

00591

5



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA  
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

2 92845

Análisis estructural y molecular de la interacción de  
la lectina *Amaranthus leucocarpus* con su receptor

T E S I S

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

P R E S E N T A:

PEDRO ANTONIO HERNANDEZ CRUZ



MEXICO, D. F.

2001



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 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.

**ESTE TRABAJO SE REALIZO EN EL LABORATORIO 9 DEL DEPARTAMENTO  
DE BIOQUIMICA DE LA FACULTAD DE MEDICINA UNAM Y FUE  
FINANCIADO POR:**

**CONACyT No. 27609-M y 2608-N**

**DGAPA PAPITT-UNAM No. IN224598**

**PROGRAMA ECOS México-Francia No. M97B05**

**Dirección General de Estudios de Posgrado UNAM.**

*A MIS PADRES  
PEDRO Y JULIA*

Gracias por ser la luz en mis tinieblas,  
por ser la paz en mi soledad, por ser el pan de vida,  
la alegría de mi corazón.  
Gracias por darme su apoyo,  
su cariño y sobre todo su amor.

*A MIS HERMANAS  
ANA MARÍA, USOLETA Y SAQRALDQ*  
Gracias por estar conmigo en todo momento.

*A PATRICIA*

Un sueño es el despertar de un anhelo,  
la llama viva que enciende al alma,  
la paz de quien busca consuelo,  
un sueño es tú mirar, tú suspirar,  
pero tú y yo, amor mío, estamos juntos,  
juntos desde la ropa a las raíces,  
juntos de otoño, de agua, de fuego y aire,  
hasta ser sólo tú, sólo yo, juntos hasta  
llegar a un beso  
TQM.

*A EDGAR*

Por brindarme la oportunidad de realizar  
este trabajo.

Especialmente dedicada a todos los compañeros del laboratorio, con quien me unen lazos muy fuertes de amistad y cariño, al Dr. Chávez, por la manzana nuestra de todos los días, a mamá Conch, con respeto y cariño; a Flor y Gisela por ser las XX, a Ali por la dieta rica y sabrosa de todos los días.

A todos los cuates del INER, encabezados por Richardin y sus pato aventuras, a Blanca I, Maca y Jonhatan, por ser tan alegres, a la traviesa de Patricia Rollosica y en especial con mucho cariño a la niña de los gatos Blanca II

A mis inseparables amigos Billy, Pepe, Erick y Leonardo  
Y A TODOS LOS QUE ME FALTARON.

## ÍNDICE GENERAL

	Página
ABSTRACT	1
RESUMEN	2
INTRODUCCIÓN	3
JUSTIFICACIÓN	11
HIPÓTESIS	12
OBJETIVOS GENERALES	12
OBJETIVOS PARTICULARES	12
MATERIALES Y METODOLOGÍA	13
CAPÍTULO I	19
ESTUDIO COMPARATIVO SOBRE LA PURIFICACIÓN DE LA LECTINA <i>Amaranthus leucocarpus</i> Sin. <i>hypocondriacus</i> .	
CAPÍTULO II	38
CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DE LA LECTINA <i>Amaranthus     leucocarpus</i> POR ANÁLISIS PROTEÓMICO	
CAPÍTULO III	63
ESPECIFICIDAD DE LA LECTINA DE <i>Amaranthus leucocarpus</i> HACIA O-GLICOPEPTIDOS.	
CAPÍTULO IV	85
AISLAMIENTO DEL RECEPTOR DE LA LECTINA DE <i>Amaranthus     leucocarpus</i> EN TIMOCITOS DE RATON CD4+	
CAPÍTULO V DISCUSIÓN GENERAL	96
CAPÍTULO VI CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	101
BIBLIOGRAFÍA	102

## ABREVIATURAS.

ALL	Lectina de <i>Amaranthus leucocarpus</i> .
ALL-B	Lectina de <i>Amaranthus leucocarpus</i> biotilada.
ALL-FTC	Lectina de <i>Amaranthus leucocarpus</i> floureceinada
ALLTr	Receptor en timocitos de la lectina de <i>Amaranthus leucocarpus</i> .
ACA	Lectina de <i>Amaranthus caudatus</i> .
Con A	Lectina de <i>Canavalia ensiformis</i> .
CRD	Dominio de reconocimiento a carbohidratos.
ELISA	Inmunoensayo enzimático en fase sólida
FPLC	Cromatografía líquida de rápida resolución.
Fuc	Fucosa.
Gal	Galactosa.
GalNAc	N-acetil-galactosamina.
Glc	Glucosa.
GlcNAc	N-acetil-glucosamina.
IgA	Inmunoglobulina A.
kDa	Kilodaltons.
LOL	Lectina de <i>Lothyrus ochrus</i> .
MALDI -TOF	Desabsorción láser matriz asistida e ionización de tiempo de vuelo.
Man	Manosa.
M	Antígeno M de la glicoforina A.
N	Antígeno N de la glicoforina A.
PNA.	Lectina de <i>Arachis hypogaeae</i> .
Xil	Xilosa
WGA	lectina de germen de trigo

## ABSTRACT

*Amaranthus leucocarpus* lectin (ALL) is a homodimeric glycoprotein of 35 kDa per subunit, which interacts specifically with N-acetyl-galactosamine (GalNAc). The lectin is composed of three isoforms with pI at 4.8, 4.9 and 5.2. The Circular Dichroism (CD) analysis indicated that the secondary structure of ALL contains 45% of  $\beta$ -sheet and 5% of  $\alpha$ -helix. The amino acid sequence of the purified lectin and its isoforms was determined by MALDI-TOF (Matrix assisted laser desorption ionization-time of flight) from peptides obtained after trypsin digestion. The three isoforms showed different rates (80 to 83%) of homology with a high nutritional value protein from *A. hypocondriacus*. The ALL has N-glycosidically linked glycans of the oligomannosidic type and, in minor proportion of the N-acetyllactosaminic type. The fine specificity of *Amaranthus leucocarpus* lectin was evaluated using different glycoproteins and neo-glycopeptides that contain Gal $\beta$ 1-3 GalNAc $\alpha$ 1-0 Ser/Thr or GalNAc $\alpha$ 1-0 Ser/Thr in their structure by ELISA and capillary electrophoresis. Fetuin and the ovine submaxillary mucin were the glycoproteins mainly recognized by ALL in the ELISA assays, while the neoglycopeptide TTSAPTTS, with two residues of GalNAc, interacted with the lectin and modified its time of migration in capillary electrophoresis assays. Analysis of the glycoprotein sequences with inhibitory activity for the lectin, showed different pattern in the O-glycosylation, which confirms that *A. leucocarpus* lectin recognizes conformation and spaces between residues of O-glycans in the oligosaccharides structures while the cluster of O-Glycans interfered with the interaction of the lectin. The receptor for ALL was purified from murine medullar thymocytes and it is a 70 kDa glycoprotein that contains 20% of sugar by mass. The ALL-receptor showed low homology with other lymphocyte phenotype markers, suggesting that the receptor for ALL in thymocytes could be considered a novel phenotypic marker specific for T cells. Our results indicated that the lectin from *Amaranthus leucocarpus* could be considered a useful tool for the study and characterization of the biological role of O-glycosidically linked glycans.



## RESUMEN

La lectina de *Amaranthus leucocarpus* (ALL) es una glicoproteína de 35 kDa por subunidad que interactúa específicamente con GalNAc y está compuesta por tres isoformas con un punto isoelectrónico de 4.8, 1.9 y 5.2. La estructura secundaria de la lectina ALL obtenida mediante análisis de dicroísmo circular, mostró que la lectina contiene un 45% de hojas plegadas  $\beta$  y un 5% de hélices alfa. La secuencia de aminoácidos de la lectina y sus isoformas se determinó mediante MALDI-TOF, utilizando péptidos obtenidos mediante digestión con tripsina. Las tres isoformas presentan un 80-85% de homología con una proteína de alto valor nutricional aislada de la semilla de *Amaranthus hypocondriacus*. La lectina ALL, presenta estructuras N-glicosídicas del tipo oligomanosídico y lactosamínico. La especificidad fina de la lectina de *Amaranthus leucocarpus* se evaluó utilizando diferentes glicoproteínas y neoglicopéptidos que presentan Gal $\beta$ 1-3 GalNAc $\alpha$ 1-0 Ser/Thr o GalNAc $\alpha$ 1-0 Ser/Thr en su estructura mediante ELISA y electroforesis capilar. La fetuina y la mucina submandibular ovina fueron reconocidas de manera importante en los ensayos de ELISA. El péptido TTSAPTTS, con dos residuos de GalNAc, desplazó significativamente el tiempo de migración de la lectina en los ensayos de electroforesis capilar. El análisis de las secuencias de glicoproteínas con actividad inhibitoria, demuestra la presencia de diferentes patrones de O-glicosilación, lo cual confirma que la lectina de *A. leucocarpus* reconoce conformación y espacios entre las estructuras O-glicosídicas sin embargo estas estructuras agrupadas en grupos compactos (clusters) interfieren con la interacción de la lectina. El receptor de la lectina ALL obtenido de timocitos de ratón y es una glicoproteína de 70kDa con un 20% (p/p) de carbohidratos. El receptor posee baja homología con otros marcadores fenotípicos, lo que sugiere que el receptor de ALL puede ser considerado un nuevo marcador específico para células T. Nuestros resultados confirman que la lectina *Amaranthus leucocarpus* es un reactivo útil para el estudio de las características y la función de las proteínas O-glicosiladas.

## INTRODUCCION

Las lectinas son proteínas o glicoproteínas de origen no inmune que reconocen de manera específica carbohidratos de la superficie celular o en suspensión, aglutinan células y precipitan glicoconjugados<sup>1</sup>. Las lectinas no poseen actividad enzimática y no son producto de una respuesta inmune<sup>1,2</sup>. Estas proteínas se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza, y han sido identificadas en diversos organismos como virus, bacterias, hongos, plantas, así como en vertebrados superiores. Aunque varias de estas proteínas poseen especificidad por estructuras sacarídicas semejantes, presentan actividades biológicas, diversas como son: la aglutinación de eritrocitos de diferentes especies<sup>1</sup>, la estimulación mitógena de linfocitos<sup>2</sup> e inhibición de la fagocitosis<sup>3,4</sup>. Debido a la capacidad de estas proteínas para interactuar con células de la respuesta inmune, algunas lectinas poseen efectos inmunosupresores, otras también son tóxicas, inhiben el crecimiento de células tumorales y participan en la adhesión celular<sup>4</sup>. Todas las actividades biológicas reportadas para las lectinas tienen en común el reconocimiento de un receptor de carácter oligosacarídico<sup>3-8</sup>.

Las lectinas en vegetales pueden tener diversas funciones, participan en las interacciones entre las bacterias fijadoras de nitrógeno con la raíz de plantas de leguminosas, poseen actividad mitógena, pueden tener efectos protectores en contra de la acción de patógena de ciertos microorganismos como es el caso de los nemátodos herbívoros; mientras que en diversas especies animales se han reportado evidencias de que las lectinas participan en fenómenos tales como el reconocimiento y en la eliminación de glicoproteínas del sistema circulatorio<sup>5,9-11</sup>, así como células envejecidas, células tumorales<sup>6,13</sup> y microorganismos<sup>6,8,13</sup>, mediante un proceso de opsonización y la participación de células con actividad fagocítica<sup>12,13</sup>. Las lectinas también participan en procesos de reconocimiento que permiten la diferenciación celular<sup>14</sup>, la organogénesis<sup>14</sup>, la migración de linfocitos<sup>5,6</sup> y como factores determinantes en la metástasis<sup>5,6</sup>.

Las lectinas aisladas de diversas fuentes vegetales o animales, han demostrado ser herramientas útiles en la investigación biomédica, en donde se les utiliza para la tipificación de grupos sanguíneos y bacterianos<sup>3,9</sup>. Recientemente, se ha propuesto su utilización como auxiliares en el trasplante de médula ósea de pacientes con inmunodeficiencias severas<sup>5,15</sup>. La actividad mitógena de algunas lectinas, ha sido muy importante para el análisis de

los eventos bioquímicos que se desarrollan durante la estimulación de los linfocitos *in vivo* y son aplicadas en la valoración de la actividad celular de diferentes enfermedades infecciosas. Las lectinas también han sido empleadas en la separación de poblaciones celulares<sup>16</sup>, de igual forma estas proteínas inmovilizadas en un soporte inerte son utilizadas para purificar macromoléculas que contienen carbohidratos, por ejemplo glicoproteínas, enzimas, hormonas y diversos receptores de membrana, entre los que destacan el receptor para la insulina.

Una gran variedad de lectinas han sido aisladas y caracterizadas de diferentes especies vegetales y/o animales, estos estudios han permitido identificar que existe una gran similitud estructural entre las lectinas de una misma familia, en algunos casos se ha demostrado que las lectinas son capaces de reconocer carbohidratos en una determinada conformación o secuencia de carbohidratos, es decir que las características de especificidad por estructuras sacarídicas también es altamente conservada entre proteínas de una misma especie. La lectina de *Canavalia ensiformis* (Con A) y de *Arachis hypogaeae* (PNA) pueden reconocer una variación a nivel del carbono 4 del monosacárido con el que interactúan. Estas lectinas tienen la capacidad para diferenciar epímeros, es decir, son capaces de diferenciar entre galactosa y la glucosa ya que mientras el hidroxilo de la galactosa en C4 se encuentra en posición axial, reconocido por la lectina de PNA, el equivalente en la glucosa se encuentra en posición ecuatorial; reconocido por la lectina de ConA, pudiendo tolerar, en ambos casos variaciones en el C2 del monosacárido. Existen lectinas cuya especificidad está dada por la conformación del carbono anomérico como la lectina de *Canavalia ensiformis* (Con A) y la lectina de *Lens culinaris* (LCA), ambas reconocen preferentemente a los  $\alpha$ -manósidos en relación a su contraparte los  $\beta$ -manosidos. Algunas lectinas como la de *Helix pomatia* tienen la capacidad de reconocer las formas anómericas  $\alpha$  y  $\beta$ <sup>17</sup>. Las lectinas además de presentar una afinidad conformacional por monosacáridos; presentan una afinidad por estructuras oligosacarídicas más complejas. Este reconocimiento puede ser en posición terminal o intermedia, así por ejemplo las lectinas Con A y LCA consideradas específicas para  $\alpha$ -manósidos tienen afinidad por estructuras oligosacarídicas similares pero no idénticas (Figura 1). Ambas lectinas reconocen estructuras oligosacarídicas unidas por enlaces de tipo N-glicosídico a una asparagina (Asn) de la cadena protéica, sin embargo la sustitución del anillo trimanosídico característico de N-

glicanos por grupos del tipo lactosaminico ( $\text{Gal}\beta 1,4 \text{GlcNAc}$ ), o la adición de una fucosa (Fuc) no es tolerado por la lectina Con A, sin embargo la lectina LCA interactúa con estas estructuras con gran especificidad.

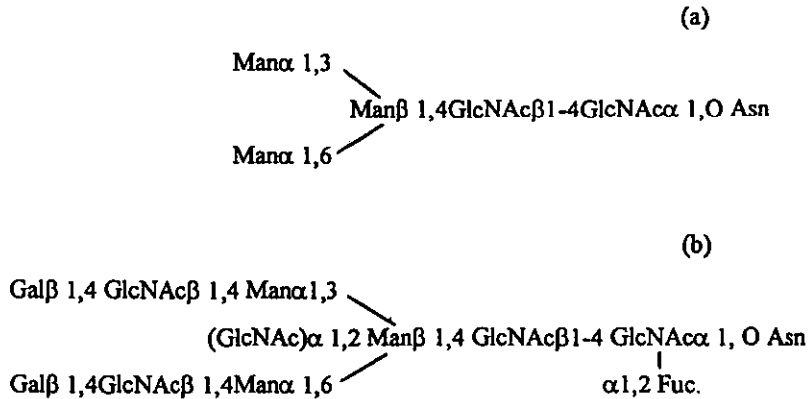


Figura 1. Estructuras oligosacáridicas específicas para las lectinas Con A(a) y LCA(b).

Las lectinas aisladas de la familia de las leguminosas, poseen entre un 50-60% de homología en sus secuencias de aminoácidos<sup>18</sup>, en sus estructuras secundarias<sup>19,20</sup>, así como en organización tridimensional<sup>21,22</sup>. Una de las características estructurales ampliamente estudiada, es el dominio de reconocimiento a carbohidratos (CRD)<sup>23</sup>, que está compuesto por aproximadamente 200 aminoácidos, altamente conservados en lectinas de la misma familia y en donde se establece la interacción carbohidrato-lectina. En general poseen una constante de disociación entre 0.1 a 1 mM, sin embargo, una característica importante es que la especificidad de las lectinas, está dirigida además de monosacáridos (primer sitio de reconocimiento) hacia estructuras oligosacáridicas más complejas<sup>24</sup>. Las exolectinas que poseen especificidad por un residuo no reductor situado en posición terminal, como sería el caso de la lectina *Phaseolus lunatus*, específica por la GalNAc determinante del grupo sanguíneo A. Por el contrario, las lectinas que poseen un sitio de reconocimiento hacia secuencias sacarídicas específicas, como la Con A, se denominan endolectinas. La interacción de las endolectinas está dirigida, generalmente hacia estructuras oligosacáridicas complejas, estas lectinas presentan constantes de disociación en el orden

micromolar, en todos estos casos, los carbohidratos interactúan con el primer y segundo sitio de reconocimiento donde se establecen las interacciones con las estructuras oligosacáridicas, (sitio extendido). La afinidad de las lectinas también aumenta debido a la multivalencia, en la cual, las subunidades de una lectina se asocian para formar dímeros o tetrameros. Por ejemplo, generalmente las unidades monoméricas de las lectinas de leguminosas tienen un peso molecular de aproximadamente 25 kDa, la mayoría están compuestos por seis hojas antiparalelas  $\beta$ -plegadas mientras que en la dimerización los constituyen 12 hojas antiparalelas  $\beta$ -plegadas, identificado en las lectinas de *Lathyrus ochrus* (LOL) y Con A<sup>25</sup>.

La organización tridimensional de estas lectinas, posee efectos biológicos distintos a otras lectinas con arreglos estructurales semejantes y existen lectinas como la de cacahuete (*Arachis hypogaea*, PNA) que presenta un arreglo tridimensional diferente al arreglo de la lectina LOL-1<sup>25</sup>. Particularmente, las lectinas obtenidas de cereales como el germen de trigo (WGA) merece un comentario diferente al de las leguminosas. En primer lugar esta lectina, a diferencia de prácticamente todas las lectinas vegetales reportadas, posee residuos de cisteína, sin que participen en uniones disulfuro entre las subunidades, cada monómero tiene cuatro secuencias de 43 aminoácidos repetidas, que forman un iso-dominio (A, B, C y D), Estos dominios tipo heveina se unen entre sí de cabeza-tallo, resultando un apareamiento de sub-dominios A1/D2, B1/C2, C1/B2 y D1/A2, permitiendo un arreglo tridimensional muy diferente al observado en leguminosas<sup>26</sup>. Estas variaciones estructurales explican parcialmente la razón por la cual algunas lectinas, de distintas especies, con especificidad hacia un mismo monosacárido, como por ejemplo GalNAc para la lectina de soya (leguminosas) y champiñón *Agaricus bisporus* (hongos), pueden reconocer estructuras oligosacáridicas diferentes y por lo tanto presentar diferentes efectos biológicos.

Esto significa que en el reconocimiento de las estructuras oligosacáridicas por lectinas, es un proceso en el que interviene la conformación de los carbohidratos y la estructura tridimensional de la lectina. Debido a la gran especificidad que poseen estas proteínas presentan una gran variedad de actividades biológicas.

### **LA GLICOSILACIÓN.**

La glicosilación de proteínas, es un evento post y/o 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 selección de las proteínas a las que se les añaden residuos sacarídicos, pero también se ha observado que tiene importancia en los oligosacáridos que finalmente quedan expresados en la superficie celular<sup>27</sup>.

Las cadenas de carbohidratos se clasifican de acuerdo a la unión azúcar-aminoácido, en N- y O-glicanos, en la figura 2 se presentan algunas de las estructuras glicánicas del tipo N y O. Los N-glicanos, generalmente presentan una GlcNAc unida a una asparagina. Los N-glicanos presentes en las proteínas se clasifican en tres grandes grupos: Los N-glicanos con un alto contenido de manosa en su estructura, también denominados de tipo oligomanosídico, los cuales son muy comunes en proteínas con diversos orígenes y funciones, son intermediarios para otro tipo de estructuras N-glicánicas más complejas. Existen también las estructuras del tipo lactosamínico, las cuales tienen como característica principal, la presencia de Gal $\beta$ 1-4GlcNAc en cantidad variable ya que las glicoproteínas que presentan este tipo de estructuras normalmente se encuentran en la superficie celular y actúan como señales de reconocimiento celular. El tercer tipo de estructura N-glicánica se conoce como híbrida, las proteínas que presentan este tipo de arreglo contienen una mezcla de las estructuras lactosamínicas y de tipo oligomanosídico. Los N-glicanos también pueden proteger a las proteínas que los portan de la acción de proteasas.

Los O-glicanos poseen una GalNAc unida a una serina o una treonina de la cadena polipeptídica. A diferencia de los N-glicanos, los O-glicanos presentan una mayor variedad de estructuras, presentándose ocho secuencias consenso de las cuales se derivan el resto de las estructuras O-glicánicas. Por su gran complejidad y diversidad, los O-glicanos se encuentran participando en diversas funciones como por ejemplo: participar en la conformación de la estructura secundaria y terciaria e inclusive de la cuaternaria de algunas proteínas como en el caso de las mucinas<sup>28</sup>, también participan evitando la agregación de las proteínas<sup>29</sup>. Muchos de los O-glicanos presentes en las glicoproteínas participan activamente en el reconocimiento celular actuando como ligando<sup>30-32</sup>, participan en la fertilización<sup>33</sup> y en diversas moléculas que juegan un papel relevante en la regulación de la respuesta inmunológica. En este grupo de células, la O-glicosilación de epitopes de moléculas extrañas es importante en la interacción de grupos celulares<sup>34</sup> y en la transducción de señales<sup>35</sup>. La presencia de estructuras O-glicánicas anormales en las

proteínas ha sido asociado con el desarrollo de tumores<sup>36</sup>. Debido a la importancia de las estructuras oligosacáridicas en las funciones celulares, se han desarrollado diversas técnicas para el estudio y caracterización de dichas estructuras, una de estas técnicas es el empleo de lectinas, especialmente las provenientes de vegetales, debido a su capacidad para interactuar y reconocer específicamente a secuencias y conformación oligosacáridicas. De acuerdo a esta especificidad, se pueden clasificar en lectinas que interactúan con glicanos del tipo N y lectinas que interactúan con glicanos del tipo O. Debido a la gran complejidad de las estructuras O-glicánicas, las lectinas que interactúan con ellas se subdividen en varios grupos como se describe en la Tabla No. 1.

La presencia de lectinas en los vegetales, se puede deber a un mecanismo de defensa en contra de herbívoros o de nématodos<sup>37</sup>. Debido a que presentan una gran especificidad hacia estructuras oligosacáridicas frecuentes en las células de origen animal, este sitio de reconocimiento a carbohidrato, ha evolucionado por diferentes caminos<sup>38</sup>. Hasta la fecha los mecanismos de evolución molecular de las lectinas se encuentran pobremente estudiados; sin embargo, la versatilidad genética de las plantas ha permitido la utilización de estas proteínas en la glicobiología, ya que al actuar como moléculas de defensa, se encuentran en grandes cantidades para anticipar el ataque de los depredadores, lo que permite aislarlas en cantidades considerables. En el aparato digestivo de los depredadores, las lectinas son resistentes a la acción de proteasas y glicosidasas<sup>39</sup>, lo que facilita su purificación, almacenaje y manejo; lo cual hace que las lectinas vegetales sean una herramienta útil y de fácil adquisición para el estudio de las estructuras oligosacáridicas. Estos resultados permiten identificar que si bien la función biológica de las lectinas vegetales no ha sido bien definida, estas proteínas representan una útil alternativa en el aislamiento y caracterización de glicoconjugados.

## O-GLICANOS

Gal ( $\beta$ 1-3) GalNAc ( $\alpha$ 1-3) Ser/Thr

GlcNAc ( $\beta$ 1-6) \ GalNAc ( $\alpha$ 1-3) Ser/Thr  
GlcNAc ( $\beta$ 1-3) /

Gal ( $\beta$ 1-3) Gal ( $\beta$ 1-4) Xyl ( $\beta$ 1-3) Ser

## N-GLICANOS

Man ( $\alpha$ 1-6) \ Man ( $\beta$ 1-4) GlcNAc ( $\beta$ 1-4) GlcNAc ( $\beta$ 1-N) Asn D  
Man ( $\alpha$ 1-3) /

Figura 2. Núcleos sacarídicos presentes en glicoproteínas con N-glicanos y O-glicanos en su estructura (Tomado de Montreuil, J. en *Methods on Glycoconjugates*. Ed. André Verbert. Harwood Academic Publishers. Austria. Pag. 1-23).



Tabla No. 1. Clasificación de lectinas que poseen especificidad hacia O-glicanos

CARBOHIDRATO	LECTINA	FAMILIA
GalNAc.	<i>Griffonia simplicifolia</i>	Leguminosa.
	<i>Vicia villosa</i>	Leguminosa.
GalNAc $\alpha$ 1-3GalNAc.	<i>Amphicarpea bracteata</i>	Leguminosa.
	<i>Dolichos biflorus</i>	Leguminosa.
Gal $\beta$ 1-3GalNAc.	<i>Arachis hypogaea</i>	Leguminosa.
	<i>Vicia graminea</i>	Leguminosa.
	<i>Sophora japónica</i>	Leguminosa.
	<i>Amaranthus caudatus</i>	Amarantacea.
	<i>Amaranthus leucocarpus</i>	Amarantacea.
	<i>Artocarpus integrifolia</i>	Moreaceae
GalNAc $\alpha$ 1-3[Fuc $\alpha$ 1-2]Gal $\beta$ 1-3 GlcNAc	<i>Crotalaria striata</i>	Leguminosa.
	<i>Falcata japónica</i>	Leguminosa.
	<i>Vicia cracca</i>	Leguminosa.

## JUSTIFICACIÓN

En las semillas de algunas especies de amarantáceas se ha identificado la presencia de lectinas, como en *A. cruentus* y *A. caudatus*, las cuales presentan semejanzas estructurales como son: La presencia de dos subunidades monoméricas de 30-35 kDa que en el estado nativo forman un homodímero de 66-70kDa, presentando una especificidad hacia la GalNAc y poseen en común la falta de especificidad hacia eritrocitos humanos del tipo A, B y O<sup>40,41</sup>. La lectina aislada de la semilla de *Amaranthus leucocarpus* (ALL), es una glicoproteína homodimérica con un peso molecular de 70 kDa<sup>42</sup> presentando, un 10% de carbohidratos en su estructura, mientras que las lectinas aisladas de las otras especies de amranto no contiene carbohidratos en su estructura. Esta lectina aglutina preferentemente a eritrocitos humanos del fenotipo M que de N<sup>43</sup>; aunque ambas glicoproteínas poseen estructuras O-glicosídicas (Gal $\beta$ 1-3GalNAc $\alpha$ 1-0Ser/Thr), reconocidas por ALL, la diferencia está determinada por el amino terminal, donde el fenotipo M posee una serina mientras que el fenotipo N posee una leucina en la misma posición<sup>44</sup>. En trabajos recientes se ha demostrado que la lectina de ALL reconoce poblaciones celulares del timo murino y de médula ósea, donde interactúa principalmente con linfocitos CD4+. Este perfil de reconocimiento de poblaciones celulares es particular, porque lectinas, como la de cacahuate (PNA, *Arachis hypogaea*), que posee especificidad también a la GalNAc, reconoce poblaciones celulares inmaduras en el timo murino, estas células no expresan ningún fenotipo y son eliminadas por el proceso de muerte celular programada (apoptosis)<sup>45</sup>. De igual forma se ha demostrado que PNA reconoce a linfocitos T CD8<sup>+</sup> de memoria<sup>46</sup>. Estos análisis comparativos, permiten sugerir que ALL reconoce la organización y el arreglo de los componentes de membrana, por lo que estudios de la interacción de la lectina con estructuras O-glicosídicas permitirán explicar los mecanismos moleculares y estructurales que participan en la interacción ALL-receptor, permitiendo explicar la diferencia que hay en los efectos biológicos entre la lectina ALL y lectinas que poseen la misma especificidad.

## **HIPÓTESIS**

La organización estructural y conformacional de las estructuras oligosacáridicas presentes en las proteínas de membrana y la organización estructural del sitio de unión a carbohidrato de la lectina de *Amaranthus leucocarpus* permite que la lectina interactúe específicamente con su receptor.

## **OBJETIVO GENERAL**

Identificar las características estructurales de la lectina *Amaranthus leucocarpus* así como su interacción con estructuras O-glicosídicas, lo que permitirá explicar los mecanismos moleculares y estructurales que participan en la interacción ALL-receptor.

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

- 1.- Caracterización química de la lectina de ALL.
- 2.- Determinación de la interacción de ALL con estructuras O-glicosídicas

## **METAS**

- 1.- Determinación de la secuencia de aminoácidos de la lectina ALL
- 2.-Determinación de la especificidad de ALL hacia diversas estructuras O-glicosídicas mediante ensayos de O-glicosilación in vitro y electroforesis capilar.
- 3.-Caracterización del receptor de la lectina de *Amaranthus leucocarpus* presente en timocitos de ratón.

## MATERIALES Y METODOLOGÍA

### 1.- PURIFICACIÓN DE LA LECTINA *Amaranthus leucocarpus*.

La purificación de la lectina se realizó por medio de cromatografía de afinidad utilizando columnas preparadas con diferentes ligandos: una empacada con estroma de eritrocitos humanos del tipo O inmovilizados en Sephadex G-25 y las otras acopladas a Sepharosa teniendo como ligandos: fetuína, IGA, mucina submaxilar bovina y ovina. Para la obtención del estroma se procedió a lisis de eritrocitos humanos del tipo O, las membranas fueron fijadas toda la noche con glutaraldehído al 1% a 4 °C, posteriormente el estroma fue lavado tres veces con agua destilada y los grupos aldehído libres fueron bloqueados con glicina 1M; finalmente el estroma fue lavado con agua destilada y se guardó en refrigeración hasta su uso. Doscientos mg de estroma fueron inmovilizados en Sephadex G-25 en una columna (25 x 1.2 cm) equilibrada con 0.15M de NaCl, se aplicaron a la columna 10 ml de extracto crudo conteniendo 160 mg de proteína, el material no retenido se eluyó con NaCl 0.15M hasta que la absorbencia a 280 nm fuera menor de 0.001; el material retenido fue eluido con ácido acético al 3%, fracciones de 3 ml fueron colectados y se les determinó absorbencia a 280 nm y concentración de proteínas<sup>47</sup>, las fracciones fueron dializadas con agua destilada y finalmente liofilizadas. Para la purificación de la lectina utilizando las glicoproteínas anteriormente descritas. Ciento cuarenta mg de cada glicoproteína se acoplaron a 20 ml de Sepharosa 4B (Pharnacia), previamente activada con bromuro de cianógeno, durante 24 horas a 4°C, posteriormente se eliminó la proteína no acoplada y se procedió a bloquear los grupos aldehído libres con glicina 1M durante 24 horas a 4°C. Las columnas (25x1cm) fueron equilibradas con NaCl 0.15M y se les aplicaron 10 ml de extracto crudo conteniendo 160 mg de proteína. El procedimiento para la purificación de la lectina fue el mismo que anteriormente se describió para la columna de estroma.

### 2.-ELECTROFORESIS EN 2-D.

100µg de lectina se sometieron a isoelectroenfoque (primera dimensión), en geles cilíndricos (0.5x10 cm) de poliacrilamida al 5% conteniendo 2% v/v de anfolinas con un rango de pH de 3.5 a 10 y 1% de Tween 20. Los geles se corrieron a 600 V durante 14 h. a 4°C; el gel se depositó en un gel de SDS al 10% (segunda dimensión). Posteriormente el

gel se tiñó durante 3 horas en una solución de azul de Coomassie, se recortaron las bandas y se destiñeron con una solución de metanol/ácido acético/agua 250/50/200 v/v.

### 3.-MALDI-TOF.

Las bandas de la lectina, obtenidas de los geles de 2-D, conteniendo 200 pM de proteína fueron digeridas con 0.5µg de tripsina en 500µl de bicarbonato de amonio pH 8 a 37°C durante 24 horas, la muestra se colocó a 4°C para inhibir el efecto de la tripsina y evaporadas usando un rotovapor 8 Howe, (London), posteriormente re-evaporadas con agua (2x200µl). Las muestras conteniendo 50 pM de péptidos se mezclaron con 1µl de ácido 2,5 dihidroxibenzoico usado como acarreador (12mg/ml en CH<sub>3</sub>OH/H<sub>2</sub>O 70:30 v/v); la mezcla se dejó cristalizar a temperatura ambiente. La masas de los iones positivos de los péptidos fueron identificados por MALDI-TOF en un espectrofotómetro de masas (Finnigan MAT, Bremen, Germany) equipado con un láser a 337 nm. Como control se realizó un ensayo con tripsina sola, para identificar las masas de los posibles péptidos producto de la autodigestión. La masa de los iones [M+H]<sup>+</sup> de los péptidos productos de la digestión con tripsina fue comparada con las existentes en la base de datos NCBI nr (Swiss-Prot con fecha 10/04/99).

### 4.-GLICOSILACIÓN *in vitro*.

Para evaluar la interacción de la lectina de ALL con estructuras O-glicosídicas, se realizaron ensayos de neo-glicosilación *in vitro*; se glicosilaron los siguientes péptidos: TTSAPTTS, GTTPSPVPTTSTTSAP y GTTPSPVP, utilizando microsomas obtenidos de mucosa gástrica, de colon y de timocitos de ratón, conteniendo 5mM de péptidos (10µl), 12 µg de microsomas (10µl), UDP-[<sup>3</sup>H]GalNac diluido en 1mM de UDP-GalNac (5µl), en una solución amortiguadora de MES a pH 7.1, 0.125 M (10µl), se incubaron durante 3 horas a 37°C, la reacción es detenida por la adición de 320 µl de buffer de tetraborato de sodio 20mM a pH 9.1 conteniendo 1mM de EDTA. Los productos se separaron utilizando una columna de intercambio iónico AG 1-X8, el material no retenido se pasó por una columna de fase reversa para eliminar el exceso de sales y los péptidos fueron eluidos con acetonitrilo/agua (35/65 v/v) y liofilizados para su uso posterior.

## 5.-ELECTROFORESIS CAPILAR

La electroforesis capilar se realizó en un equipo P/ACE modelo 5000 (Beckman) equipado con detector de fluorescencia y controlado por System Gold software V 18 (Beckman). La absorbencia de los glicopéptidos se cuantificó a 200 nm, se inyectaron aproximadamente 10-20 pmol de muestra durante 6 segundos en un capilar de sílica de 57cm x 75  $\mu\text{m}$  i.d, con ácido fórmico 2N como amortiguador, la temperatura de corrida fue de 23°C con un voltaje a 20 kV durante toda la corrida, la cual duró 30 minutos. Después de cada corrida, el capilar se lava con acetonitrilo al 25% en PBS a pH 7.2 durante 2 minutos. La interacción de la lectina ALL con los diferentes glicopéptidos se midió de la siguiente manera: 4 $\mu\text{g}$  de ALL-FTC con 16 $\mu\text{g}$  de glicopéptidos en PBS pH 7.2 se incubaron durante una hora a temperatura ambiente, 5ng de la muestra fueron aplicados al aparato de electroforesis capilar, se usó PBS pH 7.2 como amortiguador, el tiempo de corrida y las condiciones se realizaron como previamente se describió.

## 6.- 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, basados en 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 y se contaron en un hemocitómetro, la suspensión celular se ajustó a  $1 \times 10^8$  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 la suspensión celular se colocó 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 PBS, durante 30 min a 4°C en agitación constante 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). 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 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. 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 0.1 M pH 2.5 para eluir al complejo ALL-biotina. Las fracciones con una densidad óptica positiva se colectaron, se dializaron contra NaCl 5mM y se concentraron por liofilización.

#### 7.- TRANSFERENCIA DE PROTEÍNAS SEPARADAS POR ELECTROFORESIS

El extracto celular se hizo a partir de  $2 \times 10^6$  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 cual se bloqueó con 5% de leche en 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 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 estreptavidina-peroxidasa 1:5000 diluida en TBS-T durante 45 min a temperatura ambiente, por último se lavó 4 veces antes de 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. La transferencia se llevó a cabo utilizando el aparato de (Tranblot, Bio-Rad), durante 1h a 10 V en amortiguador de transferencia. 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 16 h de incubación, se lavaron en esta misma solución amortiguadora durante 2 h 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 1 h con la solución amortiguadora, haciendo cambio cada 15 min y la reacción se reveló por quimioluminiscencia.

#### 8.-PURIFICACIÓN DE ISOFORMAS DEL RECEPTOR ALL POR 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, usada como intercambiador aniónico. La proteína se disolvió en un regulador de bis Tris 10 mM a pH 7.1 500 µg deL receptor se aplicaron a 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 imidazol; las fracciones, de 1 ml cada una, se monitorearon a una A<sub>280</sub> nm con una sensibilidad de 0.1.

#### 9.-COMPOSICIÓN DE CARBOHIDRATOS.

El análisis de composición de carbohidratos fue llevado a cabo por metanólisis en la presencia de meso-inositol como estándar interno. Se hidrolizaron 50 µg de glicoproteína proteína en 1ml de metanol/HCl 0.5 M, a temperatura de 100°C durante 24h. Posteriormente, los derivados trifluoro-acetil-alditoles se obtuvieron adicionando 100µl de



piridina y 100µl de ácido trifluoroacético. La composición de azúcares se determinó por cromatografía de gases por el método de Zanetta<sup>48</sup>, 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), equipado con un detector de flama y utilizando helio como gas acarreador.

## CAPÍTULO I

### ESTUDIO COMPARATIVO SOBRE LA PURIFICACIÓN DE LA LECTINA *Amaranthus leucocarpus* syn. *hypocondriacus*.

La lectina aislada de la semilla de *A. leucocarpus*, comparte especificidad por el monosacárido GalNAc con otras lectinas aisladas de la familia de las leguminosas, por ejemplo: la lectina de cacahuete (*Arachis hypogaea*) que reconoce a linfocitos CD8<sup>49</sup>, que son poblaciones que tienen actividad citotóxica, mientras que la lectina aislada de la semilla de *A. leucocarpus* reconoce macrófagos murinos peritoneales no estimulados, reconoce subpoblaciones de timocitos CD4<sup>+</sup> en médula tímica de ratón e interactúa con proteínas O-glicosiladas en algunos procesos neurodegenerativos<sup>50</sup>. En este trabajo se comparó la capacidad de diferentes glicoproteínas que contienen en su estructura al disacárido Galβ1-3GalNAcα1-0Ser/Thr (antígeno T) o al monosacárido GalNAcα1-0Ser/Thr (antígeno Tn) como ligandos específicos para la purificación de la lectina por cromatografía de afinidad, además se hace una descripción de algunas características químicas de la lectina ALL.

#### RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

La purificación de la lectina ALL se realizó por cromatografía de afinidad utilizando distintos ligandos: a) Estroma de eritrocitos humanos O<sup>M</sup>-Sephadex G-25, b) Inmunoglobulina A-Sepharose, c) Fetuina-Sepharose, d) Mucina submaxilar ovina-Sepharose y e) Mucina submaxilar bovina-Sepharose. En todos los casos se aplicó a cada columna extracto salino, obtenido de la harina deslipidizada, se identificó una fracción no retenida (FNR), que en la mayor parte de los casos no posee actividad hemaglutinante y otra fracción proteica eluida con ácido acético al 3%, que presentó actividad hemaglutinante. Como ha sido determinado en estudios previos esta lectina es específica para GalNAc, este carbohidrato ha sido utilizado para eluir de manera específica a la lectina de las columnas de afinidad, el rendimiento proteico es similar al identificado cuando se eluyó a la lectina por disminución del pH. La lectina de *A. leucocarpus* representa el 8% de la proteína soluble. Los distintos ligandos empleados son adecuados para la purificación de la lectina ALL, debido a que la actividad específica aumenta en los cinco sistemas aproximadamente 16 veces con respecto al extracto crudo, en tanto que un 60% de la actividad hemaglutinante es recuperada con dichos sistemas. El porcentaje de lectina purificada varía con respecto al ligando utilizado como soporte

cromatográfico, siendo la IgA, la de menor capacidad para retener a la lectina de *A. leucocarpus*. Analizando las ventajas que tiene la utilización de los diferentes tipos de ligando, podemos considerar que la columna con estroma de eritrocitos humanos del tipo O<sup>M</sup> es el método más económico para la purificación de la lectina ALL.

El análisis electroforético de la lectina purificada por los cinco sistemas de purificación, muestra una banda que corresponde a un peso de 35 kDa en condiciones desnaturalizantes, este peso molecular es muy parecido al que tienen otras lectinas de la familia de las amarantáceas como es el caso de *A. caudatus* y *A. cruentus*, las cuales poseen un peso molecular de 33 kDa, esta diferencia en el peso molecular se puede deber a la presencia de la porción glicánica de la lectina de *A. leucocarpus*, la cual representa un 10% del peso. El amino terminal de lectina se encuentra bloqueado, esta característica es compartida por la lectina de *A. caudatus*, en contraste con las lectinas provenientes de la familias de las leguminosas donde es poco frecuente debido a la remoción del péptido señal. Esto sugiere un mecanismo de modificación del amino terminal en los pseudo cereales que todavía está por estudiarse.

La especificidad de la lectina por diversos carbohidratos se determinó mediante la comparación de la capacidad inhibitoria de monosacáridos, glicoproteínas, sus derivados desialilados y glicanos liberados de estas glicoproteínas hacia la hemaglutinación inducida por la lectina ALL sobre eritrocitos humanos del tipo O<sup>M</sup>. El monosacárido GalNAc, es el mejor inhibidor de la actividad hemaglutinante de la lectina, mientras que de las glicoproteínas, la fetuina y la asialo fetuina fueron los mejores inhibidores y en menor proporción la IgA y las mucinas submaxilar ovina y bovina. Los glicanos liberados de estas glicoproteínas tienen capacidad inhibitoria de cuatro a seis veces mayor que la GalNAc, pero son menos inhibidores que las glicoproteínas de las cuales fueron liberados. La eliminación del residuo de Galactosa de la fetuina no modifica significativamente la interacción con la lectina, lo cual indica que la lectina de *A. leucocarpus* interactúa fuertemente con los antígenos T y Tn. Estos resultados son confirmados por la interacción específica con la mucina submaxilar ovina y su asialo forma, ya que esta glicoproteína contiene NeuAc $\alpha$ 2,3GalNAc $\alpha$ 1-0Ser/Thr. Es interesante señalar que las glicoproteínas tienen pesos moleculares y cantidad de carbohidratos muy distintas; así tenemos que en el caso de la mucina submaxilar bovina y ovina, tienen un peso molecular que varía de entre los 375 a 1,000 kDa<sup>51</sup>, esta diferencia en el peso molecular se

debe a la presencia de carbohidratos, el 60% del peso molecular en ambas glicoproteínas corresponde a estructuras oligosacáridicas. La fetuina que tiene un peso molecular de aproximadamente de 40k Da, presenta tres estructuras del tipo O-glicosídica, las cuales corresponden al antígeno T y trece del tipo N-glicosídico<sup>52</sup>. La IgA tiene un peso molecular de 55 kDa y presenta dos estructuras de tipo N-glicánico y cinco del tipo O-glicosídico, de las cuales cuatro corresponden al antígeno T y una al antígeno Tn<sup>53</sup>. El fenotipo M y N se encuentran en la glicoforina A<sup>N</sup> y A<sup>M</sup>, las cuales tienen el mismo peso molecular de aproximadamente 37 kDa, del los cuales aproximadamente el 60% corresponde a carbohidratos<sup>46</sup>, ambas isoformas presentan el mismo número de estructuras O-glicosídicas (trece), las cuales corresponden a variaciones del antígeno T, además de poseer tres estructuras del tipo N. El análisis de los sitios O-glicosilables de estas glicoproteínas demuestra que en la IgA, la mucina submaxilar bovina y ovina, las estructuras oligosacáridicas pueden estar organizadas en agrupaciones continuas, mientras que en la fetuina estas estructuras oligosacáridicas se encuentran separadas, lo cual sugiere que en la interacción de la lectina de *A. leucocarpus* se requiera una distancia entre las estructuras oligosacáridicas. Esta idea es confirmada por el hecho de que los O-glicanos liberados de las glicoproteínas, así como de los eritrocitos desializados tienen la misma capacidad inhibitoria, lo cual hace de la lectina de *A. leucocarpus* una herramienta útil para el estudio de estructuras tipo mucinas y sus actividades biológicas.

**A COMPARATIVE STUDY ON THE  
PURIFICATION OF THE *AMARANTHUS  
LEUCOCARPUS SYN. HYPOCONDRIACUS*  
LECTIN**

**Pedro Hernández,<sup>1</sup> Macario Bacilio,<sup>1,2</sup> Flor Porras,<sup>1</sup> Soledad Juarez,<sup>3</sup>  
Henri Debray,<sup>4</sup> Edgar Zenteno,<sup>3,\*</sup> Blanca Ortiz<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Departamento de Bioquímica  
Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias  
Tlalpan D. F., 14080, Mexico

<sup>2</sup>Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste  
Baja California Sur, 23000, Mexico

<sup>3</sup>Laboratorio de Lectinas  
CIQ, Universidad Autónoma del Estado de Morelos  
Cuernavaca Morelos, 62210, Mexico

<sup>4</sup>Laboratoire de Chimie Biologique UMR du CNRS No. 111  
Université des Sciences et Technologies de Lille  
Villeneuve d'Ascq, 59655, France

<sup>5</sup>Laboratorio de Inmunología  
Departamento de Bioquímica  
Facultad de Medicina  
UNAM, P. O. Box 70159  
México D. F., 04510, Mexico

## ABSTRACT

*Amaranthus leucocarpus* lectin is a homodimeric glycoprotein of 35 kDa per sub-unit, which interacts specifically with N-acetylgalactosamine. In this work, we compared different glycoproteins that contain Gal $\beta$ 1-3 GalNAc $\alpha$ 1-3 Ser/Thr or GalNAc $\alpha$ 1-3 Ser/Thr in their structure as ligands to purify the *A. leucocarpus* lectin. From the glycoproteins tested, fetuin was the most potent inhibitor of the hemagglutinating activity and the better ligand for lectin purification; however, the use of desialylated stroma from erythrocytes represented the cheapest method to purify this lectin. O-linked glycans released from the glycoproteins used as affinity matrix and those from different erythrocytes were less inhibitory than parental glycoproteins. The NH<sub>2</sub>-terminal of the lectin is blocked; moreover, this is the only example of a lectin isolated from this genus to be a glycoprotein. Analysis of the glycoprotein sequences with inhibitory activity for the lectin, showed a different pattern in the O-glycosylation, which confirms that *A. leucocarpus* lectin recognizes conformation and, probably, distances among O-linked glycans moieties.

## INTRODUCTION

Lectins are carbohydrate binding proteins or glycoproteins of non-immune origin, and with no enzymatic activity.<sup>1</sup> Due to their specific binding properties, they have been used in studies of cell surface architecture, blood group typing, isolation, and characterization of oligosaccharide structures.<sup>2</sup> Lectins are responsible for cell surface recognition in bacteria, animals and plants.<sup>3</sup> Plant lectins are widely used in immunology, cell biology, and cancer research.<sup>4</sup>

Lectins from different species from the *Amaranthaceae* group have been identified.<sup>5,6</sup> *Amaranthus leucocarpus* syn *hypocondriacus* is a Mexican representative of the *Amaranthaceae* family, which possesses high nutritional value due to its protein content and the considerable proportion of essential amino acids.<sup>7</sup> *A. leucocarpus* possesses a lectin specific for GalNAc (N-acetyl-galactosamine).<sup>8</sup> The lectin from *A. leucocarpus* (ALL) induces immunosuppression in animals,<sup>9</sup> recognizes unstimulated murine peritoneal macrophages, and recognizes CD4<sup>+</sup> mouse medullary thymocytes sub-population<sup>10</sup> as well. This lectin has been recently demonstrated to interact with O-glycosyl proteins in some neurodegenerative process.<sup>11</sup> ALL agglutinates preferentially human erythrocytes with the M phenotype,<sup>12</sup> suggesting that the density or the topographical presentation of saccharidic moieties in the lectin receptor plays a relevant role in the interaction with ALL. In this work, we compared different glycoproteins that share

Gal $\beta$ 1-3 GalNAc $\alpha$ 1-0Ser/Thr (T-antigen) and GalNAc $\alpha$ 1-0Ser/Thr (Tn-antigen) in their structure as specific chromatography ligands and used them to improve the method for the purification of ALL. We also describe the chemical characteristics of this lectin.

## EXPERIMENTAL

### Reagents

Chromatographic materials, Sephadex G-25 and Sepharose 4B, were from Pharmacia Biotechnology (Uppsala, Sweden). Fetuin, human immunoglobulin A (IgA), ovine and bovine submaxillary gland mucin, cyanogen bromide, as well as sugars, were from Sigma (Sigma Fine Chem. Co., St. Louis, MO, USA). All other reagents were of analytical grade. Glycans from human IgA were a kind gift of Prof. A. Pierce, from the Université des Sciences et Techniques de Lille, France.

### Lectin Extraction

*Amaranthus leucocarpus* seeds were obtained in Tulyehualco (Mexico). The seeds were ground to a fine powder in a grinder and the seed meal was deslipidated with petroleum ether. Their soluble proteins were extracted by agitation overnight with 10 volumes of 0.15 M sodium chloride (SSI) at 4°C. The pH of the extract was adjusted to 4 with 1M acetic acid and the suspension allowed to stand overnight at 4°C. The clear supernatant (crude extract), obtained by centrifugation at 3000 x g for 10 minutes, was stored at 4°C for further studies.

### Lectin Purification

#### Purification by stroma column

Erythrocyte membranes (stroma) were obtained by lysis of human red blood cells group O<sup>M</sup> according to Dodge *et al.*<sup>12</sup> The membranes were fixed with 1% glutaraldehyde overnight at 4°C, then the stroma were washed with distilled water and freeze dried. Two hundred milligrams of erythrocyte stroma was physically entrapped in a chromatographic column with Sephadex G-25 as described.<sup>13</sup> The column was equilibrated with SSI (0.15 M NaCl). The crude extract (160 mg of protein) was applied to the stroma column (25 x 1.2 cm), and the unretained material was eluted with SSI at a flow rate of 15 mL/h, until the A<sub>280</sub> of the collected fractions was below 0.01. The bound lectin was eluted with acetic acid (3%) and the pH of each collected fraction was adjusted to 6

with 1N NaOH and tested for protein concentration and hemagglutinating activity. In control assays, we eluted the lectin from the affinity chromatography column by adding 200 mM GalNAc, and results indicate that, in both eluting systems, the column yields the same lectin concentration.

#### Purification with immobilized glycoproteins

140 mg of each glycoprotein (IgA, fetuin, bovine, or ovine submaxillary mucin) was coupled to 20 mL of CNBr-activated Sepharose 4B CNBr.<sup>14</sup> The columns were equilibrated with SSI at a flow rate of 15 mL/h. The *A. leucocarpus* crude extract (160 mg of protein) was applied to each column and lectin elution was performed as described above.

#### Hemagglutinating Activity

Erythrocytes from different animal species were obtained from the animal facilities at the School of Medicine, UNAM. Updated human erythrocytes from healthy donors were obtained from the Central Blood Bank, IMSS, Mexico. Hemagglutinating activity was assayed in microtiter U plates (NUNC, Denmark) by the two-fold serial dilution procedure.<sup>15</sup> The agglutinating activity was tested with either 2% (w/v) untreated erythrocyte suspension in phosphate buffered saline (PBS: 0.01 M sodium phosphate, 0.14 M sodium chloride, pH 7.2) or with neuraminidase-treated (0.1 U per 0.5 mL of packed erythrocytes at 37°C for 30 min) or pronase-treated (100 µg per 0.5 mL of packed erythrocytes at 37°C for 30 min) erythrocytes. The hemagglutinating titer is reported as the inverse of the last dilution with agglutinating activity.

#### Preparation of Glycans

Desialylated stromata from donkey, rabbit, and human O<sup>M</sup> erythrocytes were obtained by the method described by Dodge;<sup>12</sup> lipids were eliminated by three sequential extractions with chloroform:methanol (2:1, v/v) followed by chloroform:methanol (1:2, v/v). The glycoproteins thus obtained were dried under nitrogen.<sup>18</sup> Glycans were obtained by mild alkaline treatment, incubating 100 mg of each glycoprotein in 0.1M NaOH and 1M NaBH<sub>4</sub> at 45°C, 36 h; then, adding Dowex 50X8-H+ to stop the reaction. The fractions were desalted on a column containing Bio-Gel P2 (60 x 2 cm) equilibrated with water and freeze-dried. Glycans and N-glycopeptides were separated by filtration on an Ultrogel-ACA 202 column (100 x 2.6 cm), equilibrated in 0.01 M Tris/HCl, 0.17 M NaCl, pH 7.4. Stromata from erythrocytes and glycoproteins and 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,<sup>16</sup> desalted on a Biogel P-2 column (2 x



60 cm), equilibrated with 0.5 M acetic acid, and lyophilized until use. Asialofetuin (2 mM) was then treated with 1 U of  $\beta$ -galactosidase from jack bean at 37°C, 24 h, as described in ref. 17, then asialo-agalacto-fetuin was desalted on a Biogel P2 column equilibrated with distilled water and freeze dried. Glycan from asialofetuin was obtained by digestion with 1 mU of endo-N-acetylgalactosaminidase from *Diplococcus pneumoniae* as described.<sup>1</sup> The carbohydrate composition of each glycan and modified glycoproteins was determined by gas-liquid chromatography (see below).

### Sugar Specificity

The sugar specificity of the lectin was determined by comparing the inhibitory activity of sugars, glycoproteins, their desialylated derivatives, or glycans on the hemagglutination induced by the lectin against pronase-treated human erythrocytes. Results are expressed as the minimal concentration required to completely inhibit four hemagglutinating doses.

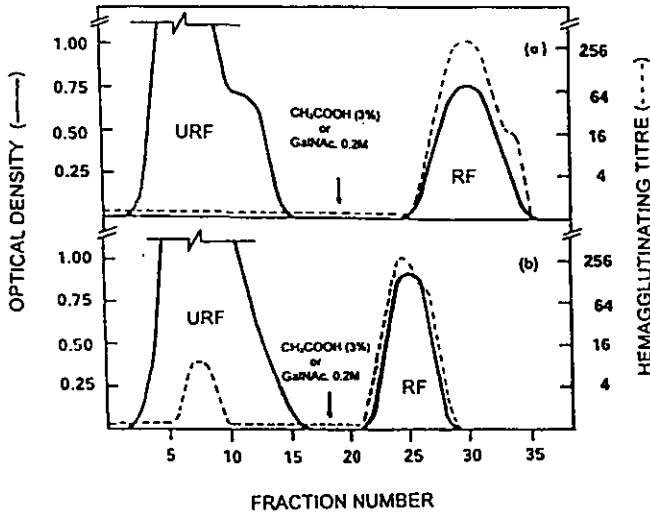
The molar concentration of the glycoproteins was determined according to their molecular weight. In desialylated glycoproteins, we subtracted the number of sialic acid molecules released from the native protein and the molar concentration of glycans was calculated on the basis of their monosaccharide content as determined by gas-liquid chromatography.

### Prediction of O-Glycosylation Sequences

NetOglyc program<sup>18</sup> was used for the prediction of fetuin, IgA, bovine, and ovine submaxillary mucin O-glycosylation sequences.

### Analytical Methods

Protein concentration was determined by the method of Bradford<sup>19</sup> with Coomassie blue R-250, using bovine serum albumin as standard. Carbohydrate concentration was determined by the method of Dubois,<sup>20</sup> using lactose as standard. Carbohydrate composition analysis was carried out by methanolysis in the presence of meso-inositol (Sigma Chem., St. Louis, MO) as internal standard; the per-O-trimethyl silylated methyl glycosides (after N-re-acetylation) were analyzed by gas chromatography using a capillary column (25 x 0.32 mm) of 5% Silicone OV 210, (Applied Science Lab., Buffalo, NY), in a Varian 2100 gas chromatograph (Orsay, France) equipped with a flame detector and a glass solid injector; the carrier gas was helium at a pressure of 0.6 bar, and the oven temperature was programmed



**Figure 1.** Purification of *A. leucocarpus* lectin. 160 mg of crude extract was applied onto a column containing A) Stroma from human erythrocytes or B) IgA-Sepharose 4B. The unretained material was eluted with 0.15 M NaCl, and the lectin was eluted with 3% acetic acid or 200mM of GalNAc. The pH of each fraction was neutralized with NaOH and the OD at 280 nm and hemagglutinating activity in presence of human erythrocytes type O was tested. A similar elution pattern to that of the stroma was obtained with the columns prepared with fetuin, ovine, and bovine submaxillary mucins. In the same conditions, the column containing IgA-Sepharose 4B is saturated, and hemagglutinating activity is detected in the non-retained fraction.

from 150 °C to 250 °C at 3 °C per min as described by Zanetta et al.<sup>21</sup> Polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) was performed on a slab gel apparatus according to the method of Laemmli.<sup>22</sup> Coomassie Brilliant Blue R-250 was used for staining.

#### Amino Acid Analysis

A 100 µg sample was hydrolyzed under vacuum with 2 mL of 6M HCl at 110 °C in sealed tubes for 24, 48, and 72 h. The samples were analyzed on an automatic amino acid analyzer Durrum 500, according to Bidlingmeyer *et al.*<sup>23</sup> using Nor-leucine as internal standard.

Table 1

Purification Process of *A. leucocarpus*<sup>a</sup> Lectin by Different  
Affinity Chromatography Matrices

Fraction	Protein (mg)	HAU <sup>b</sup>	Specific Activity <sup>c</sup>	Protein Yield (%)
Crude Extract	812	44800	55.2	100
Fetuin	42	38100	907.1	5.1
Stroma	40	32800	820	4.9
Ovine Mucin	35	32100	917.1	4.3
Bovine Mucin	31	30000	967.7	3.8
IgA	28	27900	996.4	3.4

<sup>a</sup> From 10 g seed meal. <sup>b</sup> Hemagglutinating units with human erythrocytes type O. <sup>c</sup> HAU/mg protein.

Amino acid sequences were obtained from SDS-PAGE-separated ALL. After electroblotting on a PVDF membrane, the band containing ALL was excised from the blot and sequenced on a Beckman Instrument Inc (Fullerton, CA, USA) Model LF3000 protein sequencer.

## RESULTS

### Lectin purification

From the *Amaranthus leucocarpus* seed extract, we purified in a single chromatography step, the lectin, which represents, in general, 8% of the total soluble protein. The different affinity chromatography supports, i.e., fetuin, ovine and bovine submaxillary mucin, and stroma from erythrocytes, are powerful ligands for its purification. Human IgA showed lower capacity to retain the lectin (Table 1 and Fig. 1). The unretained material was always eluted with SSI and the lectin was eluted from the affinity matrix with 3% acetic acid (Fig. 1), a similar elution pattern was obtained when we added 0.1M GalNAc in SSI to each column.

Although the yield of purified lectin varies according to the affinity matrix used, we consider that the optimal purification system corresponds to fetuin and erythrocyte stroma affinity columns. Our results indicate that the purified lectin corresponds to 5% of protein of the crude extract. With any of the chromatography supports used, more than 60% of hemagglutinating activity was recovered and the



**Figure 2.** SDS-polyacrylamide electrophoresis of the purified *Amaranthus leucocarpus* lectin: C-G) Purified lectin 5  $\mu$ g from human stroma, fetuin, ovine, and bovine submaxillary gland mucins and IgA-Sepharose 4B columns, respectively. b) 25  $\mu$ g of *A. leucocarpus* crude extract. a) Molecular weight markers: bovine serum albumin (66 kDa); ovalbumin (45 kDa); glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase, rabbit muscle (36 kDa), carbonic anhydrase (29 kDa), and  $\alpha$ -lactoglobulin from bovine milk (14 kDa).

specific activity was increased when compared with the crude extract. The purification process of the lectin is summarized in Table 1. As shown in figure 2, the purified fractions obtained from any of the affinity systems used are homogeneous, showing a single band in SDS-PAGE.

#### Lectin Characterization

ALL is a glycoprotein of 35 kDa, as revealed by SDS-PAGE (Fig. 2). As previously indicated,<sup>13</sup> the lectin contains 52.8% of hydrophobic, 15.2% of polar, and 31% of charged amino acids, and three cystein residues per sub-unit. ALL is a glycoprotein with a sugar content of 8%. Monosaccharide analysis indicates: the glycans to be of the N-glycosidic type with galactose, mannose, N-acetylglucosamine, and xylose, in the molar ratio of 4:3:5:1. The NH<sub>2</sub>-terminal residue of ALL is blocked.

Table 2

Hemagglutinating Activity of the *Amaranthus leucocarpus* Lectin<sup>a</sup>

Erythrocytes	HA Titer		
	Native	Nanase	Pronase
Donkey	1024	8096	8096
Rabbit	256	1024	2056
Mouse (CD-1)	16	64	64
Rat	16	32	32
Pig	32	256	256
Sheep	16	128	128
Human: O <sup>M</sup>	64	1024	512
Human: O <sup>N</sup>	64	256	256

<sup>a</sup> Lectin concentration was 16 µg/mL. Hemagglutinating titer is reported as the inverse of the last dilution with agglutinating activity tested in the presence of a 2% solution of native neuraminidase, or pronase treated erythrocytes.

## Hemagglutinating Activity

ALL showed hemagglutinating activity towards erythrocytes from different animal species; erythrocytes from donkey are better recognized than cells from other species. Treatment of erythrocytes with neuraminidase or pronase increased the hemagglutinating capacity of the lectin. It is interesting to note that human erythrocytes are agglutinated independently from the ABO blood group system; however, the hemagglutinating titer of the lectin is higher in the presence of erythrocytes presenting the M blood phenotype treated with neuraminidase or pronase than with erythrocytes containing N phenotype. The presence of N or M phenotype in pronase treated cells was confirmed using a specific commercial antiserum.

The lectin from ALL shows hemagglutinating activity in the presence of all erythrocytes tested, although the erythrocytes from donkey and rabbit were sixty-four times more agglutinated than mouse erythrocytes (Table 2). Hemagglutinating activity increased after treatment of erythrocytes with neuraminidase or pronase; however, as previously described,<sup>8</sup> there is a significant difference in the increase of hemagglutinating titer in the presence of human erythrocytes with the M phenotype as compared with the erythrocytes with the N phenotype. No differences were observed among human erythrocytes in the ABO blood group system.

Table 3

Inhibition of the Hemagglutinating Activity of *A. leucocarpus* Lectin with Glycoproteins and Glycans<sup>a</sup>

Compound	Concentration ( $\mu$ M)
GalNAc	62
Human IgA	0.004
Human Asialo IgA	0.001
Fetuin	0.0005
Asialo-Fetuin	0.0001
Agalacto-Fetuin	0.0001
Bovine Mucin	0.05
Bovine Asialomucin	0.01
Ovine Mucin	0.01
Ovine Asialomucin	0.005
Asialo Glycan from Human Erythrocyte <sup>b</sup>	15
Donkey Erythrocyte	15
Rabbit Erythrocyte	15
Fetuin	15
Fetuin <sup>c</sup>	1
IgA	15

<sup>a</sup> Minimum concentration of glycoprotein or glycans to inhibit 4 hemagglutinating units of *A. leucocarpus* lectin (Titer = 4). Tests were performed in the presence of desialylated human erythrocytes O<sup>M</sup>. <sup>b</sup> O-glycosidically linked glycans were liberated from desialylated glycoproteins with reductive  $\beta$ -elimination and contains Gal/GalNAc-ol.

<sup>c</sup> O-glycosidically linked glycans liberated from asialo-fetuin by treatment with endo-N-acetylgalactosaminidase treatment contains Gal/GalNAc.

### Sugar Specificity

From all the monosaccharides tested, only GalNAc inhibited the hemagglutinating activity of *A. leucocarpus* lectin and glycoproteins containing GalNAc are powerful inhibitors. From the glycoproteins tested, the most potent inhibitor was fetuin; and to a lesser extent, IgA, ovine, and bovine submaxillary were also more powerful inhibitors than GalNAc. The glycans released from these glycoproteins by reductive  $\beta$ -elimination or by enzymatic treatment had inhibitory capacity, but they were four and sixty times, respectively, more powerful inhibitors than GalNAc, but less inhibitory than parental O-glycosylproteins (Table 3). All

Table 4

Prediction of O-Glycosylable Sequences from Glycoproteins<sup>a</sup>

Glycoprotein	Sequence
Ovine Mucin	S T* T* G S T* S
Bovine Mucine	S* E S T* T* Q L P
Fetuin	A G P T* S A A G V A S* V V V** G P T* P S A** A P S* A V P**
IgA	T* P S T* P S T* P
Glycophorin A <sup>M</sup>	S* S* T* T E V A M
Glycophorin A <sup>N</sup>	L S* T* T* G V A M

\* indicates the putative glycosylation site, based on nctOglyc program:<sup>18</sup>  
and \*\* proposed by Smith, et al.<sup>30</sup>

the glycans liberated from desialylated fetuin, IgA, and stromata from donkey, rabbit, and human O<sup>M</sup> erythrocytes contained Gal and GalNAc-ol, and inhibited the hemagglutinating activity of *A. leucocarpus* lectin at the same concentration (Table 3).

## Prediction of O-Glycosylation Sequences

Results from the prediction of sequences most susceptible to O-glycosylation in fetuin, IgA, ovine, and bovine submaxillary mucin and glycophorin A<sup>N</sup> and A<sup>M</sup> are summarized in Table 4. O-glycosylable sequences in IgA, ovine and bovine submaxillary mucin are rich in serine and threonine residues, indicating that they possess different putative O-glycosylation sites; whereas, the O-glycosylable sequence in fetuin has only one residue able to link O-glycans.

## DISCUSSION

Plant lectins represent a group of well-preserved proteins in evolution. This property is observed even in their sugar-binding specificity.<sup>24</sup> Lectins from Amaranteaceae family have been demonstrated in *A. caudatus*,<sup>5</sup> *A. cruentus*,<sup>6</sup> and *A. leucocarpus*.<sup>13</sup> These lectins represent important tools to characterize O-glycosidically linked glycans,<sup>25</sup> and some authors have suggested their capacity to specifically recognize sugar structures in tissues and tumors.<sup>9-11,25</sup> In this work, we compared the use of the stroma of human erythrocytes type O<sup>M</sup>, IgA, ovine and bovine submaxillary gland mucins, and fetuin as affinity chromatography ligands to find a rapid and economic method to purify *A. leucocarpus* lectin. We obtained, with all these purification systems, an increase in the specific activity as compared with the crude extract. Our results indicate that, if all these ligands are adequate to purify *A. leucocarpus* lectin, the most economic method to purify the lectin was the stroma column prepared from updated erythrocytes. This process can also be used to purify other lectins with specificity for GalNAc or Galβ1,3GalNAcα1-3Ser/Thr.<sup>26</sup>

In general, the lectins from the Amarantaceae group are homodimeric proteins with a range of 33 (*A. caudatus* and *A. cruentus*)<sup>5,6</sup> to 35 kDa per subunit (*A. leucocarpus*). The difference in the molecular weight shown by *A. leucocarpus* seems to correspond to a glycan moiety, since this is the only lectin from this group to be glycosylated. In the amino acid sequences of all the lectins from this group, the amino terminal is blocked and *A. leucocarpus*, as we show in this work, is not the exception.

The ability of lectins to bind carbohydrates and their capacity to detect subtle variations in the conformation of carbohydrate structures found in glycoconjugates of the cell surface depends on their 3-D structures.<sup>27-29</sup> *A. leucocarpus* lectin recognizes O-glycosidically-linked glycans and glycoproteins containing these structures. However, the tested glycoproteins, fetuin, IgA, bovine and ovine submaxillary mucins, showed different capacities to inhibit the hemagglutinating activity of the lectin. Fetuin and its asialo-form were the most potent inhibitors; elimination of galactose residues does not modify, significantly, the interaction with the lectin, indicating that *A. leucocarpus* lectin reacts strongly with T (Galβ1,3GalNAcα1,0Ser/Thr) and Tn (GalNAcα1,0Ser/Thr) structures.

This result is confirmed by the specific interaction with ovine submaxillary gland mucin and its asialo-form, since this glycoprotein contains only NeuAcα2,3GalNAc Ser/Thr.<sup>30</sup> Fetuin possesses three O-glycosidically-linked glycans and thirteen N-glycosidically linked glycans.<sup>16</sup> IgA and bovine submaxillary gland mucin also contain O-glycans.<sup>30,31</sup> The analysis of O-glycosylable sequences in these glycoproteins indicated that in contrast to fetuin,



ovine, bovine submaxillary gland mucins, and IgA these sites are not organized in clusters; hence, it is possible that lectin interaction requires a specific distance among the O-glycosylable sites.

This suggestion is supported by the fact that O-linked glycans from any of the glycoproteins tested, released by reductive  $\beta$ -elimination (containing Gal $\beta$ 1,3GalNAc-ol) or by enzymatic treatment (Gal $\beta$ 1,3GalNAc), including those from all types of asialo-erythrocyte stromata, inhibit to the same extent the activity of the lectin. It is noteworthy that liberated glycans present a drastically reduced inhibitory effect, when compared to the parental glycoproteins, being only four and sixty times more powerful than GalNAc.

ALL agglutinates, preferentially, the human erythrocytes with the M phenotype. The M and N phenotypes in human erythrocytes are present in glycophorins A<sup>M</sup> and A<sup>N</sup> and both glycoproteins possess the same rate of O-glycosylation (see Table 4) although they show differences at their NH<sub>2</sub>-terminal, glycophorin A<sup>M</sup> possessing a serine residue and A<sup>N</sup> leucine residue.<sup>32</sup> Moreover, our results strongly suggest that ALL recognizes conformation and distances between O-glycosidically-linked GalNAc.

O-glycosidically linked glycans attached to membrane and cell surfaces (conforming mucin and mucin-like structures) play important roles in modulating the immune response, inflammation, and tumorigenesis.<sup>33,34</sup> These structures are responsible for the 3-D organization of glycoproteins.<sup>35</sup> Based on the aforementioned data, our results strongly suggest that the lectins from the *Amaranthus* genus, particularly *A. leucocarpus*, represent a tool for the study of mucin structures and their biological role.

#### ACKNOWLEDGMENTS

Thanks are due to Araceli Zavala, for technical assistance. This work was supported in part by CONACyT (27609 M), PAEP 202317, DGAPA-UNAM (PAPIIT-IN224598) and Program ECOS Mexico-France (M97B05).

#### REFERENCES

1. I. J. Goldstein, R. C. Hughes, M. Monsigny, T. Osawa, N. Sharon, *Nature* 285-286 (1980).
2. H. Lis, N. Sharon, *Ann. Rev. Biochem.*, 55, 35-67 (1986).
3. R. Nesser, B. Koellreutter, P. Wuersch, *Infec. Immun.*, 58, 428-436 (1986).

4. N. Sharon, H. Lis, in *The Lectins Properties, Function and Application in Biology and Medicine*, Academic Press, 1986, pp. 266-270.
5. S. J. Rinderle, I. J. Goldstein, E. E. Remsen, *Biochemistry*, **29**, 10555-10561 (1990).
6. A. Calderón de la Barca, L. Vázquez-Moreno, *J. Food. Biochem.*, **12**, 117-126 (1988).
7. H. Bourges, *Perfil Bromatológico del Amaranto, Primer Seminario Nacional del Amaranto*, A. Santos, F. Gómez, G. Suárez, Compiladores, Chapingo México, 1990, p. 577.
8. E. Zenteno, R. Lascurain, L. F. Montaña, L. Vazquez, H. Debray, J. Montreuil, *Glycoconjugate J.*, **9**, 204-208 (1992).
9. E. Zenteno, J. L. Ochoa, C. Parra, L. F. Montaña, I. Rayon, G. Maldonado, B. Ruiz, R. Carvajal, in *Lectins-Biol., Biochem., Clinical Biochem.*, Vol. IV, T. C. Bog-Hansen, J. Breborowicz, eds. Walter de Gruyter, Berlin, 1985, pp. 537-546.
10. R. Lascurain, R. Chávez, P. Gorocica, A. Pérez, L. F. Montaña, E. Zenteno *Immunology*, **83**, 410-413 (1994).
11. G. Guevara, B. Espinosa, E. Zenteno, L. Vazquez, J. Luna, G. Perry, R. Mena, *J. Neuropath. Exp. Neurol.*, **57**, 905-914 (1998).
12. T. Dodge, C. Mitchell, D. Hanahan, *Arch. Biochem. Biophys.*, **100**, 113-118 (1963).
13. E. Zenteno, J. Ochoa, *Phytochemistry*, **27**, 313-317 (1988).
14. C. March, I. Parikh I. P. Cuatrecasas, *Anal. Biochem.*, **60**, 149-152 (1974).
15. H. Debray, D. Decout, G. Strecker, G. Spik, J. Montreuil, *Eur. J. Biochem.*, **117**, 41-55 (1981).
16. R. G. Spiro, V. D. Bhojroo, *J. Biol. Chem.*, **249**, 704-711 (1974).
17. S. Bouquetlet, in *Methods on Glycoconjugates, a Laboratory Manual*, A. Verbert, ed., Harwood Academic Publishers, Switzerland, 1995, pp. 51-62.
18. J. Hansen, O. Lund, O. Tolstrup, A. Gooley, K. Williams, S. Brunack, *Glycoconjugate J.*, **15**, 115-130 (1998).

19. M. M. Bradford, *Anal. Biochem.*, **37**, 157-223 (1976).
20. M. Dubois, K. Giles, J. Hamilton, P. Rebers, F. Smith, *Anal. Chem.*, **28**, 350-356 (1956).
21. J. P. Zanetta, W. Breckenridge, G. Vincendon, *J. Chromatogr.*, **69B**, 291-304 (1972).
22. U. K. Laemmli, M. Favra, *J. Molec. Biol.*, 575-593 (1973).
23. A. Bidlingmeyer, A. Cohen, L. Tarvin, *J. Chromatogr.*, **336**, 93-104 (1984).
24. N. Sharon, H. Lis, *FASEB J.*, **4**, 3198-3208 (1990).
25. R. Lascuirain, F. Porras, R. Baez, R. Chavez, S. Martínez, G. Alvarez, E. Zenteno, *Immunol. Invest.*, **265**, 579-587 (1997).
26. E. Hernández, R. Ortiz, F. López, A. Martinage, F. Massó, L. Montaña, E. Zenteno, *Phytochemistry*, **32**, 1209-1211 (1993).
27. I. Weiss, K. Dricrkramer, *Ann. Rev. Biochem.*, **65**, 441-473 (1995).
28. M. Rini, *Ann. Rev. Biomol. Struct.*, **24**, 551-577 (1995).
29. V. Sharma, A. Surolia, *J. Mol.*, **267**, 433-445 (1997).
30. B. A. Gottschalk, in *The Glycoproteins*, A. B. Gotschalk, ed., Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, 1972, pp. 810-829.
31. A. Pierce-Cretel, M. Panblanco, G. Strecker, J. Montreuil, G. Spik, *Eur. J. Biochem.*, **114**, 169-178 (1981).
32. M. Tomita, H. Furthmayer, V. T. Marchesi, *Biochemistry*, **17**, 4756-4770 (1978).
33. W. Wenyu, J. A. Punt, L. Granger, S. O. Sharrow, K. P. Kearse, *Glycobiology*, **7**, 349-356 (1997).
34. M. Krishna, A. J. Varki, *J. Exp. Med.*, **185**, 1997-2013 (1997).
35. T. A. Gerken, C. L. Owens, M. Pasumarthy, *J. Biol. Chem.*, **272**, 9709-9719 (1997).

36. K. D. Smith, A. M. Harbin, R. A. Carruthers, A. M. Lawson, E. F. Hounsell, *Biomed. Chrom.* 4, 261-266 (1990).

Received December 6, 1998  
Accepted December 24, 1998  
Manuscript 7046

## CAPÍTULO II

### CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DE LA LECTINA *Amaranthus leucocarpus* por ANÁLISIS PROTEÓICO.

A pesar de la gran variedad de estructuras de lectinas reportadas, la familia de las leguminosas y de las gramíneas<sup>19,23,54</sup>, son las más conservadas, siendo las leguminosas las que aportan el mayor número de estructuras tridimensionales resueltas, más de diez, algunas de ellas han sido recientemente caracterizadas<sup>55,56</sup>. Sin embargo, muchas de las lectinas con actividad biológica importante permanecen sin ser caracterizadas química y estructuralmente. Debido a la gran información que se ha obtenido del análisis del material genético de células mediante la secuenciación del ADN y la expresión del ARNm, se ha comenzado a obtener información acerca de la expresión de genes individuales y sobre regulación-coordinación de algunos genes<sup>57</sup>, más aun, recientemente se ha concluido que es necesaria la comprensión de la expresión tanto de genes como de proteínas para el funcionamiento de la red genética<sup>58</sup>. Esto ha generado una nueva disciplina dentro del área de la química de proteína llamada análisis proteómico, donde un proteoma es definido como la cantidad total de proteínas expresadas por un genoma<sup>59</sup>. La importancia de este análisis es su habilidad para estudiar modificaciones post-transcripcionales y post-traduccionales de las proteínas, para lo cual se han desarrollado tres áreas: La primera de ellas se encarga del estudio de la secuencia genómica de un organismo, la segunda consiste en el análisis de la expresión de proteínas mediante la electroforesis de dos dimensiones y la tercera consiste en el empleo de la espectrometría de masas para correlacionar a las proteínas con sus genes. También ha permitido la secuenciación de proteínas. Existen dos técnicas de ionización para el estudio de proteínas, una de ellas es el electrospray, que crea iones por una diferencia de potencial entre el capilar y la entrada al espectrómetro de masas. El campo eléctrico genera gotitas cargadas en forma de niebla, mediante la aplicación de un gas el tamaño de las gotas disminuye, obteniéndose iones altamente cargados sin fragmentación, lo que permite su utilización para el análisis de proteínas de bajo peso molecular. La otra técnica de espectrometría de masas empleada es el MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption), basada en la inserción de la muestra a analizar en una sustancia capaz de cristalizar y de absorber radiaciones UV, obteniéndose iones de moléculas polares o cargadas; este cristal orgánico debe de ser capaz de absorber a la longitud de onda del láser, que generalmente es de 337nm, la aplicación de este láser al

cristal orgánico permite la generación de iones, que después son analizados. La técnica más empleada para el análisis de estos iones es el TOF (time of flight ), en donde la proporción masa / carga es determinada por el tiempo que le toma a los iones moverse hacia una región libre de campo eléctrico, así el tiempo de vuelo para un ión está relacionado con  $m/z$  . El MALDI es empleado para el análisis de moléculas de alto peso molecular<sup>60</sup>. En conclusión el análisis proteómico presenta una alta sensibilidad para diferenciar a proteínas que han sido modificadas y permite cuantificar todas las proteínas que se encuentran en una célula.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La lectina de *Amaranthus leucocarpus* se purificó mediante cromatografía de afinidad usando estroma de eritrocitos humanos del tipo O<sup>M</sup>. La presencia de isoformas se evaluó por medio de electroforesis en dos dimensiones. Se encontraron tres isoformas con un pI de 4.8, 4.9 y 5.2. Las tres presentan idéntica actividad hemaglutinante hacia eritrocitos humanos del fenotipo M. La actividad hemaglutinante de cada isoforma fue inhibida con 200 mM de GalNAc.

La secuencia de aminoácidos de las de ALL se obtuvo por MALDI-TOF.. En algunos experimentos la lectina de *A. leucocarpus* fue sometida a deglicosilación antes de la electroforesis de dos dimensiones. En el caso de la lectina que no fue deglicosilada se obtuvieron péptidos con masas de 410 a 2345m/z. Los péptidos obtenidos presentaron 60% de homología con una proteína de alto valor nutricional reportada en la lectina de *A. hypocondriacus*, los mismos resultados fueron obtenidos cuando se compararon la masas de los péptidos obtenidos de la lectina ALL deglicosilada. Un aspecto interesante es que se encontraron varios glicopéptidos comunes para las tres isoformas de la lectina. El tratamiento con la PGNase, previo al tratamiento con tripsina reveló la presencia de un nuevo fragmento con masa de 3848.8m/z que corresponde a los aminoácidos 112-147 de la secuencia de ALL

En la semilla de *A. hypocondriacus*, se identificó el gen de una proteína globular de 35 kDa, a la cual no se le ha asociado actividad biológica. Esta proteína fue se considera una proteína de alto valor nutricional, debido al considerable número de residuos de aminoácidos esenciales. Nuestros resultados indican que esta proteína podría tener actividad de lectina dada la gran homología que presenta con la lectina aislada de *A.*

*leucocarpus syn hypocondriacus*. Es interesante mencionar que a pesar de que en efecto la lectina podría ser considerada de alto valor nutricional, se ha demostrado en diversos estudios que la extracción de la misma, incrementa, aunque de manera moderada, la digestibilidad de la harina, sugiriendo que la lectina en referencia, podría tener un efecto antinutricional<sup>61,62</sup>. Este resultado ha sido demostrado en otras lectinas vegetales, como en leguminosas y hongos<sup>63</sup>.

Se observan tres sitios de posible N-glicosilación en la secuencia de la lectina de *A. leucocarpus*. La composición de carbohidratos de la lectina ALL indica la presencia de: Gal, Man, GlcNAc y Xyl en una proporción de 4:3:3.5:1. Para caracterizar a las cadenas oligosacáridicas se realizaron ensayos de cromatografía de afinidad de los glicopéptidos de ALL en una columna de ConA-Sepharose. Los resultados revelan que la composición de los glicopéptidos purificados por la columna de Con A fue Man y GlcNAc 3:2.1, mientras que en la fracción no retenida la composición fue Man, GlcNAc, Gal y Xyl en proporción de 3:3:7:3. La presencia de N-glicanos fue sugerida por la composición de carbohidratos obtenida de los glicopéptidos de la lectina ALL que fueron retenidos en la columna de ConA-Sepharose, la cual presenta una especificidad hacia estructuras del tipo N-glicanos que contiene en su estructura man  $\alpha(1-6)$  [man  $\alpha(1-3)$ ] sustituida por dos residuos de GlcNAc, además de estos N-glicanos, se detectó en menor cantidad la presencia de estructuras del tipo lactosaminico. En el material no retenido por la columna de ConA/Sepharose. Las estructuras unidas por enlaces de tipo N-glicosídico, parecen ser comunes en las proteínas de almacenamiento presentes en semillas de *Glycine max* y en lectinas de plantas como en la jacalina, *Sophora japonica*, *Erythrina americana* y *Viscum Album*.

La N-glicosilación generalmente está asociada a precursoras de lectinas, así tenemos que la forma glicosilada de la lectina de Con A es inactiva, se necesita de una modificación post-traducciona para remover la porción oligosacáridica y así tener la forma activa de la lectina, lo mismo sucede con la lectina del germen de trigo. Esto sugiere que los N-glicanos no tienen un papel importante en la actividad biológica de la lectinas. Es muy posible que las cadenas oligosacáridicas presentes en las lectinas actúen de manera protectora en contra de proteasas. En este trabajo se demostró que la lectina ALL después de la deglicosilación con una endoglicosidasa específica para enlaces de tipo N-glicosídico, nos permitió

identificar una secuencia de 35 aminoácidos, que se encuentra cercana a un sitio de glicosilación, lo cual nos permite confirmar que la lectina se encuentra glicosilada; aunque el papel de estas estructuras en la topología, la flexibilidad y especificidad fina de la lectina todavía no ha sido resuelto. Existe la posibilidad de que la presencia de los N-glicanos modifiquen la interacción lectina-receptor, provocando ligeras variaciones en el sitio de reconocimiento de la lectina. Es interesante señalar que estos sitios de glicosilación se encuentren presentes en la lectina de *A. caudatus*, sin embargo, esta lectina no se encuentra glicosilada, esto se puede deber a una regulación de las glicosiltransferasas, las cuales podrían estar inactivadas por factores reguladores, a nivel genético o a nivel proteico.



**CHEMICAL CHARACTERIZATION OF THE LECTIN FROM *Amaranthus leucocarpus* syn. *hypocondriacus* BY 2-D PROTEOME ANALYSIS**

Pedro Hernández<sup>1</sup>, Henri Debray<sup>2</sup>, Heidi Jaekel<sup>2</sup>, Yonathan Garfias<sup>1</sup>, Maria del Carmen Jiménez<sup>1</sup>, Salvador Martínez-Cairo<sup>3</sup> and Edgar Zenteno<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Bioquímica, Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, Tlalpan D.F., 14080, México.

<sup>2</sup>Laboratoire de Chimie Biologique, UMR du CNRS No. 8576, Université des Sciences et Technologies de Lille, 59655 Villeneuve d'Ascq cedex, France.

<sup>3</sup>Unidad de Investigación, Centro Médico Nacional S XXI, IMSS, 06725 México.

<sup>4</sup>Laboratorio de Inmunología, Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM, PO Box 70159, México 04510.

\*Corresponding author. E. Zenteno.  
Dep. Bioquímica, Facultad de Medicina UNAM  
P.O. Box 70159, 04510, México D.F.  
Fax 52 (5) 616-24-19  
E-mail: ezenteno@servidor.unam.mx

Running title: Characterization of the lectin from *Amaranthus leucocarpus*

Key words: *Amaranthus leucocarpus*, plant lectins, T and Tn-specific lectin, glycoproteins, Proteome analysis, Circular Dichroism, *Amaranthus* lectins.

## ABSTRACT

In this work we characterized chemically the *N*-acetyl-D-galactosamine specific lectin from *Amaranthus leucocarpus* syn. *hypocondriacus* lectin (ALL). It is a dimeric glycoprotein composed by three isoforms with pI at 4.8, 4.9, and 5.2. Circular dichroism analysis indicated that the secondary structure of ALL contains 45% of  $\beta$ -sheet and 5% of  $\alpha$ -helix. Amino acid sequence of the purified lectin and its isoforms was determined from peptides obtained after trypsin digestion by MALDI-TOF (Matrix assisted laser desorption ionization-time of flight). The three isoforms showed different degrees (80 to 83%) of homology with a high nutritional value protein from *A. hypocondriacus*. Furthermore, analysis of tryptic peptides obtained from ALL previously treated with peptide *N*-glycosidase, revealed a 93% homology with the aforementioned protein. Presence of *N*-glycosidically linked glycans of the oligomannosidic type and, in minor proportion, of the *N*-acetyllactosaminic type glycans was determined by affinity chromatography on immobilized Con A.

## INTRODUCTION

Lectins with specificity for O-glycosidically linked glycans (containing the Gal $\beta$ 1-3 GalNAc $\alpha$ 1-0Ser/Thr and GalNAc $\alpha$ 1-0Ser/Thr determinants) have been widely used in fractionation of glycoproteins and cellular subpopulations [1-3]. Lectins from *Amaranthaceae* family have been identified in *A. caudatus* [4], *A. cruentus* [5] and *A. leucocarpus* [6]. All of these lectins have a high proportion of essential amino acids such as lysine, leucine, threonine, phenylalanine, valine and sulfur amino acids and interact specifically with GalNAc (*N*-acetyl-D-galactosamine) [4-6]. These lectins have been proved to be useful tools to recognize O-glycosidically linked glycans in different tissues, tumors, and cells [7-9]. *A. leucocarpus* *syn hypocondriacus* is a Mexican representative of the *Amaranthaceae* family. It possesses a lectin that induces immunosuppression in animals [8] and recognizes non-stimulated murine peritoneal macrophages, and naive CD4<sup>+</sup> mouse and human lymphocytes [10, 11]. The lectin from *A. leucocarpus* (ALL) agglutinates human erythrocytes with the M phenotype [7] and interacts with O-glycosidically linked proteins in some neurodegenerative process [12].

It has recently been suggested that ALL may recognize a particular conformation of some O-glycans determinants adjacent to the peptidic backbone of the specific cellular receptor, conferring the lectin its particular biological properties [13]. In this work, we determined the main characteristics of the subunits that compose this lectin and the amino acid sequence of each isoform was analysed from pepsin digested-glycopeptides, by MALDI-TOF (Matrix assisted laser desorption ionization-time of flight).

## MATERIALS AND METHODS

### Lectin extraction

*Amaranthus leucocarpus syn hypocondriacus* seeds were obtained in Tulyehualco (Mexico) and the lectin was purified by affinity chromatography on a column containing human erythrocyte type O<sup>M</sup> membranes physically entrapped in Sephadex G-25 (Sigma Fine Chemical Co., St. Louis, MO, USA) [6].

### Enzymatic treatment of ALL with PNGase

ALL (500  $\mu$ g) in 150  $\mu$ l of 30 mM phosphate buffer, pH 8.4, was boiled 5 min at 100°C with 0.2% SDS and 0.5%  $\beta$ -mercaptoethanol. After cooling at room temperature, 4  $\mu$ l Triton X-100/mg protein and 300  $\mu$ l of distilled water/mg protein were added. The treated

sample was incubated overnight at 37°C with 80 mU/mg protein of N-peptide glycosidase F (PNGase) from *Flavobacterium meningosepticum* (provided by Dr. A. L. Tarentino, Wadsworth Center for Laboratories and Research, Albany, USA) [14]. The mixture containing deglycosylated lectin was electrophoresed in SDS-PAGE for trypsin treatment (see further).

### **Purification of lectin glycopeptides**

ALL glycopeptides (ALLgp) were prepared by incubating 10 mg lectin in 0.5 ml of 150 mM Tris-acetate pH 8 and 15 mM CaCl<sub>2</sub> with 1 mg pronase (from *Streptomyces griseus*, Sigma) for 48 h at 36°C. The mixture was boiled for 5 min to stop the enzymatic reaction and the glycopeptides were filtered on a column containing Bio-Gel P-2 (100 x 1.2 cm ID) equilibrated with distilled water. The glycopeptides were then lyophilized until use [7]. Purification of ALL glycopeptides was performed by affinity chromatography on a Con A-Sepharose column (10 x 1 cm) (Sigma), containing 10 mg of Con A/ml Sepharose. ALLgp (200 µg) in acetate buffer (5 mM sodium acetate, 0.14 M NaCl, and 5 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 5.2) were deposited onto the column. The unretained fraction was eluted with the acetate buffer; addition of 200 mM α-methyl-mannoside eluted the retained fraction. Each collected fraction was desalted on a Biogel P-2 column equilibrated with distilled water and lyophilized. ALL glycopeptides, not recognised by ConA, were applied to a column (10 x 1 cm) containing the erythroagglutinin from *Phaseolus coccineus* (10 mg/ml Sepharose), under similar conditions as for Con A.

### **Analytical methods**

Protein concentration was determined by the method of Bradford [15], using bovine serum albumin as standard. Carbohydrate composition was determined with the heptafluorobutyrate derivatives of O-methyl-glycosides from the lectin and its glycopeptides, obtained after methanolysis in 0.5 M methanol-HCl for 24 h at 80°C; lysine (Sigma) was used as internal standard. The samples were analysed by gas-chromatography using a capillary column (25 x 0.32 mm) of 5% Silicone OV 210, (Applied Science Lab., Buffalo, NY), in a Varian 2100 gas chromatograph (Orsay, France), as described by Zanetta *et al.* [16]. Two-dimensional electrophoresis (2-D) of the purified ALL was performed as follows: For the first dimension, isoelectric focusing was performed with 10 µg of purified ALL in cylindrical 5% polyacrylamide gels (0.2 x 10 cm) containing 2% (v/v) of pH 3.5 to 10 ampholines (Pharmacia) and 1% Triton X-100 [17]. Gels were run at 600 V for 14 h at 4° C. Then, each

gel was deposited (SDS-PAGE), for a second dimension, on 12% separating and 4% stacking gel in a slab gel apparatus according to the method of Laemmli [18]. Coomassie brilliant blue R-250 was used for staining. The pH gradient was established after isoelectric focusing in blank gels by slicing the gels into 0.4 cm sections, and eluting the ampholines with distilled water, for 12 h and measuring the pH of the solution. The gradient was linear over the pH 4 to 8.5 range.

#### Amino acid sequencing

Amino acid sequencing of ALL was determined by MALDI-TOF on peptide fragments obtained by trypsin digestion of the purified ALL. After electrophoresis of the purified lectin or of the N-peptide glycosidase F-treated lectin on SDS-PAGE, or after 2-D electrophoresis, the bands or spots were excised with a scalpel, and each band or spot containing 200 pM of protein was digested with 0.5 µg trypsin (Promega sequencing grade) in 500 µl ammonium bicarbonate, pH 8.0, at 37 °C, for 24 h. The enzyme digest was then evaporated to dryness using a Speed Vac concentrator (Savant Instruments Inc., N.Y) and re-evaporated with water (2 x 100 µl). Samples were prepared by mixing directly onto the target 1 µl of the reaction products (containing 50 pM of peptides) and 1 µl of a 2,5-dihydroxybenzoic acid matrix (12 mg/ml in acetonitrile/H<sub>2</sub>O, 80:20, v/v) and allowing the mixture to crystallize at room temperature. Positive ions of the peptides were measured by MALDI-TOF on a Vision 2000 time-of-flight mass spectrometer (Finnigan MAT, Bremen, Germany) equipped with a 337 nm UV laser. Mass spectra were acquired in reflectron mode under 8 keV acceleration voltage and positive detection. Control assays were performed using trypsin alone to identify self-digested peptide mass and with angiotensin I as standard (Mr 1296.7) [19]. The mass of [M+H]<sup>+</sup> ions from peptides produced by tryptic digestion was compared with those obtained from NCBI nr (Swiss-Prot 10/04/99) database. Putative glycosylation sites were determined with the Prosite Pattern Search.

#### Circular dichroism

CD spectrum of ALL was recorded on an AVIV (New York, USA) spectropolarimeter. The protein concentration was 300 µg of ALL/ ml of PBS (30 mM sodium phosphate, 0.15 M sodium chloride, pH 7.0) and the scanning range was 180 to 240 nm in 5 mm path length cells. Prediction of secondary structure, using *A. leucocarpus* amino acid sequence, was made with SOPMA [20], GOR4 [21], and PSIPRED [22] programs.

### **Hemagglutinating activity and sugar specificity**

Human erythrocytes group O<sup>M</sup> from healthy donors were obtained from the Central Blood Bank, IMSS, Mexico. Hemagglutinating activity, using 25 µl of lectin in phosphate buffered saline (PBS: 0.01 M sodium phosphate, 0.15 M sodium chloride, pH 7.2), was assayed in microtiter U plates (NUNC, Denmark) by the two-fold serial dilution procedure, finally 25 µl 2% (v/v) erythrocyte suspension in PBS was added to the lectin dilution. The hemagglutinating titer is reported as the inverse of the last dilution with agglutinating activity. Sugar specificity of the lectin was determined by comparing the inhibitory activity of GalNAc on the hemagglutination induced by the lectin and against human erythrocytes.

## RESULTS

### Identification of lectin isoforms

The lectin from *Amaranthus leucocarpus* was purified by affinity chromatography using a column containing glutaraldehyde treated stroma from human erythrocytes type O. SDS-PAGE of the purified lectin under non denaturing conditions indicated that it is a 70 kDa protein, whereas, after treatment with  $\beta$ -mercaptoethanol and boiling for 10 min, the lectin renders a band of 35 kDa, indicating its two subunits composition, as determined by SDS-PAGE (Figure 1). Two-dimensional (2-D) electrophoresis of *A. leucocarpus* lectin confirms that it is a protein of 35 kDa, presenting three main isoforms with a pI of 4.8, 4.9, and 5.2 (further identified as isoform I, II, and III, respectively) (Figure 2). Hemagglutinating activity of the purified lectin was confirmed in the presence of human erythrocytes with the M phenotype, 2  $\mu$ g/ml of ALL are necessary to agglutinate a 2% solution of erythrocytes. The hemagglutinating activity of the lectin was inhibited specifically by 200 mM of GalNAc, other monosaccharides such as GlcNAc, Gal, Man, L-fuc, or Neu5Ac at 200 mM concentration did not affect the hemagglutinating activity of the lectin.

### Amino acid sequence

Amino acid sequence of the purified lectin and each isoform was analysed from peptides obtained after trypsin digestion, by MALDI-TOF, and compared with the relative values obtained from the NCBI nr (Swiss-Prot 10/01/99) database. Digestion of the purified lectin with trypsin yields peptides with an m/z range of 508.5 to 2810.7. When we compared the m/z values with the relative values obtained from the NCBI nr database, a homology of 83% was found with a protein of high nutritional value identified in *Amaranthus hypocondriacus* seeds; and the matched peptides cover 60.5 % (184/304 amino acids) of the protein (Table 3). Analysis of the peptides obtained by trypsin digestion of *A. leucocarpus* isoforms, separated after 2-D electrophoresis, indicated relevant differences in the digestion profile and in the degree of homology with the aforementioned protein. ALL-I isoform yielded eight main peptides, ALL-II and ALL III yielded, each, seven peptides. As for *A. leucocarpus* lectin the m/z of the isoforms was identified at 508.5 to 2810.7; however, as indicated in table 1, some fragments were common for the three isoforms. Tryptic peptides obtained from ALL-I and III isoforms showed 83% homology with *A. hypocondriacus* protein

whereas ALL-II showed 80% homology with this protein. Treatment of the purified lectin with PNGase before trypsin digestion enabled us to identify a new fragment at  $m/z$  3848.8, which corresponds to a 35 amino acid long peptide, and the identified peptides revealed now a 93% homology with the aforementioned globular protein (Table 1); the matched peptides, obtained after deglycosylation, covered 72 % (219/304 amino acids) of the *A. hypochondriacus* amino acid sequence (Table 1).

#### **Circular dichroism.**

The CD spectrum of *A. leucocarpus* lectin was characterized by a maximum negative absorption at 198-202 nm and positive absorption at 185 nm in the far UV region (Figure 4). Analysis of these spectra with PROCEC 3.0 program revealed that the secondary structure of ALL contains 45% of  $\beta$ -sheet and 5% of  $\alpha$ -helix. Similar results were obtained using SOPMA (35% of  $\beta$ -sheet and 7% of  $\alpha$ -helix), GOR4 (40% of  $\beta$ -sheet and 7% of  $\alpha$ -helix), and PSIPRED (39% of  $\beta$ -sheet and 6% of  $\alpha$ -helix) programs.

#### **Carbohydrate composition of ALL**

Monosaccharide analysis of the glycopeptides obtained by pronase digestion of the affinity purified lectin revealed galactose, mannose, and *N*-acetyl-D-glucosamine; in minor concentration, xylose residues were also identified. The sugar composition of the glycopeptides purified by affinity chromatography on ConA-Sepharose was Man and GlcNAc. The glycopeptides that were not retained in the ConA-Sepharose column were chromatographed on *Phaseolus coccineus* erythroagglutinin-Sepharose. With this column we identified a slight and retarded interaction with ALL glycopeptides; most of the glycopeptides were obtained practically in the void volume, and this fraction contains Man, GlcNAc, Gal, and Xylose residues (Table 2).



## DISCUSSION

Lectins from the *Amaranthaceae* family, such as *A. caudatus* (ACA) and *A. cruentus*, have been shown to be composed of tightly associated homodimers of 33 kDa subunits [3, 5, 23]. The lectin from *A. leucocarpus* is a dimeric glycoprotein of 35 kDa subunits, composed of three main isoforms with a pI ranging from 4.8 to 5.2, as demonstrated by 2-D electrophoresis. The hemagglutinating activity and sugar specificity for GalNAc of the three isoforms is identical, indicating that the active site of the lectin seems to be preserved among the three isoforms.

As demonstrated previously, the amino terminal in *A. leucocarpus* lectin is blocked [13]. In this work, we determined the amino acid sequence of the purified lectin, as well as of each isoform, by analyzing the peptides obtained through trypsin digestion by MALDI-TOF and comparing them with the relative values obtained from the NCBI database (Swiss-Prot 10/01/99). Our results indicate that the tryptic peptides prepared from purified lectin and the three isoforms show different degree (80 to 83%) of homology with the amino acid sequence of the high nutritional value globular protein identified in *A. hypocondriacus* [24]. Although the nutritional value of the 35 kDa protein identified in *A. hypocondriacus* has been cited only for its amount of essential amino acids [24], previous works showed that removal of the lectin does not affect the nutritional value of *Amaranthus* seed meal [25, 26]. The identified amino acid sequence for the *Amaranthus hypocondriacus* globular protein has not been associated with any functional activity [24], but the present work shows that this identified protein is in fact a lectin.

Lectins from *Amaranthaceae* share the capacity to interact with GalNAc [4, 5], however, ALL shows slight differences in the recognition of oligosaccharidic sequences. The lectin from *A. caudatus* and ALL can bind T and Tn antigens, and substitutions in these antigens of their Gal C3 and GalNAc C6 by neuraminic acid are well tolerated by both lectins; however, in contrast to ACA, substitutions by N-acetyl lactosaminyl groups at the same positions in the typically class II core of O-glycosidically linked glycans are not tolerated by ALL [7]. These results indicate that the specificity of ALL is directed to GalNAc present in the inner core of class I O-glycosidically linked glycans and not to the middle of a longer oligosaccharide. The ability of lectins to bind carbohydrate structures found in glycoconjugates depends on their 3-D structure [27, 28]. Secondary structure of *A.*

*leucocarpus* lectin, as determined by Circular Dichroism, is rich in  $\beta$ -sheet (45%) along with 5%  $\alpha$ -helix; however, *A. caudatus* lectin possesses 40 and 2% of  $\beta$ -sheet and  $\alpha$ -helix motifs (Protein Data Bank, version 1999). Considering that both lectins are very similar in their secondary structures, although not identical, our results suggest that the 3-D structure of ALL and, most probably, the sugar binding site are influenced by the presence of N-linked glycans; this could explain the subtle differences in the recognition of oligosaccharide sequences with the non-glycosylated lectin from *A. caudatus* [4, 29].

ALL is a glycoprotein that contains 8% of sugar by weight [13]. Our work shows that the three putative N-glycosylation sites are present in the amino acid sequence of ALL. Moreover, sequential treatment of the lectin with *N*-peptide glycosidase F and trypsin reveals a 35 amino acid-long cryptic peptide (residues 113 to 147), which has not been identified in the glycosylated lectin or its isoforms. The presence of N-glycosidically linked glycan was suggested by the carbohydrate composition of the glycopeptides obtained from the lectin and purified by affinity chromatography on Con A-Sepharose. Con A possesses high affinity for glycans with the trimannosidic core containing man  $\alpha(1,6)$  [man  $\alpha(1,3)$ ] man substituted by two GlcNAc residues [30]. ALL-glycopeptides interact (with low affinity) with the erythroagglutinin from *Phaseolus coccineus*, the specificity of this lectin is directed toward the Gal ( $\beta 1-4$ ) or ( $\beta 1-3$ ) GlcNAc ( $\beta 1-2$ ) Man ( $\alpha 1-$ ) saccharidic sequence present in triantennary N-acetyllactosamine-type N-glycopeptides [31]. Our data indicate that ALL contains N-glycosidically linked glycans of the oligomannosidic-type and, in minor proportions, biantennary N-acetyllactosaminic-type glycans most probably present in the unretained ConA-Sepharose fraction. The oligomannosidic structure seems to be common to glycan moieties found in other plant lectins, such as jacalin [32], *Sophora japonica* [33], *Erythrina americana* [34], and *Viscum album* lectin I [35]. The specific role of glycan moieties of the *A. leucocarpus* lectin, such as its effect on the topology, the internal flexibility of the molecule or its fine sugar specificity, remains to be determined.

## ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Prof. Nathan Sharon for critical reading of this manuscript, Dr. Anthony L. Tarentino of Wadsworth Center for Laboratories and Research, Albany USA, for providing the PNGase from *Flavobacterium meningosepticum* and Marie Christine Slomianny from USTL, for MALDI analysis. This work was supported in part by CONACyT (27609 M), DGAPA-UNAM (PAPIIT-IN224598) and Program ECOS Mexico-France (M97B05).

## REFERENCES.

1. Sharon, N. and Lis, H. (1990). Legume lectins, a large family of homologous proteins. *FASEB J.* 4: 3198-3208.
2. Weiss, I. and Drickramer, K. (1996). Structural basis of the lectin-carbohydrate recognition. *Annu. Rev. Biochem.* 65: 441-73
3. Van Damme, E. J. Peumans, W. J., Barre, A. and Rouge, P. (1998). Plant lectins: A composite of several distinct families of structurally and evolutionary related proteins with diverse biological roles. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 33:209-58.
4. Rinderle, S. J., Goldstein, I. J., Matta, K. L. and Ratcliffe, R.M. (1989). Isolation and characterization of amaranthin, a lectin present in the seeds of *Amaranthus caudatus*, that recognizes the T- (or cryptic T)-antigen. *J Biol Chem* 264:16123-131
5. Calderon de la Barca, A. and Vazquez-Moreno L. (1988). *Amaranthus cruentus* lectin: Purification, stability and some biochemical properties. *J. Food. Biochem.* 12: 117-26.
6. Zenteno, E. and Ochoa, J. L. (1988). Isolation and characterization of *Amaranthus leucocarpus* lectin. *Phytochemistry* 27: 313-17
7. Zenteno, E., Lascurain, R., Montaña, L. F., Vazquez, L. Debray, H. and Montreuil J. (1992). Specificity of *Amaranthus leucocarpus* lectin. *Glycoconjugate J.* 9: 204-8
8. 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 *Machaerocerus eruca* and *Amaranthus leucocarpus* lectin. In *Lectins-biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry.* Bög-Hansen TC Breborowicz J. Eds Walter de Gruyter. 4: 537-46.
9. Boland, C.R., Chen, Y. F., Rinderle, S. J., Resau, J. H., Luk, G. D., Lynch, H.T. and Goldstein I. J. (1991). Use of the lectin from *Amaranthus caudatus* as a histochemical probe of proliferating colonic epithelial cells. *Cancer Res* 51: 657-65
10. Lascurain, R., Chávez, R., Gorocica, P., Pérez, A., Montaña, L. F. and Zenteno, E. (1994). Recognition of CD4<sup>+</sup> mouse medullary thymocyte subpopulation by *Amaranthus leucocarpus* lectin. *Immunology* 83: 410-13
11. Lascurain, R., Porras, F., Báez, R., Chávez, R., Martínez, S., Álvarez, G. and Zenteno, E. (1997). *Amaranthus leucocarpus* lectin recognizes human naive T cell subpopulations. *Immunol. Invest.* 26:579-87

12. Guevara, J., Espinosa, B., Zenteno, E., Vázquez, L., Luna, J., Perry, G. and Mena, R. (1998). Altered glycosylation pattern of proteins in Alzheimer disease. *J. Neuropath. Exp. Neurol.* 57:905-14.
13. Hernández, P., Bacilio, M., Porras, F., Juárez, S., Debray, H., Zenteno, E. and Ortiz, B. (1999). A comparative study on the purification of the *Amaranthus leucocarpus* syn. *hypocondriacus* lectin. *Prep. Biochem. Biotechnol.* 29:219-34.
14. Kuster, B., Wheler, S. F., Hunter, A. P., Dweek, R. A. and Harvey, D. J. (1977). Sequencing of N-linked oligosaccharides directly from protein gels: in-gel deglycosylation followed by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry and normal-phase high-performance liquid chromatography. *Anal. Biochem.* 250: 82-101.
15. Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein dye-binding. *Anal. Biochem.* 72:248-54.
16. Zanetta, J. P., Timmerman, P. and Leroy, Y. (1999). Gas-liquid chromatography of the heptafluorobuturate derivatives of O-methyl-glycosides on capillary columns: a method for the quantitative determination of monosaccharide composition of glycoproteins and glycolipids. *Glycobiology* 9:255-66.
17. Catsimopoulos, N. (1968). Micro isoelectric focusing in polyacrylamide gel columns. *Anal. Biochem.* 26:480-84.
18. Laemmli, U. K. and Favra M. (1973). Maturation of the head of bacteriophage T4. I. DNA packaging events. *J. Mol. Biol.* 80: 575-99 .
19. Hellman, U., Wernstedt, C., Gonez, J. and Heldin, C. H. (1995). Improvement of an "In-Gel" digestion procedure for the micropreparation of internal protein fragments for amino acid sequencing. *Anal. Biochem.* 224:451-55.
20. Geourjon, C. and Deleage, G. (1995). SOPMA: significant improvements in protein secondary structure prediction by consensus prediction from multiple alignments. *Comput. Appl. Biosci.* 11: 681-84
21. Garnier, J., Gibrat, J. F. and Robson, B. (1996). GOR secondary structure prediction method version IV *Methods in Enzymology* R.F. Doolittle Ed., vol 266, 540-53
22. Jones, D. T. (1999). Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices. *J. Mol. Biol.* 292:195-202.

23. Transue, T. R., Smith, A. K., Mo, H., Goldstein, I. J. and Saper, M. A (1997). Structure of benzyl T-antigen disaccharide bound to *Amaranthus caudatus* agglutinin. Nat. Struct. Biol. 4: 779-83.
24. Raina, A. and Datta, A. (1992). Molecular cloning of a gene encoding a seed-specific protein with nutritionally balanced amino acid composition from *Amaranthus* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 11774-78
25. Calderon de la Barca, A., Ochoa, J. L. and Valencia, M.E. (1985) Effect of the extraction of a hemagglutinin on the nutritive value of *Amaranthus leucocarpus* seeds. J. Food Sci. 50:1700-08
26. Calderon de la Barca, A., Zenteno, E., Ochoa, J. L., Valencia, M. and Carvajal, R. (1985). The removal of *Amaranthus leucocarpus* lectin does not affect the nutritional value of the seed meal. In Lectins-Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry. Bög-Hansen. TC Breborowics J. Eds. Walter de Gruyter. 4:531-36
27. Rini, M. (1995). Lectin structure. Annu. Rev. Biomol. Struc. 24: 551-77
28. Sharma, V. and Surolia, A. (1997). Analysis of carbohydrate recognition by legume lectin: Size of the combining site loops and their primary specificity. J. Mol. Biol. 267:433-45
29. Rinderle, S. J., Goldstein, I. J. and Remsen E. E. (1990). Physicochemical properties of Amaranthin, the lectin from *Amaranthus caudatus* seeds. Biochemistry. 29: 10555-61
30. Debray, H., Decout, 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
31. Pérez Campos, E., Sierra, C., Lascrain, R., Espinoza, B., Bouquelet, S., Debray, H., and Zenteno E. (1997) The erythroagglutinin from *Phaseolus coccineus* Var. Alubia: chemical characterization, sugar specificity and effect on coagulation factors. J. Agric. Food Chem. 45: 3747-52
32. Capon, C., Piller, F., Wieruszkeski, J. M., Leroy, I. and Fournet, B. (1990) The glycomannosidic structure from jacalin, *Artocarpus integrifolia* lectin. Carbohydr. Res. 199:121-27
33. Fournet, B., Leroy, Y., Wieruszkeski, J. M., Montreuil, J., Poretz, R. D. and Goldberg, R. (1987). Primary structure of an N-glycosidic carbohydrate unit derived from *Sophora japonica* lectin. Eur. J. Biochem. 166: 321-24

34. Ortega, M., Sanchez, C., Chacon, E., Estrada, R., Masso, F., Montaña, L. F., Rendon, J. and Zenteno, E. (1990). Purification and characterization of a lectin from *Erythrina americana* by affinity chromatography. *Plant Science* 72:133-40
35. Debray, H., Wieruszeski, J. M., Strecker, G. and Franz, H. (1992). Structural analysis of the carbohydrate chains isolated from mistletoe (*Viscum album*) lectin I. *Carbohydr. Res.* 236:135-43

Table 1. Amino acid sequence of the lectin from *Amaranthus leucocarpus* (syn. *hypocondriacus*) determined from tryptic peptides by MALDI-TOF

m/z	Isoform	Residue No*	Sequence
1861.2	II, III	2-18	(-)AGLPVIMCLKSNNNQKY
2119.1	I, III	21-38	YQSDNIQQYGLLQFSADK
1586.3	I, II, III	39-52	ILDPLAQFEVEPSK
550.9	III	68-71	YLVR
2259.4	I, II, III	72-90	WSPNHYWITASANEPDENKS
3848.8**		112-147	LLHVQLGHYTENYTVGGG FVSYLFAESSQIDTGSK
1159.7	II, III	148-156	DVFHVIDWK
866.8	I, II, III	157-163	SIFQFPK
758.7	I	164-169	TYVTFK
2810.7	III	175-198	YLGVITINQLPCLQ FGYDNLNDPK
1822.5	III	199-214	VAHQMFVTSNGTICIK
508.5	III	221-223	FWR
1715.3	I, II, III	224-238	LSTDNWILVDGNDPR
1121.9	I, II, III	239-248	ETNEAAALFR
1861.2	III	249-264	SDVHDFNVISLLNMQK
694.8	I	265-269	TWFIK

\* Amino acid residues are numerated according to the determined sequence of the high nutritional value protein from *A. hypocondriacus* [24]. \*\*This peptide was obtained after deglycosylation and trypsin digestion of the purified lectin.



Table 2. Carbohydrate composition of *Amaranthus leucocarpus* lectin glycopeptides purified by affinity chromatography on ConA-Sepharose 4B column.

Sugar residue	Molar ratio*		
	ALL	ALL gp ConA	ALLgp**
Xylose	0.7	0.0	0.3
Mannose	3.0	3.0	3.0
Galactose	4.0	0.0	2.7
GlcNAc	3.5	2.1	3.7

\*Molar ratio is related to 3 Man residues, \*\*ALLgp corresponds to the fraction unretained on the Con A-Sepharose column, but retarded in the *Phaseolus coccineus* erythroagglutinin-Sepharose column.

Table 3. Homology of the amino acid sequence of the lectin *Amaranthus leucocarpus* (ALL) and the high nutritional value protein from *Amaranthus hypocondriacus* (AH).

		10	20	30	40	50	
AH		MAGLPVIMCLKSNNNQKYLRYQSDNIQQYGLLQFSADKILDPLAQFEV					48
ALL		*-AGLPVIMCLKSNNNQKY--YQSDNIQQYGLLQFSADKILDPLAQFEV					46
		60	70	80	90		
AH		EPSKTYDGLVHIKSRYTNKYLVWRWSPNHYWITASANEPDENKSNWACT					96
ALL		EPSK-----YLVWRWSPNHYWITASANEPDENKS-----					73
		100	110	120	130	140	
AH		LFKPLYVEEGNMKKVRL <del>LLHVQLGHTENYTVGGSFVSYLFAESSQIDTGS</del>					146
ALL		----- <b>LLHVQLGHTENYTVGGSFVSYLFAESSQIDTGS</b> -----					106
		150	160	170	180	190	
AH		KDVFHVIDWKSIFQFPKTYVTFKGNNGKYLGVITINQLPCLQFGYD					192
ALL		<b>KDVFHVIDWKSIFQFPKTYVTFK-----YLGVITINQLPCLQFGYD</b>					147
		200	210	220	230		
AH		NLNDPKVAHQMFVTSNGTICIKSNYMNKFWRLSTDNWLVDGNDPR					238
ALL		<b>NLNDPKVAHQMFVTSNGTICIK-----FWRLSTDNWLVDGNDPR</b>					187
		240	250	260	270	280	
AH		ETNEAAALFRSDVHDFNVISLLNMQKTWFIKRF <del>TS</del> SGKPEFINCMN					283
ALL		<b>ETNEAAALFRSDVHDFNVISLLNMQKTWFIK-----</b>					219
		290	300				
AH		AATQIVDETAILEIIELGSSN					304
ALL		-----					236

AH corresponds to the determined sequence of the high nutritional value protein from *A. hypocondriacus* [24]. In bold letters, the amino sequence of ALL matched with *A. hypocondriacus*. In cursive letters, the amino acid sequence identified after deglycosylation and trypsin treatment. \*The NH<sub>2</sub>-terminal end of ALL is blocked. Putative N-glycosylation sites (underlined) were determined with the Prosite Pattern Search.

## Figure Footnotes

Figure 1. SDS-polyacrylamide electrophoresis of the purified *Amaranthus leucocarpus* lectin: A) *A. leucocarpus* crude extract (60  $\mu\text{g}$ ) after reductive treatment; B) Purified lectin (5  $\mu\text{g}$ ) after treatment with  $\beta$ -mercaptoethanol; C) Purified lectin (5  $\mu\text{g}$ ) without reductive treatment. D) *A. leucocarpus* crude extract without reductive treatment. Molecular weight markers:  $\beta$ -galactosidase *Escherichia coli* (116 kDa); phosphorylase B (97 kDa); fructose-6-phosphate kinase (84 kDa) bovine serum albumin (66 kDa); glutamic dehydrogenase (55 kDa); ovalbumin (45 kDa); glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (36 kDa), carbonic anhydrase (29 kDa).

Figure 2. Two-dimensional electrophoresis of the purified *Amaranthus leucocarpus* lectin. Isoelectric focusing (in the first dimension) of 100  $\mu\text{g}$  purified ALL was performed in cylindrical polyacrylamide (at 5% concentration) gels containing 2% (v/v) of pH 3.5 to 10 ampholines and 1% Triton X-100. Gels were run at 600 V for 14 h at 4 $^{\circ}$  C. The gel was deposited for a second dimension on an SDS-PAGE slab gel. The pH gradient was established after isoelectric focusing in blank gels by slicing the gels into 0.4 cm sections, eluting ampholines with distilled water, for 12 h, and measuring the pH of the solution. The gradient was linear over the pH 4 to 8.5 range, and indicated spots correspond to pH 4.8, 4.9 and 5.2 for ALL-I to III, respectively.

Figure 3. Circular dichroism spectrum of *A. leucocarpus* lectin. CD spectrum of the lectin was recorded on an AVIV spectropolarimeter. The protein concentration was 300  $\mu\text{g}$  of ALL/ml in 30 mM PBS, pH 7.0; the scanning range was 180 to 240 nm in 5 mm path length cells. Analysis of this spectrum with PROCES 3.0 program revealed that the secondary structure of ALL contains 45% of  $\beta$ -sheet and 5% of  $\alpha$ -helix.

Fig. 1

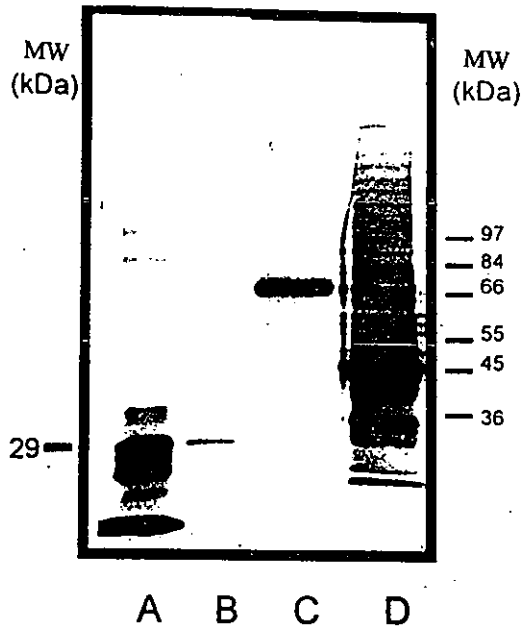
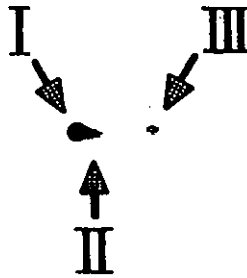


Fig. 2



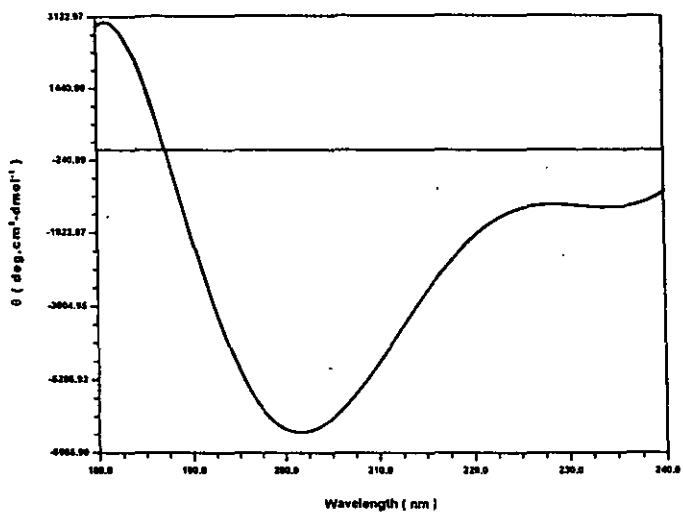


Fig. 3

### CAPÍTULO III

#### ESPECIFICIDAD DE LA LECTINA DE *Amaranthus leucocarpus* POR O-GLICOPÉPTIDOS.

Las lectinas interactúan específicamente con estructuras sacarídicas ya sea en solución o con glicoproteínas de membrana, donde reconocen secuencias de monosacáridos de manera reversible. La interacción de las lectinas con monosacáridos presentan constantes de disociación del orden de  $10^{-2}$  a  $10^{-4}$ M, a pesar de la baja afinidad, las lectinas poseen una alta especificidad, así tenemos que lectinas que reconocen galactosa no interactúan con su epímero, la glucosa. La mayoría de la lectinas presenta una especificidad hacia estructuras oligosacáridicas más complejas, con constantes de disociación del orden  $4 \times 10^{-6}$  M. Esta capacidad de interacción de las lectinas, se debe a que el sitio de reconocimiento a carbohidrato se caracteriza por ser una región de aproximadamente 200 aminoácidos, altamente homólogos (50-60%) en lectinas de la misma familia y en donde se establece la interacción carbohidrato-lectina<sup>23</sup>. La afinidad de las lectinas también aumenta debido a la multivalencia de cada lectina en la cual las subunidades de una lectina se asocian para formar dímeros o tetrámeros<sup>25</sup>.

Existen lectinas que interactúan específicamente con estructuras de tipo N-glicosídicas, como las lectinas *Lens culinaris* y *Canavalia ensiformis*. Por otra parte, existe un gran número de lectinas que poseen la capacidad de reconocer estructuras del tipo O-glicosídico, debido a la especificidad por la posición axial del OH en el carbono 4 de la galactosa o de la GalNAc, como es el caso de la lectina de *Arachis hypogaeae* y *Amaranthus leucocarpus*. Sin embargo, dada la gran diversidad de estructuras que hay en los O-glicanos<sup>27</sup>, existen lectinas que presentan especificidad hacia cierto tipo de estructuras O-glicosídicas. Así tenemos que para el antígeno T (Gal $\beta$ 1-3GalNAc $\alpha$ 1-OSer/Thr) se han identificado en: Amarantáceas, en la Móraceae, en algunas especies de leguminídeae y en las proteínas inhibidoras de ribosomas<sup>39</sup>, a pesar de poseer la misma especificidad, estas lectinas tienen actividades biológicas diferentes. En lectinas de la misma especie como las amarantáceas *A. caudatus* y *A. leucocarpus*, poseen aparentemente la misma especificidad hacia el antígeno T; sin embargo, a diferencia de otras lectinas de la misma especie *A. leucocarpus* induce inmunosupresión y reconoce una población de timocitos CD4+ vírgenes. Estas diferencias en la actividad sugiere que el arreglo

conformacional de los oligosacáridos y la cantidad de estos en la célula pueden influir en la interacción carbohidrato-lectina.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se determinó la constante de afinidad de la lectina ALL, así como su especificidad hacia diversas glicoproteínas, péptidos y neo-glicopéptidos O-glicosilados mediante ensayos in vitro, empleando electroforesis capilar y ELISA. Para los ensayos de O-glicosilación se emplearon preparaciones microsomales obtenidas de timocitos de ratón, ya que en éstas células se ha caracterizado el receptor, se utilizaron microsomas obtenidos de mucosa gástrica y de colon, ya que se caracterizan por su alto contenido de mucinas. Se utilizaron los siguientes péptidos que poseen sitios potenciales de O-glicosilación TTSAPTTs, GTTPSPVP y GTTPSPVPTTSTTSAP. El grado de glicosilación se evaluó por electroforesis capilar.

El péptido TTSAPTTs glicosilado con preparaciones microsomales de ratón, presentó dos residuos de GalNAc incorporados en las treoninas dos y cuatro, mientras que el mismo péptido glicosilado con las preparaciones de mucosa gástrica y de colon presentó un solo residuo de GalNAc incorporado en la treonina en posición dos. El péptido GTTPSPVP glicosilado con las preparaciones microsomales de mucosa gástrica y mucosa de colon, presentó dos residuos de GalNAc incorporados en las treoninas en las posiciones dos y tres. Por otra parte el péptido GTTPSPVPTTSTTSAP, glicosilado con microsomas mucosa gástrica presentó dos residuos de GalNAc en las treoninas en posiciones dos y tres, mientras que al utilizar las preparaciones de mucosa de colon se obtuvo la incorporación de seis residuos de GalNAc presentes en la treonina dos, tres, nueve, diez, doce y trece. La interacción de la lectina de *A. leucocarpus* se evaluó mediante el empleo de la electroforesis capilar midiendo el retardo en el tiempo de migración de la lectina fluorosceinada, de todos los glicopéptidos utilizados solo el péptido TTSAPTTs glicosilado con las preparaciones microsomales de timocitos de ratón fue capaz de desplazar el tiempo de migración de la lectina. Los glicopéptidos que presentaban un residuo de GalNAc no interactuaron con la lectina y, por tanto, no se observó cambios en el tiempo de migración, mientras que el glicopéptido GTTPSPVPTTSTTSAP, el cual presentó seis residuos de GalNAc no interactuó con la lectina de la semilla de amaranto.

Estudios previos han demostrado que la lectina de *Arachis hypogaea* es capaz de interactuar con glicopéptidos en donde las estructuras oligosacáridicas se encuentran en

posiciones adyacentes<sup>64</sup>, mientras que para la lectina de *Salvia sclarea*, específica para el antígeno Tn, la distancia entre dichas estructuras no interfiere con la interacción de la lectina<sup>7</sup>. Para la lectina de *A. leucocarpus*, la distancia entre las estructuras oligosacáridicas influye en la interacción de la lectina con su receptor, demostrado por el hecho de que la lectina solo interactúa con el glicopéptido TTSAPTTS glicosilado con microsomas de timo murino. Esta interacción fue puesta en evidencia con ensayos de electroforesis capilar, que demuestran que este péptido di-glicosilado es el único que modifica el tiempo normal de migración de la lectina en electroforesis capilar.

Mediante el empleo de la técnica de ELISA, también se evaluó la interacción de la lectina de *A. leucocarpus* con diversas glicoproteínas, péptidos, glicopéptidos y neoglicopéptidos. La interacción de la lectina con estructuras oligosacáridicas se evaluó usando mucina submaxilar ovina y bovina, fetuina, glicoforina A, glicopéptidos de estas proteínas, así como los neoglicopéptidos derivados de la glicosilación in vitro. Los péptidos de glicoforina M y N y el péptido TTSAPTTS, fueron utilizados como control. Cada una de las glicoproteínas probadas presenta una cantidad variable de estructuras oligosacáridicas, así por ejemplo la mucina submaxilar ovina y bovina contienen aproximadamente un 60% de carbohidratos en su estructura, de los cuales el más del 95% son O-glicanos. La fetuina contiene un 50% de glicosilación de los cuales el 6% corresponde a los residuos O-glicosilados. La IgA posee el 15% de su peso correspondiente a estructuras oligosacáridicas, de las cuales el 33% son O-glicanos. La lectina de *A. leucocarpus* interactuó preferentemente con la fetuina y, en menor proporción, con la mucina submaxilar bovina, la IgA y la mucina ovina. La glicoforina A<sup>M</sup> fue reconocida preferentemente a la glicoforina A<sup>N</sup>. Los péptidos no glicosilados de glicoforina no fueron reconocidos.

La constante de disociación de la lectina por GalNAc a 26°C se obtuvo por fluorescencia, a 26°C. Nuestros valores indican que la constante es de  $1.02 \times 10^{-2}$  M. Este valor es semejante al reporte en lectinas con la misma especificidad que ALL. De acuerdo con los datos obtenidos por ELISA de la especificidad de la lectina, el orden de esta constante de asociación para la fetuina y péptido TTSAPTTS debe de ser aproximadamente 100 veces mayor. Nuestros datos confirman que ALL interactúa específicamente con estructuras O-glicosídicas del tipo T y Tn, la distancia entre ellas es importante para la



interacción lectina-receptor, así como también la orientación y conformación de los monosacáridos constituyentes de dichos antígenos. Tal es el caso de los fenotipos M y N que aparentemente presenta el mismo número de antígeno T en su estructura, sin embargo, la lectina de ALL aglutina preferentemente a los eritrocitos humanos con el fenotipo M. En estos marcadores se ha sugerido que la orientación de los monosacáridos en fenotipo M es diferente a la observada en el fenotipo N. Estas evidencias pudieron ser comprobadas al identificar que la lectina de ALL no interactúa con estructuras O-glicosiladas adyacentes, como lo demostró la no interacción con el glicopéptido GTTPSPVPTTSTTSAP, en el que los residuos de GalNAc se encuentran en posiciones muy cercanas. Esto nos permite suponer que la lectina no interactúa con estructuras que contienen gran cantidad de residuos O-glicosilados. Tal es el caso de la leucosialina, molécula cuyo precursor es una glicoproteína de 65 kDa, que se caracteriza por presentar un alto contenido de O-glicanos en su estructura y cuyo peso molecular se incrementa hasta 120 kDa en función al estado de activación de la célula debido al aumento en la cantidad de O-glicanos presentes.

Estos resultados abren una nueva perspectiva en la interacción lectina-receptor, en la cual no solamente la secuencia de carbohidratos participa en dicho reconocimiento, si no también la distancia y conformación de dichos carbohidratos es relevante para la interacción de una lectina con su receptor específico.

**SPECIFICITY OF *Amaranthus leucocarpus* LECTIN FOR  
O-GLYCOSYLPEPTIDES**

Running title: Specificity of *Amaranthus leucocarpus* lectin

Key words: *Amaranthus leucocarpus*, plant lectins, T and Tn-specific lectin, O-glycans.

## ABSTRACT

*Amaranthus leucocarpus* lectin (ALL) is specific for N-acetyl-D-galactosamine (GalNAc) present in the inner core of O-glycosidically linked glycans from different glycoproteins and cells. In this work we used fluorescence spectroscopy to calculate the dissociation constant of ALL and GalNAc  $1.0 \times 10^{-2}$  M. We also determined the specificity of ALL for O-glycosylpeptides by capillary electrophoresis and ELISA assays. The O-glycosylpeptides were obtained after pronase digestion of fetuin, human Immunoglobulin A, ovine and bovine submaxillary mucin (OSM and BSM), as well as with neo-glycopeptides obtained by *in vitro* O-glycosylation with microsomes from murine thymocytes, gastric fundus and colon. ELISA assays were revealed with peroxidase labeled murine monoclonal IgG2 with  $\kappa$  light chain (designated as 5D4) antibodies, raised against the purified lectin. Our results indicate that pronasic O-glycopeptides containing GalNAc-Ser/Thr (from OSM) and Gal $\beta$ 1,3GalNAc-Ser/Thr (from BSM, IgA, glycophorin A<sup>N</sup>) showed the same capacity to interact with ALL, whereas glycophorin A<sup>M</sup>-as well as and fetuin showed increased capacity to interact with the lectin. From the *in vitro* glycosylated peptides, only the TTSAPTTS containing GalNAc residues on T2 and T6 was identified by ALL. Neither TTSAPTTS containing one transferred GalNAc nor other glycopeptides, with more than two GalNAc residues interacted with the lectin. These results confirm that ALL recognizes spaces between GalNAc residues in glycan structures whereas adjacent GalNAc interfered with the lectin interaction.

## INTRODUCTION

Lectins are important tools for oligosaccharide characterization as well as for isolation of cellular populations (1,2). In particular, lectins with specificity for O-glycosidically linked glycans (containing Gal $\beta$ 1-3 GalNAc $\alpha$ 1-0Ser/Thr, and GalNAc $\alpha$ 1-0Ser/Thr) have been widely used in fractionation of glycoproteins and cellular sub-populations (3, 4). Lectins from the *Amaranthaceae* family have been identified in *A. caudatus* (5), *A. cruentus* (6), and *A. leucocarpus* (7). All these lectins interact specifically with GalNAc (N-acetyl-D-galactosamine) (5-7) and have been proved to be useful tools to recognize O-glycosidically linked glycans in different tissues, tumors, and cells (8-10). *Amaranthus leucocarpus* is a Mexican representative of the *Amaranthaceae* family. It possesses a lectin that induces immunosuppression in animals (11), recognizes non-stimulated or naive cellular populations, such as murine peritoneal macrophages and CD4<sup>+</sup> mouse and human lymphocytes (12). The lectin from *Amaranthus leucocarpus* (ALL) agglutinates human erythrocytes with the M phenotype (8), and it has been recently demonstrated to interact with O-glycosidically linked proteins in some neurodegenerative processes (13). In a recent work, it has been suggested that ALL may recognize a particular conformation of some O-glycan determinants adjacent on the peptidic backbone of specific cellular receptor, conferring the lectin its particular biological properties (14). The amino acid sequence and isoforms of this lectin was recently determined (15). In this work, we determined the specificity of *Amaranthus leucocarpus* lectin towards different O-glycosidically structures using microsomal preparations and capillary electrophoresis.

## MATERIALS AND METHODS

### Lectin extraction

*Amaranthus leucocarpus* seeds were obtained in Tulyehualco (Mexico). The lectin was purified by affinity chromatography on stroma from human O erythrocytes as described previously (7).

### Fluorescence spectroscopy

Fluorescence analysis was carried out using 100 $\mu$ g of *Amaranthus leucocarpus* lectin in 1ml of phosphate buffered saline (PBS: 0.01 M sodium phosphate, 0.15 M sodium chloride, pH 7.2), was placed in a 1 cm path-length-cell and the titration curve with

GalNAc was obtained at 26°C. The fluorescence emission was recorded, with a Perkin Elmer spectrofluorimeter LS-5B with 285 nm for the excitation wavelength, as the emission 385 nm wavelength. The excitation and emission slits were set at 5 mm and 2.5 mm respectively.

### **Microsomal preparation**

Surgically removed thymuses from 28 old male BALB/c mice were minced in DMEM with a 20-gauge needle in a Petri dish, passed through a nylon mesh and the harvested cells were washed thrice in DMEM. The pellet was suspended in 2 ml of PBS,; cells were counted with a hemocytometer, their viability was assessed by the trypan blue exclusion test, and adjusted to  $1 \times 10^6$  cells/ml in PBS. Afterwards the thymocyte microsomal suspensions were prepared by sonication on ice of the cell pellet, followed by procedure further described. Protein concentration was determined according to the method of Lowry (16), the cellular pellet was stored at  $-70^\circ\text{C}$  in a 0.2M NaCl/0.25M sucrose solution until used for GalNAc transferase assays.

Samples from human stomach and colon were healthy tissues from cancer patients, who had undergone resection. Microsomes from these tissues were prepared by Potter-Elvehjem homogenization of tissue in ice- cold 0.25 M, sucrose and 0.2 M NaCl and centrifuged at  $10000 \times g$  for 10 min followed by ultracentrifugation at  $140000 \times g$  for 20 min to collect the microsomal pellet. The pellet was suspended in NaCl-sucrose solution and protein concentration was determined on a Hotachi 717 spectrophotometer (Boehringer) using the Biotrol kit protein assay reagent (Biotrol, Chennevieres les Louvres, France).

### **GalNAc transferase assays**

Different synthetic peptides were used as exogenous substrates: the octapeptide  $\text{NH}_2\text{-TTSAPTTS-COOH}$  (AP) deduced from a tandem repeat sequence of MUC 5AC of human stomach mucin,  $\text{NH}_2\text{-GTPSPVP-COOH}$  (GP) tandem repeat sequence of fundic human gastric,  $\text{NH}_2\text{-GTPSPVPTTSTTSAP-COOH}$  (GP2) tandem repeat sequence of human colon (17, 18 ,19). Assays were performed in microsomal suspensions with a total volume of 40  $\mu\text{l}$  containing the following components at final concentrations: peptide acceptor 5mM (10  $\mu\text{l}$ ), 125 mM MES buffer (pH7.0) (10  $\mu\text{l}$ ) containing 0.2% (v/v) triton X-100, 12.5 mM  $\text{MnCl}_2$ . 1mM PMSF, 1mM AEBSF, 1mM E64; 1mM AMP (5 $\mu\text{l}$ ), UDP-

[<sup>3</sup>H]-GalNAc (0.3 X 10<sup>6</sup> dpm) in 1mM cold UDP-GalNAc (5µl), and 12µg of microsomal preparation (10 µl). After addition of the enzyme preparation, the samples were incubated for 3 h at 37°C. The reaction was stopped by the addition of 8 volumes (320 µl) of 20 mM sodium borate-1mM ethylenediamine tetraacetic acid (pH 9.1). The products of the *in vitro* O-glycosylation reaction were separated from the excess UDP-GalNAc using an AG1-X8 anion exchange resin column by elution with water (3 X 1 ml) and [<sup>3</sup>H]GalNAc incorporation was counted in a Beckman, LS 6000 TA liquid scintillation spectrometer. Before capillary electrophoresis, the aqueous eluates from the exchanger AG1-X8 were desalted on Sep-Pak C18 reversed-phase cartridges activated with 10 ml methanol followed by 10 ml deionized water containing the counterion trifluoroacetic acid (TFA, 0.1%); polar materials were washed with 10 ml water/TFA, whereas the glycopeptide fractions were obtained by elution with 10 ml of acetonitrile 25% in water/0.1%TFA.

### Capillary Electrophoresis

Capillary electrophoresis was performed on a P/ACE Model 5000 system (Beckman, Fullerton, Ca.) controlled by the System Gold software V 810 (Beckman). UV absorbance was monitored at 200 nm. The fused silica capillary was 57 cm X 75 µm i.d. and fitted in a cartridge with a modified mandrel to improve cooling. Migrations were run at 23°C using a 2 N formic acid buffer and the voltage across the capillary was maintained at 20 kV. Injections were performed out by pressure (duration 6 s, approximately 10-20 pmol) and after each separation the capillary was flushed with acetonitrile 25% in PBS pH 7.2 for 2 min (20). Interaction of the *A. leucocarpus* lectin with different glycosylpeptides was performed using 4 µg of ALL-FTC with 16 µg of peptides in PBS pH 7.2, and incubating 1 h at room temperature, 5 ng of sample was injected to a P/ACE Model 5000 system. Migrations were run at 23°C using PBS, pH 7.2, during 30 min and the voltage across the capillary was maintained at 20 kV. Absorbance was monitored at 560 nm.

### Preparation of glycopeptides

Glycosylpeptides from human IgA, ovine and bovine submaxillary mucin, porcine stomach mucin and fetuin were obtained after treatment by *Streptomyces griseus* pronase treatment (1mg of enzyme per 10 mg of glycoprotein incubated for 48 h at 37°C). Each O-glycosylpeptide was desalted by filtration on a column (2x60 cm) containing Bio-Gel P2, equilibrated with 0.5 M acetic acid in distilled water, lyophilized, and kept at 4°C until use.

The O- and N-glycosylpeptides from fetuin were fractionated by gel filtration on a column (1.6 x 100 cm) containing Bio-Gel P4 equilibrated with 0.05 M pyridine acetate, pH 4.5 []. Each O-glycosylpeptide was desalted by filtration on a column containing Bio-Gel P2. O-glycosylpeptides 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 [21], and desalted on a Biogel P-2 column (1 x 60 cm) equilibrated with 0.5 M acetic acid. The carbohydrate composition of each glycosylpeptide was determined by gas-liquid chromatography.

### **Hybridoma fusions and screening**

Balb/c female mice (20-30 g) were immunized intraperitoneally, four times with 50 µg of ALL in complete Freund's adjuvant. Spleen cells were harvested and fused to the myeloma cell line P3-X63Ag8 according to the method described by Kohler and Milstein (1975) and modified by Geffer et al. (1977), using polyethylene glycol to promote hybridization of mouse myeloma cells. To determine production and secretion of ALL reactive monoclonal antibodies (mAbs), supernatants of HAT selection growth-positive clones were analyzed by ELISA using ALL and supernatant of P3-X63Ag8 cell culture as negative control. Positive hybridomas were expanded and subcloned by limiting dilution to ensure stability of mAb production. The antibodies were purified by fractionation with 27% solid ammonium sulfate and ionic exchange chromatography on DEAE-Sephadex (Pharmacia) and finally labeled with horseradish peroxidase, according to the method of Avrameas and Ternynck (1971).

### **Specificity of *Amaranthus leucocarpus* lectin determined by ELISA**

The specificity of *A. leucocarpus* was determined by comparing the capacity of the lectin to interact with glycoproteins, glycopeptides, asialo-glycopeptides, as well as with Neo-glycosylpeptides. Samples (200 µg) in carbonate buffer (100 mM pH 9), were incubated in sterile flat bottom microwell plates (Nunc Delta, Roskilde, Denmark) for 12h at 4°C. The plates were then washed with PBS and the wells covered with 300 µl of 5% skimmed milk in PBS and incubated for 12 h at 4°C. After removing of milk, the wells were incubated with 100 µg ALL at 37°C for 3 h and then incubated overnight at 4°C. The excess lectin was washed with PBS and the wells were incubated with 100 µl of monoclonal (5D<sub>4</sub>) antibody against the lectin diluted 1: 400 at 37°C for 1 h and then incubated overnight at 4°C. Excess monoclonal antibody was eliminated by washing five

times with PBS and the wells were incubated with 100µl of anti murine IgG peroxidase labeled for 1 h at 37°C. Unbound conjugate was removed by washing 6 times with PBS containing 0.1% Tween 20 followed by two washes with PBS alone. The presence of ALL was revealed by incubating the wells with 100 µl  $\sigma$ -phenylenediamine hydrochloride and 100 µl hydrogen peroxide in 0.1 M citric acid at room temperature for 30 min. The reaction was stopped by adding 100 µl of 6 M acid chloride to each well and the absorbance was read at 490 nm on a DYNATECH MR 5000 microplate reader.

#### **Analytical methods.**

Protein concentration was determined by the method of Lowry modified by Peterson (1977), using bovine serum albumin as standard. Carbohydrate content and composition of the lectin, its isoforms, and of all glycoproteins used in this study was determined with heptafluorobutyrate derivatives of O-methyl-glycosides, obtained after hydrolysis with 0.5 N methanol-HCl for 24 h at 100°C, by gas-chromatography with a capillary column (25 x 0.32 mm) of 5% Silicone OV 210, (Applied Science Lab., Buffalo, NY), in a Varian 2100 gas chromatograph (Orsay, France); the carrier gas was helium at a pressure of 0.6 bar, and the oven temperature programmed from 100 to 240°C at 2°C per min [17]. L-lysine (Sigma Chem., St. Louis, MO) was used as internal standard. Identification of each sugar residue was confirmed by mass spectrometry using the Finnigan Automass II mass spectrometer, the HFB derivatives of the O-methyl glycosides of monosaccharides present relatively high mass: 978 for hexoses, 977 for hexosamines and 1275 for sialic acid [17].



## RESULTS

### Fluorescence spectroscopy.

The dissociation constant of *Amaranthus leucocarpus* lectin and GalNAc was determined by quenching of fluorescence was considered as  $1.0 \times 10^{-2}$  M. Other monosaccharides used as control, such as GlcNAc, Gal, Glc and Man, did not interact with the lectin.

### GalNAc transferase assays

The GalNAc-transferase activities from crude microsomal homogenates from thymocytes and from human gastric fundus and human colon were comparatively analyzed. The microsomal homogenates were assayed toward different synthetic peptides. After elimination of the excess of UDP-GalNAc, the GalNAc transferase activities were measured by the transfer of radiolabeled [ $^3$ H]GalNAc to the peptide substrates. Incorporation rates to the tested peptides ranged 4,000 to 40,000 nmol GalNAc/h/mg protein (Table 1).

### Capillary Electrophoresis.

To visualize the differences in O-glycosylation, performed to all peptides with the different microsomal preparations, the samples were analyzed using electrophoretic techniques. Capillary Electrophoresis ( 25Karger, B.L. and Foret, F., 1993) allowed us to identify O-glycosylated products, according to their relative electrophoretic mobility. Electrophoresis gave very reproducible profiles, allowing us to compare the electrophoretic profiles of peptides with or without incorporated GalNAc. Incubation without GalNAc always revealed a specific fraction, identified at 19.6 min, whereas addition of UDP-GalNAc, renders fractions identified at 21.4 and 22.2 min which corresponded to peptides containing one or two incorporated GalNAc residues, respectively (Figure 1). Table 2 summarize the number of fractions and residues of GalNAc incorporated to the different tested peptides.

Only peptide AP glycosylated with microsomal preparation from thymocytes was able to interact with ALL, as identified by the delay in the migration time, whereas the same peptide glycosylated with gastric fundus and human colon did not interact with the lectin (Figure 2). Peptides GP and GP2 glycosylated with different microsomal preparations and with GalNAc residues incorporated at different positions, did not interact with the lectin (Table 3).

## Monoclonal antibodies

Hybridomas were produced by fusion of mouse myeloma cells and spleen cells from mice immunized with the lectin from *A. leucocarpus*. Hybridoma culture supernatants were screened for production of antibodies against ALL by indirect ELISA. Hybridoma cells were subcloned, one of them was chosen for further characterization and designated as DG4; its isotypic characterization indicates that it belongs to IgG2 with  $\kappa$  light chains. Specificity of monoclonal antibodies was verified in the lectin purification procedure; following affinity chromatography of a hemolymph sample, collected fractions were assayed for lectin presence, only the protein fraction eluted from the affinity chromatography matrix was positively identified by 5D4 antibody in the ELISA assays.

## ELISA

The ELISA method to evaluate the interaction of ALL with different O-glycopeptides implies utilization of monoclonal antibodies against the purified ALL. The ELISA method implies utilization of monoclonal antibodies against the purified ALL. Standardization of ELISA assays was achieved by using the purified lectin. The sensitivity of the assay allowed us to detect concentrations as low as 3 ng/ ml (1 fmol). Our results indicate that O-glycopeptides containing GalNAc-Ser/Thr (from OSM) and Gal $\beta$ 1,3GalNAc-Ser/Thr (from BSM, IgA, glycophorin A<sup>N</sup>) showed the same capacity to interact with ALL; whereas glycophorin A<sup>M</sup>-as well as and fetuin showed two fold powerful capacity than other O-glycosylpeptides to interact with the lectin. In the presence of Neo-glycosylpeptides, our results confirmed that only the peptide AP, which is glycosylated on T2 and T6 positions, was recognized by ALL. Neo-glycopetptides containing one or more GalNAc residues were not recognized by the lectin. The peptide AP, recognized by ALL, was glycosylated by the microosomal preparation of mouse thymocytes (Table 4).

## DISCUSSION

Plant lectins represent a group of well-preserved proteins through evolution; this property is observed even at their sugar-binding specificity (21). Lectins from the *Amaranteaceae* family have been demonstrated in *A. caudatus* (5), *A. cruentus* (6), and *A. leucocarpus* (7). These lectins have been considered important tools to characterize O-glycans (21) and their capacity to recognize specifically sugar structures in tissues and tumors has been demonstrated (22). ALL agglutinates preferentially human erythrocytes with glycophorin A<sup>M</sup> rather than those with glycophorin A<sup>N</sup>, both phenotypes revealed similar rates of O-glycosylation and showed differences at their NH<sub>2</sub>-terminal. These results, and the fact that ALL recognizes T (Galβ1,3GalNAcα1,0Ser/Thr) and Tn (GalNAcα1,0Ser/Thr) structures, suggest that ALL recognizes its specific sugar receptor in a particular conformation or, probably, distances between O-glycans moieties (15). In this work we identified the fine specificity of *Amaranthus leucocarpus* lectin for glycopeptides, peptides and neo-glycopeptides. Neo-glycopeptides were prepared with microsomes from mouse thymocytes (12), gastric fundus and human colon (17, 18). The interaction of ALL with glycoproteins was different probably because they have different patterns of carbohydrate distribution and conformation as suggested in a previous work (15). Bovine submaxillar mucin is very rich in T and Tn-antigens, glycophorin A<sup>M</sup>-as well as A<sup>N</sup> and ovine mucin possesses the Tn antigen in a high proportion; however, the O-glycosidically linked glycans represents 30% of the glycan structure in fetuin and is confined to the carboxyl part of the molecule, but was the glycoprotein best recognized by ALL. Glycophorin A<sup>M</sup> was better recognized than glycophorin A<sup>N</sup>, differences in the interaction should be due to the interaction of ALL with GalNAc; moreover, glycan 3-D presentation or the possible participation of OH<sub>1</sub> from serine residues in the amino-terminal of the A<sup>M</sup>-glycophorin could be not ruled out. These results were confirmed using neo-glycopeptides and capillary electrophoresis, the peptide AP with two GalNAc residues, separated in the peptide sequence, was able to modify the migration time of ALL. It is interesting to point out that the GP2 glycopeptide with six GalNAc residues incorporated, in cluster conformation, did not interact with ALL. In contrast to other lectins with similar sugar specificity, such as *Salvia sclarea* or *Vicia villosa* lectins, adjacent GalNAc residues are not recognized by ALL (23). The ability of lectins to bind carbohydrates depends on their 3-D

structure (25) and their capacity to detect subtle variations in the conformation of carbohydrate structures from cell surface (26).

In previous works it was determined that *A. caudatus* (ACA) showed great homology with ALL (27); but, in spite of this homology, ALL showed slight differences in the recognition of oligosaccharidic sequences. Similarly to ACA, *A. leucocarpus* lectin can bind T and Tn antigens, and substitutions in these antigens of their Gal-C3 and GalNAc-C6 by neuraminic acid are well tolerated by both lectins. The present results confirm that ALL recognizes T and Tn structures arranged orderly its receptor, but a high density of GalNAc, forming glycosylated clusters on the receptor, interfered with the lectin's active site.

O-glycosidically linked glycans attached to membrane and cell surfaces play important biological roles (28), and these structures are responsible for the 3-D organization of glycoproteins. Based on the aforementioned, our results reinforce the notion that lectins from the *Amaranthus* genus, and particularly *A. leucocarpus* represent a tool for the study of mucin structures and their biological role.

#### ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported in part by CONACyT (27609 M), PAED 202317, DGAPA-UNAM (PAPIIT-IN224598) and Program ECOS Mexico-France (M97B05).

## REFERENCES

- 1.- I. J. Goldstein, R. C. Hughes, M. Monsigny, T. Osawa, N. Sharon (1980). *Nature* 285-286.
- 2.- H. Lis, N. Sharon (1986). *Ann. Rev. Biochem.* 55: 35-67.
- 3.- R. Nesser, B. Koellreutter, P. Wuersch P. (1986). *Infec. Inmun.* 58: 428-436
- 4.- N. Sharon, H. Lis (1986). In: *The Lectins Properties, Function and Application in Biology and Medicine.* Academic Press. Pp. 266-270.
- 5.-S. J. Rinderle, I. J. Goldstein, E. E. Remsen (1990). *Biochemistry* 29: 10555-10561
- 6.-A. Calderón de la Barca, L. Vázquez-Moreno (1988). *J. Food. Biochem.* 12: 117-126.
- 7.- E Zenteno, JL Ochoa (1988) *Phytochemistry* 27: 313-317.
- 8.-E. Zenteno, R. Lascurain, L. F. Montaña, L. Vazquez, H. Debray, J. Montreuil (1992) *Glycoconjugate J.9:* 204-208
- 9.-Peumans W J and Van Damme E (1995). *Plant Physiol.* 109: 347-352.
- 10.- Gallager J T. (1984). *Biosci. Rep.* 4: 621-632.
- 11.- E. Zenteno, J. L. Ochoa, C. Parra, L. F. Montaña, I. Rayon, G. Maldonado, B. Ruiz, R. Carvajal. (1985). In *Lectins-Biol., Biochem., Clinical Biochem.* Vol IV. (T. C. Bog-Hansen, J. Breborowicz, eds) Walter de Gruyter, Berlin. Pp 537-546.
- 12.-R. Lascurain, R. Chávez, P. Gorocica, A. Pérez, L.F. Montaña, E. Zenteno (1994) *Immunology* 83: 410-413
- 13.- G. Guevara, B. Espinosa, E. Zenteno, L. Vazquez, J. Luna, G. Perry, R. Mena R. (1998). *J. Neuropath. Exp. Neurol.* 57:905-914.
- 14.-Hernández, P., Bacilio, M., Porras, F., Juarez, S., Debray, H., Zenteno, E. and Ortiz, B. (1999). *Prep. Biochem. Biotechnol.* 29:219-234.
- 15.-Hernández P, Debray H, Jaekel H, Garfias Y, Jimenez M C, Martínez-Cairo S and Zenteno E. *Eur. J. Biochem. Enviado.*
- 16.-Peterson G. L(1977). *Anal. Biochem.* 83:346-356
- 17.-Audie JP, Janin A, Porchet N, Copin MC, Gosselin B, Aubert JP. (1993) *J Histochem Cytochem.* 41(10):1479-85.
- 18.-Guyonnet Duperat V, Audie JP, Debailleul V, Laine A, Buisine MP, Galiegue-Zouitina S, Pigny P, Degand P, Aubert JP, Porchet N. (1995). *Biochem J.* 305 :211-9.

- 19.-Krotkiewski H(1988). Glycoconjugate J. 3: 35-48.
- 20.- Soudan B, Hennebicq S, Tetaert D, Boersma A, Richet C, Demeyer D, Briand G, Degand P (1999). J Chromatogr B Biomed Sci Appl. 729:65-74.
- 21.- Spiro R. G., Bhoyroo V. D.(1974). J. Biol. Chem. 249: 704-711
- 22.- Sharon N., Halina L ( 1990 ). The FASEB journal. 4: 3198-3208
- 23.-Medeiros A, Bianchi S, Calvete JJ, Balter H, Bay S, Robles A, Cantacuzene D, Nimtz M, Alzari PM, Osinaga E. (2000) Eur J Biochem.267:1434-40.
- 24.- Hennebicq S, Tetaert D, Soudan B, Boersma A, Briand G, Richet C, Gagnon J, Degand P.(1998) Glycoconj J. 15:275-82.
- 25.-Weiss I. Wilian and Drickramer Kurt. (1996) Annu. Rev. Biochem. 65: 441-473
- 26.-Medeiros A, Bianchi S, Calvete JJ, Balter H, Bay S, Robles A, Cantacuzene D, Nimtz M, Alzari PM and Osinaga E (2000). Eur J Biochem. 267:1434-40.
- 27.-Transue, T. R., Smith, A. K., Mo, H., Goldstein, I. J. and Saper, M. A (1997). Nat. Struct. Biol. 4:779-783.
- 28.-Yamashita Y, Chunng Y. S, Horie R, Kanagi R and Sowa M (1995). J. Natl. Cancer Inst.87: 441-446.

**Table 1. Incorporation rate of GalNAc in peptides *in vitro*.**

PETIDE	GalNAc transferase		
	THYMOCYTES*	FUNDIC GASTRIC*	COLON*
TTSAPTTS	84,000±100	17,800±5,000	19,900±6,400
GTPSPVP	ND	4070±500	4,070±30
GTPSPVPTTSTTSAP	ND	51300±460	5,300±2,660

\*nM of GalNAc/h/mg after 3hrs of incubation at 37°C. ND: Not determined

**Table 2. Capillary electrophoresis and proposed positions of GalNAc residues on Neoglycosylpeptides**

GalNAc-transferase	Peptide	Peaks	No. transferred GalNAc
Murine Thymocytes	TT*SAPT*TS	2	2
Human Gastric Fundus	TT*SAPTTS	1	1
	GT*T*PSPVPTTSTTSAP	2	2
Human Colon	TT*SAPTTS	1	1
	GT*T*PSPVP	2	2
	GT*T*PSPVPT*T*ST*T*SAP	6	6

\*Sites of incorporation of GalNAc

Table 3. Time (in min) of migration\* of *Amaranthus leucocarpus* lectin in the presence of different Neo-glycosylpeptides.

GalNAc transferase			
PETIDE	THYMOCYTES	FUNDIC GASTRIC	COLON
TTSAPTTs**	15	13	13
TTSAPTTs	13	13	13
GTPSPVP	13	13	13
GTPSPVPTTSTTSAP	13	13	13

\*Determined by capillary electrophoresis in a 30 minutes run program. Positive interaction of the lectin was determined by inhibition of the migration time. \*\* The peptide was glycosylated by thymocyte microsomes.



**Table 4. Interaction of O-glycosylpeptides and Neo-O-glycosylpeptides with *Amaranthus leucocarpus* lectin determined by ELISA.**

GLYCOPEPTIDE	SEQUENCE	O D (490 nm)
Ovine Mucin	ST*T*GST*S <sup>1</sup>	0.5
Bovine Mucin	S*EST*T*QLP <sup>1</sup>	0.7
Fetuin	AGPT*SAAG <sup>1</sup>	0.9
	VAS*VVV <sup>1</sup>	
	GPT*PSA <sup>1</sup>	
	APS*AVP <sup>1</sup>	
IgA	TPST*PST*P <sup>1</sup>	0.4
AN glycophorin	LS*TT*EVAM	0.1
AM glycophorin	SS*TT*GVAM	0.8
Neoglycopeptides <sup>2</sup>		
	TT*SAPT*TS <sup>3</sup>	0.5
	TT*SAPPTS	0.1
	GT*T*PSPVP	0.1
	GT*T*PSPVPT*T*ST*T*SAP	0.1

\*Indicates the glycosylation sites<sup>1</sup> Data from Hernandez et al. (14), <sup>2</sup>Determined by capillary electrophoresis. <sup>3</sup>The peptide was glycosylated by thymocyte microsomes. Glycopeptide concentration was adjusted to 100 nM and incubated with 10 µg lectin, and revealed with HPR labeled Mabs anti ALL.

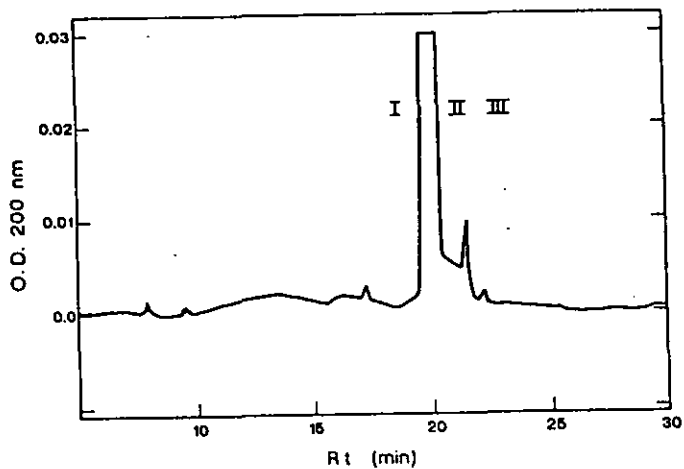


Figure 1. Electropherogram of the TTSAPTTS peptide O-glycosylated by murine thymocyte microsomes. Capillary electrophoresis was performed on a P/ACE Model 5000 system. UV absorbance was monitored at 200 nm. Migrations were run at 23°C using a 2 N formic acid buffer and the voltage across the capillary was maintained at 20 kV, in a 30 min program. Arrows indicate the position of mono and di-glycosylated peptides.

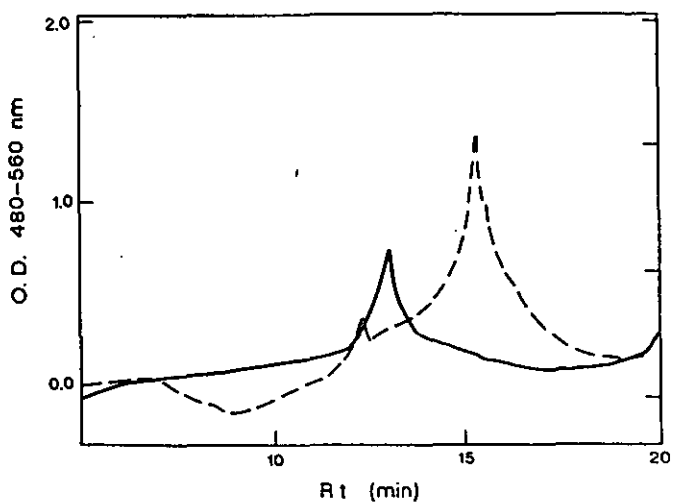


Figure 2. Electrophorogram of the interaction of *A. leuocarpus* lectin with the TTSAPTTS O-glycosylpeptide. The assay was performed using 4  $\mu\text{g}$  of ALL-FITC with 16  $\mu\text{g}$  peptides in PBS, pH 7.2 and incubated during 1 h at  $25 \pm 3^\circ\text{C}$ ; 5 ng of the sample was injected into a P/ACE Model 5000 system. Migration rates of the lectin-glycopeptide were compared with free lectin (dotted line). Assays were performed at  $23^\circ\text{C}$  using PBS pH 7.2 at 20 kV, in a 30 min program. Absorbance was monitored of 488 nm at 560 nm.

## CAPÍTULO IV

### AISLAMIENTO DEL RECEPTOR DE LA LECTINA DE *Amaranthus leucocarpus* EN TIMOCITOS DE RATON CD4+

La glicosilación de proteínas mediante enlaces del tipo O-glicosídico se realiza en el aparato de Golgi, en donde por acción de la GalNAc transferasa, se adiciona un residuo de GalNAc a un residuo de serina o treonina<sup>65</sup>. La O-glicosilación fue asociada con estadios de inmadurez cuando en 1976 Reisner identificó poblaciones de timocitos en la corteza del timo reconocidas por la lectina de *Arachis hypogaeae* (PNA), específica para residuos de galactosa, presentes en los O-glicanos<sup>69</sup>. A partir de entonces, la identificación de estructuras reconocidas por esta lectina se relacionó con procesos de inmadurez y posteriormente se amplió a procesos de transformación cancerosa. Sin embargo recientemente se ha despertado el interés de la posible función de las estructuras O-glicosiladas en la superficie de diversos grupos celulares<sup>3</sup>. En particular se ha observado que durante la maduración de los linfocitos T, se expresa una cantidad variable de O-glicanos, la cual puede ser influenciado por la expresión de transferasas de GalNAc, así como la presencia del sustrato específico<sup>66</sup>.

El desarrollo y maduración de los linfocitos T, se lleva a cabo en el timo. En este órgano se encuentran tres poblaciones principales de células, que representan etapas diferentes en la maduración de las células T. Estas poblaciones son reconocidas por la expresión de sus co-receptores CD4, CD8, CD4-CD8- y CD4+CD8+. Previamente se ha demostrado que la lectina de *Amaranthus leucocarpus* aglutina aproximadamente  $5.6 \pm 0.9$  % de células del timo, de las cuales el 75% presentan el fenotipo CD3, CD4+, CD8<sup>67</sup>-. Estos resultados indican que la lectina reconoce poblaciones en las última etapas de maduración, lo que sugiere que la presencia de estructuras O-glicosídicas, participan de manera importante no solo en los estadios celulares de inmadurez, sino en los procesos de desarrollo celular. Ya que hasta los momentos se cuenta con pocas herramientas para el estudio y caracterización de estructuras O-glicosídicas, en este trabajo se aisló y caracterizó al receptor de la lectina de *Amaranthus leucocarpus* (ALL) presente en los timocitos CD4+

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La sub-población de linfocitos reconocidos por la lectina ALL fue separada por aglutinación selectiva utilizando a la lectina ALL acoplada a biotina. La caracterización fenotípica de las células ALL+ se hizo mediante el método de doble marcaje, utilizando

anticuerpo anti-CD8 unido a fluoresceína diluido 1:150/10<sup>5</sup> células y anticuerpos anti-CD2, CD3, CD4 o CD43 unido a ficoerytrina (PE) como segundo color. CD45RB, que es un marcador de inmadurez, también fué determinado en las células ALL+ usando un solo marcaje con anti- CD45RB unido a fluoresceína. Después de la incubación las células fueron lavadas en PBS-BSA y resuspendidas en 500µl de PBS con 0.1% de p-formaldehído. Las células fluorescentes fueron determinadas por citometría de flujo en un citofluorómetro Becton & Dickinson. Los timocitos aglutinados por la lectina de ALL corresponden aproximadamente al 5% de la población total, la mayoría de estas células presentan un fenotipo maduro con CD2+CD3+CD4CD8-(83.4%), mientras que el 14.8 de las células presentan el fenotipo CD2+CD3+VD4+CD8+, 0.4% de las células presentan el fenotipo CD2+CD3+CD4-CD8+, aproximadamente el 90% de la población reconocida por la lectina de *Amaranthus leucocarpus* también presenta el fenotipo CD45RB, presente en células vírgenes. La maduración de los timocitos se caracteriza por la expresión del receptor de células T y los CD4 y CD8. El antígeno común de leucocitos, CD45, es un marcador potencial de células de memoria, de células en descanso o células vírgenes CD4, los timocitos expresan una isoforma de alto peso molecular de este antígeno, que es reconocida por anticuerpos monoclonales anti CD45RA y CD45RB. Los O-glicanos reconocidos por la lectina de *Archachis hypogaea* (PNA) también son marcadores de proliferación y diferenciación de los timocitos. Los receptores de PNA se encuentran predominantemente en células de la corteza tímica y corresponden a poblaciones de timocitos inmadurosCD4-, CD8- y CD4+, CD8- y también se encuentran expresados en linfocitos de memoria o activados. Estos resultados sugieren que las poblaciones reconocidas por la lectina de amaranto, corresponden a una clase de timocitos vírgenes y que serán exportados a los tejidos linfoides periféricos.

La purificación de receptor se realizó mediante cromatografía de afinidad indirecta. De aproximadamente 10<sup>8</sup> timocitos se recobraron 27.4 mg de proteína soluble después de la lisis. La fracción recuperada de este procedimiento corresponde a menos del 1% de la proteína presente en el lisado. El receptor de ALL es una glicoproteína, el peso molecular determinado por SDS-PAGE es de 70 kDa, con aproximadamente el 20% de carbohidratos. El análisis de la composición de aminoácidos indica que la proteína es rica en residuos de ácido aspártico, ácido glutámico, serina, prolina y glicina. La fracción de carbohidratos del receptor esta formada por GalNAc y Gal, monosacáridos característicos de estructuras de

tipo O-glicosídicas, además se detectó la presencia de pequeñas cantidades de GlcNAc, manosa y ácido siálico característicos de N-glicanos.

La purificación de las isoformas del receptor de ALL se realizó mediante el empleo de FPLC. El receptor purificado por afinidad fue aplicado a una columna mono P HR 5/5 equilibrada con amortiguador Bis-Tris a pH 7.5 con un flujo de 1ml/min, las isoformas del receptor fueron separadas mediante un gradiente discontinuo de 0 a 1M NaCl. A las fracciones colectadas se les midió pH, densidad óptica a 280 nm y concentración de proteína. Tres isoformas fueron aisladas mediante la cromatografía de intercambio iónico. La isoforma ALLTr1 corresponde al 50 % de la proteína aplicada a la columna, mientras que ALLTr2 y ALLTr3 representan el 25% y el 15% respectivamente. Las isoformas del receptor presentan pequeñas variaciones en la concentración de carbohidratos por peso y por diferencias en la concentración de ácido siálico, siendo ALLTr3 la isoforma con mayor cantidad de este monosacárido, lo cual sugiere que el estado de glicosilación es modificado de acuerdo al estado de activación de la célula. El receptor y sus isoformas poseen el amino terminal bloqueado. Existen lectinas que tienen capacidad para interactuar con otros antígenos de leucocitos; PNA reconoce una glicoproteína de 170-180 kDa y otras bandas de 110-120 kDa, la lectina de *Salvia sclarea* interactúa con una glicoproteína de 125 kDa, que corresponde a la leucosialina, también conocida como sialoforina o CD43. Otras estructuras tipo mucina han sido caracterizadas en los linfocitos, tales como CD45, que es una glicoproteína de 95 kDa; Ly5 o T200 de 210 kDa. Para descartar la posibilidad de que CD43 fuera el receptor potencial para la lectina de ALL, debido a que posee alto contenido de estructuras O-glicánicas, se realizaron ensayos de electrotransferencia del lisado celular a papel de nitrocelulosa, usando un aparato de transferencia semi-seco Bio-Rad, bajo las condiciones del fabricante, usando el anticuerpo S7, que reconoce la isoforma de 115 kDa y el anticuerpo 1B11 que reconoce la isoforma de 130 kDa. Con estos ensayos se confirmó que la glicoproteína que es reconocida por la lectina ALL no corresponde a ninguna de las isoformas de CD43, lo cual posteriormente fue confirmado mediante la secuenciación del receptor.

La secuencia de aminoácidos del receptor de ALL se obtuvo por MALDI-TOF, mediante la digestión triptica se obtuvieron 25 péptidos cuyos rangos de masas fueron de 442.9 a 3817.2 m/z, las masas más abundantes se encontraron en: 689.9, 14807.7, 1957.2,

2251.1 y 2809. El receptor de ALL presenta un 17% de homología con la proteína KIAA0659, un 10% de homología con el receptor del factor transformante del crecimiento tipo beta y un 7% de homología con el dominio de muerte de una proteína asociada a Fas (CD95), debido a la baja homología del receptor con secuencias depositadas en NCBI nr (Swiss-Prot) podemos concluir que la glicoproteína de 70kDa aislada de timocitos de ratón es un nuevo receptor, que deberá ser secuenciado por la degradación de Edman.

La lectina de *Amaranthus leucocarpus* reconoce macrófagos peritoneales murinos, donde interactúa con un receptor de 68 kDa<sup>68</sup>, cuya composición de aminoácidos es diferente a la que se presenta en el receptor de timocitos, esto indica la posible presencia de motivos proteicos, que presenten estructuras O-glicosídicas comunes tanto en las células provenientes de la línea linfóide y mieloide. Aunque el papel del receptor de ALL debe investigarse más a fondo, el receptor para ALL en timocitos puede ser considerado como un nuevo marcador para células vírgenes.

## Isolation of the receptor for *Amaranthus leucocarpus* lectin from murine naive thymocytes

Flor Porras<sup>1</sup>, Ricardo Lascrain<sup>3</sup>, Raúl Chávez<sup>3</sup>, Blanca Ortiz<sup>2</sup>, Pedro Hernández<sup>2</sup>, Henri Debray<sup>4</sup> and Edgar Zenteno<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Bioquímica, Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, Calzada de Tlalpan 4502, 01040 México, <sup>2</sup>Laboratorio de Inmunología, Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM, 04510, México, and <sup>3</sup>Laboratoire de Chimie Biologique de la Université des Sciences et Technologies de Lille, UMR du CNRS n° 8576, Villeneuve d'Ascq, 59655 France

Received June 28, 1999; revised on October 27, 1999; accepted on October 31, 1999

From murine medullary thymocytes we purified the receptor for the *Amaranthus leucocarpus* lectin (ALL) using a complex with the biotin-labeled lectin and avidin-agarose as the affinity matrix. Most ALL<sup>+</sup> thymocytes (83%) are naive cells with the CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>CD45RB<sup>+</sup> phenotype. The receptor for this lectin is a 70 kDa glycoprotein that contains 20% of sugar by mass. It is constituted mainly by aspartic and glutamic acids, serine, proline, and glycine; its glycosidic portion contains mainly O-glycosidically linked glycans with Gal, GalNAc and NeuAc residues as well as one N-glycosidically linked glycan per molecule. Ionic strength chromatography revealed that the ALL-thymocyte receptor (ALLTr) is made up by three isoforms, which possess similar amino acid composition but show slight differences in their sugar composition. The N-terminal amino acid residues are blocked both in the receptor and its purified isoforms. Analyses of the receptor's peptides, obtained by trypsin digestion with MALDI-TOF (matrix assisted laser desorption ionization-time of flight), were compared with the relative values obtained from the NCBItr (Swiss-Prot 10/01/99) database. Our results indicate that the peptides of ALLTr show low homology (<17%) with the human KIAA protein, the Fas-associated death domain protein, and the transforming growth factor- $\beta$  type II receptor. Our results suggest that the ALL thymocyte receptor could be considered a novel phenotypic marker specific for naive T cells.

**Key words:** thymocyte/glycoproteins/lectins/*Amaranthus leucocarpus*/ontogeny

## Introduction

Bone marrow-derived nucleated cells are known to possess glycoproteins containing O-glycosidically glycans linked through N-acetyl-D-galactosamine (GalNAc) to hydroxyl groups of serine or threonine residues. These O-glycosyl-proteins or mucin-like glycoproteins appear to be of different sizes, depending on the state and the type of cells. Previous works indicate that the mucin-like structures are specific for each cell lineage and for different differentiation stages, within a given cell lineage (Fukuda, 1992; Muroi *et al.*, 1997). For these reasons, it is of particular interest to identify specific tools for the study of the specific role of O-glycans in cell physiology.

Lectins are excellent tools for oligosaccharide characterization as well as for isolation of cellular populations. Lectins, which show specificity for O-glycosidically linked glycans, have been widely used in the fractionation of thymocytes and lymphocyte subpopulations. By selective agglutination with peanut agglutinin (*Arachis hypogaea*), it is possible to purify cortical immature thymocytes (Reisner *et al.*, 1976a); Using the same procedure, T and B splenocytes were fractionated with the lectin from *Glycine max* (Reisner *et al.*, 1976b). *Helix pomatia* can be employed for the identification and isolation of T cells (De Petris and Tackacs, 1983), and *Vicia villosa* agglutinin recognizes specifically lymphocytes bearing the CD8<sup>+</sup> (cytotoxic) phenotype (Fortune and Lehner, 1988). Other lectins such as wheat germ agglutinin, specific for GlcNAc have been used in the purification of B lymphocytes (De Dios *et al.*, 1986). Sequential fractionation of lymphocytes by soybean and peanut agglutinins yielded a pluripotential stem cells enriched fraction devoid of graft versus host activity, which has been successfully transplanted into patients with severe immune deficiencies (Reisner, 1983). Moreover, some of these lectins are currently used to evaluate the immune status of patients (Sharon, 1983). In previous works we demonstrated that the lectin from *Amaranthus leucocarpus* (ALL) possesses the capacity to interact with murine medullary thymocytes (Lascrain *et al.*, 1994), murine nonactivated peritoneal macrophages (Gorocica *et al.*, 1998; Maldonado *et al.*, 1998), and human naive T-lymphocytes (Lascrain *et al.*, 1997). ALL is a 35 kDa glycoprotein specific for the T and the T<sub>H</sub> antigens (Gal  $\beta$ 1,3GalNAc  $\alpha$ 1,O-Ser/Thr and GalNAc $\alpha$ 1,O-Ser/Thr, respectively) (Zenteno *et al.*, 1992). This lectin agglutinates preferentially erythrocytes with the M phenotype, does not recognize B lymphocytes, shows low mitogenic activity on human lymphocytes (Lascrain *et al.*, 1997), and induces suppression in mice (Zenteno *et al.*, 1985). Although it has been reported that all the cells recognized by ALL share the characteristic of being naive or quiescent cells

To whom correspondence should be addressed at: Laboratorio de Inmunología, Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina UNAM, PO Box 70159, 04510 Mexico



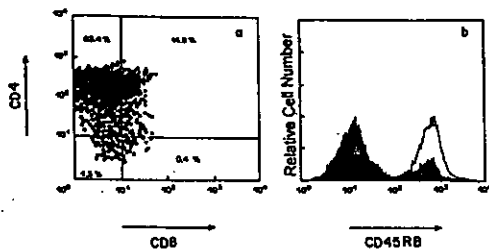


Fig. 1. Phenotypic characterization of murine thymocytes purified by selective agglutination with biotin-labeled *Amaranthus leucocarpus* lectin. (a) Analyses were performed using PE labeled anti-CD4 and FITC-labeled anti-CD8 as second color. (b) FITC-labeled anti-CD45RB was used to identify thymocytes with naive phenotype. Almost 90% of the ALL-purified cells are CD45RB<sup>+</sup> (Clear) and ~8% of the total thymocytes corresponded to naive CD45RB<sup>+</sup> cells (Dark).

(Lascurain et al., 1997; Gorocica et al., 1998), until now the specific role of the lymphocyte subset recognized by this lectin has not been elucidated. This work provides information on the molecular characteristics of the ALL receptor from murine medullary thymocytes.

## Results

### Cellular purification

The thymocytes agglutinated by biotin-labeled ALL (ALL<sup>+</sup>) corresponded to 5% ( $\pm 0.3$ ) of the total thymocytes. ALL<sup>+</sup> cells bear mainly the mature thymocyte phenotypes, CD2<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> (83.4%), 14.8% of the cells are CD2<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>, 0.4% are CD2<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>, and 1.3% are CD2<sup>-</sup>CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> (Figure 1a). Almost 90% of the ALL-purified cells possess also the CD45RB<sup>+</sup> phenotype (Figure 1b); control experiments indicated that ~8% of the total thymocytes corresponded to naive CD45RB<sup>+</sup> cells.

### Receptor purification

From  $\sim 10^8$  thymocytes, 27.4 mg of soluble protein were obtained after lysis. The receptor for ALL was purified in a single step from the thymocyte lysate by an indirect affinity chromatography method, using biotin-labeled ALL and avidin-agarose as affinity support. The receptor was eluted from the affinity matrix specifically by adding 0.2 M GalNAc (Figure 2). The purified protein corresponds to 180  $\mu$ g (<1%) of the proteins from the cell lysate.

### Polyacrylamide gel electrophoresis and blotting

SDS-PAGE analysis of the purified ALL-receptor from murine thymocytes showed that the purified fraction is homogeneous, giving a single band of 70 kDa (Figure 3). Experiments using ALL as control indicated a band of a 35 kDa protein, confirming that the 70 kDa band obtained by affinity chromatography corresponds to the purified receptor (Figure 3). Blotting of murine thymocytes lysate was revealed with antibodies against the CD43 isoforms S7 (which recognize the 115 kDa isoform) and 1B11 (130 kDa), and with biotin labeled ALL. Our results indicate that the antibodies against CD43

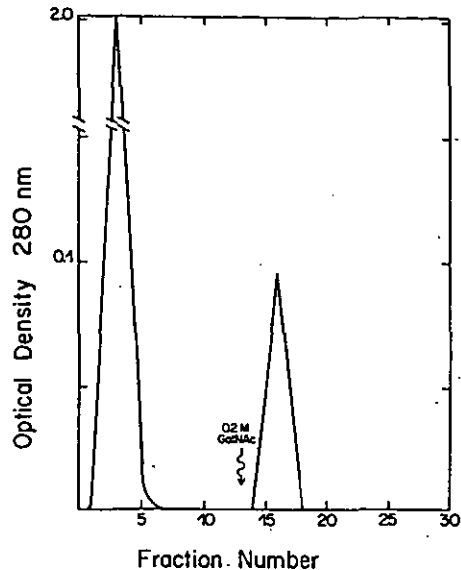


Fig. 2. Purification of the murine thymocyte receptor for *Amaranthus leucocarpus* lectin. The cells prior to lysis were incubated with biotin-labeled ALL, and then the complex was purified on an avidin-agarose column. The unretained fraction was eluted with PBS-T (0.1% Triton X-100) and the affinity purified receptor was eluted by addition of 0.2 M GalNAc in PBS-T. Optical density  $A_{280}$  was determined on fractions dialyzed previously against PBS.

isoforms, recognized in the thymocytes extract, a single band, which corresponds to its specific proteins, (Figure 4, lanes 1, 2), and ALL recognizes only a 70 kDa protein in the same cell lysate (Figure 4, lane 3). The purified ALL thymocyte receptor is recognized by the lectin (Figure 4, lane 4).

### Purification of ALL thymocyte receptor isoforms

From the affinity purified ALL receptor we obtained three isoforms by ion exchange chromatography on a mono-P column, in anionic form. The isoforms (termed as ALLTr1, ALLTr2, and ALLTr3) were eluted with a stepwise gradient of NaCl. The amount of protein obtained in each fraction indicated that the most important isoform is the ALLTr1, which corresponds to 50% of the receptor applied on the column; ALLTr2 and ALLTr3 corresponded to 25% and 15% of the protein applied on the mono P column (Figure 5).

### Chemical characterization

The thymocyte receptor for ALL is a glycoprotein, with 20% of sugars by weight, containing mainly aspartic, glutamic, serine, proline, and glycine residues; no specific peak of cysteic acid was found after performic acid oxidation (Table I). The carbohydrate fraction of the receptor, which represents 20% by weight, contains mainly N-acetyl-D-galactosamine and galactose, but N-acetyl-D-glucosamine, mannose, and sialic acid are also present in smaller amounts (Table II). The

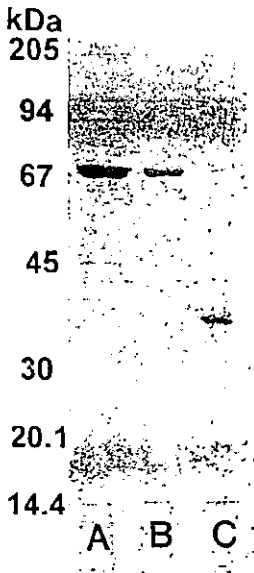


Fig. 3. SDS-PAGE of the purified ALL-thymocyte receptor. Lane A, 50  $\mu$ g of thymocyte lysate. Lane B, 10  $\mu$ g of purified fraction eluted with 0.2 M GalNAc. Lane C, 10  $\mu$ g *Amaranthus leucocarpus* lectin. The molecular weight markers are: myosin (205 kDa), phosphorylase b (94 kDa), bovine serum albumin (67 kDa), ovalbumin (45 kDa), carbonic anhydrase (30 kDa), trypsin inhibitor (20.1 kDa) and  $\alpha$ -lactalbumin (14.4 kDa).

analysis of the purified isoforms indicated slight differences in the concentration of carbohydrates by weight, and quantitative differences in the concentration of sialic acid; as indicated in Table II the most sialylated isoform is represented by the ALLTr3 fraction. The receptor and its purified isoforms possess blocked N-terminal amino acid residues. Tryptic digestion of the purified receptor, analyzed by MALDI-TOF, yields 25 peptidic fractions, the *m/z* of the identified fractions ranged from 442.9 to 3817.2, but the main fractions were located at 689.9, 1284.7, 1480.7, 1957.2, 2251.1, and 2809.1. The molecular  $[M+H]^+$  ions from the MALDI-TOF spectrum of tryptic digested thymocyte receptors were compared with those obtained from the NCBItr (Swiss-Prot 10/01/99) database. The identified thymocyte peptides showed 17% homology with the KIAA0659 protein, which is a predicted coding sequence obtained from cDNA clones from brain, 10% with the transforming growth factor- $\beta$  type II receptor, and 7% with Fas-associated death domain protein interleukin-1 $\beta$ -converting enzyme.

## Discussion

T lymphocytes differentiate within the thymus along the CD4/CD8 developmental pathway in a highly ordered process

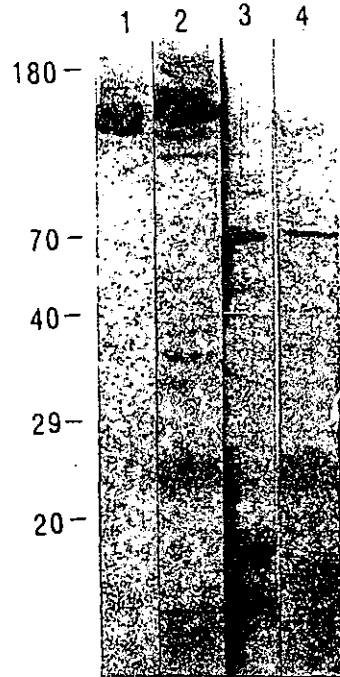


Fig. 4. Immunoblot of murine thymocytes and purified ALL-thymocyte receptor. Thymocyte lysates (from  $2 \times 10^6$  cells) were electrophoresed in SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, transferred to nitrocellulose filters, and analyzed with S7 (anti-115 kDa isoform of murine CD43, lane 1), and 1B11 (anti-CD43, 130 kDa isoform, lane 2). Cell lysate (lane 3) and the affinity chromatography purified receptor (lane 4) were analyzed with biotin-labeled ALL. Lanes 1 and 2 were revealed with rat anti-mouse conjugated with horseradish peroxidase, and lanes 3 and 4 with Extavidin-peroxidase in an enhanced chemiluminescence detection system.

(Sprent, 1989). Maturation of thymocytes is assessed by expression of the T cell receptor and the CD4 and CD8. The leukocyte common antigen, CD45, has been promoted as a potential marker of memory T cells. Resting or naive CD4<sup>+</sup>T cells express a high-molecular weight isoform recognized by anti CD45RB monoclonal antibodies (CD45RA in humans), the reciprocal subsets on activated lymphocytes are identified by the loss of CD45RB monoclonal antibodies staining (Bell *et al.*, 1998). Lymphocyte O-linked (Gal $\beta$ 1,3GalNAc) glycans, reactive with PNA, are other markers which seem to be developmentally regulated (Wu *et al.*, 1997), and have also been implicated in T-cell proliferation and differentiation (Barclay *et al.*, 1987). PNA receptors are predominantly present in immature (cortical) thymocytes (CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> and CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>), and in mature CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> memory or activated lymphocytes (Galvan *et al.*, 1998). The GalNAc specific lectin from *Amaranthus leucocarpus* recognizes murine medullary thymocytes (Lascrain *et al.*, 1994) and human T-cells with the phenotype CD4<sup>+</sup>CD45R $\alpha$ <sup>+</sup>CD27<sup>-</sup>, indicating that the lectin

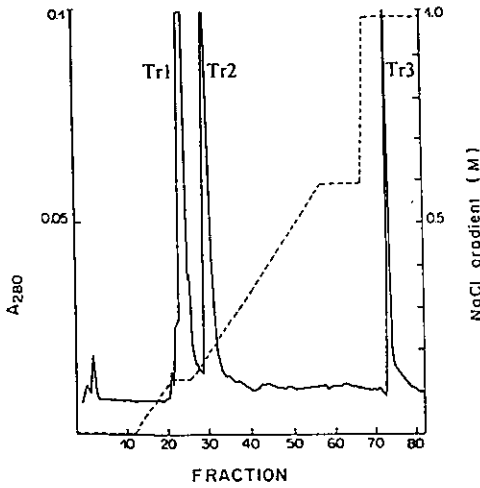


Fig. 5. Purification of murine thymocyte receptor (ALLTr)-isoforms for *Amaranthus leucocarpus* lectin by ion exchange chromatography on a mono P column (anionic form) in an FPLC system. The affinity purified ALL receptor (500 µg) was applied to the column equilibrated previously with 50 mM Bis-Tris buffer pH 7.5. Isoforms were eluted by a stepwise NaCl gradient (dotted line). Detection of the optical density of each 1 ml fraction was at A<sub>280</sub> (continuous line).

Table I. Amino acid composition of the thymocyte-receptor for *Amaranthus leucocarpus* lectin

Amino acid	Residues per 100 amino acids	Residues per molecule
ASX	11.5	59.1
GLX	10.5	54.0
SER	10.4	53.4
GLY	8.1	41.7
HIS	6.7	34.6
ARG	2.9	15.2
THR	6.8	35.1
ALA	5.5	28.5
TYR	4.9	25.5
MET	1.7	8.7
VAL	4.2	21.9
ILE	3.0	15.3
LEU	6.9	35.6
CYS	0	0
PHE	3.2	16.5
LYS	4.9	25.5
PRO	3.7	44.8
Total		515.4

The molecular mass of the receptor is 70 kDa. Calculation of amino acid residues is based on the consideration that up to 20% of the molecular mass is carbohydrate.

receptor is present specifically in naive or quiescent cell subpopulations (Lascarain *et al.*, 1997). In this work we confirmed that the main proportion (83%) of the murine thymocytes recognized by ALL are CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>; furthermore, we identified them as CD45RB<sup>+</sup>, indicating that they correspond to a naive cell subset of thymocytes, which could be destined for export to the peripheral lymphoid tissues (Sprent, 1989).

The thymocyte receptor for ALL is a glycoprotein of 70 kDa, which seems to be made up of three isoforms that can be separated by ion exchange chromatography. The ALL-thymocyte receptor contains mainly glutamic, aspartic, serine, proline, and glycine residues. Its glycans contain mainly Gal, GalNAc, and NeuAc residues as typical sialylated O-glycosylproteins. But the presence of mannose and GlcNAc residues indicates that the receptor contains also N-glycosidically linked glycans. The amino acid composition of the three isoforms is almost identical to that of the affinity chromatography purified receptor. The main differences among these fractions were observed in their sugar concentration and degree of sialylation; the isoform ALLTr3 is the most sialylated, suggesting that, as in other membrane O-glycosylproteins, the glycosylation state is modified according to the activation state of the cell (Carlsson and Fukuda, 1986; Piller *et al.*, 1988).

By means of lectins with similar specificity to ALL, several authors characterized different leukocyte antigens; PNA recognizes a major glycoprotein of 170–180 kDa and minor bands of 110–120 kDa (De Maio *et al.*, 1986); the lectin from *Salvia sclarea* interacts specifically with a 125 kDa glycoprotein that corresponds to leukosialin (CD43 or sialophorin)

Table II. Carbohydrate composition of ALL-thymocyte receptor and isoforms

Sugar residue	Residues per molecule			
	ALLTr	ALLTr1	ALLTr2	ALLTr3
Sugar content (%)	20	27	23	19
Fucose	10.0	0.0	0.0	0.0
Mannose	3.1	5.4	6.0	2.9
Galactose	18.9	27.3	24.7	19.2
GlcNAc	10.0	17.8	9.7	4.6
GalNAc	26.0	34.4	30.4	23.0
NeuAc	7.6	6.6	9.5	11.2

Sugar residues per molecule are presented considering the percent of their concentration and a molecular mass of 70 kDa.

(Piller *et al.*, 1988). Mucin-like structures have been identified in other leukocyte antigens (Shimizu and Shaw, 1993), such as CD45 (95 kDa) and Ly5 or T 200 (210 kDa). Although the potential receptor for ALL has been assumed to be leukosialin (Figure 4), which is the major carrier of O-glycosidically linked glycans in lymphocytes (Carlsson and Fukuda, 1986; Shelley *et al.*, 1989), no cross reaction was identified either between the ALL receptor and known phenotypic markers, or with leukosialin (Figure 4). These results were confirmed by

analysis of the amino acid sequence of the ALL-thymocyte receptor. The receptor and its isoforms have blocked N-terminal amino acid residue; the analysis of tryptic peptides from the receptor by MALDI-TOF indicated that the protein shows low (<17%) homology with proteins such as the human cerebral KIAA0659 protein (Ishikawa *et al.*, 1998), Fas-associated death domain protein (Fernandes-Alnemri *et al.*, 1996), and transforming growth factor- $\beta$  type II receptor (Suzuki *et al.*, 1994).

ALL interacts also with resident murine peritoneal macrophages through a 68 kDa receptor, its amino acid composition being different from that of the thymocyte receptor (Gorocica *et al.*, 1998), indicating the presence of common protein motifs containing O-glycosidically linked glycans in cells derived from lymphoid and myeloid cell lineage. Although the function of the ALL receptor remains to be identified, our results suggest that the ALL receptor could be considered a novel molecular marker for naive or quiescent T-cell populations.

## Materials and methods

### Reagents

*Amaranthus leucocarpus* seeds were obtained in Tulyehualco, Mexico; and the lectin was purified by affinity chromatography as described by Zenteno and Ochoa (1988). The *A. leucocarpus* lectin (ALL) was labeled with the N-hydroxysuccinimide ester of biotin from Pierce Chem. Co. (Rockford, IL) at a label/protein ratio of 2:1 (Savage *et al.*, 1992). Electrophoresis and blotting reagents were obtained from Bio-Rad Lab. Inc. (Richmond, CA, USA). Cell culture media, biotin, avidin monomeric-agarose, avidin-peroxidase, bovine serum albumin fraction V, sugars, and chemical reagents were from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). Phycoerythrin (PE)-labeled antibodies against murine lymphocyte markers: CD2, CD3, CD4, and CD43 isoforms, as well as FITC-labeled anti-CD8, and anti-CD45RB, as well as rat anti-mouse antibodies conjugated with horseradish peroxidase were obtained from Pharmingen (New York, NY). Trypsin, sequence grade, was obtained in Promega (Orsay, France).

### Cells

Thymus glands were surgically removed from male CD-1 mice (4 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 suspended cells. Thymocytes were suspended in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 5% fetal calf serum (heat inactivated at 56°C for 30 min) at  $10^8$  cells/ml. The ALL<sup>+</sup> thymocyte subpopulation was purified by selective agglutination as follows: 1 ml of the cell suspension was incubated for 10 min at room temperature with 10  $\mu$ g of biotinylated-ALL, then the cell suspension was layered gently on top of a 7% bovine serum albumin solution in PBS in conical 12 ml glass tubes. After 30 min at room temperature, the cells present in the bottom (ALL<sup>+</sup> thymocytes) and on the top (ALL<sup>-</sup> thymocytes) were collected separately and washed twice with PBS (Reisner, 1983).

### Analysis of separated cells

Viability of purified thymocytes (>90%) was assessed by the trypan blue exclusion test. Phenotypic characterization of the ALL<sup>+</sup> cell fractions was determined by the double stain immunological method (Hudson and Hay, 1980). ALL<sup>+</sup> cells were incubated at room temperature for 15 min with 10  $\mu$ l FITC anti-CD8 diluted 1:150/ $10^6$  cells in 500  $\mu$ l PBS-BSA-azide (PBS with 0.2% bovine serum albumin and 0.2% sodium azide) and 10  $\mu$ l PE-labeled anti-CD2, CD3, or CD4, diluted 1:200, as the second color. CD45RB was determined on ALL<sup>+</sup> thymocytes using a single fluorescence assay using 10  $\mu$ l of FITC-anti CD45RB (diluted 1:150/ $10^6$  cells in PBS-BSA-azide). After incubation, the cells were washed with PBS-BSA and suspended in 500  $\mu$ l of PBS with 0.1% *p*-formaldehyde; fluorescent cells were determined by flow cytometry in an Excalibur Becton & Dickinson Cell Sorter apparatus (FACs, Mountain View, CA). In all cases the biotin-labeled ALL was present, and no variations in the phenotypic characterization were observed if the lectin was eliminated previously by addition of 0.2 M GalNAc. Control staining was performed using FITC-labeled antibodies against ALL.

### Receptor purification

Indirect affinity chromatography was used as a method to purify the lectin-binding glycoproteins from the thymocyte (Buckie and Cook, 1986);  $10^8$  thymocytes purified by agglutination with biotin-ALL were lysed in a solution of PBS containing 1  $\mu$ g/ml aprotinin A, 1  $\mu$ g/ml pepstatin, 2  $\mu$ g/ml leupeptin, 2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, and 0.1% (v/v) Triton X-100 (lysis buffer), for 30 min at 4°C under shaking. Nuclei, cell debris, and mitochondria were removed by centrifugation, first for 10 min at 250  $\times$  g, then 30 min at 18,000  $\times$  g. Pellets were eliminated and the clear supernatant was loaded on an avidin-agarose column (3  $\times$  1 cm), equilibrated previously with PBS-T (PBS containing 0.1% v/v Triton X-100) at 4°C. The unretained material was eluted with PBS-T and the fraction corresponding to the bound protein was eluted with 0.2 M GalNAc in PBS-T, and the biotin-labeled lectin was eluted from the avidin column by addition of 0.2 M glycine/HCl, pH 2.8. Optical density  $A_{280}$  was determined on fractions dialyzed against PBS. Finally, the GalNAc-eluted fractions were pooled, dialyzed against distilled water, and freeze-dried for further analysis. In order to avoid nonspecific interaction among the avidin column and cell proteins, the thymocyte lysate in absence of biotin-labeled lectin or with unlabeled lectin was deposited onto the column. Our results indicate that, under these conditions, almost all deposited protein was recovered in the unretained fraction and no protein was detected in fractions eluted with either GalNAc or 0.2 M glycine/HCl pH 2.8.

### Separation of ALL<sup>+</sup> thymocyte receptor isoforms

The affinity purified thymocyte receptor was applied to a mono P prepacked HR column 5/5 mm (Pharmacia, Uppsala, Sweden) equilibrated previously with 50 mM Bis-Tris buffer, pH 7.5, at a flow rate of 1 ml/min with a maximal pressure of 40 bars, in a 60 min program using an FPLC system (Pharmacia, Uppsala, Sweden). Thymocyte receptor isoforms were eluted from the column with a 0-1 M NaCl stepwise gradient in Bis-Tris buffer. Fractions of 1 ml were collected

optical density was monitored at A<sub>220</sub>. Each eluted peak dialyzed against distilled water before lyophilization for further analysis.

**acrylamide gel electrophoresis**

molecular mass and the homogeneity of the purified receptor were evaluated by polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) in the presence of 0.1% sodium dodecyl sulfate (SDS), using the Laemmli (1970) buffer system; the gels were stained with 0.1% Coomassie brilliant blue.

**analytical methods**

Protein concentration was determined by the method of Lowry modified by Peterson (1977), using bovine serum albumin as standard. Carbohydrate concentration was determined by the method of Dubois et al. (1956), using lactose as standard. Carbohydrate composition analysis was performed by methylation in the presence of meso-inositol as internal standard; per-O-trimethyl silylated methyl glycosides (after N-reacylation) were analyzed by gas-chromatography using a capillary column (25 x 0.32 mm) of 5% Silicone OV 210 (Applied Science Lab., Buffalo, NY), in a Varian 2100 gas chromatograph (Orsay, France; Zanetta et al., 1972).

**amino acid analysis**

100 µg sample was hydrolyzed under vacuum with 2 ml of 6 N HCl at 110°C in sealed tubes for 24, 48, and 72 h. The samples were analyzed on an automatic amino acid analyzer (Beckman 500), according to Bidlingmeyer et al. (1984), using L-leucine as internal standard. The amino acid sequence analysis was determined in samples of purified ALL-thymocyte receptor and isoforms. Samples were separated by SDS-PAGE and electroblotted on a PVDF membrane; the band was excised from the blot and sequenced with a Beckman Model F3000 protein sequencer (Fullerton, CA). Amino acid sequencing determined by MALDI-TOF on peptide fragments obtained by trypsin digestion of the purified ALL-receptor was performed on the SDS-PAGE excised band as follows: the gel containing 200 pM of receptor was digested with 0.5 µg trypsin in 500 µl ammonium bicarbonate, pH 8.0 at 37°C, for 24 h. The reaction was inhibited by storing at 4°C. Then, the enzyme digest was evaporated to dryness using a Gyrovap (Howe, London). Samples were prepared by mixing directly into the target 1 µl of the reaction products (containing 50 pM) and 1 µl of a 2,5-dihydroxybenzoic acid matrix (12 mg/ml in CH<sub>3</sub>OH/H<sub>2</sub>O, 70:30, v/v), and then allowing the mixture to crystallize at room temperature. Positive ions of the peptides were measured by MALDI-TOF on a Vision 2000 time-of-flight mass spectrometer (Finnigan MAT, Bremen, Germany) equipped with a 337 nm UV laser. The mass spectra were acquired in reflectron mode under 8 keV acceleration voltage and positive detection. Control assays were performed using trypsin alone to identify self-digested peptide mass and with angiotensin I as standard (M<sub>r</sub> 1296.7). The mass of [M+H]<sup>+</sup> ions from peptides produced by tryptic digestion was compared with those obtained from NCBInr (Swiss-Prot 10/01/99) data base (Hellman et al., 1995).

**Protein blotting**

Thymocytes (2 x 10<sup>6</sup>) were solubilized in lysis buffer. Insoluble material was removed by centrifugation first for 10 min at

250 x g, then 30 min at 18,000 x g and detergent soluble proteins were resolved by 10% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE). Resolved proteins were transferred to nitrocellulose membranes by using a semidry blotting apparatus (Bio-Rad, Richmond, CA) under conditions recommended by the manufacturer. Membranes containing transferred proteins were blocked overnight with TBS (Tris-base 20 mM, NaCl 137 mM, pH 7.6, and 0.1% Tween 20) and 5% skimmed milk, prior to incubation with antibodies against the CD43 isoforms S7 and 1B11 (anti-115 kDa and anti-130 kDa, respectively). Membranes were then washed in TBS and primary antibodies were detected with rat anti-mouse antibodies conjugated with horseradish peroxidase and an ECL (Enhanced chemiluminescence) detection system. To evaluate the binding of ALL to murine thymocyte glycoproteins and to the purified receptor, these proteins were transferred to nitrocellulose membranes. Membranes containing resolved proteins were blocked overnight in TBS containing 5% skimmed milk and incubated with ALL-biotin diluted in PBS and with 5% skimmed milk for 1 h at 37°C and overnight at 4°C. The blot was then washed with TBS without Tween-20 and incubated with Extravidin<sup>®</sup>-peroxidase. Proteins were visualized by ECL. Negative controls were performed using biotin-labeled antibodies raised against the purified lectin and revealed no interaction with the purified thymocyte receptor or with the total lysate.

**Acknowledgments**

Thanks are due to Marie-Christine Slomianny (USTL) for the MALDI-TOF analysis. This work was supported in part by CONACyT (27609 M), PAED (202317) and DGAPA (PAPIIT-IN224598) UNAM, and by Program ECOS Mexico-France (M97B05).

**References**

Barclay, A.N., Jackson, D.I., Willis, A.C. and Williams, A.F. (1987) Lymphocyte specific heterogeneity in the rat leukocyte common antigen (T200) is due to differences in polypeptide sequences near the NH<sub>2</sub>-terminus. *EMBO J.*, 6, 1259-1264.

Bell, E.B., Sparshott, S.M. and Bunce, C. (1998) CD4<sup>+</sup> T-cell memory, CD45R subsets and the persistence of antigen—a unifying concept. *Immunol. Today*, 19, 61-64.

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.

Buckie, J.W. and Cook, G.M.W. (1986) Specific isolation of surface glycoproteins from intact cells by biotinylated concanavalin A and immobilized streptavidin. *Anal. Biochem.*, 156, 463-472.

Carlsson, S.R. and Fukuda, M. (1986) Isolation and characterization of leukostatin, a major sialoglycoprotein on human leukocytes. *J. Biol. Chem.*, 261, 12779-12786.

De Dios, J., Manso, M., León, V. and López Borrasca, A. (1986) Separation of human lymphocyte subclasses by rosettes with latex-lectin particles. *Biochem. Med. Metab. Biol.*, 35, 12-17.

De Maio, A., Lix, H., Gershoni, J.M. and Sharon, N. (1986) Identification of glycoproteins that are receptors for peanut agglutinin on immature (cortical) mouse thymocytes. *FEBS Lett.*, 194, 28-32.

De Petris, S. and Tackaacs, B. (1983) Relationship between mouse lymphocyte receptors for peanut agglutinin (PNA) and *Helix pomatia* agglutinin (HPA). *Eur. J. Immunol.*, 13, 831-840.

Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J.F., Rebers, P.A. and Smith, F. (1956) Colorimetric method for determination of sugar and related substances. *Anal. Chem.* 28, 350-356.

- Fernandes-Alnemri, T., Armstrong, R.C., Krebs, J., Srinivasula, S.M., Wang, L., Buttlich, F., Friz, L.C., Trapani, J.A., Tomaselli, K.J., Litwack, G. and Alnemri, E.S. (1996) *In vitro* activation of CPP32 and Mch3 and Mch4, a novel human apoptotic cysteine protease containing two FADD-like domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 7464-7469.
- Fortune, F. and Lehner, T. (1988) Phenotypic expression of *Vicia villosa* binding T cell subsets, as markers of contrasuppressor cells in systemic lupus erythematosus. *Clin. Exp. Immunol.*, **74**, 100-104.
- Fukuda, M. (1992) Cell surface carbohydrates in hematopoietic cell differentiation and malignancy. In Fukuda, M. (ed.), *Cell Surface Carbohydrates and Cell Development*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 127-159.
- Galvan, M., Muralidharana, K., Baum, J., and Ahmed, R. (1998) Alterations in cell surface carbohydrates on T cells from virally infected mice can distinguish effector/memory CD8 (+) T cells from naive T cells. *J. Immunol.*, **161**, 641-648.
- Gorocica, P., Lascurain, R., Hernandez, P., Porras, F., Bosquelet, S., Vazquez, L. and Zenteno, E. (1998) Isolation of the receptor for *Amaranthus leucocarpus* lectin from murine peritoneal macrophages. *Glycoconj. J.*, **15**, 809-814.
- Hellman, U., Wernstedt, C., Gonez, J. and Heldin, C. H. (1995) Improvement of an in gel digestion procedure for the micropreparation of internal protein fragments for amino acid sequencing. *Anal. Biochem.*, **224**, 451-455.
- Hudson, L. and Hay, F.C., eds. (1980) *Practical Immunology*, 2nd ed. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Ishikawa, K., Nagase, T., Suyama, M., Miyajima, N., Tanaka, A., Kotani, H., Nomura, N. and Ohara, O. (1998) Prediction of the coding sequences of 100 new cDNA clones from brain which can code for large proteins *in vitro*. *DNA Res.*, **5**, 169-176.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during assembly of the bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- Lascurain, R., Chávez, R., Gorocica, P., Pérez, A., Montaño, L.F. and Zenteno, E. (1994) Recognition of a CD4<sup>+</sup> mouse medullary thymocyte subpopulation by *Amaranthus leucocarpus* lectin. *Immunology*, **83**, 410-413.
- Lascurain, R., Porras, F., Baez, R., Chávez, R., Martínez-Cairo, S., Alvarez, G. and Zenteno, E. (1997) *Amaranthus leucocarpus* lectin recognizes human naive T cell subpopulations. *Immunol. Invest.*, **26**, 579-587.
- Maldonado, G., Gorocica, P., Agundia, C., Pérez, A., Molina, J. and Zenteno, E. (1998) Inhibition of phagocytic activity by the N-acetyl-D-galactosamine-specific lectin from *Amaranthus leucocarpus*. *Glycoconj. J.*, **15**, 615-622.
- Muroi, K., Amemiya, Y., Sievers, E.L., Miura, Y., Hakomori, S.E. and Loken, M.R. (1997) Expression of sialosyl-T and disialosyl-T antigens in erythroid cells. *Leukemia Lymphoma*, **25**, 403-414.
- Peterson, G.L. (1977) A simplification of the protein assay method of Lowry *et al.* which is more generally applicable. *Anal. Biochem.*, **83**, 346-356.
- Piller, F., Piller, V., Fox, R.I. and Fukuda, M. (1988) Human T-lymphocyte activation is associated with changes in O-glycan biosynthesis. *J. Biol. Chem.*, **263**, 15146-15150.
- Reisner, Y. (1983) Differential agglutination by soybean agglutinin of human leukemia and neuroblastoma cell lines: potential application to autologous bone marrow transplantation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 6657-6661.
- Reisner, Y., Linker-Israeli, M. and Sharon, N. (1976a) Separation of mouse thymocytes into two subpopulations by the use of peanut agglutinin. *Cell. Immunol.*, **25**, 129-134.
- Reisner, Y., Ravid, A. and Sharon, N. (1976b) Use of soybean agglutinin for the separation of mouse B and T lymphocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **72**, 1585-1591.
- Savage, D., Mattson, G., Desai, S., Nielander, G., Morgensen, S. and Conklin, E. eds. (1992) *Avidin-Biotin Chemistry: A Handbook*. Pierce Chemical Company, Rockford, IL.
- Sharon, N. (1983) Lectin receptors as lymphocyte surface markers. *Adv. Immunol.*, **34**, 213-218.
- Shelley, C.S., Remold-O'Donnell, E., Davis III, A.E., Bruns, G.A. P., Rosen, F.S., Carroll, M.C. and Whitehead, A.S. (1989) Molecular characterization of sialophorin (CD43), the lymphocyte surface sialoglycoprotein defective in Wiskott-Aldrich syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 2819-2823.
- Shimizu, Y. and Shaw, S. (1993) Cell adhesion. Mucins in the mainstream. *Nature*, **366**, 630-631.
- Sprent, J. (1989) In Paul, W.E. (ed.), *T Lymphocytes and the Thymus. Fundamental Immunology*, Second edition. Raven Press, New York, pp. 69-93.
- Suzuki, A., Shiota, N., Maeda, T., Tada, M. and Ueno, M. (1994) Cloning of a isoform of mouse TGF-beta type II receptor gene. *FEBS Lett.*, **355**, 19-22.
- Wu, W., Punt, J.A., Granger, L., Sharrow, S.O. and Kearse, K.P. (1997) Developmentally regulated expression of peanut agglutinin (PNA)-specific glycans on murine thymocytes. *Glycobiology*, **7**, 349-356.
- Zanetta, J.P., Breckenridge, W.C. and Vincendon, G.J. (1972) Analysis of monosaccharides by gas-liquid chromatography of the O-methylglycosides as trifluoro-acetic derivatives. *J. Chromatogr.*, **69**, 291-304.
- Zenteno, E. and Ochoa, J.L. (1988) Isolation and purification of *Amaranthus leucocarpus* lectin on stroma column. *Phytochemistry*, **27**, 313-317.
- Zenteno, E., Ochoa, J.L., Parra, C., Montaño, M., Ruiz, B. and Carvajal, R. (1985) *Machaerocereus eruca* and *Amaranthus leucocarpus* lectins: biological activity on immune response cells. In Bog-Hansen, T.C., Breborowicz, J. (eds.), *Lectins Biology, Biochemistry Clinical Chemistry*. Vol. 4. Ed. W. de Gruyter, Berlin, pp. 437-445.
- Zenteno, E., Lascurain, R., Montaño, L.F., Vázquez, L., Debray, H. and Montreuil, J. (1992) Specificity of *Amaranthus leucocarpus* lectin. *Glycoconj. J.*, **9**, 204-208.

## CAPÍTULO V. DISCUSIÓN GENERAL

Las lectinas se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza, destacando las lectinas vegetales, que abundan en plantas inferiores y superiores. Se han caracterizado lectinas en las familias de gramíneas y de leguminosas, estas últimas, las más caracterizadas estructuralmente, encontrándose semejanzas como son: secuencias de aminoácidos y arreglos tridimensionales<sup>25</sup>, sin embargo, existen diferencias importantes que hacen que cada lectina interactúe de forma muy precisa con las estructuras oligosacáridicas que reconoce y, por tanto, cada una tenga una actividades biológica propia.

En la familia de las amarantáceas se han caracterizado lectinas que tienen pesos moleculares muy parecido, presentando una especificidad hacia la GalNAc y fetuína ésta última es una glicoproteína de 45 kDa que posee tres estructuras glicosiladas del tipo O-glicosídico (Gal $\beta$ 1-3GalNAc $\alpha$ 1-0Ser/Thr). Las lectinas de las amarantáceas aglutinan los eritrocitos humanos del tipo A, B y O; sin embargo existen diferencias significativas en su capacidad de interactuar con las glicoproteínas presentes en las membranas celulares, por ejemplo, la lectina de *Amaranthus caudatus* (ACA) se ha relacionado con ciertos procesos tumorales<sup>69</sup>, además de que la lectina ACA induce la proliferación de células de cáncer de colon humano HT29<sup>70</sup>, al tiempo que la lectina de ALL se ha caracterizado por reconocer subpoblaciones de linfocitos CD4+, además de inducir inmunosupresión en ratones.

La purificación de la lectina de *Amaranthus leucocarpus* se realizó usando como ligandos diferentes tipos de glicoproteínas, que presentaran en sus estructuras al antígeno T o al antígeno Tn. Todas las glicoproteínas utilizadas son eficientes para la purificación de la lectina ALL, sin embargo, el porcentaje de lectina purificada varía de acuerdo al ligando empleando. El análisis de las secuencias O-glicosilables en dichas glicoproteínas demuestra una variedad de motivos susceptibles de O-glicosilación, por ejemplo, en las mucina submaxilar ovina y bovina existen secuencias de aminoácidos repetitivas, las cuales se caracterizan por un alto contenido de residuos de serina y treonina susceptibles de O-glicosilación; la fetuína presenta solo tres sitios de O-glicosilación, mientras que la IgA presenta una secuencia de aproximadamente 20 aminoácidos en donde se encuentran cinco sitios de O-glicosilación muy cercanos entre sí. Ésta variedad en la distribución de los O-

glicanos, podría explicar el por que éstas glicoproteínas tengan diversa capacidad para interactuar con la lectina de ALL.

La secuencia de aminoácidos de ALL muestra un 60-63% de homología con la secuencia reportada para una proteína considerada de alto valor nutricional de *Amaranthus hypocondriacus*<sup>71</sup>, de la cual también se obtuvo la secuencia de la lectina de *A. Caudatus*<sup>72</sup>. Se encontró homología en la estructura secundaria entre la lectina de *A. leucocarpus* y la lectina de *A. caudatus*, en donde las estructuras predominantes fueron las hojas plegadas  $\beta$ . Se ha observado la homología en la estructura de lectinas de la familia de las leguminosas, ésta se conserva en el sitio de reconocimiento a carbohidrato, donde se encuentran participando invariablemente tres aminoácidos: ácido aspártico, asparagina y algún aminoácido del tipo aromático, o en su lugar una leucina, en algunos casos la participación de un ácido glutámico es importante para el reconocimiento de estructuras que presenten GalNAc en su composición<sup>72</sup>.

En la familia de las amarantáceas sólo se ha reportado la estructura cristalina de la lectina *A. caudatus* unido al antígeno T<sup>73</sup>. Esta lectina es dimérica, cada monómero está compuesto por los dominios N y C, unidos por una alfa hélice corta para formar un monómero ovalado, cada dominio tiene una estructura del tipo trébol  $\beta$ , semejante a los observados en lectinas provenientes de la cadena B de *Ricinus communis* (RCA)<sup>74</sup>, de *Galanthus nivalis* (GNA)<sup>75</sup> y de *Artocarpus integrifolia* (jacalina)<sup>76</sup>, a pesar de las semejanzas estructurales, estas lectinas presentan diversos grados de interacción con carbohidratos, la jacalina tiene un sitio de unión a galactosa en cada una de sus cuatro subunidades, mientras que la lectina de GNA tiene 12 sitios de unión a Man, lo cual sugiere que estructuralmente estas lectinas tienen un ancestro común y que mediante procesos selectivos de evolución adquirieron los arreglos conformacionales que les permite la especificidad actual<sup>77</sup>. En el sitio de reconocimiento de la lectina ACA encontramos que el OH en posición 4 de la galactosa se encuentra formando un puente de hidrógeno con la histidina 73, mientras que el OH en posición 4 de la GalNAc se encuentra formando un puente de hidrógeno con el triptofano en posición 77, el grupo N-acetilo de la GalNAc forma un puente de hidrógeno con la amida de la cadena principal de la tirosina 76<sup>72</sup>.

Tomando en cuenta la alta homología entre la secuencia de aminoácidos de las lectinas de *A. Leucocarpus* y *A. Caudatus* es posible que ambas estructuras



tridimensionales sean semejantes, sin embargo existen diferencias estructurales que pueden influir en la actividad biológica de estas lectinas, por ejemplo el 10% del peso molecular de la lectina de *A. leucocarpus* es debido a estructuras oligosacáridicas en su estructura, 1. Las estructuras oligosacáridicas de la lectina de ALL corresponden a N-glicanos del tipo lactosamínico y oligomanosídico. Existen lectinas en las cuales las estructuras glicosídicas se encuentran en sus precursores como es el caso de las lectinas de Con A, WGA y PNA, la remoción de estos oligosacáridos durante las modificaciones post-traduccionales vuelve a lectina activa, sin embargo en la mayoría de las lectinas, los glicanos se encuentran ampliamente distribuidos y pueden servir como protección contra la acción de proteasas. Se ha observado que los N-glicanos no afectan significativamente la estructura tridimensional de las proteínas, sin embargo, podrían influenciar la interacción con los ligandos, al modificar la orientación de los aminoácidos involucrados en el reconocimiento al carbohidrato. En la lectina de *A. leucocarpus* existe un sitio de N-glicosilación que se encuentra cercano al sitio de interacción a carbohidrato que pudiera influenciar en la interacción de la lectina con sus receptor específico.

La lectina de cacahuate *Arachis hypogaea* (PNA) se une al antígeno T por interacción con los grupos hidróxilo de los carbonos 2, 3, 4 y 6 de la galactosa terminal, y con el hidróxilo del carbono 4 y el N-acetilo del carbono 2 de la GalNAc<sup>78</sup>. El disacárido sialilado, se hace inaccesible a la unión con la lectina. Mediante ensayos de especificidad empleando diversas O-glicoproteínas se determinó que la lectina de *A. caudatus* interactúa con el antígeno T<sup>79</sup>, mientras que en el caso de la lectina de *A. leucocarpus* el uso de diversas O-glicoproteínas, (fetuina, mucina ovina y bovina, IgA, O-glicopéptidos y los O-glicanos de estas glicoproteínas), se demostró que la lectina ALL tiene especificidad hacia el antígeno T y Tn<sup>43</sup>. Las sustituciones en el C3 de la Gal y C6 de la GalNAc, por ácido siálico, son toleradas por ambas lectinas, esto ha sido demostrado por el empleo de O-glicoproteínas del tipo mucina, como la fetuina, la IgA y la glicoforina A en los cuales al antígeno T se encuentra sialilado. Por otra parte al eliminar el ácido siálico del antígeno, se provoca un incremento en la capacidad inhibitoria de estas glicoproteínas hacia la hemaglutinación por ALL. En la inhibición de la actividad hemaglutinante de ALL utilizando mucina proveniente del estómago de puerco se demostró que sustituciones por

grupos N-acetil-lactosaminicos (Gal $\alpha$ 1-4GlcNAc), en los carbonos C3 de la Gal y en el C6 de la GalNAc no son tolerados por la lectina ALL.

Para tener un mejor análisis sobre la interacción lectina con estructuras O-glicosídicas, se realizaron ensayos de O-glicosilación *in vitro*, encontrando que la presencia de dos residuos de GalNAc, separados por tres aminoácidos facilita la interacción de ALL con su receptor, mientras que residuos de continuos GalNAc en la cadena polipeptídica impiden dicha interacción. Se ha observado mediante ensayos de interacción con péptidos sintéticos que la presencia de estructuras oligosacáridicas en posiciones continuas no afectan la interacción de la lectina de cacahuete *Arachis hypogaea* (PNA)<sup>64</sup>. En contraste, la interacción de la lectina de *Vicia graminea* (VGA)<sup>14</sup>, con su receptor requiere la presencia de estructuras oligosacáridicas contiguas y de un aminoácido hidrofóbico. En el caso de la lectina de *Salvia sclarea* Tn específica, la presencia contigua de estas estructuras no afecta la interacción lectina-receptor<sup>80</sup>

Las lectinas interactúan con las estructuras glicánicas mediante enlaces de diferentes tipos, entre los cuales sobresalen los puentes de hidrógenos, interacciones hidrofóbicas y las interacciones del tipo Van der Waale, el tipo de interacción depende, en gran parte, del arreglo tridimensional de la lectina en el sitio de reconocimiento a carbohidrato, en particular la conformación tridimensional que adquieren las estructuras oligosacáridicas podrían jugar un papel relevante en dicha interacción. Esto se ha observado en la lectina de germen de trigo (*Triticum vulgare*) WGA que reconoce tanto la GlcNAc y el ácido siálico, que son monosacáridos con estructuras diferentes, sin embargo guardan similitud conformacional en los carbonos 2 y 3 del azúcar. De manera semejante, en la glicoforina A<sup>N</sup> y A<sup>M</sup> hay una diferencia en el grado de torsión de la cadena polipeptídica relacionado con el grado de glicosilación de dichas isoformas; es decir, al aumentar la glicosilación aumenta el grado de torsión de la cadena polipeptídica<sup>81</sup>, lo cual podría influenciar en la interacción carbohidrato-proteína.

En el sitio de unión de la lectina de *Amaranthus caudatus*, el anillo del carbohidrato es orientado de manera paralela a la superficie de la proteína<sup>77</sup>, mientras que en la lectina de *Ricinus communis*, el anillo del carbohidrato se encuentra orientado de manera perpendicular al sitio de unión<sup>77</sup>. La presencia de un entorno proteico podría variar el grado de interacción

de las lectinas con sus receptores y explica la diferencia en las actividades biológicas presentadas entre las lectinas ACA y ALL.

La lectina de amaranto (ALL) reconoce a un  $5.6 \pm 0.9\%$  de las células totales del timo. La caracterización fenotípica de esta subpoblación, mostró que el 75% de la células presenta el marcador CD4+ y el 11% el marcador CD8+. 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 receptor de la lectina de ALL, se ha caracterizado, mediante cromatografía de afinidad en timocitos murinos, con un peso molecular de 70 kDa.

Mediante análisis de espectrometría MALDI-TOF, se obtuvieron 25 péptidos, los cuales no presentaron homología con los marcadores celulares ya reportados, como por ejemplo las isoformas de la leucosialina<sup>R2</sup> (CD43), por lo que se puede considerar al receptor de ALL como un nuevo marcador de células T, cuya función queda por dilucidar. La porción sacarídica del receptor corresponde al 30% del peso total, con una composición de galactosa, GalNAc y ácido siálico en una proporción de 2:3:0.3, además presenta residuos de Man y GlcNAc en proporción 2:1.

La separación del receptor para ALL por medio de intercambio aniónico, generó tres fracciones que fueron eluidas con diferente fuerza iónica. La composición de aminoácidos de estas fracciones, por lo que posiblemente se trata de tres isoformas de la misma glicoproteína. Las diferencias en el grado de sialilación de cada fracción purificada, sugiere que son la razón principal en la interacción con la columna de intercambio iónico, debido a que el ácido siálico presenta carboxilos que a pH neutro se encuentran ionizados. Las variaciones en el grado de sialilación del receptor de ALL, posiblemente refleja distintos estadios de diferenciación de las células que lo presentan, debido a la acción de las sialiltransferasas importantes en la expresión final de estructuras oligosacáridicas sobre la superficie celular y estas diferencias son reconocidas de manera específica por la lectina de *Amaranthus leucocarpus*, por lo que podemos considerar a la lectina de ALL una herramienta útil en el estudio de estructuras O-glicosídicas de estos tipos celulares y los mecanismos de control de la glicosilación de los diferentes antígenos de superficie presentes en estas células.

## CAPÍTULO VI CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

### CONCLUSIONES

1.-Debido a la homología que existe entre la lectina de *Amaranthus leucocarpus* y la de *Amaranthus caudatus*, es posible que su estructura tridimensional sea semejante.

2.-La distancia que existe entre residuos oligosacáridicos y el arreglo conformacional de estas estructuras parece ser importante para la interacción lectina-receptor.

3.- El receptor de la lectina de *Amaranthus leucocarpus*, puede ser considerado como una nueva herramienta para realizar el marcaje fenotípico de sub-poblaciones de linfocitos.

### PERSPECTIVAS.

1.- Estudios calorimétricos de la especificidad de la lectina de *Amaranthus leucocarpus* hacia estructuras O-glicosídicas.

1.-Cristalización de la lectina de *Amaranthus leucocarpus* con el glicopéptido TTSAPTTS, para establecer los mecanismos moleculares de la interacción de la lectina con dicho glicopéptido y establecer las diferencias a nivel estructural con lectinas con la misma especificidad que la lectina ALL.

2.-Caracterización de las estructuras glicosídicas de la lectina *Amaranthus leucocarpus*, para establecer su papel en la función biológica de la lectina.

3.-Caracterización del receptor de la lectina de *Amaranthus leucocarpus*, así como su participación en posibles mecanismos de transducción de señales.

4.- Aplicación de la lectina como marcador fenotípico de linfocitos en distintos estadios de maduración y/ activación, así como en diversos estados patológicos.

## BIBLIOGRAFÍA

- 1.-Goldstein I. J, Hughes R. C, Monsigny M., Osawa T., and Sharon N. (1980). What should be called a lectin? *Nature* 66: 285-286.
- 2.-Nowel P. C. (1960). Phytohemagglutinin: An initiator of mitosis in cultures of normal human leucocytes. *Cancer. Res* 20: 462-466.
- 3.-Nesser R, Koellreutter B. Wuersch, P. (1986). Oligomannoside type glycopeptides inhibiting adhesion of *Escherichia coli* strains mediated by type 1 pili. preparation of potent inhibitors from plant glycopeptides. *Infec. Immun.* 58: 428-436
- 4.-Sharon N, and Lis H. (1986) Bacterial lectins. In: *The Lectins Properties, Function and Application in Biology and Medicine.* Academic Press. 266-270.
- 5.-Lis H. and N. Sharon. (1986) Lectins as molecules and as tools. *Ann. Rev. Biochem.* 55: 35-67.
- 6.-Boland C. R, Chen Y. F, Rinderle S. J, Resau J. H, Luk G. D, Lynch H. T. and Goldstein I. J. (1991). Use of the lectin from *Amaranthus caudatus* as a histochemical probe of proliferating colonic epithelial cells. *Cancer Res* 51: 657-665
- 7.-Ofek I, Mirelman D. and N. Sharon. (1977) Adherence of *Escherichia coli* to human mucosal cells mediated by mannose receptors *Nature.* 265: 623-625
- 8.-Ofek I and N Sharon. (1988) Lectinophagocytosis a molecular mechanism of recognition between cell surfaces sugars and lectin in phagocytosis of bacteria. Minireview. *Infec. Immun.* 56: 539-547
- 9.-Barondes S.H. (1981) Lectins: Their multiple endogenous cellular functions. *Ann. Rev. Biochem.* 50: 207-231
- 10.-Strocker R. J, Morell A. G. and I. H Schemberg. (1974). Animal Hepatic lectins. *Science* 186: 365-366
- 11.-Lis H and N. Sharon. (1978) Lectins: Their chemistry and application to immunology. In *The Antigens.* Vol. IV Cap. 7. M. Sela Academic Press. pags. 429-459
- 12.-Sharon N. (1984) Surface carbohydrates and surface lectins are recognition determinants in phagocytosis *Immunol Today* 5: 1-5
- 13.-Gallily R, Vray B, Stain Y. and N. Sharon. ( 1984 ). Wheat germ agglutinin potentiate uptake of bacteria by murine peritoneal macrophages. *Immunology* 52: 679-686

- 14.-Barondes S. H. (1988). Soluble lectins: A new class of extracellular proteins. *Science*. 223: 1259-1264
- 15.-Skider. S. E, Kabat E. A, Steer C. J and Ashwell G. (1983). Binding of synthetic oligosaccharides to hepatic Gal/GalNac lectin. Dependence of fine structural features. *J. Biol. Chem* 258: 199-202
- 16.-Shanker P. N, Wilkinson K. D, Goldstein I. (1976). An N-acetylglucosamine binding lectin from *Bandereia simplicifolia* seeds. *Arch. Biochem. Biophys.* 177: 330-333
- 17.-Mákela O, (1957). Studies on Hemagglutinins of leguminosae seeds. *Ann. Med. Exp. Fenn. Suppl.* 11: 1-156
- 18.-Danny J. Schell and Marilyn E. Etzler (1988). cDNA Cloning, primary structure and in vitro biosynthesis of DB58 lectin from *Dolichos biflorus*. *J. Biol. Chem.* 263: 14648-14653.
- 19.-Foirest A, Lebrum E, Van Repenbusch R, De Neve R. and Dony S.A. (1981). The structure of lentil (*Lens culinaris*) lectin amino acid sequence and prediction of secondary structure. *J Biol Chem.* 256: 5550-60.
- 20.-Wei Xin Shi, Zhi Min Shem, Ce Sum and Jen Tsi Yang. (1993). Conformation and activity of *Phaseolus coccineus*. var. *rubronanus* lectin. *J. Prot. Chem.* 12: 153-157
- 21.-Thomas W. Mimb, H. Freddy, Martem J and Reny Lorist. (1996). The Crystallographic structure of phytohemagglutinin-L. *J. Biol. Chem.* 34: 20479-20485.
- 22.-Einspahr H, Parks E, H. Suguna and Suddanth F. (1986). The crystal structure of pea lectin at 3.0 Å resolution. *J. Biol. Chem.* 261: 16518-16527.
- 23.-Rini M. James. (1995) Lectin structure. *Annu. Rev. Biomol. Struc.* 24: 551-577.
- 24.-Gallager J. T. (1984) Carbohydrate binding properties of lectins: a possible approach to lectin nomenclature and classification, *Biosci. Rep.* 4: 621-632.
- 25.-Sharon N. and Halina L (1990) Legume lectins-a large family of homologous proteins. *The FASEB journal.* 4: 3198-3208
- 26.-Weiss I. William and Drickramer Kurt. (1996) Structural basis of the lectin-carbohydrate recognition. *Annu. Rev. Biochem.* 65: 441-473
- 27.-Van den Steen P, Rudd M P, Dwek A R and Opdenaker G. (1998). Concepts and Principles of O-glycosylation. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 33: 151-208.

- 28.-Carraway K. L and Hull S. R. (1991) Cell surface mucin-type glycoprotein and mucin like domains. *Glycobiology*. 1:131-138.
- 29.-Rose M. C, Voter W. A, Sage H, Brown C. F and Kaufman B (1984). Effects of deglycosylation on the architecture of ovine submaxillary glycoprotein *J. Biol. Chem.* 259: 3167-3172.
- 30.-Chapman B. S, Eckart M. R, Kaufman S. E and Lapointe G. R (1996). O-linked oligosaccharide on the 75 kDa neurotrophin receptor *J. Neurochem.*66: 1707-1716.
- 31.-Lai R, Visser L, and Poppema S (1991). Tissue distribution of restricted leucocyte common antigen. A comprehensive study with proteins and carbohydrate-specific CD45R antibodies. *Lab. Invest.* 64: 844-854.
- 32.-Powell L. D and Varki A (1994). The oligosaccharide binding specificities of CD22 beta, a sialic acid-specific lectin of B cells. *J. Biol. Chem.* 269: 10628-10636.
- 33.-Gong X, Dubois D. H, Miller D. J. and Shur B. D. (1995). Activation of a G protein complex by aggregation of beta 1-4galactosyltransferase on the surface of sperm. *Science.* 269: 1718-1721.
- 34.-Nguyen Q. V, Knapp W and Humpreys R. E (1993).Characterization of the invariant chain C-terminus (Glu183-Glu193) epitope which is sylation site at Thr 104 results in generation of a soluble human transferring receptor. *Blood.* 83: 580-586.
- 35.-Willoutby R E (1993).Retroviruses preferentially bind O-linked sialylglycoconjugates and sialomucin . *Glycobiology.* 3: 437-445.
- 36.-Yamashita Y, Chunng Y. S, Horie R, Kanagi R and Sowa M (1995). Alterations in gastric mucin with malignant transformation novel pathway for mucin synthesis *J. Natl. Cancer Inst.* 87: 441-446
- 37.-Peumans W. J and Van Damme E (1995). Lectin as plant defense proteins. *Plant Physiol.* 109: 347-352.
- 38.-Wright H. T, Sandrasegaram G, Wright C. S. (1991). Evolution of a family of N-acetylglucosamine binding proteins containing the disulfide-rich domain of wheat germ agglutinin. *J. Mol. Evol.* 33: 283-94.
- 39.-Peumans W. J and Van Damme E. J. M (1998).Plant lectins: Specific tools for the identification, isolation and characterization of O-linked glycans. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 33: 209-258.

- 40.-Calderon de la Barca A and Vázquez Moreno L. (1988) *Amaranthus cruentus* lectin: Purification, stability and some biochemical properties. *J. Food. Biochem.* 12: 117-126.
- 41.-Rinderle S. J, Goldsteins I. J. and Reseen E. E (1990). Physicochemical properties of Amaranthin, the lectin from *Amaranthus caudatus* seeds. *Biochemistry.* 29: 10555-10561
- 42.-Zenteno E and Ochoa J. L (1988). Isolation and characterization of *Amaranthus leucocarpus* lectin. *Phytochemistry* 27: 313-317.
- 43.-Zenteno E, Lascrain R, Montano L. F, Vazquez L, Debray H, Montreuil J (1992). Specificity of *Amaranthus leucocarpus* lectin. *Glycoconj. J.* 9: 204-208.
- 44.-Krotkiewski H (1988). The Structure of glycophorins of animal erythrocytes. *Glycoconjugate J.* 3: 35-48.
- 45.-Reisner Y, Linker-Israeli M and Sharon N (1976). Separation of mouse thymocytes into two subpopulations by the use of peanut agglutinin. *Cellular Immunol.* 25: 129-134.
- 46.-Wu W, Harley H. H, Punt J. A, Sharrow S. O and Kears K. P (1996). Identification of CD8 as a peanut agglutinin (PNA) receptor molecule on immature thymocytes. *J. Exp. Med.* 184: 759-764.
- 47.-Bradford, M. M (1976). A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein dye-binding. *Anal. Biochem.* 72:248-54.
- 48.-Zanetta, J. P., Timmerman, P. and Leroy, Y (1999). Gas-liquid chromatography of the heptafluorobutrate derivatives of O-methyl-glycosides on capillary columns: a method for the quantitative determination of monosaccharide composition of glycoproteins and glycolipids. *Glycobiology* 9:255-66.
- 49.-Reisner Y, Linker-Israeli M. and Sharon, N (1976). Separation of mouse thymocytes into two subpopulations by the use of peanut agglutinin. *Cellular Immunol.* 25: 129-134.
- 50.-Guevara J, Espinosa B, Zenteno E, Vázquez L, Luna J, Perry G and Mena, R (1998). Altered glycosylation pattern of proteins in Alzheimer disease. *J. Neuropath. Exp. Neurol.* 57:905-914.
- 51.-Hoile D. H, Schwyzer M, Steinman H and Hill R (1976). Ovine mucin. *J. Biol. Chem.* 3799-3804
- 52.-Dziegielewska K. D, Brown W. M, Casey S. J, Christie D. L, Foreman R. C, Hill R. M, Saunders N. R (1990). The complete cDNA and amino acid sequence of bovine fetuin. Its



- homology with alpha 2HS glycoprotein and relation to other members of the cystatin superfamily. *J. Biol. Chem.* 265: 4354-4357
- 53.-Beazinger J and Kornfeld S (1974). Structure of the Carbohydrate units of IgA. *J. Biol. Chem.* 249: 4270-4281.
- 54.-Yarwood A, Richardson M, Sousa-Cavada R. and Rouge P (1985). The complete amino acid sequence of  $\beta_1$  and  $\beta_2$  subunits of isolectins Lol I and Lol II from seeds of *Lothyrus adrus* FEBS. *Let.* 104: 104-109.
- 55.-Lorris R, Steyaert J, Maes D, Liggartem J, Pikarsyll and Wyns L (1993). Crystal structure determination and refinement at 2.3 Å of lentil lectin. *Biochemistry* 32: 8773-8781
- 56.-Banerjee R, Das K, Ravishankar R, Suguna K, Suroliya A and Vijayan M (1996). Conformation, protein-carbohydrate interaction and novel subunit association in the refined structure of Peanut lectin-lactose complex. *J. Mol. Biol.* 259: 281-296.
- 57.-Somerville C, Somerville S (1999). Plant functional genomics. *Science.* 285:380-3.
- 58.-Gygi S, Rochon Y, Franz B and Aebersold R (1999). Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. *Mol. Cell. Biol.* 19: 1720-1730
- 59.-Wilkins M. R, Pasquali C, Appel R. D, Ou K, Golaz O, Sanchez J. C, Yan J. X, Gooley A. A, Hughes G, Humphrey-Smith I, Williams K. L, Hochstrasser D. F (1996). From proteins to proteomes: large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis. *Biotechnology (N Y).* 1:61-5.
- 60.-John R Yates III (1998). Mass spectrometry and age of Proteome. *J. Mass Spectrometry.* 33:1-19
- 61.-Calderon de la Barca A, Ochoa J. L and Valencia M. E (1985). Effect of the extraction of a hemagglutinin on the nutritive value of *Amaranthus leucocarpus* seeds. *J. Food Sci.* 1700-1702.
- 62.-Calderon de la Barca A., Zenteno E, Ochoa J. L, Valencia M. and Carvajal R (1985). The removal of *Amaranthus leucocarpus* lectin does not affect the nutritional value of the seed meal. In *Lectins-Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry.* Börg-Hansen. TC Brebowski J. Eds. Walter de Gruyter. 4:531-536

- 63.-Ortiz R, Sánchez R, Páez A, Montaña L. F and Zenteno E (1992). Induction of intestinal malabsorption syndrome in rats feed with *Agaricus bisporus* lectin. J. Agric. Food. Chem. 40: 1375-1378.
- 64.-Prigent M. J, Bencomo V. V, Sinay P and Cartron P (1984). Interaction of Glycopéptides Carrying cluster of O-glycosidic disaccharide chains ( $\beta$ -D-Gal (1-3)- $\alpha$ -D-GalNAc) with  $\beta$ -D-Galactose binding lectins Glycoconj. J. 1: 73-80
- 65.-Roth J, Taatjes D J, Weinstein J C, Greenwell P and Watkins W (1996) Differential sub-compartmentation of terminal glycosylation in the Golgi apparatus of the intestinal absorptive and goblet cells. J. Biol. Chem. 261:14307-14312.
- 66.-Gillespie W, Paulson J. C, Kelm S, Pang M and Baum L. G (1993). Regulation of  $\alpha$ 2,3-sialyltransferase expression correlates with conversion of peanut agglutinin (PNA)+ to PNA- phenotype in developing thymocytes. J. Biol. Chem. 268: 3801-3804.
- 67.-Lascurain R, Chávez R, Gorocica P, Pérez A, Montaña L. F and Zenteno E (1994). Recognition of CD4<sup>+</sup> mouse medullary thymocyte subpopulation by *Amaranthus leucocarpus* lectin. Immunology 83: 410-413 .
- 68.-Gorocica P, Lascurain R, Hernandez P, Porras F, Bouquelet S, Vazquez L, Zenteno E (1998). Isolation of the receptor for *Amaranthus leucocarpus* lectin from murine peritoneal macrophages. Glycoconj J. 15: 809-1
- 69.-Bronckart Y, Nagy N, Decaestecker C, Bouckaert Y, Rummelink M, Gielen I, Hittlet A, Darro F, Pector J. C, Yeaton P, Danguy A, Kiss R, Salmon I. (1999). Grading dysplasia in colorectal adenomas by means of the quantitative binding pattern determination of *Arachis hypogaea*, *Dolichos biflorus*, *Amaranthus caudatus*, *Maackia amurensis*, and *Sambucus nigra* agglutinins. Hum Pathol. 10: 1178-91.
- 70.-Yu LG, Milton J. D, Fernig D. G, Rhodes J. M (2001). Opposite effects on human colon cancer cell proliferation of two dietary Thomsen-Friedenreich antigen-binding lectins. J Cell Physiol. 2: 282-287.
- 71.-Raina A and Datta A (1992). Molecular cloning of a gene encoding a seed-specific protein with nutritionally balanced amino acid composition from *Amaranthus*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 89: 11774-11778.

- 72.-Transue T. R, Smith A. K, Mo H, Goldstein I. J, Saper M. A (1997). Structure of benzyl T-antigen disaccharide bound to *Amaranthus caudatus* agglutinin. Nat Struct Biol. 10: 779-83.
- 73.-Sharma V and Surolia A. (1997). Analyses of carbohydrate recognition by legume lectins: Size of the combining site loops and their primary specificity. J. Mol. Biol. 267: 433-445
- 74.-Rutenber E, Katzin B. J, Ernst S, Collins E. J, Mlsna D, Ready M. P, Robertus J. D (1991) Crystallographic refinement of ricin to 2.5 Å. Proteins. 10: 240-250
- 75.-Van Damme E. J. M, Kaku H, Perini F, Goldstein U, Peeters B, Yagi F, Decrock B and Peumans W (1993). Biosynthesis, primary structure and molecular cloning of snowdrop (*Galanthus nivalis*) lectin. Eur. J. Biochem. 93: 769-777
- 76.-Sankaranarayanan R, Sekar K, Banerjee R, Sharma V, Surolia A, Vijayan M (1996). A novel mode of carbohydrate recognition in jacalin, a Moraceae plant lectin with a beta-prism fold. Nat Struct Biol. 7: 596-603.
- 77.-Wright S (1997) New folds of the plant lectins. Current Opinon in Struct. Biol. 7: 631-636
- 78.-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.
- 79.-Rinderle S. J, Goldstein I. J, Matta K. L, Ratcliffe R. M. (1989) Isolation and characterization of amaranthin, a lectin present in the seeds of *Amaranthus caudatus*, that recognizes the T- (or cryptic T)-antigen. J Biol Chem. 264: 16123-31.
- 80.-Medeiros A, Bianchi S, Calvete JJ, Balter H, Bay S, Robles A, Cantacuzene D, Nimtz M, Alzari P. M, Osinaga E (2000). Biochemical and functional characterization of the Tn-specific lectin from *Salvia sclarea* seeds. Eur J Biochem. 5: 1434-40.
- 81.-Pepe G, Siri D, Oddon Y, Pavia A. A, Reboul J. P (1991). Conformational analysis of the amino termini (5 residues) of human glycoporphin A<sub>M</sub> and A<sub>N</sub>: differentiation of the structural features of the T<sub>N</sub> and T antigenic determinants in relation to their specificity. Carbohydr Res. 209: 67-81
- 82.-Fukuda M. (1991) Leukosialin, a mayor O-glycan-containing sialoglycoprotein defining leukocyte differentiation and malignancy. Glycobiology 1: 347-356.