

EXTRACCIÓN, PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE DOS LECTINAS EN SEMILLAS DE *DIOCLEA SERICEA*

por

Adriana Yanett Sierra & Gerardo Pérez¹

Resumen

Sierra, A. Y. & G. Pérez: Extracción, purificación y caracterización de dos lectinas en semillas de *Dioclea sericea*. Rev. Acad. Colomb. Cienc. 23(88): 445-454. ISSN 0370-3908.

Las semillas de *Dioclea sericea* contienen dos tipos de lectinas obtenidas por extracción salina y precipitación entre el 30 y 70% s con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ o por precipitación con ácido tricloroacético al 2.5%; la lectina tipo P_4 se purificó por cromatografía de afinidad sobre Sephacryl S-200; la lectina tipo P_2 se purificó por cromatografía hidrofóbica sobre Phenyl-Sepharosa. A cada una de las lectinas se les determinó su especificidad por carbohidratos, pI, M_r de subunidades, peso molecular de la proteína nativa, contenido de carbohidratos, concentración mínima inhibitoria, capacidad de aglutinación de eritrocitos animales, composición en aminoácidos y secuencia N-terminal de las cadenas α , β y γ de la lectina P_4 y α de la lectina P_2 . Se establecieron los contenidos de las dos lectinas en las semillas maduras.

Palabras clave: *Dioclea sericea*; Fabaceae, purificación; caracterización, lectina

Abstract

Two types of lectins from *Dioclea sericea* seeds were obtained by saline extraction and precipitation with 30-70% s $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ or by 2.5% trichloroacetic acid precipitation. The P_4 lectin was purified by affinity chromatography on Sephacryl S- 200; the P_2 lectin was purified by hydrophobic chromatography on Phenyl- Sepharose. The following properties were determined for each lectin: carbohydrate specificity, pI, subunit M_r , molecular weight of the native protein, carbohydrate content, minimal inhibitory capacity, animal erythrocyte agglutination, amino acid composition, and N-terminal sequence of the α , β and γ chains of P_4 lectin and α chain of the P_2 lectin. The lectin content in mature seeds was established.

Key words: *Dioclea sericea*, Fabaceae, purification, characterization, lectin

(1) Autor a quien se debe dirigir la correspondencia.

Introducción

Las lectinas son proteínas de origen no inmune enlazantes de carbohidratos, las cuales tienen la propiedad de aglutinar células, estimular mitogénicamente linfocitos, generar células supresoras y mediar en la fagocitosis de células blancas. Estas proteínas son herramientas fundamentales en glicobiología ya que se utilizan para el aislamiento, purificación y estudio estructural de carbohidratos, caracterización de superficies celulares, cambios en glicoproteínas y/o glicolípidos durante transformaciones malignas, tipificación sanguínea y aislamiento de linfocitos. (Lis & Sharon, 1986).

Grupo de Investigación en Proteínas, Laboratorio de Bioquímica, Departamento de Química, Universidad Nacional, Bogotá, Colombia.

Las similitudes encontradas a nivel funcional y estructural entre las lectinas aisladas de *Dioclea grandiflora*, *Dioclea lehmanni* y *Canavalia ensiformis* señalan la importancia de estudiar detalladamente la *Dioclea sericea* por ser una planta silvestre muy extendida en nuestro país y poco estudiada hasta el momento (Bernal & Jiménez, 1990)

Las lectinas se han detectado en gran variedad de leguminosas y gramíneas y en las primeras la subtribu *Diocleinae*, con 30-50 especies, ha sido objeto de varios estudios, particularmente la *Canavalia ensiformis* de donde se aisló la ConA que es la lectina mejor caracterizada y con mayor número de aplicaciones biomédicas (Lis & Sharon, 1986).

Otras especies también ya estudiadas incluyen la *D. grandiflora*, *D. lehmanni* y *D. altissima* en las cuales se han encontrado lectinas de tipo P_4 con estructura y propiedades similares a la Con A teniendo entre sí una alta homología. Estas lectinas poseen tres subunidades características α , β y γ con pesos moleculares aparentes de 25-26, 13-14 y 8-9 kDa respectivamente, son afines por la glucosa o manosa; para su actividad requieren iones Ca^{+2} y Mn^{+2} (Moreira et al., 1983; Pérez et al., 1989; Moreira et al., 1997)

Las lectinas tipo P_4 de *D. grandiflora* y *D. altissima* no se encuentran glicosiladas a diferencia de la lectina P_4 de *D. lehmanni*; estas lectinas presentan alta afinidad por los trimanósidos que están presentes en las uniones carbohidrato-asparagina, su composición de aminoácidos muestra un bajo contenido de cisteína y ausencia de metionina y es rico en aminoácidos ácidos e hidroxílicos. (Ainouz et al., 1987; Pérez et al., 1989; Moreira et al., 1997).

Respecto a la segunda lectina, denominada P_2 , se ha determinado su presencia en *D. grandiflora*, *D. lehmanni* y en *Canavalia ensiformis* (Melgarejo & Pérez, 1997; Pérez, 1998); de esta lectina se ha determinado su estructura dimérica, su baja afinidad por la glucosa y la manosa, su relativa especificidad por lactosa y sacarosa, su pI de carácter ácido, su composición en aminoácidos y su secuencia N-terminal. El contenido de proteína es de 184 mg/100 g de harina de semillas maduras en *D. lehmanni* (Pérez, 1998).

Tanto la lectina P_2 como la P_4 de *D. lehmanni* se localizan en los cuerpos proteicos de los cotiledones de la semilla madura (Melgarejo & Pérez, 1997).

La especie *Dioclea sericea* no ha sido estudiada hasta ahora; sólo se conoce su clasificación botánica realizada por Humboldt (Humboldt & Bonpland, 1823), es una enredadera, localizada en zonas secas y pedregosas en contraposición a la *D. lehmanni* que se localiza en las orillas de los ríos.

Materiales y métodos

Las semillas de *Dioclea sericea* se recolectaron en la cercanía al Boquerón (Viotá, Cundinamarca), se recolectaron semillas verdes y maduras. La planta fue clasificada por el Dr. Roberto Jaramillo (ICN).

Se escogieron las semillas que presentaron apariencia sana en vaina, se desgranaron, lavaron y molieron hasta obtener un polvo fino.

Se realizó un ensayo preliminar para escoger el mejor material a trabajar, así como las mejores condiciones de extracción. La proteína de las semillas verdes y maduras, se extrajo por tres veces consecutivas con NaCl 1% en relación 1:10 (p:v) a 4 °C durante 16 h; se centrifugó (18.000 r.p.m., 30 min., 4 °C) y se determinó el título específico (TE) de cada extracto. A los extractos de las semillas maduras se les adicionó $(NH_4)_2SO_4$ hasta 30% de saturación (8 h, 4 °C) y se centrifugó (18.000 r.p.m., 30 min, 4°C); al sobrenadante se adicionó $(NH_4)_2SO_4$ hasta 50% s y luego de precipitar y centrifugar, se precipitó el sobrenadante hasta 70% s con $(NH_4)_2SO_4$.

A la harina de las semillas maduras se le realizaron los siguientes análisis proximales: Humedad (Método 14004), Extracto Etéreo (Método 7045), Fibra Cruda (Método 7054), Cenizas (Método 14006), Proteína Bruta (Método 7016), según las normas AOAC (1.975) y Nitrógeno no proteico (Villarraga & Peña, 1979).

Con base en los resultados preliminares obtenidos, se realizó un ensayo a pequeña escala con la harina de las

semillas maduras que se extrajeron con NaCl 1% por cuatro veces consecutivas; el conjunto de extractos se dividió en dos porciones. A una de ellas se le realizó precipitación fraccionada con sulfato de amonio entre el 0 y el 20% de saturación, entre el 20 y 30% de saturación, entre el 30 y 70% de saturación y entre el 70 y 90% de saturación. Cada una de estas fracciones se centrifugó (18.000 r.p.m., 1 h, 4°C), los precipitados se resuspendieron en NaCl 1% y se dializaron contra NaCl 1%. El extracto salino inicial fue ensayado para detectar la presencia de inhibidores de tripsina (Hamerstrand et al, 1981).

A la segunda porción del extracto salino se le adicionó ácido tricloroacético (ATA) hasta 2.5% (4°C, 30 min), se centrifugó (10.000 r.p.m., 45 min, 4 °C); el sobrenadante se neutralizó con NaOH 1N y se ultrafiltró por Amicon PM10, con el fin de eliminar los inhibidores de tripsina presentes. El precipitado obtenido con ATA se resuspendió en NaCl 1% hasta disolver toda la lectina presente y se neutralizó con NaOH 1 N.

De acuerdo a los resultados obtenidos se realizó una extracción a gran escala (75 g harina) en donde se cuantificó la proteína por microKjeldahl (Steyermark, 1961) y se determinó el título y título específico. Las fracciones que provienen de las distintas precipitaciones de proteína y que poseen actividad aglutinante, se cromatografiaron sobre Sephacryl S-200 (160 x 2.5 cm), la fracción retenida (P_4) se eluyó con Glucosa 0.2 M - NaCl 1%; a esta fracción se le eliminó un posible agregado pasándola por Biogel P 150 (100x 0.5 cm) equilibrado en buffer fosfato 20 mM, pH 7. La fracción no retenida (P_2), eluída con NaCl al 1%, que presentó actividad eritroaglutinante, se cromatografió por Phenyl-Sepharosa (60 x 0.5 cm), esta columna se eluyó inicialmente con NaCl 1% y luego con gradiente lineal de acetonitrilo al 70%.

Como control de la presencia de la lectina se utilizó el ensayo de aglutinación (Villarraga & Peña, 1979) con eritrocitos A+, B+ y O+, en sistema tubo y microtiter.

La pureza de las proteínas se determinó por electroforesis (Laemmli, 1970) (T 15%). Las proteínas se caracterizaron determinando su contenido de carbohidratos (Dubois et al., 1956), punto Isoeléctrico en condiciones desnaturizantes (Bollag et al, 1991) y no desnaturizantes (Hoeffler, 1992), peso molecular de la lectina nativa por HPLC (Sierra, 1997) por espectrometría de masas MALDI-TOFT y de sus subunidades por electroforesis (Weber & Osborn, 1975), aglutinación de eritrocitos animales, inhibición de la eritroaglutinación por carbohidratos, mínima concentración inhibitoria, com-

posición en aminoácidos (Hirs y Stein., 1956) y secuencia N-terminal de las subunidades a, b y g de la lectina P_4 transferidas sobre membranas de PVDF (Matsudaira, 1987) tratadas con Biobrene Plus y de la cadena a de la lectina P_2 en solución, utilizando un secuenciador Applied Biosystems 477A.

Resultados y discusión

Se detectó actividad eritroaglutinante en semillas verdes (TE = 15.16) y maduras (TE = 52.89) siendo mayor la actividad de lectina en las últimas. El análisis proximal de las semillas maduras arrojó un contenido de humedad del 12%, cenizas 3.22%, grasa 2.29%, 10% de fibra y un contenido de proteína bruta de 22.12%. El valor de proteína insoluble en ATA 10% es de 14.56%, siendo inferior al de *D. lehmanni*. Estos resultados indican que la semilla no es fuente de reserva lipídica y que posee un alto contenido de carbohidratos como cutinas, pentosas, celulosa, suberina y ligninas lo cual facilita la extracción de la proteína. En el ensayo preliminar con semillas maduras, se encontró actividad aglutinante con eritrocitos humanos A, B y O + en cada uno de los extractos. En las semillas verdes se encontró actividad de lectina hasta el tercer extracto salino siendo los valores de título específico menores que en los extractos de semillas maduras. En el ensayo a pequeña escala se utilizaron rangos más pequeños de sulfato de amonio para obtener un mejor fraccionamiento; sin embargo se observó la presencia de lectina desde el 20% de saturación con un título de 1:1, hasta un 70% de saturación con un título de 1:32. Esta amplia distribución de lectina en las diferentes fracciones confirma los resultados obtenidos previamente en *D. lehmanni* y *D. grandiflora* (Melgarejo y Pérez, resultados sin publicar); luego de cuantificar la lectina, en el ensayo a gran escala se encontró en mayor cantidad al precipitar al 70% de saturación.

Se estableció en los extractos salinos la presencia de inhibidores de tripsina y con el objeto de separar las lectinas de los inhibidores, se realizó la precipitación con ATA 2.5%, encontrándose la actividad inhibitoria en el sobrenadante. La lectina se detectó tanto en el sobrenadante como en el precipitado; aprovechando el bajo PM de los inhibidores de tripsina se logró eliminarlos del sobrenadante por ultrafiltración con Amicon PM10 concentrando y restituyendo el volumen original con NaCl 1% varias veces.

Los resultados obtenidos en el ensayo a gran escala se presentan en las Tablas 1 (conjunto de extractos concentrado se toma como referencia (con un valor unitario de 1) para calcular posteriormente el factor de purificación. La precipitación con ATA muestra cantidades apreciables de

Tabla 1. Cantidad de proteína y título específico en los extractos salinos de *D. sericea*.

ETAPA	Proteína (mg/ml)	Título	Título Específico	Factor de Purificación
1ª Extracción NaCl	30.09	1 : 32	1.06	
2ª Extracción NaCl	4.39	1 : 8	1.82	
3ª Extracción NaCl	0.33	1 : 4	12.05	
Pool Extractos NaCl	7.52	1 : 32	4.26	1 (Referencia)

Tabla 2. Distribución de las lectinas P_2 y P_4 en las fracciones obtenidas por Acido Tricloroacético y por Sulfato de Amonio.

ETAPA	Proteína mg /100 g harina	Título	Título Específico	Factor de Purificación
Fraccionamiento con A. Tricloroacético				
P_4 Precipitado	870.42	1 : 2	25.6	6
P_4 Sobrenadante	514.16	1 : 1	34.9	8.16
Total lectina P_4	1384.58			
P_2 Precipitado	761.39	1 : 64	42.7	10.07
P_2 Sobrenadante	106.19	1 : 8	71.1	16.69
Total lectina P_2	867.58			
Fraccionamiento con Sulfato de Amonio				
P_4 Precipitado 0-30% saturación	77.58	1 : 2	32	4.32
P_4 Precipitado 30-70 % saturación	1010.5	1 : 8	57.8	7.81
Total lectina P_4	1088.08			
P_2 Precipitado 0-30% saturación	420.27	1: 64	23.3	3.14
P_2 Precipitado 30-70% saturación	314.3	1 : 64	80.1	10.82
Total lectina P_2	734.57			

lectina tipo P_4 en el precipitado y en el sobrenadante; por el contrario gran parte de la lectina P_2 precipita con el ATA. En la precipitación con $(NH_4)_2SO_4$ se observa que la gran mayoría de la lectina P_4 se recupera de la fracción 30-70% s mientras que la lectina P_2 está similarmente distribuida entre las fracciones 0-30 % y 30-70% s. En consecuencia, por razones que desconocemos, la precipitación de la lectina P_2 ocurre en un rango muy amplio de concentraciones de $(NH_4)_2SO_4$. En la figura 1 se observa el perfil electroforético de los extractos y de las fracciones obtenidas por precipitación.

De la comparación de los métodos de precipitación podemos concluir con respecto a la proteína P_4 , que si el objetivo es buscar una proteína con un mayor título específico, se debe precipitar con sulfato de amonio al 70% s, pero si el objetivo es buscar es una mayor recuperación de proteína ello se obtiene de la reunión del sobrenadante y precipitado con ATA 2.5% (1385 mg / 100 g harina). Para la lectina P_2 el contenido es de 867 mg / 100 g harina. Comparando estos valores con los disponibles para otras

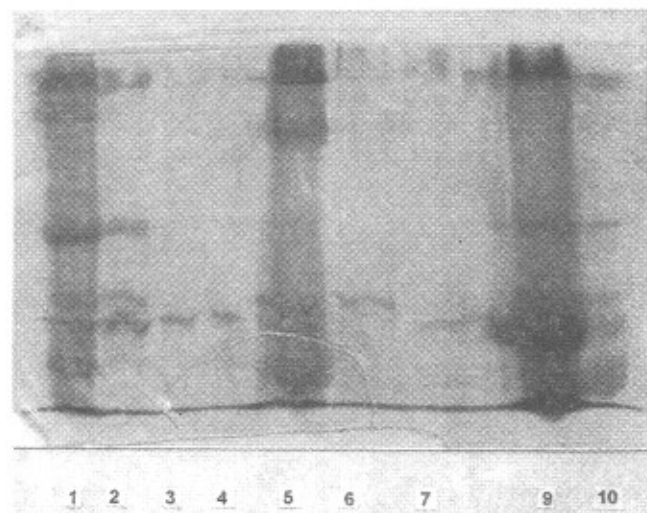


Figura 1. Electroforesis de los extractos salinos y de las fracciones precipitadas con sulfato de amonio (SA) y ATA. Carriles 1-4: extractos salinos 1 a 4; carril 5: precipitado SA 30-70 %s; carril 6: precipitado SA 0-30 %s; carril 7: precipitado SA 70-90 %s; carril 9: precipitado ATA 2.5%; carril 10: sobrenadante precipitación con ATA 2.5%.

especies de la subtribu *Diocleinae* el contenido de P_4 es menor y el de P_2 es considerablemente mayor (Melgarejo, 1997; Pérez, 1998), lo que señala a *D. sericea* como una buena fuente para la obtención de lectina P_2 .

La cromatografía de afinidad del precipitado obtenido con ATA 2.5% (Fig 2A), del sobrenadante con ATA 2.5% (Fig 2B) y del precipitado con $(NH_4)_2SO_4$ 30-70% σ (Fig 2C), evidencia la retención de la lectina P_4 sobre el soporte y la presencia, en cantidades variables, de un pico no retenido que posee actividad eritroaglutinante donde está presente la lectina P_2 . La cromatografía hidrofóbica de la fracción conteniendo la lectina P_2 , presentó un perfil de elución (Fig 3) en el cual el primer pico eluido con el gradiente de acetonitrilo, es el único que posee actividad. Los perfiles obtenidos en la cromatografía hidrofóbica para las fracciones P_2 del Sephacryl S-200 provenientes de los diferentes métodos de precipitación son similares y por tanto no se muestran.

La pureza de las dos lectinas se evaluó por electroforesis en SDS (Fig 4); la lectina P_4 (carril 2) presentó las tres bandas características α (29.9 kDa), β (16.5 kDa) y γ (13.4 kDa) análogas a las observadas en *D. grandiflora*, *D. lehmanni* y *D. altissima*. Un contaminante ocasional (banda en 45 kDa) es removido por filtración en Biogel P150. La lectina P_2 (carril 1) presenta una banda mayoritaria en 30 kDa y a veces una banda en 60 kDa probablemente debida a una reducción incompleta. La determinación por punto isoeléctrico, en placa o en tubo en condiciones desnaturalizantes mostró la presencia en P_2 de cinco isolectinas con pI comprendidos entre 5.84 y 6.66. Para la lectina P_4 se obtienen tres bandas en la región básica (9.36-8.68) que corresponden a la cadena b, dos bandas en la región neutra (6.56-6.36) que provienen de la cadena α y una banda ácida (3.50) de la cadena γ ; estos resultados son similares a los obtenidos por electroenfoque con las subunidades de la lectina de *D. grandiflora* (Ainouz et al, 1987).

Los ensayos de aglutinación con las proteínas puras utilizando eritrocitos humanos A+, B+ y O+, presentaron para la lectina P_2 el mayor título con B+ y para la lectina P_4 con A+ y B+.

La caracterización de las lectinas (Tabla 3) permitió establecer, que la proteína P_4 en su forma nativa posee un peso molecular de 57.3 (± 0.4) kDa determinado por filtración por gel y de 52.85 kDa determinado por MALDI-TOFT donde también se detecta la subunidad con 26.53 kDa (cadena α) y un fragmento con 13.23 kDa (cadena β y/o γ). La proteína es dimérica, se encuentra glicosilada (5.85% carbohidratos neutros) en mayor proporción que

Tabla 3. Propiedades moleculares de las lectinas P_2 y P_4 de *Dioclea sericea*.

	P_2	P_4
Mr proteína nativa (kDa)		
- Biogel P150	64.6	56.9
- Sphergel TSK 3000	57.3	57.7
- MALDI - TOFT	53 273 26 582	52 856 26 532 13 231
Mr subunidades (kDa)		
- SDS-PAGE	30.0	29.9 16.5 13.4
Inhibición eritroaglutinación	Lactosa Melibiosa Sacarosa	Glucosa Manosa
Contenido Triptófano (%)	4.41	3.50
Carbohidratos neutros (%)	1.52	5.85
pI (cond. desnaturalizantes)	5.84 - 6.66 (5 bandas)	9.36 6.57 3.50
pI (cond no desnaturalizantes)	5.72 - 5.38	6.85 - 6.64

su análoga en *D. lehmanni*, por electroforesis en SDS presenta las subunidades α (29.9 kDa), β (16.5 kDa) y γ (13.4 kDa) también presentes en las lectinas de la *D. lehmanni* y *D. grandiflora*, que poseen pesos similares; aglutina eritrocitos de diversas especies animales (caprino, canino, ratón, conejo y muy débilmente bovino). Los ensayos de inhibición con diversos carbohidratos (Tabla 4) mostraron que la lectina reconoce glucosa/manosa o sus derivados siendo el mejor inhibidor el p-nitrofenil- α -D-manopiranosido. La composición en aminoácidos de la lectina P_4 (Tabla 5) muestra que los aminoácidos e hidroxilados son los más abundantes; los azufrados son poco abundantes pero es de destacar que se encuentran 4 residuos de CySH y de Met por molécula, lo cual es inusual en las lectinas. La comparación con la lectina de *Dioclea lehmanni* muestra diferencias importantes en los contenidos de Arg, Gly, Phe, además de los azufrados (Pérez et al, 1991). La secuencia de aminoácidos N-terminal de la cadena α (Fig 5) es idéntica en los primeros 20 residuos con las de *D. lehmanni* y *D. grandiflora*, con la interesante excepción de la sustitución de Ile⁴ e Ile¹⁷ (altamente conservadas en

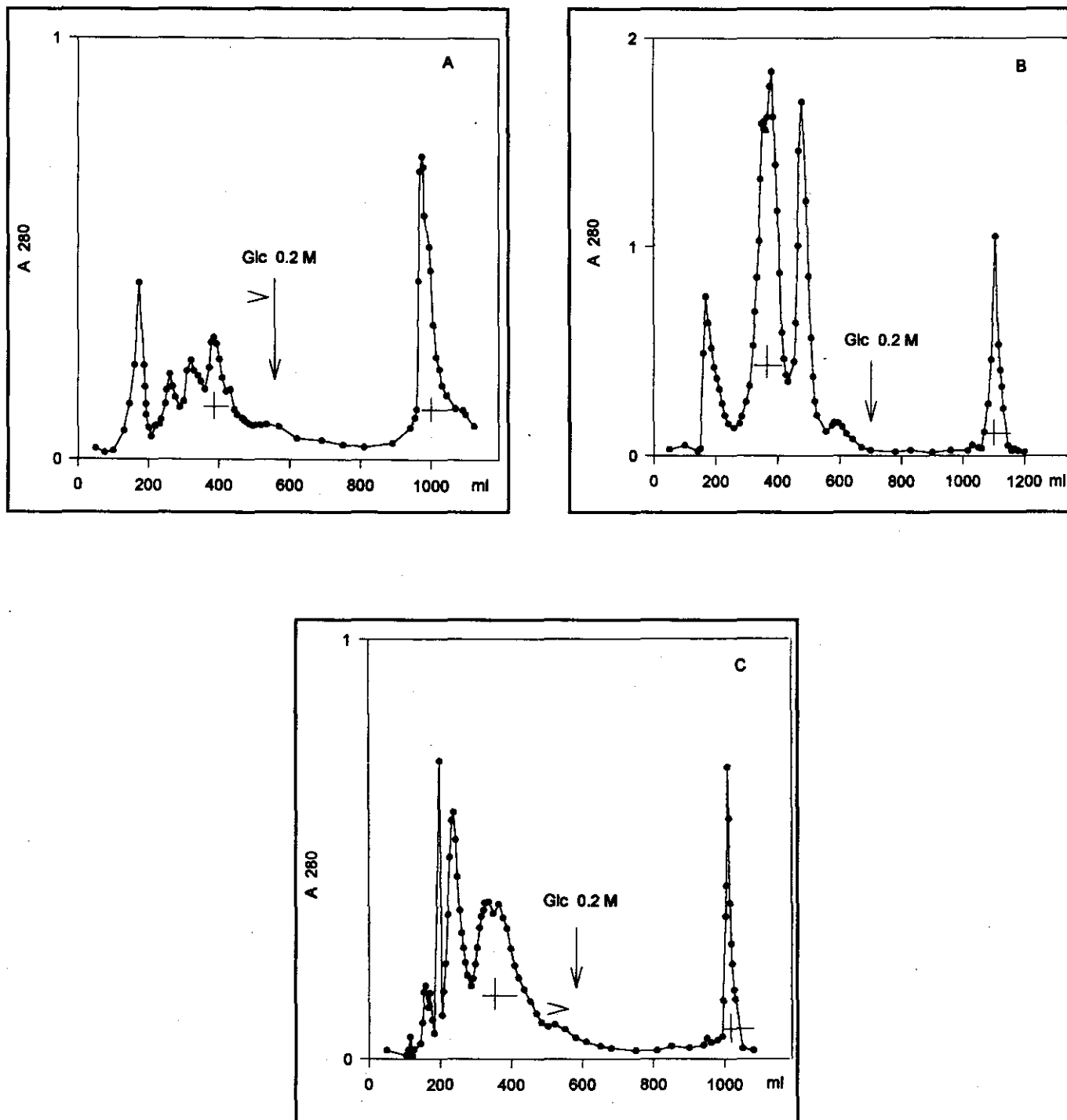


Figura 2. Purificación por cromatografía de las lectinas P_2 y P_4 de *D. sericea*.
 2A: Cromatografía sobre Sephacryl S-200 del precipitado con ATA 2.5%.
 2B: Cromatografía sobre Sephacryl S-200 del sobrenadante con ATA 2.5%.
 2C: cromatografía sobre Sephacryl S-200 del precipitado con sulfato de amonio 30-70% s.
 Las cruces indican las fracciones donde se encuentran presentes las lectinas

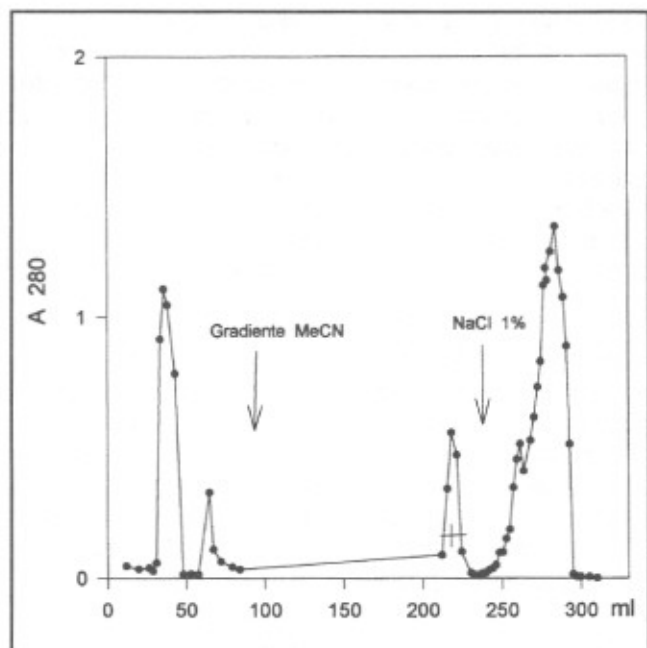


Figura 3. Cromatografía sobre Phenyl-Sepharosa del precipitado con ATA 2.5%. La cruz indica la fracción donde se encuentra presente la lectina.

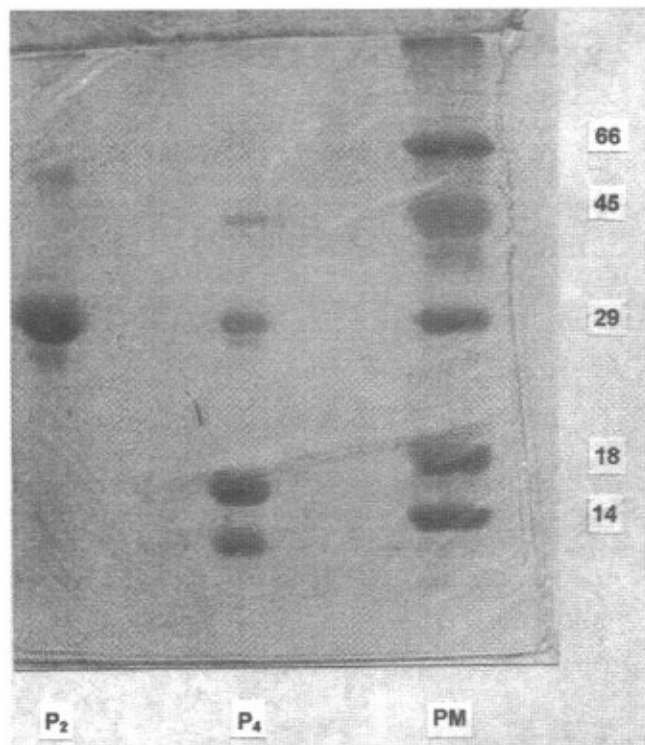


Figura 4. Electroforesis en SDS de las lectinas P_2 y P_4 de *D. sericea*. Carril 1: lectina P_2 ; carril 2: lectina P_4 ; carril 3: patrones de peso molecular.

Tabla 4. Mínima concentración inhibitoria de carbohidratos para las lectinas P_2 y P_4 de *Dioclea sericea*.

CARBOHIDRATO	LECTINA P_2 (1:4)	LECTINA P_4 (1:4)
Glucosa 0.6 M.	?	0.175 M.
Manosa 0.6M.	N.D.	0.125 M
Sacarosa 0.3M	N.D	0.075 M
Melezitosa 0.3 M.	0.075 M	0.0125 M.
Lactosa 0.3 M.	0.125 M.	N.D
Melibiosa 0.3M	0.25 M	N.D
Celobiosa. 0.3 M.	0.066 M	N.D
Sacarosa 0.3 M.	0.125 M	N.D
Galactosa 0.6 M.	0.15 M	N.D
α -Metil-D-Manosa 0.6 M	N.D	0.025 M
N-Acetil- α -D-glucosamina 0.6M	N.D	0.125 M
2-Desoxi-D-Glucosa.0.6 M.	N.D	No Inhibio
p-Nitrofenil- β -D-Manopiranosido 37 m M.	N.D	No inhibio
p-Nitrofenil- α -D-glucopiranosido 37 mM.	N.D	No Inhibio
p-Nitrofenil- β -D-glucopiranosido 37 mM.	N.D	No Inhibio
p-Nitrofenil- α -D-Manopiranosido 37 mM.	N.D	9.25. mM
Palatinosa 0.6M.	N.D	0.0125 M.
1-O-Metil- β -D-glucopiranosido 0.6 M.	N.D	No Inhibio
1-O-Metil- α -D-glucopiranosido 0.6 M	N.D	0.1M.

Tabla 5. Composición en aminoácidos de las lectinas de *Dioclea sericea*

	LECTINA P ₂		LECTINA P ₄	
	g AA/ 100g proteína	Residuos /mol	g AA/ 100g proteína	Residuos /mol
Lys	4.400	9	4.745	8
His	1.198	2	1.863	3
Arg	2.346	4	2.382	3
Asx	14.085	33	11.621	23
Thr	7.130	19	7.220	16
Ser	11.135	35	12.061	31
Glx	6.224	13	5.368	9
Pro	3.318	9	2.877	7
Gly	7.014	33	8.179	32
Ala	8.168	31	7.062	22
Cys	0.0	0	2.007	4
Val	7.985	22	6.197	14
Met	1.445	3	2.345	4
Ile	5.836	14	6.962	14
Leu	6.848	16	7.949	16
Tyr	3.985	7	3.331	5
Phe	4.655	9	4.399	7
Trp	4.410	6	3.500	4

las Diocleas) por Lys^a y Lys¹⁷; esta secuencia es también altamente homóloga con la región equivalente en las lectinas del género *Canavalia*. En la posición 15 los datos obtenidos indican una variante molecular en la que Thr está reemplazada por Asn. La secuencia N-terminal de la cadena β (Fig 5) es idéntica en los primeros 16 residuos a la de la cadena α, como es esperar si se presenta un procesamiento posttranscripcional confirmándose la sustitución Lys⁴ y la microheterogeneidad T/N en 15.

La secuencia N-terminal de la subunidad γ (14 residuos) es altamente homóloga (75%) en los primeros 8 aminoácidos y luego varía considerablemente cuando se compara con las cadenas γ de *D. lehmanni* y *D. grandiflora* (Fig 6); esta situación permite postular la presencia en las semillas de *D. sericea* de una asparaginasa que actuaría a nivel de las posiciones 118-119 (Asn-Ser) de la cadena intacta (cadena α) que requiere de una región muy conservada en las lectinas P₄ de *Dioclea* (hasta el residuo 126) para ejercer su actividad. Este procesamiento posttranscripcional es análogo al que ocurre en *C. ensiformis* (Bowles & Papin, 1988).

La homología con la región N-terminal de la cadena γ de las lectinas del género *Canavalia* es bastante baja (25%).

La lectina P₂, no es afín a la glucosa o manosa y tiene un peso molecular de 57.3 kDa (SpheroGel TSK 3000); por MALDI-TOFT se observa la forma dimérica con 53.27 kDa y el monómero con 26.58 kDa, éste último en mayor proporción. La proteína está formada por dos subunidades de igual peso molecular que también están

	1	10	20	
Concanavalina A cadena α	A	D T I V A V E L D T Y P N T D I G D P D Y	(a)
<i>C. maritima</i> cadena α	A	D T I V A V E L D T Y P N T D V G D P S Y	(a)
<i>Dioclea lehmanni</i> cadena α	A	D T I V A V E L D S Y P N T D I G D P S Y	 (a)
<i>D. grandiflora</i> cadena α	A	D T I V A V E L N S Y P N T D I G D P S Y	 (b)
<i>Dioclea sericea</i> cadena α	A	D T K V A V E L D S Y P N T D K G D P		(c)
		N		
<i>Dioclea sericea</i> cadena β	A	D T K V A V E L D S Y P N T D		(c)
		N		
(a): Pérez et al , 1991				
(b): Ainouz et al , 1987				
(c): Este trabajo				

Figura 5. Comparación de la secuencia N-terminal de las cadenas α y β de la lectina P₄ de *Dioclea sericea* con las de otras lectinas de la subtribu *Diocleinae*

presentes en *D. lehmanni* y *D. grandiflora*. Esta proteína aglutina eritrocitos de diversas especies animales (caprino, canino, ratón y conejo) y humana A+, B+ y O+ y es incapaz de aglutinar eritrocitos de bovinos difiriendo marcadamente de la lectina P₂ de *D. lehmanni*. Esta última es incapaz de aglutinar eritrocitos de ratón y canino y aglutina débilmente los de conejo (Pérez, 1998). Por el método del fenol-sulfúrico se determinó un contenido de carbohidratos de 1.52%, por ensayos de inhibición, con los mismos carbohidratos ensayados para la lectina tipo P₄, se encontró que se une a lactosa, melibiosa y sacarosa pero con una afinidad relativamente baja. Su composición en aminoácidos (Tabla 5) muestra una proporción importante de residuos hidrofóbicos lo que explica su comportamiento cromatográfico y difiere de la lectina P₂ de *D. lehmanni* en el contenido de Arg, Glx, Gly y Ala. (Pérez, 1998).

La secuencia N-terminal de la lectina P₂ (19 residuos) es altamente homóloga con las cadenas de *D. lehmanni* y *D. grandiflora* y *C. ensiformis* (Fig 7) siendo notable la sustitución de Phe⁶, Phe⁸ y Phe¹¹ (presentes en estas últimas) por Ile⁶, Ile⁸ e Ile¹¹. Esta secuencia confirma la presencia en la subtribu *Diocleinae* de una segunda lectina nueva, diferente de las descritas por otros grupos.

En términos generales se encontró una apreciable similitud de la lectina denominada P₄, con la Concanavalina A y las lectinas P₄ de *D. grandiflora* y *D. lehmanni*. En forma análoga, la lectina P₂ de *D. sericea* es muy similar a las lectinas P₂ de *D. lehmanni* y *D. grandiflora*. Este trabajo confirma la existencia simultánea en semillas de la subtribu *Diocleinae* de dos lectinas con propiedades moleculares diferentes planteando interrogantes tales como la presencia de lectinas análogas en otras especies de Fabaceas fuera de la subtribu *Diocleinae*, la razón de

	119	130	
Concanavalina A	STHQTNALHFMFNQFSK	(a)
<i>C. maritima</i>	STHETNALHFMFNQFTK	(a)
<i>Dioclea lehmanni</i>	SIADANDLHFSFSQFSQ	(a)
<i>D. grandiflora</i>SIADENSLHFSFNQFSQ	(b)
		HK	
<i>Dioclea sericea</i>	SKADENHLLIIIQ	(c)

(a) : Pérez et al , 1991
 (b) : Ainouz et al , 1987
 (c) : Este trabajo

Figura 6. Comparación de la secuencia N-terminal de la cadena g de la lectina P₄ de *Dioclea sericea* con las de otras lectinas de la subtribu *Diocleinae*

	1	10	20		
Concanavalina A	+GAVYF	+FTKFTTS	+S	+LTLQ (a)
<i>Dioclea lehmanni</i>	AGAVYFK	FTKFTTSS	SSLTLQ (b)	
<i>D. grandiflora</i>	AGAVYFK	FTKFTTSS	SSLTLQ (a)	
<i>Dioclea sericea</i>	AGAVYIR	ITFITISS	SVLTL (c)	

La + indica un residuo de aminoácido no identificado.

(a) : Melgarejo , 1997
 (b) : Pérez, 1998
 (c) : Este trabajo

Figura 7. Comparación de la secuencia N-terminal de la lectina P₂ de *Dioclea sericea* con las de otras lectinas de la subtribu *Diocleinae*

su procesamiento posttranscripcional diferente, sus potenciales interacciones en el endospermo entre sí y con proteínas de reserva y sobre los factores que regulan su expresión.

Agradecimientos

Al Departamento de Química de la U. Nacional, por su apoyo en la realización de este trabajo. Al Dr Roberto Jaramillo (ICN) por la clasificación botánica. A la Facultad de Veterinaria por el suministro de las muestras de sangre animal. A la Química Fanny Guzmán (Instituto de Inmunología) por proveer las facilidades para la secuenciación de las proteínas.

Bibliografía

- Ainouz I.I., Moreira, R. A., Campos, F.D.A.P., Richardson, M., Begbie, R., Stewart, J.C., Watt, W.B. & Pusztai A. 1987. "The isolation and amino acid sequence of the b- and g-subunits of the lectin from the seeds of *Dioclea grandiflora*". *Phytochemistry* **26**, 1435-1440.
- Andrews, P. 1965. "The gel filtration behaviour of proteins related to their molecular weights over a wide range" *Biochem. J.* **96**, 595-606.
- A.O.A.C. 1975, Official methods of analysis of the Association of Agricultural Chemists "12^a Edition, Washington.
- Bernal, H. & Jiménez, L. 1990. "Haba Criolla". SECAB. Programa de recursos vegetales del SECAB. Editorial Guadalupe. Bogotá, Colombia.
- Bollag, D., Edelstein S. & Stuart., J. 1991 "Isoelectric focusing (IEF)". *Protein Methods*. Wiley-liss, New York. pp 162-164.
- Bowles, D.J. & Papin, D.J. 1988. "Traffic and assembly of concanavalin A". *Trends Biochem. Sci.*, **13**, 60-64.
- Deutscher, M. 1990. "Guide to protein purification" *Meth. Enzymol.* **182**, 339-402.
- Dubois, M., Gilles, K., Hamilton, J., Rebers, P. & Smith, F. 1956. "Colorimetric method for determination of sugars and related substances". *Anal. Chem.*, **28**, 350-356.
- Galvis, M. & Múnera, M. 1974. "Evaluación de la proteína de *Canavalia ensiformis*". Tesis, Departamento de Química, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.
- Gupta, D., Osscarson, S., Raja, T., Stanley, P., Toone, E. & Brawer, C. 1996. "A comparison of the fine saccharide-binding specificity of *Dioclea grandiflora* lectin and concanavalin A." *Eur. J. Biochem.*, **242**, 320-326.
- Hamerstrand, G.E., Black, L.T. & Glover, J.D. 1981. "Trypsin inhibitors in soy products: Modification of the standard analytical procedure" *Cereal Chem*, **58**, 42-45.
- Hirs, W. & Stein, H. 1956. "Peptides obtained by Chymotryptic hidrolisis of performic acid-oxidized ribonuclease. A partial structural formula for the oxidized protein". *J. Biol. Chem.* **221**, 151-169.
- Hoeffler. 1992. "2-D Gel Electrophoresis". *Scientific Instruments*. 136-140.
- Humboldt, A. & Bonpland, A. 1823. "Nova genera et species plantarum". *Sixieme partie botanique*. Apud Gide Filium, Bibliopolam. No. 20, 457-458, 576.
- Laemmli, U. 1970. "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of Bacteriophage T4" *Nature*, **227**, 680-685.
- Lakhtin, V.M. 1989. "Biotechnology of lectins" *Biotekhnologiya*, **5**, 676-91.
- Lis, H. & Sharon, N. 1986. "Applications of lectins" in *The lectins*, (Liener I., E., Sharon N., Goldstein I.J., eds.) Academic Press, Orlando, pp 293-370.
- Matsudaira, P. 1987. "Sequence from picomole quantities of proteins electroblotted onto polyvinylidene difluoride membranes". *J. Biol. Chem.*, **262**, 10035-10038.
- Melgarejo, L. M. 1997. Localización intracelular de las lectinas P₂ y P₄ de *Dioclea lehmanni* y estudio de la homología de la región amino terminal de las lectinas P₂ presentes en *Dioclea grandiflora* y *Canavalia ensiformis*. Tesis Doctorado. Depto Química, Universidad Nacional de Colombia.
- Melgarejo, L.M. & Pérez, G. 1997. Immunolocalization of the lectins P₂ and P₄ from *Dioclea lehmanni* seeds". *Plant Cell Physiol.*, **38**, 480-483.
- Moreira, R., Barros, A., Stewart, J. & Pusztai, A. 1983. "Isolation and characterization of a lectin from the seeds of *Dioclea grandiflora*." *Planta*, **158**, 63-69.
- Moreira, R., Monteiro, A., Horta, A., Oliveira, J. & Cavada, B. 1997. "Isolation and characterization of *Dioclea altissima* Var. *Megacarpa* seed lectin". *Phytochemistry*, **46**, 139-144.
- Pérez, G. 1998. Isolation and characterization of a novel lectin from *Dioclea lehmanni* (*Fabaceae*) seeds. *Int.J. Biochem Cell Biol.*, **30**, 843-853.
- Pérez, G., Hernández, M. & Mora, E. 1989. "Isolation and characterization of a lectin from the seeds of *Dioclea lehmanni*". *Phytochemistry*, **29**, 1.749-1.759.
- Pérez, G., Pérez, C., Sousa, A. B., Moreira, A. R. & Richardson, M. 1991. "Comparison of the amino acid sequences of the lectins from seeds of *Dioclea lehmanni* and *Canavalia maritima*." *Phytochemistry*, **30**, 2619-2621.
- Sierra, A.Y. 1997. "Extracción, purificación y caracterización parcial de las lectinas presentes en las semillas de *Dioclea sericea*" Tesis, Departamento de Química, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.
- Steyermark, B. 1961. *Quantitative organic microanalysis*. Second edition, Academic Press, New York, pp 188-209.
- Villarraga M. & Peña, M. 1979. "Purificación y caracterización parcial de la lectina presente en la *Erythrina rubrinervia*". Tesis, Departamento de Química. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.
- Weber, K. & Osborn, M. 1975. "Proteins and sodium dodecyl sulfate: Molecular weight determination of polyacrylamide gels and related procedures" en "The proteins". 3^a edición, Neurath H., Hill R.L. (eds.), Academic Press. New York Vol. 1. pp 179-223.