

Análisis de isolectinas con fases estacionarias basadas en partículas no porosas y monolíticas de poliestireno-divinilbenceno y espectrometría de masa con ionización electrospray ^[1]

Hochleitner, E.O. ⁽ⁱ⁾; Bakry, R. ⁽ⁱ⁾; Huck, C.W. ⁽ⁱ⁾; Flores, F.I. ⁽ⁱⁱ⁾; Stöggel, W.M. ⁽ⁱ⁾; Stecher, G. ⁽ⁱ⁾; Bonn, G.K. ⁽ⁱ⁾

⁽ⁱ⁾ Institute of Analytical Chemistry and Radiochemistry, Leopold-Franzens University, Innrain 52a, A-6020 Innsbruck, Austria

⁽ⁱⁱ⁾ INTI-Contaminantes Orgánicos

Introducción

Las lectinas son proteínas unidas a carbohidratos. Se encuentran en microorganismos, semillas, raíces, cortezas vegetales así como también en membranas de células de mamíferos ^[2]. Las lectinas vegetales están involucradas en la captura y fijación de nitrógeno de bacterias a legumbres y en la protección contra patógenos ^[3]. Las lectinas pueden presentar una amplia variedad de isómeros, los cuales se pueden generar por polimorfismos genéticos resultando en una amplia variedad de secuencias de aminoácidos y estructuras 3-D, o pueden generarse durante el proceso post-translacional ^[2,4].

La cromatografía en fase reversa (RP-LC) ha emergido como una de las técnicas predominantes de separación de proteínas. La espectrometría de masa (MS), la cual puede asegurar la determinación del peso molecular, es consecuentemente el método de detección preferido para estas biomoléculas.

El objetivo de este trabajo fue desarrollar un método rápido para la separación y caracterización de isolectinas vegetales. Se estudiaron las isolectinas de tres especies vegetales: lentejas (*Lens culinaris*), germen de trigo (*Triticum vulgare*) y porotos (*Canavalia ensiformis*). Los isómeros son de origen proteolítico (lentejas) y genéticos (germen de trigo) y en gran parte las secuencias son homólogas. Se estudió la performance de las columnas micropeliculares y monolíticas de poliestireno-divinilbenceno (PS-DVB) en combinación con la espectrometría de masa con electrospray (ESI-MS) para la separación de isolectinas y su caracterización. Finalmente, se utilizó el método para la identificación de una lectina vegetal en una matriz biológica compleja.

Metodología / Descripción Experimental

Espectrómetro de masa con cuadrupolo Finnigan MAT LCQ, equipado con una fuente de ionización por electrospray (Finnigan MAT, San Jose, CA). La columna capilar monolítica fue conectada inline al capilar spray

(d.e.:150 μ m, d.i.:75 μ m, Polymicro Technologies, Phoenix, AZ) por medio de un conector. Se aplicó un voltaje de 4,5 kV y se utilizó una temperatura de 190 °C para calentar el capilar. Se utilizó nitrógeno para asistir neumáticamente al ESI. Los espectros de masa fueron registrados en una PC equipada con el software LCQ Xcalibur versión 1.2 (Finnigan). Se utilizó Citocromo C para el tuning. Para la identificación de las proteínas y comparación de las secuencias se utilizó el Molecular Biology Server del Swiss Institute of Bioinformatics (Génova, Suiza).

Resultados

Separación de isómeros de lectinas por microcromatografía líquida y detección por ESI-MS

En el cromatograma de las lectinas del germen de trigo (*Fig. 1a*) se observan dos picos parcialmente resueltos. El espectro de masa del primer pico presenta dos masas: 17090 y 17175 Da; el segundo pico presenta una masa de 17081 Da. Las secuencias de las tres isolectinas del germen de trigo ya habían sido anteriormente elucidadas, las cuales tienen en común del 95 al 97 % de las secuencias. El promedio de las masas moleculares de 17081, 17090 y 17175 Da pueden calcularse de las secuencias cDNA publicadas de las isolectinas 1, 2 y 3 del germen de trigo ^[6]. Estas masas concuerdan con los iones más intensos detectados. Se observan los cromatogramas extraídos de los iones totales corrientes (TIC) (*Fig. 1a*): iones cargados +10 de la isolectina 1 (*Fig. 1b-m/z 1709,1*) y de la isolectina 2 (*Fig. 1c-m/z 1710,1*).

Las lentejas contienen dos isolectinas que se separan electroforéticamente: isolectina A e isolectina B ^[5]. Ambas son conformadas por dos cadenas polipeptídicas: una cadena β N-terminal (19891 Da) y una más pequeña α C-terminal (5878 Da). Se observaron tres picos en el cromatograma (*Fig. 2a-picos 2a, 2b, 2c*). El espectro de masa del pico que eluyó primero (*pico 2a*) contiene dos masas: 5878 y 5750 Da. El segundo pico está conformado por tres masas: 5621, 5531 y 5446 Da. Las masas detectadas

en los primeros dos picos concuerdan con el peso molecular teórico de

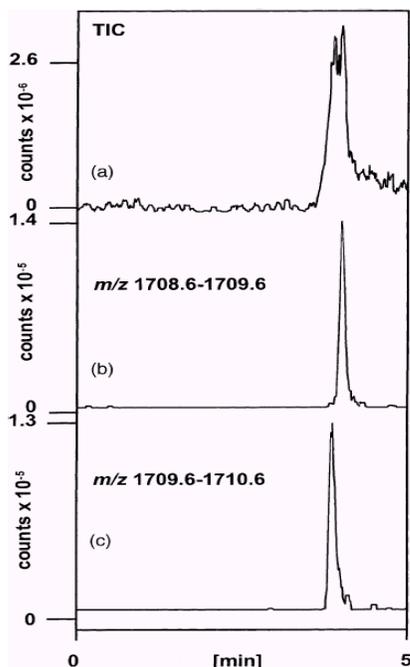


Fig. 1. LC-ESI- MS de las isolectinas del germen de trigo.

la subunidad α (aminoácidos 1-54) y sus truncaciones C-terminales 1-53, 1-52, 1-51 y 1-50. La masa en el tercer pico corresponde a la subunidad β (teóricamente 19891 Da). La subunidad α intacta y el fragmento 1-53 (subunidad α -isolectina B) eluyen más tarde que los fragmentos 1-52, 1-51 y 1-50 (subunidad α - isolectina A) con la ausencia del residuo de lisina cargado positivamente en la posición 53. La separación de las lectinas de las lentejas en tres picos facilita la interpretación y la obtención de los espectros de masa significativamente. Se pueden observar los espectros de masa del ión 5+ de la subunidad α de la isolectina B (Fig. 2b- m/z 1176,3), de la subunidad α de la isolectina A (Fig. 2c- m/z 1107,8) y del ión cargado +12 de la subunidad β (Fig. 2d- m/z 1658,5).

A la Concanavalin A se la considera como un precursor y se procesa proteolíticamente para producir dos cadenas de 12939 y 12678 Da. Estas cadenas se transponen para formar una nueva unión peptídica. La proteína final tiene un peso molecular de 25598 Da. Se puede observar la separación de dos picos (Fig. 2a, picos 3a y 3b). El espectro del primer pico revela una masa de 12939 Da, el segundo pico revela dos masas: 12678 y 25598. Los dos iones de aproximadamente 12 kDa representan a los fragmentos 1-118 y 119-237 de concanavalin A generados durante el proceso proteolítico de la lectina. La masa 25598 corresponde a la proteína final intacta. No se observan otros fragmentos o isómeros de concanavalin A.

Análisis de isolectinas en una matriz compleja aplicando LC-ESI-MS (extracto de lentejas [7])

Si bien el cromatograma obtenido era muy complejo y la separación fue incompleta, el espectro de masa extraído de secciones seleccionadas del cromatograma permitió la identificación de la subunidad α de la isolectina B. El promedio de nueve barridos entre 11,7 y 12 min. produjo un espectro de masa comparable al obtenido con el espectro de la subunidad α de la isolectina B del estándar de lenteja (Fig. 2, pico 2a) obtenido con el promedio de 14 barridos entre 11,6 y 12,1 min.

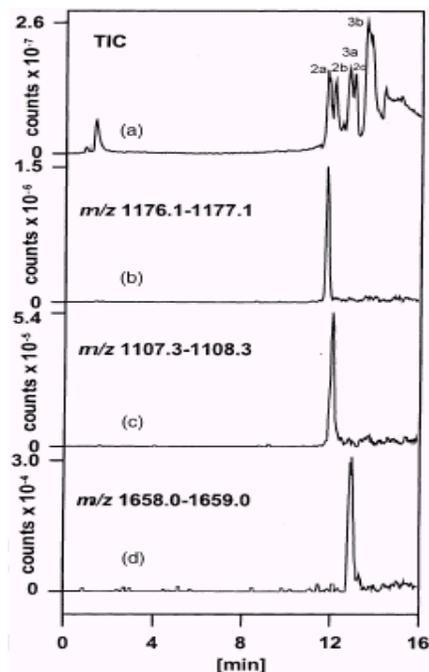


Fig. 2. LC-ESI-MS de las isolectinas de la lenteja y concanavalin A.

Conclusiones

—El uso del LC-ESI-MS permitió la caracterización de isolectinas vegetales aún en los casos en que la separación de los picos no fue completa;

—se necesitan métodos más selectivos de tratamiento de muestras o de separaciones multidimensionales para permitir una mayor eficiencia en el análisis de isómeros de lectinas en matrices complejas;

—el uso del LC-ESI-MS usando fases estacionarias monolíticas de PS-DVB posibilita mayores investigaciones en isómeros de lectinas en una amplia variedad de vegetales como así también en muestras de alimentos.

Referencias

- [1] E.O. Hochleitner, R. Bakry, C.W. Huck, F. Flores, W.M. Stöggli, G. Stecher, et al., *I. J. Mass Spectrometry* 12239 (2002).
- [2] I.J. Goldstein, R.D. Poretz, in: I.E. Liener et al./ I.J. Goldstein (Eds.), *The Lectins*, vol. 35, Academic Press, New York, 1989.
- [3] J. Inbar, *I. Chet. Crit. Rev. Biotechnol.* 1 (1997) 17.
- [4] E.J.M. Van Damme, et al./, T.C. Borg-Hansen (Eds.), *Lectin Reviews*, vol. 1, Sigma, St. Louis, MO, 1991, p. 161.
- [5] I.K. Howard, H.J. Sage et al./ *J. Biol. Chem.* 216 (1971) 1590.
- [6] C.S. Wright, N. Raikhel, *J. Mol. Evol.* 28 (1989) 327.
- [7] I.K. Howard, H.J. Sage et al./ *J. Biol. Chem.* 216 (1971) 1590.

Para mayor información contactarse con:
Fabiana Flores – fflores@inti.gov.ar