

11261

17
203.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

Relevancia de la población celular reconocida
por la lectina de *Amaranthus leucocarpus*
en la respuesta inmune

T E S I S

Que para obtener el grado de
MAESTRIA EN CIENCIAS BIOMEDICAS

INMUNOLOGÍA

presenta

FLOR DE MARIA ROSANA PORRAS ORTA

Ciudad Universitaria, México. D.F., marzo de 1998

259922

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 esta 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.

Agradecimientos

Gracias a todos los compañeros y amigos del laboratorio de Inmunoquímica del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina, UNAM, por compartir las horas de trabajo conmigo, y por sus valiosos consejos. En especial agradezco el apoyo que recibí por parte de los Dres. Edgar Zenteno, Raúl Chávez y Ricardo Lascuraín.

Agradezco el apoyo del Dr. Pablo Hernández Jauregui del Centro de Investigación Biomédica de Oriente del IMSS, Puebla y al CONACyT por su apoyo con una beca para la realización de este trabajo.

Agradezco sus sugerencias para el mejoramiento de esta tesis, a los Drs. Luis Felipe Montaña Estrada, Leopoldo Santos Argumedo, Edgar Zenteno Galindo, Ricardo Lascuraín Ledesma e Iris Estrada Parra.

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Inmunoquímica del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina, UNAM bajo la asesoría del Dr Edgar Zenteno Galindo y la coasesoría del Dr. Raúl Chávez Sánchez.

Este proyecto fue financiado por CONACyT (1595P-M) y DGAPA IN211396.

A mi papá y mi mamá con todo mi cariño y agradecimiento por todo lo que me enseñaron.

A todos mis hermanos, Isabel, César Daniel y Dulce.

A mi familia ampliada: Arturo y Meli, Otto, Gabi y el pequeño Samuel, Mónica y Mario, Gabriela, David Alberto y Bruno.

Al mejor de todos los tíos, mi tío Carlitos.

A la memoria de mis amados abuelos, José y Josefina, que nunca olvidaré.

A mi compañero Sergio, por todo lo compartido, con todo mi amor.

INDICE

PAGINA

I. RESUMEN

1

II. INTRODUCCION

3

III. ANTECEDENTES

14

IV. HIPOTESIS

16

V. OBJETIVOS

16

VI. MATERIAL Y METODOS

17

VII. RESULTADOS

28

VIII. DISCUSION

44

IX. CONCLUSIONES

53

X. REFERENCIAS

54

I. RESUMEN

Los procesos de glicosilación son eventos postraduccionales que modifican las proteínas de membrana. Los carbohidratos participan activamente en la interacción celular y su expresión es regulada específicamente por las glicosiltransferasas. Utilizando lectinas se ha identificado la función de diversas estructuras N-glicosídicas de diversos grupos celulares, sin embargo la función de los O-glicanos queda aún por definir.

La lectina de *Amaranthus leucocarpus* (ALL) es específica para O-glicanos que contienen al disacárido Gal β 1,3GalNAc, por lo cual en este trabajo utilizamos esta lectina para identificar linfocitos y dilucidar la posible función de los receptores reconocidos por ella. Mediante ensayos de aglutinación diferencial con la lectina de *A. leucocarpus* identificamos que el 5.6%+0.9% de las células del timo murino son aglutinadas por la lectina. El 75% de los linfocitos reconocidos son CD3+ CD4+CD8-, lo que sugiere que la lectina reconoce una población de células en las últimas etapas de maduración.

El receptor para ALL fue purificado a partir de timocitos murinos por cromatografía de afinidad; se trata de una glicoproteína de 70 kDa, que contiene 30% de carbohidratos. Los azúcares más abundantes son GalNAc, Gal. y en menor proporción GlcNAc y manosa. La proteína se compone principalmente de serina, glicina, prolina y treonina y en menor proporción de arginina y metionina. El amino terminal de esta molécula se encuentra bloqueado, lo que sugiere que en efecto se trata de un receptor de membrana. Este receptor no presenta

reacción cruzada con los anticuerpos anti-CD43 y está constituido por diferentes isoformas, que se diferencian por el grado de glicosilación.

El peso molecular del receptor reconocido por ALL no coincide ni con CD45, ni con ninguna proteína O-glicosilada conocida. Nuestros resultados indican que el receptor para la lectina de ALL es diferente a los receptores O-glicosilados reportados previamente y sugieren su participación en los procesos de maduración de las poblaciones celulares.

II. INTRODUCCION

Cuando se pone en marcha la respuesta inmune específica, los diferentes tipos celulares ejercen diferentes funciones interactuando constantemente entre sí. De esta manera, las células presentadoras de antígeno presentan el complejo antígeno/molécula de histocompatibilidad clase II al receptor de la célula T (TCR), la cual es activada mediante esta señal, y algunas otras transmitidas por moléculas accesorias. El papel biológico de los linfocitos T en la respuesta inmune específica es fundamental ya que cuando son activados, en particular los linfocitos T cooperadores (T CD4+), regulan el funcionamiento de su propio linaje y el de otros tipos celulares como son los linfocitos B, para que proliferen, se diferencien y sinteticen anticuerpos, y el de los macrófagos para que aumenten su capacidad para procesar y eliminar moléculas o grupos celulares extraños. Esta regulación se realiza mediante contactos celulares o por medio de citocinas. Por su parte los linfocitos T citotóxicos lisan directamente a las células blanco, generalmente células infectadas por parásitos intracelulares o células tumorales. Es por esta razón que los linfocitos T son considerados las células centrales en la función y regulación del sistema inmune.

Tanto los linfocitos T cooperadores como los T citotóxicos que se encuentran en la sangre y en los tejidos provienen del timo que es el órgano linfoide donde se lleva a cabo su diferenciación y maduración. Los precursores de los linfocitos T, denominados timocitos, provienen a su vez de la médula ósea. Dentro del timo los linfocitos adquieren la capacidad para: reconocer fragmentos de antígeno presentados por las moléculas de histocompatibilidad del propio

individuo donde se desarrollan, y a no activarse frente a los tejidos de éste. En realidad este aprendizaje consiste en una selección de los timocitos que llevan adelante las interacciones adecuadas ya mencionadas. Menos del 5% de los timocitos sobreviven a esta selección. Son las células estromales, también denominadas células epiteliales, macrófagos y células dendríticas, las responsables de adiestrar a los timocitos; para ello cuentan con moléculas de histocompatibilidad clase I y II, con moléculas accesorias y con un amplio espectro de citocinas.

El papel de las moléculas accesorias en la activación de los linfocitos T

Se ha observado que, para que los linfocitos T cooperadores (T_h) sean activados y puedan llevar adelante la proliferación y sus funciones efectoras se requiere que reconozcan al antígeno presentado por las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad clase II (MHC II) que se encuentran en las células presentadoras de antígeno (APC). Sin embargo, actualmente se sabe que las señales transmitidas al interior de la célula a través del receptor del linfocito T (TCR), después de la unión con el complejo antígeno-MHC, no son suficientes para que la célula se active, sino que son necesarias otras señales que son generadas por otras moléculas de superficie presentes en el linfocito T cuando se unen a su ligando específico sobre la célula presentadora; además del papel que tienen estas proteínas en el aumento de la adhesión entre el linfocito T y la APC. Este fenómeno llevó a postular la hipótesis de "la segunda señal" (Bretscher y Cohn, 1970), la cual establece que es necesaria una segunda señal para que el linfocito T se active, además de la señal dada por el complejo TCR; de esta

manera en ausencia de esta segunda señal generada por moléculas accesorias como el B-7.1 o el B-7.2 (actualmente conocidas como CD80 y CD86 respectivamente), la estimulación del TCR induce a un estado de anergia en el cual la célula se encuentra viva pero no es capaz de realizar las funciones que usualmente se despliegan al activar a un linfocito T en forma adecuada (Jenkins y Schwartz, 1987; Quill y Schwartz, 1987). Este proceso solo puede realizarse en presencia de células de origen hematopoyético que posean moléculas de membrana que lo induzcan a proliferar y a producir IL-2.

En la actualidad se han identificado varias moléculas de superficie que están implicadas en la activación del linfocito T, mediante la producción de señales secundarias que actúan en concierto con las señales dadas por el TCR; estos marcadores son el CD28, CTLA-4, LFA-1, CD2, CD40L, y algunas otros; cuyos ligandos en células presentadores de antígeno son B7-1 y 2, para CD28 y CTLA-4, ICAM-1,2 y 3 para LFA-1, LFA-3 para CD2 y CD40 para CD40L (Dubey *et al.*, 1995; Damle *et al.*, 1993; Semnani *et al.*, 1994; Cayabyab *et al.* 1994; Freeman *et al.*, 1993a). Por otro lado, se ha observado que estas moléculas accesorias se expresan en diferentes momentos de la respuesta desarrollada por los linfocitos T, y de esta manera podrían estar contribuyendo a regularla y llevarla más allá de su inicio (Croft *et al.*, 1997).

Durante los procesos de diferenciación y maduración de los linfocitos T dentro del timo, en particular en la selección positiva y negativa, los timocitos requieren del reconocimiento del complejo péptido-MHC a través de su TCR; en este proceso no se ha establecido claramente la posible participación de

moléculas co-estimuladoras. Sin embargo, desde hace algunos años Page *et al* (1993) plantearon que debe existir una segunda señal para que se lleve a cabo exitosamente la selección negativa de los timocitos CD4+CD8+. Esta propuesta está apoyada por el hecho de que ambas señales, la transmitida por el TCR y la dependiente de células presentadoras de antígeno, son necesarias para inducir este fenómeno, y también en los estudios donde se observa que las células doble positivas (CD4+CD8+) expresan moléculas co-estimuladoras como CD2 (Bierer *et al.*, 1989), LFA-1 (Springer, 1990), VLA-4 (Sawada, *et al.*, 1992) y CD28 (Gross *et al.*, 1992).

Actualmente se tienen datos acerca de que la expresión del contra-receptor B7 está restringida a la médula tímica y está asociada a células epiteliales y dendríticas (Nelson *et al.*, 1993; Punt *et al.*, 1994) en tanto que ICAM-1 se encuentra en todo el timo y ambas moléculas participan en la eliminación de los timocitos dobles positivos *in vitro* (Kishimoto *et al.*, 1996). También se ha observado que CD40 se expresa en las células epiteliales y dendríticas en el timo y que al bloquear su interacción con gp39 (CD154) se previene la eliminación de timocitos que expresan ciertas cadenas V β , o bien que la pérdida de la función de gp39 permite la sobrevivencia de los timocitos auto-reactivos (Foy *et al.*, 1995).

En los años 70 se identificó que casi todas las células presentaban carbohidratos sobre su superficie en forma de glicoproteínas, glicolípidos y polisacáridos. De manera casi simultánea se observó también, el gran potencial que tienen los carbohidratos para codificar información por medio de su secuencia, su posición, la configuración de las unidades glicosídicas, y la

presencia de puntos de ramificación (Sharon y Lis, 1989). Ahora se sabe que muchas de las proteínas expresadas en la membrana celular están glicosiladas y cada vez se conoce un mayor número de glicoproteínas en las cuales su porción sacarídica tiene un papel importante en los fenómenos de reconocimiento e interacción celular (Sharon y Lis, 1989).

En estudios hechos por Reisner a mediados de los 70 (Reisner *et al.*, 1976a) se observó que durante la diferenciación de los linfocitos T existía una expresión decreciente de las cadenas sacarídicas de membrana reconocidas por la lectina específica para galactosa extraída del cacahuete (PNA). De ese momento a la fecha se ha observado que las modificaciones ocurridas en el perfil de glicosilación de los glicoconjugados de membrana tienen mucha influencia sobre los fenómenos de reconocimiento y adhesión intercelular en el timo, por lo cual se cree que participan en los fenómenos de migración y/o selección durante la diferenciación y maduración de los timocitos.

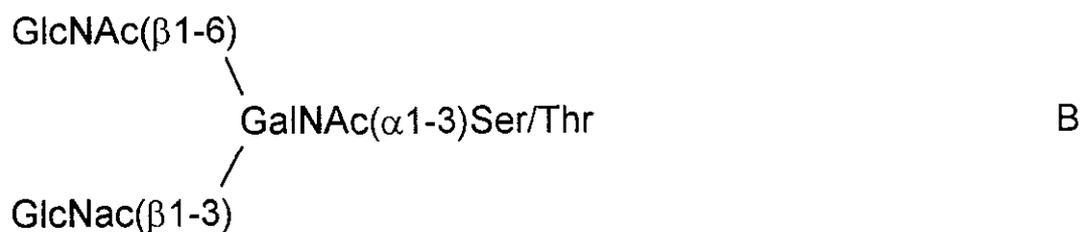
Presencia de estructuras O-glicosídicas en proteínas de membrana

La glicosilación de proteínas es un evento co-traducciona l que se presenta en el retículo endoplásmico, y también un evento terminal, que modifica los residuos de azúcar unidos a las proteínas en los diferentes niveles del aparato de Golgi. Este fenómeno juega un papel importante en el transporte y destino de las proteínas a las que se les añaden residuos sacarídicos, pero también se ha observado que tiene importancia por los oligosacáridos que finalmente quedan expresados en la superficie celular.

Las glicoproteínas son biopolímeros que contienen una o más cadenas de carbohidratos unidas al polipéptido. Las cadenas de carbohidratos se clasifican de acuerdo a la unión entre el azúcar y el aminoácido en: N- y O-glicanos. Los N-glicanos generalmente presentan una N-acetil-D-glucosamina unida a una asparagina y los O-glicanos poseen una N-acetil-D-galactosamina unida a una serina o una treonina de la cadena polipeptídica (Figura A); las enzimas encargadas de esta unión son proteínas unidas a membrana llamadas glicosiltransferasas presentes en retículo endoplásmico y aparato de Golgi. Los estudios hasta ahora realizados indican que es necesaria una glicosiltransferasa para cada unión diferente, y se han encontrado determinadas uniones que son hechas por más de una glicosiltransferasa. Muchas de las glicoproteínas hasta ahora estudiadas presentan N- y O-glicanos sobre la misma cadena polipeptídica (Schachter y Brockhausen, 1992).

La presencia de O-glicanos en glicoproteínas de membrana se debe a una modificación postraduccional de los grupos hidroxilo de los residuos de serina y treonina por la acción de las glicosiltransferasas. Las cadenas oligosacáridicas resultantes tienden a expresarse en grupo sobre tramos cortos de la cadena peptídica, por lo cual pueden presentar determinantes antigénicos o funcionales sacarídicos múltiples para el reconocimiento por anticuerpos, la adhesión celular y la unión de microorganismos (Hounsell *et al.*, 1996). Las estructuras O-glicosiladas han sido frecuentemente relacionadas con antígenos asociados a tumores; se ha visto que estas estructuras son expresadas en células menos diferenciadas en estadios tempranos del desarrollo, y que se suprime su

Gal(β 1-3)GalNAc(α 1-3)Ser/Thr A



Gal(β 1-3)Gal(β 1-4)Xyl(β 1-3)Ser C

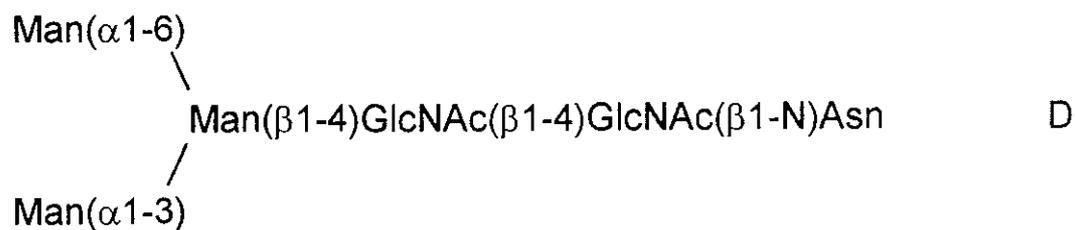


Figura A. Núcleos sacarídicos internos más comunes. A, B y C corresponden a O-glicanos, siendo las estructuras B y C las que se encuentran en O-glicoproteínas tipo mucina; el núcleo C constituye la secuencia terminal de casi todos los glicosaminoglicanos de los proteoglicanos. La estructura D es común en todas las N-glicoproteínas. (Tomado de Montreuil, J. en *Methods on Glycoconjugates*. Ed. André Verbert. Harwood Academic Publishers. Australia. Pags. 1-23).

expresión conforme progresa el desarrollo y la diferenciación (Fukuda, 1985; Feizi, 1985; Saitoh, *et al.*, 1991). También existen glicoproteínas con enlaces O-glicosídicos que son ligandos para selectinas (Shimizu y Shaw, 1993). Por otro lado, desde el punto de vista estructural, se ha observado que las proteínas que poseen dominios tipo mucina adoptan cierta conformación y rigidez, lo cual permite a los sitios activos de la proteína sobresalir del glicocálix (Jentoft, 1990) como es el caso del co-receptor CD8 (Leahy, 1992) o las glicoproteínas de superficie CD34, CD45, CD43, GlycCAM-1 y MadCAM-1 (Shimizu y Shaw, 1993).

Las cadenas O-glicosiladas presentes en glicoproteínas de membrana son aceptores de sialiltransferasas que unen residuos de ácido siálico en posición α 2-3 a la galactosa y/o α 2-6 a la N-acetil-D-galactosamina; dichas transferasas son la Gal β 1,3GalNAc α 2,3-sialiltransferasa (ST3Gal) y la GalNAc α 2,6-sialiltransferasa (ST3GalNAc) (Varki, 1997).

Una de las glicoproteínas expresadas más ampliamente en células pertenecientes al sistema inmune y donde se ha observado el papel que podrían jugar los O-glicanos en la comunicación celular, es la leucosialina, sialoforina o CD43. El peso molecular de esta proteína varía en el rango de 95-135 kDa debido a diferencias en su glicosilación (Fukuda, 1991). Esta proteína está densamente glicosilada principalmente por O-glicanos y una porción de éstos está unida a un dominio con repeticiones en serie en la cadena polipeptídica. La ramificación de los O-glicanos que se encuentran en la leucosialina puede variar de acuerdo al estado metabólico de la célula (Figura B), su maduración y en algunos estados patológicos como la leucemia y síndromes de inmunodeficiencia

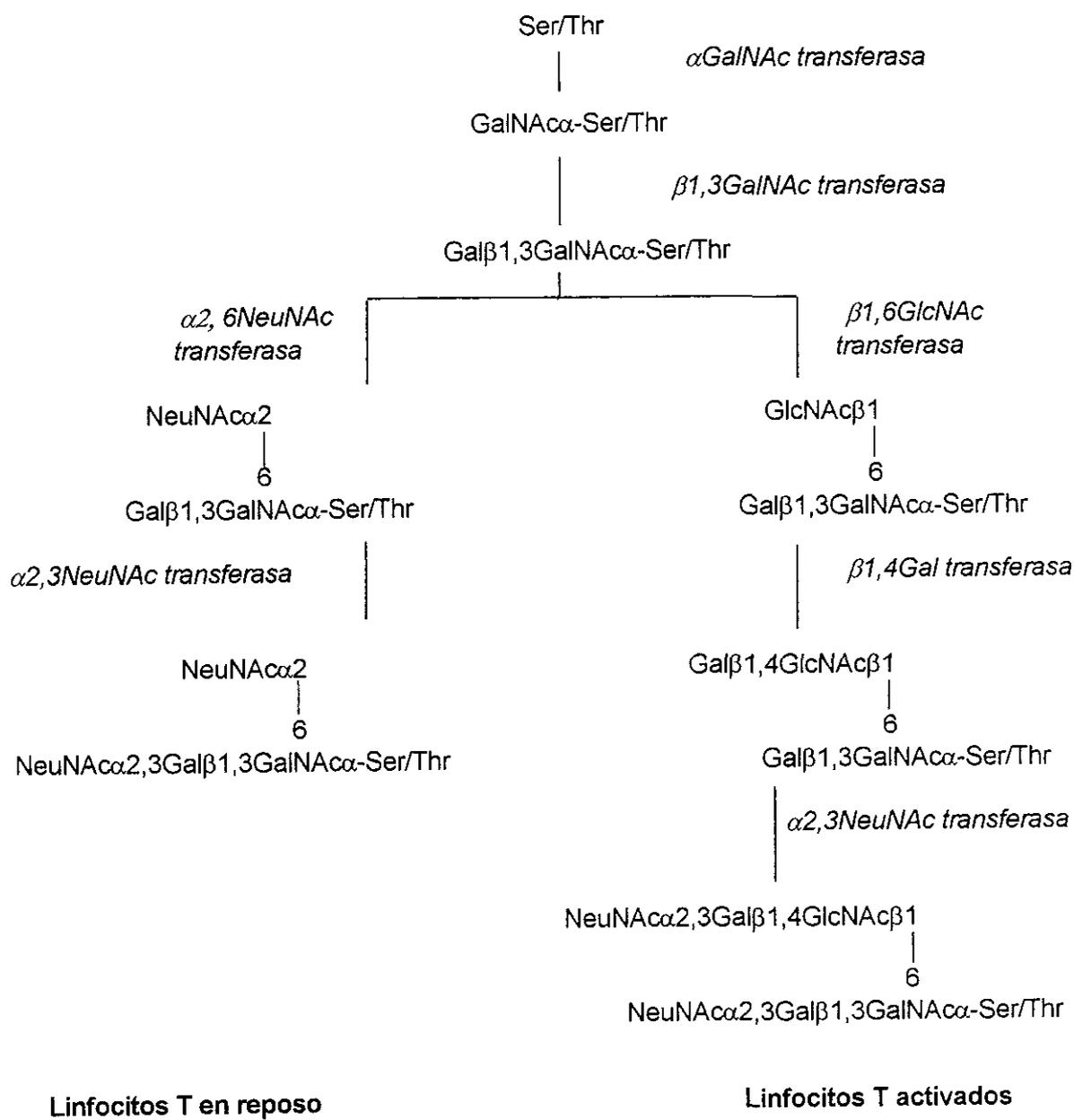


Figura B. Esquema que representa las modificaciones en la estructura oligosacáridica de la leucosialina de la superficie celular durante la activación de linfocitos T (figura tomada de Piller F, Piller V, *et al.* J. Biol. Chem. 1988, 263:15146-15150).

como el Wiskott-Aldrich. Un ejemplo de lo anterior es la presencia del hexasacárido NeuNAc α 2-3Gal β 1-3(NeuNAc α 2-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-6)GalNAc que se expresa en linfocitos T activados (Piller *et al.*, 1988), en timocitos y en linfocitos T de pacientes que padecen leucemia aguda (Saitoh *et al.*, 1991) o síndromes como el de Wiskott-Aldrich (Piller, *et al.*, 1991) o el SIDA (Lefebvre, 1994); y no está presente en linfocitos T en reposo, en donde el O-glicano expresado es el tetrasacárido NeuNAc α 2-3Gal β 1-3(NeuNAc α 2-6)GalNAc. Se cree que esta proteína está involucrada en la activación celular, ya que al tratar a las células con anticuerpos monoclonales contra ella se induce proliferación en presencia de monocitos (Axelsson *et al.*, 1988; Mentzer, *et al.*, 1987). Debido a la variación en la expresión de los O-glicanos que exhibe esta glicoproteína es muy posible que la modificación en la expresión de estos carbohidratos influyan en la función del CD43.

Otra de las glicoproteínas O-glicosiladas donde se observa la importancia de este tipo de oligosacáridos es el marcador CD45 o antígeno común de los leucocitos (L-CA). Se trata de una familia de glicoproteínas de superficie con pesos moleculares que van de 180 a 220 kDa y poseen actividad de fosfatasa en su dominio citoplásmico; la diversidad de esta familia está dada por el empalme alternativo de 3 exones que codifican para una porción del dominio extracelular. y para una variedad de patrones de glicosilación específicos para cada tipo celular (Thomas, 1989; Pulido and Sánchez-Madrid, 1990). Son precisamente los exones que codifican para los múltiples sitios potenciales para la O-glicosilación los que se expresan de manera diferencial en poblaciones de linfocitos por el resultado de

un empalme alternativo (Johnson *et al.*, 1989); por lo cual se piensa que estas estructuras O-glicosiladas son importantes desde el punto de vista funcional ya que pueden estar regulando las interacciones que llevan a cabo las células que portan las diferentes isoformas de esta proteína. Se ha observado que durante el desarrollo de los linfocitos T, en el timo existe una expresión diferencial de dos isoformas de proteínas O-glicosiladas: CD45RO+ y CD45RA+, que se presentan en poblaciones en distinto estado de diferenciación (Fuji, 1992).

Otras glicoproteínas que tienen un papel importante en los mecanismos de activación celular durante la respuesta inmune y que se encuentran O-glicosiladas, son el caso del co-receptor CD8 así como algunas glicoproteínas presentes en neutrófilos que participan en la liberación de superóxido de nitrógeno al unirse con la selectina P de las plaquetas activadas (Nagata, *et al.*, 1994).

Hasta el momento se cuenta con pocas herramientas para la identificación y el estudio de las estructura O-glicosiladas sobre la superficie celular, y es por esta razón que no se conoce con precisión su función en los fenómenos de reconocimiento, adhesión y activación celular. Debido al reconocimiento específico que poseen las lectinas, estas moléculas protéicas provenientes de diferentes fuentes representan una buena opción para el estudio de los carbohidratos de membrana.

III. Antecedentes

Aplicación de las lectinas en la caracterización de poblaciones celulares

El trabajo clásico de Reisner *et al.* en 1976a donde utilizan la lectina de cacahuate (PNA) para separar dos subpoblaciones de timocitos de ratón bien diferenciadas por la presencia de ciertos marcadores de superficie y su respuesta proliferativa a dos mitógenos, fitohemaglutinina (*Phaseolus vulgaris*) y conacanavalina A, fue uno de los trabajos pioneros en el cual utilizaron a las lectinas como herramientas en la separación y caracterización de poblaciones celulares; indicando la relevancia en la presencia de ciertos glicoconjugados en la membrana citoplásmica y en el hecho de que éstos podrían jugar un papel importante en el estado de maduración celular. A partir de estos estudios se han utilizado las lectinas en la separación de otras poblaciones celulares. Por ejemplo, con el empleo de la lectina de soya (SBA) es posible separar linfocitos T de linfocitos B en bazo (Reisner *et al.*, 1976b), por lo cual un uso importante que se le ha dado a esta lectina es la remoción de linfocitos T maduros de la médula ósea humana y el aislamiento de una población rica en células hematopoyéticas susceptibles para trasplantes isogénicos (Reisner *et al.*, 1983). La lectina de cacahuate tiene la capacidad de separar células germinales de somáticas en testículos de ratón (Maekawa y Nishimune, 1985). Recientemente se han utilizado lectinas que reconocen y sirven para la caracterización de poblaciones celulares que contienen glicoconjugados con ácido siálico en posición terminal, como es el caso de las lectinas de germen de trigo (WGA) y de *Limax flavus* (LFA) (Mrkoci *et al.*, 1996; Fischer, 1995). Actualmente se cuenta con lectinas cuya especificidad

permite distinguir entre ácidos siálicos unidos en posición α 2,3 y α 2,6 a los azúcares subyacentes como son las lectinas de *Maackia amurensis* (MAA) y *Sambucus nigra* (SNA) respectivamente (Kaku *et al.*, 1993; Mrkoci *et al.*, 1996). Todos estos datos sugieren que en los procesos normales de diferenciación, maduración o activación, los carbohidratos de la membrana sufren modificaciones que pueden ser identificadas mediante la utilización de lectinas específicas para cada carbohidrato.

La lectina de amaranto se ha purificado a partir de las semillas de la planta de *Amaranthus leucocarpus*, la cual tiene una especificidad por N-acetil-D-galactosamina (GalNAc) y en particular por los antígenos T y Tn (Gal β 1.3GalNAc β 1,3Ser/Thr y GalNAc β 1,3Ser/Thr respectivamente) (Zenteno *et al.*, 1992). Esta lectina induce inmunosupresión contra antígenos particulados cuando es inoculada por vía intraperitoneal previamente al reto antigénico (Zenteno *et al.*, 1985). Aunque no se conoce el mecanismo de inmunosupresión que tiene esta lectina se ha postulado que su unión con estructuras O-glicosídicas juega un papel importante en las interacciones celulares que podrían darse a través de este tipo de estructuras (Maldonado *et al.*, 1994); debido a lo anterior la lectina de amaranto constituye una herramienta muy útil en el estudio de los O-glicanos presentes en células del sistema inmune.

IV. HIPOTESIS

Las estructuras glicosiladas, particularmente las estructuras O-glicosiladas, de la membrana de los grupos celulares que participan en la respuesta inmune, juegan un papel fundamental en los procesos de comunicación y activación celular, son de igual forma importantes marcadores fenotípicos de poblaciones celulares.

V. OBJETIVOS

-Identificar la relevancia de las estructuras O-glicosídicas presentes en timocitos murinos

-Determinar la utilidad de la lectina de *Amaranthus leucocarpus* en el estudio de la función que tienen las estructuras O-glicosiladas presentes en timocitos murinos.

-Caracterizar fenotípicamente la subpoblación celular reconocida por la lectina de *Amaranthus leucocarpus* en timo de ratón.

-Aislar y caracterizar químicamente el receptor para la lectina de amaranto de la superficie de timocitos murinos.

IV. HIPOTESIS

Las estructuras glicosiladas, particularmente las estructuras O-glicosiladas, de la membrana de los grupos celulares que participan en la respuesta inmune, juegan un papel fundamental en los procesos de comunicación y activación celular, son de igual forma importantes marcadores fenotípicos de poblaciones celulares.

V. OBJETIVOS

-Identificar la relevancia de las estructuras O-glicosídicas presentes en timocitos murinos

-Determinar la utilidad de la lectina de *Amaranthus leucocarpus* en el estudio de la función que tienen las estructuras O-glicosiladas presentes en timocitos murinos.

-Caracterizar fenotípicamente la subpoblación celular reconocida por la lectina de *Amaranthus leucocarpus* en timo de ratón.

-Aislar y caracterizar químicamente el receptor para la lectina de amaranto de la superficie de timocitos murinos.

VI. MATERIALES Y METODOS

Reactivos

El medio de cultivo Dulbecco modificado por Eagle (DMEM), el suero fetal de ternera (SFT), la albúmina sérica bovina (SBA) y los inhibidores de proteasas, aprotinina A, leupeptina y pepstatina, así como la N-acetil-D-galactosamina, el isotiocianato de fluoresceína (FITC), el azul de tetrazolio (NBT), la avidina fosfatasa, la streptavidina-peroxidasa, el hidrocloreuro de 3,3 diaminobenzidina (DAB), el 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato (BCIP), el Sephadex G-50 y la avidina acoplada a agarosa fueron obtenidos de Sigma Chem. (St. Louis, MO, USA). La sulfo-NHS-biotina y el inhibidor fenil-metil-sulfonilo (PMSF) fueron adquiridos en Pierce Chemical Co. (Rockford, IL, USA). Los anticuerpos monoclonales de rata acoplados a biotina y sin acoplar, dirigidos contra los marcadores CD3, CD4, CD8, CD43 y NLDC-145 de ratón, fueron adquiridos en Pharmigen (San Diego, CA, USA). La inmunoglobulina G de conejo acoplada, a peroxidasa, dirigida contra rata se obtuvo de Dako (Carpinteria, CA, USA). Los reactivos para la quimioluminiscencia fueron adquiridos en Amersham International (Amersham, Buckinghamshire, UK).

La lectina de amaranto se purificó a partir del extracto crudo obtenido de las semillas de la planta de *Amaranthus leucocarpus* por extracción con solución salina isotónica (NaCl 0.9% p/v, SSI) eliminando el material particulado por centrifugación a 10 000 rpm durante 10 min. Posteriormente se purificó en una columna de 10 x 1cm conteniendo fetuina Sepharosa 4B, previamente equilibrada con SSI. Después de eluir la fracción no retenida del extracto crudo con SSI, la

fracción con actividad aglutinante se eluyó con agua destilada. Se ajustó la fuerza iónica con NaCl a esta última fracción, y se determinó su actividad aglutinante y su concentración de proteína por el método de Bradford (1976).

Acoplamiento de isotiocianato de fluoresceína (FITC) a la lectina de amaranto (ALL)

El acoplamiento de la fluoresceína a la proteína se llevó a cabo dializando la proteína contra amortiguador de carbonatos pH 9 y agregándole isotiocianato de fluoresceína (FITC) en una proporción de 0.05mg por cada miligramo de ALL, disuelto en el mismo amortiguador. Se incubó toda la noche a 4°C en agitación. El FITC no acoplado se separó del conjugado por filtración utilizando una columna de Sephadex G-25 equilibrada previamente con solución amortiguadora de fosforos 0.15M pH 7.2 (PBS).

Acoplamiento de biotina a la lectina de amaranto

La lectina de amaranto fue dializada contra amortiguador de carbonatos pH 8.5; se le agregaron 0.07mg de sulfo-NHS-biotina por cada miligramo de proteína. Se incubó durante 2h a temperatura ambiente y finalmente se separó de la biotina no acoplada por diálisis contra PBS.

Reconocimiento de timocitos murinos por la lectina de amaranto

Fueron utilizados ratones machos CD1 de 28 días de edad. Los timos fueron extraídos quirúrgicamente y fueron disgregados con una malla fina de tela

Las células se resuspendieron en 1ml de PBS, después de 3 lavados con medio de cultivo Dulbecco modificado por Eagle (DMEM) suplementado con suero fetal de ternera (SFT). Para determinar la dosis óptima de lectina necesaria para aglutinar 1×10^6 timocitos/ml, se contaron las células y se hicieron varias suspensiones celulares las cuales se incubaron con diferentes concentraciones de lectina que fueron desde 0.01 hasta 20 μ g de ALL; se incubaron durante 30 min y se separaron por aglutinación, de acuerdo a la metodología descrita por Reisner *et al.* (1976a), la cual consiste en colocar la suspensión celular sobre una solución de albúmina sérica bovina (BSA) al 7% durante 30 min para permitir que las células aglutinadas por la lectina se sedimenten. A continuación, las células fueron recuperadas e incubadas con N-acetil-D-galactosamina (GalNac) 0.2M y después de dos lavados con PBS se contaron ambas poblaciones. Posteriormente, se procedió a determinar el número de células aglutinadas con la dosis óptima de la lectina. La viabilidad de las células fue determinada por exclusión con azul tripán.

Determinación del fenotipo de los timocitos positivos al marcaje con ALL

Para identificar el fenotipo de las células aglutinadas por la lectina, los timocitos aglutinados con la lectina de amaranto, fueron incubadas por separado con anticuerpos monoclonales dirigidos contra los marcadores CD4 ó CD8 acoplados a biotina, se lavaron en dos ocasiones con PBS para quitar los anticuerpos que no se unieron y posteriormente se incubaron con estreptavidina acoplada a peroxidasa de rábano a una dilución 1:4000, los timocitos fueron

lavados exhaustivamente con PBS antes de ser incubados con H₂O₂ 0.3% como sustrato y tetracloruro de 3,3' diamino-benzidina (DAB) como cromógeno hasta que desarrollaron color. Finalmente las células se lavaron con PBS y se cuantificaron.

Para determinar si las células ALL+ eran dobles o simples positivas también se realizó un doble marcaje con anticuerpos contra CD4 y CD8. Una vez fijados los timocitos en portaobjetos fueron incubados primero con anticuerpo murino anti-CD4 unido a biotina y posteriormente con estreptavidina peroxidasa; después de lavar las células dos veces con PBS fueron incubadas con H₂O₂ y DAB hasta que desarrollaron color. En una segunda etapa las células se incubaron con anticuerpo anti-CD8 murino acoplado a biotina y posteriormente con avidina-fosfatasa alcalina, para revelar con 5-bromo 4-cloro 3-indolil fosfato en nitroazul de tetrazolio (NBT/BCPI) hasta que se observó color.

Localización *in situ* de timocitos ALL+ en el timo

Después de ser extraídos, la mitad los timos se colocaron en OCT (Tissue Tek) y se congelaron inmediatamente en isopentano frío, la otra mitad se fijó en formol al 10% y se procesaron para microscopía óptica. Se realizaron cortes de 7µm de grosor con un crióstato Bright FS/FCS y se fijaron con una solución de acetona/cloroformo (v/v); se secaron a temperatura ambiente y posteriormente se congelaron hasta su uso.

Antes de llevar a cabo la tinción, los cortes se lavaron exhaustivamente con PBS pH 7.2 y se incubaron durante 15 min en suero normal de ratón al 3%.

finalmente se lavaron por 10 min más en PBS. Los cortes fueron incubados en primer lugar con 15µl de PNA conjugada a isotiocianato de tetrametil rodamina (TRICT), en cámara húmeda durante 25 min, posteriormente se lavaron con PBS por 30 min. La tinción con la ALL acoplada a isotiocianato de fluoresceína (FITC) se realizó saturando cada corte con la lectina en cámara húmeda por 25 min y lavando posteriormente con PBS 30 min.; por último los cortes se montaron en PBS/glicerol. Cada una de las preparaciones se observó en un microscopio Zeiss equipado con un condensador de epifluorescencia IV/2 y se tomaron microfotografías. Algunas de las preparaciones se incubaron con ALL acoplada a biotina (ALL-B) y avidina acoplada a fosfatasa alcalina, usando 5µl de NBT/BCIP como sustrato.

Para identificar el fenotipo de la población reconocida por la lectina de amaranto se hicieron dobles marcajes *in situ*, llevando adelante en primer lugar la tinción con ALL-B y la avidina acoplada a fosfatasa alcalina y posteriormente los cortes se incubaron con anticuerpos monoclonales anti-CD3, anti-CD4 o anti CD8. durante 15 min. Finalmente se agregó como segundo anticuerpo IgG de conejo anti-rata acoplado a peroxidasa en una dilución 1:200 y DAB como cromógeno. Por otro lado, también se realizaron dobles marcajes *in situ* con ALL-FITC, y posteriormente con anticuerpos NLDC-145 de rata específicos para células interdigitantes, incubando posteriormente con anticuerpos anti IgG de rata conjugados a peroxidasa, para revelar después con H₂O₂ y DAB.

Purificación del receptor para ALL a partir de timocitos murinos

Para la obtención del receptor de ALL a partir de timocitos murinos se estandarizó una técnica de aislamiento aprovechando la versatilidad de la interacción avidina-biotina. Se obtuvieron los timos de 10 ratones machos de 28 días de edad y se disgregaron por separado. Las células así obtenidas se resuspendieron en medio de cultivo DMEM, suplementado con 5% de SFT y se contaron en un hemocitómetro, la suspensión celular se ajustó a 1×10^8 células en 1ml de PBS. Para separar la subpoblación reconocida por la lectina de amaranto se incubaron las células durante 15 min con $10 \mu\text{g}$ de ALL-B y se colocó la suspensión celular sobre una solución de BSA al 7% en PBS en tubos de vidrio cónicos de 12ml. Después de 30 min las células aglutinadas (ALL+) se recuperaron del fondo del tubo, se lavaron y se lisaron incubándolas en una solución que contenía $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ de aprotinina A, $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ de pepstatina, $2 \mu\text{g}/\text{ml}$ de leupeptina y 2mM de fluoruro de fenilmetilsulfonilo y Tritón X-100 al 1% (v/v) en PBS, durante 30 min a 4°C en agitación constante. Posteriormente, la solución resultante se centrifugó a $14000 g$ durante 30 min para eliminar residuos celulares y mitocondrias.

Las glicoproteínas de membrana reconocidas por ALL se aislaron de una manera específica utilizando cromatografía de afinidad. El sobrenadante recuperado se pasó a través de una columna de agarosa-avidina previamente lavada con glicina 0.1M, pH 2 y estabilizada a pH 7.2 con PBS. Después de colocar la muestra se lavó la columna con PBS con el fin de eluir la fracción no retenida hasta que la densidad óptica con una A_{280} llegara a cero; posteriormente

se agregaron 3ml de una solución de GalNAc 0.2M en PBS con el propósito de desprender el receptor de ALL por competencia con el monosacárido específico reconocido por la lectina. A continuación se lavó de nuevo la columna con PBS y se añadió glicina 0.1M pH 2 para eluir al complejo ALL-biotina. Las fracciones con una densidad optica positiva se colectaron, se dializaron contra NaCl 5mM y se concentraron por liofilización.

Determinación del peso molecular del receptor para ALL

La evaluación del peso molecular de la glicoproteína reconocida por ALL se realizó por electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones reductoras (5% de β -mercaptoetanol y 8M de urea) y no reductoras en presencia de 0.1% de dodecil sulfato de sodio, SDS. La concentración de los geles de poliacrilamida utilizados para la separación fue de 12.5% empleando el sistema de Laemmli (1970). Los geles se tiñeron con nitrato de plata y con azul de Coomassie R-250 al 0.1%.

Transferencia de proteínas separadas por electroforesis

Con la finalidad de evaluar si la leucosialina es la glicoproteína reconocida por ALL, se realizó una transferencia de las glicoproteínas de membrana aisladas de timocitos de ratón. El extracto celular se hizo a partir de 2×10^6 timocitos utilizando el amortiguador de lisis conteniendo Tritón X-100 al 0.1% (v/v) en PBS más los inhibidores de proteasas. En primer lugar, se separaron por electroforesis las proteínas contenidas en el extracto celular; una vez separadas se transfirieron

a una membrana de nitrocelulosa. La transferencia se llevó a cabo utilizando el aparato de Tranblot, Bio-Rad durante 1h a 10 volt en amortiguador de transferencia. El papel de nitrocelulosa se bloqueó con 5% de leche en solución de lavado: solución salina amortiguada con trizma base con 0.1% de Tween-20 (v/v), pH 7.6 (TBS-T). Posteriormente, la membrana se incubó por separado con dos anticuerpos monoclonales contra CD43, el S7, que reconoce la isoforma de 115 kDa, y el 1B11 que reconoce la isoforma con peso de 130 kDa, durante 1h a temperatura ambiente. Después de la incubación la membrana se lavó con TBS-T brevemente en dos ocasiones, seguidas de un lavado de 15 min y 2 lavados más de 5 min. A continuación se agregó IgG de rata acoplada a peroxidasa diluida 1:2500 como segundo anticuerpo y se incubó la membrana durante 45 min a temperatura ambiente; se lavó la membrana 4 veces con el amortiguador de lavado y finalmente se reveló por quimioluminiscencia en una película Hyperfilm ECL de Kodak®.

Por otro lado, también se evaluó la unión de la lectina de amaranto a las glicoproteínas de membrana de los timocitos murinos y a la fracción eluída con GalNAc en la cromatografía de afinidad, transferidas a una membrana de nitrocelulosa incubando ésta con la ALL-B y utilizando EXtravidina®-peroxidasa como enzima para llevar a cabo el revelado por quimioluminiscencia. Una vez bloqueada la membrana de nitrocelulosa se incubó con la lectina de amaranto acoplada a biotina diluida 1:200 en TBS y 5% de leche a 37° C durante 1h y a 4°C toda la noche, posteriormente se lavó 3 veces con TBS-T. Después, la membrana se incubó con Extravidina®-peroxidasa 1:5000 diluida en TBS-T durante 45 min a

temperatura ambiente y por último se lavó 4 veces antes del revelarla por quimioluminiscencia.

Para confirmar la ausencia de lectina biotinilada en la fracción eluída con GalNac se hizo una transferencia de la proteína contenida en dicha fracción y separada por electroforesis a papel de nitrocelulosa, así como de una muestra de la lectina acoplada a biotina, presente en ese mismo gel. Las tiras de papel de nitrocelulosa donde se transfirieron las proteínas se incubaron en PBS con Tween 20 al 0.01% conteniendo 1% de leche para bloquear el papel. Después de 16h de incubación se lavaron en esta misma solución amortiguadora durante 2h haciendo cambios de solución cada 20 min. Posteriormente los filtros se incubaron con una solución de estreptavidina-peroxidasa diluida 1:8000 en PBS durante 30 min Finalmente los filtros se lavaron durante 1h con la solución amortiguadora, haciendo cambio cada 15 min y la reacción se reveló por quimioluminiscencia.

Separación del receptor para ALL por medio de FPLC

Una vez obtenido el receptor para la lectina de amaranto por cromatografía de afinidad se procedió a purificarlo por el sistema de FPLC. Para lo anterior se utilizó una columna Mono-P HR 5/20 de Pharmacia que fue usada como un intercambiador aniónico. Para lo anterior la proteína se disolvió en un regulador de imidazol 10 mM a pH 7.1 y fueron aplicados 500 µg de receptor en la columna ajustándose el flujo a 0.5 ml/min. La muestra fue eluída con un gradiente de NaCl 1M, pH 7.1 disuelto en el mismo regulador de imidazol, las fracciones, de 1 ml cada una, se monitorearon a una A_{280} nm con una sensibilidad de 0.1.

Caracterización química

Determinación de azúcares

La determinación de la concentración de azúcares se llevó a cabo por el método de fenol (Dubois, et al., 1956). Se preparó una solución al 5% de fenol cristalizado en agua (p/v) y se agregó 0.1ml de esta solución a 1ml de la solución del receptor con una concentración de 50 μg de proteína, posteriormente se añadió 1ml de ácido sulfúrico. La solución se agitó y se incubó a 100°C durante 5 min, posteriormente se leyó la densidad óptica en A_{490} . Se utilizó lactosa como estándar.

Composición de carbohidratos

El análisis de composición de carbohidratos fue llevado a cabo por metanolisis en la presencia de meso-inositol como estándar interno. Se hidrolizaron 50 μg de proteína en 1ml de metanol/HCl 0.5 M a temperatura de 100°C durante 24h. Posteriormente, los derivados trifluoro-acetil-alditales se obtuvieron adicionando 100 μl de piridina y 100 μl de ácido trifluoroacético. La composición de azúcares se determinó por cromatografía de gases por el método de Zanetta et al. (1972), el cual consistió en agregar los derivados trifluoro-acetil-alditales a una columna conteniendo silicón OV-210 al 3% (Applied Science Lab, Buffalo, NY). El programa de temperatura se estableció de 100-240°C, con un incremento de 1°C por minuto, en un cromatógrafo Varian 2100 (Orsay, Francia), utilizando helio como gas vector.

Composición de aminoácidos

Las fracciones obtenidas de la cromatografía de afinidad y por intercambio iónico fueron analizadas para composición de aminoácidos. Para tal efecto se hidrolizaron 50 μg de proteína de cada fracción en frascos sellados conteniendo HCl 6N durante 24, 36 y 72h a 110° C. Posteriormente se realizó derivación en el sistema PICOTAG de Waters Associates (CA, USA) en una columna Pico-Tag C-18, 3.9 x 150mm. La muestra se hizo por triplicado y se inyectó en el sistema en tres ocasiones; se obtuvo la media de los datos resultantes y se hizo el tratamiento estadístico por medio del programa LabNet de Spectra Physics (Bidlemeier et al., 1984).

Determinación del amino terminal

La secuencia de aminoácidos de las fracciones del receptor de ALL fue realizada en un secuenciador de aminoácidos automatizado Beckman 3000. Las muestras fueron separadas por electroforesis en condiciones reductoras en SDS-PAGE y después transferidas a una membrana de PVDF (polivinil), posteriormente las fracciones obtenidas fueron aplicadas al secuenciador de aminoácidos.

VII. RESULTADOS

Reconocimiento de timocitos murinos por la lectina de amaranto

Los resultados mostraron que la dosis óptima de lectina de amaranto para aglutinar timocitos osciló entre 0.1 y 1 μg de proteína con un título de 1:64 para 10^6 células.

Para determinar la cantidad de células aglutinadas por la lectina, la suspensión celular de timocitos murinos fue incubada con ALL y las células reconocidas por la lectina se separaron de las que no lo fueron mediante el procedimiento descrito por Reisner (1976a). Las células aglutinadas por ALL fueron $5.6 \pm 0.9\%$ del total de timocitos y la viabilidad fue en todos los casos $\geq 90\%$, determinada por exclusión con azul tripán.

Determinación del fenotipo de los timocitos positivos al marcaje con ALL

Para conocer el fenotipo de las células aglutinadas por la lectina de amaranto se marcaron con anticuerpos anti-CD4 y anti-CD8 acoplados a biotina. Posteriormente las células se incubaron con estreptavidina peroxidasa y se reveló con H_2O_2 y DAB. Al cuantificar las células que reaccionaron con cada uno de los anticuerpos se encontró que un 75% de las células reconocidas por el amaranto fueron CD4+ y un 11% CD8+. Al realizar el doble marcaje con ambos anticuerpos se observó que las células aglutinadas por ALL fueron simples positivas.

Localización de células ALL+ en el timo

Con la finalidad de localizar las células reconocidas por la lectina de amaranto dentro del timo se hicieron tinciones *in situ*. Se trabajó con cortes de 7 μm de espesor los cuales se fijaron y procesaron para microscopía óptica. Estos cortes fueron incubados primero con PNA-TRICT y después con ALL-FITC. después de fijarlos se observaron al microscopio de fluorescencia y se tomaron microfotografías, donde se encontró que las células marcadas con PNA-TRICT se encontraban, como ya es conocido, en la corteza tímica (FIG. 1) y los timocitos que presentaban la marca de fluoresceína se encontraban localizadas en la médula tímica (FIG. 2). Al realizar la tinción con ALL-B y revelar con avidina-fosfatasa alcalina y NBT/BCIP como substrato se observó la misma localización de los timocitos ALL+ (FIG. 3). El fenotipo de las células ALL+ se determinó *in situ* utilizando una doble tinción de los cortes histológicos del timo, incubando en primer lugar con ALL-B, utilizando avidina-fosfatasa alcalina con NBT/BCIP para revelar, y en una segunda fase incubando con anticuerpos contra los marcadores CD3, CD4 o CD8, y agregando un segundo anticuerpo acoplado a peroxidasa. En los cortes teñidos de esta forma se observó que los timocitos ALL+ fueron predominantemente CD4+ (FIG. 4). Se encontró que algunas de las células teñidas con la lectina de amaranto presentaban morfología de células interdigitantes. Para confirmar lo anterior se hicieron dobles tinciones con ALL-FITC y con anticuerpos específicos para células interdigitantes (NDLC-145). utilizando un segundo anticuerpo acoplado a peroxidasa para revelar. Como resultado de esta doble tinción, al analizar los cortes se encontró que la lectina de

amaranto reconoce a células interdigitantes (FIG. 5 y 6) y el porcentaje de este tipo celular es alrededor del 80%

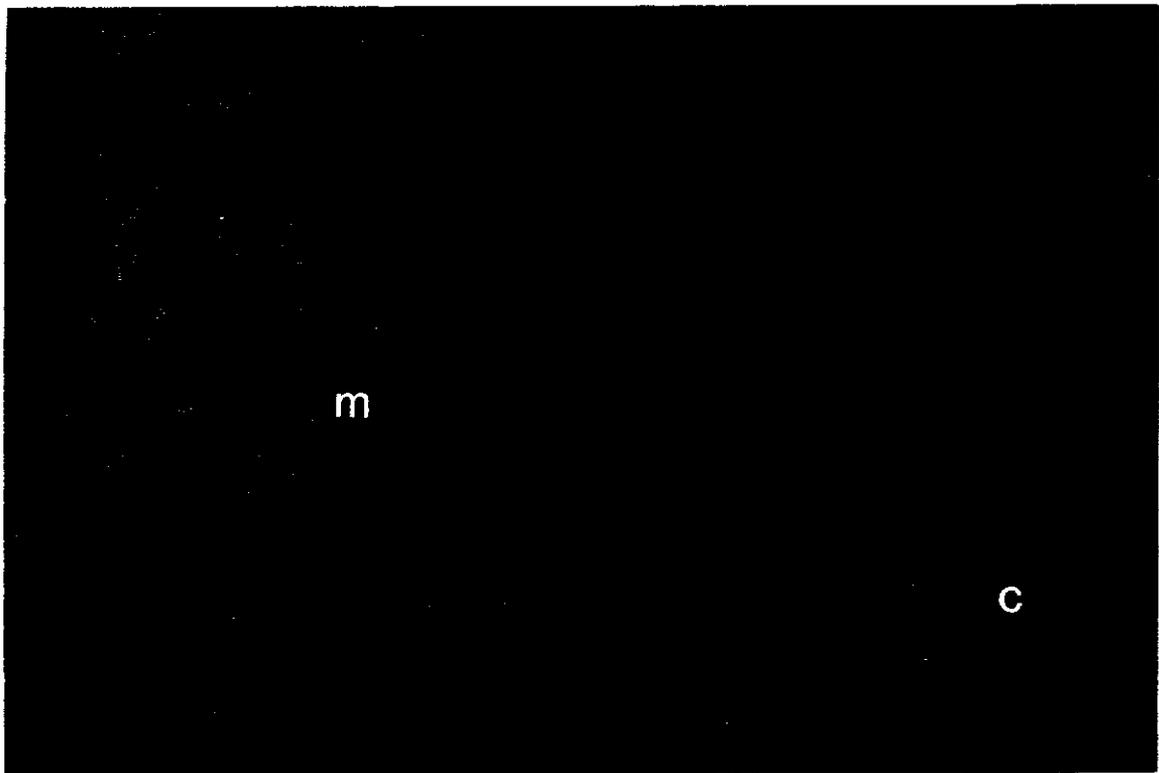


Figura 1 Microfotografía de un corte longitudinal de timo de ratón teñido con lectina de cacahuate acoplada a rodamina (PNA-TRIC). Las células que fueron teñidas con la lectina se encuentran en la región cortical (C).

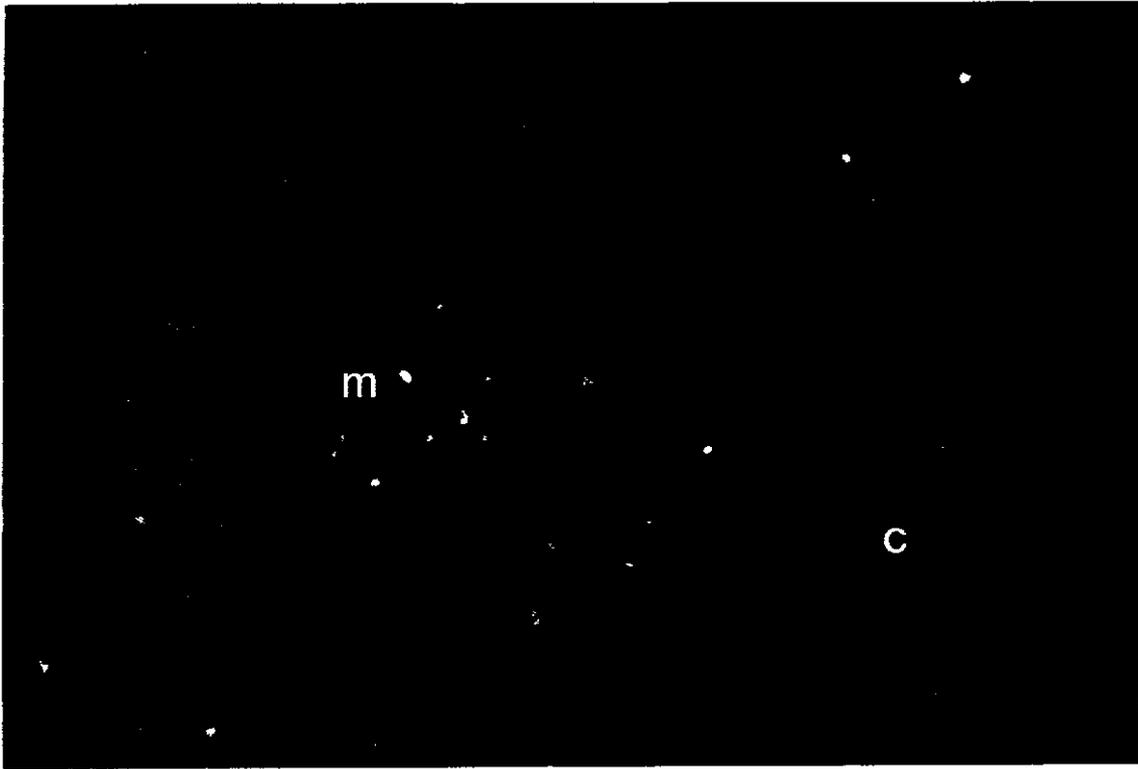


Figura 2 Microfotografía del mismo corte longitudinal de la Figura 1 teñido con lectina de amaranto acoplada a fluoresceína (ALL-FITC). Las células marcadas con fluoresceína se localizan principalmente en la médula tímica (M).



Figura 3. Microfotografía de un corte longitudinal de timo de ratón teñido con ALL-B y avidina acoplada a fosfatasa alcalina. Al igual que en la Figura 2 se observa la misma localización de los timocitos reconocidos por ALL en la región medular (M).



Figura 4 Microfotografía de un corte longitudinal de timo de ratón con doble tinción utilizando ALL-B y avidina acoplada a fosfatasa alcalina (azul) y anticuerpo anti-CD4 más un segundo anticuerpo acoplado a peroxidasa (café). Las células que presentan doble marca se encuentran en la médula tímica (M) en tanto que ésta no se observa en la región cortical (C)

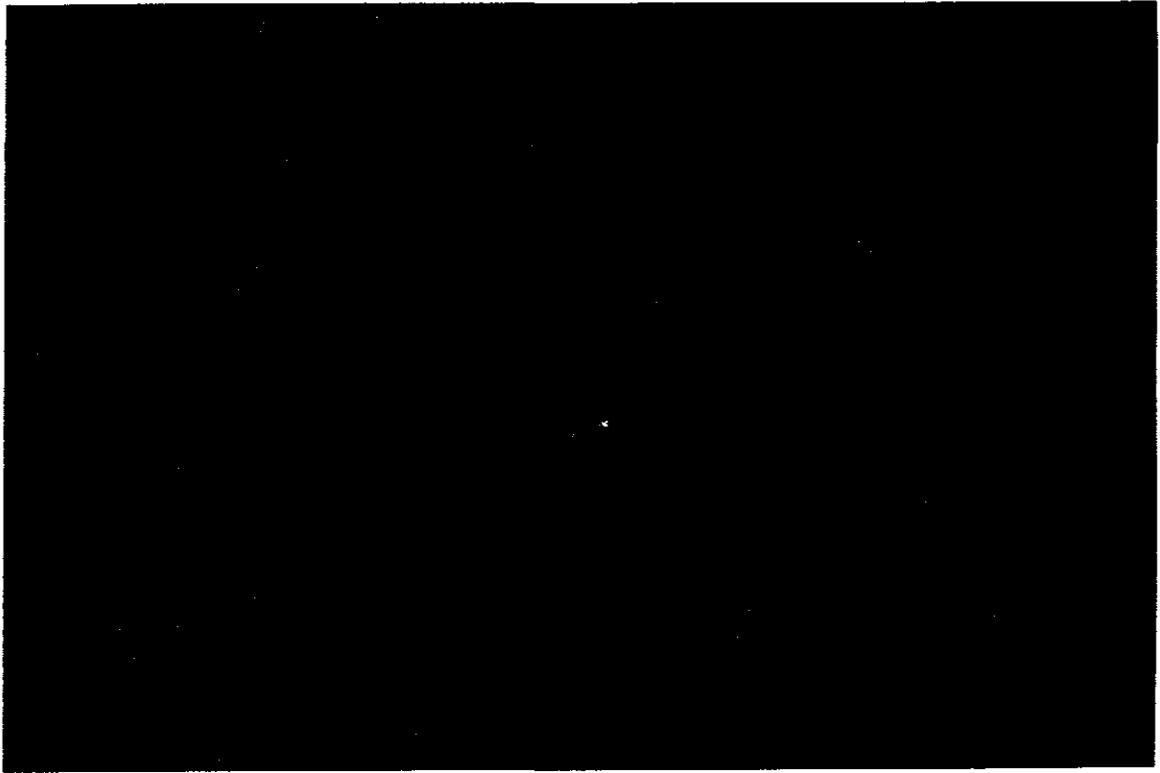


Figura 5 Microfotografía de un corte longitudinal de timo de ratón teñido con ALL-FITC. El campo corresponde al mismo de la Figura 6



Figura 6 Microfotografía del mismo corte longitudinal de la Figura 5 teñido con anticuerpos específicos para células interdigitantes (NDLC-45) utilizando un segundo anticuerpo acoplado a peroxidasa

Purificación del receptor para ALL (ALLTr)

El receptor para la lectina de amaranto presente en células tímicas de ratón fue aislado por medio de cromatografía de afinidad, empleando la interacción avidina-biotina. En primer lugar se incubaron las células con ALL-B, y una vez separada la subpoblación reconocida por ella por medio de sedimentación diferencial de las células aglutinadas, fueron lisadas en presencia de inhibidores de proteasas. El lisado celular fue pasado a través de una columna de avidina acoplada a agarosa y el receptor de ALL eluído específicamente con N-acetil-D-galactosamina que es el azúcar específico reconocido por la lectina (FIG. 7) El liofilizado de esta fracción fue analizado por electroforesis en gel de poliacrilamida al 12.5% en condiciones reductoras y no reductoras. En el perfil electroforético tanto en condiciones reductoras como no reductoras se observó una sola banda proteica de una M_r de 70,000, (FIG. 8).

Transferencia de proteínas separadas por electroforesis

Las proteínas presentes en el lisado celular de timocitos murinos y la fracción eluída con GalNAc en la cromatografía de afinidad, fueron separadas por electroforesis en condiciones reductoras y transferidas a papel de nitrocelulosa. Las tiras de la membrana fueron incubadas por separado con dos anticuerpos dirigidos contra la leucosialina, S7 y 1B11, y por otro lado con ALL-B. Las membranas tratadas con los anticuerpos fueron incubadas posteriormente con un segundo anticuerpo acoplado a peroxidasa, y las tiras incubadas con ALL-B se incubaron en una segunda ocasión con Extravidina®-peroxidasa.

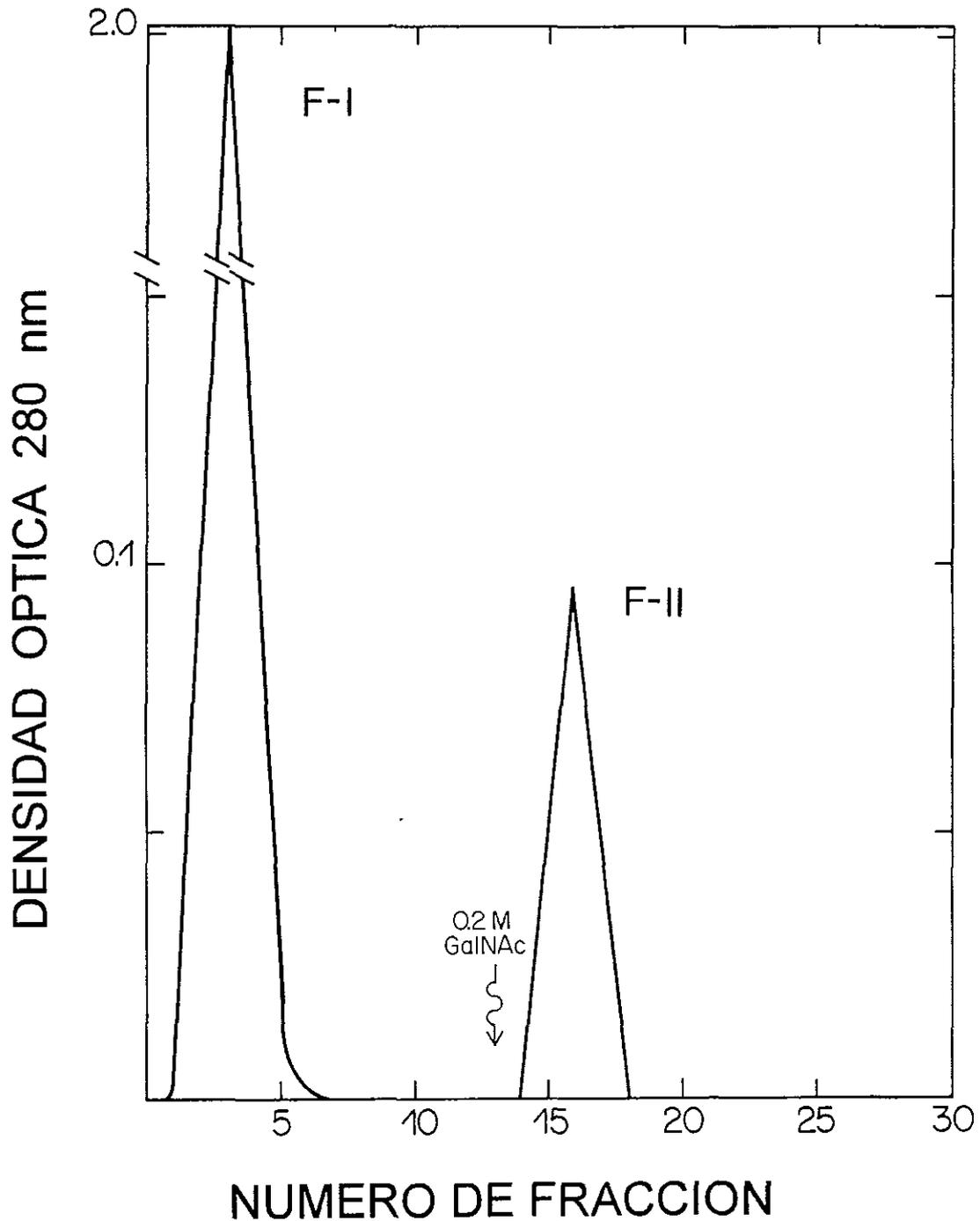


Figura 7. Cromatografía de afinidad. Perfil cromatográfico del lisado celular obtenido a partir de timocitos murinos. Las células aglutinadas por la lectina de amaranto (ALL-B) fueron lisadas en presencia de inhibidores de proteasas y el lisado celular fue pasado a través de una columna de avidina acoplada a agarosa: después del desprendimiento de la fracción no retenida F-I, la fracción retenida F-II se eluyó con N-acetil-D-galactosamina (GalNAc) 0.2M, el azúcar específico reconocido por ALL.

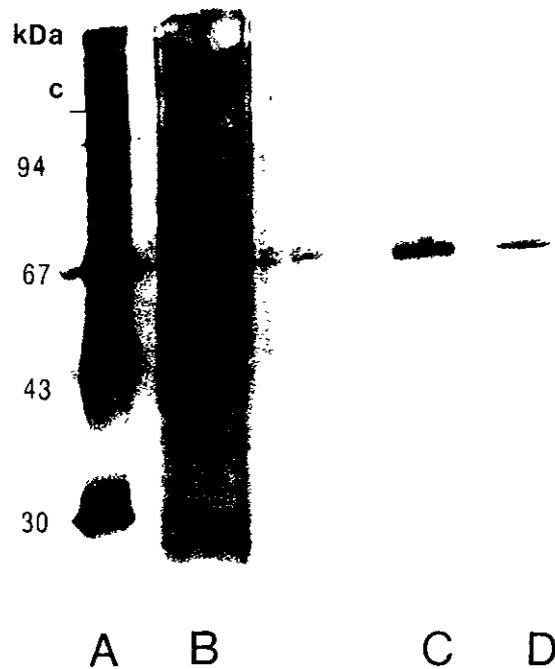


Figura 8. Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones reductoras (PAGE-SDS) del receptor para la lectina de *Amaranthus leucocarpus* en timo (ALLTr). (A) Pesos moleculares. (B) fracción no retenida, F-I. (C y D) fracción eluida con GalNAC 0.2M, F-II.

Al revelarse por quimioluminiscencia se observó que la lectina de amaranto reconoció una sola glicoproteína que corresponde a un peso de 70 kDa, comprobando el resultado de la electroforesis (Fig. 9, carril 4), y también reconoció a la fracción eluida con GalNac en la cromatografía de afinidad (Fig. 9, carril 5). Por otro lado, los anticuerpos S7 y 1B11 reconocieron las glicoproteínas de 115 y 130 kDa para las cuales son específicos (Fig. 9, carriles 2 y 3 respectivamente).

Para comprobar la ausencia de la lectina biotinilada en la fracción purificada se llevó a cabo una electrotransferencia de un corrimiento electroforético en condiciones reductoras, donde se colocaron en carriles separados la fracción purificada y la lectina de amaranto acoplada a biotina: al

revelar con estreptavidina-peroxidasa, H_2O_2 y DAB solo se observó una banda en el carril correspondiente a la ALL-biotina, que en este caso tuvo un M_r de 35,000, lo cual corresponde al monómero de ALL; en el carril correspondiente al receptor para ALL no se observaron bandas al revelar la transferencia (resultados no mostrados).

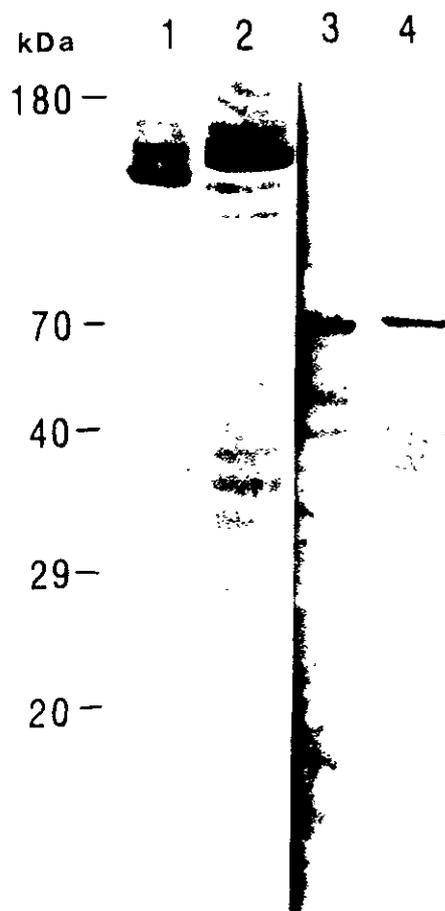


Figura 9. Transferencia de proteínas del lisado celular de timocitos separadas por electroforesis en condiciones reductoras. Carriles (1 y 2), estas tiras se incubaron en primer lugar con dos anticuerpos diferentes específicos contra la leucosialina (CD43), S7 y 1B11 respectivamente, y después con un segundo anticuerpo acoplado a peroxidasa. Carriles (3 y 4), estas tiras fueron incubadas primero con ALL-B y posteriormente con Extravidina[®] peroxidasa, en el carril 4 se corrió la fracción eluida con GalNAc en la cromatografía de afinidad.

Purificación del receptor por medio de FPLC

La fracción eluída con GalNAc en la cromatografía de afinidad fue resuspendida en amortiguador de imidazol e inyectada en una columna Mono P HR 5/20. Al eluir con un gradiente de NaCl 1M se obtuvieron tres fracciones principales Tr-25, Tr-30 y Tr-70 (FIG. 10) que presentaron lecturas positivas de densidad óptica a una A_{280} . Dichas fracciones eluyeron a una concentración de NaCl de 0.1, 0.2 y 1M respectivamente.

Caracterización Química

Determinación de azúcares

La concentración de azúcares se determinó por el método de Dubois *et al.* (1956), utilizando lactosa como estándar. Se encontró que los carbohidratos presentes en el receptor constituyen el 30% en peso del receptor purificado por cromatografía de afinidad, la proporción de carbohidratos varió cualitativamente en cada una de las fracciones purificadas por cromatografía de intercambio iónico. identificándose que las fracciones Tr-1, Tr-2 y Tr-3 contienen 25, 28 y 35% de carbohidratos por peso, respectivamente.

Composición de carbohidratos

La determinación de los carbohidratos encontrados en el receptor para ALL se analizó por medio de cromatografía de gases, a partir de una muestra del receptor hidrolizada por metanolisis, de acuerdo al método de Zanetta *et al.* (1972). Los resultados se muestran en la Tabla 1.

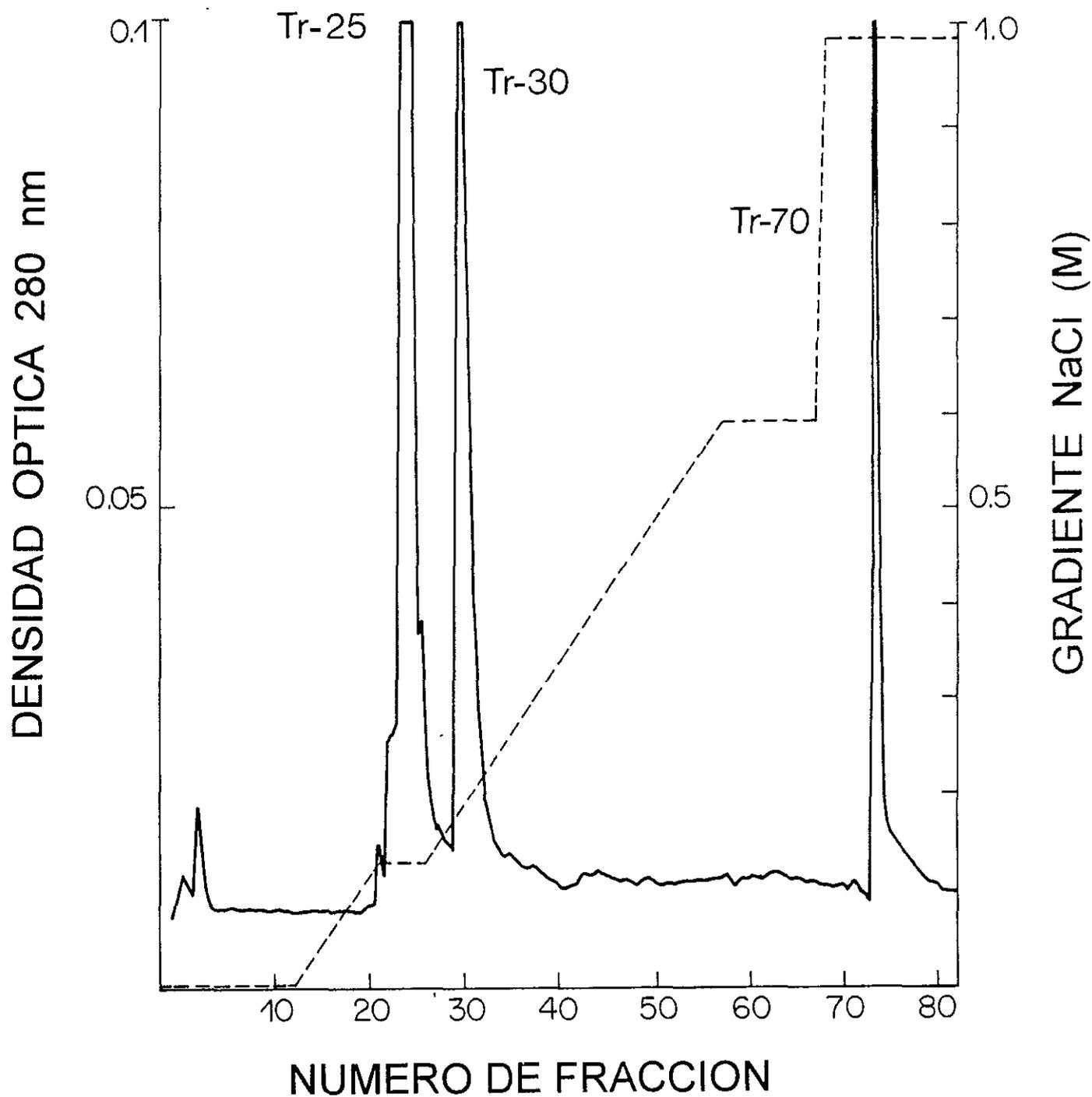


Figura 10. Cromatografía de intercambio iónico. La fracción eluída con GalNAc en la cromatografía de afinidad se purificó por medio del sistema FPLC, utilizando una columna Mono-P HR 5/20 de Pharmacia. La muestra se disolvió en amortiguador de IMIDAZOL 10 mM pH 7.1, y se eluyó con un gradiente de NaCl 1M disuelto en el mismo amortiguador.

Los carbohidratos más importantes son la galactosa y la N-acetil-D-galactosamina, identificándose en menor proporción manosa y N-acetil-D-glucosamina.

Tabla 1. Composición de carbohidratos del receptor de ALL en timo

Residuo de azúcar	Residuo por Mol*			
	ALL Tr	ALL Tr1	ALL Tr2	ALL Tr3
Fucosa	0.0	0.0	0.0	0.0
Manosa	7.6	7.3	7.1	7.8
Galactosa	8.0	8.4	8.6	8.8
GlcNAc	4.9	5.1	5.0	5.4
GalNAc	12.2	13.4	13.0	13.0
NeuAc	1.2	1.0	1.5	1.9

Considerando un peso molecular de 70 kDa.

Composición de aminoácidos

Para analizar la composición de aminoácidos de cada una de las fracciones obtenidas por FPLC, éstas se hidrolizaron previamente y se utilizó el sistema PICOTAG de Waters para la derivación de los aminoácidos. La composición de aminoácidos y la cantidad relativa de cada uno de ellos, dado en número de residuos por mol, de las tres fracciones es muy similar, ver (Tabla 2).

Tabla 2. Composición de aminoácidos del receptor purificado por cromatografía de afinidad y de las fracciones Tr1, Tr2, Tr3 obtenidas por FPLC *

Aminoácido	Total	Tr1	Tr2	Tr3
Asp	33.2	50.8	36.9	50.9
Glu	47.2	67.5	98.1	106.6
Ser	42.1	57.6	130.1	101.7
Gly	43.1	210.9	138.8	161.6
Arg	5.8	13.9	2.9	-
Thr	15.7	15.7	20.6	9.6
Ala	21.0	1.6	51.0	35.3
Pro	45.5	38.6	42.7	27.1
Tyr	19.1	6.9	3.0	2.3
Val	3.6	21.6	16.4	14.3
Ile	17.5	18.5	11.8	10.3
Leu	32.6	30.3	17.4	20.8
Phe	15.2	72.2	28.0	36.2
Lys	29.2	15.7	13.4	20.0
His	47.8	-	12.2	11.9
Met	26.8	-	2.5	1.8

* Número de residuos por mol, considerando un peso molecular de 70 kDa

Determinación del amino terminal.

El amino terminal del receptor tímico para ALL, purificado por cromatografía de afinidad se encuentra bloqueado. Se realizaron cuatro intentos en diferentes muestras purificadas con el mismo procedimiento obteniéndose con el mismo resultado. Las muestras hidrolizadas por calentamiento fueron analizadas en el secuenciador automático y se identificaron diversos residuos de aminoácidos entre los más abundantes glicina y serina, como se demuestra en la composición. lo que confirma que el grupo amino de esta proteína se encuentra bloqueado.

VIII. DISCUSION

La glicosilación de proteínas mediante enlaces de tipo O-glicosídico es un proceso enzimático que se realiza en el aparato de Golgi, en donde por la acción de glicosiltransferasas se adiciona N-acetil-D-galactosamina a residuos de serina o treonina. La O-glicosilación fue asociada hace algunos años con estadios de inmadurez, cuando Reisner, *et al.* (1976) identificaron poblaciones de timocitos en la corteza tímica que fueron reconocidas por la lectina de cacahuete (PNA), específica para residuos de galactosa presentes en los O-glicanos. A partir de entonces, la identificación de estructuras reconocidas por esta lectina en diversos tejidos se relacionó con procesos de inmadurez (Maekawa y Nishimune, 1985) y posteriormente se amplió esta relación con procesos de transformación cancerosa (Singhal y Hakamori, 1990; Saitoh *et al.*, 1991). Sin embargo, hasta hace poco tiempo se ha despertado el interés acerca de la posible función de las estructuras O-glicosiladas en la superficie de diferentes grupos celulares. En particular, se ha observado que durante la maduración de los linfocitos T se presenta una expresión variable de O-glicanos (Wu, *et al.*, 1997), la cual puede ser influenciada por la expresión tanto de las glicosiltransferasas responsables, como del sustrato específico, (Johnson, *et al.*, 1989; Baum, *et al.*, 1996).

El desarrollo y maduración de los linfocitos T se llevan a cabo dentro del timo. En este órgano se encuentran tres poblaciones principales de células, que representan etapas diferentes en el desarrollo de las células T. Estas poblaciones son reconocidas comúnmente por la expresión de los co-receptores CD4 y CD8. Las células dobles negativas, CD4-CD8-, localizadas en la región subcapsular y

en la parte exterior de la corteza, corresponden a la población mas temprana o menos diferenciada. Las células dobles positivas CD4+CD8+, se encuentran hacia el centro de la corteza y constutuyen la subpoblación que está sujeta a los procesos de selección dentro de este órgano. Por último, en la médula tímica se encuentra localizada una subpoblación de células simples positivas, CD4+CD8- o CD4-CD8+, las cuales están en las últimas etapas de maduración. De acuerdo a los resultados que se obtuvieron, la lectina de amaranto (ALL) reconoce un porcentaje de 5.6 ± 0.9 de las células totales del timo. Al hacer la caracterización fenotípica de esta subpoblación se encontró que presentaban los marcadores CD4+ y CD8+, en un 75% y un 11%, respectivamente. Al realizar el doble marcaje con anticuerpos dirigidos contra estas dos moléculas de superficie se mostró que las células ALL+ son simples positivas, es decir, CD4+CD8- o CD4-CD8+. El marcaje realizado *in situ* con la lectina de amaranto reveló que los timocitos que son reconocidos por la lectina se localizan en la región medular del timo. De acuerdo a las características fenotípicas que presentaron las células ALL+ y a su localización, se postula que se trata de una subpoblación que ha superado los procesos de selección y que se halla en las últimas etapas de maduración. Considerando que el 12% de las células CD4+ presentes en timo son células que han alcanzado su madurez, es importante hacer notar que aproximadamente un 30% de ellas son reconocidas por la lectina de amaranto.

Al realizar los ensayos de localización *in situ* con las lectinas de amaranto (ALL) y cacahuate (PNA) se confirmó que PNA se une principalmente a la región cortical del timo en tanto ALL se localiza de forma preferente en la médula (Figs. 1

y 2). De esta manera, es importante hacer notar que la población reconocida por ALL es diferente a la que reconoce PNA, no obstante que ambas lectinas unen al disacárido Gal β 1,3GalNAc, el cual se encuentra en el antígeno T. La diferencia en el reconocimiento celular por parte de ambas lectinas se puede explicar por el sitio de interacción de cada una de ellas con el disacárido unido al péptido, Gal β 1,3GalNAc α 1,O-Ser/Thr.

La lectina de amaranto se une al antígeno T (Gal β 1,3GalNAc α 1,O-Ser/Thr) por interacción con los grupos N-acetilo del carbono 2 e hidroxilo del carbono 4 de la GalNAc, ALL también interactúa con el hidroxilo del carbono 4 de la galactosa y muy posiblemente con un hidroxilo cercano perteneciente a la serina o a la treonina de la cadena peptídica (Zenteno, *et al.*, 1992); es decir, además de interactuar con la porción interna del disacárido que es la N-acetil-D-galactosamina unida al péptido, la lectina interactúa con los residuos de aminoácido cercanos al sitio de glicosilación. Debido a que el ligando de la lectina de amaranto se encuentra en el lugar donde se une el oligosacárido a la cadena peptídica, es posible que la cercanía de otras cadenas sacarídicas obstaculice el acceso de la lectina y por tanto inhiba el reconocimiento del ligando por parte de la lectina. Otra glicoproteína fuertemente O-glicosilada, como la mucina estomacal, no posee la capacidad para inhibir la actividad aglutinante de la lectina de amaranto (Zenteno, *et al.*, 1992), lo que confirma que la especificidad de esta lectina está dirigida hacia GalNAc presente en receptores específicos. Por el tipo de interacción que presenta ALL con el antígeno T, la unión de ácido siálico al disacárido no impide el reconocimiento por ALL, aunque sí disminuye su

afinidad por ella. Se ha observado que glicoproteínas con ácido siálico como la fetuína y la mucina submaxilar ovina y bovina inhiben efectivamente la actividad de la lectina, sin embargo, la eliminación de ácido siálico provoca un incremento importante de su capacidad inhibitoria. Por lo anterior, la lectina de amaranto puede unirse a timocitos que expresen O-glicanos con los antígenos sialil-T o disialil-T en sus glicoproteínas de membrana, en las cuales el ácido siálico está unido en enlace α 2-6 a la N-acetil-D-galactosamina y α 2-3 a la galactosa.

Por su parte, la PNA se une al antígeno T por interacción con los grupos hidroxilo 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 la GalNAc. Al encontrarse sialilado el disacárido se hace inaccesible a la unión con la lectina. (Pereira, *et al.*, 1976; Swamy, *et al.*, 1991).

Las células reconocidas por la lectina de amaranto se encuentran en la médula del timo (Figs. 2 y 3) y son células simples positivas, ya sea CD4+CD8- o CD8+CD4+. Tanto el fenotipo como su localización indican que se trata de células maduras, o bien, que se encuentran en las últimas etapas de maduración. El hecho de que ALL reconozca también a algunas células interdigitantes (Figs. 5 y 6) y de que en algunas de las preparaciones éstas se hayan observado rodeadas de timocitos CD4+, podría estar sugiriendo que el oligosacárido presente en el receptor para ALL se encuentra tanto en la células interdigitantes como en los timocitos y juega un papel en la adhesión o en la comunicación entre ambas poblaciones.

En estudios recientes (Wu *et al.*, 1996), acerca de las glicoproteínas presentes en timocitos murinos que son reconocidas por la lectina de cacahuete, se ha observado que PNA se une por lo menos a 6 de ellas, de las cuales han sido identificadas CD43, CD45 y las cadenas α y α' de CD8; en los lisados celulares de timocitos murinos precipitados con la lectina y separados por medio de electroforésis se observan bandas con pesos de 55, 65 y 150; el péptido de 55 kDa se encuentra asociado a CD8. En los ensayos electroforéticos realizados en el presente trabajo con el receptor purificado para ALL se observó una sola banda que corresponde a un peso molecular de 70 kDa (Fig. 8). El peso molecular del receptor de amaranto no coincide con el de ninguna de las glicoproteínas reconocidas por la lectina PNA. En nuestro estudio, se descartó el que la leucosialina (CD43) sea el receptor para ALL, a pesar de que es una glicoproteína con más de 80 sitios susceptibles de ser O-glicosilados (Shelley, *et al.*, 1990) y por tanto tiene muchos sitios que pueden ser reconocidos por la lectina de amaranto. CD43 es un receptor que posee un peso molecular que va de 95-135 kDa, cuyo precursor no glicosilado pesa 52 kDa; la diferencia en el peso de las distintas isoformas está determinada por los diferentes grados de glicosilación (Fukuda, 1991). En el análisis de la transferencia tratada con anticuerpos específicos para CD43 (Fig. 9), se observó que ninguno de éstos reconoció la banda de 70 kDa correspondiente al receptor para ALL. Por otro lado, en la transferencia incubada con la lectina de amaranto (Fig. 9) se observó que ésta no reconoció ninguna banda correspondiente a alguno de los pesos moleculares reportados para la leucosialina, que van de 95 a 135 kDa (Fukuda, 1991). En

cuanto a los carbohidratos encontrados en el receptor para ALL, la porción sacarídica de éste corresponde al 30% del peso total, con una composición de galactosa, GalNAc y NeuNAc en una proporción de 2:3:0.3, además presenta residuos de manosa y GlcNAc en proporción 2:1. La proporción de GalNAc encontrada es menor a la reportada para la leucosialina y se aprecia un número mayor de residuos de manosa y GlcNAc (Tabla 1), en proporción 2:1, de lo reportado para CD43, el cual posee un solo sitio N-glicosilado. El marcador CD45 es otra glicoproteína con dominios de mucina, es decir, con tramos del péptido donde se presentan varios aminoácidos sustituidos por O-glicosilación (Johnson *et al.*, 1989). Los pesos moleculares de sus diferentes isoformas que van de 180 a 220 kDa (Johnson *et al.*, 1989) están por arriba del peso molecular del receptor para ALL. En los estudios sobre la especificidad de ALL (Zenteno *et al.*, 1992), se ha identificado que la proteína reconocida por la lectina sobre los eritrocitos es la glicoforina, la cual posee 13 residuos de aminoácidos O-glicosilados y solo tres que son N-glicosilados; de acuerdo a la proporción de azúcares, el receptor identificado en el timocito es semejante a esta proteína.

Es evidente que las diferencias demostradas por las lectinas ALL y PNA en el reconocimiento de un oligosacárido sobre las células se debe a la organización estructural del receptor. También se han reportado diferencias de este tipo en otras lectinas (Debray, *et al.*, 1981), como la concanavalina A (Con A) y *Lens culinaris*, las cuales son inhibidas eficazmente por α -manósidos. Sin embargo en presencia de secuencias oligosacáridicas o de glicoproteínas se comportan de manera totalmente diferente, de tal forma que la lectina de *L. culinaris* requiere la

participación de azúcares como la L-fucosa. Lo anterior indica, que tanto las lectinas como sus receptores requieren de una organización tridimensional específica en el momento de la interacción. En el caso de la lectina de amaranto, se ha demostrado que ésta interactúa con los grupos hidroxilos de la serina presente en la porción peptídica de su receptor en eritrocitos; es muy probable que esto mismo ocurra en la interacción de ALL con su receptor sobre el timocito. Por todo lo dicho anteriormente, se postula que el receptor para ALL sobre la superficie de los timocitos se trata de un receptor nuevo, con una estructura particular que le permite ser reconocido por la lectina. Para confirmar esto será necesario hacer estudios de secuencia de la proteína sobre la cual se encuentran los azúcares que unen ALL.

La separación del receptor para ALL por medio de intercambio aniónico generó tres fracciones que fueron eluidas con diferente fuerza iónica (Fig. 10). Al analizar la composición de aminoácidos de estas fracciones se observó un patrón muy similar en cuanto a la cantidad de residuos/mol de cada una de ellas por lo que se considera que se trata de tres isoformas de la misma glicoproteína. La cantidad de residuos de serina y treonina en la proteína indica que podría tratarse de una glicoproteína susceptible de ser reconocida por la lectina de amaranto, debido a la presencia de oligosacáridos unidos mediante enlaces O-glicosídicos a la cadena peptídica. La existencia de diferencias en el grado de sialilación de cada fracción purificada (Tabla 1) sugiere que éstas son la razón principal en la interacción con la columna de intercambio iónico, debido a que estos grupos poseen carboxilos que a pH neutro se encuentran ionizados. Esto también podría

indicar que el diferente grado de sialilación del receptor para amaranto refleja distintos estadios de diferenciación de las células que lo presentan.

Los procesos de glicosilación requieren de un control estricto por medio de las glicosiltransferasas, aunque los mecanismos por los cuales se lleva a cabo este control no han sido bien dilucidados, particularmente en las células tímicas. Se ha observado que la expresión del substrato específico de las glicosiltransferasas también es importante en la expresión final de estructuras oligosacáridicas sobre la superficie celular. Existen datos acerca de la existencia de una serie de eventos de glicosilación durante la ontogenia de los linfocitos T que permiten identificar a las células que han madurado y han sobrepasado las barreras de la selección negativa (Pulido y Sánchez-Madrid, 1990; Gillespie, *et al.* 1993; Baum, *et al.*, 1995; Baum, *et al.* 1996; Wu, *et al.*, 1997). De esta manera, se considera que la glicosilación y particularmente la O-glicosilación tiene un papel preponderante en la diferenciación de los timocitos. El que la lectina de amaranto tenga la capacidad para reconocer timocitos medulares, sugiere que: a) la molécula de superficie reconocida por esta lectina podría poseer una característica particular, no tanto por su porción sacarídica sino por la porción peptídica que será glicosilada; b) existen enzimas glicosídicas particulares para el receptor del amaranto y c) existen enzimas glicosídicas en la médula del timo con propiedades o especificidad diferente a la de corteza.

En estudios recientes de reconocimiento de la lectina de amaranto con otros grupos celulares, se ha demostrado que algunas estirpes celulares como los macrófagos (Maldonado, *et al.*, 1998 en prensa) son reconocidos por la lectina de

amaranto solo cuando se encuentran en reposo y no han sido activados, de tal forma que existe una relación inversa entre los receptores para amaranto y algunos marcadores de activación como Mac 2 (β -integrina). Lo anterior confirma que los receptores O-glicosilados para amaranto se encuentran en células maduras o en las últimas etapas de maduración pero que no han sido activadas. En el caso del humano, los linfocitos T periféricos reconocidos por ALL presentan el marcador CD45RA+, lo cual sugiere que se trata de células maduras que no han tenido contacto con el antígeno, es decir, células vírgenes.

Nuestros datos concuerdan con la idea cada vez más difundida de que las secuencias específicas de los oligosacáridos participan en diferentes funciones durante el desarrollo de los timocitos y de que la regulación de la expresión de glicosiltransferasas, en particular las sialiltransferasas, añade otro nivel de complejidad a los mecanismos de control del fenotipo de la superficie celular y puede ser un medio efectivo de modular las interacciones celulares durante la maduración, selección y migración de los timocitos. Sin embargo, existen pocos datos acerca del papel de la O-glicosilación en los mecanismos antes mencionados; y es por esta razón que se considera importante el uso de lectinas que reconozcan este tipo de oligosacáridos, en el estudio de las interacciones celulares, en particular entre las células tímicas.

IX. CONCLUSIONES

•La lectina de amaranto (ALL) reconoce aproximadamente el 30% de los timocitos maduros, principalmente con el fenotipo CD4+CD8-; la localización medular de las células reconocidas indica que se trata de células maduras, o bien que se encuentran en las últimas etapas de maduración.

•De acuerdo a los resultados obtenidos en el presente trabajo, se propone que el receptor reconocido por ALL es nuevo: i) el peso molecular de la proteína purificada con ALL es de 70 kDa; este peso no coincide con el de ninguna de las glicoproteínas O-glicosiladas conocidas, presentes en la superficie de timocitos murinos. ii) la proteína reconocida por ALL sobre los timocitos murinos no es reconocida por anticuerpos dirigidos contra la leucosialina. iii) el porcentaje de residuos de galactosa y N-acetil-D-galactosamina presente en el receptor de amaranto, indica que la glicoproteína reconocida por ALL presenta una proporción menor de O-glicanos que la leucosialina, por lo que debe tratarse de una proteína con una densidad menor de residuos O-glicosilados.

•La presencia de células interdigitantes ALL+ permite suponer que la glicoproteína reconocida por la lectina participa en fenómenos de reconocimiento y/o adhesión entre estas células y los timocitos.

•La lectina de amaranto es un marcador eficaz de subpoblaciones de timocitos, particularmente de poblaciones maduras que no han sido activadas.

X. REFERENCIAS

- Axelsson, B., Youseffi-Etemad, R., Hammarström, S., and Perlmann, P. (1988). Induction of aggregation and enhancement of proliferation and IL-2 secretion in human T cells by antibodies to CD43. *J. Immunol.* 141: 2912-2917.
- Baum, L.G., Pang, M., Perillo, N.P., Wu, T., Delegeane, A., Uittenbogaart, C.H., Fukuda, M., and Selhamer, J.J. (1995). Human thymic epithelial cells express an endogenous lectin, galectin-1, which binds to core 2 O-glycans on thymocytes and lymphoblastoid cells. *J. Exp. Med.* 181: 877-887.
- Baum, L.G., Derbin, K., Perillo, N.L., Wu, T., Pang, M., and Uittenbogaart, C.H. (1996). Characterization of terminal sialic acid linkages on human thymocytes. *J. Biol. Chem.* 271: 10793-10799.
- Bidlingmeyer, B.A.; Cohen, S.A., and Tarvin T.L. (1984). Rapid analysis of amino acids using pre-column derivatization. *J. Chromatogr.* 33: 93-104.
- Bierer, B.E., Sleckman, B.P., Ratnofsky, S.E., and Burakoff, S.J. (1989). The biologic roles of CD2, CD4, and CD8 in T cell activation. *Annu. Rev. Immunol.* 7: 579.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid sensitive method for quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein dye-binding. *Anal. Biochem.* 37: 157-223.
- Bretscher, P.A., and Cohn, M. (1970). A theory of self-nonsel self discrimination. *Science* 169:1042-1049.
- Cayabyab, M., Phillips, J.H., and Lanier, L.L. (1994). CD40 preferentially costimulates activation of CD4+ T lymphocytes. *J. Immunol.* 152: 1523-1531.

- Croft, M., and Dubey, C. (1997). Accessory molecule and costimulation requirements for CD4 T cell response. *Crit. Rev. Immunol.* 17: 89-118.
- Damle, N.K., Klussman, K., Linsley, P.S., and Aruffo, A. (1992). Differential costimulatory effects of adhesion molecules B7, ICAM-1, LFA-3, and VCAM-1 on resting and antigen primed CD4+ lymphocytes. *J. Immunol.* 148: 1985-1992.
- Debray, H., Decant, D., Strecker, G., Spik, G. And Montreuil, J. (1981) Specificity of twelve lectins towards oligosaccharides and glycopeptides related to N-glycosylproteins. *Eur. J. Biochem.* 117: 41-55.
- Dubey, C., Croft, M., and Swain, S.L. (1995). Costimulatory requirements of naive CD4+ T cells: ICAM-1 or B7-1 can costimulate naive CD4 T cell activation but both are required for optimum response. *J. Immunol.* 155: 45-57.
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Robers, P.A., and Smith, F. (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28: 350-356.
- Fischer, e., and Brossmer, R. (1995). Sialic acid-binding lectins: submolecular specificity and interaction with siloglycoproteins and tumor cells. *Glycoconjugate J.* 12: 707-713.
- Foy, T.M., Page, D.M., Waldschmidt, T.J., Shoneveld, A., Laman, J.D., Masters, S.R., Tygrett, L., Ledbetter, J.A., Aruffo, A., Classen, E., Xu, J.C., Flavell, R.A., Oehen, S., Hedrick, S.M., and Noelle, R.J. (1995). An essential role for gp39, the ligand for CD40, in thymic selection. *J. Exp. Med.* 182: 1377-1388.
- Freeman, G.J., Boriello, F., Hodes, R.J., Reiser, H., Gribben, J.G., Ng, J.W., Kim, J., Goldberg, J.M., Hathcock, K., Laszlo, G., et al., (1993a). Murine B7-2, and

alternative CTLA-4 counter-receptor that costimulates T cell proliferation and interleukin 2 production. *J. Exp. Med.* 178: 2185-2192.

-Freeman, G.J., Gribben, J.G., Boussiotis, V.A., Ng, J.W., Restivo, V.A.J., Lombard, L.A., Gray, G.S., and Nadler, L.M. (1993b). Cloning of B7-2: a CTLA-4 counter receptor that costimulates human T cell proliferation. *Science* 262: 909-911.

-Fujii, Y., Okumura, M., Inada, K., Nakahara, K., and Matsuda, H. (1992). CD45 isoform expression during T cell development in the thymus. *Eur. J. Immunol.* 22: 1843-1850.

-Fukuda, M. (1991). Leukosialin, a major O-glycan-containing sialoglycoprotein defining leukocyte differentiation and malignancy. *Glycobiology* 1: 347-356.

-Gross, J.A., Callas, E., and Allison, J.P. (1992). Identification and distribution of the costimulatory receptor CD28 in the mouse. *J. Immunol.* 49: 380-387

-Gillespie, W., Paulson, J.C., Kelm, S., Pang, M. and Baum, L.G. (1993). Regulation of α 2,3-sialyltransferase expression correlates with conversion of peanut agglutinin (PNA)+ to PNA- phenotype in developing thymocytes. *J. Biol. Chem.* 268: 3801-3804.

-Hounsell, E.F., Davies, M.J., and Renouf, D.V. (1996). O-linked protein glycosylation structure and function. *Glycoconjugate J.* 13: 19-26.

-Jenkins, M.K., and Schwartz R.H. (1987). Antigen presentation by chemically modified splenocytes induces antigen-specific T unresponsiveness *in vitro* and *in vivo*. *J. Exp. Med.* 165: 302-319.

-Jentoft, N. (1990). Why are proteins O-glycosylated? *TIBS* 15: 291-294.

- Johnson, N.A., Meyer, C.M., Pingel, J.T., and Thomas, M.L. (1989). Sequence conservation in potential regulatory regions of the mouse and human leukocyte common antigen gene. *J. Biol. Chem.* 264: 6220-6229.
- Kaku, H., Mori, Y., Goldstein, I.J., and Shibuya, N. (1993). Monomeric, monovalent derivative of *Maackia amurensis* leucoagglutinin. Preparation and application to the study of cell surface glycoconjugates by cytometry. *J. Biol. Chem.* 268: 13237-13241.
- Kishimoto, H., Cai, Z., Brunmark, A., Jackson, M.R., Peterson, P.A., and Sprent, J. (1996). Differing roles for B7 and intracellular adhesion molecule-1 in negative selection of thymocytes. *J. Exp. Med.* 184: 531-537.
- Leahy, D.J., Axel, R., and Hendrickson, W.A. (1992). Crystal structure of a soluble form of the human T cell coreceptor CD8 at 2.6 Å resolution. *Cell* 68:1145-1162.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Lefebvre, J.C., Giordanengo, V., Limouse, M., Doglio, A., Cucchiaroni, M., Monpoux, F., Mariani, R., and Peyron, J.F. (1994). Altered glycosylation of leukosialin, CD43, in HIV-1-infected cells of the CEM line. *J. Exp. Med.* 189: 1609-1617.
- Linsley, P.S., Brady, W., Grosmarie, L., Aruffo, A., Damle, N.K., and Ledbetter, J.A. (1991). Binding of the B cell activation antigen B7 to CD28 costimulates T cell proliferation and interleukin 2 mRNA accumulation. *J. Exp. Med.* 173: 721-730.

-Maekawa, M., and Nishimune, Y. (1985). Separation of germ cells from somatic cells in mouse testis by affinity for a lectin, peanut agglutinin. *Biol. Reprod.* 32: 419-425.

-Maldonado G., Porras F., Fernández L., Vázquez L. and Zenteno E. (1994) Effect of lectins on mouse peritoneal macrophage phagocytic activity. *Immunol. Invest.* 23: 429-436.

-Mentzer, S.J., Remold-O'Donell, E., Crimmins, A.V. Bierer, B.E., Rosen, F S., and Burakoff, S.J. (1987). Sialophorin, a surface sialoglycoprotein defective in the Wiskott-Aldrich syndrome, is involved in human T lymphocyte proliferation. *J. Exp. Med.* 165: 1383-1392.

-Mrkocij, K., Kelm, S., Crocker, P.R., Schauer, R., and Berger, E.G. 1996 Constitutively hyposialylated human T-lymphocytes clones in Tn-syndrome: binding characteristics of plant and animal lectins. *Glycoconjugate J.* 13: 567-573.

-Nagata, K., Tsuji, T., Hnai, N., and Irimura, T. 1994. Role of O-linked carbohydrate chains on leukocyte cell membranes in platelet-induced leukocyte activation. *J. Biol. Chem.* 23290-23295.

-Nelson, A.J., Hosier, S., Brady, W., Linsley, P.S., and Farr, A.G. (1993). Medullary thymic epithelium express a ligand for CTLA-4 *in situ* and *in vitro*. *J Immunol.* 151: 2453-2461.

-Page, D.M., Kane, P.K., Allison, J.P., and Hedrick, S.M. (1993). Two signals are required for negative selection of CD4+CD8+ thymocytes. *J. Immunol.* 151: 1868-1880.

-Pereira, M.E.A., Kabat, E.A., Lotan, R., and Sharon, N. (1976). Immunochemical studies on the specificity of the peanut (*Arachis hypogaea*) agglutinin. *Carbohydr Res.* 51:107-118.

-Piller, F., Piller, V., Fox, R.I., and Fukuda, M. (1988). Human T-lymphocyte activation is associated with changes in O-glycan synthesis. *J. Biol. Chem.* 263: 15146-15150.

-Piller, V., Piller, F., and Fukuda, M. (1990). Biosynthesis of truncated O-glycans in the cell line Jurkat. Localization of O-glycan initiation. *J. Biol. Chem.* 265: 9264-9271.

-Piller, F., Le Deist, F., Weinberg, K.I., Parkman, R., and Fukuda, M. (1991) Altered O-glycan synthesis in lymphocytes from patient with Wiskott-Aldrich syndrome. *J. Exp. Med.* 173: 1501-1510.

-Pulido, R., and Sánchez-Madrid, F. (1990). Glycosylation of CD45: Carbohydrate composition and its role in acquisition of CD45R0 and CD45RB T cell maturation-related antigen specificities during biosynthesis. *Eur. J. Immunol.* 20: 2667-2671.

-Punt, J.A., Osborne, B.A., Takahama, Y., Sharrow, S.O., and Singer, A. (1994). Negative selection of CD4+CD8+ thymocytes by T cell receptor-induced apoptosis requires a costimulatory signal that can be provided by CD28. *J. Exp. Med.* 179: 709-713.

-Quill, H., and Schwartz, R.H. (1987). Stimulation of normal inducer T cell clones with antigen presented by purified Ia molecules in planar lipid membranes: specific induction of a long lived state of proliferation nonresponsiveness. *J. Immunol* 138: 3704-3712.

- Reisner, Y., Linker-Israeli, M., and Sharon, N. (1976a). Separation of mouse thymocytes into two subpopulations by the use of peanut agglutinin. *Cellular Immunol.* 25: 129-134.
- Reisner, Y., Ravid, A., Sharon, N. (1976b). Use of soybean agglutinin for the separation of mouse B and T lymphocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 72: 1585-1591.
- Reisner, Y., Kapoor, N., Kirkpatrick, D., Pollack, M.S., Cunningham-Randles, S., Dupont, B., Hodes, M.Z., Good, R.A., and O'Reilly, J.O. (1983). Transplantation for severe combined immunodeficiency with HLA-A, B, D, DR incompatible parental marrow cells fractionated by soybean agglutinin and sheep red blood cells. *Blood* 61: 341-348.
- Saitoh, O., Piller, F., Fox, R.I., and Fukuda, M. (1991). T-lymphocyte leukemia expresses complex branched O-linked oligosaccharides on major sialoglycoprotein, leukosialin. *Blood* 77:1491-1499.
- Sawada, M., Nagamine, J., Takeda, K., Utsumi, K., Kosugi, A., Tatsumi, Y., Hamaoka, T., Miyake, K., Nakajima, K., Watanabe, T., Sakakibara, S., and Fujiwara, H. (1992). Expression of VLA-4 on thymocytes. Maturation stage-associated transition and its correlation with their capacity to adhere to thymic stromal cells. *J. Immunol.* 149: 3517-3524.
- Schachter, H., and Brockhausen, I. (1992). The biosynthesis of serine (threonine)-N-acetylgalactosamine-linked carbohydrate moieties. In *Glycoconjugates. Composition, Structure, and function.* Eds. Allen, H.J. and Kisailus, E.C. Edit. Marcel Dekker, New York EUA. Pags. 263-332.

- Semnani, R.T., Nutman, T.B., Hochman, P., Shaw, S., and van, S.G. (1994). Costimulation by purified intercellular adhesion molecule 1 and lymphocyte function-associated antigen 3 induces distinct proliferation, cytokine and cell surface antigen profiles in human "naive" and "memory" CD4+ T cells. *J. Exp. Med.* 180: 2125-2135.
- Sharon, N., and Lis, H. (1989). Lectins as cell recognition molecules. *Science* 246: 227-234.
- Shelley, C.S., Remold-O'Donnell E., Rosen, F.S., and Whitehead, A.S. (1990). Structure of the human sialophorin (CD43) gene. Identification of features atypical of genes encoding integral membrane proteins. *Biochem. J.* 270: 569-576.
- Shimizu, Y., and Shaw, S. (1993). Mucins in the mainstream. *Nature* 366: 630-631.
- Singhal, A., and Hakamori, S. (1990). Molecular changes in carbohydrate antigens associated with cancer. *BioEssays* 12: 223-230
- Springer, T.A. (1990). Adhesion receptors of the immune system. *Nature* 340: 425-434.
- Swamy, M.J., Gupta, D., Mahanta, S.K., and Surolata, A. (1991). Further characterization of the saccharide specificity of peanut (*Arachis hypogaea*) agglutinin. *Carbohydr. Res.* 213:59-62.
- Thomas, M.L. (1989). The leukocyte common antigen family. *Ann. Rev Immunol.* 7: 339-369.
- Varki, A. (1997). Sialic acids as ligands in recognition phenomena. *FASEB J.* 11: 248-255.

- Wu, W., Harley, H.H., Punt, J.A., Sharrow, S.O., and Kearse, K.P. (1996). Identification of CD8 as a peanut agglutinin (PNA) receptor molecule on immature thymocytes. *J. Exp. Med.* 184: 759-764.
- Wu, W., Punt, J.A., Granger, L., Sharrow, S.O., and Kearse, P. (1997). Developmentally regulated expression of peanut agglutinin (PNA)-specific glycans on murine thymocytes. *Glycobiology* 7: 349-356.
- Zanetta, J.P., Beckenridge, W.C. and Vincendon, G. (1972). Analysis of monosaccharides by gas liquid chromatography of the O-methyl glycosides as trifluoroacetates derivatives. Applications to glycoproteins and glycolipids. *J. Chromatogr.* 69: 291-304.
- Zenteno, E., Ochoa, J.L., Parra, C., Montaña, L.F., Rayon I., Maldonado, G., Ruiz. B. and Carvajal, R. (1985). Mitogenic, immunosuppressive and phagocytic activity of *Macharocereus eruca* and *Amaranthus leucocarpus*. En *Lectins-Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry*. Vol. IV. Eds. Bog-Hansen T.C., Breborowicz. J. Walter de Gruyter, Berlin. Pags. 537-546.
- Zenteno, E., Lascurain, R., Montaña, L.F., Vázquez, L., Debray, H., and Montreuil J. (1992). Specificity of *Amaranthus leucocarpus* lectin. *Glycoconjugate J.* 9: 204-208.