



# USO DE LA LECTINA DE *Olneya tesota* (PF2) PARA LA PURIFICACIÓN Y DETECCIÓN HISTOQUÍMICA DE UNA PROTEÍNA DE CHOQUE TÉRMICO (GP14) DE BAZO

USE OF THE *Olneya tesota* LECTIN (PF2) FOR PURIFICATION AND HISTOCHEMICAL DETECTION OF A SPLEEN HEAT SHOCK PROTEIN (GP14)

Gabriel Urbano-Hernández<sup>a</sup>, Ana María Guzmán-Partida<sup>a</sup>, María del Carmen Candia-Plata<sup>b</sup>, Guillermo López-Cervantes<sup>c</sup>, Luz Vázquez-Moreno<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup> Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Apartado Postal 1735. Hermosillo Sonora, México.

<sup>b</sup> Laboratorio de Bioquímica Clínica. Universidad de Sonora, Hermosillo Sonora, México.

<sup>c</sup> Departamento de Patología. Hospital Infantil del Estado de Sonora, Hermosillo Sonora, México.

## RESUMEN

PF2 es una lectina de las semillas de *Olneya tesota* (Palo fierro) con afinidad alta hacia carbohidratos complejos triantennarios tetrasialilados. El objetivo de este estudio fue localizar glicoconjugados que interactúen con PF2 en secciones de tejido de bazo y purificar glicoproteínas usando cromatografía de afinidad con PF2. Se incubaron secciones finas de tejido de bazo con PF2 biotinilada y se observaron interacciones con linfocitos en los nódulos y estructuras internas de tipo reticular en la pulpa blanca. Se prepararon extractos de bazo para purificar la glicoproteína detectada, usando dos etapas cromatográficas, intercambio iónico (CM-celulosa) y afinidad (PF2-agarosa). Por electroforesis nativa y con SDS se mostró una glicoproteína monomérica de 14 kDa (GP14). Una vez digerida con una proteasa, se identificaron seis secuencias peptídicas en la GP14. Cada péptido mostró 100% de homología a secuencias internas de diferentes proteínas de choque térmico de la familia de 70 kDa (HSP70). Esta similitud con las HSP fue confirmada por electrotransferencia e inmunodetección usando anticuerpos específicos para HSP70. En conclusión, la lectina PF2 tiene especificidad hacia un glicoconjugado denominado GP14 que pudiera ser una glicoproteína de estrés del bazo humano, identificada por primera vez.

**Palabras clave:** *Olneya tesota*; lectina PF2; bazo; proteína de choque térmico.

## ABSTRACT

PF2 is a lectin from *Olneya tesota* (Palo fierro) seeds with high affinity towards triantennary tetrasialylated complex carbohydrates. The goal of this study was to localize PF2-interacting glycoconjugates in spleen tissue thin sections, and to purify glycoproteins using PF2 affinity chromatography. Biotinylated PF2 was incubated with thin sections of fixed spleen tissues and interactions with lymphocytes in nodules of splenic white pulp were observed. Two chromatographic steps, using ion exchange chromatography (CM-cellulose) and affinity chromatography (PF2-agarose)

made possible the purification of a glycoprotein from spleen extracts. Both SDS-PAGE and PAGE showed a 14-kDa monomeric glycoprotein (GP14). GP14 was protease digested and the sequences of six peptides were identified. Each of the GP14 peptides showed 100% homology to different internal sequences of the 70-kDa family of heat shock proteins (HSP70). The similarity with HSP was confirmed by Western blot using an antibody specific to HSP70. In conclusion, PF2 lectin has specificity toward a glycoconjugate named GP14 from spleen extract. GP14 could be a novel stress glycoprotein from human spleen.

**Keywords:** *Olneya tesota*; PF2 lectin; spleen; glycoproteins; heat shock proteins

## INTRODUCCIÓN

Las lectinas son proteínas o glicoproteínas que se unen específica y reversiblemente a los carbohidratos, promoviendo la aglutinación celular o precipitación de polisacáridos y glicoconjugados (Goldstein et al., 1980; Sharon y Lis, 1989). Las lectinas son ubicuas ya que se encuentran en virus, bacterias, hongos, plantas y animales (Goldstein y Porretz, 1986; Kim et al., 2004). En el reino vegetal, las semillas de leguminosas son una fuente abundante de lectinas, constituyendo hasta el 10% de su proteína soluble total (VanDamme et al., 1997).

Las lectinas de las semillas de plantas muestran una alta afinidad con carbohidratos, por lo que han sido utilizadas como reactivos de gran valor en la glicobiología, tal es el caso de la detección y caracterización preliminar de glicoconjugados de las células de membrana y en la definición de grupos sanguíneos (Loris et al., 1998). Además, las lectinas cuando son inmovilizadas resultan una herramienta atractiva para separar moléculas que contienen carbohidratos a partir de mezclas complejas (Merkle y Cummings, 1987).

La lectina PF2 es una molécula tetramérica, que proviene de las semillas de la leguminosa *Olneya tesota* (Palo fierro), con cuatro subunidades de 33 kDa (Vázquez-Moreno et al., 2000) y que se une a los carbohidratos complejos

triantenarios tetrasialilados (Urbano-Hernández, 2007) y no es inhibida por monosacáridos (Vazquez-Moreno *et al.*, 2000). Por lo tanto, PF2 puede ser utilizada para identificar y purificar glicoproteínas que contienen a estos oligosacáridos complejos.

Entre las glicoproteínas purificadas por afinidad a lectinas se incluyen a aquellas involucradas en el desarrollo y diferenciación celular, así como también en algunas que pueden ser importantes marcadores de condiciones patológicas como infecciones, inflamación y traumas (Muroi *et al.*, 1997; Tsuboi y Fukuda, 2001; Porras *et al.*, 2005). Las proteínas de choque térmico (HSP, por sus siglas en inglés) son glicoproteínas purificadas a partir de tejidos humanos, usando cromatografía de afinidad con lectinas. Algunas de esas glicoproteínas pueden ser inducidas o bien constitutivamente expresadas por las células de los tejidos humanos (Dahlman-Wright *et al.*, 1992; Zhao and Wang, 2004; Porras *et al.*, 2005).

Debido a que hay diversidad de glicoconjugados complejos en tejidos humanos, este estudio se centró en la búsqueda de moléculas por las que la PF2 pudiera tener afinidad, en tejidos normales de bazo, así como en su utilización para purificar dichas moléculas glicoproteicas.

## MATERIALES AND MÉTODOS

### Materiales y reactivos

Los tejidos de necropsias fueron obtenidos bajo los requerimientos legales y éticos de la Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002, proporcionados por el Departamento de Patología del Hospital Infantil del Estado de Sonora. Las secciones de tejido del bazo de pacientes de tres meses de edad fueron seleccionadas para este estudio.

La agarosa activada con divinilsulfona (Mini-LeaK) fue de Kem-En-Tec (Hellerup, Denmark). El cocktail inhibidor de proteasas (COMPLETE, EDTA-free) fue adquirido de Roche Diagnostic (Indianapolis, IN, USA). Los geles de poliacrilamida fueron de GE Healthcare Life Science (Uppsala, Sweden) y los estándares de peso molecular de amplio rango SDS-PAGE fueron de Bio-Rad (Hercules, CA, USA). Los anticuerpos monoclonales anti-CD20 humano fueron de Dako (Denmark). Los anticuerpos policlonales anti-HSP70 fueron adquiridos de GenWay Biotech (San Diego, CA). Los anticuerpos anti-Ig fueron de BioGenex (San Ramon, CA) y la estreptavidina peroxidasa de Vector Lab. Inc. (USA). El resto de los reactivos fueron adquiridos de Sigma Chemicals Co. (St Louis, MO, USA).

### Inmuno y lectino histoquímica

La lectina PF2, previamente purificada de acuerdo a Vazquez-Moreno *et al.* (2000), fue biotinilada usando el protocolo de Hofmann *et al.* (1982). Los anticuerpos anti-CD20 fueron usados como tinción positiva de las células B en tejidos linfoides.

Las secciones de tejido de bazo (2  $\mu$ m) fueron embebidas en parafina para ser usadas en el ensayo de reconoci-

miento de PF2. Los tejidos se dejaron secar toda la noche a 37 °C, se les removió la parafina con xileno, para luego ser hidratados a través de una serie de mezclas de alcohol-agua (100 - 50%).

La técnica de recuperación del epítipo inducida por calor (HIER, por sus siglas en inglés) fue aplicada sobre los tejidos rehidratados. Para bloquear los sitios de interacción no específica, los tejidos fueron cubiertos con albúmina de suero bovino (BSA) en solución amortiguadora de fosfato salino (PBS) 0.01M, pH 7.2 y se dejaron incubar a temperatura ambiente con PF2 biotinilada (20  $\mu$ g/mL) durante 45 min. La interacción fue revelada por incubación con el sistema estreptavidina peroxidasa durante 30 min (Vector Lab. Inc. USA) y posterior reacción con 3,3'-diaminobenzidina 4 HCl (DAB, 0.2 mg/mL) y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.005%) por 10 seg a temperatura ambiente. Finalmente, los tejidos fueron enjuagados con agua, contra teñidos con hematoxilina de Mayer, deshidratados, aclarados y montados (Schorge *et al.*, 2003). La intensidad de interacción con anticuerpos y con lectina (anti CD20 y PF2 biotinilados, respectivamente) fue subjetivamente evaluada con una escala de cuatro categorías: (-) negativo, (+) interacción débil, (++) interacción moderada e (++++) interacción fuerte (Aoki *et al.*, 1990).

Para evaluar la especificidad de la tinción con PF2, se incluyeron los siguientes controles:

(1) lectina PHA-E (fitohemaglutinina de frijol tipo E) como marcador de células T, (2) anti CD20 biotinilado diluido en PBS (1:50, v/v) como marcador positivo de células B, (3) pre-absorción de lectinas con fetuina (control de especificidad), ovoalbúmina y BSA a una concentración de 20  $\mu$ g/mL y (4) sustitución de la lectina conjugada por PBS para determinar la presencia de actividad peroxidasa endógena.

### Aislamiento de proteínas por intercambio iónico

El aislamiento de las proteínas del tejido de bazo se realizó de acuerdo a la metodología de Martínez-Pomares *et al.* (1999) y Ketcham *et al.* (1985). El tejido fue cortado en trozos y la *fascia* exterior se removió, para luego homogenizarse a 4 °C en solución amortiguadora Tris-HCl 10 mM pH 7.5 con Tween 20 al 2.5% (v/v), NaCl 150 mM, NaN<sub>3</sub> 10 mM, EDTA 2 mM, iodoacetamida 5 mM e inhibidores de proteasas, usando un sonicador Branson modelo 250 (Branson Ultrasonics Corp, USA) a 4 pulsos por 10 segundos. Se usó un volumen de 90 mL de solución amortiguadora por cada 60 g de tejido. El homogenado se centrifugó a 12,500g durante 30 min a 4 °C, usando una centrífuga Allegra TM 64 R (Beckman Coulter, Inc., USA). El sobrenadante obtenido fue nuevamente centrifugado a 66,200 g por 60 min a 4°C. La pastilla fue lavada dos veces más con la solución amortiguadora conteniendo inhibidores de proteasas y Triton X-100 al 2%. El material insoluble fue removido por centrifugación a 164,000g por 30 min a 4°C en una centrífuga Beckman TC-100 (Beckman Coulter, Inc., USA). Todos los sobrenadantes fueron combinados y dializados durante 48 h contra PBS, haciendo cambios continuos cada 4 h. Se añadió el extracto dializado a 50 mL de CM-celulosa y se agitó a 4 °C por 48 h. Este material fue

filtrado usando papel Whatman No. 4 sobre un embudo Buchner y posteriormente lavado cinco veces con PBS. La CM-celulosa fue resuspendida en PBS y empacada en una columna de vidrio de 1.5 x 30 cm. Las proteínas no unidas a la matriz fueron lavadas con PBS hasta que la absorbancia a 280 nm fue menor a 0.02. Las proteínas unidas fueron eluidas por separación isocrática con NaCl 0.5M en PBS a 0.3 mL/min y colectadas en fracciones de 2 mL. Las fracciones de cada pico fueron integradas, dializadas contra agua y liofilizadas, para luego almacenarse a -40°C hasta su análisis. Debido a la alta actividad proteolítica del tejido, al iniciar la purificación de las proteínas del bazo se añadió al homogenado una cantidad conocida de BSA como control interno, para verificar el grado de proteólisis producido y así descartar que las glicoproteínas purificadas no sean un producto de degradación de las proteínas presentes en el bazo.

### Purificación por cromatografía de afinidad con PF2 inmovilizada

La matriz de agarosa-PF2 fue preparada de acuerdo a Vazquez-Moreno *et al.* (2000), donde la lectina PF2 (40 mg) fue acoplada a agarosa activada (1g). Esta matriz (2 mL) fue empacada en una columna de vidrio (0.7 mm de diámetro) y equilibrada con PBS. Las proteínas aisladas por intercambio iónico fueron aplicadas (1.1 mg en 10 mL de PBS) a la columna y las proteínas no unidas a la matriz fueron lavadas extensivamente con PBS, mientras que las proteínas unidas a PF2 fueron eluidas por cambio de pH, usando glicina-HCl 0.02 M pH 3.0, a 1 mL/min. El proceso cromatográfico fue seguido a 280 nm y se colectaron fracciones de 1 mL. Las fracciones eluidas se juntaron, se dializaron contra agua, se liofilizaron y se almacenaron a -40°C hasta su análisis.

### Determinación de proteína

La concentración de proteína se estimó de acuerdo al método de Lowry *et al.* (1951), empleando BSA como estándar.

Electroforesis en geles de poliacrilamida y ensayo de electrotransferencia (Western blot)

Las proteínas contenidas en las fracciones de cromatografía de intercambio iónico y de afinidad fueron analizadas por electroforesis en condiciones desnaturizantes y reductoras (SDS-PAGE), utilizando un equipo Phast System GE Healthcare Life Science (Uppsala, Suecia), con un gel en gradiente lineal de 8-25%. Se aplicaron 4 µg de proteína a cada pozo y los geles fueron teñidos con nitrato de plata (Wray *et al.*, 1981). La masa molecular de las subunidades fue estimada por comparación con marcadores de masa molecular de amplio rango (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Las fracciones proteicas también fueron analizadas en condiciones nativas (PAGE), utilizando un gel de alta densidad al 20%. Se aplicaron 10 µg de proteína. Todos los geles fueron teñidos con nitrato de plata.

La electrotransferencia e inmunodetección en membrana se realizó de acuerdo a lo descrito por Towbin *et al.*

(1979). Las proteínas separadas por SDS-PAGE fueron transferidas a una membrana de difluoruro de polivinilo a 2.5mA/cm<sup>2</sup> por 45 min, usando una cámara semiseca (Buchler Instruments Labconco). La membrana fue bloqueada toda la noche con BSA al 2% en PBS a 4°C, seguido de una incubación con anticuerpos policlonales anti-HSP70 (1:500) y posterior incubación con anti-Ig biotinilados y estreptavidina-peroxidasa. El color de la reacción se desarrolló a temperatura ambiente añadiendo DAB al 0.075% en PBS.

Análisis de péptidos de la glicoproteína GP14 por cromatografía líquida y espectrometría de masas tándem (LC-MS/MS)

La glicoproteína purificada por cromatografía de afinidad fue recortada del gel SDS-PAGE y enviada a Centre Protéomique de l'Est du Québec (Québec, Canada) para su análisis. La glicoproteína fue tratada con tripsina y el análisis directo de las secuencias de péptidos fue hecho por LC-MS/MS de acuerdo a Link *et al.* (1999). Los espectros MS/MS fueron comparados con los espectros teóricos de National Center for Biotechnology Information (NCBI) disponibles en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Las secuencias de aminoácidos deducidas fueron obtenidas usando el Expasy Proteomics Server disponible en <http://www.expasy.gov>, para luego realizar el alineamiento múltiple de secuencias de proteínas con el programa CLUSTAL W.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Lectino-histoquímica

La lectina PF2 de semillas de *Olneya tesota* tiene una elevada afinidad hacia carbohidratos complejos trianténarios tetrasialilados (Urbano-Hernández, 2007) y no es inhibida por carbohidratos simples (Vazquez-Moreno *et al.*, 2000). Otra característica de esta lectina es su afinidad alta hacia tejidos linfoides como el timo y ganglio linfático, demostrado por análisis histoquímico (Urbano-Hernández, 2007). En este estudio PF2 se utilizó para estudiar la interacción con glicoconjugados de tejido post-mortem del bazo y purificar esos glicoconjugados. A diferencia de los tejidos del bazo de un adulto (Steiniger *et al.*, 2001), los tejidos de los neonatos estudiados presentaron en diferentes secciones un gran número de folículos secundarios (Urbano-Hernández, 2007), lo que sugiere una expresión diferencial de los glicoconjugados o bien de sus carbohidratos en diferentes estados de madurez.

La lectino histoquímica de diversas secciones de tejido del bazo reveló que PF2 interactúa notablemente en la pulpa blanca. Se observó una distribución intensa (+++) en la tinción con la lectina, especialmente en los linfocitos de los folículos de la pulpa. Los centros germinales del bazo, donde los linfocitos B son abundantes, se tiñeron también con los anticuerpos anti-CD20 (Figura 1A y B, respectivamente). Se seleccionó el antígeno CD20 como forma de confirmación linfocitaria, ya que es una fosfoproteína expresada en la superficie de todas las células B, desde las inmaduras hasta las maduras, con una concentración elevada en las últimas. Las interacciones del anti-CD20 y PF2 fueron similares entre sí,

tanto en intensidad como en localización celular de linfocitos B.

PF2 también mostró afinidad moderada (++) hacia aquellas estructuras internas de tipo reticular en la pulpa blanca y una afinidad débil (+) hacia las células reticulares que limitan a los folículos, mientras que la tinción del retículo interno folicular en la pulpa blanca fue de intensidad moderada (++) (Figura 1B). Esto no ocurrió con el control de lectinas que consistió de la lectina de frijol PHA-E (Figura 1C). Las vainas linfoides peri-arteriolares, abundantes en linfocitos T, fueron escasamente teñidas, mientras que la zona marginal externa fue teñida solamente por PHA-E (datos no mostrados). En ambas regiones, la ausencia de interacciones entre PF2 y zonas de células T, así como la tinción de los nódulos de la pulpa blanca, indicaron la probable afinidad específica de PF2 hacia células B; sin embargo, esto debe ser confirmado con una doble tinción con PF2 y anti-CD20. No se conoce aún el arreglo preciso de los linfocitos B y T en los diferentes compartimentos de la pulpa blanca del bazo (Steiniger *et al.*, 2003); no obstante los linfocitos B representan la línea celular principal de los centros germinales donde se observó la tinción más fuerte con PF2.

Los carbohidratos de la matriz extracelular juegan un papel importante en las interacciones matriz-célula (Dullmann *et al.*, 2000), por lo tanto, el análisis histoquímico del bazo usando nuevas lectinas podría contribuir a la identificación de determinantes carbohidrato específicos. Solamente unas pocas lectinas, tales como la de *Chelidonium majus* (CMA) (Dullmann *et al.*, 2000), tiñen selectivamente las fibras reticulares, lo cual no se observó con PF2. La relevancia de este resultado implica la posibilidad de mostrar la variabilidad estructural de los tejidos linfoides y los mecanismos que controlan el tránsito linfocítico, por lo que es importante la identificación de las glicoproteínas a las que están unidos los oligosacáridos en las fibras reticulares y que interactúan con PF2.

### Purificación de glicoproteína del bazo

Para definir mejor a las glicoproteínas del bazo reconocidas por PF2, los extractos de tejidos fueron inicialmente fraccionados por cromatografía de intercambio iónico, usando CM-celulosa. Las proteínas no adsorbidas a la matriz se fueron en la fracción de lavado (Tabla 1), mientras que las que si se adsorbieron eluyeron con NaCl 0.5 M en PBS, principalmente como una sola fracción (Figura 2). Este aislamiento permitió la remoción de hemoglobina contaminante (Huisman *et al.*, 1958) para favorecer posteriormente la purificación de proteínas sobre la base de su afinidad con PF2.

Las proteínas eluidas de CM-celulosa fueron aplicadas a la columna de agarosa-PF2 y se obtuvieron dos fracciones principales: el lavado (no interacción) y la elución con glicina-HCl que libera las glicoproteínas que fueron reconocidas por PF2 (Figura 3).

Las fracciones proteicas de elución de intercambio iónico y afinidad fueron analizadas por SDS-PAGE. El análisis electroforético de la fracción de intercambio iónico mostró la

**Tabla 1.** Purificación de proteínas del bazo por cromatografía de intercambio iónico y de afinidad con PF2.

**Table 1.** Purification of spleen proteins by ion exchange and PF2-affinity chromatography.

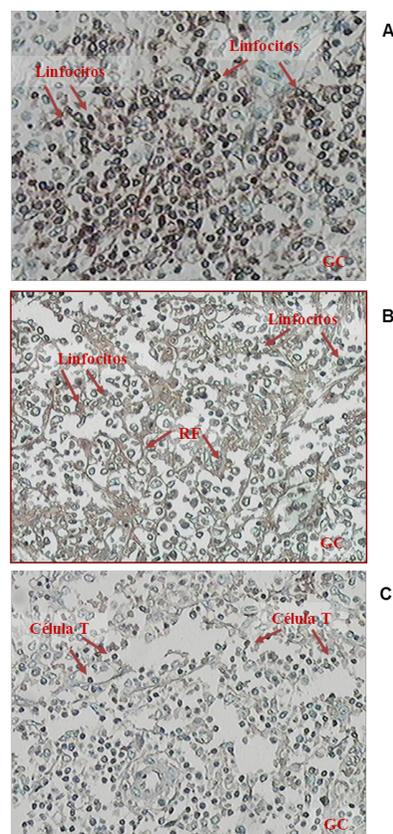
Etapa cromatográfica	Proteína Aplicada (mg)	Proteína no adsorbida (mg)	Proteína adsorbida (mg)
CM-celulosa <sup>a</sup>	22 ± 0.9	18 ± 0.7	3.3 ± 0.05
Agarosa-PF2 <sup>b</sup>	1.1 ± 0.2	0.73 ± 0.1	0.19 ± 0.03

<sup>a</sup> 50 mL de volumen de cama

<sup>b</sup> 2 mL de volumen de cama

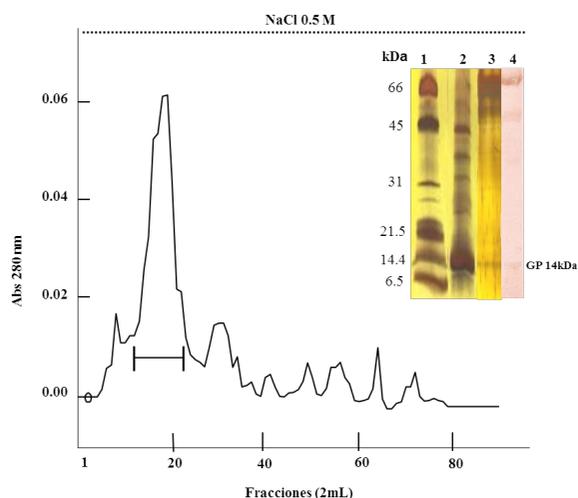
± Desviación estándar de 6 corridas.

presencia de varias bandas cuyas masas moleculares estaban entre 66 y 45 kDa, además de una banda tenue de 14 kDa (Figura 2, inserto). Por otra parte, la fracción de afinidad por PF2 reveló una banda intensa de 14 kDa (Figura 3, inserto A). Adicionalmente, esta fracción de afinidad fue sujeta a PAGE en condiciones nativas (Figura 3, inserto B) y se observó nuevamente una sola banda cuya masa estimada fue también de 14 kDa. De acuerdo a estos análisis, la glicoproteína purificada del tejido de bazo es un monómero, al cual se le nombró GP14.



**Figura 1.** Microfotografías de las secciones de centros germinales (GC) del bazo procesadas con (A) anti-CD20, (B) lectina PF2 y (C) lectina PHA-E por inmunohistoquímica 20X. La interacción positiva de los linfocitos y fibras reticulares (RF) es mostrada con flechas.

**Figure 1.** Light microphotographs of spleen germinal centers (GC) sections processed with (A) anti-CD20, (B) PF2 lectin and (C) PHA-E lectin by immunohistochemistry 20X. The positive interaction of lymphocytes and reticular fibers (RF) is shown with narrows.



**Figura 2.** Aislamiento de glicoproteínas del bazo por cromatografía de intercambio iónico en CM-celulosa (elución isocrática). Inserto: análisis electroforético SDS-PAGE de (1) estándar de masa molecular; (2) extracto crudo de tejido de bazo; (3) fracción de elución de la cromatografía en CM-celulosa (---); (4) fracción de elución de CM-celulosa transferida a membrana de difluoruro de polivinilo y detectada con anti-HSP70, seguido de un tratamiento con anti-Ig biotinilado de conejo, complejo estreptavidina-peroxidasa y DAB. El gel fue teñido con plata.

**Figure 2.** Isolation of spleen glycoproteins by ionic exchange chromatography with CM-cellulose (isocratic elution). Insert: SDS-PAGE analysis of (1) molecular weight standards; (2) crude extract from splenic tissue; (3) elution fraction from CM-cellulose (---); (4) elution fraction from CM-cellulose transferred onto a polyvinylidene difluoride membrane and detected with a polyclonal anti-HSP70 antiserum followed by treatment with biotinylated anti-rabbit Ig, streptavidin-peroxidase complex and DAB. Gel was silver stained.

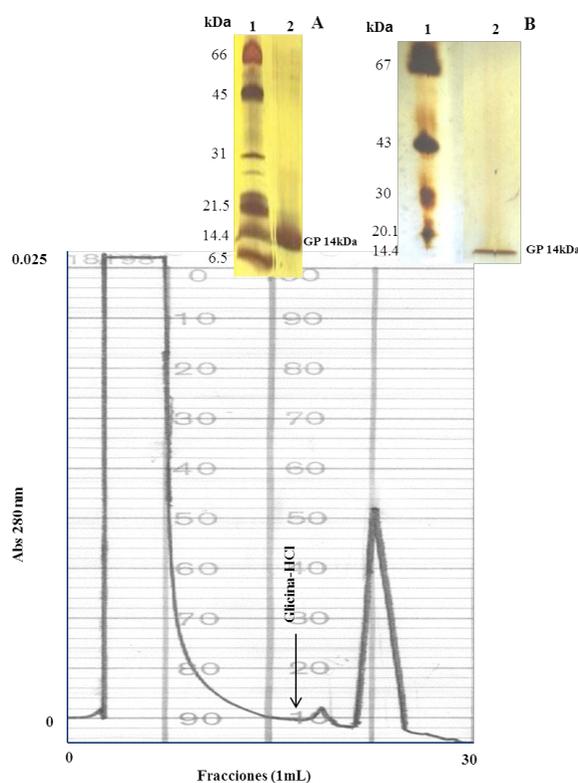
Para probar que GP14 no se trataba de un producto de degradación se realizaron pruebas de proteólisis, donde BSA se incorporó a los extractos originales del tejido. Los resultados indicaron que esta proteína no mostraba degradación bajo las condiciones utilizadas en el proceso de purificación, por lo que entonces se puede afirmar que GP14 no es un producto de degradación de proteínas de mayor masa molecular.

Por otra parte, se observó que GP14 pudo ser teñida únicamente con plata y no con azul de Coomassie. Un comportamiento similar ha sido reportado para glicoproteínas con alto contenido de carbohidratos, como MUC-1 y PASS III, típicamente teñidas en SDS-PAGE con nitrato de plata y con reactivo de PAS para oligosacáridos (Mather, 2000).

Una vez realizados los estudios de masas, que apuntaban a que se podía tratar de una proteína de choque térmico (ver más adelante), se realizó una electrotransferencia del gel de electroforesis (SDS-PAGE) y se probó inmunodetección con anticuerpos policlonales contra proteínas de choque térmico (anti-HSP70) (Figura 2, inserto). Los resultados mostraron reactividad positiva con la GP14 (Figura 2A, línea 4).

### Análisis de péptidos

GP14 fue removida cortando la banda a partir de los geles y analizada por LC-MS/MS después de su digestión



**Figura 3.** Purificación de la glicoproteína del bazo por cromatografía de afinidad en agarosa-PF2. La fracción de proteína no unida fue removida por lavado extensivo con PBS y la proteína unida fue eluida por cambio de pH, usando glicina-HCl. Inserto: (A) Análisis de la fracción de proteína en SDS-PAGE obtenida por cromatografía de afinidad. (1) Estándar de masa molecular y (2) fracción de elución de agarosa-PF2. (B) Electroforesis nativa de GP14. (1) estándar de masa molecular y (2) fracción eluida de agarosa-PF2. Los geles fueron teñidos con plata.

**Figure 3.** Purification of spleen glycoprotein by agarose-PF2 affinity chromatography. The unbound protein fraction was removed by extensive washing with PBS and bound protein was eluted by pH change, using glycine-HCl buffer. Insert: (A) SDS-PAGE under reducing conditions analysis of protein fraction obtained by affinity chromatography. (1) molecular weight standards and (2) elution fraction from agarose-PF2. (B) Native electrophoresis of GP14. (1) molecular weight standards and (2) fraction eluted from agarose-PF2. Both gels were silver stained.

con tripsina. El tratamiento con esta proteasa produjo seis fragmentos peptídicos identificables que contenían de 12 a 17 aminoácidos cada uno, los cuales correspondieron a 88 de los 110 aminoácidos esperados para una proteína cuya masa es de 14 kDa (Tabla 2). Los análisis bioinformáticos de estas secuencias mostraron que los péptidos fueron 100% homólogos a diferentes secuencias internas de proteínas HSP (Tabla 2), llegando en algunas ocasiones a cubrir hasta el 17% de sus secuencias completas. Por otra parte, dos de los fragmentos peptídicos generados (secuencia sombreada) coincidieron con sitios potenciales de glicosilación en las proteínas HSP70, lo cual valida la presencia de carbohidratos en GP14, ya que presenta el péptido LLQDFFNKELNK y TTPSYVAFTDTER, los cuales contienen parte de dichos sitios ([www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/](http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/)). Asimismo, se encontró que los péptidos LDKSQIHDIIVLVGGSTR y STAGDTHLGG-

**Tabla 2.** Secuencia de aminoácidos de péptidos tripticos generados de la digestión de GP14 y comparación con secuencias completas de proteínas de choque térmico.

**Table 2.** Amino acid sequences of tryptic peptides generated from GP14 and comparison with sequences of heat shock proteins

Nombre de la proteína y número accesión NCBI	Posición y secuencias de aminoácidos					
Heat shock 70kDa protein 8 isoform 1 variant <i>gi</i>   74740536 Heat shock cognate protein 54 <i>gi</i>   11526573 Heat shock 70kDa protein 8 isoform 2 variant <i>gi</i>   62896815 71Kd heat shock cognate protein <i>gi</i>   32467 <b>GP14 (péptidos)</b>	<b>37</b>	TTPSYVAFTDTER	<b>49</b>	<b>172</b>	IINEPTAAAIA YGLDEK	<b>188</b>
		TTPSYVAFTDTER			IINEPTAAAIA YGLDEK	
		TTPSYVAFTDTER			IINEPTAAAIA YGLDEK	
		TTPSYVAFTDTER			IINEPTAAAIA YGLDEK	
		TTPSYVAFTDTER			IINEPTAAAIA YGLDEK	
		*****			*****	
Heat shock 70kDa protein 8 isoform 1 variant <i>gi</i>   74740536 Heat shock cognate protein 54 <i>gi</i>   11526573 Heat shock 70kDa protein 8 isoform 2 variant <i>gi</i>   62896815 71Kd heat shock cognate protein <i>gi</i>   32467 <b>GP14 (péptidos)</b>	<b>221</b>	STAGDTHLGGEDFDNR	<b>236</b>	<b>300</b>	ARFEELNADLFR	<b>311</b>
		STAGDTHLGGEDFDNR			ARFEELNADLFR	
		STAGDTHLGGEDFDNR			ARFEELNADLFR	
		STAGDTHLGGEDFDNR			ARFEELNADLFR	
		STAGDTHLGGEDFDNR			ARFEELNADLFR	
		*****			*****	
Heat shock 70kDa protein 8 isoform 1 variant <i>gi</i>   74740536 Heat shock cognate protein 54 <i>gi</i>   11526573 Heat shock 70kDa protein 8 isoform 2 variant <i>gi</i>   62896815 71Kd heat shock cognate protein <i>gi</i>   32467 <b>GP14 (péptidos)</b>	<b>326</b>	LDKSQIHDI VLVGGSTR	<b>342</b>	<b>349</b>	LLQDF FNGKELNK	<b>361</b>
		LDKSQIHDI VLVGGSTR			LLQDF FNGKELNK	
		LDKSQIHDI VLVGGSTR			LLQDF FNGKELNK	
		LDKSQIHDI VLVGGSTR			LLQDF FNGKELNK	
		LDKSQIHDI VLVGGSTR			LLQDF FNGKELNK	
		*****			*****	

Los aminoácidos sombreados en la secuencia de los péptidos indican parte del sitio glicosilación de las proteínas con las que se compararon.

\* identidad total de aminoácido.

DFDNR de GP14 exhibieron una homología de 100% con dos péptidos de GP62, la cual es la principal glicoproteína de estrés inducida por calor en células de rata (Henle et al., 1997; Jethmalani y Henle, 1998).

Las HSP son proteínas muy conservadas en todas las células procariontas y eucariotas. Recientemente, las subfamilias HSP60, HSP70 y HSP90 han recibido una gran atención debido a su papeles potenciales en la síntesis de proteínas, crioprotección y en procesos inmunológicos relevantes (Habich et al., 2004). Por otro lado, también se han reportado las HSP pequeñas (SHSP) que funcionan como chaperonas moleculares y se caracterizan por ser las HSP menos conservadas y varían ampliamente en tamaño (12 a 40 kDa) y composición de aminoácidos (Parsell, 1993; Fu et al., 2003).

Otros trabajos han mostrado que la lectina de *Amaranthus leucocarpus* (ALL) reconoce al receptor de las células T humanas, identificado como una proteína con 44% de homología con HSP8 (Porrás et al., 2005). En el bazo, los miembros de la familia de proteínas HSP70 están estrechamente relacionados entre sí (Welch, 1990); sin embargo, en este estudio se está reportando una posible HSP con baja masa molecular. La homología de los péptidos de GP14 a HSP fue inesperada ya que no hay informes de glicoproteínas de esta clase, con baja masa molecular, en este tejido.

## CONCLUSIONES

El patrón de marcaje de la lectina PF2 en el estudio histológico del bazo demostró que puede ser una herramienta potencial para el estudio de patrones de distribución de glicoconjugados celulares. Asimismo, los resultados de

reactividad cruzada con anticuerpos anti- proteínas de choque térmico y la homología de secuencias del mismo tipo de proteínas confirman que la glicoproteína GP14 purificada en este trabajo puede ser considerada como una nueva HSP de baja masa molecular, la cual pudo ser purificada gracias a su contenido de oligosacáridos y a la afinidad de PF2.

## AGRADECIMIENTOS

Agradecemos el apoyo técnico brindado por Sofía López Valenzuela del Departamento de Patología del Hospital Infantil del Estado de Sonora. Se reconoce al CONACYT el apoyo para Gabriel Urbano-Hernández.

## BIBLIOGRAFÍA

- Aoki, D., Nozawa, S., Iizuka, R., Kawakami, H. y Hiran O, H. 1990. Differences in lectin binding patterns of normal endometrium and endometrial adenocarcinoma, with special reference to staining with *Ulex europeus* agglutinin 1 and peanut agglutinin. *Gynecol Oncol.* 37: 338-45.
- Dahlman-Wright, K., Wright, A., Carlstedt-Duke, J. y Gustafsson, J. A. 1992. DNA-binding by the glucocorticoid receptor: a structural and functional analysis. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 41: 249-72.
- Dullmann, J., Feldhaus, S., Van Damme, E. J., Peumans, W. J. y Schumacher, U. 2000. Lectin histochemistry of the spleen: a new lectin visualizes the stromal architecture of white pulp and the sinuses of red pulp. *J Histochem Cytochem.* 48: 923-31.
- Fu, X., Liu, C., Liu, Y., Feng, X., Gu, L., Chen, X. y Chang, Z. 2003. Small heat shock protein Hsp16.3 modulates its chaperone activity by adjusting the rate of oligomeric dissociation.

- Biochem Biophys Res Commun. 310: 412-20.
- Goldstein, I. J., Hughes, H. C., Monsigny, M., Osawa, T. y Sharon, N. 1980. What should be called a lectin? *Nature*. 285: 66.
- Goldstein, I. J. y Poretz, R. D. 1986. Isolation, physicochemical characterization and carbohydrate binding specificity of lectins. En *The Lectins: Properties, Functions, and Applications in Biology and Medicine*. Liener I.E., Sharon N., Goldstein I.J. (ed.), pp 33-93. Academic Press, New York..
- Habich, C., Kempe, K., Burkart, V., Van Der Zee, R., Lillicrap, M., Gaston, H. y Kolb, H. 2004. Identification of the heat shock protein 60 epitope involved in receptor binding on macrophages. *FEBS Lett*. 568: 65-9.
- Henle, K. J., Jethmalani, S. M., Li, L. G. y Li, G. C. 1997. Protein glycosylation in a heat-resistant rat fibroblast cell model expressing human HSP70. *Biochem Biophys Res Commun*. 232: 26-32.
- Hofmann, K., Titus, G., Montibeller, J. A. y Finn, F. M. 1982. Avidin binding of carboxyl-substituted biotin and analogues. *Biochemistry*. 21: 978-84.
- Huisman, T. H., Martis, E. A. y Dozy, A. 1958. Chromatography of hemoglobin types on carboxymethylcellulose. *J Lab Clin Med*. 52: 312-27.
- Jethmalani, S. M. y Henle, K. J. 1998. Interaction of heat stress glycoprotein GP50 with classical heat-shock proteins. *Exp Cell Res*. 239: 23-30.
- Ketcham, C. M., Baumbach, G. A., Bazer, F.W. y Roberts, R. M. 1985. The type 5, acid phosphatase from spleen of humans with hairy cell leukemia. Purification, properties, immunological characterization, and comparison with porcine uteroferrin. *J Biol Chem*. 260: 5768-76.
- Kim, M. V., Seit-Nebi, A. S., Marston, S. B. y Gusev, N. B. 2004. Some properties of human small heat shock protein Hsp22 (H11 or HspB8). *Biochem Biophys Res Commun*. 315: 796-801.
- Link, A. J., Eng, J., Schieltz, D. M., Carmack, E., Mize, G. J., Morris, D. R., Garvik, B. M. y Yates, J. R., 3RD 1999. Direct analysis of protein complexes using mass spectrometry. *Nat Biotechnol*. 17: 676-82.
- Loris, R., Hamelryck, T., Bouckaert, J. y Wyns, L. 1998. Legume lectin structure. *Biochim Biophys Acta*. 1383: 9-36.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. y Randall, R. J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 193: 265-75.
- Martinez-Pomares, L., Crocker, P. R., Da Silva, R., Holmes, N., Colominas, C., Rudd, P., Dwek, R. y Gordon, S. 1999. Cell-specific glycoforms of sialoadhesin and CD45 are counter-receptors for the cysteine-rich domain of the mannose receptor. *J Biol Chem*. 274: 35211-8.
- Mather, I. H. 2000. A review and proposed nomenclature for major proteins of the milk-fat globule membrane. *J Dairy Sci*. 83: 203-47.
- Merkle, R. K. y Cummings, R. D. 1987. Lectin affinity chromatography of glycopeptides. *Methods Enzymol*. 138: 232-59.
- Muroi, K., Amemiya, Y., Sievers, E. L., Miura, Y., Hakamori, S. I. y Loken, M. R. 1997. Expression of sialosyl-T and disialosyl-T antigens in erythroid cells. *Leuk Lymphoma*. 25: 403-14.
- Parsell, D.A., Taulien, J. y Lindquist, S. 1993. The role of heat-shock proteins in thermotolerance. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 339: 279-85
- Porras, F., Urrea, F., Ortiz, B., Martinez-Cairo, S., Bouquelet, S., Martinez, G., Lascrain, R. y Zenteno, E. 2005. Isolation of the receptor for the *Amaranthus leucocarpus* lectin from human T lymphocytes. *Biochim Biophys Acta*. 1724: 155-62.
- Schorge, J. O., Lea, J. S., Garner, E. O., Duska, L. R., Miller, D. S. y Coleman, R. L. 2003. Cervical adenocarcinoma survival among Hispanic and white women: a multicenter cohort study. *Am J Obstet Gynecol*. 188: 640-4.
- Sharon, N. y Lis, H. 1989. *Lectins*. Chapman and Hall. London. New York
- Steiniger, B., Barth, P. y Hellinger, A. 2001. The perifollicular and marginal zones of the human splenic white pulp: do fibroblasts guide lymphocyte immigration? *Am J Pathol*. 159:501-12.
- Steiniger, B., Ruttinger, L. y Barth, P. J. 2003. The three-dimensional structure of human splenic white pulp compartments. *J Histochem Cytochem*. 51: 655-64.
- Towbin, H., Staehelin, T. y Gordon, J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 76: 4350-4.
- Tsuboi, S. y Fukuda, M. 2001. Roles of O-linked oligosaccharides in immune responses. *Bioessays*. 23: 46-53.
- Urbano-Hernández, G. 2007. Identificación de estructuras glicosídicas reconocidas por la lectina PF2 en fetuina y tejidos linfoides. Ph.D. Tesis. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C.
- Vandamme, E. J. M., Barre, A., Rouge, P. y Peumans, W. J. 1997. Molecular cloning of the bark and seed lectins from the Japanese pagoda tree (*Sophora japonica*). *Plant Mol Biol*. 33: 523-536.
- Vazquez-Moreno, L., Ortega-Nieblas, M., Robles-Burgueño, M. R. y Ramos-Clamont, G. 2000. Purification of complex carbohydrate specific lectins from *Olneya tesota* seeds using tandem affinity chromatography. *Int J Bio-chromatogr*. 5: 83-90.
- Welch, W. J. 1990. The mammalian stress response: cell physiology and biochemistry of stress proteins. En *Stress proteins in biology and medicine*. Morimoto R.I., Tissieres. A. y Georgopoulos, C. (ed.), pp 223-278. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York
- Wray, W., Bouliskas, T., Wray, V. P. y Hancock, R. 1981. Silver staining of proteins in polyacrylamide gels. *Anal Biochem*. 118: 197-203.
- Zhao, C. y Wang, E. H. 2004. Heat shock protein 90 suppresses tumor necrosis factor alpha induced apoptosis by preventing the cleavage of Bid in NIH3T3 fibroblasts. *Cellular Signalling*. 16: 313-321.