

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA

**Glicosilación de Marcadores de
Superficie de Linfocitos T en Estados
Anérgicos**

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS BIOMEDICAS

P R E S E N T A

RICARDO / LASCURAIN LEDESMA

DIRECTOR DE TESIS: DR. EDGAR ZENTENO GALINDO

CIUDAD UNIVERSITARIA, 1995

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

11281
2
2ej



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DEDICATORIA

A MI FAMILIA.

A MIS PADRES, HERMANOS,
ESPOSA E HIJOS.

A MIS AMIGOS.

A TODAS AQUELLAS PERSONAS
QUE HAN CONVIVIDO CONMIGO.

INDICE

	Página
- Resumen	1
- Agradecimientos	3
- Capítulo I. Introducción	4
- Capítulo II. Objetivos	12
- Capítulo III. Artículo: Specificity of <i>Amaranthus leucocarpus</i> lectin. Glycoconjugate J. 1992, 9:204-208	15
- Capítulo IV. Artículo: Recognition of a CD4 ⁺ mouse medullary thymocyte subpopulation by <i>Amaranthus leucocarpus</i> lectin. Immunology 1994, 83:410-413	24
- Capítulo V. Artículo: Isolation of the receptor for <i>Amaranthus</i> <i>leucocarpus</i> lectin from murine medullary thymocytes. Manuscrito en preparación	35
- Capítulo VI. Aplicación de la lectina <i>Amaranthus leucocarpus</i> para el estudio de linfocitos humanos	56
- Capítulo VII. Perspectivas	64
- Conclusiones	67
- Referencias	68

RESUMEN

Los estudios sobre receptores y ligandos en el contexto de la comunicación y cooperación celular son importantes para elucidar los mecanismos que conducen a la inmunidad o a la anergia de un organismo. Para estos estudios el uso de lectinas constituye una ventaja ya que la mayoría de los receptores son glicoproteínas. Con este fin se ha utilizado la lectina de *Amaranthus leucocarpus* (ALL) la cual suprime la respuesta inmunitaria de ratones contra antígenos particulados. Por lo anterior, se determinaron las especificidades molecular y celular de ALL así como el aislamiento del receptor celular.

En ensayos de inhibición de la hemaglutinación con glicanos, glicósidos y glicoproteínas de estructura conocida, se estableció que ALL es específica para la N-acetil-D-galactosamina presente en el antígeno T (Gal β 1 \rightarrow 3GalNAc α 1 \rightarrow O-Ser/Thr) y en el antígeno T_n (GalNAc α 1 \rightarrow O-Ser/Thr). Por ensayos de aglutinación se determinó que ALL identifica al $5.61 \pm 0.85\%$ de las células de timo de ratón cuyo fenotipo es predominantemente CD4⁺CD8⁻ (75%) y por medio de cortes histológicos de timo murino, se identificó que ALL reconoce a timocitos medulares y a una población de células interdigitantes residentes en la médula. Mediante cromatografía de afinidad, se aisló de la membrana de timocitos, a una glicoproteína de peso molecular de 70 kDa, que está compuesta por 20% de carbohidratos (Gal y GalNAc en relación 1:3).

Con respecto a las células de sangre venosa humana, ALL aglutinó al 3-4% de células mononucleadas de individuos clínicamente sanos. Igualmente, se determinó que de los linfocitos amaranto positivos el 61% son CD2⁺, el 60% CD3⁺, el 68% CD4⁺, el 22% CD8⁺ y el 0.2% CD19⁺. En análisis por citofluorometría de las células reconocidas por ALL, se identificó que estas células además son CD45RA⁺, siendo un marcador para linfocitos que se encuentran en las etapas finales de maduración o para linfocitos maduros vírgenes. En cultivos celulares, ALL indujo actividad mitogénica en linfocitos de pacientes tuberculosos anérgicos, que fueron pobremente estimulados por las lectinas Con A y PHA. Los resultados mostraron que ALL reconoce a una O-glicoproteína perteneciente a una subpoblación de linfocitos que posiblemente se amplifica en los enfermos tuberculosos anérgicos.

SUMMARY

Cellular communication and cooperation studies on both, receptors and ligands, are important to elucidate the mechanisms that lead to immunity or anergy of an organism. In order to clarify these mechanisms, the use of lectins have an advantage since the majority of the receptors are glycoproteins. Having this aim in mind, we utilized the *Amaranthus leucocarpus* lectin (ALL) which suppresses the mice immune response against particulate antigens. Therefore, we determined the molecular and cellular specificities of ALL and we also used it for the isolation of the lectin-specific cellular receptor.

Inhibition of the hemagglutination assays using glycans, glycosides and glycoproteins of known structure established that ALL is specific for N-acetyl-D-galactosamine which is present in the T_n - (GalNAc α 1 \rightarrow 0-Ser/Thr) and T-antigen (Gal β 1 \rightarrow 3GalNAc α 1 \rightarrow 0-Ser/Thr). In agglutination assays we determined that ALL identifies $5.61 \pm 0.85\%$ of mouse thymus cells containing CD4⁺CD8⁻ (75%) phenotype, and in mouse-thymus histological studies we demonstrated that ALL recognizes medullar thymocytes and a population of medullary-interdigitant cells. We isolated by ALL lectin-affinity chromatography, from the membrane of thymocytes, a glycoprotein of 70 kDa molecular weight composed by 20% of carbohydrates (Gal and GalNAc in a 1:3 molar ratio).

With regard to human blood venous cells, ALL agglutinated 3-4% mononucleates cells from clinically healthy individuals; it was determined that these ALL positive lymphocytes were CD2⁺ (61%), CD3⁺ (60%), CD4⁺ (68%), CD8⁺ (22%) and CD19⁺ (0.2%). Cytofluorometer analysis of cells recognized by ALL showed that these cells are CD45RA⁺, which is a marker for naive lymphocytes.

In cell cultures, ALL induced mitogenic activity on lymphocytes from tuberculous anergic patients that were poorly stimulated with Con A and PHA. The results showed that ALL recognizes one O-glycoprotein from a subpopulation of lymphocytes that is probably increased in tuberculous anergic patients.

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis fue realizada gracias a todos aquellos compañeros y compañeras de labores, quienes contribuyeron con amistad, ideas y en muchas ocasiones con trabajo compartido. Debo agradecer a Edgar Zenteno Galindo, Raúl Chávez Sánchez, Luis Felipe Montaña Estrada, Patricia Gorocica Rosete, Armando Pérez Torres, Fernando Guerra Infante, Georgina Alvarez Fernández, Felipe Massó Rojas, Beatriz Rodríguez Savala y a Flor de María Porras.

Agradezco por sus sugerencias para mejoramiento de la Tesis, a los Drs: Edgar Zenteno Galindo, Luis Felipe Montaña Estrada, Sergio Estrada Parra, Rubén Darío Martínez Pérez, Jorge Arellano Blanco, Iris Estrada García y Julio Granados Arreola.

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio 9 del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina, UNAM, en el Departamento de Investigación en Bioquímica del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, Secretaría de Salud y en el Laboratorio de Biología Experimental de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos. El trabajo fue financiado en parte por CONACYT, la Dirección General de Asuntos del Personal Académico con los Programas PAPIIT y PADEP.

CAPITULO I. INTRODUCCION

La *glicosilación* es el proceso de unión por enlace covalente de un carbohidrato con una proteína, un lípido o una base nitrogenada. La glicosilación se efectúa tanto en los organismos procariotes como en los eucariotes⁽¹⁾, sin embargo, en los eucariotes adquiere gran relevancia, ya que es un proceso cotraduccional que permite el transporte de diversas proteínas del retículo endoplásmico al aparato de Golgi (en donde culmina el procesamiento de numerosas glicoproteínas), determinando además el destino final de estas moléculas, ya sea como glicoproteínas de membrana, de secreción o lisosomales^(1,2). En el caso del sistema inmunitario, las inmunoglobulinas necesitan ser glicosiladas para que las células plasmáticas la secreten, de hecho la IgM, de acuerdo a la glicosilación se puede secretar en forma polimérica o monomérica⁽³⁾. De la misma manera, el receptor CD4 requiere estar glicosilado para ser expresado en la superficie de los linfocitos T cooperadores⁽⁴⁾.

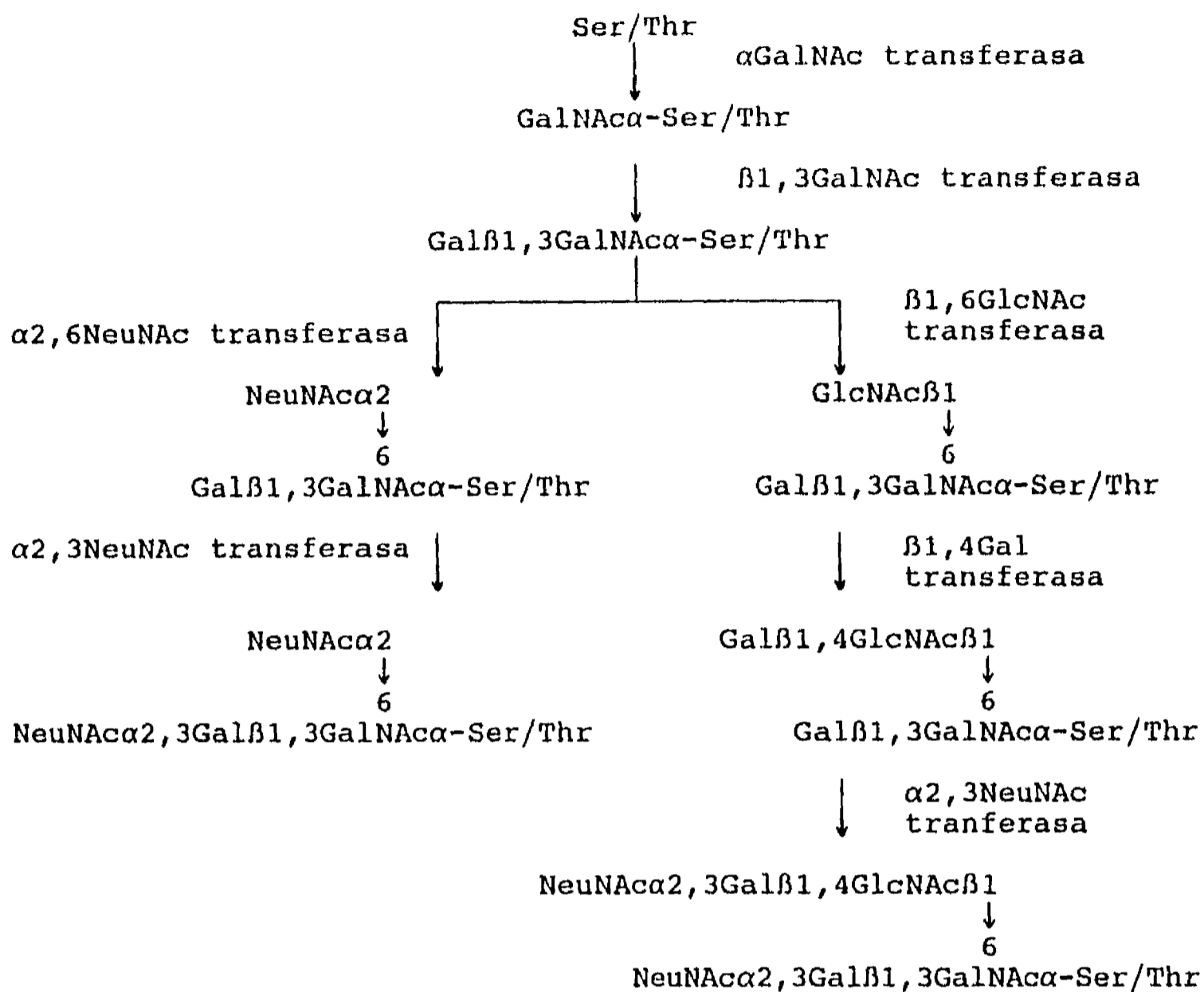
Uno de los aspectos más relevantes identificados en la función biológica de las estructuras glicosídicas asociadas a proteínas o a lípidos de la superficie de la célula, es su participación en el reconocimiento celular⁽⁵⁾. Este reconocimiento es un evento central en una gran variedad de fenómenos biológicos y frecuentemente constituye la primera etapa de numerosos procesos basados en interacciones célula con célula, tal como: la migración celular, la fertilización, la embriogénesis,

la formación de tejidos⁽¹⁾, así como la infección y la respuesta inmunitaria⁽⁶⁾. Por ejemplo, la expresión de estructuras sacarídicas relacionadas con los antígenos Lewis^a y Lewis^x en la superficie celular, es inducida por citocinas durante el daño tisular^(7,8). El reconocimiento de estas estructuras por medio de las selectinas (receptores celulares con actividad de lectina) tanto en los leucocitos del torrente sanguíneo como en las células endoteliales, facilita que los leucocitos sean retenidos en el endotelio y atraídos al tejido dañado, para iniciar o amplificar el proceso inflamatorio⁽⁹⁾. En los macrófagos, los denominados receptores para manosas son lectinas de membrana asociadas al mecanismo de fagocitosis y pinocitosis. Estos receptores reconocen a la D-manosa, L-fucosa y N-acetil-D-glucosamina en glicoconjugados que pueden estar en forma libre o en la superficie de diversos microorganismos^(10,11) e incluso de células sanguíneas que han perdido los residuos de ácido siálico en un proceso natural de envejecimiento, como sucede con los eritrocitos.

Otro aspecto importante de las estructuras glicosídicas es el cambio en los patrones de glicosilación de moléculas de superficie celular, ya que se correlacionan con la distribución de las células en un tejido, el crecimiento, la diferenciación y en ocasiones con la activación celular. Por ejemplo, los timocitos que se localizan en la corteza tímica, son células inmaduras en proceso de desarrollo y diferenciación⁽¹²⁾. Estas células característicamente expresan entre sus glicoconjugados de superficie, a la estructura Gal β 1 \rightarrow 3GalNAc α 1-0 Ser/Thr

(antígeno T o de Thomsen-Friedenreich), lo cual permite su identificación y aislamiento con la lectina *Arachis hypogaea* (PNA)⁽¹³⁾. En cambio, los timocitos que se encuentran en las últimas etapas de maduración y que se localizan en la médula tímica, expresan uno o dos residuos de ácido siálico sobre el mismo antígeno T (sialil-T o disialil-T), lo que provoca un enmascaramiento del receptor de galactosa, impidiendo el reconocimiento por PNA^(14,15). La diferencia entre el antígeno T de los timocitos inmaduros y el sialil-T o disialil-T de los timocitos maduros, se debe evidentemente a la incorporación de ácido siálico por acción de enzimas sialiltransferasas cuya expresión tal vez se regula en la diferenciación celular.

Con respecto a la activación celular, también se presentan cambios en el patrón de glicosilación. Se ha encontrado que los linfocitos T en estado de reposo expresan el antígeno disialil-T, mientras que en estado de activación se sintetiza la enzima β 1,6 N-acetil-glucosaminiltransferasa la cual compite con la α 2,6 sialiltransferasa modificando la secuencia de carbohidratos en dicha molécula debido a la incorporación de residuos de N-acetil-D-glucosamina y D-galactosa al disialil-T⁽¹⁶⁾ (Figura A).



Linfocitos T en reposo

Linfocitos T activados

Figura A. Esquema que representa las modificaciones en la estructura oligosacáridica de la leucosialina de la superficie celular durante la activación de linfocitos T (figura tomada de Piller F, Piller V, *et al.* J Biol Chem 1988, 263:15146-15150).

Por otra parte, numerosas evidencias sugieren la existencia de modificaciones en el perfil de glicosilación de grupos celulares, las cuales no corresponden a estadios de diferenciación o de desarrollo celular y que son indicativos de estados patológicos. Singhal y Hakomori han encontrado que todas las transformaciones oncogénicas estudiadas, se acompañan de alteraciones en la glicosilación de moléculas de superficie celular, ya sea por supresión, síntesis incompleta o por neosíntesis de cadenas glicosídicas no complejas⁽¹⁷⁾. En estos casos, frecuentemente se expresan oligosacáridos característicos de diferenciación celular (antígenos oncofetales) en células tumorales⁽¹⁸⁾. Por ejemplo, en el adenocarcinoma humano es frecuente la exposición de precursores sacarídicos (antígenos T y T_n) de proteínas O-glicosiladas en la superficie de la célula tumoral⁽¹⁷⁾.

Cabe resaltar que en los últimos años, los oligosacáridos de la superficie celular han cobrado enorme importancia por el papel que juegan en la comunicación celular⁽¹⁹⁻²¹⁾. La glicosilación se presenta en diferentes moléculas de superficie y aún en las moléculas relacionadas con la presentación de antígenos como son las del Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC)⁽²²⁾. En diversos ejemplos se puede apreciar que esta característica permite una correcta comunicación celular tal como ocurre con la sialoadhesina de los macrófagos^(23,24) o el CD22 de los linfocitos B⁽²⁵⁻²⁷⁾ que reconocen específicamente a estructuras que contienen ácido siálico en posición α 2,6 en las membranas celulares^(28,29). Las cadenas gamma y

delta del CD3 también están glicosiladas⁽²²⁾ y aunque no se ha identificado claramente la función que tiene esa característica, es interesante observar que sustancias mitogénicas policlonales que interactúan con carbohidratos, tal como la lectina Concanavalina A (con especificidad por α -D-manosa)⁽³⁰⁾, provoca la activación de la célula reconocida, aún en ausencia de un estímulo antigénico. Esta simulación de la activación celular, igualmente ha sido identificada en los superantígenos, los cuales provocan un enlace entre el MHC y el receptor antigénico de linfocitos T (TCR), sin necesidad de procesamiento antigénico, propiciando la activación de las células⁽³¹⁾. Este efecto, de la misma manera se logra inducir con la fitohemaglutinina (PHA), que es una lectina que reconoce simultáneamente a los residuos lactosamínicos presentes en el MHC y en el TCR⁽³⁰⁾ (Figura B).

Pese a lo anterior, no se ha explorado si en enfermedades infecciosas crónicas existe alteración en los perfiles de glicosilación de receptores que son importantes para la activación celular. En diversos estudios sobre la disfunción del sistema inmunitario que presentan los pacientes tuberculosos anérgicos, no se ha encontrado que las células responsables de la inmunidad dejen de expresar alguna glicoproteína de superficie celular durante el curso de la infección, lo que se ha detectado es deficiencia en la expresión de glicoproteínas importantes (como el receptor de IL-2) y el aumento de ciertas subpoblaciones celulares⁽³²⁾. Por ello, no se descarta que la alteración en el funcionamiento celular se deba a una

modificación en los patrones de glicosilación de las proteínas de superficie. La falta de información en este sentido se debe principalmente a que el estudio de los oligosacáridos generalmente se realiza mediante modificaciones enzimáticas y químicas o bien mediante el uso de anticuerpos monoclonales. Como alternativa interesante se ha planteado la utilización de lectinas, debido entre otras cosas a la gran especificidad que poseen por estructuras sacarídicas, a que la fuerza de interacción es relativamente baja y a que no ejercen ninguna alteración sobre la estructura o el grupo celular reconocido. El uso de lectinas, sobre todo aquellas con efectos mitogénicos o inmunosupresores puede ser de utilidad para detectar cambios en la glicosilación de marcadores de células inmunitarias responsables de la anergia celular. Una lectina que ha mostrado tener efectos biológicos inmunosupresores en modelos murinos, es la lectina de *Amaranthus leucocarpus* (ALL). Esta lectina inoculada por vía intraperitoneal previo a un reto antigénico induce supresión inmunitaria contra los antígenos particulados⁽³³⁾ sugiriendo que se afecta la cooperación celular. Los análisis bioquímicos han mostrado que ALL es una glicoproteína homodimérica que aglutina eritrocitos humanos⁽³⁴⁾ y que su actividad aglutinante se inhibe con N-acetil-D-galactosamina (GalNAc). El potencial de estudio que promete ALL, se basa en que GalNAc es la molécula precursora de cadenas sacarídicas en O-glicoproteínas de linfocitos⁽¹⁷⁾ y que estas estructuras se modifican en correlación con la activación de dichas células⁽¹⁶⁾. Por lo tanto, la lectina de *Amaranthus leucocarpus* puede ser una herramienta muy útil

para esclarecer el papel que desempeñan las O-glicoproteínas en la cooperación celular y consecuentemente en la activación o en la anergia de las células T.

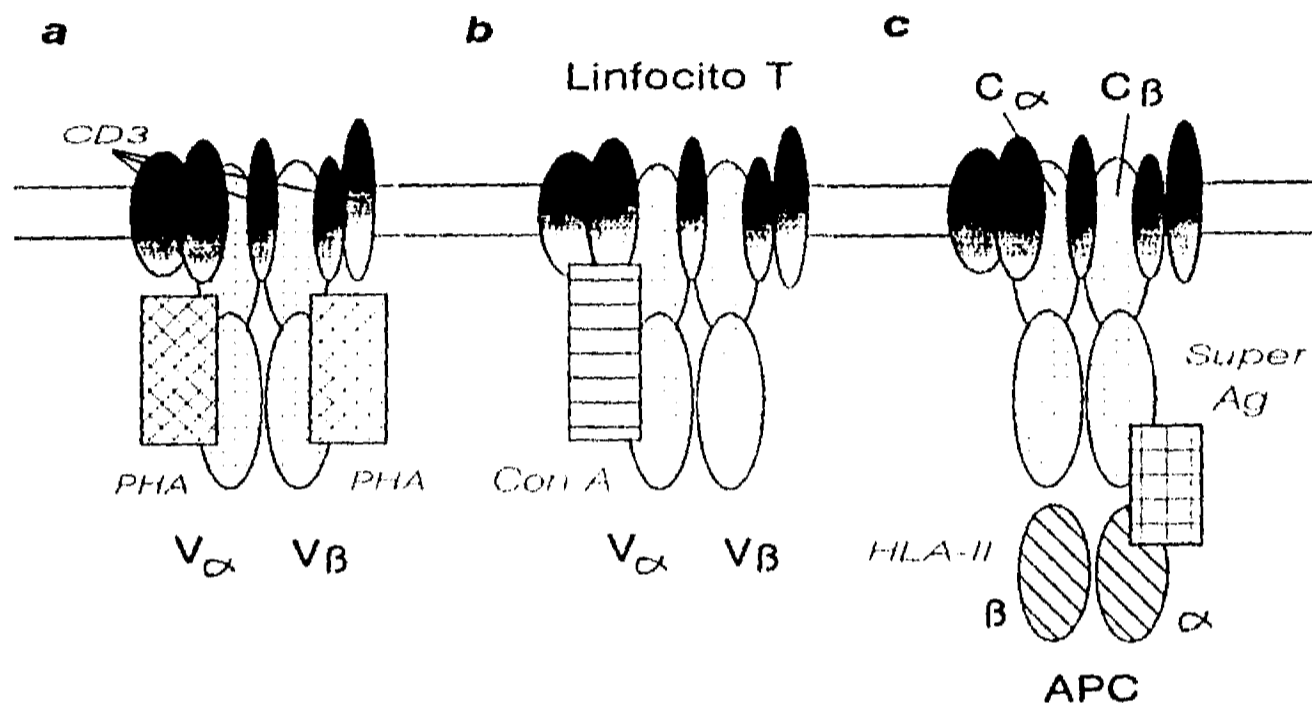


Figura B. a) La lectina mitogénica PHA se une a las cadenas α y β del TCR y activa linfocitos T. b) La Con A concomitantemente interacciona con el CD3 para realizar la estimulación de linfocitos T. c) Los superantígenos activan linfocitos T después de la formación de un puente molecular entre el dominio V β del TCR y la molécula de clase II de la célula presentadora de antígeno. Figura modificada de Licastro F, *et al.* Int J Biochem 1993, 25:845-852.

CAPITULO II. OBJETIVOS

Objetivos Generales

1. Determinar la especificidad de la lectina de *Amaranthus leucocarpus* (ALL).
2. Precisar el estado de diferenciación celular y la localización de las células amaranto positivas.
3. Caracterizar el fenotipo de las células amaranto positivas.
4. Aislar e identificar a las moléculas O-glicosídicas reconocidas por ALL.
5. Establecer el papel biológico de las estructuras O-glicosídicas en la comunicación celular.

Objetivos Particulares

1. Determinar la especificidad de la lectina de *Amaranthus leucocarpus* por grupos sanguíneos humanos.
2. Identificar la estructura sacarídica reconocida por la lectina de *Amaranthus leucocarpus*.

3. **Determinar el porcentaje de células inmunitarias amaranto positivas así como su fenotipo en modelo murino, utilizando métodos de separación selectiva por aglutinación, y uso de anticuerpos monoclonales contra marcadores celulares.**
4. **Localizar en el timo murino, la presencia de células amaranto positivas por medio de métodos de histoquímica.**
5. **Aislar y purificar de la superficie celular a las moléculas O-glicosídicas reconocidas por la lectina de *Amaranthus leucocarpus*.**
6. **Determinar el reconocimiento de ALL por linfocitos humanos.**
7. **Caracterizar el fenotipo de los linfocitos humanos amaranto positivos.**
8. **Determinar la presencia y densidad en la expresión de O-glicoproteínas de linfocitos de pacientes con enfermedad infecciosa crónica y deficiencia inmunitaria celular.**
9. **Dilucidar el efecto biológico de ALL en la actividad celular mediante ensayos de mitogenicidad de células mononucleadas de sangre venosa humana.**
10. **Establecer si la lectina de amaranto puede emplearse como reactivo biológico de diagnóstico.**

El trabajo realizado permitió la elaboración de tres artículos. Los artículos se presentan en capítulos donde se comentan los resultados y su discusión. Los métodos utilizados se encuentran en las copias de los sobretiros y en el manuscrito del tercer artículo. Se adiciona otro capítulo donde se presentan la metodología y la discusión de resultados obtenidos de la aplicación de la lectina de *Amaranthus leucocarpus* para el estudio de linfocitos humanos.

Artículos Elaborados:

1. **Specificity of *Amaranthus leucocarpus* lectin.**
Glycoconjugate J. 1992, 9:204-208
2. **Recognition of a CD4⁺ mouse medullary thymocyte subpopulation by *Amaranthus leucocarpus* lectin**
Immunology 1994, 83:410-413
3. **Isolation of the receptor for *Amaranthus leucocarpus* lectin from murine medullary thymocytes.**

Manuscrito

CAPITULO III

ARTICULO: SPECIFICITY OF *AMARANTHUS LEUCOCARPUS* LECTIN

INTRODUCCION

La planta *Amaranthus leucocarpus* del género *Amaranthus* es una especie mexicana que tiene un alto valor nutricional debido a su contenido protéico y por la considerable proporción de aminoácidos esenciales. En estudios previos se ha mostrado que las lectinas aisladas de *Amaranthus caudatus*, *A. cruentus* y *A. leucocarpus* tienen similitudes, tales como las dos unidades monoméricas de 33-36 kDa que forman un homodímero de 66 kDa, la presencia de un epitopo común y la inhibición de su actividad hemaglutinante por N-acetil-D-galactosamina y fetuina, la cual es una glicoproteína que contiene sacáridos en enlace O- y N-glicosídicos. De manera similar a la lectina *A. leucocarpus*, la especificidad de *A. caudatus* por Galb1@3GalNAc ha sido recientemente determinada; sin embargo, *A. leucocarpus* induce inmunosupresión en animales y es mitogénica para linfocitos de bazo murinos, mientras que *A. caudatus* no ejerce tales efectos. Para identificar el origen de estas discrepancias, se determinó la fina especificidad de la lectina de *A. leucocarpus*, y la afinidad de la lectina por eritrocitos humanos con fenotipos en los cuales los residuos N-acetil-D-galactosamina representan determinantes importantes.

RESULTADOS Y DISCUSION

En ensayos de hemaglutinación con eritrocitos humanos, se encontró que ALL aglutina por igual a eritrocitos del grupo sanguíneo ABO y a cualquiera de los fenotipos Le^a, Le^b, M, MN, N, P, Kell, y S (cuadro 1) sin establecer diferencias. No obstante, cuando los eritrocitos fueron tratados con neuraminidasa y/o pronasa previo a la hemaglutinación, se encontró una diferencia significativa. La finalidad del tratamiento con neuraminidasa fue descubrir carbohidratos enmascarados por residuos de ácido siálico, y con pronasa el objetivo fue eliminar o abrir porciones peptídicas de glicoproteínas de la membrana y así exponer estructuras sacarídicas para su interacción con la lectina. La única diferencia observada con respecto a los otros eritrocitos, fue el incremento en el título hemaglutinante de los eritrocitos con fenotipo M, lo cual señala que ALL reconoce estructuras sacarídicas específicas de estas células. Cuando los eritrocitos fueron tratados con neuraminidasa y enseguida con pronasa presentaron un incremento en el título hemaglutinante, sin embargo se logró identificar que este incremento fué significativamente mayor con aquellos eritrocitos que poseen el fenotipo M (cuadro 1). Esto sugiere que una parte de la estructura reconocida por ALL se encuentra en la superficie de los eritrocitos de fenotipo M. Se ha reportado que los fenotipos M y N de los eritrocitos son conferidos por las glicoforinas A^M y A^N, las cuales son

glicoproteínas de superficie celular⁽³⁵⁾. El análisis estructural ha revelado que ambas glicoforinas tienen varios enlaces O-glicosídicos cerca del extremo aminoterminal de la cadena peptídica. Estas glicoforinas son diferentes, no por la secuencia de carbohidratos de sus oligosacáridos, sino porque la glicoforina A^M termina con un residuo de serina y la A^N tiene una leucina en esa posición⁽³⁶⁾. Lo anterior sugiere que el hidroxilo de la serina aminoterminal de la glicoforina A^M participa en el reconocimiento de ALL por el antígeno T.

Cabe destacar que ALL puede ser un reactivo útil para tipificar eritrocitos humanos del fenotipo M, siempre y cuando sean previamente tratados con neuraminidasa.

En los ensayos de inhibición de la hemaglutinación utilizando distintos monosacáridos, se encontró que solamente N-acetil-D-galactosamina (GalNAc) tuvo capacidad inhibitoria, lo cual indicó que este carbohidrato es la molécula central para el sitio de unión de ALL. En los mismos ensayos de inhibición, con la utilización de glicósidos, glicanos (oligosacáridos libres), glicopéptidos y glicoproteínas de estructura conocida, se encontró que las mucinas submaxilares ovina y bovina, la fetuina y las formas desializadas de esas glicoproteínas así como las moléculas IgA humanas fueron las de mejor efecto inhibitorio (cuadro 2). Debido a que la estructura GalNAc α 1 \rightarrow 0-Ser/Thr (antígeno T_n) se halla en la mucina submaxilar ovina y que Gal β 1 \rightarrow 3GalNAc α 1 \rightarrow 0-Ser/Thr (antígeno de

Thomsen-Friedenreich o antígeno T) es una molécula común para las proteínas, mucina submaxilar bovina, IgA y fetuina, podemos deducir que ALL reconoce al antígeno T y con menor afinidad al antígeno T_n. Por otra parte, la presencia de ácido siálico en el antígeno T no evita la unión de ALL aunque si disminuye la afinidad según se observa en las interacciones con sialoproteínas y asialoproteínas (sin ácido siálico).

Specificity of *Amaranthus leucocarpus* lectin

EDGAR ZENTENO^{1*}, RICARDO LASCURAIN², LUIS F. MONTAÑO³,
LORENA VAZQUEZ¹, HENRI DEBRAY⁴ and JEAN MONTREUIL⁴

¹Departamento Biología Experimental, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Cuernavaca, Morelos, Mexico

²Departamento Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM, Mexico 04510 D.F.

³Departamento Biología, Instituto Nacional de Cardiología, Mexico 14000 D.F.

⁴Laboratoire de Chimie Biologique (Unité mixte du C.N.R. No 111), Université des Sciences et Techniques de Lille Flandres-Artois, 59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France

Received 11 December 1991 and revised 28 February 1992

We have demonstrated that *Amaranthus leucocarpus* lectin hemagglutinating activity was powerfully inhibited by the T-antigen, containing Gal(β 1-3)GalNAc(α 1-3)Ser/Thr, and the T_n-antigen, which contains GalNAc(α 1-3)Ser/Thr. This suggests that the acetamido group at C-2 and the axial -OH at C-4 of the N-acetyl-D-galactopyranosylamine ring are important for lectin binding. The hemagglutination assays also established that desialylated and Pronase-treated human type O erythrocytes with an M phenotype were better recognized than erythrocytes from all other blood groups. The recognition was dependent on pH and ionic strength.

Keywords: plant lectin, *Amaranthus leucocarpus*, T and T_n antigen-specific lectin

Amaranthus leucocarpus is a Mexican species of the *Amaranthus* genus with a high nutritional value due to its protein content and the considerable proportion of essential amino acids it possesses [1]. Previous reports have shown similarities between the lectins isolated from *A. caudatus* [2, 3], *A. cruentus* [4, 5] and *A. leucocarpus* [6], such as two 33,000–36,000 Da monomer units forming a native 66,000 Da homodimer, presence of common epitopes and inhibition of their hemagglutinating activity by N-acetyl-D-galactosamine and fetuin, a glycoprotein containing both O- and N-glycosidically linked glycans [7]. Similarly to *A. leucocarpus*, the Gal(β 1-3)GalNAc specificity of *A. caudatus* lectin has only recently been determined [3]; however, *A. leucocarpus* induces immunosuppression in animals and is mitogenic for murine spleen lymphocytes [6, 8] where *A. caudatus* does not exert any such effect [2].

In order to identify the nature of these discrepancies, we tried to establish (a) the fine sugar specificity of the *A. leucocarpus* lectin, and (b) whether human erythrocytes with phenotypes in which N-acetylgalactosamine residues represent important determinants were specifically agglutinated by the lectin.

Materials and methods

Materials

Amaranthus leucocarpus seeds obtained in Tulyehualco (Mexico) were identified at the Centro de Investigaciones Biológicas, UAEM, Mexico. The lectin was purified by affinity chromatography on a column containing human type O red blood cell stroma as already described [6]. Ultrogel ACA-202 was from IBF-Biotechnics (Clichy, France); Bio-Gel P-4 and Bio-Gel P-2 were from Bio-Rad (Vitry sur Seine, France). Mucine from bovine submaxillary gland, mucin grade II from porcine stomach, fetuin from fetal calf serum, human α_1 -acid glycoprotein, Pronase (*Streptomyces griseus*, Sigma fraction XXV), neuraminidase (*Vibrio cholerae*, Sigma fraction V, EC 3.2.1.18) as well as other sugars, chemicals and proteins were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Human serum IgA as well as its O-glycans that contain Gal(β 1-3)GalNAc [9] were gifts from Professor G. Spik; α (2-3)- and α (2-6)-sialyllactose as well as ovine submaxillary mucin were a gift from Dr. G. Strecker (Université des Sciences et Techniques de Lille Flandres-Artois, France).

Analytical methods

Protein concentration was determined by the method of Lowry *et al.* [10] using bovine serum albumin as a standard.

* To whom correspondence should be sent at Departamento Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM, PO Box 70-159, Mexico 04510 D.F.

Total carbohydrate was determined by the phenol-sulfuric acid method [11] using lactose as standard. Carbohydrate composition analysis was carried out by methanolysis in the presence of meso-inositol as internal standard and the per-*O*-trimethyl silylated methyl glycosides (after *N*-reacetylation) were analysed by gas-liquid chromatography in a capillary column (25 mm × 0.32 mm) of silicone OV 101 [12].

Preparation of glycans and glycopeptides

Fetuin glycopeptides were obtained by Pronase digestion (1 mg of enzyme per 10 mg of glycoprotein were incubated for 48 h at 37 °C). The O- and N-glycosyl peptides were fractionated by gel-filtration on a column (1.6 cm × 100 cm) containing Bio-Gel P-4 equilibrated with 0.05 M pyridine acetate, pH 4.5 [13]. O-Glycosidically-linked glycans from fetuin were liberated by alkaline reductive treatment [14], and further fractionated by gel filtration on a column of Ultrogel ACA-202 (1.6 cm × 100 cm) equilibrated in 0.01 M Tris/HCl, pH 7.4, 0.17 M NaCl, 0.02% NaN₃; the O-glycans and the N-glycosyl peptides were desalted on Bio-Gel P-2 equilibrated with water and kept lyophilized until use [15].

Glycoproteins, glycopeptides or glycans were desialylated by incubation at 100 °C for 1 h in the presence of 0.02 N sulfuric acid, as described by Spiro and Bhoyroo [16], and desalted on a Bio-Gel P-2 column (2 cm × 60 cm) equilibrated with water.

Endo-*N*-Acetylgalactosaminidase digestion of asialofetuin was carried out at 37 °C for 48 h with 1 mU of *Diplococcus pneumoniae* endo-*N*-acetylgalactosaminidase (EC 3.2.1.97, Boehringer, Mannheim, Germany). The released O-glycosidically linked glycans were purified by descending paper chromatography for 16 h on Whatman No. 3 paper in ethyl acetate-pyridine-acetic acid-water, 5:5:1:3 by vol. [17]. O-Glycosidically linked glycans from porcine stomach mucin were obtained by alkaline-borohydride degradation [18] and fractionated by high performance liquid chromatography on an ODS-column (Allman, USA) as described earlier [15]. Structural characterization of the obtained oligosaccharide-alditols was completed by methylation analysis and by 500-MHz ¹H-NMR studies.

Hemagglutinating activity

Human erythrocytes type A,B,O,M,N,MN,Le^a, Le^b, P, S and Kell from healthy human donors were from the Central Blood Bank, IMSS, Mexico. *Amaranthus leucocarpus* lectin hemagglutinating activity was assayed in microtiter U plates (NUNC, Denmark) according to a twofold serial dilution procedure [19]. The hemagglutinating activity was tested with either 2% (w/v) untreated erythrocyte suspension in phosphate buffered saline (0.01 M sodium phosphate, 0.14 M sodium chloride, pH 7.2; PBS) or with neuraminidase-treated (0.1 U per 0.5 ml of packed erythrocytes at 37 °C for 30 min), Pronase-treated (100 µg per 0.5 ml of packed erythrocytes at 37 °C for 30 min) or neuraminidase- and

Pronase-treated erythrocytes. To verify that enzyme treatment did not remove the antigenic determinants on the RBC surface, we corroborated the presence of the M and N antigens after enzyme treatment with specific antibodies. The hemagglutinating titre is reported as the inverse of the last dilution with agglutinating activity.

Sugar specificity

The lectin sugar specificity was determined by comparing the inhibitory activity of various sugars, glycoproteins, or their derived glycopeptides and glycans, on the hemagglutination induced by the lectin against neuraminidase- and Pronase-treated human type O^m erythrocytes [19]. Results are expressed as the minimal concentration required to completely inhibit four hemagglutinating doses. The glycoprotein molar concentration was determined according to their molecular weight; with desialylated glycoproteins we subtracted the number of sialic acid molecules released from the native protein. The molar concentration of glycans and glycopeptides was calculated on the basis of their oligosaccharide content as determined by gas chromatography.

pH and ionic strength dependence study

Amaranthus leucocarpus lectin was exposed to a wide range (5.0-9.0) of pH before assessing its hemagglutinating activity toward neuraminidase- and Pronase-treated N and M erythrocytes. The lectin was first exhaustively dialysed against distilled water and then against a 'universal' buffer (NaCl 0.1 M; citric acid, Na₂H₂PO₄, barbital, glycine, 0.028 M each) the pH of which was adjusted to the desired value with 0.2 M NaOH [20].

Similarly, the effect of ionic strength on the lectin activity was assessed by exposing the lectin to different salt concentrations. The lectin was first dialysed against deionized water (conductivity = 1-2 µmoh) containing 0.2 M sucrose to prevent hemolysis, and then its agglutinating activity against 2% N or M erythrocyte suspension was tested in the presence of various concentrations of NaCl ranging from 0 to 0.2 M. Control assays were performed with isotonic saline (NaCl 0.15 M) solution alone or supplemented with 0.2 M sucrose.

Results

Blood group specificity

A. leucocarpus does not possess serological specificity for the human blood groups A, B and O [6]. Moreover, the lectin does not differentiate between Kell, Le^a, Le^b, P, M, N and S blood groups. As for A, B and O native erythrocytes, Pronase treatment increased the lectin agglutinating activity towards these cells five-fold. However, it is noteworthy that with neuraminidase-treated erythrocytes, the lectin agglutinating activity was four times more powerful with

Table 1. Hemagglutinating activity of *A. leucocarpus* lectin^a against different human type O erythrocyte phenotypes.

Blood group	Hemagglutinating titre of enzyme-treated or untreated erythrocytes			
	Untreated	Pronase	Neuraminidase	Pronase/neuram.
Kell	2	64	64	64
Le ^a	2	64	64	64
Le ^b	2	64	64	64
M	2	128	256	1024
N	2	64	64	128
P	2	64	64	64
S	2	64	64	64

^a The lectin concentration was 2.4 µg ml⁻¹. Similar results were obtained with human type A and B red blood cells with either M or N phenotype. All blood groups, with the exception of the M phenotype, possessed the N antigen.

asialo-M erythrocytes than with any other tested groups, including asialo-N red cells (Table 1). These differences were more marked when the cells were Pronase- and neuraminidase-treated. With these treated cells, only 0.002 µg of the lectin was required to induce agglutination as compared to asialo-N-erythrocytes where 0.018 µg was needed. Enzyme treatment did not remove the M and N antigens from the red blood cell surface.

Sugar specificity

To determine the carbohydrate binding specificity we conducted hapten inhibition assays of the agglutination induced by the lectin on asialo and Pronase-treated human type O^m erythrocytes. Among the tested simple sugars only *N*-acetyl-*D*-galactosamine inhibited the agglutination (Table 2). Addition of galactose or its derivatives galactosamine, methyl- α -*D*-galactopyranoside, methyl- β -*D*-galactopyranoside and *p*-nitrophenyl- α or - β *D*-galactopyranoside at a concentration of 100 mM did not modify the agglutinating titre of the lectin (data not shown). The same results were obtained with lactose, α (2-3)- or α (2-6)-sialyllactose, and *N*-glycosylproteins, such as human α ₁-acid glycoprotein, human serotransferrin and human IgG, or their derived *N*-glycosylpeptides.

Glycoproteins containing *O*-glycosidically-linked glycans such as fetuin, bovine and ovine submaxillary mucin, and human IgA were better inhibitors than *N*-acetylgalactosamine (Table 2). Interestingly enough, human milk IgA, which possesses greater amounts of complex *O*-glycans [21], was fourfold less inhibitory than human serum IgA. The inhibitory capacity of these glycoproteins was significantly increased after desialylation. Although *O*-glycosylpeptides and asialo *O*-glycosylpeptides were powerful inhibitors, they were less inhibitory than the parent *O*-glycosylproteins. Moreover, *N*-glycosylpeptides from fetuin, obtained by

Table 2. Carbohydrate specificity of *Amaranthus leucocarpus* lectin.^a

Compound	Concentration (µM)	Relative inhibitory potency
<i>N</i> -acetylgalactosamine	62	1
Ovine submaxillary mucin	0.01	6,200
Asialo-ovine submaxillary mucin	0.005	12,400
Bovine submaxillary mucin	0.05	1,240
Asialo-bovine submaxillary mucin	0.01	6,200
Fetuin	0.0005	124,000
Asialo-fetuin	0.0001	620,000
Human milk IgA	0.004	15,500
Human serum IgA	0.001	62,000
α ₁ -acid glycoprotein	NI ^b	- ^b
Human lactotransferrin	NI	-
Fetuin asialo-glycan ^c	15	4.1
Fetuin asialo-glycan ^d	1	62
Fetuin asialo- <i>O</i> -glycosylpeptide	0.01	6,200
Serum IgA glycan	13	4.8
Porcine stomach mucin	NI	-
glycan I	15	4.1
glycan II	32	1.9
glycan III	NI	-

^a Hemagglutinating activity was tested against neuraminidase- and Pronase-treated human type O red blood cells.

^b Other sugars and glycosides not inhibitory (NI) at a 100 µM concentration included: *D*-galactosamine, *D*-galactose, *D*-mannose, *D*-glucose, *L*-fucose, *N*-acetyl-*D*-glucosamine, *N*-acetyl-*D*-neuraminic acid, *p*-nitrophenyl α - or β -galactosamine, methyl α - or β -galactoside, α (2-3)- and α (2-6)-sialyllactose, lactose, *N*-acetyllactosamine, Gal β 1-4(2-acetamido-2-deoxy-anhydroglucosaminitol).

^c Fetuin asialo-glycan = Gal β 1-3(acetamido-2-deoxy-1,5-anhydrogalactitol).

^d Fetuin asialo-glycan = Gal β 1-3GalNAc.

β -elimination, were not inhibitory at 100 µM. Porcine stomach mucin in its native form was not inhibitory as opposed to its oligosaccharides obtained by β -elimination (Table 2). Oligosaccharides obtained by alkaline-borohydride degradation, from asialofetuin, IgA and porcine stomach mucin, and containing Gal(β 1-3)-2-acetamido-2-deoxy-1,5-anhydrogalactitol were fourfold more powerful inhibitors than *N*-acetylgalactosamine; the disaccharide Gal(β 1-3)GalNAc, obtained after endoglycosidase digestion, was 62 times more powerful an inhibitor than the simple sugar. The aglycone portion derived from fetuin, was not inhibitory at 100 µM.

Amaranthus leucocarpus lectin reacted with porcine stomach mucin oligosaccharide I and II (Fig. 1), thus suggesting that the substitution of *N*-acetylgalactosamine by Gal(β 1-4)GlcNAc(β 1-6) of glycan II is well tolerated by the lectin. It is noteworthy that the lectin did not react with a more complex structure such as mucin oligosaccharide III which contains *N*-acetylgalactosamine in a terminal position (as suggested by 500 MHz ¹NMR spectroscopy).

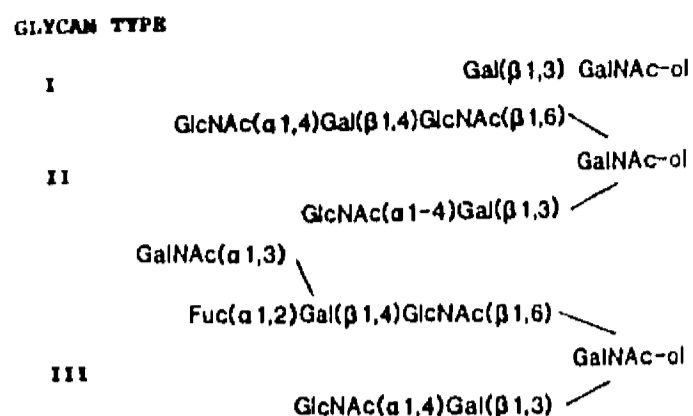


Figure 1. Structure of the oligosaccharide alditols from porcine stomach mucin used as inhibitors of the *Amaranthus leucocarpus* lectin.

Effect of pH and ionic strength

The lectin ability to agglutinate Pronase- and neuraminidase-treated human M and N erythrocytes was tested between pH 5 and pH 9. The optimal pH was found to be between pH 5.5 and pH 6.6; the hemagglutinating activity of M and N red cells diminished 99% and 75%, respectively, at pH 9. As far as the ionic strength is concerned, similar results were obtained. NaCl concentrations below 0.05 M abolished the agglutinating activity of the lectin (Fig. 2).

Discussion

Our results show that *Amaranthus leucocarpus* lectin interacts specifically with the T-antigenic disaccharide Gal(β 1-3)GalNAc and also recognizes *N*-acetylgalactosamine in the α anomeric configuration (T_n -antigen).

As for amaranthin, another lectin isolated from the seeds of *A. caudatus* [3], the most important loci for the *A. leucocarpus* lectin binding site are the hydroxyl group from the C-4 hydroxyl and the C-2 acetamido groups of the reduced *N*-acetylgalactosamine residue of the T-antigenic disaccharide. Similar to amaranthin [3] and jacalin, another anti-T lectin isolated from the seeds of the jackfruit *Artocarpus integrifolia* [22, 23], the combining site of the *Amaranthus leucocarpus* lectin seems to accommodate mainly the *N*-acetylgalactosamine residue found in the inner core of O-glycosidically linked glycans; for the three lectins, substitution(s) of the C-3 and/or the C-6 hydroxyl group(s) of the T_n -antigen with a galactose and/or an *N*-acetylneuraminic acid residue [16] did not decrease significantly the affinity of the lectins. Asialo-ovine submaxillary mucin was also a powerful inhibitor of the lectin agglutinating activity, due to its large number of accessible GalNAc α (1-3)Ser/Thr residues (T_n -antigen) [24].

The *Amaranthus leucocarpus* lectin combining site seems to be restricted to *N*-acetylgalactosamine residues situated in the inner core of the O-glycosidically linked glycan, since

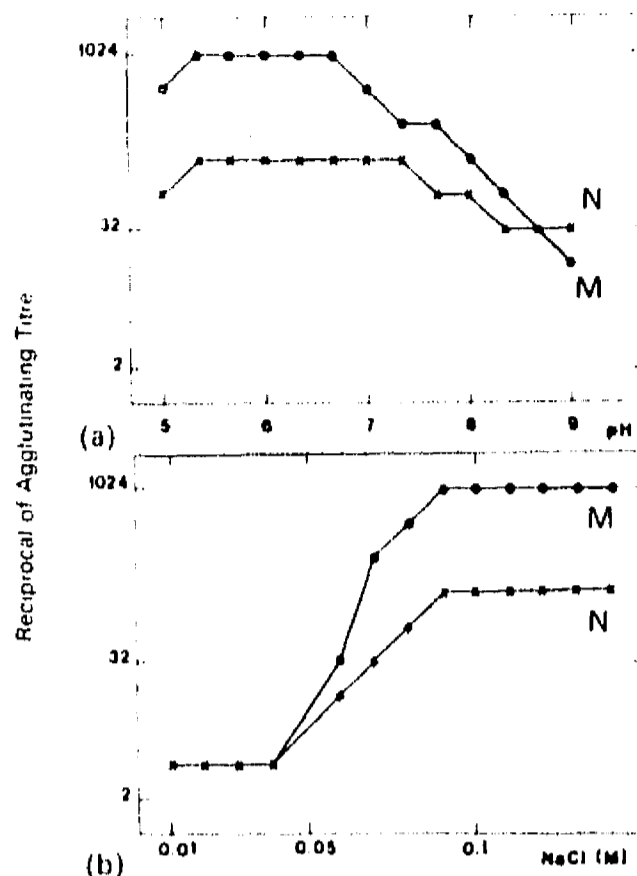


Figure 2. pH and salt dependence of the agglutinating activity of neuraminidase- and Pronase-treated N and M erythrocytes by *Amaranthus leucocarpus* lectin. The concentration of the lectin was $2.4 \mu\text{g ml}^{-1}$. The agglutinating titre was assayed in the 'Universal' buffer at (a) different pH values, and (b) different NaCl concentrations.

oligosaccharides obtained by alkaline-borohydride degradation from porcine stomach mucin or from fetuin and containing 2-acetamido-2-deoxy-1,5-anhydrogalactitol showed slightly less ability to inhibit the hemagglutinating activity of the lectin than the native glycoprotein or the O-glycosidically-linked glycans released by endo-*N*-acetylgalactosaminidase digestion. This was also observed for the *A. caudatus* lectin [3]. This suggests that the spatial feature provided by the O-glycosidic linkage plays an important role in the stabilization of the lectin interaction, as has been observed with *V. graminea* agglutinin [25].

We also found, as previous reports have indicated [6, 8], that *Amaranthus leucocarpus* lacks red blood cell group specificity, including the *N*-acetylgalactosamine-containing P or S phenotypes [26]. However, it is noteworthy that desialylated and mild Pronase-treated human type A, B and O erythrocytes with the M phenotype interact more strongly with the lectin than asialo-N red blood cells. The mild enzyme treatment avoided the loss of M or N antigen on the cell surface [27].

The interaction of *Amaranthus leucocarpus* with the erythrocyte receptors is ionic strength- and pH-dependent:

a decreased protonization of the glycopeptide receptors, induced by the pH increase, seems to reduce these interactions. Because the pH dependence was distinctively related to the type or phenotype of the erythrocytes, we consider that the decrease in binding activity is linked to the red blood cell receptors and not to the lectin. The pH dependence of the interaction between lectins and receptors has been studied for other lectins [25, 28-31]. So far the only clear dependence has been demonstrated with *V. graminea* agglutinin, suggesting the participation of the terminal leucine residue from the peptidic fragment of the N-antigen determinant (glycophorin-A^N [20]).

It has been established clearly that glycophorin possesses 13 structures, 12 are O-glycosidically linked and one is N-linked [32]. It is possible that the lectin receptors are glycophorin A^M molecules which possess three oligosaccharide chains attached to their terminal amino acid residues 2-4 [33]. Nevertheless, it is also possible that Pronase-treatment removed blood group M determinants [27] from the cell surface and the stronger agglutination of these cells may have depended on other undefined M-associated Pronase-resistant structures including glycolipids, or remaining O-glycosidically linked structures. But, similar to *Vicia villosa* lectin B₄, a T_n and CAD blood group specific lectin [34], the interaction is probably directed to glycoprotein rather than to glycolipid antigens.

To sum up, *Amaranthus leucocarpus* lectin possesses some structural similarities with other *Amaranthus* lectins [2-6]; these resemblances include the sugar specificity, but we have shown that there are subtle differences between the *A. leucocarpus* and *A. caudatus* lectins which could account for their different biological activities, such as lymphocyte mitogenic activity [2, 6, 8].

Acknowledgements

This work was supported by the Université des Sciences et Techniques de Lille Flandres-Artois, by the Centre National de la Recherche Scientifique, Unité Mixte de Recherche No 111, by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, France, and by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, the Programa Universitario de Investigación en Salud, UNAM, and DGCSA-Secretaría de Educación Pública, Mexico. Red blood cells were kindly provided by Professor Rodriguez-Moyado from the Central Blood Bank, IMSS, Mexico.

References

- Sanchez-Marroquin A (1980) In *Potencialidad Agroindustrial del Amarantho*, pp. 126-27. Centro de Estudios Económicos del Tercer Mundo, Mexico.
- Pardoe GL, Bird WG, Uhlenbruck M, Sprenger I, Heggen M (1970) *Immunotaestforsch Allerg Klin Immunol* **140**:374-94.
- Rinderle SJ, Goldstein IJ, Matta KL, Ratcliffe RM (1989) *J Biol Chem* **264**:16123-31.
- Koepe SJ, Rupnow JH (1988) *J Food Sci* **53**:1412-7.
- Calderon de la Barca AM, Vazquez-Moreno L (1988) *J Food Biochem* **12**:117-26.
- Zenteno E, Ochoa JL (1988) *Phytochemistry* **27**:313-7.
- Spiro RG (1972) *Methods Enzymol* **28**:3-43.
- Zenteno E, Ochoa JL, Parra C, Montaña LF, Rayon I, Maldonado G, Ruiz B, Carvajal R (1985) In *Lectins—Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry*, Vol. 4 (Bog-Hansen TC, Breborowicz J, eds) pp. 537-46. Berlin: Walter de Gruyter.
- Baenziger JV, Kornfeld S (1974) *J Biol Chem* **249**:7260-9.
- Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RS (1951) *J Biol Chem* **193**:265-75.
- Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F (1956) *Anal Chem* **28**:350-6.
- Montreuil J, Bouquelet S, Debray H, Fournet B, Spik G, Strecker G (1986) In *Carbohydrate Analysis, A Practical Approach* (Chaplin MF, Kennedy JF, eds) pp. 143-204. Oxford: IRL Press.
- Heeb MJ, Marini AM, Gabriel O (1985) *Infect Immunol* **47**:61-7.
- Aminoff D, Gahmman WD, McLean CM, Yadomae T (1980) *Anal Biochem* **101**:44-53.
- Zenteno E, Debray H, Montreuil J, Ochoa JL (1986) In *Lectins—Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry*, Vol. 5 (Bog-Hansen TC, Van Driessche E, eds) pp. 147-54. Berlin: Walter de Gruyter.
- Spiro RG, Bhojroo VD (1974) *J Biol Chem* **249**:704-11.
- Fan JQ, Yamamoto K, Matsumoto Y, Hirabayashi Y, Kumagai H (1990) *Biochem Biophys Res Commun* **169**:751-7.
- Van Halbeek H, Dorland L, Vliegthart FG, Kochetkov NK, Arbatsky NP, Derevitskaya VA (1982) *Eur J Biochem* **127**:21-9.
- Osawa T, Matsumoto I (1972) *Methods Enzymol* **28B**:323.
- Duk M, Lisowska E (1984) *Eur J Biochem* **143**:73-8.
- Pierce-Cretel A, Panblanco M, Strecker G, Montreuil J, Spik G (1981) *Eur J Biochem* **114**:169-78.
- Sastry MJK, Banerjee P, Patanjali SR, Swamy MJ, Swarnalatha GV, Surokata A (1986) *J Biol Chem* **261**:11726-33.
- Swamy MJ, Gupta D, Mahanta SK, Surokata A (1991) *Carbohydr Res* **213**:59-67.
- Gottschalk BA (1972) In *The Glycoproteins* (Gottschalk BA, ed), pp. 810-29. Amsterdam: Elsevier.
- Duk M, Lisowska E, Kordowicz M, Wasniowska K (1982) *Eur J Biochem* **123**:105-12.
- Race RR, Sanger R (1975) In *Blood Groups in Man*, 6th Edn, pp. 139-77. Oxford: Blackwell.
- Winzler RJ, Harris ED, Pekas DJ, Johnson CA, Weber P (1967) *Biochemistry* **6**:2195-202.
- Hassing GS, Goldstein IJ (1970) *Eur J Biochem* **16**:549-55.
- Dulaney JT (1979) *Anal Biochem* **99**:254-67.
- Privat JP, Delmotte F, Mialonier G, Bouchard P, Monsigny M (1974) *Eur J Biochem* **47**:5-14.
- Fangé GB (1977) *J Biol Chem* **252**:2095-100.
- Petryniak J, Petryniak B, Wasniowska K, Krotkiewski H (1980) *Eur J Biochem* **105**:335-41.
- Tomita M, Furthmayr H, Marchesi VT (1978) *Biochemistry* **17**:4756-70.
- Bailly P, Tollefsen SE, Cartron JP (1985) *Glycoconjugate J* **2**:401-8.

CAPITULO IV

ARTICULO: RECOGNITION OF A CD4⁺ MOUSE MEDULLARY THYMOCYTE SUBPOPULATION BY *AMARANTHUS LEUCOCARPUS* LECTIN

INTRODUCCION

Las lectinas empleadas como mitógenos son herramientas inmunológicas útiles para el entendimiento de los mecanismos de activación celular inducida por antígeno; su actividad mitogénica no está restringida a una estructura sacarídica específica como ha sido demostrado con la fitohemaglutinina (específica para complejos lactosamínicos) o con la concanavalina A (específica para α -D-manosa y α -D-glucosa). Recientemente se ha reportado que una lectina específica de Gal β 1 \rightarrow 3GalNAc, aislada de la semilla de la fruta Jacalina *Artocarpus heterophyllus*, es mitogénica para linfocitos T, sin embargo, este efecto no se presenta con las lectinas *Agaricus bisporus* y *Arachis hypogaea* que tienen la misma especificidad de *Artocarpus heterophyllus*. También, recientemente hemos descrito que una nueva lectina obtenida de la semilla de *Amaranthus leucocarpus* (ALL), es específica de Gal β 1 \rightarrow 3GalNAc y no es mitogénica para linfocitos T de individuos sanos.

En virtud de que algunas de estas lectinas son ampliamente usadas para separar tanto linfocitos inmaduros como a timocitos, el siguiente objetivo fue determinar si la lectina *A. leucocarpus* podría diferenciar a una subpoblación de timocitos de ratón.

RESULTADOS Y DISCUSION

Se realizaron suspensiones celulares de timo de ratón, las cuales se incubaron con ALL a diferentes concentraciones y se aislaron de manera similar al procedimiento descrito por Reisner y colaboradores⁽¹³⁾. Las células incubadas con ALL se colocaron en 5 ml de una solución de albúmina sérica bovina al 7%, una vez que las células aglutinadas (amaranto positivas) se sedimentaron, fueron recuperadas e incubadas con GalNAc 0.2 M. Después de la incubación se cuantificaron las células en un hemocitómetro. Los resultados mostraron que la concentración óptima de ALL oscila entre 0.1 μ g y 1.0 μ g de proteína (con título hemaglutinante de 1:16) para 10^6 timocitos. En estas condiciones, las células recuperadas mostraron más del 90% de viabilidad, determinada mediante la prueba de la exclusión del colorante azul tripano. Así, ALL aglutinó a un porcentaje de 5.61 ± 0.85 del total de las células del timo murino. Los datos concordaron cuando se incubaron timocitos

murinos en suspensión con una dosis subaglutinante de ALL-FITC (10 ng de lectina por 10^6 células) y se analizaron en un citofluorómetro, el cual mostró que la cantidad de timocitos amaranto positivos fue del 4.7% (Fig. 4). Estos resultados difieren del porcentaje de timocitos aglutinados por la lectina PNA que es del 85-95%⁽¹³⁾. En virtud de lo anterior, se decidió identificar a los marcadores celulares asociados con estados de diferenciación o madurez de los timocitos aglutinados por ALL. Nuevamente se llevaron a cabo suspensiones de timocitos murinos y las células amaranto positivas se incubaron con anticuerpos monoclonales de rata anti-CD4 murino o con anti-CD8 murino conjugados a biotina. Luego de la incubación se lavaron 2 veces para eliminar los anticuerpos no unidos. Las células se incubaron por segunda ocasión con estreptavidina conjugada a peroxidasa de rábano. Luego de lavar las células, éstas se incubaron con H_2O_2 en presencia de 3,3'diaminobencidina (DAB) hasta que desarrollaron un color marrón. Al final, se cuantificaron las células que reaccionaron con cada anticuerpo. Los ensayos se repitieron, pero ahora, fijando las células de la suspensión en portaobjetos y efectuando ahí las incubaciones. Los resultados revelaron que del 5 al 7% de los timocitos fueron amaranto positivos y de éstos el 75% fueron $CD4^+$ y el 11% $CD8^+$. Los porcentajes no presentaron diferencias estadísticas (debido a que la muestra es pequeña) por lo que el predominio de células $CD4^+$ amaranto positivas no es significativo. Aunque estos ensayos muestran que los timocitos amaranto positivos ya expresan los marcadores CD4 y CD8, se desconocía si esos timocitos eran dobles positivos ($CD4^+CD8^+$). Para identificar con mayor certeza o para definir la

especificidad celular, se realizaron dobles tinciones celulares con los timocitos fijados en portaobjetos. En la primera etapa se incubaron los timocitos con el anticuerpo anti-CD4 murino marcado con biotina, después con estreptavidina-peroxidasa, luego con H₂O₂ y DAB hasta que se desarrolló el color marrón. En la segunda etapa del ensayo, se incubaron los mismos timocitos con el anticuerpo anti-CD8 murino marcado con biotina, después con avidina-fosfatasa alcalina y al final con 5-bromo 4-cloro 3-indolil fosfato en nitroazul de tetrazolium (NBT/BCIP) hasta que se desarrolló un color azul violeta. Los resultados mostraron que los timocitos amaranto positivos fueron CD4⁺CD8⁻ o CD4⁻CD8⁺.

En reportes previos se ha aseverado que la lectina PNA (específica para el antígeno T) reconoce timocitos que residen en la corteza tímica⁽³⁷⁾. Para localizar las células amaranto positivas, se realizaron cortes histológicos de timo murino por técnica de congelación. Dichos cortes de 7 μm de grosor fueron incubados primero con PNA conjugada a isotiocianato de tetrametil rodamina (TRICT), y mas tarde con ALL conjugada a isotiocianato de fluoresceína (FITC). Los resultados mostraron que efectivamente, la PNA se une a todas las células de la corteza tímica y a células epiteliales de la médula, y por su parte ALL se une selectivamente a una subpoblación celular residente en la médula. La incubación de estos cortes histológicos de timo con ALL-biotina y avidina-fosfatasa alcalina, confirmó que los timocitos amaranto positivos se hallan en la médula (figura 2). Asimismo se observó que algunas células con morfología dendrítica de la médula

tímica también fueron amaranto positivas. Para comprobarlo se efectuaron otros cortes histológicos en donde primero se incubaron con ALL-FITC, se tomaron microfotografías, luego se incubaron con anticuerpos NLDC-145 de rata específicos para células interdigitantes, enseguida con anticuerpos anti-IgG de rata conjugados a peroxidasa y se revelaron con H₂O₂ y DAB. De nuevo se tomaron microfotografías y se analizaron las impresiones fotográficas en donde se observó que aproximadamente el 80% de las células interdigitantes son amaranto positivas. El hecho que las células interdigitantes posean un oligosacárido que está presente en timocitos medulares con los cuales interaccionan sugiere que desempeñan alguna función en la adhesión o en la comunicación celular (se debe buscar la lectina endógena en ambas células). Estos resultados señalan que ALL reconoce a una subpoblación de timocitos que se encuentran en médula tímica y concuerdan con los fenotipos CD4⁺CD8⁻ y CD4⁻CD8⁺ hallados en ensayos de dobles marcajes realizados con timocitos fijados en portaobjetos.

Por otro lado, se hicieron dobles marcajes celulares *in situ*. Para ello, se realizaron cortes histológicos de timo de ratón y se incubaron con ALL-biotina, enseguida con avidina-fosfatasa alcalina y por último con NBT/BCIP; en una segunda etapa se incubaron con anticuerpos monoclonales de rata ya sea anti-CD3, anti-CD4 o anti-CD8 murinos, luego con anticuerpos anti-IgG de rata conjugados a peroxidasa y al final con H₂O₂ y DAB. Después de estas incubaciones se pudo observar que los timocitos amaranto positivos *in situ* fueron predominantemente CD3⁺CD4⁺.

La diferencia en cuanto a las especificidades celulares mostradas por lectinas PNA y ALL puede ser explicada por el sitio de interacción de cada lectina con la molécula Gal β 1 \rightarrow 3GalNac α 1 \rightarrow 0-Ser/Thr. Se ha demostrado que PNA se une al antígeno T por interacción con los grupos hidroxilos de los carbonos 2, 3, 4 y 6 de la galactosa terminal, y con el hidroxilo del carbono 4 y el N-acetilo del carbono 2 de GalNac por lo que la sialización de la molécula hace inaccesible el reconocimiento^(14,15). En cambio ALL se une al antígeno T por interacción con GalNac en los grupos, N-acetilo del carbono 2 e hidroxilo del carbono 4. ALL, además interacciona con el hidroxilo del carbono 4 de la galactosa, con el oxígeno del enlace O-glicosídico y con un hidroxilo cercano perteneciente a una serina o a una treonina de la cadena peptídica. Por lo que la sialización de este disacárido (demostrada en aislamientos de glicopéptidos de membrana celular)⁽³⁸⁾ no impide el reconocimiento por ALL aunque si disminuye la afinidad como se ha mostrado en el artículo I. Por lo tanto ALL puede unirse a timocitos que expresan en su superficie O-glicoproteínas con sialil-T o disialil-T, en las cuales el ácido siálico está unido en enlace α 2 \rightarrow 6 a la N-acetil-D-galactosamina y α 2 \rightarrow 3 a la galactosa. Se ha descrito que la sialo-O-glicoproteína denominada sialoforina⁽⁴⁰⁾, leucosialina⁽³⁹⁾ o CD43⁽⁴¹⁾ posee múltiples estructuras sacarídicas disialil-T. Esta sialo-O-glicoproteína se expresa en la superficie de linfocitos maduros en reposo⁽¹⁶⁾, los cuales se tornan PNA⁺ al ser tratados con neuraminidasa⁽⁴²⁾. Lo anterior sugiere que los timocitos inmaduros de corteza tímica tienen una leucosialina

escasamente sialilada que es reconocida por PNA⁽³⁷⁾. La leucosialina aparece tempranamente durante la ontogenia del timo por lo que se ha sugerido que la molécula puede jugar un papel en la maduración de linfocitos T⁽⁴³⁾. El hecho de que los timocitos migren de corteza a médula tímica acorde al proceso de maduración, implica que la sialización del antígeno T de O-glicoproteínas refleja un estado celular próximo a la maduración terminal que puede ser reconocido por la lectina ALL. Aunque ALL debería reconocer además de los timocitos de médula tímica, a los timocitos corticales; los estudios bioquímicos de interacción de la lectina ALL con glicopéptidos y glicoproteínas de estructura conocida, han sugerido que la presencia de residuos de serinas o treoninas cercanas al sitio de enlace O-glicosídico del antígeno T son muy importantes para el reconocimiento, quizá por los grupos OH que poseen o por otros enlaces O-glicosídicos de antígenos T_n.

Recognition of a CD4⁺ mouse medullary thymocyte subpopulation by *Amaranthus leucocarpus* lectin

R. LASCURAIN,* R. CHÁVEZ,† P. GOROCICA,* A. PÉREZ,‡ L. F. MONTAÑO§ & E. ZENTENO*
*Department of Biochemistry, INER, Departments of †Biochemistry and ‡Histology, Faculty of Medicine, UNAM, §Biología Celular, Instituto Nacional de Cardiología and *Laboratorio de Biología Experimental, Centro de Investigaciones J. Félix Frias, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Cuernavaca, Mexico

SUMMARY

We have used the Gal β (1 \rightarrow 3)GalNAc-specific *Amaranthus leucocarpus* lectin to isolate a thymus cell subpopulation which is different from that sorted with *Arachis hypogaea* lectin. The cells recognized by *A. leucocarpus* lectin were predominantly CD4⁺, whereas a minor proportion of CD8⁺ cells (approximately 11%) were also identified. The *A. leucocarpus*-positive cells were located in the thymus medulla and the cortico-medullary junction. The cortex was negative for *A. leucocarpus* cells.

INTRODUCTION

Lectins employed as mitogens are immunological tools for understanding the mechanisms of antigen-driven cell activation;^{1,2} their mitogenic activity is not restricted to a specific saccharide structure as it has been demonstrated with phytohaemagglutinin (specific for complex oligosaccharides) nor concanavalin A (specific for α -D-mannose and α -D-glucose).^{3,4} It has recently been shown that a Gal β (1 \rightarrow 3)GalNAc-specific lectin isolated from the seeds of the jackfruit *Artocarpus heterophyllus*⁵ is mitogenic for T lymphocytes,⁶ as opposed to *Agaricus bisporus* and *Arachis hypogaea* lectins, both of which share the sugar specificity of *Artocarpus heterophyllus*.^{7,8} We have recently described a new Gal β (1 \rightarrow 3)GalNAc-specific lectin from *Amaranthus leucocarpus* (ALL)⁹⁻¹¹ which is not mitogenic for the T cells of healthy individuals. Since some of these lectins are widely used for separating mature from immature lymphocytes⁶ and mouse thymocytes,¹² the aim of this work was to determine if the lectin from *A. leucocarpus* could differentiate a specific mouse thymocyte subpopulation.

MATERIALS AND METHODS

Reagents

Peanut agglutinin (PNA), dimethyl sulphoxide, pronase (*Streptomyces griseus*, Sigma fraction XXV), fluorescein isothiocyanate (FITC), tetramethyl rhodamine B isothiocyanate (TRITC), Hanks' solution, bovine serum albumin (BSA), nitro blue tetrazolium (NBT), dimethylformamide, neuraminidase type V, *N*-acetyl-D-Galactosamine, alkaline phosphatase-labelled avidin, peroxidase-labelled streptavidin, 3,3' diamino

benzidine tetrahydrochloride (DAB), 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (BCIP) and Sephadex G-50 were purchased from Sigma Chemicals (St Louis, MO). Isopentane, chloroform and acetone were from Merck, Mexico. Biotin-labelled as well as non-labelled rat monoclonal antibodies directed to the mouse CD4 (L3T4) and CD8 (Lyt-2) molecules as well as peroxidase-labelled rabbit anti-rat immunoglobulin G (IgG) were purchased from Pharmingen (San Diego, CA). Mouse dendritic cells were determined with rat monoclonal antibody NLDC-145.¹³

Lectin purification

Amaranthus leucocarpus seeds were obtained in Tulyehualco, Mexico. The lectin was purified by affinity chromatography on a column containing human type O red blood cell stroma as described by Zenteno & Ochoa.¹⁰ The haemagglutination activity of *A. leucocarpus* (ALL) was tested against pronase-treated O human erythrocytes.¹¹ ALL (agglutinating activity of 1:15000) was labelled with FITC, at a label to protein ratio of 3.5,^{14,15} and with Immunopure *N*-hydroxysuccinimidobiotin from Pierce Chemical Co. (Rockford, IL) according to instructions.¹⁶

Preparation of thymus sections

Thymus gland was surgically removed from 3-week-old male BALB/c mice under anaesthesia. The specimens were divided into two parts. One was embedded in OCT (Tissue Tek) compound and immediately frozen in cold isopentane and the other fixed in 10% formalin and processed for light microscopy. Serial sections of 7- μ m thickness were cut, on the same day, with a Bright FS/FCS cryostat from the frozen specimen, fixed in cold acetone-chloroform (v.v), air dried and kept frozen until used.

Received 10 May 1994; revised 8 July 1994; accepted 10 July 1994

Correspondence: Edgar Zenteno, Departamento Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM, Apdo. Postal 70-159, Mexico 04510.

Immunofluorescent and immunohistochemical staining of tissue sections

Fixed sections were washed extensively with phosphate-buffered saline, pH 7.2 (PBS) incubated for 15 min with 3% normal mouse serum and washed for 10 min with PBS before staining. FITC-labelled ALL was used at saturating concentrations as determined by previous titration experiments. Sections were incubated for 25 min at room temperature in a humidified atmosphere with 15- μ l aliquots of the lectin. The sections were then washed for 30 min with PBS and mounted with PBS, glycerol before each slide was examined by two independent observers on a standard 14 Zeiss microscope equipped with an IV.2 epifluorescence condenser. Specificity controls were performed using non-conjugated lectin at the same protein concentration range as the first layer reagents. Slides treated in this way were always negative. Some experiments were performed with biotin-labelled lectin; in these experiments alkaline phosphatase-labelled avidin was used as second ligand and 5 μ l/slide of NBT/BCIP¹⁷ was used as substrate. Double stains were performed with tissue sections first stained with biotin-labelled ALL, as described above, and then incubated, separately, with unlabelled CD4 and/or CD8 rat monoclonal antibody for 15 min; as a second layer a 1:200 dilution of the peroxidase-labelled rabbit anti-rat IgG was used and DAB was used as a chromogen. In order to determine whether medullar stromal cells were macrophages or dendritic cells double stains were performed with the biotin-labelled ALL and NLDC-145 monoclonal antibody, as described above.

Fractionation of thymocytes

Surgically removed thymuses were minced in Hanks' solution with a 20-gauge needle in a Petri dish, washed thrice in PBS, counted and adjusted to 1×10^8 cells/ml in PBS. Similar to the method used for the isolation of PNA⁺ and PNA⁻ thymocytes,¹² 1 ml of the cell suspension was incubated with 100 μ g of ALL in PBS for 1 hr at room temperature. Two hundred and fifty microlitres of this solution was poured onto a glass tube (10 \times 1 cm) containing 7% BSA in PBS and left for 30 min at room temperature before collection of the supernatant and the precipitate. After separation, the cells were incubated with 0.2 M GalNAc for 30 min at room temperature, washed twice with PBS and adjusted to 2×10^6 cells/ml in PBS. To confirm the specificity of the lectin binding 100 μ l of the ALL⁺ and ALL⁻ cell suspension were incubated, separately in 3 ml glass tubes, for 30 min at room temperature with the optimal concentration, as determined in previous titration experiments, of FITC-labelled ALL. In order to determine the percentage of CD4⁺ and CD8⁺ positive cells, the ALL⁺ and ALL⁻ isolated cells were incubated with biotin-labelled CD4 and CD8 monoclonal antibody, the peroxidase-labelled streptavidin was used as a second layer, and DAB was used as the chromogen. At the end of the incubation period, cells were washed twice in PBS, mounted in PBS/glycerol and observed by light microscopy. In some experiments the lectin-isolated cells were incubated with 0.005 IU/l of sialidase before performing the fluorescence assays.

FACS analysis

The amount of ALL-positive thymocytes was also determined in a Becton Dickinson FACScan using forward angle laser light scatter to exclude dead cells. ALL-stained thymocytes were

resuspended in 0.5 ml of buffered 1% paraformaldehyde and 5000–10000 cells were counted. The number of ALL-positive cells was determined in three different experiments using solely FITC-labelled lectin.

RESULTS

All the experiments in this study were performed using a subagglutinating dose of the lectin (1 μ g/ml). The number of *Amaranthus leucocarpus*-positive thymocytes, determined in three independent experiments by the absolute number of aggregated cells and the percentage of fluorescent cells per microscopic field, corresponded to 7% of the total (roughly 150×10^6) cells. Neuraminidase treatment of the thymocytes showed a minimum increase in the amount of ALL-positive cells as opposed to PNA-positive cells which showed a significant increase. When thymic cells were first fractionated into PNA⁺ and PNA⁻ populations, less than 3% of the former reacted with ALL whereas none of the latter did. Seventy-five per cent (60%–87%) of the *A. leucocarpus*-positive thymocytes were CD4⁺ and 11% (3%–15%) of the ALL⁺ cells were CD8⁺; these results represent the mean of 10 different experiments.

Immunohistochemical analysis showed that the ALL⁺ cells were located in the thymus medulla, only a small percentage of positive cells were found in the cortico-medullary junction. The cortex was negative for ALL cells (Fig. 1). Immunofluorescence with FITC-labelled ALL suggested that a very small percentage of stromal cells were also ALL⁺, therefore further analysis was performed with biotin-labelled lectin as well as with a dendritic cell-specific monoclonal antibody. Figure 2 shows ALL⁺ stromal cells located only in the thymic medulla; this cell corresponded to a dendritic cell as determined by NLDC-145 monoclonal antibody stain. Double-staining analysis showed that ALL⁺ dendritic cells interact mainly with some CD4⁺, ALL⁻ thymocytes since there was only one ALL⁺ thymocyte near the dendritic cell (Fig. 3).

FACS analysis with FITC-labelled ALL showed that 5–7% of the thymus cells were positive, thus corroborating the percentage found in the immunofluorescence assays (Fig. 4).

DISCUSSION

One classification of thymocytes is based on the expression of the CD4 and CD8 markers; the immature double negative subset contains all of the cells with thymus-homing precursor potential whereas the single positive subsets are regarded as mature cells because they show the functional properties of peripheral T cells.¹⁸ Nevertheless, thymocytes can also be classified by their ability to bind peanut agglutinin.¹⁹ PNA⁺ cells are considered immature despite the fact that they can possess the CD4⁺, CD8⁻ or CD4⁺, CD8⁺ phenotype. The latter are considered intermediates between progenitor cells and mature T cells.^{20–22} Generally immature thymocytes are located in the thymic subcapsular zone and cortex whereas mature cells are found in the medulla.

In this study we have shown that the lectin isolated from *Amaranthus leucocarpus*,¹¹ which shares closely related sugar specificity with PNA, recognizes a different and more mature thymic cell population. Although 11% of the cells were CD8⁺ the majority of the cells binding ALL had the CD4⁺ phenotype

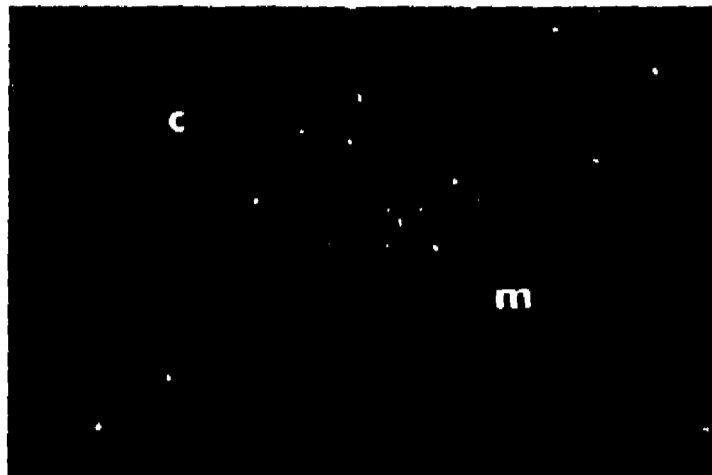


Figure 1. Photomicrograph ($\times 31$) of a longitudinal mouse thymus section stained with FITC-labelled *Amaranthus leucocarpus* lectin. Positive cells were mainly located in the medulla (m) and cortico-medullary junction (c).

and were located in the medulla thus reinforcing the mature stage of this cell population. None of the ALL⁺ cells were double negative. As shown in Figure 3 we have observed that some of the ALL⁺ stromal cells were NLDC-145⁺ cells and therefore they can be considered dendritic cells²³ which express among others adhesion molecules but do not express the Thy-1 nor the CD4 markers.²⁴ It is interesting to recall that thymic cells stained with NLDC-145⁺ antibody correspond to non-lymphoid cells with dendritic appearance in the medulla and corticomedullary region.¹³ The majority of thymocytes bound to the ALL⁺ dendritic cells were of the CD4 phenotype and may be in the deletion process.²⁵ nevertheless, scarce ALL⁺ thymocytes were located near dendritic cells suggesting that this cell subpopulation may correspond to stage III thymocytes²⁶ which have already gone through the negative selection process since the majority of ALL⁺ peripheral blood lymphocytes are PNA⁻ and either CD4⁺ or CD8⁺. Despite

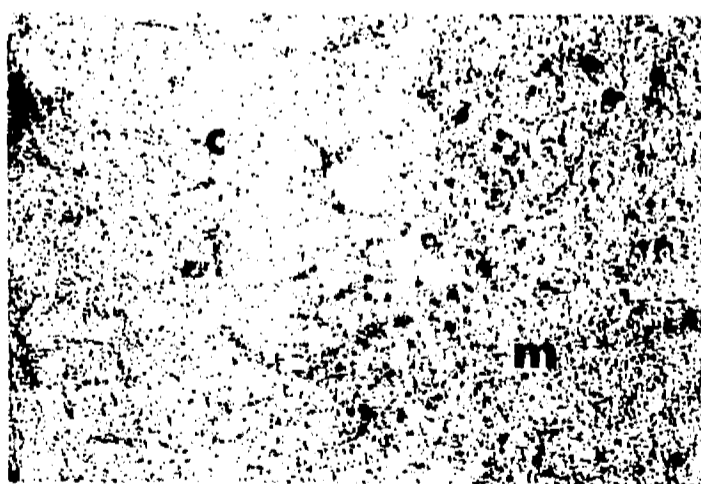


Figure 2. Photomicrograph ($\times 1375$) of a double-stained longitudinal mouse thymus section. Biotin-labelled *Amaranthus leucocarpus*-positive cells (dark blue), and rat anti-mouse CD4⁺ cells (light brown). Double-positive cells were only present in the medulla (m), whereas none was detected in the thymic cortex (c).

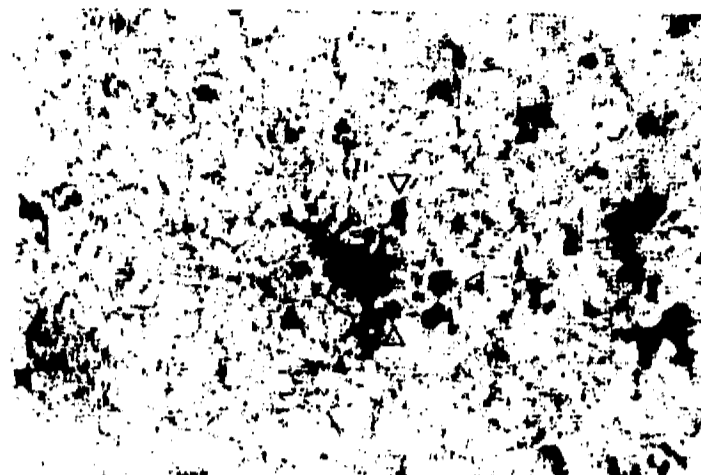


Figure 3. Photomicrograph ($\times 55$) of a double-stained longitudinal mouse thymus section showing a ALL⁺ dendritic cell surrounded by CD4⁺ thymocytes (arrows) and one *A. leucocarpus*-positive thymocyte (dark blue).

this, the biological role of the ALL⁺, CD4⁺ circulating lymphocytes remains obscure.

The discrepancy in the maturation stage of thymocytes isolated by PNA or by ALL may be explained by their different sugar specificity. PNA recognizes the terminal galactose of the Gal β (1 \rightarrow 3)GalNAc disaccharide only when it is deficient in neuraminic acid;²⁷ PNA⁻ cells treated with sialidase became PNA⁺ thus suggesting that the PNA receptors on the mature cells are cryptic.^{12,28} The combining site of the *A. leucocarpus* lectin accommodates the *N*-acetylgalactosamine residue found in the inner core of *O*-glycosidically linked glycans⁹ independently of the presence or absence of neuraminic acid in the disaccharide, as our results with sialidase-treated thymocytes revealed. The lectin from *Artocarpus heterophyllus* which binds the Gal β (1 \rightarrow 3)GalNAc disaccharide²⁹ recognizes mature T human peripheral blood cells;⁹ nevertheless, its sugar specificity is controversial, some authors suggest that it recognizes the terminal galactose of the disaccharide^{29,30} whereas Swamy *et al.*³¹ affirm that its combining site is similar to that of *Amaranthus leucocarpus* lectin.

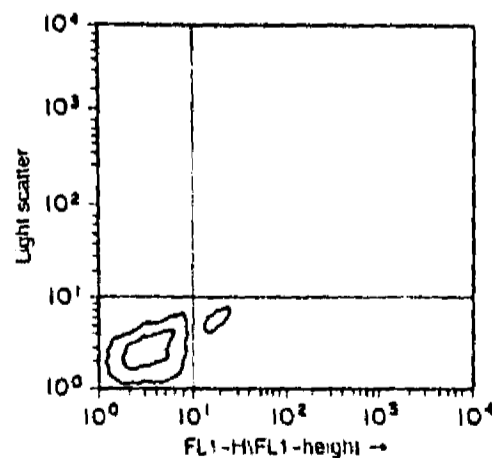


Figure 4. FACSscan analysis of ALL-positive cells. Thymocytes from BALB/c mice were suspended in PBS, incubated with FITC-labelled lectin, washed and suspended in 1% paraformaldehyde. The amount of positive cells was 5–7% as determined in three different experiments.

The different cell populations recognized by lectins with apparently similar sugar specificity deserve a more profound analysis since there are many more surface markers which determine the biological role of a cell.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by grants from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, Mexico; Programa Universitario de Investigación en Salud, and Programa de Apoyo a Divisiones de Estudios de Posgrado, UNAM, Mexico. The authors wish to thank Dr Felipe Massó who contributed to the data and ideas surveyed in this paper and Beatriz Rodríguez for helpful technical assistance.

REFERENCES

- ANDERSSON J., SJÖBERG O. & MÖLLER G. (1972) Mitogens as probes for immunocyte activation and cellular cooperation. *Transplant Rev* 11, 131.
- PEACOCK J.S., COLSKY A.S. & PINTO V.B. (1990) Lectins and antibodies as tools for studying cellular interactions. *J Immunol Methods* 126, 147.
- STOBO J.D., ROSENTHAL A.S. & PAUL W.E. (1972) Functional heterogeneity of murine lymphoid cells. I. Responsiveness to and surface binding of concanavalin A and phytohemagglutinin. *J Immunol* 108, 1.
- STOBO J.D. & PAUL W.E. (1973) Functional heterogeneity of murine lymphoid cells. III. Differential responsiveness of T cells to phytohemagglutinin and concanavalin A as a probe for T cell subsets. *J Immunol* 110, 362.
- HAGIWARA K., COLLET-CASSART D., KOBAYASHI K. & VAERMAN J.P. (1988) Jacalin: isolation, characterization and influence of various factors on its interaction with human IgA1, as assessed by precipitation and latex agglutination. *Mol Immunol* 25, 69.
- PINEAU N., AUCOUTURIER P., BRUGIER J.C. & PREUD'HOMME J.L. (1990) Jacalin: a lectin mitogenic for human CD4 T lymphocytes. *Clin Exp Immunol* 80, 420.
- PRESANT C.A. & KORNFELD S. (1972) Characterization of the cell surface receptor for the *Agaricus bisporus* haemagglutinin. *J Biol Chem* 247, 6937.
- LOTAN R., SKUTELSKY E., DANON D. & SHARON N. (1975) The purification, composition and specificity of the anti-T lectin from peanut (*Arachis hypogaea*). *J Biol Chem* 250, 8518.
- ZENTENO E., OCHOA J.L., PARRA C. *et al.* (1985) Mitogenic, immunosuppressive and phagocytic activity of *Machaerocereus eruca* and *Amaranthus leucocarpus* lectins. In: *Lectins - Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry* (eds T. C. Bög-Hansen & J. Breborowicz), Vol. 4, p.537. Walter de Gruyter, Berlin.
- ZENTENO E. & OCHOA J.L. (1988) Isolation and purification of *Amaranthus leucocarpus* lectin on stromia column. *Phytochemistry* 27, 313.
- ZENTENO E., LASCURAIN R., MONTAÑO L.F., VÁZQUEZ L., DEBRAY H. & MONTREUIL J. (1992) Specificity of *Amaranthus leucocarpus* lectin. *Glycoconjugate J* 9, 204.
- REISNER Y., LINKER-ISRAELI M. & SHARON N. (1976) Separation of mouse thymocytes into two subpopulations by the use of Peanut agglutinin. *Cell Immunol* 25, 129.
- KRAAL G., BREEI M., JANSE M. & BRUIN G. (1986) Langerhans cells, veiled cells and interdigitating cells in the mouse recognized by a monoclonal antibody. *J Exp Med* 163, 981.
- THE T.H. & FELTKAMP T.E.W. (1970) Conjugation of fluorescein isothiocyanate to antibodies. I. Experiments on the conditions of conjugation. *Immunology* 18, 865.
- HUDSON L. & HAY F.C. (eds) (1989) Antibody as a probe. In: *Practical Immunology*, edn 3, p. 34. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- SAVAGE D., MATTSO G., DESAI S., NIELANDER G., MORGENSEN S. & CONKLIN E. (eds) (1992) *Avidin-biotin Chemistry: A Handbook*, p. 47. Pierce Chemical Company, Rockford, IL.
- SAMBROOK J., FRITSCH W.F. & MANIATIS T. (1989) *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, edn 2, p. 18.74. Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA.
- MALE D., CHAMPION B., COOKE A & OWEN M. (1991) *Advanced Immunology*, edn 2, p.6.6. Gower Medical Publishing, London.
- RITTER M.A. & CRISPE I.N. (1992) *The Thymus*, p. 74. IRL Press and Oxford University Press, Oxford.
- SCOLLAY T., BARTLET P. & SHORTMAN K. (1984) T cell development in the adult murine thymus: changes in the expression of the surface antigens Ly2, L3T4 and B2A2 during development from early precursor cells to emigrants. *Immunol Rev* 82, 79.
- FOWLKES B.J., SCHWARTZ R.H. & PARFILL D.M. (1988) Deletion of self-reactive thymocytes occurs at a CD4⁺ 8⁺ precursor stage. *Nature* 334, 620.
- MACDONALD H.R., HENGARTNER H. & PEDRAZZINI T. (1988) Intrathymic deletion of self-reactive cells prevented by neonatal anti-CD4 antibody treatment. *Nature* 335, 174.
- KAMPERDIJK E.W.A., KAPSENBERG M.L., VAN DEN BERG M. & HOFFSMIT E.C.M. (1985) Characterization of dendritic cells, isolated from normal and stimulated rat lymph nodes. *Cell Tissue Res* 242, 469.
- ARDAVIN C. & SHORTMAN K. (1992) Cell surface marker analysis of mouse thymic dendritic cells. *Eur J Immunol* 22, 859.
- CARLOW D.A., VAN OERS N.S., TEH S.J. & TEH H.S. (1992) Deletion of antigen-specific immature thymocytes by dendritic cells requires LFA-1/ICAM interactions. *J Immunol* 148, 595.
- ROIT I., BROSTOFF J. & MALE D. (1993) *Immunology*, edn 3, p.11.6. Mosby, London.
- NOVOGRODSKY A., LOTAN R., RAVID A. & SITARON N. (1975) Peanut agglutinin, a new mitogen that binds to galactosyl sites exposed after neuraminidase treatment. *J Immunol* 115, 1243.
- DE MAIO A., LIS H., GERSHONI J.M. & SHARON N. (1986) Identification of glycoproteins that are receptors for peanut agglutinin on immature (cortical) mouse thymocytes. *FEBS Letters* 194, 28.
- ROQUE-BARREIRA M.C. & CAMPOS-NETO A. (1985) Jacalin: an IgA binding lectin. *J Immunol* 134, 1740.
- PEREIRA M.E.A., LOURES M.A., VILLALTA F. & ANDRADE A.F.B. (1980) Lectin receptors as markers for *Trypanosoma cruzi*. Developmental stages and a study of the interaction of wheat germ agglutinin with sialic acid residues on epimastigote cells. *J Exp Med* 152, 1375.
- SWAMY M.J., GUPTA D., MAHANTA S.K. & SUROLATA A. (1991) Further characterization of the saccharide specificity of peanut (*Arachis hypogaea*) agglutinin. *Carbohydr Res* 213, 59.

CAPITULO V

ARTICULO: ISOLATION OF THE RECEPTOR FOR *AMARANTHUS LEUCOCARPUS* LECTIN FROM MURINE MEDULLARY THYMOCYTES

INTRODUCCION

Las lectinas son proteínas o glicoproteínas que interaccionan específicamente con estructuras sacarídicas e inducen aglutinación celular. Debido a su especificidad, estas proteínas son excelentes herramientas para la caracterización de oligosacáridos y para el aislamiento de poblaciones celulares. Las lectinas *Arachis hypogaea* (aglutinina del cacahuete), *Glycine max* (aglutinina del frijol de soya), *Helix pomatia* y *Triticum vulgare* (aglutinina de germen de trigo) han sido ampliamente usadas para la separación de timocitos inmaduros de la corteza del timo, así como otras subpoblaciones de linfocitos T. Recientemente, hemos demostrado que la lectina *Amaranthus leucocarpus* es específica de la molécula GalNAc de los antígenos T y T_n (Gal β 1 \rightarrow 3GalNAc α 1 \rightarrow O-Ser/Thr y GalNAc α 1 \rightarrow O-Ser/Thr respectivamente) y posee la capacidad de interactuar con timocitos medulares que se encuentran en los últimos estadios de maduración.

Para poder identificar la función del receptor celular reconocido por ALL en el tráfico y/o en el proceso de maduración de los timocitos, se decidió purificar y definir las características moleculares del receptor celular.

RESULTADOS Y DISCUSION

Se incubaron 1×10^9 timocitos de ratones machos de 6-9 semanas de edad, con la dosis óptima de ALL-biotina y las células aglutinadas (amaranto positivas) fueron separadas por sedimentación en albúmina sérica bovina al 7% de acuerdo al método descrito⁽¹³⁾. Luego de aislar las células amaranto positivas, éstas fueron lisadas a 0°C con tritón X-100 al 1.0% en presencia de inhibidores de proteasas (2 mM de fenilmetilsulfonilfluoruro, 1 µg/ml de aprotinina A, 1 µg/ml de pepstatina y 2 µg de leupeptina) durante 30 minutos. El producto de la lisis celular fue centrifugado a 3,500 rpm durante 10 minutos, y el sobrenadante fue nuevamente centrifugado a 14,000 rpm por 30 min para eliminar citoesqueletos, mitocondrias y restos celulares. El sobrenadante obtenido de la segunda centrifugación se aplicó a una columna de avidina-agarosa equilibrada con 0.1% de tritón X-100 en PBS a pH 7.2, con la finalidad de retener las glicoproteínas de membrana unidas a ALL-

biotina de manera similar a un método descrito⁽⁴⁴⁾. Después de eluir con PBS el material no retenido por la columna, la fracción correspondiente a la proteína adsorbida se eluyó con GalNAc 0.2 M en PBS o con glicina 0.1 M pH 2.5. Para evitar la desnaturalización protéica de la fracción eluida a pH ácido, ésta fue inmediatamente neutralizada con amortiguador Tris 1 M.

Posteriormente, la fracción purificada por cromatografía de afinidad fue dializada contra NaCl 0.01 M y analizada mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 12.5%⁽⁴⁵⁾ en condiciones reductoras y no reductoras. El revelado de la separación electroforética en condiciones no reductoras, fue realizado con nitrato de plata siguiendo la técnica descrita⁽⁴⁶⁾. Este perfil electroforético mostró una sola banda protéica de una M_r de 70,000 para la fracción purificada. Para confirmar la ausencia de lectina biotinilada en la fracción purificada, ésta fue electrotransferida a papel de nitrocelulosa de acuerdo a la técnica⁽⁴⁷⁾ y el papel fue incubado con estreptoavidina-peroxidasa, H_2O_2 y DAB. El resultado negativo comparado con la reacción de una muestra testigo de ALL-biotina, indicó que la fracción purificada no contiene biotina.

La electroforesis en condiciones reductoras utilizando β -mercaptoetanol al 5% y Urea 8 M en la poliacrilamida y en el amortiguador de corrida, mostró que la fracción purificada no modifica el peso molecular, mientras que la muestra testigo ALL-biotina presenta una banda de 35 kDa que se identifica químicamente como el

monómero de ALL. Los resultados sugieren que la fracción eluida con GalNAc o con glicina a pH ácido corresponde a un receptor celular de un peso molecular aproximadamente de 70 kDa. Esto sugiere que se trata de un receptor diferente a los receptores celulares descritos para lectinas específicas de los antígenos T y T_n. Considerando que la principal glicoproteína de membrana de leucocitos, la leucosialina, es portadora de antígenos T y de sus formas sialiladas⁽³⁹⁾ podemos decir que es el receptor celular de lectinas que reconocen al antígeno T. Sin embargo, en relación al peso molecular de la leucosialina, hay discrepancias desde 95 hasta 195 kDa. Por ejemplo, De Maio y colaboradores⁽³⁷⁾ han encontrado que la lectina *Arachis hypogaea* específica del antígeno T, reconoce a dos glicoproteínas de membrana de timocitos, una que tiene un peso molecular entre 170-180 kDa y otra de 110 kDa. De Petris y Tackacs, con otros métodos han mostrado que PNA reconoce en timocitos tratados con neuraminidasa, a 3 glicoproteínas membranales cuyos pesos moleculares son 120-125, 140 y 185-195 kDa, mientras que en timocitos no tratados sólo reconoce a la de alto peso molecular⁽⁴⁸⁾. Piller y colaboradores con el uso de la lectina *Salvia sclarea* (específica del antígeno T_n), han aislado de una línea linfóide celular a una leucosialina con glicosilación incompleta, la cual se identifica con anticuerpos y tiene un peso molecular de 125 kDa⁽⁴⁹⁾. Los estudios dirigidos por Fukuda esclarecen estas discrepancias en los pesos moleculares de la leucosialina. En esos estudios se ha encontrado que diferentes células hematopoyéticas sintetizan a un precursor protéico de la leucosialina, el cual es rico en serina, treonina y

prolina, tiene 84 sitios para enlaces O-glicosídicos⁽⁴³⁾. Inicialmente tiene un peso molecular de 52 kDa y con la formación de algunos enlaces con N-acetil-D-glucosamina, se incrementa a 54 kDa. Estos enlaces N-glicosídicos son necesarios para el transporte hacia el aparato de Golgi, donde se llevan a cabo los enlaces O-glicosídicos⁽³⁹⁾. También, se han reportado variaciones en la glicosilación de la leucosialina en distintos tipos de leucocitos⁽⁵⁰⁾, lo cual indica que la masa molecular de la leucosialina aumenta con el número de glicosilaciones y/o su ramificación. Estas diferencias en el patrón de glicosilación, han sugerido que se relacionan con la función celular. Por ejemplo, la leucosialina de 105 kDa (denominada gp105) que está presente en células precursoras de eritrocitos, ya no se encuentra en los eritrocitos diferenciados⁽⁵¹⁾. Otro ejemplo es la activación de linfocitos T, la cual induce cambios en la glicosilación de la leucosialina; de un tetrasacárido cambia a un hexasacárido⁽¹⁶⁾.

La leucosialina (sialoforina o CD43) por sus características estructurales parece ser el receptor de ALL. Es probable que esta molécula sea una leucosialina de 70 kDa relacionada con un estado de diferenciación celular de los timocitos. Aunque también puede ser que la leucosialina de los timocitos murinos tenga un peso molecular de 70 kDa. La secuenciación de aminoácidos del receptor de ALL en timocitos murinos y posteriormente en linfocitos humanos, deberá esclarecer su identidad molecular.

**ISOLATION OF THE RECEPTOR FOR *AMARANTHUS LEUCOCARPUS*
LECTIN FROM MURINE MEDULLARY THYMOCYTES**

Running Title: *Amaranthus leucocarpus* thymocyte receptor

Key Words: *Amaranthus leucocarpus* lectin, lectin receptor, medullary thymocytes, leukosialin, glycoprotein.

ABSTRACT

A receptor with an M_r of 70,000 from murine CD-1 medullary thymocytes was purified using a complex with the biotin-labelled *Amaranthus leucocarpus* lectin and avidin-agarose as the affinity matrix. The receptor is a glycoprotein that contains 20% of sugar by weight and is composed of galactose and N-acetyl-D-galactosamine (in a 1:3 molar ratio) in its saccharidic portion. The ALL-thymocyte receptor is composed of O-glycan structures, which could be considered precursors of leukosialin, present in thymocytes in the latter stages of maturation.

INTRODUCTION

Lectins are proteins or glycoproteins that interact specifically with saccharide structures and induce cell agglutination (1,2). Due to their specificity, these proteins have been demonstrated to be excellent tools for oligosaccharide characterization as well as for isolation of cellular populations (3,4). Lectins from *Arachis hypogaea* (PNA), *Glycine max* (soybean agglutinin), *Helix pomatia*, and wheat germ agglutinins have been widely used in the fractionation of immature thymocytes from the cortex of the thymus (5) and other T-cell subpopulations (6-8). In a recent work we demonstrated that the lectin from *Amaranthus leucocarpus* (ALL) shares sugar specificity for the T and the T_n antigen (Gal β 1,3GalNAc α 1,O-Ser/Thr and GalNAc α 1,O-Ser/Thr, respectively) (9), and possesses the capacity to interact with medullary thymocytes (10). In this work we provide information on the molecular characteristics of the ALL receptor from medullary thymocytes, these cells belong to the group of thymocytes in the late stages of maturation.

MATERIALS AND METHODS

Reagents. Lectin was purified from *Amaranthus leucocarpus* seeds by affinity chromatography as described in (11). The *A. leucocarpus* lectin (hemagglutinating specific activity of 3,000) was labelled with N-hydroxysuccinimide esters of biotin from Pierce Chem. Co. (Rockford, IL, USA) at a label/protein ratio of 2:1 (12). Fetal calf serum was purchased from Gibco BRL, Inc. (Grand Island, NY, USA). Electrophoresis and blotting reagents were obtained from Bio-Rad Lab. Inc. (Richmond, CA, USA). Cell culture media, biotin and avidin monomeric-agarose, bovine serum albumin fraction V, sugars and chemical reagents were from Sigma Chemical Co (St Louis, MO, USA).

Cells. Thymus glands were surgically removed from male CD-1 mice (6-9 weeks old), washed twice in phosphate buffered saline (PBS; 0.15 M NaCl, 0.05 M sodium phosphate, pH 7.2) and passed through a fine mesh to harvest the cell suspensions. The thymocytes were then resuspended in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 5% fetal calf serum (heat inactivated at 56°C for 30 min), counted in a hemocytometer and adjusted to 1×10^8 cells/ml. Thymocytes subpopulation was purified by selective agglutination (5) as follows: the cell suspension was incubated for 10 min at room temperature with 250 μ g of biotinylated-*Amaranthus leucocarpus* lectin and layered gently on the top of a solution of 7% bovine serum albumin in PBS in conical 12 ml glass tube. After 30 min at room temperature, the cells present in the bottom (ALL⁻ thymocytes) and in the top (ALL⁺ thymocytes) were collected separately and washed twice with PBS.

Analysis of separated cells. Both, ALL⁺ and ALL⁻ thymocytes, were assessed for their viability by the trypan blue exclusion test. The immunological properties of the obtained cell fractions were established with standard immunological methods by fluorescent staining with monoclonal antibodies. Fluorescent cells were enumerated by fluorescent microscopy and cytofluorometry (13).

Receptor purification. Indirect affinity chromatography was used as a method to specifically isolate the lectin-binding glycoproteins from the surface of cells (14); 5×10^7 ALL⁺ thymocytes were lysed in a solution of PBS containing 1 $\mu\text{g/ml}$ aprotinin A, 1 $\mu\text{g/ml}$ pepstatin, 2 $\mu\text{g/ml}$ leupeptin, 2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1.0% (v/v) triton X-100, for 30 min at 0°C under shaking. Nuclei, cell debris, and mitochondria were removed by centrifugation, first 10 min 250 g, then 30 min 18,000 g. Pellets were eliminated and the clear supernatant was loaded on an avidin-agarose column (3 x 1 cm), equilibrated previously with PBS (pH 7.2, 0.1% triton X-100) at 4°C. The unretained material was eluted with PBS until the optical density at A_{280} reached zero. The fraction corresponding to the bound protein was eluted with 0.2 M GalNac in PBS or 0.1 M glycine pH 2.5. The collected fractions with positive optical density were pooled, dialyzed against 5 mM NaCl, and concentrated by lyophilization.

Polyacrylamide gel electrophoresis. The molecular weight and the homogeneity degree of the purified receptor was evaluated under reducing (in the presence of 5% β -mercaptoethanol and 8 M urea) and under non-reducing conditions by polyacrilamide gel electrophoresis (PAGE) in the presence of 0.1% sodium dodecyl sulphate (SDS), using the Laemmli buffer system (15). Gels that had been run with samples under non-reducing conditions were stained with silver nitrate as described in (16) and gels with reduced samples were stained with 0.1% Coomassie brilliant blue.

Protein Blotting. Proteins separated by SDS-PAGE were transferred onto nitrocellulose filters of 0.22 μ m (Bio Rad 162-0115) in an electric field produced by a 1 A constant current for 1 hour as described (17). The filters were later quenched in 0.1% gelatine, 0.01% Tween 20-PBS for 16 h at 4°C and then washed with 0.1% Tween 20-PBS for 2 h, changing buffer every 20 min. The filters were incubated with a solution containing streptavidin-peroxidase diluted 1:8000, 10 mM EDTA, in PBS for 30 min. At the end, filters were washed for 1 h with buffer changes every 15 min. Finally, the reaction was revealed with 0.03% 3,3'-diaminobencidine, 0.1% de H_2O_2 in PBS.

Analytical methods. Protein concentration was determined by the method of Bradford (18) with Comassie R-250, using bovine serum albumin as standard. Carbohydrate concentration was determined by the method of Dubois *et al.* (19), using lactose as standard. Carbohydrate composition analysis was performed after methanolysis in the presence of meso-inositol as internal standard, and the per-Q-trimethyl sialylated methylglycosides (after N-reacetylation) were analyzed by gas-liquid chromatography in a capillary column (25 mm x 0.32 mm) of silicone OV 101 (20)

RESULTS

Cellular purification. For each murine thymus we obtained $0.9-1.5 \times 10^8$ thymocytes. The fraction of cells agglutinated by the lectin (ALL⁺ cells) contained 5×10^6 cells corresponding to 4.7% of the total thymocytes recovered. More than 75% of the cells in the ALL⁺ fraction bear the mature thymocyte phenotype CD2⁺, CD3⁺, CD4⁺, CD8⁻ a small proportion (less than 11%) possesses the phenotype CD2⁺, CD3⁺, CD4⁻, CD8⁻, whereas the ALL⁻ fraction comprises a cell population that bears the phenotype CD2⁺, CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺ and the immature cortical phenotype CD2⁺, CD3⁺, CD4⁻, CD8⁻ (not shown).

Receptor purification. The thymocyte receptor for ALL was purified by the indirect affinity chromatography method, using biotin-labelled ALL and avidin-agarose as affinity support. The receptor was eluted from the affinity matrix by addition of 0.2 M GalNAc (Fig. 1). The purified protein corresponds to 0.1% of the cell lysate (table 1), a similar yield was obtained by diminishing the pH of the chromatography media with 0.1M glycine/HCl, pH 2.5, instead of using the specific carbohydrate.

Polyacrylamide gel electrophoresis and blotting. Analysis of the electrophoretic profile of the murine thymocytes shows 21 protein bands with molecular weights between 170 and 13 kDa; the best identified bands correspond to 110, 85, 70, 63, 30, and 15 kDa (figure 2). Analysis of the purified ALL-receptor, under reducing and non-reducing conditions, shows a single band of 70 kDa (Fig 2). To confirm the absence of biotinylated lectin in the purified receptor we performed

Western blot analysis with peroxidase-labelled streptavidin reaction, which revealed a negative reaction in the transferred ALL-thymocyte receptor and staining of a single band in the presence of biotinylated ALL (not shown).

Chemical composition. The receptor is a glycoprotein, with 20% of sugars by weight and composed only by galactose and N-acetyl-D-galactosamine in a molar ratio of 1:3 in its saccharidic portion (table 2).

DISCUSSION

We purified the receptor for the *Amaranthus leucocarpus* lectin from the medullary (mature) thymocytes. It is a glycoprotein of M_r 70,000, composed of galactose and GalNAc as a typical O-glycosidically linked protein. ALL possesses high affinity for T and Tn antigens, and the specific interaction of the lectin is directed to the axial -OH and the N-acetylated groups of GalNAc (9); this lectin interacts with the human A^M glycophorin due to its interaction with the free hydroxyl-group from serine present in the amino terminal, which plays an important role in the stabilization of the interaction of the lectin-receptor complex (9). The ALL sugar-specificity is very similar to that exhibited by the lectin of PNA, but ALL shows great specificity for medullary thymocytes (10,21). The ALL⁺ cells are CD4⁺ (75%) or CD8⁺ (11%), indicating that ALL is able to interact with thymocytes in their last stages of maturation (10).

By means of lectins with similar sugar specificity, several authors demonstrated different lymphocyte receptors; PNA shows great affinity with a major glycoprotein with M_r 170,000-180,000 and a minor band of M_r 110,000-120,000 (22,23); Piller and Piller have identified a glycoprotein of M_r 125,000 (which corresponds to leukosialin) with high affinity for the T_n-specific lectin from *Salvia sclarea* seeds (24). Leukosialin (CD43 or sialophorin) is a major membrane sialoglycoprotein in normal leukocytes, it possesses an M_r of 120,000 (M_r 113,000 to 150,000) and shows an extremely Ser/Thr rich extracellular domain, which carries O-linked carbohydrates (25); the structure of these O-glycans varies among T-cell subsets and may change during differentiation and lymphocyte-activation (26,27). The precursor of leukosialin is a

glycoprotein of M_r 54,000, which is transformed into the mature form at M_r 120,000. At the present, molecular intermediates of biosynthesis have not been detected and discrepancies to explain the big shift (M_r 66,000) in molecular weight of leukosialin, from the precursor to mature form have been difficult to settle (28).

There are reports of similarities in the biochemical properties of leukosialin in mice with leukocyte common antigens, such as L-CA or CD45 and Ly5 or T200 (29,30). These antigens possess high molecular weight and are highly glycosylated; they can be expressed in alternative molecular forms in different cell types, and have been implicated in T-cell proliferation and differentiation (31). We consider that these molecules do not correspond to the receptor of the lectin due to their high molecular weight, and leukosialin seems to be, for its structural characteristics, the ALL receptor. Our results suggest that utilization of ALL could be important in the study of the role of Q-glycosylated lymphocyte receptors in cell-proliferation, differentiation, and in their interaction with antigen presenting cells.

REFERENCES

1. Liener IE, Sharon N and Goldstein IJ eds. 1986. Lectins, Properties, Functions and applications in Biology and Medicine. Ed. Acad Press New York, USA
2. Sharon N and Lis H. Lectins as cell recognition molecules. *Science* 1989, 246:227-234.
3. McCoy Jr JP. The application of lectins to the characterization and isolation of mammalian cell populations. *Cancer and Metastasis Reviews* 1987, 6:595-613
4. Peacock JS, Colsky AS and Pinto VB. Lectins and antibodies as tools for studying cellular interactions. *J Immunol Methods* 1990, 126:147-157
5. Reisner Y, Linker-Israeli M and Sharon N. Separation of mouse thymocytes into two subpopulations by the use of peanut agglutinin. *Cell Immunol.* 1976, 25:129-134.
6. Reisner Y and Sharon N. Fractionation of subpopulations of mouse and human lymphocytes by peanut agglutinin or soybean agglutinin. *Methods Enzymol* 1984, 108:168-179
7. Hellström U, Hammarström ML, Hammarström S and Perlmann P. Fractionation of human lymphocytes on *Helix pomatia* a hemagglutinin-sepharose and wheat germ agglutinin-sepharose. *Methods Enzymol* 1984, 108:153-168
8. De Dios I, Manso M, León V and López Borrasca A. Separation of human lymphocyte subclasses by rosettes with latex-lectin particules. *Biochem Med Metab Biol* 1986, 35:12-17.
9. Zenteno E, Lascurain R, Montaña LF, Vázquez L, Debray H and Montreuil J. Specificity of *Amaranthus leucocarpus* lectin. *Glycoconj J.* 1992, 9:204-208.
10. Lascurain R, Chávez R, Gorocica P, Pérez A, Montaña LF and Zenteno E. Recognition of a CD4⁺ mouse medullary thymocyte subpopulation by *Amaranthus leucocarpus* lectin. *Immunology* 1994, 83:410-413
11. Zenteno E and Ochoa JL. Isolation and purification of *Amaranthus leucocarpus* lectin on stroma column. *Phytochemistry* 1988, 27:313-317
12. Savage D, Mattson G, Desai S, Nielander G, Morgensen S and Conklin E eds. 1992. Avidin-biotin chemistry: A handbook. pp 42-48. Ed. Pierce Chemical Company, Rockford IL, USA.

13. Hudson L and Hay FC eds. 1980. Practical Immunology 2nd ed. pp 13-17. Ed. Blackwell Scientific Publications, Oxford, UK
14. Buckie JW and Cook GMW. Specific isolation of surface glycoproteins from intact cells by biotinylated concanavalin A and immobilized streptavidin. Anal Biochem 1986, 156:463-472
15. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during assembly of the bacteriophage T4. Nature 1970, 227:680-685
16. Switzer RC, Merrill CR and Shifrin S. A highly sensitive silver stain for detecting proteins and peptides in polyacrylamide gels. Anal Biochem 1979, 98(1):231-237
17. Towbin H, Staehelin T and Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc Natl Acad Sci USA 1979, 76:4350-4354.
18. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 1976, 72:248-254
19. Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA and Smith F. Anal Chem 1956, 28:350-356
20. Montreuil J, Bouquelet S, Debray H, Fournet B, Spik G and Strecker G. 1986. In: Carbohydrates analysis, a practical approach. Chaplin MF and Kennedy JF eds. pp 143-204, Oxford, IRL Press.
21. Swamy MJ, Gupta D, Mahanta SK and Surolata A. Further characterization of the saccharide specificity of peanut (*Arachis hypogaea*) agglutinin. Carbohydr Res 1991, 213:59-63
22. De Maio A, Lis H, Gershoni JM and Sharon N. Identification of glycoproteins that are receptors for peanut agglutinin on immature (cortical) mouse thymocytes. FEBS let. 1986, 194:28-32
23. De Petris S and Tackacs B. Relationship between mouse lymphocyte receptors for peanut agglutinin (PNA) and *Helix pomatia* agglutinin (HPA). Eur J Immunol 1983, 13:831-840.
24. Piller V, Piller F and Fukuda M. Biosynthesis of truncated Q-glycans in the T cell line Jurkat. Localization of Q-glycan initiation. J Biol Chem 1990, 265:9264-9271

25. Shelley CS, Remold-O'Donnell E, Davis III AE, Bruns GAP, Rosen FS, Carroll MC and Whitehead AS. Molecular characterization of sialophorin (CD43), the lymphocyte surface sialoglycoprotein defective in Wiskott-Aldrich syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989, 86:2819-2823
26. Carlsson SR, Sasaki H and Fukuda M. Structural variation of the leukosialin in different cellular lines. *J Biol Chem* 1986, 261:12787-12795
27. Piller F, Piller V, Fox RI and Fukuda M. Human T-lymphocyte activation is associated with changes in Q-glycan biosynthesis. *J Biol Chem* 1988, 263:15146-15150
28. Carlsson SR and Fukuda M. Isolation and characterization of leukosialin, a major sialoglycoprotein on human leukocytes. *J Biol Chem* 1986, 261:12779-12786
29. Gulley ML, Ogata LC, Thorson JA, Dailey MO and Kemp JD. Identification of a murine pan-T cell antigen which is also expressed during the terminal phases of B cell differentiation. *J Immunol* 1988, 140:3751-3757.
30. Baecher CM, Infante AJ, Semcheski KL, Frelinger JG. Identification and characterization of a mouse cell surface antigen with alternative molecular forms. *Immunogenetics* 1988, 28:295-302.
31. Barclay AN, Jackson DI, Willis AC, Williams AF. Lymphocyte specific heterogeneity in the rat leucocyte common antigen (T200) is due to differences in polypeptide sequences near the NH₂-terminus. *EMBO J* 1987, 6:1259-1264.

Table I. Purification protein of ALL thymocyte-receptor*

Fraction	mg	% Yield
Total cell lysate	200	100.0
F-I (unretained)	164	82.0
F-II (GalNAc-eluted)	0.2	0.1

* Data obtained from 1×10^7 thymocytes.

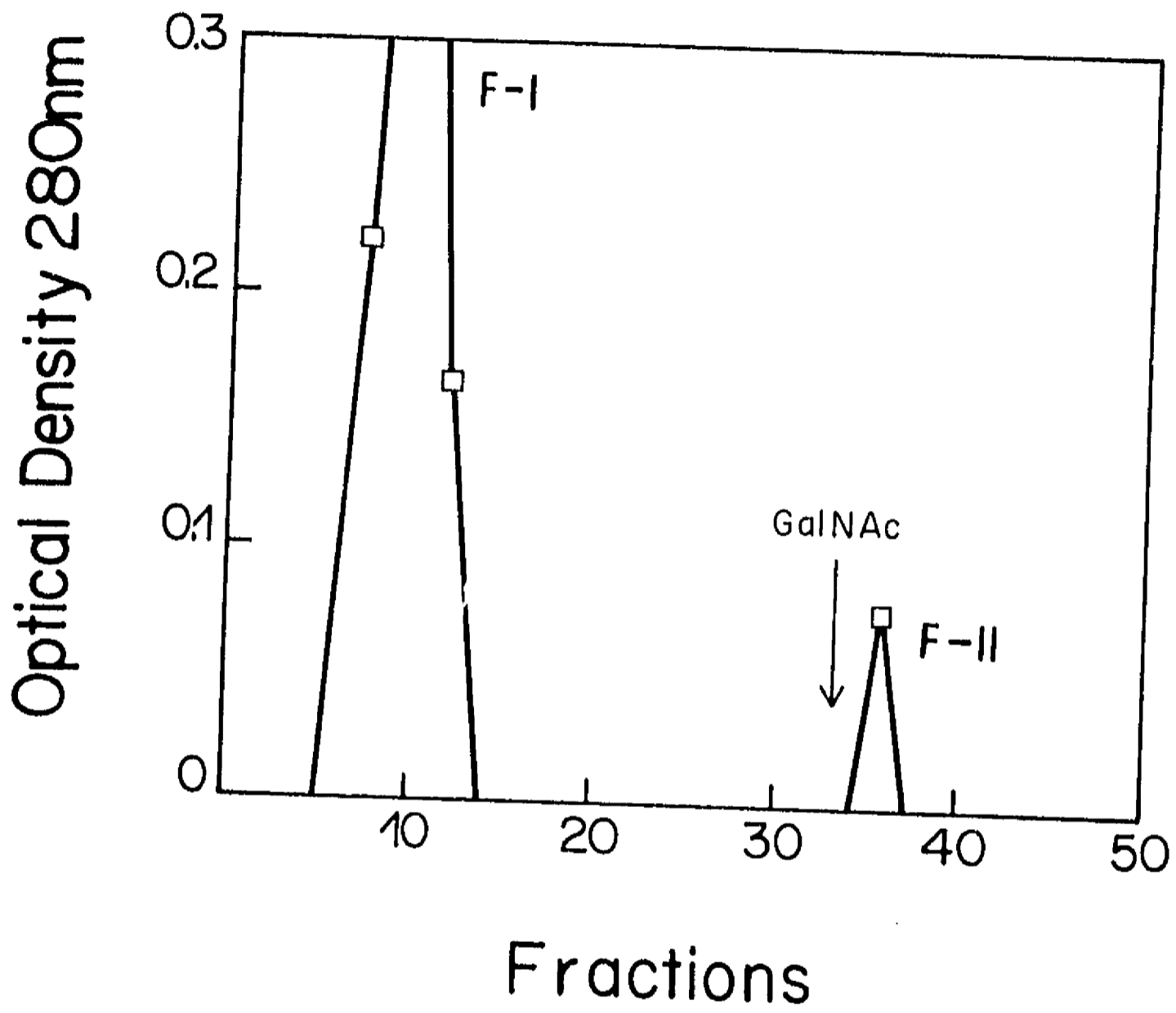
Table II. Carbohydrate composition of ALL-thymocyte receptor

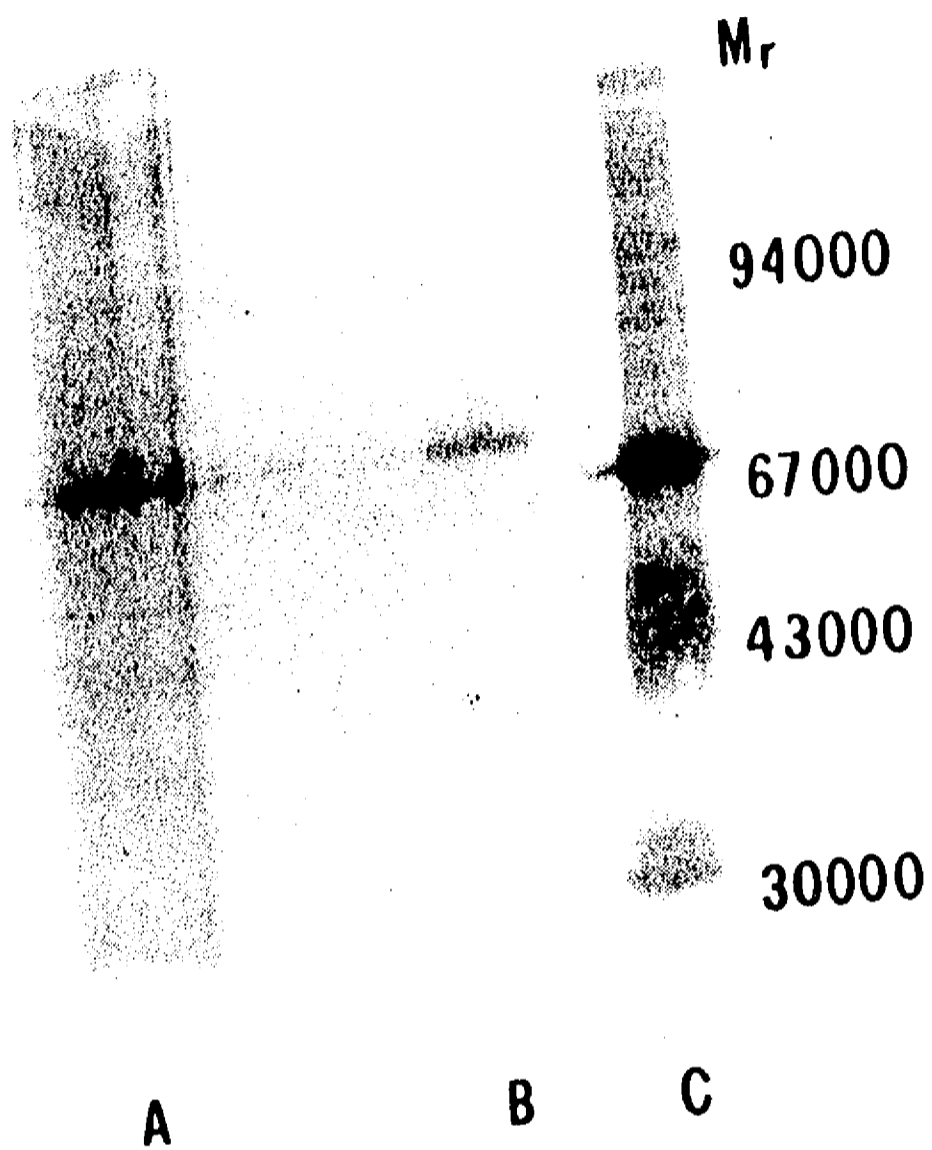
Sugar residue	Molar ratio
Fucose	0
Gal	1
GalNAc	3
Glc	0
GlcNAc	traces
Mannose	traces
NeuAc	0

Footnotes

Figure 1. Affinity chromatography of murine thymocytes. The cells prior to lysis were incubated with biotin-labelled ALL, then the complex was purified on an avidin-agarose column. F-I, unretained fraction eluted with PBS; F-II, fraction desorbed by addition of 0.2 M GalNAc or 0.1 M glycine/HCl, pH 2.5, buffer.

Figure 2. SDS-PAGE of the affinity purified *Amaranthus leucocarpus* thymocyte receptor. Unretained fraction (line A), purified fraction eluted with 0.2 M GalNAc (line B). M_r standards: phosphorylase B, 94000; albumin, 67000; ovalbumin, 43000; carbonic anhydrase, 30000; soybean trypsin inhibitor, 20100 and lysozyme, 14400 (line C).





CAPITULO VI
APLICACION DE LA LECTINA *AMARANTHUS LEUCOCARPUS*
PARA EL ESTUDIO DE LINFOCITOS HUMANOS

INTRODUCCION

Con el descubrimiento de la mediación de los carbohidratos en las interacciones celulares, este campo de investigación ha cobrado gran importancia para la Biología Celular, la Fisiología Celular y la Inmunología^(5,19). Primero, porque los estudios sobre la función de moléculas de superficie de células inmunitarias han mostrado que los oligosacáridos de diversas glicoproteínas participan en las interacciones celulares a nivel de ligando con el receptor^(7-11,23-25,52-54). Segundo, porque la expresión diferencial de estructuras sacarídicas en la superficie celular está aparentemente asociada con la diversidad funcional⁽⁵⁰⁾ y con los distintos estadios de desarrollo y de diferenciación celular de los tejidos^(5,17). Tercero, porque en las células anormales se altera la expresión de carbohidratos de superficie celular con respecto a las células circunvecinas⁽¹⁷⁾. En este sentido el uso de las lectinas como herramientas para el análisis de glicoconjugados fenotípicos de subpoblaciones celulares ha sido útil, sin embargo, no se han explotado lo suficiente para el estudio de estados patológicos.

Recientemente, hemos demostrado que la lectina de *Amaranthus leucocarpus* (ALL), que reconoce específicamente a la molécula GalNAc de los antígenos T y T_n, posee la capacidad de interactuar con linfocitos localizados en la médula tímica de ratón. Por otra parte se ha demostrado que en enfermedades infecciosas crónicas, aumenta en circulación sanguínea el número de células linfoides inmaduras. Debido a lo anterior, consideramos importante determinar si la lectina de amaranto puede ser útil para detectar marcadores fenotípicos en células que posiblemente presentan modificaciones en el patrón de glicosilación durante un proceso infeccioso crónico.

RESULTADOS Y DISCUSION

Se obtuvieron 20 ml de sangre venosa humana de 9 voluntarios clínicamente sanos. Las células mononucleadas de la sangre venosa fueron separadas del paquete eritrocitario por centrifugación a 1,750 rpm en Ficoll hypaque (1.077 de densidad), durante 30 minutos a 4°C. Una vez separadas, las células se cuantificaron en un hemocitómetro y se fraccionaron en dos grupos. Uno de ellos, que comprendía el 20% de la población total de células, fue utilizado como testigo; y el segundo grupo que contenía el 80% de células restantes, fue incubado durante

30 minutos a temperatura ambiente, con una concentración óptima de ALL (1.0 $\mu\text{g}/10^6$ células). Posteriormente, las células que se incubaron con ALL, se aplicaron en una solución de albúmina sérica bovina al 7% en PBS, obteniéndose a su vez, una subpoblación de células ALL⁻ y otra de células ALL⁺ (aglutinadas por la lectina) que se aislaron por sedimentación. Las fracciones celulares obtenidas, se incubaron después con GalNAc 0.2 M durante 15 min, se lavaron con PBS y se cuantificaron finalmente en un hemocitómetro.

Para determinar el fenotipo de las subpoblaciones celulares se incubaron por separado, aproximadamente 3×10^5 células en cada caso, con distintos anticuerpos monoclonales murinos contra marcadores de superficie de linfocitos humanos (CD2, CD3, CD4, CD8, CD19, etc.). Una segunda incubación fue realizada con anticuerpos contra IgG murina conjugados a un fluorocromo (fluoresceína, ficoeritrina o rodamina). Finalmente, las células fluorescentes se cuantificaron en un microscopio equipado con epifluorescencia.

Los resultados mostraron que por cada mililitro de sangre, se obtuvieron $1-2 \times 10^6$ células mononucleadas, siendo de 3 a 4 el porcentaje de células ALL⁺. En cuanto a la inmunofluorescencia, en el cuadro A se muestran los porcentajes de células ALL⁺, ALL⁻ y células testigo que expresaron los diferentes marcadores fenotípicos analizados así como la relación entre el número de células CD4⁺ y CD8⁺.

Cuadro A. Porcentajes de marcadores fenotípicos de células mononucleadas humanas (células testigo) y de las que se incubaron con la lectina de amaranto y que fueron separadas en células aglutinadas (ALL⁺) así como en células que no aglutinaron (ALL⁻).

	Células Testigo	Células ALL ⁺	Células ALL ⁻
CD1a	18.3 ± 12	24.2 ± 19	16.2 ± 7.0
CD2	51.5 ± 16	61.8 ± 18	67.5 ± 15
CD3	72.1 ± 3.5	60.0 ± 3.2	71.5 ± 0.7
CD4	60.5 ± 5.0	67.9 ± 6.2	50.4 ± 7.6
CD8	33.1 ± 9.0	22.0 ± 4.3	36.1 ± 6.4
CD19	2.3 ± 1.0	0.2 ± 1.3	4.7 ± 1.6
Relación CD4/CD8	1.83 ± 0.7	3.05 ± 0.28	1.43 ± 0.5

Media ± desviación estándar

Estos resultados mostraron que dentro de las células ALL⁺ hay un ligero predominio de linfocitos T CD4⁺, lo cual se refleja en la relación con CD8, aunque no es estadísticamente significativo. Por otra parte, en un ensayo de doble marcaje se incubaron las células mononucleadas humanas con ALL-FITC (dosis subaglutinante de 0.05 µg/10⁶ células) y en una segunda incubación se utilizaron anticuerpos monoclonales murinos anti-CD45RA o anti-CD45RO por separado. La tercera incubación consistió en adicionar anticuerpos contra IgG murina conjugados a ficoeritrina. El análisis en un citofluorómetro mostró que en un individuo adulto clínicamente sano, el 1% de linfocitos de sangre venosa fueron ALL⁺ y CD45RA⁺, lo cual sugiere que son células que se encuentran en las etapas finales de maduración o que son células maduras vírgenes. Este porcentaje de células amaranto positivas es mas bajo que el observado en el microscopio de

epifluorescencia, la razón se debe a que se estrechó la ventana de lectura en el citofluorómetro con la finalidad de registrar sólo linfocitos con fluorescencia intensa. No obstante, el resultado indica que ALL reconoce a linfocitos vírgenes, los cuales poseen una glicoproteína de superficie portadora de antígenos T.

La presencia de antígenos T en la superficie de diversas células ha sido asociada frecuentemente con inmadurez celular, o con casos de alteraciones en la glicosilación propiciadas por diversos procesos neoplásicos⁽¹⁷⁾. Sin embargo, no se ha descrito hasta el momento la asociación del antígeno T con enfermedades infecciosas que tienden a hacerse crónicas, en las que aumenta la cantidad de células linfoides inmaduras en la circulación sanguínea y se propicia la supresión de la respuesta inmunitaria como ocurre con la leishmaniasis, la brucelosis, la tuberculosis y la lepra. En este sentido, ALL puede ser una herramienta muy útil para: a) detectar alteraciones en el número de células inmaduras asociadas a enfermedades infecciosas crónicas, b) aislar y caracterizar fenotípica y funcionalmente a dichas subpoblaciones celulares y, c) poder disecar de manera mas fina los procesos involucrados en la inmunosupresión.

Con la finalidad de explorar el efecto biológico *in vitro* de ALL en la actividad celular de linfocitos humanos sobre todo de individuos inmunosuprimidos, se realizaron ensayos de mitogenicidad.

Se obtuvieron células mononucleadas de sangre venosa de pacientes con tuberculosis pulmonar activa tanto reactivos y no reactivos a la inoculación intradérmica de tuberculina (proteína purificada derivada de *Mycobacterium tuberculosis*, PPD). Se utilizaron microplacas de cultivo de 96 pozos y por cada pozo se colocaron 2×10^5 células en 0.2 ml de medio de cultivo RPMI-1640 suplementado con suero fetal de ternera al 10%. Los cultivos celulares fueron mantenidos durante 72 horas a 37°C en atmósfera de CO₂ al 5% en presencia de la cantidad óptima (previa titulación) de cada una de las siguientes lectinas de: *Phaseolus vulgaris* (fitohemaglutinina, PHA), *Canavalia ensiformis* (concanavalina A, Con A), *Arachis hypogaea* (PNA) y *Amaranthus leucocarpus* (ALL), o de PPD. Cabe mencionar que se usó la lectina PNA porque es específica del antígeno T. Dieciocho horas antes de finalizar la incubación, a los cultivos se les adicionó 1 μ Ci de timidina ³H, y la radioactividad incorporada en el ácido desoxirribonucleico fue medida en un Contador de centelleo. Los resultados (cuadro B) mostraron que las células mononucleadas de los pacientes con tuberculosis y PPD⁺ responden a la estimulación mitogénica de PHA, Con A y PPD al igual que las células de individuos sanos. En cambio, como se esperaba, las células de los pacientes con tuberculosis y PPD⁻ mostraron una respuesta deficiente a la estimulación de PHA, Con A y PPD. La lectina PNA no indujo mitosis celular en ninguno de los cultivos celulares, mientras que ALL que fue ligeramente mitogénica para las células de los individuos sanos y de los pacientes PPD⁺ estimuló de manera significativa a las células de los pacientes PPD⁻. Estos resultados muestran que las células de los pacientes

tuberculosos anérgicos (PPD) tienen capacidad de respuesta clonal, brindando un nuevo campo de estudio que no ha sido suficientemente explorado.

Cuadro B. Actividad mitogénica de células mononucleadas de sangre venosa de pacientes tuberculosos, inducida con diferentes lectinas o con antígeno.

	Testigo sano	Tuberculosis pulmonar	
		PPD ⁺	PPD ⁻
Fondo	171 ± 96	252 ± 88	181 ± 77
PHA	39791 ± 1876	30639 ± 3611	11224 ± 2856
Con A	37092 ± 1634	25087 ± 1059	9087 ± 1775
PNA	516 ± 112	459 ± 38	225 ± 49
ALL	7662 ± 184	9182 ± 1353	26278 ± 3451
PPD	17718 ± 2138	24083 ± 2845	7181 ± 1040

Los resultados son expresados en cuentas por minuto (cpm) de timidina ³H incorporada en el cultivo celular.
Media ± error estándar

La mitosis celular inducida por las lectinas PHA y Con A es uno de los parámetros más utilizados para evaluar *in vitro* la respuesta inmunitaria celular. La estimulación se lleva a cabo porque PHA se une a las estructuras lactosamínicas de ambas cadenas del TCR, mientras que Con A se une a los complejos manosídicos y glucosídicos de las cadenas α del TCR, y γ del CD3⁽³⁰⁾. Por esto último, la respuesta mitogénica deficiente de las células mononucleadas de los pacientes anérgicos ante la estimulación de PHA o Con A permite sugerir que ha

habido modificaciones en la glicosilación de los receptores antigénicos de los linfocitos T. Sin embargo, la anergia puede ser ocasionada por otros mecanismos, puesto que las células de los pacientes anérgicos también responden deficientemente al PPD. Más aún, la interacción de cualquiera de estas lectinas con los receptores de los linfocitos, no es suficiente para inducir la activación celular. Se requiere de la participación de los monocitos/macrófagos⁽⁵⁵⁾ con los cuales es indispensable la interacción bidireccional de receptores de superficie⁽⁵⁶⁻⁵⁸⁾ aunada a la estimulación sostenida y generada por receptores de citocinas como la IL-2 entre otras^(59,60).

La proliferación linfocitaria de las células de los pacientes anérgicos, inducida por ALL indica la presencia de O-glicoproteínas que son correceptores importantes para la activación celular y que en el caso de los anérgicos, posiblemente no están participando porque poseen cadenas sacarídicas propias de linfocitos inmaduros. Una glicoproteína que por sus características moleculares puede ser el receptor de ALL, es la leucosialina (CD43 o sialoforina). Esta molécula de superficie celular, está ampliamente distribuida en células linfoides⁽³⁹⁾, los carbohidratos constituyen el 50% de su masa molecular⁽⁶¹⁾, presenta 84 sitios para O-glicosilación⁽⁴³⁾, tiene diferentes patrones de glicosilación en distintos leucocitos⁽⁵⁰⁾, su disfunción está relacionada con la inmunodeficiencia particularmente en el síndrome de Wiskott-Aldrich^(62,63), y se ha encontrado que los anticuerpos monoclonales contra el CD43 (leucosialina) inducen transformación blastoide de linfocitos T humanos⁽⁴⁰⁾.

CAPITULO VII. PERSPECTIVAS

Si la lectina *Amaranthus leucocarpus* reconoce a una leucosialina, sialoforina o CD43, puede inducir transformación blastoide en los linfocitos T, al igual que lo hacen los anticuerpos anti-CD43⁽⁴⁰⁾. Los resultados obtenidos nos permiten suponer que la lectina de *Amaranthus leucocarpus* reconoce el perfil de glicosilación de una leucosialina propia de una subpoblación celular. Por lo tanto, el aumento en el número de células portadoras del receptor de ALL puede ser la razón por la cual se detecta la transformación blastoide en células de pacientes tuberculosos anérgicos. Algunos autores han reportado aumentos selectivos de ciertas subpoblaciones leucocitarias producidas en la infección micobacteriana. Toossi *et al* encuentran un ligero aumento de la subpoblación de linfocitos T $Fc\gamma R^+/CD16^+$ en los pacientes tuberculosos anérgicos, por lo que sugieren que la inmunosupresión se debe a la interferencia que ejerce dicha subpoblación aunado a factores secretados por monocitos⁽⁶⁵⁾. Havlir por su parte encuentra que los sobrenadantes de monocitos expuestos a micobacterias vivas, producen factores que inducen una proliferación selectiva de linfocitos T CD4-CD8/ γ - δ ⁽⁶⁶⁾. Asimismo, en una revisión reciente se sugiere que el aumento de monocitos inmaduros en circulación sanguínea contribuye a la inmunosupresión en virtud de que estas

células tienen disminuida la expresión de moléculas de histocompatibilidad de clase II y que la estimulación directa de los monocitos por antígeno micobacteriano produce liberación de factores supresores como el receptor de IL-2 soluble y el factor beta de crecimiento transformante (TGF- β)⁽³²⁾. Lo anterior apoya la posibilidad de un aumento en el número de células portadoras de la O-glicoproteína reconocida por ALL, es decir un aumento de linfocitos que están en las últimas etapas de maduración. La segunda posibilidad es que la cadena sacarídica de una leucosialina de los linfocitos, se encuentre modificada en virtud de factores secretados durante la infección. De cualquier manera, en ambas posibilidades el proceso de anergia podría atribuirse a una deficiente cooperación celular, puesto que se ha reportado que en el síndrome de Wiskott-Aldrich la composición anormal de oligosacáridos del CD43 puede ser la causa de la disfunción de los linfocitos T⁽⁶⁴⁾.

Por lo anterior, el aislamiento y caracterización del receptor de ALL permitirá esclarecer el papel que juegan los carbohidratos reconocidos por ALL y para establecer el estudio de las subpoblaciones linfocitarias de los enfermos tuberculosos anérgicos.

Perspectivas Inmediatas

- 1. Establecer la utilización de ALL como un importante reactivo biológico para el estudio de las poblaciones linfocitarias de pacientes tuberculosos anérgicos.**
- 2. Precisar la relación que existe entre la expresión del receptor de ALL y las situaciones celulares de inmunosupresión.**
- 3. Determinar el significado biológico del cambio en la expresión y configuración de determinados carbohidratos de superficie celular e integrar el conocimiento con respecto a deficiencias en la cooperación celular que contribuyen al fenómeno anérgico.**
- 4. Esclarecer el papel de las estructuras O- y N-glicosídicas en la comunicación celular.**

CONCLUSIONES

1. La lectina *Amaranthus leucocarpus* reconoce a la N-acetil-D-glucosamina presente en el antígeno de Thomsen-Friedenreich o antígeno T (Gal β 1 \rightarrow 3GalNac α 1 \rightarrow 0-Ser/Thr) y en el antígeno T_n (GalNac α 1 \rightarrow 0-Ser/Thr) de proteínas O-glicosiladas.
2. Con la lectina de *Amaranthus leucocarpus* se puede aislar una subpoblación de timocitos que se localizan en la médula tímica murina y que posiblemente se encuentran en las últimas etapas de maduración. Esto genera la oportunidad de estudiar sus interrelaciones con el microambiente tímico.
3. El receptor de *Amaranthus leucocarpus* en el timocito murino es una glicoproteína de 70 kDa que posee N-acetil-D-galactosamina y galactosa. Los ensayos de competencia con anticuerpos anti-CD43 permiten sugerir que el receptor de ALL es un precursor de la leucosialina.
4. Con la lectina de *Amaranthus leucocarpus* también se aísla a una pequeña subpoblación de linfocitos de sangre venosa humana de individuos clínicamente sanos cuyo fenotipo es predominantemente CD4⁺CD8⁻ y característicamente CD45RA⁺.

- 5. La mitogenicidad de células mononucleadas de pacientes tuberculosos anérgicos inducida por la lectina de *Amaranthus leucocarpus* plantea dos posibilidades; que por la infección micobacteriana aumente el número de células vírgenes inmaduras o que los linfocitos expresen modificaciones sacarídicas en sus leucosialinas.**
- 6. Que la presencia de células amaranto positivas en pacientes tuberculosos anérgicos, contribuya concomitantemente con otros factores a una deficiente cooperación celular.**
- 7. La lectina abre una perspectiva interesante para el estudio de los mecanismos de la anergia celular observada en el curso de la tuberculosis.**

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

REFERENCIAS

1. Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K and Watson JD eds. **Molecular Biology of The Cell**. 3rd ed. Garland Publishing, Inc. New York and London 1994.
2. Stryer L. **Bioquímica** 3a edición Ed. Reverté S.A. Barcelona 1990
3. Muraoka S and Shulman MJ. Structural requirements for IgM assembly and cytolytic activity. Effects of mutations in the oligosaccharide acceptor site at Asn402. **J Immunol** 1989, 142(2):695-701.
4. Tiff CJ, Proia RL, and Camerini-Otero RD. The folding and cell surface expression of CD4 requires glycosylation. **J Biol Chem** 1992, 267(5):3268-3273.
5. Sharon N and Lis H. Carbohydrates in cell recognition. **Sci Am (USA)** 1993, 268(1):74-81
6. Roitt I, Brostoff J and Male D, eds. **Immunology** 3rd edn. Mosby-Year Book Europe Ltd, London 1993
7. Rosen SD. Cell surface lectins in the immune system. **Seminars in Immunology** 1993, 5:237-247.
8. Gearing AJH and Newman W. Circulating adhesion molecules in disease. **Immunology Today** 1993, 14(10):506-512.
9. Lasky LA. Selectins: interpreters of cell-specific carbohydrate information during inflammation. **Science** 1992, 258:964-969.

10. Taylor ME, Conary JT, Lennatz MR, Stahl PD, Drickamer K. Primary structure of the mannose receptor contains multiple motifs resembling carbohydrate recognition domains. *J Biol Chem* 1990, 265:12156-12162.
11. Ezekowitz RAB, Sastry K, Bailly P, Warner A. Molecular characterization of the human macrophage mannose receptor: demonstration of multiple carbohydrate recognition-like domains and phagocytosis of yeast in Cos-1 cells. *J Exp Med* 1990, 172:1785-1794.
12. Male D, Champion B, Cooke A and Owen M eds. *Advanced Immunology* 2nd edn. pp. 7.9-7.15 Ed. Gower Medical Publishing, London 1991
13. Reisner Y, Linker-Israeli M and Sharon N. Separation of mouse thymocytes into two subpopulations by the use of peanut agglutinin. *Cell Immunol* 1976, 25:129-134.
14. Pereira MEA, Kabat EA, Lotan R and Sharon N. Immunochemical studies on the specificity of the peanut (*Arachis hypogaea*) agglutinin. *Carbohydr Res* 1976, 51:107-118.
15. Swamy MJ, Gupta D, Mahanta SK and Surolata A. Further characterization of the saccharide specificity of peanut (*Arachis hypogaea*) agglutinin. *Carbohydr Res* 1991, 213:59-62
16. Piller F, Piller V, Fox RI and Fukuda M. Human T-lymphocyte activation is associated with changes in O-glycans biosynthesis. *J Biol Chem* 1988, 263(29):15146-15150.

17. Singhal A and Hakomori S. Molecular changes in carbohydrate antigens associated with cancer. *BioEssays* 1990, 12(5):223-230.
18. Feizi T. Monoclonal antibodies reveal saccharide structures of glycoproteins and glycolipids as differentiation and tumour-associated antigens. *Bioch Soc Transac* 1984, 12:545-549
19. Sharon N and Lis H. Lectins as cell recognition molecules. *Science* 1989, 246:227-234.
20. Zanetta J-P, Kuchler S, Lehmann S, Badache A, Maschke S, Thomas D, Dufourcq P and Vincendon G. Glycoproteins and lectins in cell adhesion and cell recognition processes. *Histochemical J* 1992, 24:791-804.
21. Picker LJ and Butcher EC. Physiological and molecular mechanisms of lymphocytes homing. *Annu Rev Immunol* 1992, 10:561-591.
22. Horejsí V. Bazil V. Review /Article. Surface proteins and glycoproteins of human leucocytes. *Biochem J* 1988, 253:1-26.
23. Crocker PR, Kelm S, Dubois C, Martin B, McWilliams AS, Shotton DM, Paulson JC, Gordon S. Purification and properties of sialoadhesin, a sialic acid-binding receptor of murine tissue macrophages. *EMBO J* 1991, 10:1661-1669
24. Van den Berg TK, Brevé JJP, Damoiseaux JGMC, Döpp EA, Kelm S, Crocker PR, Dijkstra CD, Kraal G. Sialoadhesin on macrophages: its identification as a lymphocyte adhesion molecule. *J Exp Med* 1992, 176:647-655.

25. Aruffo A, Kanner SB, Sgroi D, Ledbetter JA, Stamenkovic I. CD22-mediated stimulation of T cells regulates T-cell receptor/CD3-induced signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992, 89:10242-10246.
26. Kelm S, Pelz A, Schauer R, Filbin MT, Tang S, de Bellard ME, Schaar RL, Mahoney JA, Hartnell A, Bradfield P and Crocker PR. Sialoadhesin, myelin-associated glycoprotein and CD22 define a new family of sialic acid-dependent adhesion molecules of the immunoglobulin superfamily. *Curr Biol* 1994, 4(11):965-972
27. Engel P, Nojima Y, Rothstein D, Zhou LJ, Wilson GL, Kehri JH, Tedder TF. The same epitope on CD22 of B-lymphocyte mediates the adhesion of erythrocytes, T-lymphocytes and B-lymphocytes, neutrophils, and monocytes. *J Immunol* 1993, 150:4719-4732
28. Stamenkovic I, Sgroi D, Aruffo A, Sy MS, Anderson T. The B lymphocyte adhesion molecule CD22 interacts with leukocyte common antigen CD45RO on T cells and alpha 2-6 sialyltransferase, CD75, on B cells. *Cell* 1991, 66:1133-1144.
29. Powell LD, Sgroi D, Sjoberg ER, Stamenkovic I, Varki A. Natural ligands of the B-cell adhesion molecule CD22-b carry N-linked oligosaccharides with a2,6-linked sialic acids that are required for recognition. *J Biol Chem* 1993, 268:7019-7027

30. Licastro F, Davis LJ and Morini MC. Lectins and superantigens: membrane interactions of these compounds with T lymphocytes affect immune responses. *Int J Biochem* 1993, 25(6):845-852.
31. Johnson HM, Russell JK and Pontzer CH. Superantigens in human disease. *Sci Am* 1992, 266(4):42-73
32. Ellner JJ. Regulación de la respuesta inmune celular frente a *Mycobacterium tuberculosis*. El mecanismo de depresión selectiva de la respuesta al PPD. *Bol Unión Int Tuberc Enf Resp* 1991, 66:141-146.
33. Zenteno E, Ochoa JL, Parra C, Montaña LF, Rayón I, Maldonado G, Ruíz B and Carbajal R. Mitogenic immunosuppressive and phagocytic activity of *Machaerocereus eruca* and *Amaranthus leucocarpus* lectins. In: *Lectins- Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry*. Bög-Hansen TC and Breborowicz J, eds. Walter de Gruyter, Berlin 1985, 4:537-546.
34. Zenteno E and Ochoa JL. Isolation and purification of *Amaranthus leucocarpus* lectin on stroma column. *Phytochemistry* 1988, 27:313-317.
35. Petryniak J, Petryniak B, Wasniowska K, Krotkiewski H. Isolation and immunochemical characterization of the *Euonymus europaeus* lectina receptor from the major sialoglycoprotein of human O erythrocytes. *Eur J Biochem* 1980, 105(2):335-341.
36. Tomita M, Furthmayr H, Marchesi VT. Primary structure of human erythrocyte glycophorin A. Isolation and characterization of peptides and complete amino acid sequence. *Biochemistry* 1978, 17:4756-4770.

37. De Maio A, Lis H, Gershoni JM and Sharon N. Identification of glycoproteins that are receptors for peanut agglutinin on immature (cortical) mouse thymocytes. *FEBS Letters* 1986, 194:28-32.
38. Bhavanandan VP, Umemoto J, Banks JR and Davidson EA. Isolation and partial characterization of sialoglycopeptides produced by a murine melanoma. *Biochemistry* 1977, 16:4426-4437.
39. Carlsson SR and Fukuda M. Isolation and characterization of leukosialin, a major sialoglycoprotein on human leukocytes. *J Biol Chem* 1986, 261:12779-12786.
40. Mentzer SJ, Remold-O'Donnell E, Crimmins MAV, Bierer BE, Rosen FS and Burakoff SJ. Sialophorin, a surface sialoglycoprotein defective in the Wiskott-Aldrich syndrome, is involved in human T lymphocyte proliferation. *J Exp Med* 1987, 165:1383-1392.
41. Borche L, Lozano F, Vilella R and Vives J. CD43 monoclonal antibodies recognize the large sialoglycoprotein of human leukocytes. *Eur J Immunol* 1987, 17:1523-1526.
42. Novogrodsky A, Lotan R, Ravid A and Sharon N. Peanut agglutinin, a new mitogen that binds to galactosyl sites exposed after neuraminidase treatment. *J Immunol* 1975, 115:1243-1248.

43. Shelley CS, Remold-O'Donnell E, Davis III AE, Bruns GAP, Rosen FS, Carroll MC and Whitehead AS. Molecular characterization of sialophorin (CD43), the lymphocyte surface sialoglycoprotein defective in Wiskott-Aldrich syndrome. Proc Natl Acad Sci USA 1989, 86:2819-2823.
44. Buckie JW and Cook GMW. Specific isolation of surface glycoproteins from intact cells by biotinylated concanavalin A and immobilized streptavidin. Anal Biochem 1986, 156:463-472.
45. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during assembly of the bacteriophage T4. Nature 1970, 227:680-672.
46. Switzer RC, Merril CR, and Shifrin S. A highly sensitive silver stain for detecting proteins and peptides in polyacrylamide gels. Anal Biochem 1979, 98(1):231-237.
47. Towbin H, Staehelin T and Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc Natl Acad Sci USA 1979, 76:4350-4354.
48. De Petris S and Tackacs B. Relationship between mouse lymphocyte receptors for peanut agglutinin (PNA) and *Helix pomatia* agglutinin (HPA). Eur J Immunol 1983, 13(10):831-840.

49. Piller V, Piller F and Fukuda M. Biosynthesis of truncated O-glycans in the T cell line Jurkat. Localization of O-glycan initiation. J Biol Chem 1990, 265(16):9264-9271.
50. Carlsson SR, Sasaki H and Fukuda M. Structural variations of O-linked oligosaccharides present in leukosialin isolated from erythroid, myeloid and T-lymphoid cells lines. J Biol Chem 1986, 261(27):12787-12795.
51. Fukuda M, Fukuda MN, Papayannopoulou T and Hakomori S. Membrane differentiation in human erythroid cells: unique profiles of cell surface glycoproteins expressed in erythroblasts *in vitro* from three ontogenic stages. Proc Natl Acad Sci USA 1980, 77(6):3474-3478.
52. Luo W, Van de Velde H, Von HI, Parnes JR, Thielemans K. Ly-1 (CD5), a membrane glycoprotein of mouse T lymphocytes and a subset of B cells, is a natural ligand of the B cell surface protein Lyb-2 (CD72). J Immunol 1992, 148:1630-1634.
53. Aubry JP, Pochon S, Graber P, Jansen KU, Bonnefoy JY. CD21 is a ligand for CD23 and regulates IgE production. Nature 1992, 358:505-507.
54. Amin AR, Tamma SM, Oppenheim JD, Finkelman FD, Kieda C, Coico RF, Thorbecke GJ. Specificity of the murine IgD receptor on T cells is for N-linked glycans on IgD molecules. Proc Natl Acad Sci USA 1991, 88:9238-9243.
55. de Vries JE, Caviles AP Jr, Bont WS and Mendelsohn J. The role of monocytes in human lymphocyte activation by mitogens. J Immunol 1979, 122:1099-1107

56. van Seventer GA, Shimizu Y and Shaw S. Roles of multiple accessory molecules in T-cell activation. *Curr Opin Immunol* 1991, 3:294-303.
57. Arnaiz-Villena A, Timón M, Rodríguez-Gallego C, Pérez-Blas M, Corell A, Martín-Villa JM and Regueiro JR. Human T-cell activation deficiencies. *Immunology Today* 1992, 13(7):259-265.
58. Geppert TD, Davis LS, Gur H, Wacholtz MC and Lipsky PE. Accessory cell signals involved in T-cell activation. *Immunol Rev* 1990, 117:1-66.
59. Webb DS, Shimizu Y, van Seventer GA, Shaw S and Gerrard TL. LFA-3, CD44, and CD45: physiologic triggers of human monocyte TNF and IL-1 release. *Science* 1990, 249:1295-1297
60. Nash PV and Mastro AM. Activation of primary lymphocytes requires prolonged lectin stimulation. *J Leukocyte Biology* 1993, 53:73-78.
61. Remold-O'Donnell E, Davis III AE, Kenney DM, Bhaskar KR and Rosen FS. Purification and chemical composition of gpL115, the human lymphocyte surface sialoglycoprotein that is defective in Wiskott-Aldrich syndrome. *J Biol Chem* 1986, 261(16):7526-7530.
62. Parkman R, Remold-O'Donnell E, Kenney DM, Perrine S and Rosen FS. Surface protein abnormalities in lymphocytes and platelets from patients with Wiskott-Aldrich syndrome. *Lancet* 1981, 2(8260-8261):1387-1389.

63. Remold-O'Donnell E, Kenney DM, Parkman R, Cairns L, Savage B and Rosen FS. Characterization of a human lymphocyte surface sialoglycoprotein that is defective in Wiskott-Aldrich syndrome. *J Exp Med* 1984, 159(6):1705-1723.
64. Piller F, Le Deist F, Weinberg KI, Parkman R and Fukuda M. Altered O-glycan synthesis in lymphocytes from patients with Wiskott-Aldrich syndrome. *J Exp Med* 1991, 173(6):1501-1510.
65. Toossi Z, Edmonds KL, Tomford JW and Ellner JJ. Suppression of purified protein derivative-induced interleukin-2 production by interaction of CD16 (Leu 11 reactive) lymphocytes and adherent mononuclear cells in tuberculosis. *J Infect Dis* 1989, 159:352-356.
66. Havlir DV, Ellner JJ, Chervenak KA and Boom WH. Selective expansion of human γ/δ T-cells by monocytes infected with live *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Invest* 1991, 87:729-733.