CAM 60	248,647			
2867,388	74-99 Cys-CAM 88	112,814			
			3017,386	37-48 + 49-63	1359,945
			3502,709	1-18 1 Cys-CAM + 49-63	257,642

Cys-CAM: cisteína modificada con iodoacetamida para formar carboxi-metil cisteína; MC: *missed cleavage*

Los iones y_1 e y_2 se detectan claramente, pero no así los demás iones de esta serie, o de la serie b , observándose sólo un número muy reducido de ellos y con muy baja intensidad. Estos resultados están perfectamente de acuerdo con la presencia de un enlace disulfuro entre las cisteínas 2 y 16, ya que en su ausencia deberían observarse la mayoría de los iones de ambas series. La aparición de algunos de ellos podría explicarse por la ruptura del enlace disulfuro como consecuencia de la activación del ión.

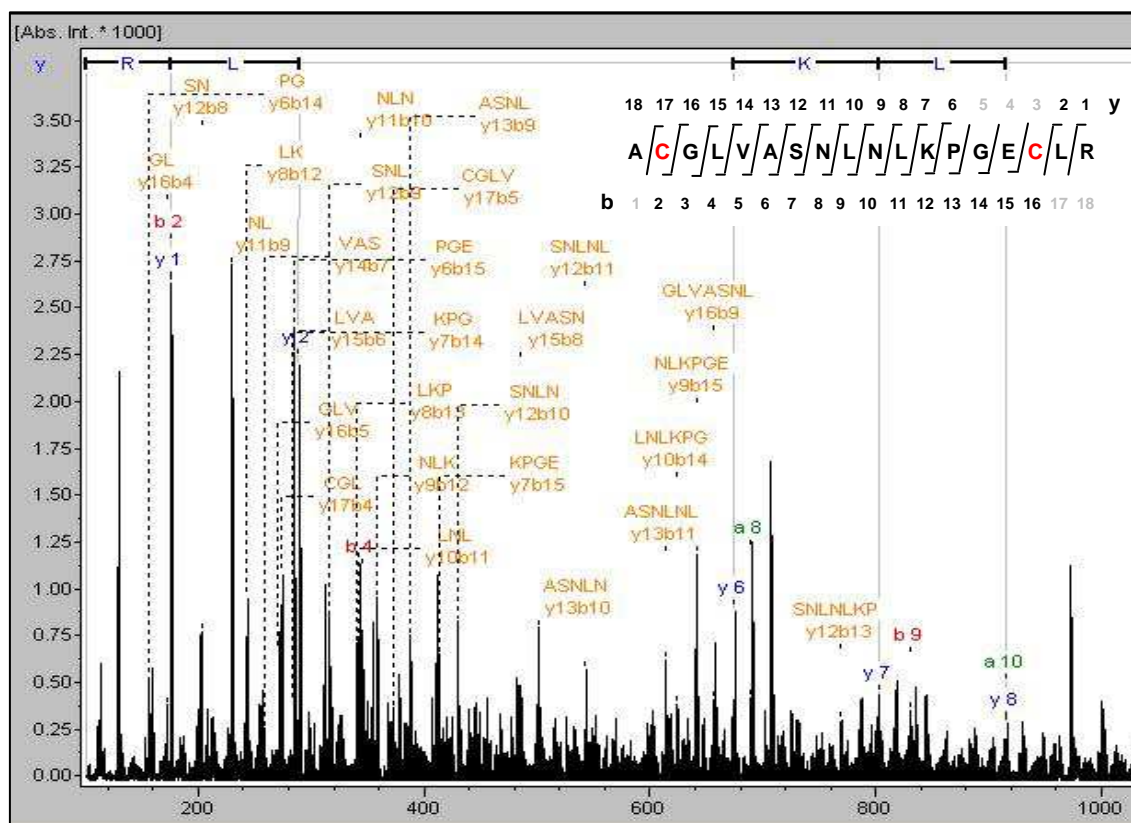


Figura 4.31. Espectro de fragmentación MS/MS del péptido a m/z 1855,9 obtenido por digestión trípica de hG1 oxidada. Se muestra la secuencia de aminoácidos del péptido 1-18 en la que se indican los sitios de fragmentación de la serie **y** (encima de la secuencia) y **b** (debajo) observados en el espectro.

En conjunto, los resultados confirman que el pico a m/z 1855,93 corresponde al péptido 1-18 con un disulfuro entre Cys2 y Cys16. La formación de este disulfuro tampoco había sido descrita con anterioridad. Sin embargo, teniendo en cuenta la importante disminución del péptido 1-18 conteniendo dos cisteínas alquiladas y que la intensidad del pico a m/z 1855,93 es la más alta de todos los picos detectados que contienen un enlace disulfuro, parece razonable concluir que la formación del disulfuro 2-16 es uno de los primeros pasos en la oxidación de hG1. De hecho, se ha descrito que el mutante C2S de hG1 es mucho más resistente a la oxidación que la proteína nativa (Hirabayashi y Kasay, 1991; Nishi *et al.*, 2008).

Con objeto de confirmar la importancia del disulfuro 2-16, hemos llevado a cabo estudios preliminares de la estabilidad del mutante C2S así como del mutante $\Delta(1-6)$, una variante natural que carece de los seis primeros aminoácidos del extremo N-terminal. De forma un tanto sorprendente, ambos mutantes de hG1 son igualmente sensibles a la oxidación y experimentan cambios similares en los espectros de DC (no mostrado). En conjunto, los resultados indican que, aunque la formación del disulfuro 2-16 parece ser uno de los primeros pasos en la oxidación de la proteína nativa, simultáneamente se forman otros

enlaces disulfuro que en el caso de los mutantes estudiados aparentemente conducen también a la pérdida de la capacidad de unión a carbohidratos en la proteína oxidada.

4.9. Efecto de hG1 nativa y oxidada sobre el crecimiento neuronal *in vitro*

Como se ha mencionado en la Introducción, se ha descrito que hG1 oxidada promueve la regeneración axonal y actúa como una citoquina (Horie *et al.*, 2004), jugando un papel importante en la neuroregeneración, por lo que podría ser utilizada como agente terapéutico en enfermedades neuronales. En concreto, se ha propuesto que después de una lesión axonal, la galectina-1 se exterioriza de los axones en crecimiento, oxidándose y reactivando las células de Schwann en el espacio extracelular por estimulación de los macrófagos que secretan un factor que promueve la regeneración axonal. En base a estos precedentes y a los nuevos datos obtenidos en este trabajo sobre los enlaces disulfuro que pueden formarse en hG1 oxidada, hemos investigado una posible influencia de hG1 en el crecimiento de neuronas *in vitro*.

Se ha comparado el efecto de hG1 y $\Delta(1-6)$ hG1 en forma reducida, recién oxidada y estabilizada con IAA (oxIAA), y simplemente oxidada, sin estabilización con IAA (ox), sobre neuronas del hipocampo ya que en esta zona la población neuronal es bastante homogénea y es posible obtener cultivos celulares homogéneos, de mediana densidad, en donde se pueden observar células de manera independiente, lo que garantiza la precisión de las observaciones. Como se puede observar en la Figura 4.32, las células en cultivo muestran el crecimiento de las neuritas, así como también cambios en la complejidad de la red neuronal en algunos casos. En concreto, se ha determinado el número y crecimiento (longitud) de axones y neuritas.

Ni la forma reducida ni las oxidadas de hG1 producen un efecto significativo sobre el crecimiento axonal (Figura 4.33A, líneas 1-3). Sin embargo, la forma reducida del mutante $\Delta(1-6)$ hG1 (línea 4) retrasa dicho crecimiento, mientras que la forma oxidada y estabilizada con IAA ($\Delta(1-6)$ hG1oxIAA) (línea 5) no tiene un efecto claro con respecto al control y la forma oxidada sin estabilizar ($\Delta(1-6)$ hG1ox) (línea 6) produce un sensible aumento de la longitud, de aproximadamente 40 μm . Es decir, las formas reducida y oxidada tienen efectos opuestos.

Por lo que se refiere a las neuritas, en presencia de hG1 se observa una disminución de su longitud (Figura 4.33B), significativamente mayor para hG1ox (línea 3) que para las formas reducida (línea 1) y oxidada+IAA (línea 2). El número de neuritas por célula también disminuye ligeramente en presencia de hG1ox (Figura 4.33C). En el caso de $\Delta(1-6)$ hG1, de nuevo se observan diferencias entre las tres formas estudiadas: la forma reducida provoca una disminución del 40% en la longitud de las neuritas, el efecto disminuye al 15% para la

forma oxidada y estabilizada y es nulo en el caso de $\Delta(1-6)$ hG1ox. Por lo tanto, la oxidación en este caso tiene como resultado la desaparición del efecto que induce la proteína nativa. Un comportamiento similar se observa al comparar el efecto sobre el número de neuritas por célula, ya que la forma reducida induce una disminución significativamente mayor que las formas oxidadas.

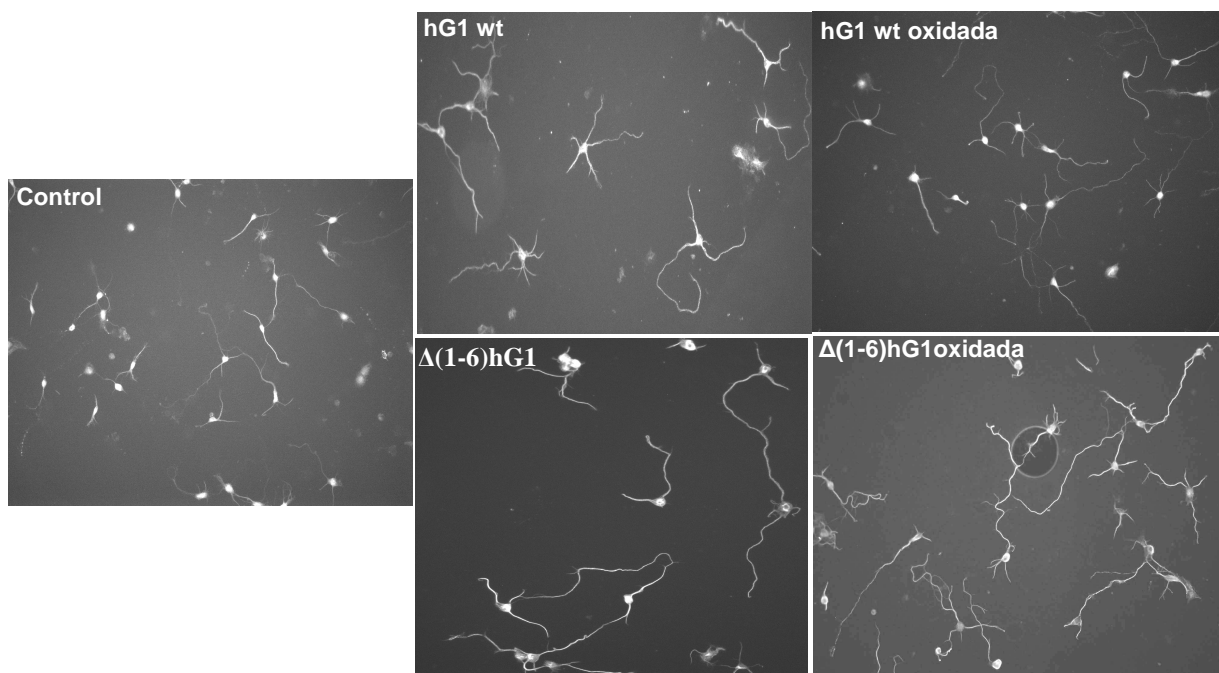


Figura 4.32. Efecto de hG1 y $\Delta(1-6)$ hG1 nativas y oxidadas sobre las neuronas hipocampales. Las neuronas se incubaron en cubreobjetos previamente recubiertos con las galectinas. El crecimiento de axones y dendritas en las diferentes condiciones se visualizó por microscopía de fluorescencia tras el marcaje de las neuronas con anticuerpo anti-tubulina y anticuerpo secundario acoplado a Alexa Fluor 488.

En resumen, sólo las formas oxidadas de hG1 tienen algún efecto sobre el desarrollo neuronal, mientras que en el caso del mutante $\Delta(1-6)$ hG1, la forma reducida provoca una disminución en la longitud de axones y neuritas y el número de neuritas por célula, pero este efecto disminuye, desaparece o incluso revierte con la oxidación. hG1 y $\Delta(1-6)$ hG1 exhiben por tanto un comportamiento opuesto, tanto las formas reducidas como las oxidadas, lo que apoya la conclusión de que la Cys2 juega un importante papel en la estabilidad y mecanismo de oxidación de la galectina-1 y, en consecuencia, en su actividad biológica.

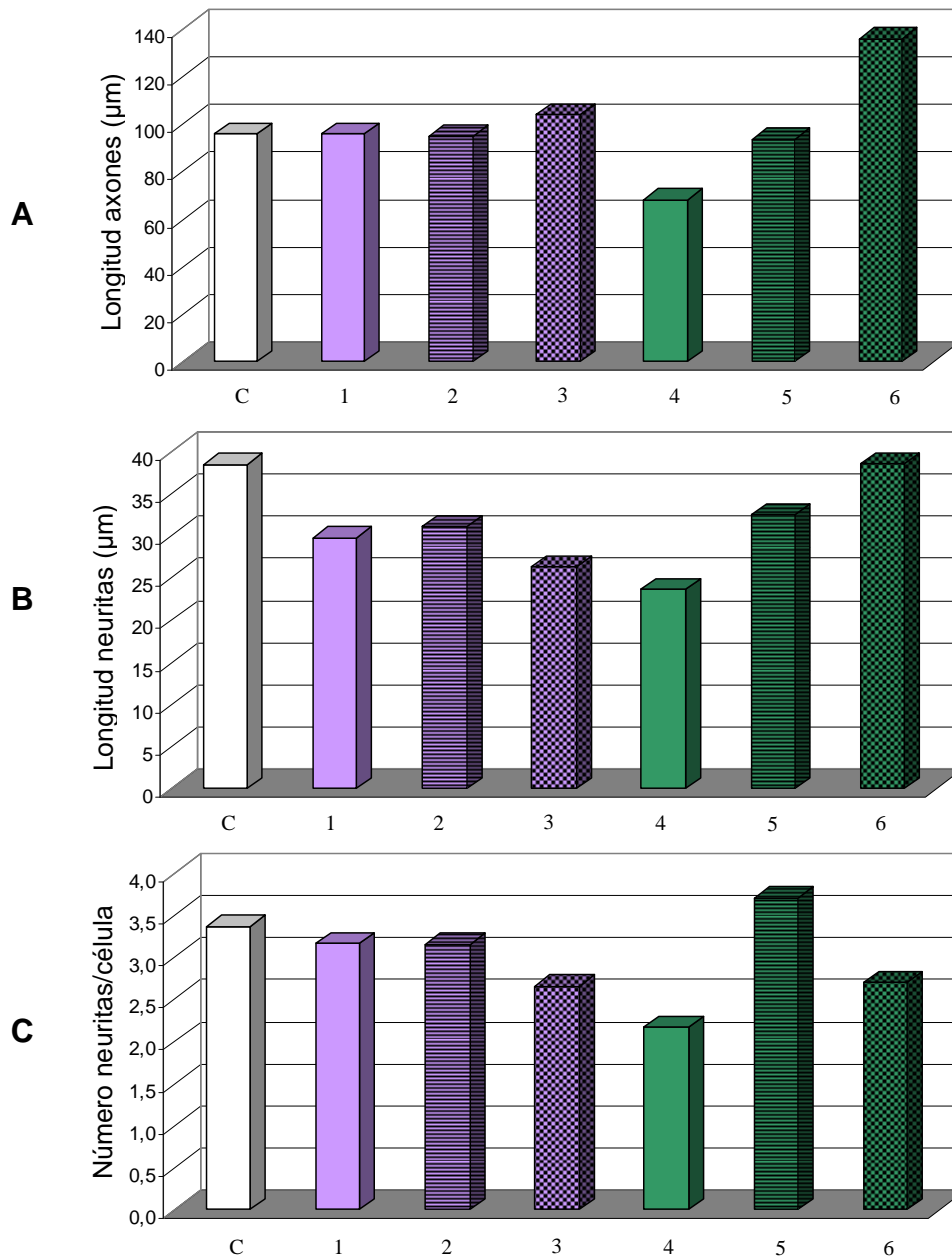


Figura 4.33. Efecto de hG1 (líneas 1-3) y $\Delta(1-6)$ hG1 (líneas 4-6) sobre la longitud de los axones (A) y neuritas (B) y sobre el número de neuritas por célula (C) en un cultivo de neuronas hipocampales. C, control; líneas 1 y 4, proteínas reducidas; líneas 2 y 5; proteínas recién oxidadas y estabilizadas con IAA; 3 y 6, proteínas oxidadas y no estabilizadas.

5. DISCUSIÓN

La búsqueda exhaustiva en los genomas secuenciados hasta la fecha de genes que codifiquen para galectinas revela la presencia en todos ellos de los tres tipos estructurales de galectinas existentes: proto, quimera y tándem-repetido. Desde el punto de vista filogenético, las galectinas de tipo tándem-repetido presentan un grado de diversificación mayor que las de tipo proto y quimera (Cooper, 2002; Kaltner y Gabius, 2012). En el caso de los mamíferos, estas galectinas no parecen divergir de un gen ancestral, sino derivar de linajes diferentes. Las galectinas 4 y 8, en concreto, tienen una similitud del 50% a nivel de los ácidos nucleicos y una identidad en la secuencia de aminoácidos del 34% (Hadari *et al.*, 1995). Ambas galectinas están codificadas por un solo gen. La galectina-4 se produce sin procesamiento post-transcripcional adicional, mientras que la galectina-8 sufre un procesamiento alternativo, generándose dos formas con diferente longitud del péptido conector: hG8 (34 aminoácidos) y hG8L (74 aminoácidos). Al igual que el resto de galectinas de tipo tándem-repetido, las galectinas 4 y 8 muestran un patrón de expresión característico, no redundante: la galectina-4 se expresa en intestino, colón y estómago (Chiu *et al.*, 1994), mientras que la expresión de la galectina-8 es alta en hígado, músculo y riñón, y baja o apenas detectable en intestino, testículos, timo y pulmón (Hadari *et al.*, 1995, 2000). Esta precisa regulación de la distribución de ambas galectinas sugiere que cada una desempeña funciones específicas distintas. De hecho, la galectina-4 está implicada en la enfermedad inflamatoria intestinal como mediador pro-inflamatorio o pro-apoptótico, mientras que la galectina-8 desempeña un importante papel en enfermedades autoinmunes como artritis reumatoide, lupus eritematoso y miastenia gravis, y es también un modulador fisiológico de la adhesión celular, siendo considerada una proteína matricelular debido a su papel dual en la adhesión para el mantenimiento de la integridad de los tejidos (Levy *et al.*, 2001, 2006; Nishi *et al.*, 2003; Carcamo *et al.*, 2006).

Evidentemente, la presencia de dos CRDs diferentes con distintas capacidades de unión y la proximidad y orientación de estos, previsiblemente determinada por el péptido conector, han de estar íntimamente relacionadas con la función biológica de estas galectinas. Sin embargo, hasta la fecha no ha sido posible resolver la estructura de una galectina de tipo tándem-repetido completa, por lo que la disposición relativa de los dominios no es conocida.

5.1. Propiedades hidrodinámicas y estructura global de hG4 y hG8

El análisis del comportamiento hidrodinámico por velocidad de sedimentación llevado a cabo en esta Tesis indica que tanto hG4 como hG8 son proteínas elongadas cuya forma global no parece diferenciarse en gran medida de la deducida para hG1, de tipo proto homodimérica, salvo por un aumento en la longitud proporcional a la masa molecular. Asimismo, el modelo obtenido para hG4 mediante SAXS muestra una organización extendida de la molécula, con

un extremo algo más voluminoso en el que, de acuerdo con el modelo generado por BUNCH, se situaría el dominio N-terminal y otro más estrecho y alargado, que correspondería al dominio C-terminal. El péptido conector estaría empaquetado entre ambos CRDs. De acuerdo con esta conclusión, el modelo obtenido para el mutante hG4V, en el que el péptido conector tiene sólo 17 aminoácidos frente a los 43 presentes en hG4, muestra una estructura más compacta, en la que los dos CRDs se encuentran más próximos entre sí. Cabe destacar que los parámetros hidrodinámicos calculados para los modelos obtenidos a partir de los datos de SAXS para hG4 y hG4V concuerdan satisfactoriamente con los datos obtenidos experimentalmente por velocidad de sedimentación, lo que respalda la validez de los modelos propuestos.

Teniendo en cuenta el número de aminoácidos del péptido conector en hG4 y hG4V, si éste estuviese completamente extendido su longitud sería del orden de 160 Å y 65 Å, respectivamente, valores claramente superiores a la distancia entre dominios en los modelos generados por BUNCH, lo que requiere que el péptido esté plegado, al menos parcialmente. De hecho, en la estructura del dominio C-terminal de hG4 (PDB 1X50), que contiene íntegramente el péptido conector de hG4V, se observa la presencia de una hebra F0 extra formada por aminoácidos del péptido. Por otra parte, las herramientas de predicción de estructura QUARK (modelado *ab initio*, Xu y Zhang, 2012) e I-TASSER (modelado comparativo basado en alineamientos alternativos múltiples), disponibles en <http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu>, tienden a generar modelos para el péptido de hG4 relativamente compactos (Figura 5.1A).

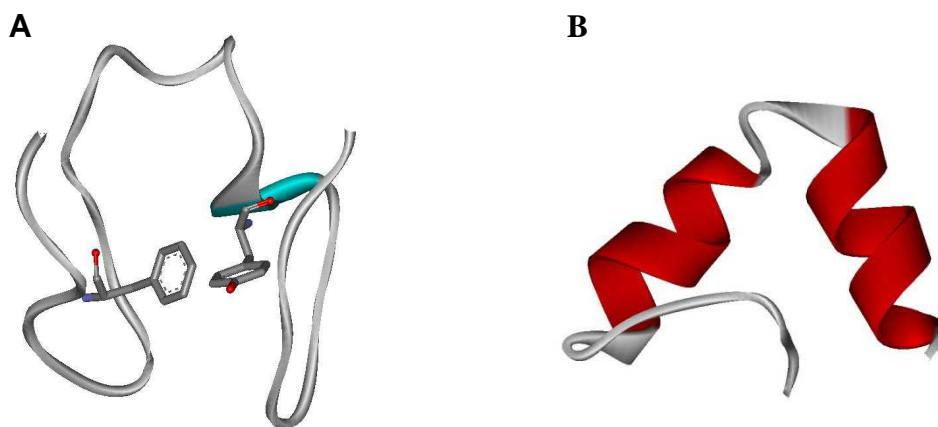


Figura 5.1. Ejemplo de los modelos generados por QUARK para el péptido conector de hG4 (A), en el que se destaca la disposición de los dos residuos aromáticos que contiene el péptido, y de hG8 (B).

Para hG8, los modelos sugieren incluso la presencia de al menos un segmento de hélice α (Figura 5.1B). En cualquier caso, los datos en conjunto indican que en ambas galectinas el péptido conector no está extendido, sino que adopta cierto plegamiento entre los CRDs N- y C-terminales.

Por otra parte, dado que el comportamiento hidrodinámico de hG8 es prácticamente idéntico al de hG4, parece razonable suponer que la forma global de ambas proteínas debe de ser muy similar, a pesar de que la secuencia del péptido conector de ambas galectinas es claramente diferente (Figura 4.1). Por tanto, el modelo obtenido para hG4, el cual ofrece la primera imagen de una galectina de tipo tándem-repetido, podría ser extrapolable a hG8 e incluso a otros miembros de este grupo estructural de galectinas.

5.2. Intercomunicación entre dominios en las galectinas

Se ha demostrado que la unión de lactosa a uno de los sitios de unión de hG1 provoca cambios en la dinámica de numerosos residuos en el monómero unido al ligando, que se transmiten a través de la interfase no covalente del homodímero al segundo monómero y tienen como resultado la aparición de cooperatividad negativa (Nesmelova *et al.*, 2010). En esta misma línea, se ha descrito que la presencia o ausencia de la región N-terminal de la galectina-3 afecta a la unión a ligandos del CRD (Seetharaman *et al.*, 1998). La menor estabilidad térmica de hG3 frente a hG3Tr, observada en esta Tesis, indica que la región N-terminal disminuye la estabilidad global de la proteína, que desnaturaliza como una única unidad cooperativa, lo que está de acuerdo con la existencia de interacciones entre los dominios N- y C-terminales. En el caso de las galectinas de tipo tándem-repetido, su actividad biológica depende de la integridad de la molécula (Levy *et al.*, 2006), lo que de manera inmediata se asocia a la presencia simultánea de dos CRDs diferentes. Sin obviar la indiscutible importancia de esta característica distintiva de las galectinas de tipo tándem-repetido, los resultados de esta Tesis sugieren además un papel del péptido conector en el establecimiento de una comunicación inter-dominios.

En primer lugar, los resultados de SAXS indican que la unión de lactosa induce una ligera compactación de hG4. Esta compactación, sin embargo, no se observa para hG4V, lo que hace pensar en un efecto indirecto sobre la región central de la molécula, constituida por el péptido conector, que necesariamente implica la transmisión más allá del sitio de unión de cambios inducidos por la unión del ligando. Estudios recientes demuestran además que el reconocimiento de ligandos en la superficie de células de neuroblastoma es diferente para hG4 y hG4V (Kopitz *et al.*, 2012), a pesar de que ambas formas contienen los dos CRDs inalterados. No obstante, también hay que considerar que la diferente longitud del péptido conector puede tener como resultado una orientación topológica distinta de los dos sitios de unión a carbohidratos, con posibles consecuencias en una hipotética unión simultánea de ambos dominios a la superficie celular.

En el caso de la galectina-8, el análisis comparativo de la estabilidad térmica de sus dos variantes naturales, hG8 y hG8L, revela diferentes comportamientos dependiendo de la

longitud del péptido conector. Para la forma extendida se observan claramente dos transiciones, que pueden asignarse a la desnaturalización independiente de los dos CRDs gracias al diferente efecto que sobre dichas transiciones tiene la presencia de ligandos específicos de uno y otro dominio. Sin embargo, en el caso de la especie mayoritaria, hG8, que presenta un péptido conector más corto, la desnaturalización térmica tiene lugar con una única transición cooperativa, lo que de nuevo sugiere una interrelación entre dominios.

La diferente estabilidad térmica del mutante hG8F19Y proporciona información muy interesante sobre este aspecto. Mientras que la temperatura de transición observada para hG8-N y hG8F19Y-N es similar, la estabilidad de la proteína completa aumenta significativamente en el mutante. La estructura cristalina del dominio N-terminal de ambas variantes, resuelta en paralelo por el grupo del Prof. Antonio Romero (Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC), ha proporcionado una base estructural para explicar este comportamiento.

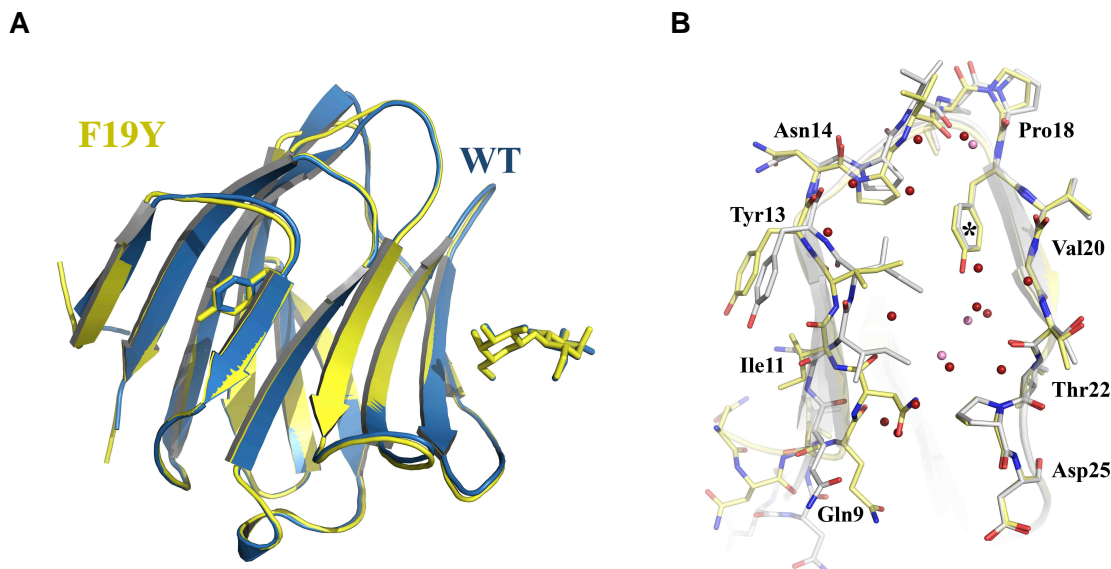


Figura 5.2. Efecto de la mutación F19Y en la estructura del dominio N-terminal de la galectina-8 unido a lactosa. **A)** Superposición de las estructuras de hG8-N (azul) y hG8F19Y-N (amarillo). **B)** Detalle del desplazamiento de la hebra F0 como consecuencia de la sustitución de la Phe19 por tirosina (señalada con un asterisco).

Si bien el sitio de unión en ambas proteínas es prácticamente idéntico, la mutación F19Y fuerza un desplazamiento de la hebra N-terminal F0, dispuesta de forma antiparalela a la hebra C-terminal F1 (Figura 5.2) que, en la proteína completa, precede al péptido conector. Parece razonable suponer que este desplazamiento en la interfase con la región formada por el péptido conector puede afectar a la estabilidad global de la molécula, e incluso transmitirse al CRD C-terminal, como ocurre para hG1. Las diferencias observadas en la unión de hG8 y hG8F19Y a lactosa apoyan esta hipótesis (véase más adelante).

En resumen, podría concluirse que, a pesar de las diferencias existentes entre los miembros de los tres grupos estructurales de galectinas, todas ellas exhiben interacciones entre los

diferentes dominios que las componen que, en el caso de las galectinas de tipo tándem-repetido, incluyen la región formada por el péptido conector. Es decir, la función de este péptido parece ir más allá de la de meramente determinar la distancia y orientación relativa de los CRDs, ejerciendo además de “intercomunicador” entre ellos.

5.3. Arquitectura del sitio de unión y reconocimiento de ligandos

El sitio de unión a carbohidratos y su especificidad por β -galactósidos están altamente conservados en toda la familia de las galectinas. Sin embargo, existen entre ellas pequeñas variaciones en la arquitectura del sitio de unión que se traducen en diferente afinidad y especificidad por oligosacáridos. Los resultados obtenidos en esta Tesis para hG4 y hG8 son un claro ejemplo de ello.

Por un lado, la afinidad por lactosa de los dos CRDs de la galectina-4 es similar y relativamente baja. Sin embargo, el efecto de las modificaciones en la posición 3 de la galactosa es diferente, lo que se explica, como se ha detallado en la sección de Resultados, por la variación en un residuo (Phe en hG4-N *versus* Ala en hG4-C) que puede intervenir en el establecimiento de contactos con sustituyentes hidrofóbicos en esa posición. Asimismo, se ha descrito que aunque ambos dominios de hG4 unen glicoesfingolípidos que contienen Gal-3-O-sulfato, la afinidad del CRD C-terminal es más alta que la del N-terminal. La unión de hG4 a los glicoesfingolípidos sulfatados presentes en la superficie celular parece ser la responsable de la actividad de esta galectina como modulador de la adhesión de células de adenocarcinoma de colon CCK-81 (Ideo *et al.*, 2002, 2005). Por otra parte, un estudio histoquímico de la unión al tejido colorectal de los CRDs de la galectina-4 de rata aislados ha demostrado que, aunque ambos CRDs tiñen el borde intercelular de las células epiteliales de la mucosa colorectal, lo hacen reconociendo estructuras subcelulares diferentes: el dominio N-terminal se une a los espacios intercelulares mientras que el dominio C-terminal se une a la membrana de las células que delimitan dichos espacios (Wasano y Hirakawa, 1999). Esta diferente selección de ligandos sugiere que la galectina-4 podría mediar las interacciones laterales entre las células del epitelio intestinal y, sobre todo, evidencia una diferente especificidad de unión de ambos dominios.

La importancia de los residuos situados en posiciones cercanas al sitio de unión primario, es decir, el construido por los residuos altamente conservados que están implicados en los contactos clave con la secuencia básica Gal β 1,3/4GlcNAc, es aún más evidente en el caso de hG8. Mientras que la afinidad del dominio C-terminal por lactosa es comparable a la observada para hG4, el dominio N-terminal muestra una afinidad muy superior. Un análisis detallado del sitio de unión en la estructura cristalina de hG8-N revela la presencia de dos residuos, Gln47, situado en la hebra S3, y Arg59, en el lazo que une las hebras S3 y S4, en

disposición adecuada para establecer enlaces de hidrógeno mediados por moléculas de agua con el OH-3 de la unidad de galactosa (Figura 5.3).

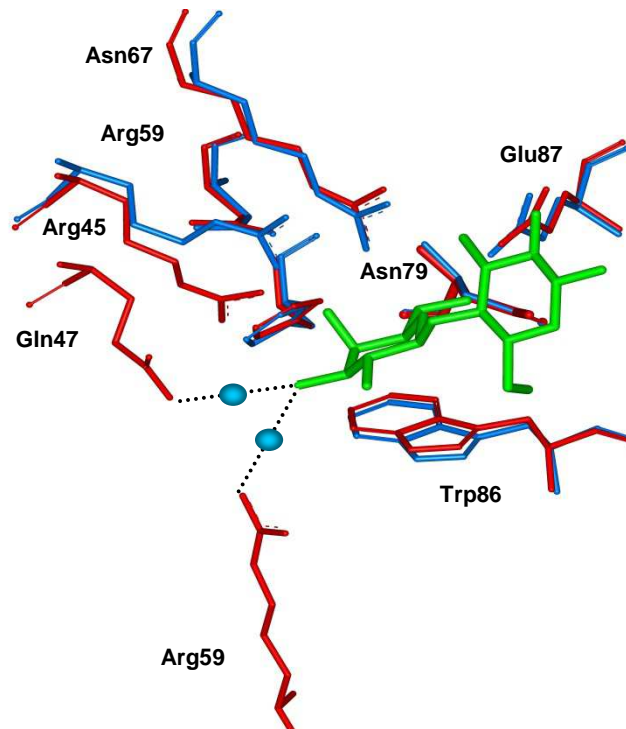


Figura 5.3. Superposición del sitio de unión a carbohidratos del dominio N-terminal de hG4 (azul) y hG8 (rojo) en complejo con lactosa (en verde). Los residuos Gln47 y Arg59 de hG8, ausentes en hG4, están implicados en la formación de enlaces de hidrógeno mediados por moléculas de agua con el OH-3 de la galactosa.

Ambos residuos pueden también participar en contactos directos con una unidad de ácido siálico unida en esa posición, contribuyendo al aumento en la afinidad de este dominio por la 3'-sialil-lactosa con respecto a la lactosa. Sin embargo, estos residuos no están presentes en el dominio C-terminal de hG8 ni en hG4-N/C, lo que explicaría la menor afinidad de estos CRDs por la lactosa y su incapacidad para unir 3'-sialil-lactosa. De este modo, la zona de la molécula que comprende la hebra S3 y el lazo S3-S4 parece decisiva en la modulación de la especificidad fina de unión a oligosacáridos de las galectinas.

El dominio N-terminal de hG8 también une glicoesfingolípidos sulfatados con alta afinidad, capacidad que tampoco comparte el dominio C-terminal (Ideo *et al.*, 2003). Por otra parte, un estudio realizado por citometría de fluorescencia demostró una unión extremadamente débil del CRD C-terminal aislado a células de ovario de hámster (CHO), en contraste con la intensa unión observada para hG8 y hG8L (Patnaik *et al.*, 2006). Estos resultados, junto con la baja afinidad que presenta el dominio C-terminal por lactosa y su incapacidad para unir galactósidos sializados o sulfatados, pueden llevar a pensar que el reconocimiento de glicoconjugados en la superficie celular por la galectina-8 depende del dominio N-terminal. Sin embargo, la unión a las células de este último dominio aislado también es mucho más

débil que la de las proteínas completas (Patnaik *et al.*, 2006). Resultados similares se obtuvieron al evaluar la capacidad de la galectina-8 de rata y de sus CRDs aislados para promover o inhibir la adhesión de células CHO, con consecuencias asimismo en la subsiguiente activación de cascadas de señalización (Levy *et al.*, 2006). Es decir, la unión a células de la galectina-8 parece involucrar de forma diferencial a ambos dominios.

En este punto, es interesante destacar que, según los datos de ITC, mientras la afinidad del dominio N-terminal de la galectina-8 no se ve afectada por la mutación F19Y, la afinidad del dominio C-terminal parece aumentar ligeramente en el mutante. En la misma línea, estudios preliminares indican que la concentración mínima de lactosa necesaria para inhibir la actividad hemaglutinante de hG8F19Y (1,0 mM) es algo menor que para hG8 (1,5 mM), lo que es compatible con un ligero aumento en la afinidad del mutante, y en concreto del dominio C-terminal, por el disacárido (resultados no mostrados). Estos datos sugieren que el desplazamiento antes descrito de la hebra F0 en hG8F19Y-N, además de aumentar la estabilidad global de la molécula, repercute en el comportamiento del CRD C-terminal. Aunque las consecuencias funcionales de estas pequeñas alteraciones y su relación con la presencia del mutante F19Y en enfermedades autoinmunes todavía se desconoce, los resultados obtenidos inciden en la trascendencia que las interacciones cooperativas entre dominios parecen tener en las galectinas de tipo tándem-repetido.

5.4. Plasticidad del CRD y efecto de la unión de ligandos

Existen numerosos datos que indican que el CRD de la galectina-1 exhibe una gran plasticidad, seguramente relacionada íntimamente con su función biológica. La estructura cristalina del mutante C2S de hG1 reveló que la introducción de esta sustitución provoca una serie de desplazamientos que se transmiten en cascada desde la interfase del homodímero hasta el sitio de unión, modificando los parámetros termodinámicos de la unión a lactosa (López-Lucendo *et al.*, 2004). Y viceversa, la unión de lactosa altera la dinámica de numerosos residuos a lo largo de la cadena polipeptídica, desde el sitio de unión hasta la interfase (Nesmelova *et al.*, 2010). Es más, los resultados del estudio sobre el mecanismo de oxidación de hG1 realizado en esta Tesis, sólo pueden explicarse asumiendo una extraordinaria flexibilidad del CRD. De hecho, la distribución en la estructura cristalina de hG1 de las cisteínas implicadas en los enlaces disulfuro que se observan en las primeras fases de la oxidación hace difícil concebir la formación de dichos enlaces sin que exista una considerable dinámica interna. Esta misma plasticidad puede ser, en parte, el origen de la relativamente alta estabilidad frente a la desnaturalización térmica de hG1, al permitir un incremento en la amplitud de las vibraciones de los aminoácidos al aumentar la temperatura sin que ello conlleve la ruptura de enlaces intramoleculares con la consiguiente pérdida de la

estructura.

A pesar de la gran homología del CRD, la estabilidad térmica de las demás galectinas estudiadas es en todos los casos menor que la de hG1, siendo la temperatura de transición para hG8 casi 20 °C menor. Evidentemente, la formación de una lámina β extendida como resultado de la homodimerización puede contribuir a la mayor estabilidad térmica de hG1. No obstante, si se compara la estabilidad de aquellas proteínas constituidas por un único CRD (es decir, hG3Tr, hG4-N/C y hG8-N/F19Y-N), también se observan diferencias significativas entre ellas. Es interesante resaltar que, tanto para hG4 como para hG8, el dominio N-terminal es más estable frente a la temperatura que el dominio C-terminal. A nivel molecular, estas diferencias probablemente sean el resultado de una combinación de factores derivados de las divergencias existentes en la secuencia de aminoácidos, el número de enlaces de hidrógeno o puentes salinos intramoleculares, un empaquetamiento más o menos eficiente del núcleo hidrofóbico, o la longitud de los lazos que conectan las hebras β entre sí (Razvi y Scholtz, 2006). En el caso de hG4 en concreto, la comparación de la estructura disponible para hG4-C y el modelo construido para hG4-N revela que los lazos que contiene el dominio C-terminal son más largos que los presentes en el N-terminal.

La presencia de lactosa o 3'-sialil-lactosa induce una serie de cambios en el espectro de DC en el UV cercano de todas las galectinas que indican que el CRD globalmente es sensible a la unión del ligando. Los cambios en el espectro son diferentes dependiendo de la proteína y también del ligando pero en todos los casos tienen como resultado un aumento de la estabilidad térmica. La magnitud de este aumento varía también en función de la galectina y del ligando y refleja, al menos en parte, las diferencias de afinidad de cada una de ellas por los ligandos. Las variaciones en la flexibilidad y/o dinámica del CRD inducidas por la unión del ligando, aparentemente específicas para cada galectina, pueden además ser importantes en la modulación de su función biológica. El ejemplo más llamativo es probablemente el que ejerce la unión de ligandos sobre la estabilidad de hG1 frente a la oxidación, especialmente considerando las actividades radicalmente diferentes que ejercen las formas reducida y oxidada de esta galectina.

5.5. Diversidad funcional de las galectinas

La selectiva expresión de las galectinas en tejidos y células lógicamente condiciona las funciones biológicas que éstas ejercen. Pero dichas funciones están también determinadas por las propiedades estructurales y especificidad de unión a ligandos de cada una de ellas. Los resultados presentados en esta Tesis demuestran la flexibilidad del CRD de las galectinas para adoptar las características específicas requeridas en cada caso y discriminar entre oligosacáridos que contienen β -galactósidos. La diferente capacidad de las galectinas

estudiadas para actuar como coadyuvantes de la actividad bactericida de los péptidos antimicrobianos refleja la complejidad de las relaciones estructura-función de las galectinas.

Se ha demostrado que las galectinas 4 y 8 son capaces de reconocer y destruir cepas de *Escherichia coli* que expresan antígenos del grupo sanguíneo B en su superficie (*E. coli* B+), mientras que no alteran la viabilidad de otras cepas de *E. coli* o de otras bacterias gram-positivas o gram-negativas, como *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* o *Pseudomonas aeruginosa* (Stowell *et al.*, 2010). Esta actividad aparentemente reside en el dominio C-terminal y está acompañada por la disrupción de la integridad de la membrana bacteriana. Por el contrario, hG1 no es capaz de unirse a *E. coli* B⁺ y aunque hG3 sí se une, no afecta a la viabilidad de la bacteria (Stowel *et al.*, 2010). Nuestros resultados confirman que ninguna de las galectinas investigadas tiene actividad bactericida por sí misma sobre *P. aeruginosa*. Sin embargo, son capaces de actuar en sinergia con péptidos antimicrobianos, aumentando la actividad bactericida de estos de forma espectacular en algunos casos. El perfil de actividad varía con respecto al observado para *E. coli* B⁺, ya que en *P. aeruginosa* son las galectinas 3 y 4 las que producen el máximo efecto, mientras que el efecto de hG1 y hG8 es mucho menor. Como se observa en otros sistemas y se ha descrito antes, la integridad de ambas galectinas es necesaria para que se dé su acción efectora, de modo que el aumento de la actividad bactericida de los péptidos en presencia de hG3Tr o de hG4-N y hG4-C aislados es mucho menor o incluso nulo.

Estudios preliminares indican que, al menos para hG1, la actividad observada puede ser debida a una desestabilización de la membrana bacteriana, como ocurre para *E. coli* B⁺, que facilita la acción de los péptidos antimicrobianos. No obstante, no se puede descartar que el mecanismo de acción de hG3 y hG4 sea diferente. De hecho, el notable efecto producido por hG1 oxidada, la cual carece de capacidad de unión a carbohidratos, hace más probable la existencia de diferentes mecanismos.

Esta nueva actividad, no descrita hasta la fecha, se suma a la larga lista de funciones que las galectinas desarrollan durante el establecimiento, desarrollo y resolución de procesos infecciosos. Como se ha demostrado para la galectina-1 y el VIH-1 (Ouellet *et al.*, 2005), el reconocimiento del patógeno por la galectina puede conducir a su entrecruzamiento con la célula huésped, promoviendo su adhesión y, por lo tanto, aumentando la eficacia del proceso infeccioso. Por otro lado, las galectinas también regulan la magnitud y calidad de la respuesta inmune e inflamatoria tras la infección. La actividad bactericida ejercida en sinergia con los péptidos antimicrobianos contribuiría también a la resolución del proceso infeccioso. El aumento simultáneo en la expresión y secreción extracelular de galectinas y péptidos en respuesta a la infección, así como el diferente efecto producido por hG1 reducida y oxidada, avalan la relevancia fisiológica de esta actividad sinérgica. Así, dado

que la secreción de la galectina-1 a los espacios extracelulares en donde podría desarrollar esta actividad puede conducir a su oxidación, como ocurre tras su externalización de neuronas y células de Schwann (Sango *et al.*, 2004), parece coherente que la forma oxidada tenga mayor actividad que la reducida. Se ha descrito que hG1ox actúa como una citoquina, uniéndose a un posible receptor en la superficie de los macrófagos y estimulando cambios en las vías de señalización que conducen a la secreción de un factor que promueve la regeneración axonal (Horie *et al.*, 2004). No es ilógico suponer que una estimulación similar de los macrófagos en los sitios de infección pudiera también favorecer la fagocitosis del patógeno. De este modo, la galectina-1 oxidada contribuiría por dos vías complementarias a la resolución de la infección, potenciando la actividad de los péptidos antimicrobianos y la de los macrófagos.

Por otra parte, la galectina-1 oxidada actúa como inhibidor del crecimiento de las neuritas en un cultivo de neuronas hipocampales, mientras que este efecto es significativamente menor o casi nulo para la forma reducida. De nuevo, la actividad de hG1ox podría ser el resultado de una activación de vías de señalización, como se ha observado, por ejemplo, para la proteína morfogenética ósea BMP-2, perteneciente a la superfamilia de los factores de crecimiento transformantes beta (Matsuura *et al.*, 2007). En el caso de la variante $\Delta(1-6)$ hG1, sin embargo, es la forma reducida la que exhibe esta actividad, que desaparece tras la oxidación. El comportamiento opuesto de hG1 y $\Delta(1-6)$ hG1 puede reflejar un cambio importante en la organización del CRD debido a la ausencia de los seis primeros aminoácidos del extremo N-terminal. La estructura tridimensional de $\Delta(1-6)$ hG1 podría proporcionar una valiosa información sobre sus relaciones estructura-función e incluso, teniendo en cuenta que esta variante parece haber adquirido propiedades características de hG1 oxidada, podría ayudar a esclarecer definitivamente el mecanismo de oxidación de hG1.

6. CONCLUSIONES

Conclusiones

1. Las galectinas de tipo tándem-repetido hG4 y hG8 se comportan en solución como monómeros, al igual que la galectina de tipo quimera hG3, mientras que hG1, de tipo proto, forma homodímeros no-covalentes. El comportamiento hidrodinámico indica que hG4 y hG8 son proteínas elongadas cuya forma global no parece diferenciarse en gran medida de la deducida para hG1, salvo por un aumento en la longitud proporcional a la masa molecular.
2. Se han obtenido modelos de la envoltura molecular y disposición de los CRDs de hG4 y hG4V, utilizando la técnica de SAXS. hG4 es una molécula extendida que presenta un extremo algo más voluminoso, en el que se situaría el dominio N-terminal, y otro más estrecho y alargado, que correspondería al dominio C-terminal. El péptido conector está plegado, al menos parcialmente, entre ambos CRDs. Los modelos ofrecen la primera imagen de una galectina de tipo tándem-repetido y podrían ser extrapolables a hG8 e incluso a otros miembros de este grupo estructural de galectinas.
3. La estabilidad térmica de las diferentes variantes de hG4 y hG8 estudiadas es significativamente inferior a la de hG3 y, especialmente, a la de hG1. Aunque la estabilidad de los CRDs N- y C-terminales es también diferente, ambas galectinas desnaturalizan como una única unidad cooperativa, con la única excepción de la variante extendida de hG8, hG8L, para la que se observan dos transiciones que pueden asignarse a la desnaturalización independiente de los dos CRDs. Este comportamiento, junto con los cambios asociados a la unión de ligandos en unas y otras variantes y el efecto que la mutación F19Y tiene sobre la estabilidad global de hG8, indica un papel del péptido conector en el establecimiento de una intercomunicación entre los CRDs.
4. La unión de ligandos induce una serie de cambios en la flexibilidad y/o dinámica interna de las proteínas que son visibles en los espectros de DC en el UV-cercano e indican que el CRD globalmente es sensible a la unión del ligando. Los cambios son diferentes dependiendo de la galectina y también del ligando pero en todos los casos tienen como resultado un aumento de la estabilidad térmica.
5. Los CRDs N- y C-terminales de hG4 y hG8 exhiben diferencias más o menos acusadas en su especificidad y afinidad por ligandos que derivan de pequeñas variaciones en la arquitectura del sitio de unión. En concreto, los residuos situados

en la hebra S3 y el lazo S3-S4 parecen influir decisivamente en la capacidad de unión a galactósidos sustituidos en posición 3, determinando por ejemplo la alta afinidad del CRD N-terminal de hG8 por lactosa y 3'-sialil-lactosa.

6. Todas las galectinas investigadas son capaces de potenciar la actividad bactericida de los péptidos antimicrobianos frente a *Pseudomonas aeruginosa*, aunque el efecto varía en gran medida dependiendo de la galectina. Para hG1 al menos, la actividad observada parece ser debida a una desestabilización de la membrana bacteriana que facilita la acción de los péptidos antimicrobianos. No obstante, el mecanismo de acción de las galectinas con mayor actividad sinérgica, es decir, hG3, hG4 y, especialmente, hG1 oxidada, pudiera ser diferente.
7. El análisis del mecanismo de oxidación de hG1 y el efecto diferencial que las formas reducidas y oxidadas de hG1 y de la variante $\Delta(1-6)$ hG1 tienen sobre el crecimiento de axones y neuritas en un cultivo de neuronas hipocampales demuestran un papel determinante de la cisteína en posición 2 de hG1 en las relaciones estructura-función de esta galectina. La formación de diferentes enlaces disulfuro intramoleculares al inicio del proceso de oxidación indica que el CRD de hG1 exhibe una extraordinaria plasticidad.

7. BIBLIOGRAFÍA

Bibliografía

- Ahmad N, Gabius H J, Andre S, Kaltner H, Sabesan S, Roy R, Liu B, Macaluso F y Brewer C F (2004). Galectin-3 precipitates as a pentamer with synthetic multivalent carbohydrates and forms heterogeneous cross-linked complexes. *J. Biol. Chem.* 279: 10841-10847.
- Alcorlo M, Jimenez M, Ortega A, Hermoso J M, Salas M, Minton A P y Rivas G (2009). Analytical ultracentrifugation studies of phage phi29 protein p6 binding to DNA. *J. Mol. Biol.* 385: 1616-1629.
- Alvarez C P, Lasala F, Carrillo J, Muñiz O, Corbí A L y Delgado R (2002). C-Type Lectins DC-SIGN and L-SIGN Mediate Cellular Entry by Ebola Virus in *cis* and in *trans*. *Journal of Virology* 76(13): 6841–6844.
- Anderluh M, Jug G, Svajger U y Obermaler N (2012). DC-SIGN Antagonists, a Potential New Class of Anti-Infectives. *Curr. Med. Chem.* 19 (7): 992-1007.
- André S, Pei Z, Siebert H-C, Ramström O y Gabius H-J (2006). Glycosyldisulfides from dynamic combinatorial libraries as O-glycoside mimetics for plant and endogenous lectins: Their reactivities in solid-phase and cell assays and conformational analysis by molecular dynamics simulations. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 14: 6314–6326.
- Andreu J M., Bordas J, Díaz J F, García de Ancos J, Gil R, Medrano F J, Nogales E, Pantos E y Towns-Andrews E (1992). Low resolution structure of microtubules in solution. Synchrotron X-ray scattering and electron microscopy of taxol-induced microtubules assembled from purified tubulin in comparison with glycerol and MAP-induced microtubules. *J. Mol. Biol.* 22: 169-184.
- Aronson M, Medalia O, Schori L, Mirelman D, Sharon N y Ofek I (1979). Prevention of colonization of the urinary tract of mice with *Escherichia coli* by blocking of bacterial adherence with methyl alpha-D-mannopyranoside; *J. Infect. Dis.* 139: 329-332.
- Asakura H, Kashio Y, Nakamura K, Seki M, Dai S, Shirato Y, Abedin M J, Yoshida N, Nishi N, Imaizumi T, Saita N, Toyama Y, Takashima H, Nakamura T, Ohkawa M y Hirashima M (2002). Selective eosinophil adhesion to fibroblast via IFN-gamma-induced galectin-9; *J. Immunol.* 169: 5912-5918.
- Baeuerle PA, Henkel T (1994). Function and activation of NF-kappa B in the immune system. *Ann. Rev. Immunol.* 12:141-179.
- Barkai-Golan R, Mirelman D y Sharon N (1978). Studies on growth inhibition by lectins of *Penicillia* and *Aspergilli*; *Arch. Microbiol.* 116: 119-121.
- Barondes S H, Castronovo V, Cooper D N, Cummings R D, Drickamer K, Feizi T, Gitt M A, Hirabayashi J, Hughes C y Kasai K, Leffler H, Lui F-T, Lotan R, Mercurio A M, Monsigny M, Pillai S, Poirer F, Raz A, Rigny P W J, Rini J M y Wang J L (1994). Galectins: a family of animal beta-galactoside-binding lectins. *Cell* 76: 597-598.
- Barrès C, Blanc L, Bette-Bobillo P, André S, Mamoun R, Gabius H J y Vidal M (2010). Galectin-5 is bound onto the surface of rat reticulocyte exosomes and modulate vesicle uptake by macrophages. *Blood* 115: 696-705.
- Barrow H, Guo X, Wandall H H, Pedersen J W, Fu B, Zhao Q, Chen C, Rhodes J M y Yu L G. (2011a). Serum galectins -2, -4 and -8 are greatly increased in colon and breast

- cancer patients and promote cancer cell adhesion to blood vascular endothelium. *Clin. Cancer Res.* 17 (22): 7035-46.
- Baum L G, Pang M, Perillo N L, Wu T, Delegeane A, Uittenbogaart C H, Fukuda M y Seilhamer J J (1995). Human thymic epithelial cells express an endogenous lectin, galectin-1, which binds to core 2 O-glycans on thymocytes and T lymphoblastoid cells. *J. Exp. Med.* 181: 877-887.
- Bellac C L, Coimbra R S, Simon F, Imboden H y Leib S L (2007). Gene and protein expression of galectin-3 and galectin-9 in experimental pneumococcal meningitis. *Neurobiol. Dis.* 28: 175-183.
- Bengoechea J A, Díaz R y Moriyón I (1996). Outer Membrane Differences between Pathogenic and Environmental *Yersinia enterocolitica* Biogroups Probed with Hydrophobic Permeants and Polycationic Peptides. *Infection and Immunity* 64 (12): 4891-4899.
- Bengoechea J A, Najdenski H y Skurnik M (2004). Lipopolysaccharide O antigen status of *Yersinia enterocolitica* O:8 is essential for virulence and absence of O antigen affects the expression of other *Yersinia* virulence factors. *Mol. Biol.* 52: 451-469.
- Bi S, Earl L A, Jacobs L y Baum L G (2008). Structural features of galectin-9 and galectin-1 that determine distinct T cell death pathways. *J. Biol. Chem.* 283: 12248-12258.
- Bibiloni R y Schiffrin E J (2010). Intestinal Host-Microbe Interactions under Physiological and Pathological Conditions. *International Journal of Inflammation* 386956: 8 paginas.
- Blanc L y Vidal M (2010). Reticulocyte membrane remodeling: contribution of the exosome pathway. *Curr. Opin. Hematol.* 17(3):177-83.
- Boyd W C y Shapleigh E (1954). Antigenic relations of blood group antigens as suggested by tests with lectins. *J. Immunol.* 73(4): 226-31.
- Bradford M M (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding; *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Brahms S y Brahms J (1980). Determination of protein secondary structure in solution by vacuum ultraviolet circular dichroism. *J. Mol. Biol.* 138: 149-178.
- Brewer C F, Miceli M C y Baum L G (2002). Clusters, bundles, arrays and lattices: novel mechanisms for lectin-saccharide-mediated cellular interactions. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 12: 616-623.
- Califice S, Castronovo V y Van den B F (2004) Galectin-3 and cancer (Review). *Int. J. Oncol.* 25: 983-992.
- Camby I, Le M M, Lefranc F y Kiss R (2006). Galectin-1: a small protein with major functions. *Glycobiology* 16: 137R-157R.
- Campanero-Rhodes M A, Menéndez M, Sáiz J L, Sanz L, Calvete J J y Solís D (2005). Analysis of the stability of the spermadhesin PSP-I/PSP-II heterodimer. *FEBS Journal* 272: 5663-5670.
- Campos M A, Morey P y Bengoechea J A (2006). Quinolones sensitize gram-negative bacteria to antimicrobial peptides. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50: 2361-2367.

- Cárcamo C, Pardo E, Oyanadel C, Bravo-Zehnder M, Bull P, Cáceres M, Martínez J, Massardo L, Jacobelli S, González A, Soza A (2006). Galectin-8 binds specific beta1 integrins and induces polarized spreading highlighted by asymmetric lamellipodia in Jurkat T cells. *Exp. Cell. Res.* 312(4):374-86.
- Carlsson S, Oberg CT, Carlsson MC, Sundin A, Nilsson UJ, Smith D, Cummings RD, Almkvist J, Karlsson A, Leffler H (2007). Affinity of galectin-8 and its carbohydrate recognition domains for ligands in solution and at the cell surface. *Glycobiology* 17:663-676.
- Cash H L, Whitham C V, Behrendt C L y Hooper L V (2006). Symbiotic bacteria direct expression of an intestinal bactericidal lectin. *Science* 313: 1126-1130.
- Chacon P, Moran F, Diaz J F, Pantos E y Andreu J M (1998). Low-resolution structures of proteins in solution retrieved from X-ray scattering with a genetic algorithm. *Biophys. J.* 74: 2760-2775.
- Chacón P, Díaz J F, Morán F y Andreu J M (2000). Reconstruction of protein form with X-ray solution scattering and a genetic algorithm. *J. Mol. Biol.* 299: 1289-1302.
- Chang-Hong R, Wada M, Koyama S, Kimura H, Arawaka S, Kawanami T, Kurita K, Kadoya T, Aoki M, Itoyama Y y Kato T (2005). Neuroprotective effect of oxidized galectin-1 in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Exp. Neurol.* 194: 203-211.
- Charalambous K, O'Reilly A O, Bullough P A y Wallace B A (2009). Thermal and chemical unfolding and refolding of a eukaryotic sodium channel. *Biochim. Biophys. Acta* 1788: 1279-1286.
- Cooper D N (2002). Galectinomics: finding themes in complexity. *Biochim. Biophys. Acta* 1572: 209-231.
- Craig S S, Krishnaswamy P, Irani A M, Kepley C L, Liu F T y Schwartz L B (1995). Immunoelectron microscopic localization of galectin-3, an IgE binding protein, in human mast cells and basophils. *Anat. Rec.* 242: 211-219.
- Cummings R D y Liu F T (2009). Galectins. In: *Essentials of Glycobiology 2nd edition*. Varki A, Cummings R D, Esko J D *et al*, editors. Cold Spring Harbor (NY).
- Dahms N M, Lobel P y Kornfeld S (1989). Mannose 6-phosphate receptors and lysosomal enzyme targeting. *J. Biol. Chem.* 264:12115-12118.
- Dam T K, Roy R, Page D y Brewer C F (2002). Negative cooperativity associated with binding of multivalent carbohydrates to lectins. Thermodynamic analysis of the "multivalency effect"; *Biochemistry* 41: 1351-1358.
- Dam T K y Brewer C F (2010). Lectins as pattern recognition molecules: the effects of epitope density in innate immunity. *Glycobiology* 20: 270-279.
- Davicino R C, Elicabe R J, Di Genaro M S y Rabinovich G A (2011). Coupling pathogen recognition to innate immunity through glycan-dependent mechanisms. *Int. Immunopharmacol.* 11: 1457-1463.
- De Waard A, Hickman S y Kornfeld S (1976). Isolation and properties of beta-galactoside binding lectins of calf heart and lung. *J. Biol. Chem.* 251, 7581-7587.
- Di Lella S, Marti M A, Alvarez R M, Estrin D A y Ricci J C (2007). Characterization of the

- galectin-1 carbohydrate recognition domain in terms of solvent occupancy. *J. Phys. Chem. B.* 111: 7360-7366.
- Díaz-Mauriño T, Castro C y Albert A (1982). Desialylation of fibrinogen with neuraminidase. Kinetic and clotting studies. *Thrombosis Research* 27(4): 397-403.
- Divne C, Stahlberg J, Reinikainen T, Ruohonen L, Pettersson G, Knowles J K, Teeri T T y Jones T A (1994). The three-dimensional crystal structure of the catalytic core of cellobiohydrolase I from *Trichoderma reesei*. *Science* 265: 524-528.
- Doniach S (2001). Changes in biomolecular conformation seen by small angle X-ray scattering. *Chem. Rev.* 101: 1763-1778.
- Drickamer K (1989). Multiple subfamilies of carbohydrate recognition domains in animal lectins. *Ciba Found. Symp.* 145: 45-58, discussion.
- Dubois M, Gilles K, Hamilton H K, Rebers P A y Smith F (1951). A colorimetric method for the determination of sugars. *Nature* 168(4265):167.
- Dumic J, Dabelic S y Flogel M (2006). Galectin-3: an open-ended story. *Biochim. Biophys. Acta* 1760: 616-635.
- Earl L A, Bi S y Baum L G (2011). Galectin multimerization and lattice formation are regulated by linker region structure. *Glycobiology* 21: 6-12.
- Farnworth S L, Henderson N C, MacKinnon A C, Atkinson K M, Wilkinson T, Dhaliwal K, Hayashi K, Simpson A J, Rossi A G, Haslett C y Sethi T (2008). Galectin-3 reduces the severity of pneumococcal pneumonia by augmenting neutrophil function. *Am. J. Pathol.* 172: 395-405.
- Flexner S y Noguchi H (1902). Snake venom in relation to haemolysis, bacteriolysis, and toxicity. *J. Exp. Med.* 6: 277-301.
- Flotte T J, Springer T A y Thorbecke G J (1983). Dendritic cell and macrophage staining by monoclonal antibodies in tissue sections and epidermal sheets. *Am. J. Pathol.* 111: 112-124.
- Forsman H, Islander U, Andreasson E, Andersson A, Onnheim K, Karlstrom A, Savman K, Magnusson M, Brown K L y Karlsson A (2011). Galectin 3 aggravates joint inflammation and destruction in antigen-induced arthritis. *Arthritis Rheum.* 63: 445-454.
- Franke D y Svergun D I (2009). DAMMIF, a program for rapid ab-initio shape determination in small-angle scattering. *J. Appl. Cryst.* 34: 33-41.
- Freire, E., Mayorga, O. L y Straume, M (1990). Isothermal titration. *Anal. Chem.* 62: 950A.
- Fukaya K, Hasegawa M, Mashitani T, Kadoya T, Horie H, Hayashi Y, Fujisawa H, Tachibana O, Kida S y Yamashita J (2003). Oxidized galectin-1 stimulates the migration of Schwann cells from both proximal and distal stumps of transected nerves and promotes axonal regeneration after peripheral nerve injury. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 62: 162-172.
- Gabius H J (1997). Animal lectins. *Eur. J. Biochem.* 243: 543-576.
- Gabius H J, Siebert H C, Andre S, Jimenez-Barbero J y Rudiger H (2004). Chemical biology of the sugar code. *ChemBiochem.* 5: 740-764.

- Gabius H J y Wu A M (2006). The emerging functionality of endogenous lectins: A primer to the concept and a case study on galectins including medical implications. *Chang Gung. Med. J.* 29: 37-62.
- Gabius H J, André S, Jiménez-Barbero J, Romero A y Solís D (2011). From lectin structure to functional glycomics: principles of the sugar code (Review). *Trends in Biochemical Sciences* 36: 298-313.
- García de la Torre J, Navarro S, López Martínez M.C, Díaz F G y López Cascales J J (1994). HYDRO: a computer program for the prediction of hydrodynamic properties of macromolecules. *Biophys. J.* 67: 530-531.
- García de la Torre J, Huertas M L y Carrasco B (2000). Calculation of hydrodynamic properties of globular proteins from their atomic-level structure. *Biophys. J.* 78: 719-730.
- Gitt M A, Colnot C, Poirier F, Nani K J, Barondes S H y Leffler H (1998). Galectin-4 and galectin-6 are two closely related lectins expressed in mouse gastrointestinal tract. *J. Biol. Chem.* 273(5): 2954-60.
- Goldring K, Jones G E, Thiagarajah R y Watt D J (2002). The effect of galectin-1 on the differentiation of fibroblasts and myoblasts in vitro. *J. Cell Sci.* 115: 355-366.
- Goslin K y Banker Gary (1989). Experimental Observations on the Development of Polarity by Hippocampal Neurons in Culture. *The Journal of Cell Biology* 108: 1507-1516
- Guinier A (1939). La diffraction des rayons X aux tres peptits angles; Application a létude de phenomenes ultramicroscopiques. *Ann. Phys.* 12: 161-237.
- Hadari Y R, Paz K, Dekel R, Mestrovic T, Accili D, Zick Y (1995). Galectin-8. A new rat lectin, related to galectin-4. *J Biol Chem* 270(7): 3447-53.
- Hadari Y R, Arbel-Goren R, Levy Y, Amsterdam A, Alon R, Zakut R y Zick Y (2000). Galectin-8 binding to integrins inhibits cell adhesion and induces apoptosis. *J. Cell. Sci.* 113: 2385-97.
- Hardman K D y Ainsworth C F (1972). Structure of concanavalin A at 2.4 Å resolution. *Biochemistry* 11: 4910-4919.
- Hillenkamp F, Karas M, Beavis R C y Chait B T (1991). Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of biopolymers. *Anal. Chem.* 63: 1193A-1203A.
- Hirabayashi J y Kasai K (1991). Effect of amino acid substitution by sited-directed mutagenesis on the carbohydrate recognition and stability of human 14-kDa beta-galactoside-binding lectin. *J. Biol. Chem.* 266: 23648-23653.
- Hirabayashi J y Kasai K (1993). The family of metazoan metal-independent beta-galactoside-binding lectins: structure, function and molecular evolution. *Glycobiology* 3: 297-304.
- Hoffmann JA, Kafatos FC, Janeway CA, Ezekowitz RA. 1999. Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science* 284(518):1313-1318.
- Holgerson J, Gustafsson A y Gaunitz S (2009). Bacterial and Viral Lectins. In : The Sugar Code. Fundamentals of glycosciences. Gabius H J, editor. Weinheim, Germany; Wiley-VCH, pg. 279-299.

- Horgan I E (1981). A modified spectrophotometric method for determination of nanogram quantities of sialic acid; *Clin. Chim. Acta* 116: 409-415.
- Horie H, Inagaki Y, Sohma Y, Nozawa R, Okawa K, Hasegawa M, Muramatsu N, Kawano H, Horie M, Koyama H, Sakai I, Takeshita K, Kowada Y, Takano M y Kadoya T (1999). Galectin-1 regulates initial axonal growth in peripheral nerves after axotomy; *J. Neurosci.* 19: 9964-9974.
- Horie H y Kadoya T (2000). Identification of oxidized galectin-1 as an initial repair regulatory factor after axotomy in peripheral nerves. *Neurosci. Res.* 38: 131-137.
- Horie H, Kadoya T, Hikawa N, Sango K, Inoue H, Takeshita K, Asawa R, Hiroi T, Sato M, Yoshioka T y Ishikawa Y (2004). Oxidized galectin-1 stimulates macrophages to promote axonal regeneration in peripheral nerves after axotomy. *J. Neurosci.* 24:1873-1880.
- Ideo H, Seko A, Ohkura T, Matta KL, Yamashita K (2002). High-affinity binding of recombinant human galectin-4 to SO(3)(-)->3Galbeta1-->3GalNAc pyranoside. *Glycobiology* 3:199-208.
- Ideo H, Seko A, Ishizuka I y Katsuko Y (2003). The N-terminal carbohydrate recognition domain of galectin-8 recognizes specific glycosphingolipids with high affinity. *Glycobiology* 13: 713-723.
- Ideo H, Seko A, Yamashita K (2005). Galectin-4 binds to sulfated glycosphingolipids and carcinoembryonic antigen in patches on the cell surface of human colon adenocarcinoma cells. *J Biol Chem.* 280(6):4730-7.
- Ilarregui J M y Rabinovich G A (2010). Tolerogenic dendritic cells in the control of autoimmune neuroinflammation: an emerging role of protein-glycan interactions. *Neuroimmunomodulation.* 17: 157-160.
- Imaizumi T, Kumagai M, Sasaki N, Kurotaki H, Mori F, Seki M, Nishi N, Fujimoto K, Tanji K, Shibata T, Tamo W, Matsumiya T, Yoshida H, Cui X F, Takanashi S, Hanada K, Okumura K, Yagihashi S, Wakabayashi K, Nakamura T, Hirashima M y Satoh K (2002). Interferon-gamma stimulates the expression of galectin-9 in cultured human endothelial cells. *J. Leukoc. Biol.* 72: 486-491.
- Inagaki Y, Sohma Y, Horie H, Nozawa R y Kadoya T (2000). Oxidized galectin-1 promotes axonal regeneration in peripheral nerves but does not possess lectin properties. *Eur. J. Biochem.* 267: 2955-2964.
- Irie A, Yamauchi A, Kontani K, Kihara M, Liu D, Shirato Y, Seki M, Nishi N, Nakamura T, Yokomise H, Hirashima M (2005). Galectin-9 as a prognostic factor with antimetastatic potential in breast cancer. *Clin. Cancer. Res.* 11:2962-2968.
- Iqbal A J, Sampaio A L, Maione F, Greco K V, Niki T, Hirashima M, Perretti M y Cooper D (2011). Endogenous galectin-1 and acute inflammation: emerging notion of a galectin-9 pro-resolving effect. *Am. J. Pathol.* 178: 1201-1209.
- Janzen D H, Juster H B y Liener I E (1976). Insecticidal action of the phytohemagglutinin in black beans on a bruchid beetle. *Science* 192: 795-796.
- Jacques D A y Trewhella J (2010). Small-angle scattering for structural biology-Expanding the frontier while avoiding the pitfalls (Review). *Protein Science*; Published by Wiley-Blackwell.

- Kadoya T y Horie H (2005). Structural and functional studies of galectin-1: a novel axonal regeneration-promoting activity for oxidized galectin-1. *Curr. Drug Targets*. 6: 375-383.
- Kahn P C (1979). The interpretation of near-ultraviolet circular dichroism. *Methods Enzymol.* 61: 339-378.
- Kalsi G y Etzler M E (2000). Localization of a Nod factor-binding protein in legume roots and factors influencing its distribution and expression. *Plant Physiol.* 124: 1039-1048.
- Kaltner H, Solís D, Kopitz J, Lensch M, Lohr M, Manning H C, Mürnseer M, Schnölzer M, André S, Sáiz J L y Gabius H J (2008). Prototype chicken galectins revisited: characterization of a third protein with distinctive hydrodynamic behaviour and expression pattern in organs of adult animals. *Biochem J.* 409: 591-599.
- Kaltner H, Kübler D, López-Merino L, Lohr M, Manning J C, Lensch M, Seidler J, Lehmann W D, André S, Solís D y Gabius H-J (2011). Toward Comprehensive Analysis of the Galectin Network in Chicken: Unique Diversity of Galectin-3 and Comparison of its Localization Profile in Organs of Adult Animals to the Other Four Members of this Lectin Family. *The Anatomical Record* 294: 427-444.
- Kaltner H y Gabius H-J (2012). A toolbox of lectins for translating the sugar code: the galectin network in phylogenesis and tumors. *Histol Histopathol* 27(4): 397-416.
- Karlsson A, Christenson K, Matlak M, Bjorstad A, Brown K L, Telemo E, Salomonsson E, Leffler H y Bylund J (2009). Galectin-3 functions as an opsonin and enhances the macrophage clearance of apoptotic neutrophils. *Glycobiology* 19: 16-20.
- Kasai K y Hirabayashi J (1996). Galectins: a family of animal lectins that decipher glycocodes. *J. Biochem.* 119: 1-8.
- Kashio Y, Nakamura K, Abedin M J, Seki M, Nishi N, Yoshida N, Nakamura T y Hirashima M (2003). Galectin-9 induces apoptosis through the calcium-calpain-caspase-1 pathway. *J. Immunol.* 170: 3631-3636.
- Keitel T, Simon O, Borriss R y Heinemann U (1993). Molecular and active-site structure of a Bacillus 1,3-1,4-beta-glucanase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90: 5287-5291.
- Kohatsu L, Hsu D K, Jegalian A G, Liu F T y Baum L G (2006). Galectin-3 induces death of Candida species expressing specific beta-1,2-linked mannans. *J. Immunol.* 177: 4718-4726.
- Koch M H, Vachette P y Svergun D I (2003). Small-angle scattering: a view on the properties, structures and structural changes of biological macromolecules in solution. *Q. Rev. Biophys.* 36: 147-227.
- Konarev P V, Petoukhov M V, Volkov V V y Svergun D I (2006). ATSAS 2.1, a program package for small-angle scattering data analysis. *J. Appl. Cryst.* 39: 277-286.
- Kopitz J, Russwurm R, Kaltner H, André S, Dotti C G, Gabius H J y Abad-Rodríguez J (2004). Hippocampal neurons and recombinant galectins as tools for systematic carbohydrate structure-function studies in neuronal differentiation. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 153(2): 189-96.
- Kopitz J, Ballikaya S, André S, Gabius H-J (2011). Ganglioside GM1/Galectin-Dependent Growth Regulation in Human Neuroblastoma Cells: Special Properties of Bivalent Galectin-4 and Significance of Linker Length for Ligand Selection. *Neurochem. Res.* 37(6): 1267-76.

- Kozin M B y Svergun D I (2001). Automated matching of high- and low-resolution structural models. *J. Apply. Cryst.* 36: 1277-1282.
- Krejcirikova V, Pachi P, Fabry M, Maly P, Rezacova P y Brynda J (2011). Structure of the mouse galectin-4 N-terminal carbohydrate-recognition domain reveals the mechanism of oligosaccharide recognition. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 67: 204-211.
- Kurushima H, Ohno M, Miura T, Nakamura T Y, Horie H, Kadoya T, Ooboshi H, Kitazono T, Ibayashi S, Iida M y Nakabeppu Y (2005). Selective induction of DeltaFosB in the brain after transient forebrain ischemia accompanied by an increased expression of galectin-1, and the implication of DeltaFosB and galectin-1 in neuroprotection and neurogenesis. *Cell Death. Differ.* 12: 1078-1096.
- Laemmli U K (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Laue T M (1997). Advances in sedimentation velocity analysis. *Biophys. J.* 72: 395-396.
- Lebowitz J, Lewis M S y Schuck P (2002). Modern analytical ultracentrifugation in protein science: a tutorial review. *Protein Sci.* 11: 2067-2079.
- Lee R T y Lee Y C (2000). Affinity enhancement by multivalent lectin-carbohydrate interaction. *Glycoconj. J.* 17: 543-551.
- Lefranc F, Mijatovic T, Decaestecker C, Kaltner H, Andre S, Brotchi J, Salmon I, Gabius H J y Kiss R (2005). Monitoring the expression profiles of integrins and adhesion/growth-regulatory galectins in adamantinomatous craniopharyngiomas: their ability to regulate tumor adhesiveness to surrounding tissue and their contribution to prognosis. *Neurosurgery* 56: 763-776.
- Lehrer R I, Reosenman M, Harwig S S, Jackson R y Eisenhauer P (1991). Ultrasensitive assay for endogenous antimicrobial polypeptides. *J. Immunol. Methods* 137: 167-173.
- Lehrer R I (2009). Small Is Beautiful: Mini-Lectins in Host Defense. In: The Sugar Code. Fundamentals of glycosciences. Gabius H J editor, Weinheim, Germany; Wiley-VCH, pg. 433-445.
- Levi G y Teichberg V I (1985). Isolation and physicochemical characterization of electrolectin, a beta-D-galactoside binding lectin from the electric organ of *Electrophorus electricus*. *Biochem. J.* 226: 379-384.
- Levy Y, Arbel-Goren R, Hadari Y R, Eshhar S, Ronen D, Elhanany E, Geiger B y Zick Y (2001). Galectin-8 functions as a matricellular modulator of cell adhesion. *J Biol Chem* 276(33): 31285-95.
- Levy Y, Auslender S, Eisenstein M, Vidavski R R, Ronen D, Bershadsky A D y Zick Y (2006). It depends on the hinge: a structure-functional analysis of galectin-8, a tandem-repeat type lectin. *Glycobiology* 16(6): 463-76.
- Levroney E L, Aguilar H C, Fulcher J A, Kohatsu L, Pace K E, Pang M, Gurney K B, Baum L G y Lee B (2005). Novel innate immune functions for galectin-1: galectin-1 inhibits cell fusion by Nipah virus envelope glycoproteins and augments dendritic cell secretion of proinflammatory cytokines. *J. Immunol.* 175: 413-420.

- Liu F T, Hsu D K, Zuberi R I, Kuwabara I, Chi E Y y Henderson W R, Jr. (1995). Expression and function of galectin-3, a beta-galactoside-binding lectin, in human monocytes and macrophages. *Am. J. Pathol.* 147: 1016-1028.
- Liu F T y Rabinovich G A (2010). Galectins: regulators of acute and chronic inflammation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1183: 158-182.
- Loh B, Grant C y Hancock R E W (1984). Use of fluorescent probe 1-N-Phenyl-naphthylamine to study the interactions of aminoglycoside antibiotics with the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 26 (4): 546-551.
- López-Lucendo M F, Solís D, Andre S, Hirabayashi J, Kasai K, Kaltner H, Gabius H J y Romero A (2004). Growth-regulatory human galectin-1: crystallographic characterisation of the structural changes induced by single-site mutations and their impact on the thermodynamics of ligand binding. *J. Mol. Biol.* 343: 957-970.
- López-Lucendo M F, Solís D, Sáiz J L, Kaltner H, Ruswurm R, André S, Gabius H J y Romero A (2009). Homodimeric Chicken Galectin CG-1B (C-14): Crystal Structure and Detection of Unique Redox-Dependent Shape Changes Involving Inter- and Intrasubunit Disulfide Bridges by Gel Filtration, Ultracentrifugation, Site-Directed Mutagenesis, and Peptide Mass Fingerprinting. *J. Mol. Biol.* 386: 366-378.
- Lutowski D, Joubert-Caron R, Lefebure C, Salama J, Belin C, Bladier D y Caron M (1997). Anti-galectin-1 autoantibodies in serum of patients with neurological diseases. *Clin. Chim. Acta* 262: 131-138.
- Martin-Santamaría S, André S, **Buzamet E**, Caraballo R, Fernández-Cureses G, Morando M, Ribeiro J P, Ramírez-Gualito K, de Pascual-Teresa B, Cañada F J, Menéndez M, Ramström O, Jiménez-Barbero J, Solís D y Gabius H-J (2011). Symmetric dithiodigalactoside: strategic combination of binding studies and detection of selectivity between a plant toxin and human lectins. *Org. Biomol. Chem.* 9(15):5445-55.
- Massardo L, Metz C, Pardo E, Mezzano V, Babul M, Jarpa E, Guzman A M, Andre S, Kaltner H, Gabius H J, Jacobelli S, Gonzalez A y Soza A (2009). Autoantibodies against galectin-8: their specificity, association with lymphopenia in systemic lupus erythematosus and detection in rheumatoid arthritis and acute inflammation. *Lupus* 18: 539-546.
- Matsumoto R, Matsumoto H, Seki M, Hata M, Asano Y, Kanegasaki S, Stevens R L y Hirashima M (1998). Human ecalectin, a variant of human galectin-9, is a novel eosinophil chemoattractant produced by T lymphocytes. *J. Biol. Chem.* 273: 16976-16984.
- Matsuura I, Endo M, Hata K, Kubo T, Yamaguchi A, Saeki N, Yamashita T. (2007) BMP inhibits neurite growth by a mechanism dependent on LIM-kinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 360:868-73.
- Mazurek N, Conklin J, Byrd J C, Raz A y Bresalier R S (2000). Phosphorylation of the beta-galactoside-binding protein galectin-3 modulates binding to its ligands. *J. Biol. Chem.* 275: 36311-36315.
- McGraw J, Oschipok L W, Liu J, Hiebert G W, Mak C F, Horie H, Kadoya T, Steeves J D, Ramer M S y Tetzlaff W (2004). Galectin-1 expression correlates with the regenerative potential of rubrospinal and spinal motoneurons. *Neuroscience* 128: 713-719.
- McGraw J, Gaudet A D, Oschipok L W, Kadoya T, Horie H, Steeves J D, Tetzlaff W y Ramer

- M S (2005). Regulation of neuronal and glial galectin-1 expression by peripheral and central axotomy of rat primary afferent neurons. *Exp. Neurol.* 195: 103-114.
- Mertens H D y Svergun D I (2010). Structural characterization of proteins and complexes using small-angle X-ray solution scattering. *J. Struct. Biol.* 172: 128-141.
- Meynier C, Guerlesquin F y Roche P (2009). Computational studies of human galectin-1: role of conserved tryptophan residue in stacking interaction with carbohydrate ligands. *J. Biomol. Struct. Dyn.* 27: 49-58.
- Mihalyi E (1968). Physicochemical studies of bovine fibrinogen. IV. Ultraviolet absorption and its relation to the structure of the molecule. *Biochemistry* 7: 208-223.
- Minton A P (1994). Modern analytical ultracentrifugation. Schuester, T.H & Lave T H, editors; pp 81-93, Birkhäuser, Boston.
- Miura T, Takahashi M, Horie H, Kurushima H, Tsuchimoto D, Sakumi K y Nakabeppu Y (2004). Galectin-1beta, a natural monomeric form of galectin-1 lacking its six amino-terminal residues promotes axonal regeneration but not cell death. *Cell Death. Differ.* 11: 1076-1083.
- Miyaniishi N, Nishi N, Abe H, Kashio Y, Shinonaga R, Nakakita S, Sumiyoshi W, Yamauchi A, Nakamura T y Hirashima M (2007). Carbohydrate-recognition domains of galectin-9 are involved in intermolecular interaction with galectin-9 itself and other members of the galectin family. *Glycobiology* 17:423-432.
- Nagy N, Bronckart Y, Camby I, Legendre H, Lahm H, Kaltner H, Hadari Y, Van H P, Yeaton P, Pector J C, Zick Y, Salmon I, Danguy A, Kiss R y Gabius H J (2002). Galectin-8 expression decreases in cancer compared with normal and dysplastic human colon tissue and acts significantly on human colon cancer cell migration as a suppressor. *Gut* 50: 392-401.
- Narciso M S, Mietto B S, Marques S A, Soares C P, Mermelstein C S, El-Cheikh M C y Martinez A M (2009). Sciatic nerve regeneration is accelerated in galectin-3 knockout mice. *Exp. Neurol.* 217: 7-15.
- Nesmelova I E, Ermakova E, Daragan V A, Pang M, Menéndez M, Lagartera L, Solís D, Baum L G y Mayo K (2010). Lactose binding to galectin-1 modulates structural dynamics, increases conformational entropy, and occurs with apparent negative cooperativity. *J. Mol. Biol.* 397: 1209-1230.
- Nishi N, Shoji H, Seki M, Itoh A, Miyanaka H, Yuube K, Hirashima M, Nakamura T (2003). Galectin-8 modulates neutrophil function via interaction with integrin alphaM. *Glycobiology* 13(11):755-63.
- Nishi N, Abe A, Iwaki J, Yoshida H, Itoh A, Shoji H, Kamitori S, Hirabayashi J y Nakamura T (2008). Functional and structural bases of a cysteine-less mutant as a long-lasting substitute for galectin-1. *Glycobiology* 18: 1065-1073.
- Oda Y, Herrmann J, Gitt M A, Turck C W, Burlingame A L, Barondes S H y Leffler H (1993). Soluble lactose-binding lectin from rat intestine with two different carbohydrate-binding domains in the same peptide chain. *J. Biol. Chem.* 268: 5929-5939.
- Ofek I y Sharon N (1988). Lectinophagocytosis: a molecular mechanism of recognition between cell surface sugars and lectins in the phagocytosis of bacteria. *Infect. Immun.* 56: 539-547.

- Offner H, Celnik B, Bringman T S, Casentini-Borocz D, Nedwin G E y Vandembark A A (1990). Recombinant human beta-galactoside binding lectin suppresses clinical and histological signs of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Neuroimmunol.* 28: 177-184.
- Ouellet M, Mercier S, Pelletier I, Bounou S, Roy J, Hirabayashi J, Sato S, Tremblay MJ (2005). Galectin-1 acts as a soluble host factor that promotes HIV-1 infectivity through stabilization of virus attachment to host cells. *J Immunol* 174(7):4120-6.
- Pál Z, Antal P, Srivastava SK, Hullám G, Semsei AF, Gál J, Svébis M, Soós G, Szalai C, André S, Gordeeva E, Nagy G, Kaltner H, Bovin NV, Molnár MJ, Falus A, Gabius HJ, Buzás EI (2012). Non-synonymous single nucleotide polymorphism in genes for immunoregulatory galectins: Association of galectin-8 (F19Y) occurrence with autoimmune diseases in a Caucasian population. *Biochim Biophys Acta*, June 6.
- Patnaik SK, Potvin B, Carlsson S, Sturm D, Leffler H, Stanley P (2006). Complex N-glycans are the major ligands for galectin-1, -3, and -8 on Chinese hamster ovary cells. *Glycobiology* 16(4):305-17.
- Perone M J, Bertera S, Tawadrous Z S, Shufesky W J, Piganelli J D, Baum L G, Trucco M y Morelli A E (2006). Dendritic cells expressing transgenic galectin-1 delay onset of autoimmune diabetes in mice. *J. Immunol.* 177: 5278-5289.
- Petoukhov M.V y Svergun D I (2005). Global rigid body modelling of macromolecular complexes against small-angle scattering data. *Biophys. J.* 89: 1237-1250.
- Peumans W J y Van Damme J M (1995). Lectins as plant Defense Proteins. *Plant Physiol.* 109: 347-352.
- Puche A C, Poirier F, Hair M, Bartlett P F y Key B (1996). Role of galectin-1 in the developing mouse olfactory system. *Dev. Biol.* 179: 274-287.
- Putnam C D, Hammel M, Hura G L y Tainer J A (2007). X-ray solution scattering (SAXS) combined with crystallography and computation: defining accurate macromolecular structures, conformations and assemblies in solution. *Q. Rev. Biophys.* 40: 191-285.
- Rabinovich G A, Daly G, Dreja H, Tailor H, Riera C M, Hirabayashi J y Chernajovsky Y (1999). Recombinant galectin-1 and its genetic delivery suppress collagen-induced arthritis via T cell apoptosis. *J. Exp. Med.* 190: 385-398.
- Rabinovich G A y Rubinstein N (2001). Galectins: a novel family of proteins involved in the regulation of the immune response. Implications in immunopathological processes. *Medicina (B Aires)* 61: 85-92.
- Rabinovich G A, Toscano M A, Jackson S S y Vasta G R (2007). Functions of cell surface galectin-glycoprotein lattices; *Curr. Opin. Struct. Biol.* 17: 513-520.
- Rivas G, Stafford W y Minton A P (1999). Characterization of heterologous protein-protein interactions using analytical ultracentrifugation. *Methods* 19: 194-212.
- Rivera-Sagredo A, Solís D, Díaz-Mauriño T, Jiménez-Barbero J y Martín-Lomas M (1991). Studies on the molecular recognition of synthetic methyl β -lactoside analogs by ricin, a cytotoxic plant lectin. *Eur. J. Biochem.* 197: 217-228.
- Roldos V, Canada F J, and Jimenez-Barbero J (2011). Carbohydrate-protein interactions: a 3D view by NMR. *Chembiochem.* 12: 990-1005.

- Romao M J, Kolln I, Dias J M, Carvalho A L, Romero A, Varela P F, Sanz L, Topfer-Petersen E y Calvete J J (1997). Crystal structure of acidic seminal fluid protein (aSFP) at 1.9 Å resolution: a bovine polypeptide of the spermadhesin family. *J. Mol. Biol.* 274: 650-660.
- Sango K, Tokashiki A, Ajiki K, Horie M, Kawano H, Watabe K, Horie H, Kadoya T (2004). Synthesis, localization and externalization of galectin-1 in mature dorsal root ganglion neurons and Schwann cells. *Eur. J. Neurosci.* 19: 55-64.
- Santucci L, Fiorucci S, Rubinstein N, Mencarelli A, Palazzetti B, Federici B, Rabinovich G A y Morelli A (2003). Galectin-1 suppresses experimental colitis in mice. *Gastroenterology* 124: 1381-1394.
- Sasaki T, Hirabayashi J, Manya H, Kasai K y Endo T (2004). Galectin-1 induces astrocyte differentiation, which leads to production of brain-derived neurotrophic factor. *Glycobiology* 14: 357-363.
- Sato M, Nishi N, Shoji H, Seki M, Hashidate T, Hirabayashi J, Kasai Ki K, Hata Y, Suzuki S, Hirashima M, et al. (2002). Functional analysis of the carbohydrate recognition domains and a linker peptide of galectin-9 as to eosinophil chemoattractant activity. *Glycobiology* 12:191-197.
- Schuck P y Rossmann P (2000). Determination of the sedimentation coefficient distribution by least-squares boundary modeling. *Biopolymers* 54: 328-341.
- Seetharaman J, Kanigsberg A, Slaaby R, Leffler H, Barondes S H y Rini J M (1998). X-ray crystal structure of the human galectin-3 carbohydrate recognition domain at 2.1-Å resolution. *J. Biol. Chem.* 273: 13047-13052.
- Seki M, Oomizu S, Sakata K M, Sakata A, Arikawa T, Watanabe K, Ito K, Takeshita K, Niki T, Saita N, Nishi N, Yamauchi A, Katoh S, Matsukawa A, Kuchroo V y Hirashima M (2008). Galectin-9 suppresses the generation of Th17, promotes the induction of regulatory T cells, and regulates experimental autoimmune arthritis. *Clin. Immunol.* 127: 78-88.
- Silva-Monteiro E, Reis L L, Kenji N O, Junqueira M, Rabinovich G A, Hsu D K, Liu F T, Savino W, Chammas R y Villa-Verde D M (2007). Altered expression of galectin-3 induces cortical thymocyte depletion and premature exit of immature thymocytes during *Trypanosoma cruzi* infection. *Am. J. Pathol.* 170: 546-556.
- Solís D, Jiménez-Barbero J, Martín-Lomas y Díaz-Mauriño T (1994). Probing hydrogen-bonding interactions of bovine heart galectin-1 and methyl β -lactoside by use of engineered ligands. *Eur J Biochem* 223: 107-114.
- Solís D, Romero A, Menéndez M, Jiménez-Barbero J (2009). Protein-carbohydrate interactions: basic concepts and methods for analysis, In : Gabius H J, editor. *The Sugar Code. Fundamentals of glycosciences*. Weinheim, Germany; Wiley-VCH, p. 233-245.
- Stannard K A, Collins P M, Ito K, Sullivan E M, Scott S A, Gabutero E, Darren G, I, Low P, Nilsson U J, Leffler H, Blanchard H y Ralph S J (2010). Galectin inhibitory disaccharides promote tumour immunity in a breast cancer model. *Cancer Lett.* 299: 95-110.
- Stillman B N, Mischel P S y Baum L G (2005). New roles for galectins in brain tumors-from prognostic markers to therapeutic targets. *Brain Pathol.* 15: 124-132.

- Stillmark H (1888). Über Ricin, ein giftiges Ferment aus den Samen von *Ricinus comm.* L und einigen anderen Euphorbiaceen. Tesis, University of Dorpat, Estonia.
- Stockert R J, Morell A G y Scheinberg I H (1974). Mammalian hepatic lectin. *Science* 186: 365-366.
- Stowell S R, Arthur C M, Dias-Baruffi M, Rodrigues L C, Gourdine J P, Heimburg-Molinaro J, Ju T, Molinaro R J, Rivera-Marrero C, Xia B, Smith D Fy Cummings R D (2010). Innate immune lectins kill bacteria expressing blood group antigen. *Nat. Med.* 16(3): 295-301.
- Strickland E H (1974). Aromatic contributions to circular dichroism spectra of proteins; *CRC Crit Rev. Biochem.* 2: 113-175.
- Suckau D, Resemann A, Schuerenberg M, Hufnagel P, Franzen J y Holle A (2003). A novel MALDI LIFT-TOF/TOF mass spectrometer for proteomics. *Anal. Bioanal. Chem.* 376: 952-965.
- Svergun D I (1992). Determination of the regularization parameter in Indirect-Transform Methods using perceptual criteria. *J. Appl. Cryst.* 25: 495-503.
- Svergun D I (2001). Determination of domain structure of proteins from X-ray solution scattering. *Biophys. J.* 80: 2946-2953.
- Swaminathan G J, Leonidas D D, Savage M P, Ackerman S J y Acharya K R (1999). Selective Recognition of Mannose by the Human Eosinophil Charcot-Leyden Crystal Protein (Galectin-10): A Crystallographic Study at 1.8 Å Resolution. *Biochemistry* 38: 15406.
- Teichberg V I, Silman I, Beitsch D D y Resheff G A (1975). β -D-galactoside binding protein from electric organ tissue of *Electrophorus electricus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 72: 1383-1387.
- Tenne-Brown J, Puche A C y Key B (1998). Expression of galectin-1 in the mouse olfactory system. *Int. J. Dev. Biol.* 42: 791-799.
- Tercero J C y Díaz-Mauriño T (1988). Affinity chromatography of fibrinogen on *Lens culinaris* agglutinin immobilized on CNBr-activated sepharose: study of the active groups involved in nonspecific adsorption. *Anal. Biochem.* 174: 128-136.
- Thiel S, Vorup-Jensen T, Stover C M, Schwaeble W, Laursen S B, Poulsen K, Willis A C, Eggleton P, Hansen S, Holmskov U, Reid K B y Jensenius J C (1997). A second serine protease associated with mannan-binding lectin that activates complement. *Nature* 386: 506-510.
- Thijssen V L, Poirier F, Baum L G y Griffioen A W (2007). Galectins in the tumor endothelium: opportunities for combined cancer therapy. *Blood* 110: 2819-2827.
- Todd M J y Gómez J (2001). Enzyme kinetics determined using calorimetry: a general assay for enzyme activity. *Anal. Biochem.* 296: 179-187.
- Toscano M A, Commodaro A G, Ilarregui J M, Bianco G A, Liberman A, Serra H M, Hirabayashi J, Rizzo L V y Rabinovich G A (2006). Galectin-1 suppresses autoimmune retinal disease by promoting concomitant Th2- and T regulatory-mediated anti-inflammatory responses. *J. Immunol.* 176: 6323-6332.
- Toscano M A, Bianco G A, Ilarregui J M, Croci D O, Correale J, Hernandez J D, Zwirner N W, Poirier F, Riley E M, Baum L G y Rabinovich G A (2007). Differential glycosylation

- of TH1, TH2 and TH-17 effector cells selectively regulates susceptibility to cell death. *Nat. Immunol.* 8: 825-834.
- Tracey B M, Feizi T, Abbott W M, Carruthers R A, Green B N y Lawson A M (1992). Subunit molecular mass assignment of 14,654 Da to the soluble beta-galactoside-binding lectin from bovine heart muscle and demonstration of intramolecular disulfide bonding associated with oxidative inactivation. *J. Biol. Chem.* 267: 10342-10347.
- Trombetta E S y Helenius A (1998). Lectins as chaperones in glycoprotein folding. *Current Opinion in Structural Biology* 8: 587-592.
- Truong M J, Gruart V, Kusnierz J P, Papin J P, Loiseau S, Capron A y Capron M (1993). Human neutrophils express immunoglobulin E (IgE)-binding proteins (Mac-2/epsilon BP) of the S-type lectin family: role in IgE-dependent activation. *J. Exp. Med.* 177: 243-248.
- Tschampel S M y Woods R J (2003). Quantifying the Role of Water in Protein-Carbohydrate Interactions. *J. Phys. Chem.* 107(43): 9175-9181.
- Tureci O, Schmitt H, Fadle N, Pfreundschuh M y Sahin U (1997). Molecular definition of a novel human galectin which is immunogenic in patients with Hodgkin's disease. *J. Biol. Chem.* 272: 6416-6422.
- Vaara M (1996). Lipid A: target for antibacterial drugs. *Science* 274 (5289): 939-40.
- Van Kooyk Y y Rabinovich G A (2008). Protein-glycan interactions in the control of innate and adaptive immune responses. *Nat. Immunol.* 9: 593-601.
- Varela P F, Romero A, Sanz L, Romao M J, Topfer-Petersen E y Calvete J J (1997). The 2.4 Å resolution crystal structure of boar seminal plasma PSP-I/PSP-II: a zona pellucida-binding glycoprotein heterodimer of the spermadhesin family built by a CUB domain architecture. *J. Mol. Biol.* 274: 635-649.
- Vasta G R (2009). Roles of galectins in infection. *Nat. Rev. Microbiol.* 7: 424-438.
- Volkov V V y Svergun D I (2003). Uniqueness of *ab initio* shape determination in small-angle scattering. *J. Appl. Cryst.* 36: 860-864.
- Wada J, Ota K, Kumar A, Wallner E I y Kanwar Y S (1997). Developmental regulation, expression, and apoptotic potential of galectin-9, a beta-galactoside binding lectin. *J. Clin. Invest.* 99: 2452-2461.
- Wasano K y Hirakawa Y (1999). Two domains of rat galectin-4 bind to distinct structures of the intercellular borders of colorectal epithelia. *J Histochem Cytochem* 47(1):75-82.
- Weis W, Brown J H, Cusack S, Paulson J C, Skehel J J y Wiley D C (1988). Structure of the influenza virus haemagglutinin complexed with its receptor, sialic acid. *Nature* 333, 426-431.
- Weis W I y Drickamer K (1996). Structural basis of lectin-carbohydrate recognition. *Annu. Rev. Biochem.* 65: 441-473.
- Whitmore L y Wallace B A (2008). Protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopy: methods and reference databases. *Biopolymers* 89: 392-400.

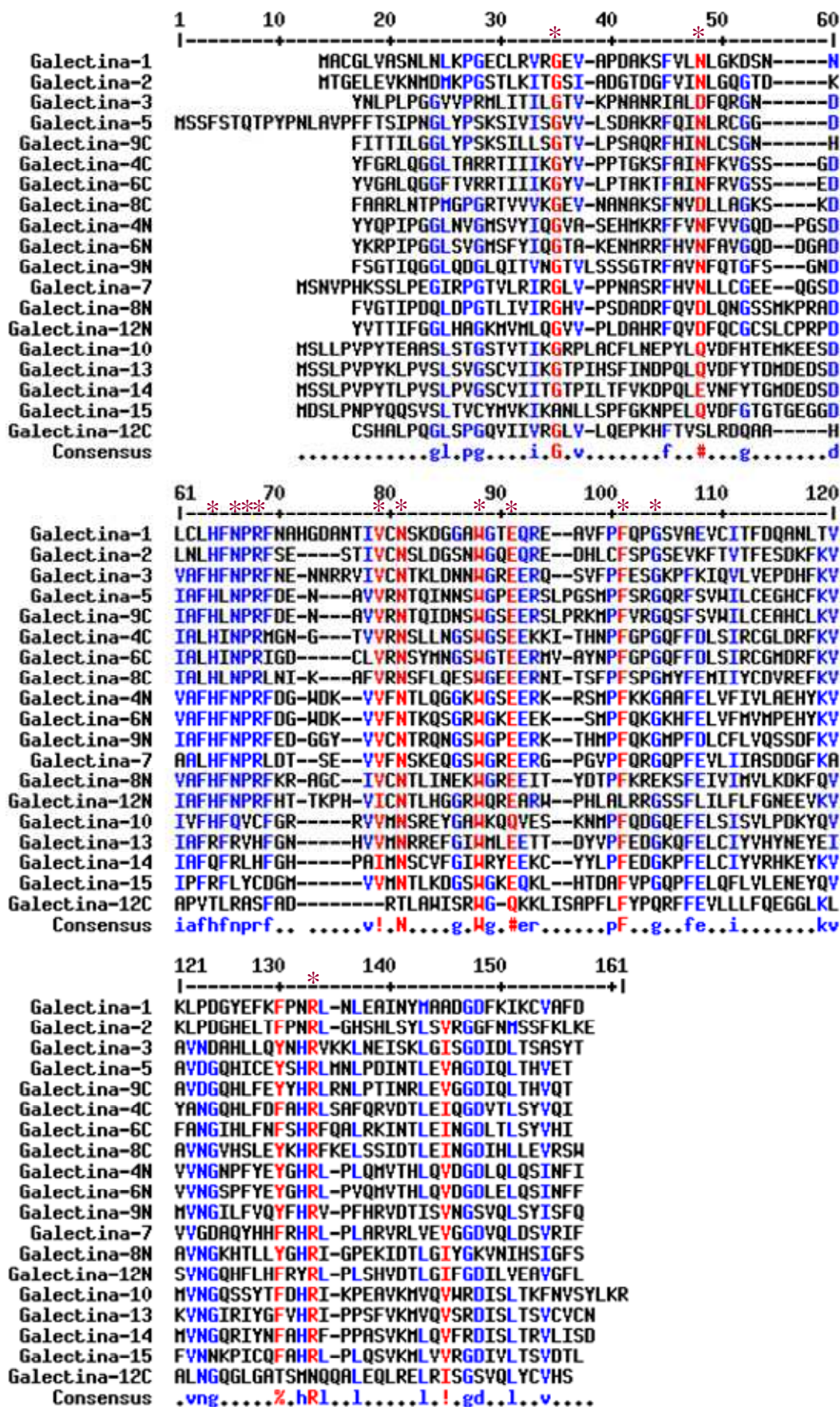
- Wiseman, T., Willinston, S., Brandts, J y Lin, L-N (1989). Rapid measurement of binding constants and heats of binding using a new titration calorimeter. *Anal. Biochem.* 179: 131-137.
- Wu M H, Hong T M, Cheng H W, Pan S H, Liang Y R, Hong H C, Chiang W F, Wong T Y, Shieh D B, Shiau A L, Jin Y T, and Chen Y L (2009). Galectin-1-mediated tumor invasion and metastasis, up-regulated matrix metalloproteinase expression, and reorganized actin cytoskeletons. *Mol. Cancer Res.* 7: 311-318.
- Yamauchi A, Kontani K, Kihara M, Nishi N, Yokomise H, Hirashima M (2006). Galectin-9, a novel prognostic factor with antimetastatic potential in breast cancer. *Breast J.* 12: S196-200.
- Yang R Y, Rabinovich G A y Liu F T (2008). Galectins: structure, function and therapeutic potential. *Expert. Rev. Mol. Med.* 10: 17.
- Xu D, Zhang Y (2012). Ab initio protein structure assembly using continuous structure fragments and optimized knowledge-based force field. *Proteins* 8, 1715-35.
- Yoshida H, Teraoka M, Nishi N, Nakakita S, Nakamura T, Hirashima M y Kamitori S (2010). X-ray structures of human galectin-9 C-terminal domain in complexes with a biantennary oligosaccharide and sialyllactose. *J. Biol. Chem.* 285: 36969-36976.
- Yoshii T, Fukumori T, Honjo Y, Inohara H, Kim H R y Raz A (2002). Galectin-3 phosphorylation is required for its anti-apoptotic function and cell cycle arrest. *J. Biol. Chem.* 277: 6852-6857.
- Zaslloff M (2002). Antimicrobial peptides in health and disease. *N. Engl. J. Med.* 347: 1199-1200.
- Zinger-Yosovich K D, Iluz D, Sudakevitz D y Gilboa-Garber (2009). Blocking of *Pseudomonas aeruginosa* y *Chromobacterium violaceum* lectins by diverse mammalian milks. *J. Dairy Sci.* 93: 473-482.
- Zhou D, Ge H, Sun j, Gao Y, Teng M and Niu L (2008). Crystal structure of the C-terminal conserved domain of human GRP, a galectin-related protein, reveals a function mode different from those of galectins. *Proteins*, Wiley InterScience; 1582-1588.
- Zhu C, Anderson A C, Schubart A, Xiong H, Imitola J, Khoury S J, Zheng X X, Strom T B y Kuchroo V K (2005). The Tim-3 ligand galectin-9 negatively regulates T helper type 1 immunity. *Nat. Immunol.* 6: 1245-1252.
- Zhu Z, Gershon M D, Ambron R, Gabel C y Gershon A A (1995). Infection of cells by varicella zoster virus: inhibition of viral entry by mannose-6-phosphate and heparin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92, 3546-3550.

Abreviaturas

BSA	Albúmina de suero bovino
bG1	Galectina-1 bovina (del inglés, <i>bovine Galectin-1</i>)
CG	Galectina de pollo (del inglés, <i>Chicken Galectin</i>)
Ci	Curio
cpm	Cuentas por minuto
CRD	<i>Carbohydrate Recognition Domain</i>
C2S	Mutante de hG1 en el que la cisteína de la posición 2 está reemplazada con una serina
DC	Dicroísmo circular
DC-SIGN	<i>Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non integrin</i>
D _{max}	Distancia máxima
DO	Densidad óptica
DTDG	Ditiodigalactósido
DTT	<i>Dithiothreitol</i>
E17	Embriones de rata de 17 días de gestación
f	Coefficiente de difusión translacional
FPLC	<i>Fast Protein Liquid Chromatography</i>
hAD-1	Péptido de neutrófilos humanos
hBD-2	β-defensina humana
HBSS	<i>Hank's Balanced Salt Solution</i>
HEPES	<i>4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid</i>
hG	Galectina humana (del inglés <i>human Galectin</i>)
hG3Tr	Variante truncada de hG3 que contiene únicamente el CRD
hG4V	hG4 que contiene sólo una parte del péptido conector
hG4-N	Dominio N-terminal de hG4
hG4-C	Dominio C-terminal de hG4
hG8F19Y	Mutante de hG8 en que la Phe de la posición 19 ha sido sustituida por Tyr
hG8F19Y-N	Dominio N-terminal del mutante hG8F19Y
hG8-L	hG8 con el péptido conector extendido
IAA	Iodoacetamida
ITC	<i>Isothermal Titration Calorimetry</i>
Lac	Lactosa
LB	Medio Luria Bertani
L-SIGN	<i>Lectin-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin</i>
MALDI	<i>Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization</i>
MBL	Metil-β-lactósido
MIC	<i>Minimal Inhibitory Concentration</i>
NPN	1-N-fenil-naftilamina

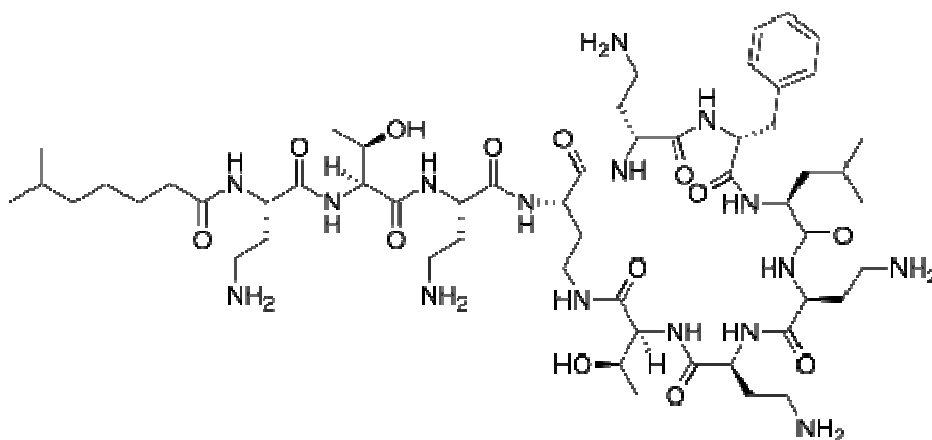
PBS	Tampón fosfato sodico 5 mM
PBS _β /PBS _{DTT}	PBS conteniendo 4 mM β-mercaptoetanol/2mM DTT
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
P(r)	Función de distribución de pares de distancias
PxB	Polimixina B
RFU	<i>Relative Fluorescence Units</i>
rG	Galectina de rata (del inglés, <i>rat Galectin</i>)
R _g	Radio de giro
s	Coefficiente de sedimentación
s ⁰ _{20,w}	Coefficiente de sedimentación a 20 °C, en agua
SAXS	<i>Small Angle X-ray Scattering</i>
SDS	Dodecilsulfato sódico
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS
3'SL	3'-sialil-lactosa
TDG	Tiodigalactósido
TEMED	N,N,N',N'-Tetrametil-etilendiamina
TFA	Ácido trifluoroacético
TOF	<i>Time Of Flight</i>
TSB	<i>Trypticase Soy Broth</i>
UA	Ultracentrifugación analítica
UFC	Unidades formadoras de colonia
WS	<i>Water Site</i>

ANEXOS

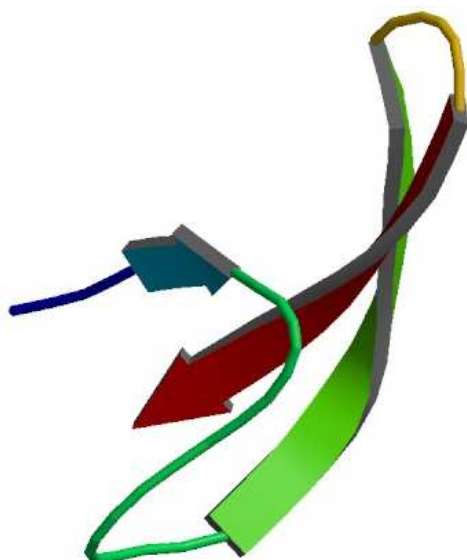


Anexo I, Figura I.1. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de galectinas, mostrando con un asterisco los residuos conservados.

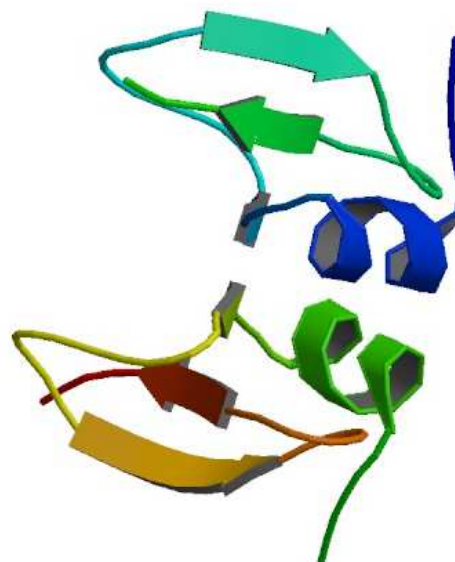
A



B



C



Anexo II, Figura II.1. Estructuras de péptidos antimicrobianos: Polimixina B (A), α defensina-1 (PDB: 2PM5) (B) y β defensina-2 (PDB: 1FD4) (C).

