



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

# POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Facultad de Estudios Superiores-Zaragoza

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DEL  
RECEPTOR PARA LA LECTINA DE  
*AMARANTHUS LEUCOCARPUS* EN LINFOCITOS  
T DE RATÓN Y HUMANO

# TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**DOCTORA EN CIENCIAS**

P R E S E N T A

M. en C. FLOR DE MARIA ROSANA PORRAS ORTA

DIRECTORES DE TESIS: DR. EDGAR ZENTENO GALINDO  
DR. RAÚL CHÁVEZ SÁNCHEZ

MEXICO, D.F.

OCTUBRE, 2006



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.

## RECONOCIMIENTOS

A los Drs. Edgar Zenteno Galindo, y Raúl Chávez Sánchez por todo su apoyo en la realización de este trabajo.

A los miembros de mi Comité Tutorial:

Dr. Edelmiro Santiago Osorio  
Dr. Luis Felipe Montaña Estrada  
Dr. Ricardo Lascurain Ledesma

Por sus valiosas observaciones durante el progreso de este trabajo que hicieron posible su buen desarrollo.

A los miembros del jurado:

Dra. Patricia Rosas Saucedo  
Dra. Martha Legorreta Herrera  
Dr. Luis Felipe Jiménez García  
Dr. Ricardo Lascurain Ledesma  
Dra. Bertha Fenton Navarro  
Dr. Edelmiro Santiago Osorio

Por la cuidadosa revisión de este manuscrito y sus útiles comentarios que permitieron el mejoramiento de este trabajo.

Al Dr. Salvador Martínez Cairo por el apoyo prestado para la realización de este trabajo.

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Inmunología del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina, UNAM bajo la dirección del Dr. Edgar Zenteno Galindo y el Dr. Raúl Chávez Sánchez.

Este trabajo fue financiado por:

CONACYT No. G38590-B

DGAPA PAPITT-UNAM No. IN230105

Dirección General de Estudios de Posgrado, UNAM.

## AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Edgar Zenteno Galindo, por su amistad y apoyo, y su infinita paciencia para con mis tropiezos. Al Dr. Raúl Chávez Sánchez por su amistad y su ingenio siempre solidario.

A todos los compañeros del Laboratorio de Inmunología del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina, UNAM, y del Laboratorio de Bioquímica del Instituto de Enfermedades Respiratorias por su amistad y apoyo incondicionales: Gisela Martínez, Pedro Hernández, Concepción Agundis, Alí Pereira, Carlos Mata, Blanca Espinosa, Blanca Ortiz, Isabel Sada, Ricardo Lascurain, Patricia Gorocica, María del Carmen Jiménez, Jonathan Garfias, Sra. Rosa Nieto.

A la memoria de mis padres con todo mi cariño, por todo su amor y cuidado.

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

A mi querida familia ampliada: Arturo y Meli con los pequeños Sarai, Adley e Isai; Otto y Gabi con los pequeños Samuel, Isaac y Norita; a David, Gabriela, David Alberto y Bruno, a Mario y mi pequeña ahijada Dessiré.

A la memoria del mejor de todos los tíos, mi tío Carlitos.

A la memoria de mis amados abuelos José y Josefina por todos los apapachos que nos dieron con tanto cariño.

A todos las (los) amigas(os) de la “reunión de biólogos”, a las(os) que me une una duradera y gozosa amistad.

A Sergio, mi compañero de vida, por todo lo que me ha dado y por amarme incondicionalmente, con todo mi amor.

# ÍNDICE

I. ABREVIATURAS	1
II. RESUMEN	2
III. ABSTRACT	4
IV. INTRODUCCIÓN	6
V. HIPÓTESIS	21
VI. OBJETIVOS	21
VII. ARTÍCULO: Isolation of the receptor for <i>Amaranthus leucocarpus</i> from murine naive thymocytes.	22
VIII. ARTÍCULO: Isolation of the receptor for the <i>Amaranthus leucocarpus</i> lectin from human T lymphocytes	36
IX. DISCUSIÓN GENERAL	50
X. CONCLUSIONES	59
XI. PERSPECTIVAS	59
XII. BIBLIOGRAFÍA	60

## ABREVIATURAS

ALL	Lectina de <i>Amaranthus leucocarpus</i>
ALLr	Receptor de ALL
ALLTr	Receptor de ALL en timocitos murinos
C1GalT	Núcleo 1 $\beta$ 1,3-galactosil-transferasa
C2GnT	Núcleo 2 $\beta$ 1,6-glucosaminil-transferasa
Gal	Galactosa
GalNAc	N-acetil-galactosamina
GlcNAc	N-acetil-glucosamina
NeuAc	Ácido siálico
ST3Gal	$\alpha$ 2,3 sialil-transferasa
ST6Gal	$\alpha$ 2,6 sialil-transferasa
ST6GalNAc	$\alpha$ 2,6 sialil-transferasa

## RESUMEN

La lectina de *Amaranthus leucocarpus* (ALL) es específica para GalNAc en los O-glicanos Gal $\beta$ 1,3GalNAc $\alpha$ 1-O-Ser/Thr y GalNAc $\alpha$ 1-O-Ser/Thr. En este trabajo se utilizó ALL para la purificación y caracterización de una O-glicoproteína de los timocitos de ratón y linfocitos T humanos. El receptor para ALL de los timocitos de ratón se purificó utilizando la lectina unida a biotina y agarosa-avidina como matriz de afinidad. La mayoría de los timocitos que reconoció por la lectina, ALL<sup>+</sup>, (83%) fueron células vírgenes con un fenotipo CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>CD45RB<sup>+</sup>. La lectina reconoce una glicoproteína de 70 kDa que contiene un 20% de azúcares por peso. Está constituida principalmente por aspártico, glutámico, serina, prolina y glicina; su porción sacarídica contiene principalmente O-glicanos con residuos galactosa, GalNAc y NeuAc así como manosa y GlcNAc. La cromatografía por intercambio iónico reveló que el receptor para ALL (ALLTr) está constituido por tres isoformas, las cuales poseen una composición similar de aminoácidos pero muestran diferencias en su composición de azúcares. El amino terminal de las tres isoformas que constituyen el receptor está bloqueado. El análisis de los péptidos trípticos del receptor por MALDI-TOF comparados con los valores relativos obtenidos de la base de datos del NCBI (Swiss-Prot 10/01/99) indica que ALLTr muestra un grado de identidad del 17% con la proteína humana KIAA, con un dominio de muerte asociado a Fas, y con el receptor tipo II de TGF $\beta$ .

En los linfocitos T humanos la glicoproteína que reconoce ALL, purificada por cromatografía de afinidad es una glicoproteína de 70 kDa, está constituida principalmente por serina, glicina y ácido glutámico; su porción sacarídica contiene principalmente GalNAc, galactosa ácido siálico, manosa y GlcNAc en menor proporción. Identificamos cuatro isoformas del receptor para amaranto por cromatografía de intercambio iónico y por electroforesis de doble dimensión. El amino terminal del receptor está bloqueado, así que los péptidos trípticos del receptor para ALL se analizaron por MALDI-TOF y sus valores se compararon con los valores relativos obtenidos de la base de datos NCBI (ProFound 2004/06/01). Nuestros resultados indican que los péptidos obtenidos poseen un 54% de identidad con la chaperona DnaK, 47% con la proteína humana KIAA y 44% con una proteína de choque térmico. El fenotipo



más frecuente de los linfocitos T ALL<sup>+</sup> fue CD45RA<sup>+</sup> CD27<sup>+</sup>; 26% de los linfocitos T ALL<sup>+</sup> fue CD25<sup>+</sup> y 13% CD69<sup>+</sup>, indicando que la glicoproteína reconocida por ALL podría ser considerada un marcador fenotípico nuevo para células T vírgenes.

## ABSTRACT

*Amaranthus leucocarpus* lectin (ALL) is specific for GalNAc in Gal( $\beta$ 1),3GalNAc( $\alpha$ )1-O-Ser/Thr y GalNAc( $\alpha$ )1-O-Ser/Thr O-glycans. ALL recognizes murine medullary thymocytes and human T cells. We purified the receptor for ALL using a complex with biotin-labeled lectin and avidin-agarose as affinity matrix. Most ALL<sup>+</sup> thymocytes (83%) are naive cells with the CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>CD45RB<sup>+</sup> phenotype. Receptor for this lectin is a 70 kDa glycoprotein that contained 20% of sugar. 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. Ionic strength chromatography revealed that ALL-thymocyte receptor (ALLTr) is made up by three isoforms, with similar amino acid composition and slight differences in sugar composition. The N-terminal amino acid is blocked; however analyses of the receptor's tryptic peptides by MALDI-TOF that were compared with the relative values obtained from NCBI database indicated that ALLTr shows identity <17% with the human KIIA protein, the Fas-associated death domain protein, and with the transforming factor growth factor- $\beta$  type II receptor. The most frequent phenotype of the CD4 or CD8 ALL<sup>+</sup> human T cells was CD45RA<sup>+</sup> CD27<sup>+</sup>; 26% were CD25<sup>+</sup> and 13% were CD69<sup>+</sup>. The receptor for ALL purified from human T cells showed that, as for murine receptor, is a 70 kDa glycoprotein, constituted mainly by serine, glycine, and glutamic acid; its glycosidic portion contained mainly GalNAc; galactose, sialic acid, mannose. By ionic strength chromatography, as well as double dimension electrophoresis we identified four ALL-receptor isoforms. N-terminal amino acid is blocked both in the ALL-receptor and its isoforms; therefore tryptic peptides of ALL-receptor analyzed

through MALDI-TOF indicated that peptides obtained showed 54% homology with a DnaK-core molecular chaperone, 47% with human KIAA protein, and 44% with heat shock protein 8. Our results indicating that the glycoprotein recognized by ALL in murine as well as in human T cells is present mainly on naïve or quiescent T cells and could be considered a new phenotype marker.

## **INTRODUCCIÓN**

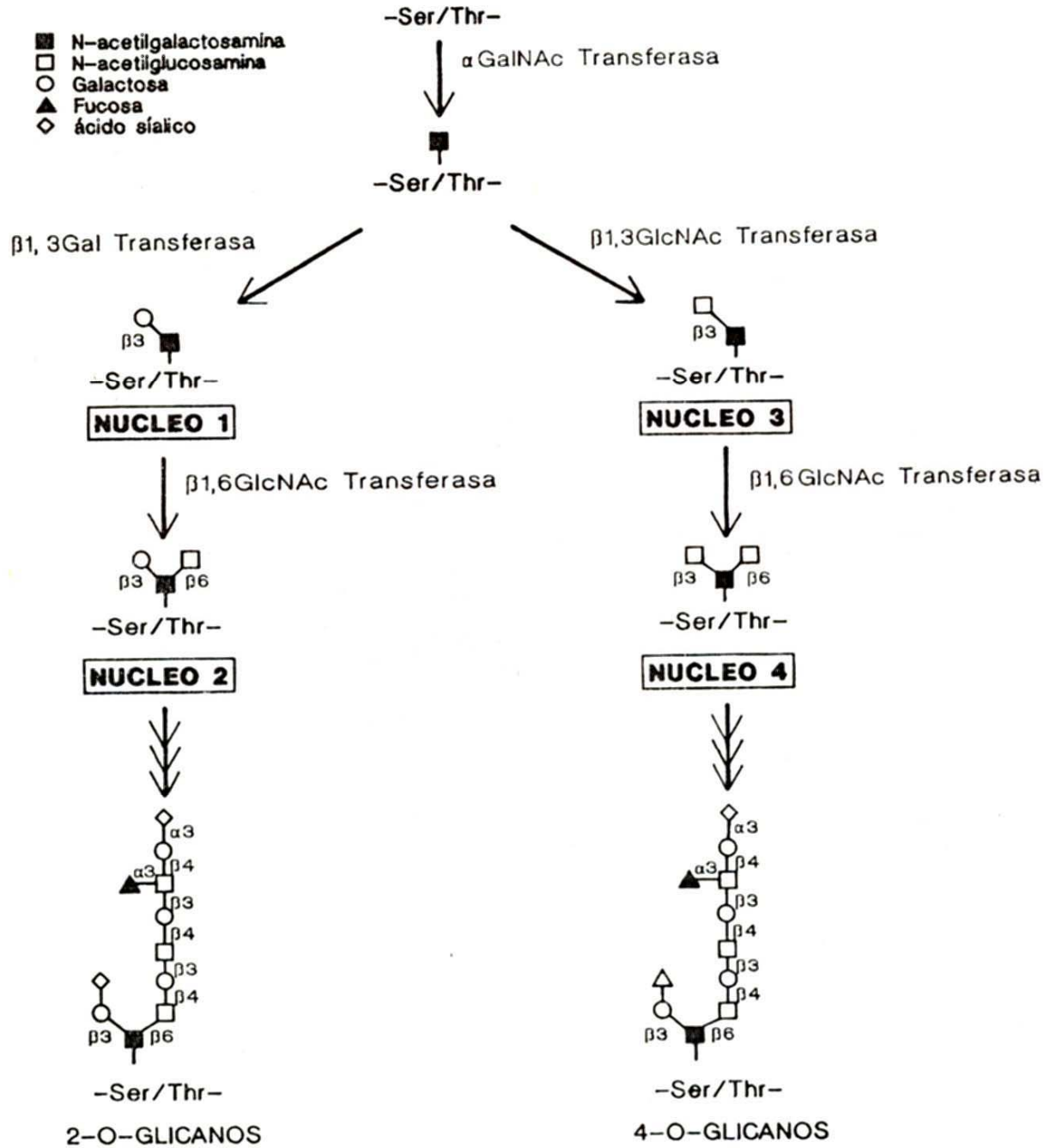
### **Presencia de estructuras O-glicosídicas en proteínas de membrana**

La glicosilación de las proteínas es una de las modificaciones postraduccionales que más se ha estudiado recientemente. En el caso de las glicoproteínas, frecuentemente el tamaño ocupado por el oligosacárido es tan largo como la proteína a la cual está unido (Van den Steen, 1998). Se ha observado que la presencia de azúcares en las proteínas influye en fenómenos tan diversos como el plegamiento correcto, el tránsito a través de los diferentes compartimientos subcelulares, su expresión a nivel de membrana citoplasmática, así como el reconocimiento intercelular. Las glicoproteínas son biopolímeros que contienen una o más cadenas de carbohidratos unidas al polipéptido. Dos de las principales modificaciones pos-traduccionales de las proteínas que involucran azúcares son la N-glicosilación, que es la transferencia de una N-acetil-D-glucosamina (GlcNAc) a un residuo de asparagina y la O-glicosilación, que es la unión de una N-acetil-D-galactosamina (GalNAc) a una serina o una treonina de la cadena peptídica (Figura A); las glicosiltransferasas encargadas de estos enlaces están presentes en retículo endoplásmico y aparato de Golgi respectivamente. En el caso de la O-glicosilación, los estudios hasta ahora realizados indican que es necesaria una glicosil-transferasa para la síntesis de cada enlace diferente, y se han encontrado determinados enlaces que son hechos por más de una glicosil-transferasa. Muchas glicoproteínas presentan N- y O-glicanos sobre la misma cadena polipeptídica (Schachter y Brockhausen, 1992).

**Figura A. Unión de oligosacáridos a proteínas.** En la unión N-glicosídica la GlcNAc se une a un residuo de asparagina que se encuentra en una secuencia Asp-X-Ser/Thr de la cadena peptídica. En la unión O-glicosídica la GalNAc se une a un residuo de serina o treonina del péptido

La presencia de O-glicanos en glicoproteínas se debe a una modificación postraduccional de los grupos hidroxilo en los residuos de serina y treonina por la acción de la polipeptidil N-acetil-galactosaminil-transferasa, e incluye cuatro subtipos de O-glicanos cuya estructura se basa en las reacciones de unión de monosacáridos a una GalNAc no substituida (GalNAc $\alpha$ -Ser/Thr) (Figura B). La mayoría de los O-glicanos contiene la estructura núcleo 1, que está formada por la adición de una galactosa en una unión  $\beta$ 1-3 a la GalNAc; la glicosil-transferasa responsable se conoce como la núcleo 1  $\beta$ 1-3 galactosil-transferasa (Core1 GalT). Con base en las actividades enzimáticas, existen por lo menos tres y probablemente más de seis núcleo 1 galactosil-transferasas expresándose de forma diferente en distintos tejidos y tipos celulares. A diferencia de la N-glicosilación no se ha encontrado una secuencia consenso a la cual se una esta enzima; en esfuerzos para definir una secuencia que dirija la formación de los O-glicanos se han comparado secuencias de aminoácidos que rodean los sitios O-glicosilados y, aunque no ha surgido dicha secuencia se conocen ciertos residuos de aminoácidos que se asocian con la O-glicosilación (Varki, 1999). La preponderancia de residuos de prolina adyacentes se ha relacionado con los sitios de O-glicosilación, de forma particular en las posiciones -1 y +3; los aminoácidos cargados no son favorables en las posiciones -1 y +3. De forma frecuente la alanina, la serina y la treonina se encuentran adyacentes al residuo glicosilado. Los O-glicanos tipo núcleo 2 se generan al añadir una GlcNAc a la GalNAc en una unión  $\beta$ 1-6. La producción de los O-glicanos núcleo 2 requieren la estructura núcleo 1 como sustrato y la núcleo 2  $\beta$ 1-6 N-acetil glucosaminil-transferasa (Core 2 GlcNAcT ó C2GnT). Los O-glicanos núcleo 2 pueden llegar a alargarse de una forma

mono o biantenaria con la presencia de lactosaminas múltiples (Gal $\beta$ 1-4GlcNAc) y uniones terminales de fucosa y/o ácido siálico, produciendo de esta manera la estructura ramificada núcleo 2 ó 2-O-glicanos (Figura B). En las células mieloides, los O-glicanos núcleo 2 funcionan como estructuras para la producción de ligandos de selectina que actúan en la regulación de la inflamación (Ellies *et al.*, 1998). Los núcleos 3 y 4 se forman al añadir una GlcNAc en unión  $\beta$ 1-3 y  $\beta$ 1-6, respectivamente a GalNAc $\alpha$ -Ser/Thr. A partir de la formación del núcleo 4 se pueden formar también O-glicanos de tipo biantenario. Pocos tejidos muestran niveles altos de las glicosil-transferasas que producen estos dos núcleos (Core 3 GlcNAc transferasa y de Core 4 GlcNAc transferasa); exceptuando el intestino, un sitio donde la producción de mucina es alto. Muchos O-glicanos se extienden en largas cadenas con terminaciones variables, que pueden ser similares a las terminaciones de los N-glicanos. Sin embargo, los O-glicanos son menos ramificados que la mayoría de los N-glicanos y comúnmente son estructuras biantenarias. La O-glicosilación puede resultar en la formación de moléculas de mucina, que son la base de la formación del moco. No obstante, no todos los O-glicanos se encuentran en las mucinas clásicas, algunas cadenas oligosacáridicas también tienden a expresarse en grupo sobre tramos cortos de la cadena peptídica formando proteínas tipo mucina, las cuales pueden presentar determinantes antigénicos o funcionales sacarídicos múltiples para el reconocimiento por anticuerpos, la adhesión celular y la unión de microorganismos (Hounsell *et al.*, 1996); algunas proteínas contienen pocos O-glicanos esparcidos sobre su estructura peptídica que pueden ser cadenas cortas con pocos residuos, o bien estructuras largas biantenarias (Varki, 1999).



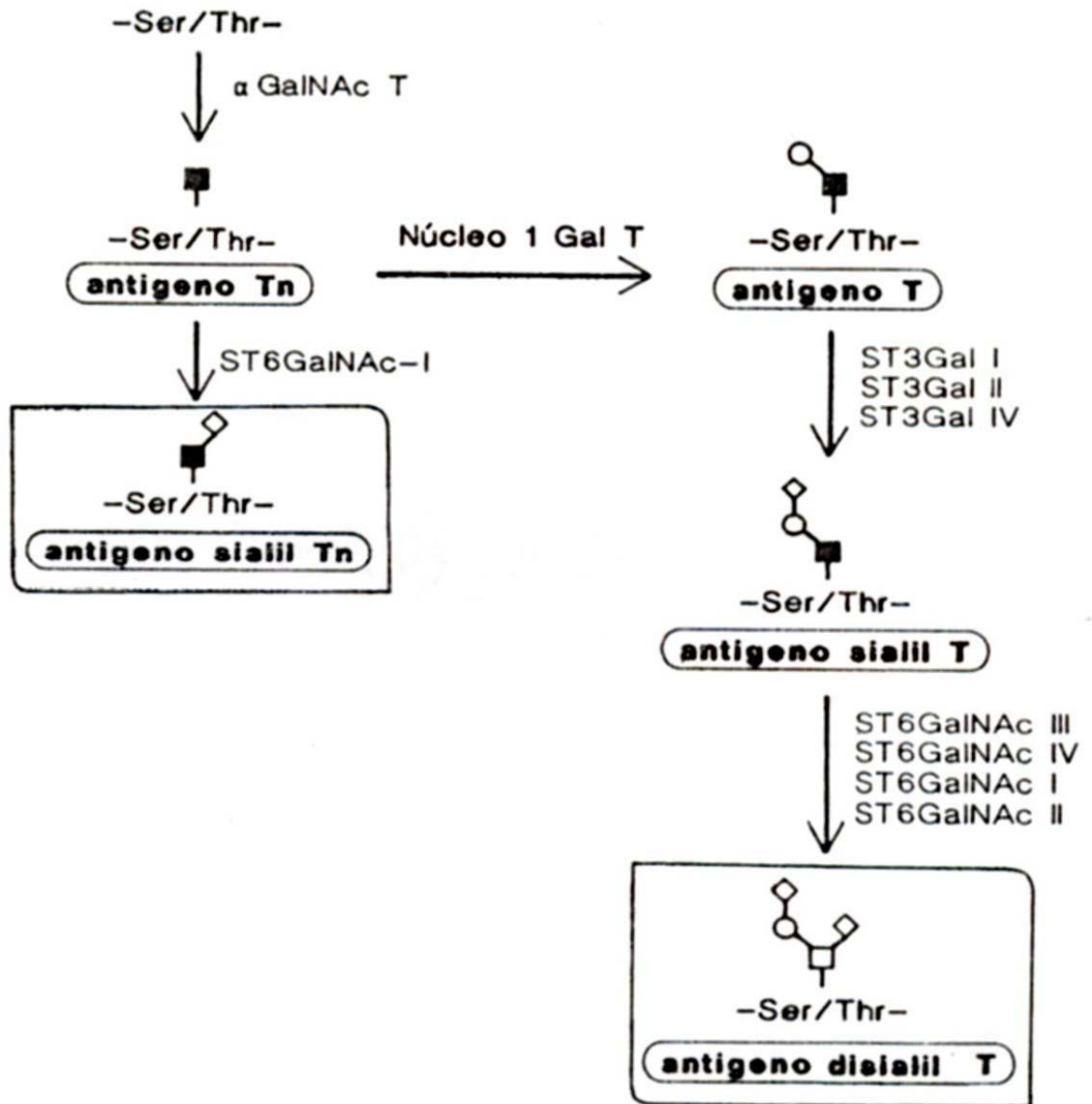
**Figura B. Biosíntesis de estructuras O-glicosídicas.** Se presentan los núcleos que representan la mayoría de este tipo de estructuras producidas *in vivo*, aunque se han reportado otros tipos diferentes de núcleos.



La biosíntesis de los O-glicanos se puede terminar prematuramente con la adición de residuos de ácido siálico. Por ejemplo, ciertas sialil-transferasas son capaces de actuar sobre la GalNAc $\alpha$ -Ser/Thr, (ST6GalNAc-I), produciendo el antígeno sialil Tn, o después de la acción de la Core 1 GalT, produciendo el antígeno sialil T (ST3Gal-I, II y IV) y disialil T (ST6Gal-I, II, III y IV) (Figura C).

Estas estructuras O-glicosídicas generalmente restringen los pasos posteriores de la biosíntesis y frecuentemente se relacionan con antígenos asociados a tumores (Varki, 1999). En cáncer de seno, por ejemplo, se ha observado que la ST3Gal-I se incrementa de forma consistente, mientras que la C2GnT1 está expresada en baja proporción o está ausente en el 50% de este tipo de cáncer (Dalziel *et al.*, 2001). El análisis de los O-glicanos unidos a la mucina MUC1, producidos por un seno lactante normal y por líneas celulares de seno ha mostrado que los oligosacáridos añadidos a la mucina normal son estructuras basadas en núcleo 2 (Harnisch *et al.*, 1989), mientras que en las mucinas asociadas a cáncer, dominan las estructuras más cortas basadas en el núcleo 1 (Lloyd *et al.*, 1996; Dalziel *et al.*, 2001)

Se ha observado que las estructuras sialil Tn y sialil T se expresan en células menos diferenciadas en estadios tempranos del desarrollo, y que se suprime su expresión conforme progresa el crecimiento y la diferenciación (Fukuda, 1985; Feizi, 1985; Saitoh, *et al.*, 1991). Desde el punto de vista estructural, se ha visto que las proteínas que con dominios tipo mucina, que están profusamente O-glicosilados, adoptan cierta conformación y rigidez, lo cual permite a los sitios activos de la proteína sobresalir del glicocáliz (Jentoft, 1990) como es el caso del co-receptor CD8 (Leahy *et al.*, 1992) o las



**Figura C. Existen vías alternativas tempranas en la biosíntesis de los O-glicanos que llevan a la formación de antígenos asociados a tumores. Las sialiltransferasas pueden actuar para producir los antígenos Tn, T, sialil Tn y disialil T. Estos antígenos parecen ser los extremos finales, que no se pueden modificar ALL-receptor por otras glicosiltransferasas.**

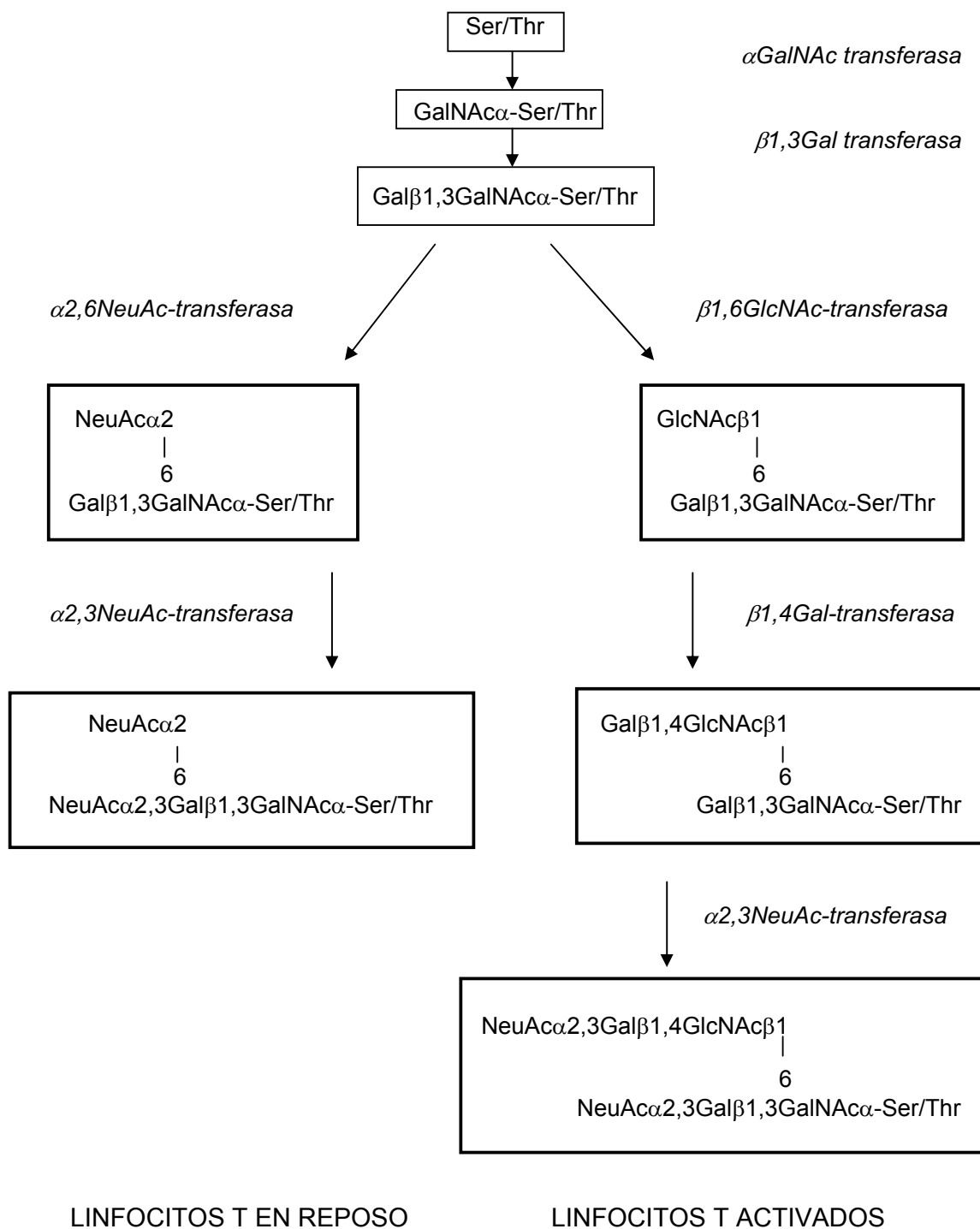
glicoproteínas de superficie CD34, CD45, CD43, GlycCAM-1 y MadCAM-1 (Shimizu y Shaw, 1993).

## **O-glicanos de linfocitos T**

La mayoría de los O-glicanos expresados en la superficie de los leucocitos forman la estructura núcleo 2. La aparición de los 2-O-glicanos se relaciona con los procesos de maduración y activación de los linfocitos T. Durante el proceso de maduración de los linfocitos T ocurren cambios en el patrón de O-glicosilación de las moléculas de superficie, entre los que se encuentra una alteración en la síntesis de los 2-O-glicanos, que está restringida a los timocitos corticales inmaduros y su expresión se detecta escasamente en timocitos medulares maduros (Baum *et al.*, 1995; Álvarez *et al.*, 2006). La regulación negativa de la síntesis de 2-O-glicanos en timocitos al parecer es esencial para el proceso de apoptosis durante el desarrollo de los linfocitos T (Perillo *et al.*, 1995). Mientras que los 2-O-glicanos dejan de expresarse por los timocitos en médula, ocurre un incremento en la expresión de la sialil-transferasa ST3Gal-I en la médula tímica, que es la enzima que une un ácido siálico a la galactosa de la estructura núcleo 1 en un enlace  $\alpha 2,3$  (Gillespie *et al.*, 1993; Kono *et al.*, 1997).

La leucosialina, sialoforina o CD43 es una de las glicoproteínas que se expresan más ampliamente en células pertenecientes al sistema inmune y donde se ha observado el papel que podrían jugar los O-glicanos en la comunicación celular. El peso molecular de esta proteína varía en el intervalo de 95-135 kDa debido a diferencias en su glicosilación (Fukuda, 1991). Esta proteína está densamente glicosilada principalmente por O-

glicanos y una porción de éstos está unida a un dominio con repeticiones en serie en la cadena polipeptídica. La ramificación de los O-glicanos que se encuentran en la leucosialina puede variar de acuerdo al estado metabólico de la célula, su maduración y en algunos estados patológicos como la leucemia y síndromes de inmunodeficiencia como el Wiskott-Aldrich. El hexasacárido NeuAc $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-3(NeuAc $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1-6)GalNAc se expresa en linfocitos T activados (Piller *et al.*, 1988), en timocitos corticales (Baum *et al.*, 1995), y en linfocitos T de pacientes que padecen leucemia aguda (Saitoh *et al.*, 1991) o síndromes como el de Wiskott-Aldrich (Piller *et al.*, 1991) o el SIDA (Lefebvre, 1994); pero, aparentemente no está presente en linfocitos T en reposo, ni en timocitos medulares, en donde solo se ha identificado al tetrasacárido NeuAc $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-3(NeuAc $\alpha$ 2-6)GalNAc que corresponde al núcleo 1 sialilado (Figura D). La glicoforma del CD43 que expresa la estructura 2-O-glicano presenta un peso molecular de 130 kDa y la que expresa la estructura núcleo 1 presenta el peso molecular de 115 kDa, siendo esta diferencia en peso debida a las variaciones en el contenido de los oligosacáridos de CD43 y no a variaciones en su estructura proteica. Se ha observado que en los linfocitos T CD8<sup>+</sup> efectores específicos a antígeno de ratones donde no se expresa CD43 (CD43<sup>-/-</sup>) existe una ausencia completa de O-glicanos tipo núcleo 2 reconocidos por el anticuerpo 1B11, que es el que se une a la glicoforma de CD43 de mayor peso molecular (130 kDa) y que está asociada a la activación. Además los 2-O-glicanos parecen tener baja expresión sobre linfocitos T CD8<sup>+</sup> vírgenes y reducir ésta de nuevo en células de memoria antígeno específicas, después del período de activación (Onami *et al.*, 2002).



**Figura D. Esquema que representa las modificaciones en la estructura oligosacáridica de la leucosialina (CD43).** La biosíntesis de los diferentes O-glicanos se lleva a cabo en distintos estados fisiológicos del linfocito T. Los linfocitos T en reposo muestran la forma simple tetrasacárida o antígeno disialil T, y una vez que se han activado expresan la estructura ramificada hexasacárida núcleo tipo 2, llamada estructura 2-O-glicano.

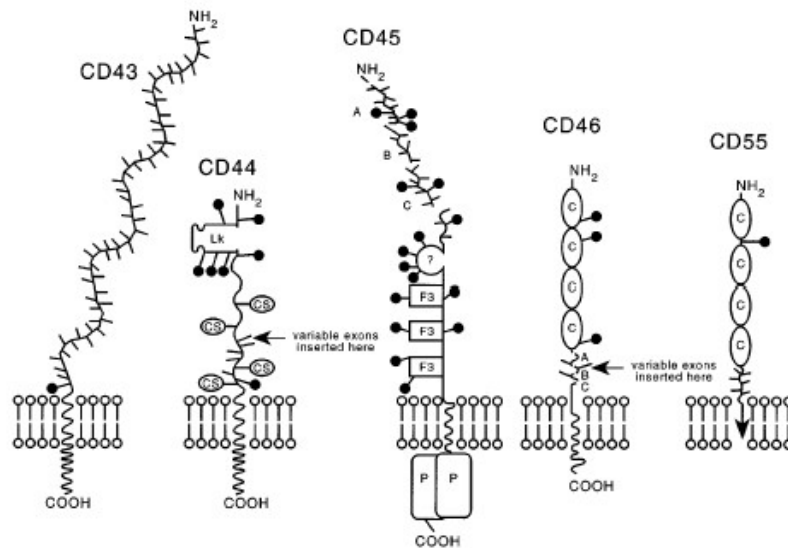
Otra de las glicoproteínas O-glicosiladas donde se observa la importancia de este tipo de oligosacáridos es el marcador CD45 o antígeno común de los leucocitos (L-CA). Se trata de una familia de glicoproteínas de superficie con pesos moleculares que van de 180 a 220 kDa y poseen actividad de fosfatasa en su dominio citoplásmico; la diversidad de esta familia está dada por el empalme alternativo de 3 exones que codifican para una porción del dominio extracelular, y para una variedad de patrones de glicosilación específicos para cada tipo celular (Thomas, 1989; Pulido y Sánchez-Madrid, 1990). Son precisamente los exones que codifican para los múltiples sitios potenciales para la O-glicosilación los que se expresan de manera diferencial en las subpoblaciones de linfocitos como resultado de un empalme alternativo (Johnson *et al.*, 1989), por lo cual se piensa que estas estructuras O-glicosiladas son importantes desde el punto de vista funcional ya que pueden modular las interacciones que llevan a cabo las células que contienen las diferentes isoformas de esta proteína. Los linfocitos T vírgenes expresan de forma predominante la isoforma más grande, CD45RA y de 3-5 días después de activados presentan la isoforma más corta CD45R0; los linfocitos T de memoria expresan en mayor cantidad la isoforma CD45R0. De esta manera se le ha tomado como un marcador de virginidad y de memoria de acuerdo a la isoforma que se presente sobre los linfocitos T.

Diversas glicoproteínas que tienen un papel importante en los mecanismos de activación celular durante la respuesta inmune también se encuentran O-glicosiladas, como es el caso del co-receptor CD8. En reportes recientes se ha sugerido que el estado de sialilación de los O-glicanos de núcleo 1 del CD8 durante la maduración de los timocitos regula su función, ya

que el CD8 que se expresa sobre los timocitos inmaduros (con bajo nivel de sialilación), se une de forma más eficiente a las moléculas de MHC clase I, con respecto al CD8 expresado sobre las células maduras (con mayor nivel de sialilación) (Moody *et al.*, 2001; Daniels *et al.*, 2001; Moody *et al.*, 2003). Existen otras glicoproteínas que se encuentran O-glicosiladas (Figura E), como son CD44, que se encuentra en la superficie de la mayor parte de los tipos celulares y que en el sistema inmunológico media la adhesión y dirección de los leucocitos hacia órganos linfoides periféricos y sitios de inflamación (Mackay *et al.*, 1993), CD46 o proteína cofactor de membrana que actúa como regulador de la activación inadecuada del complemento y su depósito sobre la membrana citoplásmica, CD55 o factor acelerador del decaimiento que es otra proteína reguladora del complemento, CD7 una glicoproteína a la que se le adjudican funciones potencialmente inmunomoduladoras (Sempowski *et al.*, 1999).

### **Uso de las lectinas en el análisis de glicoproteínas**

Las lectinas se utilizan ampliamente como herramientas en la tipificación de bacterias y grupos sanguíneos (Nesser *et al.*, 1986, Barondes *et al.*, 1981), en la separación de subpoblaciones celulares (Shanker *et al.*, 1976), en la purificación de macromoléculas que contienen carbohidratos, etc.; esto se debe a que unen de manera específica estructuras sacarídicas, que exhiben una configuración y estructura determinada. La baja afinidad que presentan las lectinas por las glicoproteínas no influye en su especificidad, pues la especificidad de unión de las lectinas a su ligando es comparable con la que presentan los anticuerpos (Lis y Sharon, 1986, Peakock *et al.*, 1990). Además,



**Figura E. O-glicosilación en moléculas CD prototipo unidas a membrana.** Leucosialina o sialoforina (CD43), el receptor de residencia leucocitaria (CD44), el antígeno común del leucocito (CD45), proteína cofactor de membrana (CD46), factor acelerador de decaimiento (CD55). Se comparan estas proteínas en términos de su estructura modular de dominios, de los sitios N-glicosilados (indicados por una línea y un punto) y los sitios ricos en Ser/Thr O-glicosilados (indicados por una línea). F3 dominio de fibronectina tipo III, CS condroitín sulfato, C proteína control del complemento (llamada también SCR, short consensus repeat), P fosfatasa de tirosina (PTPasa), LK dominio de unión. Tomado de Van den Steen *et al.*, 1998.



al ser específicas para azúcares permite que se puedan ser utilizar para el estudio de carbohidratos de superficie celular y para la identificación y aislamiento de subpoblaciones celulares (Hellstrom *et al.*, 1984; Reisner y Sharon, 1984).

La lectina de amaranto (ALL) es una glicoproteína aislada de la semilla de *Amaranthus leucocarpus* y reconoce de forma específica las estructuras O-glicosídicas núcleo 1 (Gal $\beta$ 1,3GalNAc $\alpha$ -Ser/Thr, antígeno T) (Zenteno *et al.*, 1992, Zenteno *et al.*, 1988) y GalNAc $\alpha$ -Ser/Thr, antígeno Tn, (Hernández *et al.*, 1999). ALL presenta un reconocimiento diferencial por glicoproteínas con distinto grado de O-glicosilación, por ejemplo reconoce mucho mejor a la fetuína que posee tres O-glicanos en su porción carboxilo terminal y a la glicoforina que contiene 13 O-glicanos, en comparación a las mucinas submaxilar ovina y bovina altamente O-glicosiladas, lo cual sugiere que ALL requiere una cierta distancia entre los enlaces O-glicosídicos y/o una organización tridimensional de ellos para poder interactuar con estas glicoproteínas (Hernández *et al.*, 2004). ALL aglutina de forma preferente a los eritrocitos con el fenotipo M, presenta una actividad mitogénica baja en los linfocitos T humanos (Lascurain *et al.*, 1997), no reconoce a los linfocitos B e induce supresión en los ratones (Zenteno *et al.*, 1985). En estudios anteriores se ha observado que el patrón de unión a ALL de los linfocitos T murinos CD8<sup>+</sup> en reposo y activados está de acuerdo con los observado para los receptores de residencia (“homing”) (Ortiz *et al.*, 2002).

Debido a la gran especificidad que presenta la lectina de amaranto por estructuras O-glicosídicas y al papel preponderante que poseen los O-glicanos presentes en la superficie celular de los linfocitos T en fenómenos tales como el

reconocimiento, la adhesión y la activación celular; y por lo tanto en la respuesta inmunológica, nosotros nos propusimos aislar y caracterizar la glicoproteína reconocida por la lectina de amaranto en dos especies, ratón y humano.

## **HIPÓTESIS**

Las estructuras O-glicosídicas reconocidas por la lectina de *Amaranthus leucocarpus* están presentes en linfocitos vírgenes o en los primeros estados de activación.

## **OBJETIVO GENERAL**

§ Aislar y caracterizar químicamente el receptor de la lectina de *Amaranthus leucocarpus* en timocitos murinos y linfocitos T humanos.

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

§ Caracterizar el fenotipo de la subpoblación celular que reconoce la lectina de *Amaranthus leucocarpus* en timocitos murinos y en linfocitos T humanos.

§ Analizar la relevancia de la O-glicosilación en timocitos murinos y linfocitos T humanos.

§ Analizar la relevancia funcional de las estructuras O-glicosídicas reconocidas por la lectina de *Amaranthus leucocarpus* presentes en timocitos murinos y linfocitos T humanos.

§ Determinar la utilidad de la lectina de *Amaranthus leucocarpus* en el estudio de las estructuras O-glicosiladas en timocitos murinos y linfocitos T humanos.

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

## **INTRODUCCIÓN**

Las células nucleadas derivadas de la médula ósea poseen en su membrana glicoproteínas O-glicosiladas. Estas O-glicoproteínas o glicoproteínas tipo mucina tienen diferentes tamaños y grados de glicosilación, dependiendo del tipo celular y su estado de activación y de maduración. En trabajos anteriores se ha observado que las estructuras tipo mucina son específicas para cada linaje celular y para diferentes estados de diferenciación dentro de un linaje determinado (Fukuda, 1992, Muroi *et al.*, 1997). Por estas razones, es de particular interés identificar herramientas específicas para el estudio del papel que juegan las estructuras O-glicosídicas en la fisiología de la célula.

Las lectinas son excelentes herramientas para la caracterización de los oligosacáridos, así como para la separación de poblaciones celulares. Las lectinas que muestran una especificidad por los O-glicanos se han utilizado ampliamente para la separación de subpoblaciones de timocitos y linfocitos. Es posible purificar timocitos corticales inmaduros por aglutinación selectiva con la lectina de cacahuete (*Arachis hypogea*) (Reisner *et al.*, 1976a). Con el mismo procedimiento es posible separar a los esplenocitos T y B utilizando la lectina de *Glycine max* (Reisner *et al.*, 1976b). La lectina de *Helix pomatia* se puede emplear en la identificación y separación de los linfocitos T (De Petris y Stackacs 1983), y la aglutinina de *Vicia villosa* reconoce de manera específica los linfocitos con fenotipo CD8<sup>+</sup> (citotóxicos) (Fortune y Lehner 1988). También

se han utilizado otras lectinas, como la proveniente del germen de trigo, específica para GlcNAc, en la purificación de linfocitos B. (De Dios *et al.*, 1986). Una separación secuencial de los linfocitos por las lectinas de soya y de cacahuate produce una fracción enriquecida de células madre pluripotenciales, desprovistas de actividad injerto contra huésped, las cuales han sido transplantadas de manera exitosa a pacientes con inmunodeficiencias severas (Reisner 1983). Además, algunas de estas lectinas se usan actualmente para evaluar el estado inmunológico de pacientes (Sharon, 1983). En trabajos previos, nosotros hemos demostrado que la lectina de *Amaranthus leucocarpus* (ALL) posee la capacidad para interactuar con timocitos medulares murinos (Lascurain *et al.*, 1994), macrófagos peritoneales sin activar (Gorocica *et al.*, 1998; Maldonado *et al.*, 1998), y linfocitos T vírgenes (Lascurain *et al.*, 1997). La lectina de amaranto es una glicoproteína de 35 kDa específica para los antígenos T y Tn (Gal $\beta$ 1,3GalNAc $\alpha$ 1-O-Ser/Thr y GalNAc $\alpha$ 1-O-Ser/Thr, respectivamente) (Zenteno *et al.*, 1992). Esta lectina aglutina de forma preferente a los eritrocitos con el fenotipo M, no reconoce a los linfocitos B, muestra una actividad mitogénica baja en los linfocitos humanos (Lascurain *et al.*, 1997) e induce supresión en ratones (Zenteno *et al.*, 1985; Porras 1992). No obstante que se ha descrito que todas las células reconocidas por ALL comparten la característica de ser células vírgenes o en reposo (Lascurain *et al.*, 1997; Gorocica *et al.*, 1998), hasta el momento no se ha dilucidado el papel específico de este subgrupo de linfocitos. Este trabajo aporta información sobre las características moleculares del receptor para ALL de los timocitos medulares murinos.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La separación de la subpoblación de timocitos de ratón, reconocidos por la lectina de amaranto (ALL<sup>+</sup>) se realizó colocando las células incubadas con ALL sobre 5 ml de una solución de albúmina sérica bovina al 7% y recuperando las células aglutinadas (ALL<sup>+</sup>). Después de incubar estas células con GalNAc 0.2 M se cuantificaron en un hemocitómetro. Los resultados mostraron que la lectina de amaranto (ALL) aglutinó un 5% ( $\pm 0.3$ ) del total de células de timo murino. El estudio del fenotipo de los timocitos reconocidos por la lectina se llevo a cabo mediante el análisis de citometría de flujo con el método de doble tinción con anticuerpos monoclonales. El análisis mostró que las células reconocidas por la lectina de amaranto presentaron principalmente un fenotipo maduro (Fig. 1a), CD2<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> (83.4%) y CD2<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> (0.4%); la lectina también reconoció a los timocitos dobles positivos y dobles negativos CD2<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> (14.8%) y CD2<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> (1.3%). Casi el 90% de las células ALL<sup>+</sup> presentaron un fenotipo CD45RB<sup>+</sup> (Fig. 1b), el cual se identifica como un marcador de células vírgenes; estos resultados indican que la lectina de amaranto reconoce una subpoblación de timocitos murinos cuyo fenotipo corresponde principalmente a células en sus últimas etapas de maduración, que no se han activado y que podrían estar destinadas a salir a poblar los tejidos linfoides periféricos (Sprent, 1989), lo anterior corresponde con datos obtenidos con anterioridad en donde se muestra que la lectina reconoce timocitos medulares en ratón (Lascurain *et al.*, 1994).

Debido a que la lectina de amaranto reconoce estructuras O-glicosídicas y para avanzar en el conocimiento del papel que pueden jugar estas

estructuras en la fisiología de los timocitos, nos propusimos aislar el receptor al que se une esta lectina y caracterizarlo.

El receptor para la lectina de amaranto se purificó a partir de la proteína obtenida de la lisis de  $\sim 10^8$  timocitos murinos, por cromatografía de afinidad indirecta. Se utilizó lectina de amaranto acoplada a biotina (ALL-B) para aglutinar a las células previamente a su lisis; y posteriormente pasar el lisado celular a través de una columna de agarosa-avidina; el receptor se eluyó de forma específica añadiendo 0.2 M de GalNAc (Fig. 2). En el análisis del receptor de ALL (ALLTr) purificado, por electroforesis en condiciones reductoras (SDS-PAGE) se observó que la fracción purificada por cromatografía de afinidad fue homogénea y se reveló una sola banda cuyo corrimiento corresponde a 70 kDa (Fig. 3). Con el propósito de establecer la identidad del receptor de ALL y conociendo que la leucosialina (CD43) es una proteína profusamente O-glicosilada ubicua en las células blancas se realizó una transferencia a papel de nitrocelulosa de las proteínas presentes en el lisado total de los timocitos separadas por SDS-PAGE, así como del receptor purificado por cromatografía de afinidad; y se revelaron las proteínas que reconocieron los anticuerpos monoclonales contra CD43, S7 el cual se une a la isoforma de 115 kDa y el 1B11 que une la de 130 kDa, así como por ALL-B. Los resultados indicaron que la lectina de amaranto solo reconoce a la proteína de 70 kDa y no así a cualquiera de las isoformas de CD43 (Fig. 4).

En el análisis de la proteína de 70 kDa por cromatografía de intercambio iónico en una columna mono P en forma aniónica, se encontraron tres isoformas que eluyeron a diferente concentración de un gradiente de NaCl (llamadas ALLTr1, ALLTr2 y ALLTr3) (Fig. 5).



La caracterización química del receptor de la lectina de amaranto en los timocitos se llevo adelante analizando la composición de aminoácidos (Tabla I) y la proporción y contenido de azúcares (Tabla II). El análisis de la secuencia del ALLTr y sus isoformas mostró que el amino terminal está bloqueado. Los residuos más abundantes de la proteína son los ácidos aspártico y glutámico, así como la serina, prolina y glicina; y existen cantidades considerables de alanina y treonina las cuales, junto con la prolina se han encontrado adyacentes al sitio de glicosilación de manera bastante común. Se encontró que la fracción sacarídica del receptor, la cual representa el 20% en peso, contiene principalmente GalNAc, Gal y NeuAc, que son residuos típicos de las O-glicoproteínas sialiladas, y en menor proporción GlcNAc y manosa, lo que indica que el receptor y sus isoformas también contienen azúcares unidos por enlaces N-glicosídicos. Las isoformas de ALLTr muestran diferencias leves en el contenido de carbohidratos en peso y diferencias cuantitativas en la concentración de ácido siálico, presentando ALLTr3 un contenido mayor de este residuo (Tabla II); proponiendo que las diferencias entre las distintas isoformas se pueden deber a los diferentes grados de glicosilación, y en particular a los diferentes grados de sialilación. Estos resultados sugieren que, como en otras O-glicoproteínas, el estado de glicosilación de ALLTr se modifica de acuerdo al estado de activación de la célula (Carlsson y Fukuda, 1986, Piller *et al.*, 1988).

También se llevo a cabo el estudio indirecto de la secuencia de amino ácidos de ALLTr por medio de la digestión de la proteína con tripsina y el análisis de los péptidos por MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption-Time of Flight); esta técnica aprovecha la energía del láser para desprender la

muestra de una matriz orgánica, y analizarla por un espectrómetro de masas de tiempo de vuelo. Se obtuvieron 25 fracciones peptídicas con valores de  $m/z$  en el rango de 442.9 a 3817.2 y las principales fracciones se ubicaron en los valores 689.9, 1284.7, 1480.7, 1957.2, 2251.1 y 2809.1. Los valores de los iones moleculares  $[M+H]^+$  de los péptidos del receptor resultantes de la digestión con tripsina se compararon con los obtenidos en la base de datos NCBI nr Swiss-Prot 10/01/99. El grado de identidad con una proteína denominada KIAA0659 (Ishikawa *et al.*, 1998), cuya secuencia se predijo a partir de cDNA de clonas de cerebro humano, fue de 17%; se identificó también 10% de identidad con el receptor para TGF $\beta$  (factor de crecimiento transformante beta) (Suzuki *et al.*, 1994) y de 7% con una enzima que contiene dominios de muerte celular semejantes a los asociados con Fas (Fernández-Alnemri *et al.*, 1996). Ver Tabla.

**Tabla.** Análisis de péptidos trípticos del receptor de la lectina de *Amaranthus leucocarpus* sobre linfocitos T murinos, determinada por MALDI-TOF.

$m/z$	Secuencia Peptídica	Proteína relacionada
1579.9	KSQGQHWYSSSDK	<sup>1</sup> Proteína FADD
1641.2	QQKLSPSWESSKPR	<sup>2</sup> TGFR-2
1957.2	LMDFSDNCAILEDDE	<sup>2</sup> TGFR-2
2240.9	QISATSLPTAISAQTPRPPMR	<sup>1</sup> Proteína FADD
2479.4	QDPVELLLLLSTQERLAAELQAR	<sup>3</sup> Proteína KIAA
2826.7	SSSFQDLYCMVVPESPTSDYAEQPK	<sup>3</sup> Proteína KIAA

\*Los valores relativos fueron comparados con los obtenidos de la base de datos NCBI nr (Swiss-Prot 10/01/99). Las principales homologías encontradas fueron con: <sup>1</sup>Precursor de caspasa 10 (Fernandes-Alnemri *et al.*, 1996); <sup>2</sup>Precursor del receptor tipo II de TGF $\beta$  (Suzuki *et al.*, 1994); <sup>3</sup>Producto génico de KIAA0659 (Ishikawa *et al.*, 1998).

En el análisis por electro-transferencia de proteínas y su reconocimiento por anticuerpos anti CD43 y ALL-B, se observa que los anticuerpos anti-CD43 no reconocen a la O-glicoproteína de 70 kDa y sí a sus respectivas isoformas (S7 a la isoforma de 115 kDa y 1B11 a la isoforma de 130 kDa) y ALL-B sólo se une a la proteína purificada (Fig. 4). Estos resultados aunados a la escasa similitud que presentan los péptidos provenientes de ALLr al compararlos con los de las tres proteínas de la base de datos con las cuales tuvieron mayor semejanza, nos lleva a proponer que la O-glicoproteína reconocida por la lectina de amaranto presente en los timocitos murinos, se puede considerar un nuevo marcador de linfocitos T vírgenes o en reposo.

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

Flor Porras<sup>2</sup>, Ricardo Lascurain<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>2</sup>Departamento de Bioquímica, Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, Calzada de Tlalpan 4502, 01040 México, <sup>3</sup>Laboratorio de Inmunología, Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM, 04510, México, and <sup>4</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 NCBI nr (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.

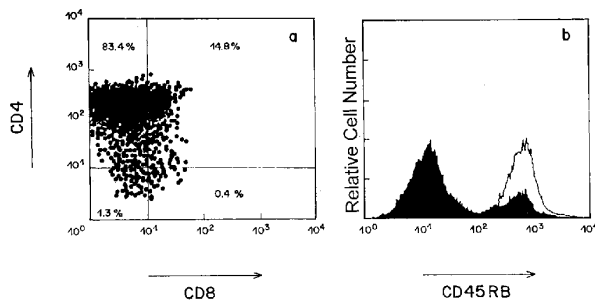
**Key words:** thymocyte/glycoproteins/lectins/*Amaranthus leucocarpus*/ontology

<sup>1</sup>To whom correspondence should be addressed at: Laboratorio de Inmunología, Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina UNAM, PO Box 70159, 04510 Mexico

### Introduction

Bone marrow-derived nucleated cells are known to possess glycoproteins containing O-glycosidically linked glycans 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 (Lascurain *et al.*, 1994), murine nonactivated peritoneal macrophages (Gorocica *et al.*, 1998; Maldonado *et al.*, 1998), and human naive T-lymphocytes (Lascurain *et al.*, 1997). ALL is a 35 kDa glycoprotein specific for the T and the T<sub>n</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 (Lascurain *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



**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

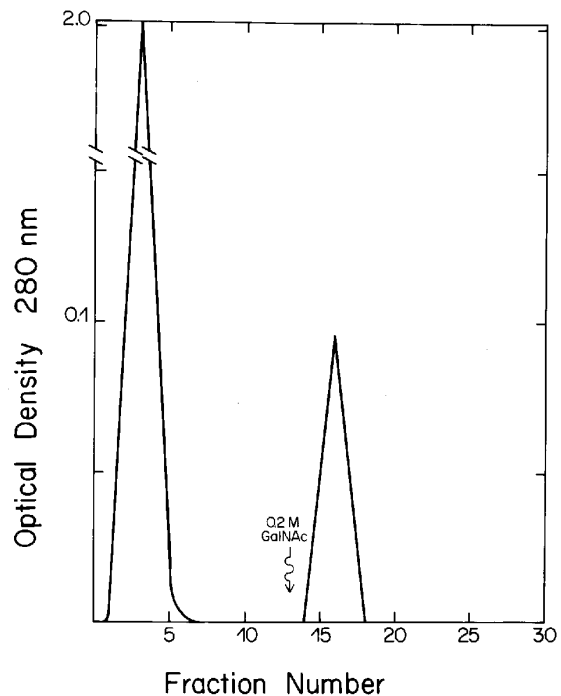
The thymocytes agglutinated by biotin-labeled ALL (ALL<sup>+</sup>) corresponded to 5% ( $\pm 0.3$ ) of the total thymocytes. ALL<sup>+</sup> cells bear mainly the mature thymocyte phenotypes, CD2<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> (83.4%), 14.8% of the cells are CD2<sup>+</sup>CD3<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.

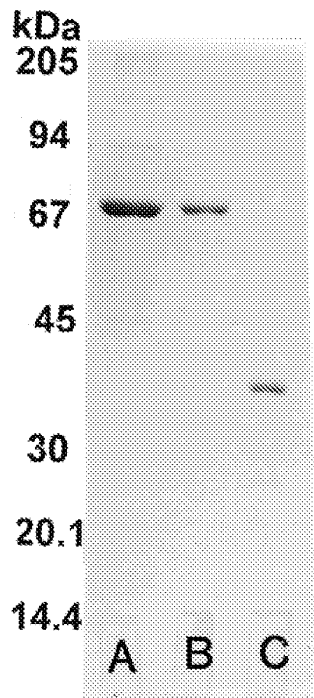
isoforms, recognized in the thymocytes extract, a single band, which corresponds to its specific proteins, (Figure 4, lanes 1, 2), and ALL recognizes only a 70 kDa protein in the same cell lysate (Figure 4, lane 3). The purified ALL thymocyte receptor is recognized by the lectin (Figure 4, lane 4).

### 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

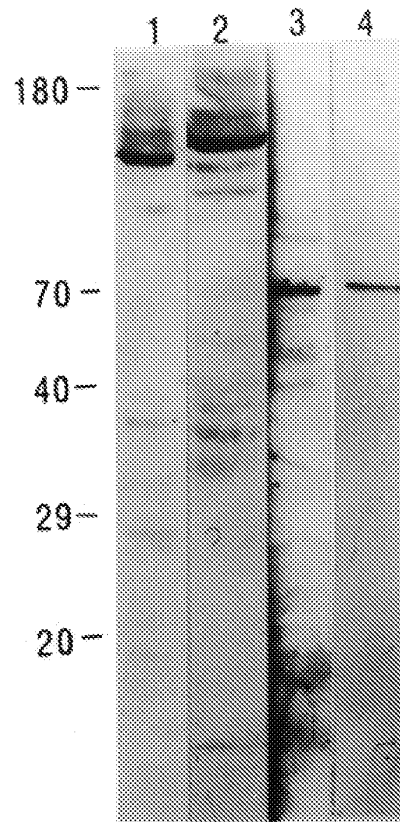


**Fig. 3.** SDS-PAGE of the purified ALL-thymocyte receptor. Lane A, 50 µg of thymocyte lysate. Lane B, 10 µg of purified fraction eluted with 0.2 M GalNAc. Lane C, 10 µg *Amaranthus leucocarpus* lectin. The molecular weight markers are: myosin (205 kDa), phosphorylase b (94 kDa), bovine serum albumin (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.

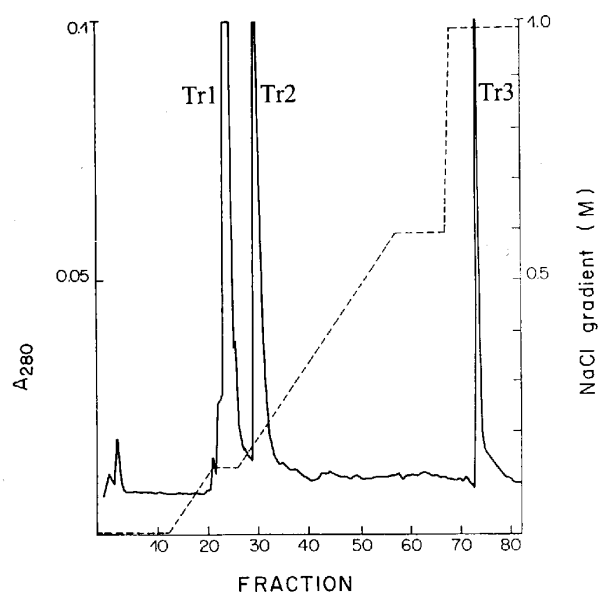
### Discussion

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 (Lascurain *et al.*, 1994) and human T-cells with the phenotype CD4<sup>+</sup>CD45Ra<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  $A_{280}$  (continuous line).

receptor is present specifically in naive or quiescent cell subpopulations (Lascurain *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 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	8.7	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.

**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<sup>6</sup> 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<sup>6</sup> 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



and optical density was monitored at  $A_{280}$ . Each eluted peak was dialyzed against distilled water before lyophilization for further analysis.

#### *Polyacrylamide gel electrophoresis*

The 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 methanalysis in the presence of meso-inositol as internal standard; the per-O-trimethyl silylated methyl glycosides (after N-reacetylation) were analyzed by gas-chromatography using a capillary column ( $25 \times 0.32$  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*

A 100  $\mu$ g sample was hydrolyzed under vacuum with 2 ml of 6 M 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.* (1984), using Nor-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 LF3000 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  $\mu$ g trypsin in 500  $\mu$ l 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 onto the target 1  $\mu$ l of the reaction products (containing 50 pM) and 1  $\mu$ l of a 2,5-dihydroxybenzoic acid matrix (12 mg/ml in  $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ , 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 ( $M_r$  1296.7). The mass of  $[\text{M}^+\text{H}]^+$  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 ( $2 \times 10^6$ ) were solubilized in lysis buffer. Insoluble material was removed by centrifugation first for 10 min at

250  $\times g$ , then 30 min at 18,000  $\times g$  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  $\text{NH}_2$ -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 leukosialin, a major sialoglycoprotein on human leukocytes. *J. Biol. Chem.*, **261**, 12779–12786.
- De Dios, I., Manso, M., León, V. and López Borrasca, A. (1986) Separation of human lymphocyte subclasses by rosettes with latex-lectin particules. *Biochem. Med. Metab. Biol.*, **35**, 12–17.
- De Maio, A., Lis, 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 Tackacs, 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., Bullrich, F., Fritz, 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., Muralihrishna, K., Baum, L. 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., Lascrain, R., Hernandez, P., Porras, F., Bouquelet, 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.
- Lascrain, R., Chávez, R., Gorocica, P., Pérez, A., Montaña, L.F. and Zenteno, E. (1994) Recognition of a CD4<sup>+</sup> mouse medullary thymocyte subpopulation by *Amaranthus leucocarpus* lectin. *Immunology*, **83**, 410–413.
- Lascrain, 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., Agundis, 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., Shioda, 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 Kears, 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., Montaña, M., Ruíz, 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., Lascrain, R., Montaña, L.F., Vázquez, L., Debray, H. and Montreuil, J. (1992) Specificity of *Amaranthus leucocarpus* lectin. *Glycoconj. J.*, **9**, 204–208.



## **Artículo: Isolation of the receptor for the *Amaranthus leucocarpus* lectin from human T lymphocytes**

### **INTRODUCCIÓN**

Las glicoproteínas y los glicolípidos juegan un papel relevante en el desarrollo y la diferenciación celular, así como en ciertas condiciones patológicas (Tsuboi y Fukuda 2001; Muroi *et al.*, 1997; Fukuda 1992). Los glicanos unidos por un enlace O-glicosídico que se encuentran en las glicoproteínas se expresan como glicanos tipo núcleo 1 (Gal $\beta$ 1,3GalNAC-Ser/Thr), los cuales se pueden sialidar en una unión  $\alpha$ 2,3 a la galactosa, o como glicanos tipo núcleo 2, que son el resultado de la adición enzimática de un residuo de GlcNAc en un enlace  $\beta$ 1,6 a la GalNAc. Se han reportado funciones diferentes de algunas glicoproteínas que contienen O-glicanos núcleo 2 y que están presentes en poblaciones celulares pertenecientes al sistema inmune, como son CD43, CD44, CD45, CD46 y CD55 (Fortune *et al.*, 1994; Shimizu y Shaw, 1993; Piller, *et al.*, 1988). Los O-glicanos núcleo 1 han sido considerados como representativos de una glicosilación aberrante o deficiente de las glicoproteínas de membrana. Existen datos recientes que sugieren que los O-glicanos presentes en CD45 regulan la activación celular a través de la modulación de la sialilación y la O-glicosilación en el dominio extracelular, ya que la dimerización de CD45 inhibe su función como fosfatasa (Xu y Weiss, 2002). Trabajos anteriores indican que las estructuras O-glicosídicas son específicas para cada linaje y para los estadios de diferenciación dentro de un mismo linaje (Muroi *et al.*, 1997; Fukuda 1992).

Las lectinas son herramientas ampliamente utilizadas para la caracterización de los oligosacáridos, así como para la separación de

poblaciones celulares. Las lectinas que muestran una especificidad por los O-glicanos se han usado ampliamente para la separación de subpoblaciones de timocitos y linfocitos. Por medio de la PNA se han identificado modificaciones en la O-glicosilación de la superficie celular con las que se puede caracterizar linfocitos T CD8<sup>+</sup> efectores y de memoria, con respecto a los linfocitos vírgenes (Galvan *et al.*, 1998). En estudios recientes se ha mostrado que el reconocimiento de ALL (considerada una lectina específica para O-glicanos tipo núcleo 1) por las glicoproteínas depende de la orientación de los residuos de GalNAc (Hernández *et al.*, 2004). ALL reconoce timocitos medulares murinos (Lascurain *et al.*, 1994), macrófagos peritoneales de ratón no activados (Maldonado *et al.*, 1998; Gorocica *et al.*, 1998) y linfocitos T humanos y murinos vírgenes o recién activados (Lascurain *et al.*, 1997, Ortiz *et al.*, 2002). La lectina de amaranto no reconoce linfocitos B y tiene poca actividad mitogénica para los linfocitos humanos (Ortiz *et al.*, 2002; Zenteno *et al.*, 1985). Este trabajo provee información sobre las características moleculares del receptor de ALL proveniente de linfocitos T humanos.

## **RESULTADOS Y DISCUSION**

Los linfocitos T humanos que reconoció la lectina de *Amaranthus leucocarpus* (ALL), se separaron por aglutinación selectiva al incubar las células con la lectina acoplada a biotina (ALL-B); esta suspensión celular se colocó sobre una solución al 7% de albúmina sérica bovina y se recuperaron las células ALL<sup>+</sup> del fondo del tubo. Una vez separados los linfocitos T ALL<sup>+</sup> se incubaron con GalNAc y se cuantificaron con hemocitómetro. La lectina de amaranto reconoció un 7±2% del total de linfocitos T. El análisis fenotípico de

los linfocitos T ALL<sup>+</sup> se llevó a cabo por citofluorometría de flujo utilizando el método de doble tinción inmunológica. El fenotipo principal de los linfocitos T ALL<sup>+</sup> fue CD4<sup>+</sup> (73%), CD27<sup>+</sup> (73%) (Fig. 1) y CD25<sup>+</sup> (26%); el marcador CD45RA, característico de células vírgenes se presentó en un 41% de las células ALL<sup>+</sup>, en tanto el 14% fue CD45R0. El marcador de activación muy temprana CD69 se presentó en el 13% de los linfocitos ALL<sup>+</sup>. Estos datos coinciden con la observación de que la lectina de amaranto interactúa con glicoproteínas que poseen O-glicanos del tipo núcleo 1 en linfocitos de ratón vírgenes CD45RB<sup>+</sup> (Lascurain *et al.*, 1994) y macrófagos murinos sin activar (Maldonado *et al.*, 1998; Gorocica *et al.*, 1998). ALL reconoce residuos de GalNAc cuando éstos están separados entre sí, mientras que los residuos de GalNAc que se encuentran agrupados en racimos impiden la interacción con la lectina. Este tipo de reconocimiento de la lectina de amaranto hacia su ligando indica que ésta puede ser una herramienta muy útil en el estudio de motivos que contengan residuos de GalNAc presentes en las O-glicoproteínas (Hernández *et al.*, 2004).

La purificación del receptor para la lectina de amaranto se realizó al aislar de forma específica las glicoproteínas provenientes de los linfocitos T unidas a la lectina, utilizando un sistema de cromatografía de afinidad indirecta con una columna de agarosa-avidina y lectina de amaranto acoplada a biotina (ALL-B). Se incubaron 10<sup>8</sup> linfocitos T con ALL-B y posteriormente se lisaron. El lisado celular resultante se separó con una columna de agarosa-avidina y el receptor se eluyó de forma específica con GalNAc 0.2 M (Fig. 2). El análisis del receptor para amaranto por electroforesis en condiciones reductoras (SDS-PAGE) dio la presencia de una sola banda cuyo peso correspondió a 70 kDa

(Fig. 3). Al estudiar el contenido y composición de aminoácidos (Tabla 1) y de azúcares (Tabla 2) se observó una glicoproteína con un 20% de azúcares en peso, que contiene principalmente serina, glicina, ácido glutámico, alanina y prolina; los residuos sacarídicos fueron principalmente GalNAc, y gal, manosa y GlcNAc en menor proporción, indicando de esta forma que el receptor para ALL presente en los linfocitos T se trata de una glicoproteína que presenta esencialmente O-glicanos.

Al examinar el receptor de ALL por cromatografía de intercambio iónico en una columna mono P en forma aniónica, se encontraron cuatro isoformas (FI, FII, FIII y FIV) que eluyeron a concentraciones diferentes de un gradiente de NaCl (Fig. 4). FI eluyó a una concentración de 0.15M, FII a 0.17M, FIII a 0.3M y FIV a 0.5M. Los resultados obtenidos de la electroforesis de doble dimensión en un gradiente de pH de 3.5 a 10 (Fig. 5) confirman la presencia de estas cuatro isoformas; el pI de estas isoformas estuvo comprendido en un pH de 4.5 a 6.0. Es posible que estas isoformas, al igual que en el receptor de ALL en timocitos murinos, estén relacionadas al estado de activación de los linfocitos y que indiquen diferentes grados de glicosilación

El estudio de la secuencia de aminoácidos del receptor de ALL así como de sus isoformas dio como resultado el amino terminal bloqueado, así que se procedió a hacer un examen de secuencia en forma indirecta haciendo una digestión con tripsina y analizando los péptidos resultantes por medio de espectrometría de masas. La digestión con tripsina produjo 65 péptidos y la relación m/z de las fracciones identificadas estuvo comprendida entre 791.3 a 3478.3. Los iones moleculares  $[M+H]^+$  producidos en el espectro de MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption-Time of Flight) se compararon con los

valores relativos obtenidos de la base de datos de NCBIInr (ProFound 2004/06/01). Los péptidos identificados del linfocito T mostraron un 54% de homología con una chaperona molecular de núcleo DnaK (Vandenbroeck *et al.*, 2002), 47% con una proteína humana llamada KIAA (Ishikawa *et al.*, 1998) y un 44% con una proteína de choque térmico (Gross *et al.*, 2003) (Tabla 3). Estas proteínas tienen en común su participación en procesos de regulación y su interacción con otras poblaciones celulares. Por ejemplo, la proteína de choque térmico interactúa con receptores específicos, como CD94 que es una lectina de tipo C y la molécula de adhesión neuronal CD56, favoreciendo de esta manera su interacción con poblaciones celulares efectoras (Gross *et al.*, 2003).

Muchas proteínas O-glicosiladas se expresan en la superficie celular de los linfocitos. Existen pocos marcadores de la superficie celular que pueden discriminar claramente células efectoras de células de memoria. En estudios realizados sobre la expresión diferencial de O-glicanos entre los linfocitos T CD8<sup>+</sup> efectoras y los de memoria, se encontró que existe una regulación positiva en la biosíntesis de los O-glicanos de núcleo 2 sobre la superficie de las glicoproteínas de membrana de los linfocitos T efectoras, en tanto que en linfocitos de memoria estos O-glicanos se regulan de forma negativa (Harrington *et al.*, 2000). En el trabajo presente encontramos que ALL reconoce 7±2% de los linfocitos T humanos; estas células expresan en mayor proporción un fenotipo virgen (CD45RA) en relación al fenotipo de memoria (CD45RO), aunque este marcador de superficie sea reconocido de igual forma sobre los linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>. Los linfocitos B no son reconocidos por la lectina. En una proporción menor los linfocitos T ALL<sup>+</sup> mostraron los



marcadores CD69 (13%) y CD25 (26%), los cuales son considerados como marcadores específicos de la activación celular temprana y tardía respectivamente (Croft *et al.*, 1997; Testi *et al.*, 1994).

La mayoría de los linfocitos T ALL<sup>+</sup> presentaron un fenotipo CD27<sup>+</sup> (73%), el cual es un miembro de la familia de los receptores del factor de necrosis tumoral (TNF-R). La expresión de CD27 está regulada estrechamente durante la ontogenia del linfocito T, está presente en la mayoría de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> con fenotipo de células vírgenes CD45RA<sup>+</sup>CD45RO<sup>-</sup> y es regulada de manera temporal después de la activación (Hendricks *et al.*, 2003; Hinzten *et al.*, 1994). El ligando identificado por CD27 es CD70, el cual es un miembro de la familia del TNF, que se expresa principalmente en los linfocitos B (Hendricks *et al.*, 2003); sugiriendo de esta forma que el receptor de ALL sobre las células T podría participar en las interacciones T-B.

Durante varios procesos biológicos, incluyendo la activación del linfocito T, los O-glicanos de núcleo 2 se pueden convertir en un oligosacárido ramificado (Fukuda *et al.*, 1992); mientras que las estructuras cortas de los antígenos T y Tn, reconocidos por ALL, con O-glicanos de núcleo 1 parecen participar activamente en procesos de regulación (Kundu *et al.*, 1989; Schoenbeck *et al.*, 1989).

## Isolation of the receptor for the *Amaranthus leucocarpus* lectin from human T lymphocytes

Flor Porras<sup>a</sup>, Francisco Urrea<sup>b</sup>, Blanca Ortiz<sup>a</sup>, Salvador Martínez-Cairo<sup>b</sup>, Stéphane Bouquelet<sup>c</sup>, Gisela Martínez<sup>d</sup>, Ricardo Lascurain<sup>d</sup>, Edgar Zenteno<sup>d,\*</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Bioquímica, Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, Calzada de Tlalpan 4502, 01040, Mexico

<sup>b</sup>Unidad de Investigación, Centro Médico Nacional S-XXI, IMSS, 01020, Mexico

<sup>c</sup>Laboratoire de Chimie Biologique de la Université des Sciences et Technologies de Lille, UMR du CNRS no 8576, Villeneuve d'Ascq, 59655, France

<sup>d</sup>Laboratorio de Inmunología, Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina UNAM, PO Box 70159, 04510, Mexico

Received 20 December 2004; received in revised form 22 March 2005; accepted 23 March 2005

Available online 8 April 2005

### Abstract

*Amaranthus leucocarpus* lectin (ALL) is specific for GalNAc, and recognizes human T cells. The receptor for ALL was purified from T cells using biotin-labeled lectin and avidin-agarose as affinity matrix. It is a 70-kDa glycoprotein, constituted mainly by serine, glycine, and glutamic acid; its glycosidic portion contains mainly GalNAc; galactose, sialic acid, mannose, and GlcNAc were identified at a lower proportion. By ionic strength chromatography, as well as double dimension electrophoresis, we identified four isoforms of the ALL-receptor. N-terminal amino acid was blocked both in the ALL-receptor and its isoforms, therefore, tryptic peptides of ALL-receptor, analyzed through MALDI-TOF, were compared with the relative values obtained from the NCBI Inr (ProFound 2004/06/01) database. Our results indicated that the tryptic peptides obtained showed 54% homology with a DnaK-core molecular chaperone, 47% with human KIAA protein, and 44% with heat shock protein 8. The most frequent phenotype of the CD4 or CD8 ALL+ T cells was CD45RA+ CD27+; 26% of ALL+ T cells were CD25+ and 13% were CD69+, indicating that the glycoprotein recognized by ALL is present mainly on naive or quiescent T cells.

© 2005 Elsevier B.V. All rights reserved.

**Keywords:** T-cells; Glycoproteins; Lectins; *Amaranthus leucocarpus*; Ontogeny; O-glycans

### 1. Introduction

Glycoproteins and glycolipids play a relevant role in cellular development, differentiation, as well as in pathological conditions [1–3]. The O-glycosidically linked glycans present in glycoproteins expressed as core 1 O-glycan (Gal $\beta$ 1,3GalNAc-Ser/Thr) which could be sialylated in an  $\alpha$ 2,3 linkage to galactose or core 2 O-glycans, which are the result of the enzymatic addition of GlcNAc in the  $\beta$ 1,6 linkage to GalNAc. Different functions of glycoproteins containing core 2 O-glycans on immune cellular populations, such as CD43, CD44, CD45, CD46, and CD55 have been reported [4–6]. Core 1 O-glycans have been considered

as representative of aberrant or deficient glycosylation of cellular membranes. Recent data suggested that O-glycans on CD45 regulate T cell activation through modulation of sialylation and O-glycosylation in the extracellular domain, since dimerization of CD45 inhibits its phosphatase function [7]. Previous work indicated that the O-glycosidically-linked structures are specific for each cell lineage and for several differentiation stages, within a given cell lineage [1,3].

Lectins represent excellent tools for oligosaccharide characterization as well as for isolation of cellular populations. Peanut agglutinin (*Arachis hypogaea*) recognizes cortical immature thymocytes [8] and effector CD8+ T-cells. T and B splenocytes are fractionated with the lectin from *Glycine max* (soybean agglutinin, SBA) [9]. *Helix pomatia* is employed for the identification and isolation of T cells [10], and *Vicia villosa* agglutinin recognizes specifically lymphocytes bearing the CD8 phenotype [11]. Other lectins,

\* Corresponding author. Fax: +52 5 616 24 19.

E-mail address: [ezenteno@servidor.unam.mx](mailto:ezenteno@servidor.unam.mx) (E. Zenteno).

such as wheat germ agglutinin (WGA), specific for GlcNAc, have been used in the purification of B lymphocytes [12]. Sequential fractionation of lymphocytes by SBA and peanut agglutinins (PNA) yielded a pluripotential stem cells enriched fraction devoid of graft versus host activity, which has been successfully transplanted into patients with severe immune deficiencies [13]. By means of PNA, modifications in cell surface O-glycosylation that could characterize effector/memory CD8(+) T cells from naive T cells have been identified [14]. The lectin from *Amaranthus leucocarpus* (ALL) recognizes GalNAc in the specific sequences Gal $\beta$ 1,3GalNAc $\alpha$ 1,O-Ser/Thr and GalNAc $\alpha$ 1,O-Ser/Thr (the T and the T<sub>n</sub> antigens, respectively) [15]; moreover, recent findings show that ALL recognition in glycoproteins is dependent of the orientation of the GalNAc saccharides [16]. ALL recognizes murine medullary thymocytes [17], murine non-activated peritoneal macrophages [18,19], and human and murine naive or early activated T-lymphocytes [20,21]. ALL does not recognize B lymphocytes, and it has a poor mitogenic activity on human lymphocytes [21,22]. This work provides information on the molecular characteristics of the ALL receptor from human T cells.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Reagents

*Amaranthus leucocarpus* seeds were obtained in Tulyehualco, Mexico, and the lectin was purified by affinity chromatography [23]. The *A. leucocarpus* lectin (ALL) was labeled with the N-hydroxysuccinimide ester of biotin from Pierce Chem. Co. (Rockford, IL, USA) at a label/protein ratio of 2:1 [24] for affinity chromatography and with fluorescein isothiocyanate (FITC) for cytometry assays. Electrophoresis reagents were obtained from Bio-Rad Lab. Inc. (Richmond, CA, USA) and monomeric avidin-agarose was from Pierce Chem. Co (Rockford, IL, USA). Bovine serum albumin fraction V, sugars, Quantum Red-labeled anti-human CD4 and CD8 monoclonal antibodies (mAbs), and chemical reagents were from Sigma Chemical Co (St Louis, MO, USA). FITC-labeled mouse anti-human CD45RO and phycoerythrin (PE)-labeled mouse anti-human CD45RA mAbs were from Southern Biotech Inc (Birmingham, AL, USA). PE- or CyChrome-labeled mAbs against CD3, PE-CD25, FITC-CD69, and PE-streptavidin were obtained from PharMingen (New York, NY, USA). Mouse anti-human CD27 mAb FITC-labeled was from Serotec Inc. (Raleigh NC, USA).

### 2.2. Cells

Human peripheral blood from healthy donors was diluted 1:2 (v/v) in phosphate-buffered saline (PBS, 0.15 M NaCl, 0.05 M sodium phosphate, pH 7.2). Mononuclear cells were separated on a Ficoll-hypaque density gradient by centrifu-

gation at 1700 rpm for 30 min at 18 °C. The cells were collected from the interface, washed twice, and then suspended in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 5% fetal calf serum (FCS, heat inactivated at 56 °C for 30 min), counted in a hemocytometer and adjusted to  $1 \times 10^8$  cells per ml. Enriched T cells were obtained with a nylon wool column; 0.6 g nylon wool packed in a 10-ml syringe barrel and previously rinsed with tissue culture medium. Up to  $10^8$  cells in 1 ml Dulbecco's modified Eagle's medium (D-MEM) containing 5% inactivated FCS were loaded onto the column and incubated at 37 °C for 30–40 min, recovering T cells that passed through. A T-cell subpopulation ALL+ was purified by selective agglutination, briefly: the T-cell enriched suspension was incubated with 1  $\mu$ g/ml of biotinylated-ALL for 15 min at room temperature and layered gently on the top of a solution of 7% bovine serum albumin in PBS in a conical 12-ml glass tube. After 30 min at room temperature, the cells in the bottom (ALL+) and on the top (ALL-) of the tube were collected separately and washed twice with PBS [8].

### 2.3. Flow cytometry

Viability of purified T cells (>90%) was evaluated by the trypan blue exclusion test.

Confirmation of T cell fractions was attained by flow cytometry using PE-labeled anti-CD3 mAbs. Phenotypic characterization of ALL+ cells was achieved by a double stain immunological method [25]. Two color staining was performed on T cells by direct and indirect immunofluorescence;  $10^6$  cells were suspended in 50  $\mu$ l of PBS-BSA-sodium azide (PBS with 0.2% bovine serum albumin and 0.2% sodium azide, PBA) and incubated for 30 min at 4 °C with 1  $\mu$ l ALL (100  $\mu$ g/ml). Cells were washed twice with PBA and stained with PE-, or CyChrome-Streptavidin and CyChrome-, or PE-labeled anti-CD3, FITC-labeled anti-CD45RO or PE-labeled anti-CD45RA and Quantum Red labeled anti-CD4 or anti-CD8, PE-labeled anti-CD25 or FITC-labeled anti-CD69 for 15 min at 4 °C. Other assays included incubation of T cells with 10  $\mu$ l PE-labeled anti-human CD27 mAbs for 30 min at 4 °C. After incubation, cells were washed twice in PBA, fixed in PBS containing 1% *p*-formaldehyde, and analyzed by flow cytometry in an Excalibur Becton and Dickinson Cell Sorter apparatus (FACS, Mountain View, CA). At least  $10^4$  events were acquired in all experiments. PE- or Cy-Chrome-labeled Streptavidin was used as a negative control in all experiments.

### 2.4. Receptor purification

Indirect affinity chromatography was used to specifically isolate the lectin-binding glycoproteins from T cells [26,27]. Cells ( $10^8$ ), purified by agglutination with biotin-labeled ALL lectin, 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 1.0% (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 lysis buffer 0.1% Triton X-100 (PBS-T) 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; the biotin-labeled lectin was eluted from the avidin column by addition of 0.2 M glycine-HCl, pH 2.8. The collected fractions were dialyzed against PBS and their absorbance was determined at  $A_{280}$ . Finally, GalNAc-eluted fractions were pooled, dialyzed against distilled water, and freeze-dried for further analysis.

### 2.5. Polyacrylamide gel electrophoresis

The molecular mass and the homogeneity of the purified receptor were evaluated by 10% polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) using the Laemmli [28] discontinuous buffer system. Before electrophoresis, samples were treated with 50  $\mu$ M 2-mercaptoethanol, boiled for 5 min, and, finally, gels were stained by the silver staining method.

### 2.6. Analytical methods

#### 2.6.1. Protein concentration

Protein was determined with the DC.protein assay kit according to manufacturer's instructions (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). 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 analyzed by gas-chromatography using a capillary column ( $25 \times 0.32$  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. [29]. The amino acid analysis was performed in a 100- $\mu$ g sample that was hydrolyzed under vacuum with 2 ml of 6 M 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. [30], using nor-leucine as internal standard.

#### 2.6.2. Amino acid sequence

The amino acid sequence was determined on purified ALL T cell receptor electrophoresed on SDS-PAGE and transferred to a PVDF membrane, the band was excised from the blot and sequenced with a Beckman Model LF3000 protein sequencer (Fullerton, Ca., USA). Amino acid sequencing was also determined by MALDI-TOF on peptide fragments obtained by trypsin digestion of the purified ALL-receptor; it was performed on the SDS-PAGE excised band as follows: the gel containing 200 pM of protein was digested with 0.5  $\mu$ g trypsin in 500  $\mu$ l 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) [31]. Samples were prepared by mixing directly

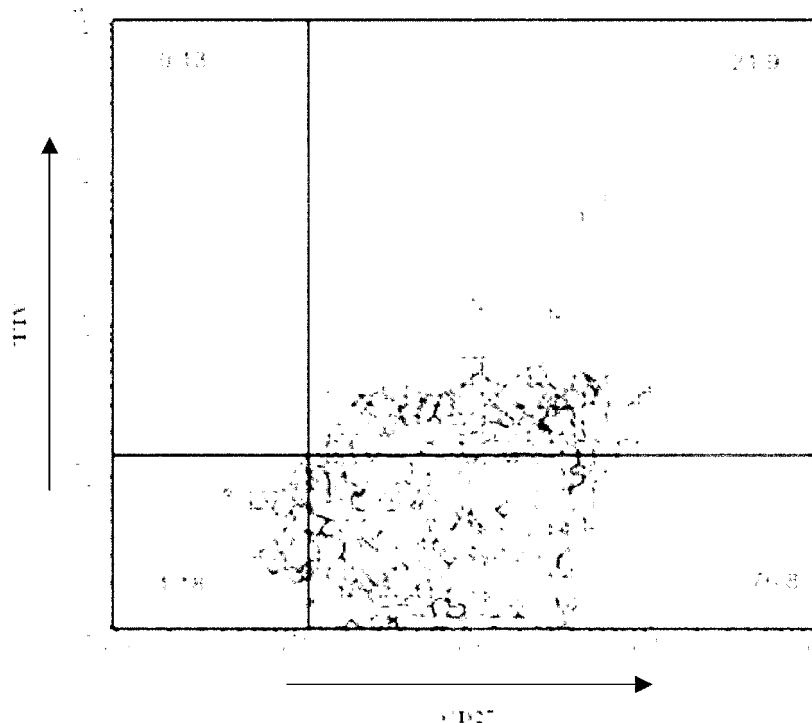


Fig. 1. Phenotypic characterization of human T lymphocytes recognized by the *Amaranthus leucocarpus* lectin. Analyses were performed using FITC-labeled lectin and PE-labeled anti-human CD27. Almost all of the gated ALL<sup>+</sup> cells are CD27<sup>+</sup>.

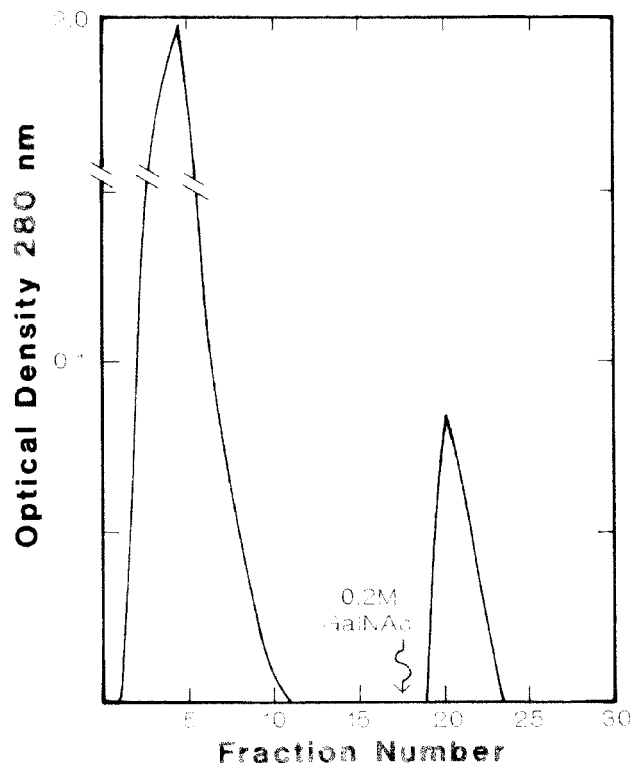


Fig. 2. Purification of human T cell receptor for *Amaranthus leucocarpus* lectin. The cells prior to lysis were incubated with biotin-labeled ALL, and then the complex was purified on an avidin–agarose column. The unretained fraction was eluted with PBS-T (0.1% TritonX-100) and the affinity purified 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.

onto the target 1  $\mu$ l of the reaction products (containing 50 pM) and 1  $\mu$ l of a 2,5-dihydroxybenzoic acid matrix (12 mg/ml in  $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ , 70:30, v/v), and then allowing the mixture to crystallize at room temperature [32]. 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 ( $M_r$  1296.7). The mass of  $[\text{M}+\text{H}]^+$  ions from peptides produced by tryptic digestion was compared with those obtained from NCBI nr (ProFound 2004/06/01) database.

## 2.7. Identification of isoforms of the ALL+ T cell receptor

### 2.7.1. Two-dimensional electrophoresis

For the first dimension, isoelectric focusing was performed with 30  $\mu$ g of the affinity purified ALL-receptor in cylindrical 5% polyacrylamide gels ( $0.2 \times 10$  cm) containing 2% (v/v) of 3.5 to 10 ampholines (Pharmacia) and 1% Triton X-100. Gels were run at 600 V for 2 h. Then, each gel was prepared for second dimension SDS-PAGE, onto 10% separating gels in a slab gel apparatus, according to Laemmli [29].

### 2.7.2. Ionic strength chromatography

The affinity purified ALL-receptor was applied to a mono-P pre-packed HR column 5/20 mm (Pharmacia, Uppsala, Sweden), in anionic form, equilibrated previously with 10 mM imidazol buffer, pH 7.1, 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). ALL-receptor isoforms were eluted from the column with a 0- to 1-M NaCl stepwise gradient in imidazol buffer. Fractions (1 ml) were collected and absorbance was monitored at  $A_{280}$ . Each eluted peak was dialyzed against distilled water before lyophilization for further analysis.

## 3. Results

### 3.1. ALL+ T cells phenotype

Biotin-labeled ALL recognized  $7 \pm 2\%$  of the total T lymphocytes; 73% of the ALL positive cells were CD4+ and 20.3 % were CD8+; 41% of the ALL+ were also CD45RA+ and 14% CD45RO+; 26% of the ALL+ T cells

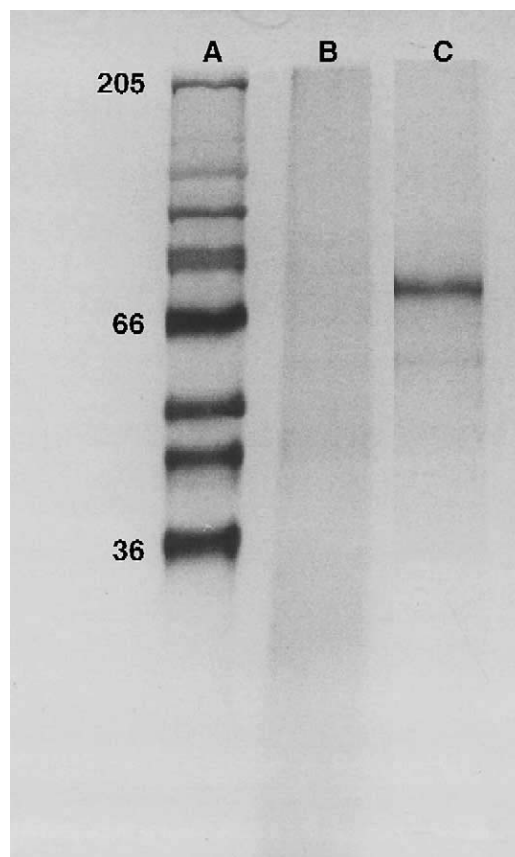


Fig. 3. SDS-PAGE of the purified ALL–T cell receptor. Lane A, molecular weight markers. Lane B, 50  $\mu$ g of T cell lysate. Lane C, 10  $\mu$ g of purified fraction eluted with 0.2 M GalNAc. The molecular weight markers are: myosin (205 kDa); B-galactosidase *Escherichia coli* (116 kDa); phosphorylase B (97 kDa); fructose-6-phosphate kinase (84 kDa); bovine serum albumin (66 kDa); glutamic dehydrogenase (55 kDa); ovoalbumin (45 kDa); glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (36 kDa).

Table 1  
Amino acid composition of the human T cell receptor for *Amaranthus leucocarpus* lectin

Amino acid	Residues per 100 amino acids	Residues per molecule <sup>a</sup>
Asp	6.2	36.2
Glu	16.4	95.7
Ser	21.4	125.4
Gly	20.1	117.8
His	2.6	15.2
Arg	1.2	7.0
Thr	3.9	22.8
Ala	9.3	54.2
Pro	3.3	19.2
Tyr	1.1	6.4
Val	3.8	22.2
Met	0.7	4.1
Ile	3.0	17.4
Leu	2.9	16.9
Phe	1.5	9.1
Lys	2.7	15.8
Total 585.4		

<sup>a</sup> Considering 70 kDa and that the receptor contained 20% sugar by weight.

were CD25+ and 13% CD69+. Most of the gated ALL+ T cells (73%) were CD27 positive (Fig. 1).

### 3.2. Receptor purification

T lymphocytes ( $10^8$ ), enriched in a nylon wool column, rendered after lysis 5.8 mg of soluble protein. The glycoprotein recognized by ALL was purified from the T cell lysate by indirect affinity chromatography. The ALL binding protein was eluted with GalNAc 0.2 M (Fig. 2). The amount of purified protein was 50  $\mu$ g, which corresponds to <1% of the cell lysate protein concentration.

### 3.3. Chemical characterization

Electrophoretic analysis of the affinity purified ALL-receptor from human T cells showed a single band of 70 kDa (Fig. 3). Control assays, using ALL as control, showed a protein band of 35 kDa, confirming that the 70-kDa protein corresponds to the ALL-receptor. The ALL-receptor is a glycoprotein, with 20% of sugars by weight, containing mainly serine, glycine, and glutamic acid; it also contains proline residues, which seem to be important for O-glycosylation [16], and is devoid of cysteine residues (Table 1). As indicated in Table 1, the ALL-receptor possesses 148 Ser/Thr residues, representing potential sites for O-glycosylation. The carbohydrate fraction of the receptor is mainly composed by GalNAc (49%); galactose, *N*-acetyl-D-glucosamine, mannose, and sialic acid are also present in smaller amounts (Table 2).

The ALL-receptor possessed blocked N-terminal amino acid residues. Tryptic digestion of the purified receptor yielded 65 peptidic fractions. The *m/z* of the identified fractions ranged from 791.3 to 3478.3. The molecular [ $M^+H$ ]<sup>+</sup> ions from the MALDI-TOF spectrum of digested

fractions were compared with the relative values obtained from the NCBIInr (ProFound 2004/06/01) database. The identified T cell peptides showed a 54% homology with a DnaK-core molecular chaperone, 47% with human KIAA protein and 44% with heat shock protein 8 (Table 3).

### 3.4. Identification of ALL+ T cell receptor isoforms

The affinity chromatography purified protein yielded four isoforms when separated by exchange chromatography on a mono-P column, in anionic form (Fig. 4). The isoforms (termed FI, FII, FIII, and FIV) were eluted with a stepwise NaCl gradient. FI was eluted at 0.15 M NaCl, FII at 0.17 M, FIII at 0.3 M, and FIV at 0.5 M. This result was confirmed by two-dimensional electrophoresis in a 3.5 to 10 pH gradient that showed four isoforms (Fig. 5); the pI of the four isoforms ranged from 4.5 to 6.0.

## 4. Discussion

Lectins with specificity for O-linked glycans (containing Gal $\beta$ 1-3 GalNAc $\alpha$ 1-O-Ser/Thr and GalNAc $\alpha$ 1-O-Ser/Thr) have been widely used in the fractionation of glycoproteins and cellular sub-populations [8,10,13,14]. *Amaranthus leucocarpus* syn *hypocondriacus* is a Mexican plant representative of the *Amaranthaceae* family and has been shown to interact with the core 1 of O-linked glycoproteins in naive CD45RA murine lymphocytes [17] and non-activated murine macrophages [18,19]. ALL recognizes GalNAc residues when they are spaced out in glycan structures, whereas GalNAc residues arranged in clusters prevents interaction with the lectin, indicating that ALL is an interesting tool to study GalNAc-containing motifs found in O-glycoproteins [16].

The ALL receptor from human T cells was purified using biotin-labeled lectin and avidin-agarose as the affinity matrix. It is a 70-kDa glycoprotein, constituted mainly by serine, glycine, and alanine; its glycosidic portion, which represented 20% of the total weight, contains mainly GalNAc, whereas Gal, Man, GlcNAc, and NeuAc were identified at a lower proportion, indicating that ALL receptor is mainly O-glycosylated. Ionic strength chroma-

Table 2  
Carbohydrate composition of the human T cell receptor for *Amaranthus leucocarpus* lectin

Carbohydrate	Residues per 100 residues	Residues per molecule <sup>a</sup>
Gal	21	16.3
Man	15	11.3
GalNAc	49	31.0
GlcNAc	11	7.3
NeuAc	4	1.8

<sup>a</sup> Sugar residues per molecule are presented considering 20% sugar by weight and a molecular weight of 70 kDa.

Table 3

Amino acid sequence of the T cell receptor for the lectin from *Amaranthus leucocarpus* determined from tryptic peptides by MALDI-TOF

m/z	Peptide sequence	Related protein
2697.9	VEIIANDQGNRTTPSYVAFDTER	<sup>1</sup> DnaK-type
2775.0	QTQFTTYSNDQPGVLIQVYEGER	<sup>2</sup> Heat shock protein 54
2982.2	TLSSSTQASLEIDSLFEGIDFYTSITR	<sup>1</sup> DnaK-type
3175.6	MLRGKPAVAALGDLTDLPTYEDIQTALSSK	<sup>3</sup> KIAA0123t
3257.7	FSSGGAYPNIPSSPLPGVPKPVFATVDGQEK	<sup>3</sup> KIAA0123
3404.8	AAAVGIDLGTYSVCVGFQHGKVEIIANDQGNR	<sup>1</sup> DnaK-type

\* Analyses of the ALL<sup>+</sup> T cell receptor's peptides, obtained for trypsin digestion by MALDI-TOF, were compared with the relative values obtained from the NCBI nr (ProFound 2004/06/01) database. Main homologies were found with: <sup>1</sup>DnaK-type molecular chaperone HSP11L-human [32]; <sup>2</sup>Heat shock protein 54 [34]; and <sup>3</sup>KIAA0123 gene product [33].

topography, as well as double dimension electrophoresis, revealed that the ALL T-cell receptor contained four isoforms; as for the ALL receptor in murine thymocytes, it is highly possible that human ALL T cell-receptor's microheterogeneity might be related to the activation stage of lymphocytes [27]. N-terminal amino acid sequence is blocked in both the receptor and its isoforms. Amino acid sequence of ALL receptor was analyzed from peptides after trypsin digestion by MALDI-TOF, and their *m/z* values compared with the relative values obtained from the NCBI nr (ProFound 2004/06/01) database. Our results indicate that tryptic peptides of ALL<sup>+</sup> T cell receptor

showed 54% homology with a DnaK-core molecular chaperone [32], 47% with human KIAA protein [33], and 44% with heat shock protein 8 [34]; these proteins have in common their participation in regulatory processes during cellular activation and their interaction with other cellular populations. For example, the heat shock protein interacts with specific receptors, such as the C-type lectin receptor CD94 and the neuronal adhesion molecule CD56, favoring interaction with effectors cellular populations [34].

Many functional O-glycosidically linked glycoproteins are expressed on the lymphocyte cell surface. There are few reliable cell surface markers that can clearly discriminate effector from memory T cells. Changes in O-linked glycosylation effector and memory cell cores in CD8<sup>+</sup> T cells showed upregulated biosynthesis of core-2 O-glycans on T cell surface glycoproteins [35,36]. In this work, we found that ALL recognizes 7 ± 2% human T cells; these cells expressed naive (CD45RA) rather than memory (CD45RO) markers, although surface markers on CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T-cells were equally well recognized, and B-cells were not recognized. A lower proportion of the ALL<sup>+</sup> T cells showed CD25 (26%) and CD69 (13%) phenotypic markers, which are considered as specific markers for late or early cellular

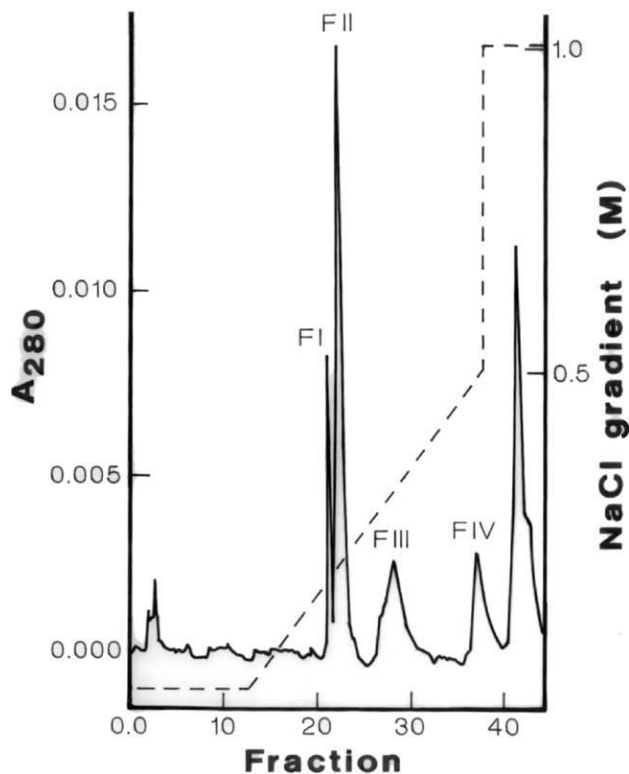


Fig. 4. Purification of human T cell receptor-isoforms for *Amaranthus leucocarpus* lectin by ion exchange chromatography on a Mono-P column (anionic form) in an FPLC system. The affinity purified ALL receptor (500 µg) was applied to the column equilibrated previously with 10 mM imidazol buffer, pH 7. Isoforms were eluted by stepwise NaCl gradient (dotted line). Detection of the optical density of each milliliter of fraction was at A<sub>280</sub> (continuous line).

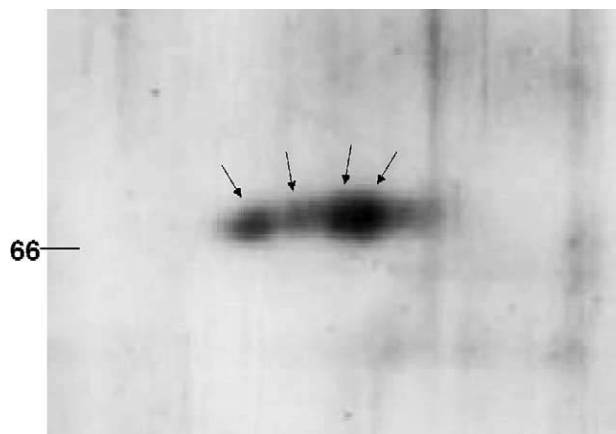


Fig. 5. Two-dimensional electrophoresis of the purified T cell receptor for *Amaranthus leucocarpus* lectin. Isoelectric focusing (in the first dimension) of 50 µg purified ALL-T cell receptor was performed in cylindrical polyacrylamide (at 5% concentration) gels containing 2% (v/v) of pH 3.5 to 10 ampholines and 1% Triton X-100. Gels were run at 600 V for 14 h at 4 °C. The gel was deposited for a second dimension on an SDS-PAGE slab gel.

activation, respectively [37,38]. In addition, most ALL<sup>+</sup> cells were also CD27<sup>+</sup>, which is a lymphocyte-specific member of the tumor necrosis factor receptor (TNF-R) family. CD27 expression is tightly regulated during T-cell ontogeny and is present in most CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells with CD45RA<sup>+</sup>CD45RO<sup>-</sup> naive phenotype, and transiently up-regulated upon priming [39]. The ligand identified by CD27 is CD70, a member of the TNF family, mainly expressed on B cells [39,40], suggesting that the ALL<sup>+</sup> receptor on T cells could participate in T cell–B cell interactions.

During various biological processes, including T-cell activation, the core 2 O-glycan can be converted to a branched oligosaccharide [3]; whereas the T and Tn antigens, recognized by ALL, in core 1 O-glycan seems to participate actively in regulatory processes [41,42]. Further work is needed to determine the specific role of the 70-kDa glycoprotein recognized by ALL in T-cells.

### Acknowledgements

The authors are grateful to Marie-Christine Slomianny (USTL) for the MALDI-TOF analysis. This work was supported by CONACyT, and DGAPA (PAPIIT-IN224598, IN232504) UNAM.

### References

- [1] K. Muroi, Y. Amemiya, E.L. Sievers, Y. Miura, S.E. Hakomori, M.R. Loken, Expression of sialosyl-T and disialosyl-T antigens in erythroid cells, *Leuk. Lymphoma* 25 (1997) 403–414.
- [2] S. Tsuboi, M. Fukuda, Roles of O-linked oligosaccharides in immune responses, *BioEssays* 23 (2001) 46–53.
- [3] M. Fukuda, Cell surface carbohydrates in hematopoietic cell differentiation and malignancy, in: M. Fukuda (Ed.), *Cell Surface Carbohydrates and Cell Development*, CRC Press, Boca Raton, 1992, pp. 127–159.
- [4] F. Fortune, J. Walker, M. Lefrancois, T. Lehner, The expression of carbohydrate antigens in activated T cells and in autoimmune diseases, *Scand. J. Immunol.* 40 (1994) 636–642.
- [5] Y. Shimizu, S. Shaw, Cell adhesion. Mucins in the mainstream, *Nature* 366 (1993) 630–631.
- [6] F. Piller, V. Piller, R.I. Fox, M. Fukuda, Human T-lymphocyte activation is associated with changes in O-glycan biosynthesis, *J. Biol. Chem.* 263 (1988) 15146–15150.
- [7] Z. Xu, A. Weiss, Negative regulation of CD45 by differential homodimerization of the alternatively spliced isoforms, *Nat. Immunol.* 3 (2001) 764–771.
- [8] Y. Reisner, M. Linker-Israeli, N. Sharon, Separation of mouse thymocytes into two subpopulations by the use of peanut agglutinin, *Cell. Immunol.* 25 (1976) 129–134.
- [9] Y. Reisner, A. Ravid, N. Sharon, Use of soybean agglutinin for the separation of mouse B and T lymphocytes, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 72 (1976) 1585–1591.
- [10] S. De Petris, B. Tackacs, Relationship between mouse lymphocyte receptors for peanut agglutinin (PNA) and *Helix pomatia* agglutinin (HPA), *Eur. J. Immunol.* 13 (1983) 831–840.
- [11] F. Fortune, T. Lehner, Phenotypic expression of *Vicia villosa* binding T cell subsets, as markers of contrasuppressor cells in systemic lupus erythematosus, *Clin. Exp. Immunol.* 74 (1988) 100–104.
- [12] I. De Dios, M. Manso, V. León, A. López Borrasca, Separation of human lymphocyte subclasses by rosettes with latex-lectin particles, *Biochem. Med. Metab. Biol.* 35 (1986) 12–17.
- [13] Y. Reisner, Differential agglutination by soybean agglutinin of human leukemia and neuroblastoma cell lines: potential application to autologous bone marrow transplantation, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 80 (1983) 6657–6661.
- [14] M. Galvan, K. Muralihrishna, L. Baum, R. Ahmed, 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 (1998) 641–648.
- [15] E. Zenteno, R. Lascurain, L.F. Montaña, L. Vázquez, H. Debray, J. Montreuil, Specificity of *Amaranthus leucocarpus* lectin, *Glycoconjugate J.* 9 (1992) 204–208.
- [16] P. Hernández, D. Tetaert, G. Vergoten, H. Debray, F. Porras, G. Alvarez, C. Agundis, P. Degand, E. Zenteno, Specificity of *Amaranthus leucocarpus* lectin for O-glycopeptides, *Biochim. Biophys. Acta* 1674 (2004) 282–290.
- [17] R. Lascurain, R. Chávez, P. Gorocica, A. Pérez, L.F. Montaña, E. Zenteno, Recognition of a CD4<sup>+</sup> mouse medullary thymocyte subpopulation by *Amaranthus leucocarpus* lectin, *Immunology* 83 (1994) 410–413.
- [18] G. Maldonado, P. Gorocica, C. Agundis, A. Pérez, J. Molina, E. Zenteno, Inhibition of phagocytic activity by the *N*-acetyl-D-galactosamine-specific lectin from *Amaranthus leucocarpus*, *Glycoconjugate J.* 15 (1998) 615–622.
- [19] P. Gorocica, R. Lascurain, P. Hernandez, F. Porras, S. Bouquetel, L. Vazquez, E. Zenteno, Isolation of the receptor for *Amaranthus leucocarpus* lectin from murine peritoneal macrophages, *Glycoconjugate J.* 15 (1998) 809–814.
- [20] R. Lascurain, F. Porras, R. Baez, R. Chávez, S. Martínez-Cairo, G. Alvarez, E. Zenteno, *Amaranthus leucocarpus* lectin recognizes human naive T cell subpopulations, *Immunol. Invest.* 26 (1997) 579–587.
- [21] B. Ortiz, F. Porras, P. Hernández, S. Martínez-Cairo, R. Lascurain, E. Zenteno, Differential expression of a 70 kDa O-glycoprotein on T cells: a possible marker for naive and early activated murine T cells, *Cell. Immunol.* 218 (2002) 34–45.
- [22] E. Zenteno, J.L. Ochoa, C. Parra, M. Montaña, B. Ruiz, R. Carvajal, *Machaerocereus eruca* and *Amaranthus leucocarpus* lectins: biological activity on immune response cells, in: T.C. Bog-Hansen, J. Breborowicz, W. de Gruyter (Eds.), *Lectins Biology*, Biochemistry Clinical Chemistry, vol. IV, 1985, pp. 437–445 (Berlin).
- [23] E. Zenteno, J.L. Ochoa, Isolation and purification of *Amaranthus leucocarpus* lectin on stroma column, *Phytochemistry* 27 (1988) 313–317.
- [24] D. Savage, G. Mattson, S. Desai, G. Nielander, S. Morgensen, E. Conklin (Eds.), *Avidin–Biotin Chemistry: A Handbook*, Pierce Chemical Company, Rockford IL, USA, 1992.
- [25] L. Hudson, F.C. Hay (Eds.), *Practical Immunology*, 2nd ed., Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1980.
- [26] J.W. Buckie, G.M.W. Cook, Specific isolation of surface glycoproteins from intact cells by biotinylated concanavalin A and immobilized streptavidin, *Anal. Biochem.* 156 (1986) 463–472.
- [27] F. Porras, R. Lascurain, R. Chávez, G. Alvarez, P. Hernández, H. Debray, E. Zenteno, Isolation of the receptor for *Amaranthus leucocarpus* lectin from murine naive thymocytes, *Glycobiology* 10 (2000) 459–465.
- [28] U.K. Laemmli, Cleavage of structural proteins during assembly of the bacteriophage T4, *Nature* 227 (1970) 680–685.
- [29] J.P. Zanetta, P. Timmerman, Y. Leroy, Gas–liquid chromatography of the heptafluorobutyrate derivatives of O-methyl-glycosides on capillary columns: a method for the quantitative determination of monosaccharide composition of glycoproteins and glycolipids, *Glycobiology* 9 (1999) 255–266.
- [30] B.A. Bidlingmeyer, S.A. Cohen, T.L. Tarvin, Rapid analysis of amino acids using pre-column derivatization, *J. Chromatogr.* 33 (1984) 93–104.



- [31] U. Hellman, C. Wernstedt, J. Gonez, C.H. Heldin, Improvement of an in gel digestion procedure for the micropreparation of internal protein fragments for amino acid sequencing, *Anal. Biochem.* 224 (1995) 451–455.
- [32] K. Vandenbroeck, I. Alloza, D. Brehmer, A. Billiau, P. Proost, N. McFerran, S. Rudiger, B. Walker, The conserved helix C region in the superfamily of interferon-gamma/interleukin-10-related cytokines corresponds to a high-affinity binding site for the HSP70 chaperone DnaK, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 25668–25676.
- [33] K. Ishikawa, T. Nagase, M. Suyama, N. Miyajima, A. Tanaka, H. Kotani, N. Nomura, O. Ohara, Prediction of the coding sequences of 100 new cDNA clones from brain which can code for large proteins in vitro, *DNA Res.* 5 (1998) 169–176.
- [34] C. Gross, I.G. Schmidt-Wolf, S. Nagaraj, R. Gastpar, J. Ellwart, L.A. Kunz-Schughart, G. Multhoff, Heat shock protein 70-reactivity is associated with increased cell surface density of CD94/CD56 on primary natural killer cells, *Cell Stress Chaperones* 8 (2003) 348–360.
- [35] L.E. Harrington, M. Galvan, L.G. Baum, J.D. Altman, R. Ahmed, Differentiating between memory and effector CD8 T cells by altered expression of cell surface O-glycans, *J. Exp. Med.* 191 (2000) 1241–1246.
- [36] J. Hernández, Y. Garfias, J. Reyes, R. Chávez, R. Lascrain, E. Zenteno, Peanut agglutinin (PNA) and *Amaranthus leucocarpus* (ALL) lectins discriminate between memory and naive porcine lymphocytes, *Vet. Immunol. Immunopathol.* 84 (2002) 71–82.
- [37] M. Croft, C. Dubey, Accessory molecule and costimulation requirements for CD4 T cell response, *Crit. Rev. Immunol.* 17 (1997) 89–118.
- [38] R. Testi, D. D'Ambrosio, R. De Maria, A. Santoni, The CD69 receptor: a multipurpose cell-surface trigger for hematopoietic cells, *Immunol. Today* 15 (1994) 479–483.
- [39] J. Hendicks, Y. Xiao, J. Borst, CD27 promotes survival of activated T cells and complements CD28 in generation and establishment of the effector T cell pool, *J. Exp. Med.* 198 (2003) 1369–1380.
- [40] R.Q. Hintzen, Characterization of the human CD27 ligand, a novel member of TNF gene family, *J. Immunol.* 152 (1994) 1762–1773.
- [41] S.K. Kundu, J. Menezes, Role of *Vicia villosa*-adherent CD8+ T cells in the immune response to Epstein–Barr virus, *Viral Immunol.* 4 (1991) 23–32.
- [42] S. Schoenbeck, M.J. Hammen, M.F. Kagnoff, *Vicia villosa* agglutinin separates freshly isolated Peyer's Patch T cells into interleukin 5- or interleukin 2-producing subsets, *J. Exp. Med.* 169 (1989) 1491–1496.

## DISCUSIÓN GENERAL

Se estima que de un 50% a un 90% de las proteínas del cuerpo humano tienen modificaciones postraduccionales. Estas modificaciones son necesarias para la función biológica de una gran cantidad de proteínas que las poseen y para las funciones efectoras de las células en las cuales se expresan dichas proteínas (Doyle y Mamula 2001). Varias de estas modificaciones afectan algunas funciones del sistema inmunológico como son la tolerancia (Mamula *et al.*, 1999; Meadows *et al.*, 1997), el reconocimiento de antígenos tumorales por parte de las moléculas del MHC clase I (Skipper *et al.*, 1996), además de participar en una respuesta inmunológica adecuada (Xu y Weiss, 2002; Zarlign *et al.*, 2000, Haurum *et al.*, 1999). Una de las principales modificaciones mediadas por enzimas a las que son sometidas las proteínas, es la glicosilación; de esta manera los oligosacáridos unidos a las proteínas modifican la estructura y función de éstas y contribuyen en la regulación del comportamiento celular.

Las estructuras O-glicosiladas sobre la superficie celular de los leucocitos en general y linfocitos T en particular han mostrado tener una participación importante en fenómenos de la respuesta inmune, tales como el reconocimiento celular durante la inflamación (Ellies *et al.*, 1998), la activación de los linfocitos T (Piller *et al.*, 1988), la adhesión intercelular (Ardman *et al.*, 1992), la presentación antigénica (Tsuboi, y Fukuda, 1997), la cooperación celular entre linfocitos T y B (Tsuboi y Fukuda, 1998) y la apoptosis de los timocitos corticales durante los procesos de selección (Galvan *et al.*, 2000; Nyugen *et al.*, 2001). Las estructuras O-glicosídicas pueden ser parte de glicoproteínas de membrana o estar unidas a lípidos. Las principales O-

glicoproteínas que se conocen y que han sido más estudiadas son CD43 y CD45, sin embargo existen otras glicoproteínas que presentan dominios de mucina como son CD44, CD46 y CD55 entre otras. Cada vez se conoce más acerca de la función que tienen los O-glicanos en la fisiología de las células del sistema inmune y cómo los diferentes grados de O-glicosilación influyen en ésta (Harrington *et al.*, 2001). Se han observado glicoproteínas que presentan tramos altamente O-glicosilados, tal es el caso de CD43 y CD45, y cómo el grado de ramificación y de sialilación de estos tramos afecta la función de la molécula y por tanto la fisiología de la célula (Onami *et al.*, 2002; Baum *et al.*, 1995; Lefebvre *et al.*, 1994). Por otro lado se conocen glicoproteínas que presentan O-glicanos esparcidos en su estructura como es el caso de la glicoforina (Pisano *et al.*, 1993,) presente en los eritrocitos, y la fetuína (Dziegielewska *et al.*, 1990), de las cuales no se ha dilucidado del todo el papel que juegan los O-glicanos.

En el presente trabajo se purificaron y caracterizaron dos glicoproteínas que fueron reconocidas por la lectina de *Amaranthus leucocarpus*, específica para GalNAc y que reconoce O-glicanos de tipo núcleo 1 (Gal $\beta$ 1,3GalNAc $\alpha$ Ser/Thr) (Hérendez *et al.*, 1999); una de ellas fue aislada a partir de timocitos murinos y la otra a partir de linfocitos T humanos. La glicoproteína presente en timocitos de ratón reconocida por la lectina de amaranto es una glicoproteína de 70 kDa con un 20% de azúcares que contiene principalmente ácido aspártico, ácido glutámico, serina, prolina y glicina; posee 88 residuos de serina o treonina que representan sitios potenciales de O-glicosilación. No se encontró cisteína. La cantidad de prolina que presenta es significativa, se ha observado la importancia de este residuo

en la unión de la polipéptido GalNAc transferasa (GalNAcT). La fracción sacarídica del receptor presenta principalmente GalNAc y galactosa y en menor proporción GlcNAc, manosa y ácido siálico. Al analizar esta glicoproteína por cromatografía de intercambio iónico se encontró que presenta 3 isoformas cuya composición de aminoácidos es casi idéntica y las principales diferencias entre ellas se observaron en la concentración de azúcares y en el grado de sialilación, lo cual sugiere que la diferencia en la glicosilación podría estar determinando las diferentes isoformas. El amino terminal del receptor tímico para la lectina (ALLTr) así como sus isoformas está bloqueado. Al realizar el análisis de péptidos por MALDI-TOF y comparando los péptidos de las fracciones digeridas con tripsina, con los obtenidos de la base de datos del NCBI, (Pro-Found) los péptidos identificados mostraron un grado de identidad bajo con tres proteínas: 17% con una proteína llamada KIAA0659, la cual es una secuencia obtenida de cDNA de clonas de cerebro; 10% con el receptor tipo II del factor de crecimiento transformante (TGF $\beta$ ) y un 7% con una proteína asociada a los dominios de muerte de FAS. Los timocitos ALL<sup>+</sup> representan el 5% ( $\pm 0.3$ ) del total de timocitos. Al realizar el estudio de fenotipo se encontró que los timocitos presentan primordialmente un fenotipo maduro CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> (83%) y sin activar CD45RB<sup>+</sup> (90%), posiblemente se trata de timocitos maduros a punto de salir a la periferia.

En los linfocitos T humanos, la glicoproteína reconocida por ALL tiene un peso de 70 kDa y un 20% de azúcares que contiene principalmente serina, glicina y ácido glutámico, también posee treonina y prolina en porcentajes considerables; la cantidad total de treonina y serina es de 148. Carece de residuos de cisteína. La presencia de los aminoácidos serina, treonina y

prolina indica que esta glicoproteína es susceptible de O-glicosilarse. Al analizar la composición de azúcares se observó que GalNAc es el principal residuo y se encontraron en menor proporción galactosa, manosa, GlcNAc y ácido siálico. La glicoproteína reconocida por ALL presenta 4 isoformas, las cuales se pueden separar por cromatografía de intercambio iónico y también fueron detectadas en el análisis de electroforesis de doble dimensión. El amino terminal del receptor de ALL así como de sus isoformas está bloqueado. En el análisis de péptidos por MALDI-TOF, los péptidos identificados en la base de datos de la NCBI (ProFound) mostraron algún grado de identidad con tres proteínas: un 54% con una chaperona llamada DNaK, 47% con la proteína KIAA y un 44% con la proteína de choque térmico 8. ALL reconoció un 7% ( $\pm 2$ ) de los linfocitos T, estos linfocitos T ALL<sup>+</sup> fueron principalmente CD4<sup>+</sup> (73%), con un 20.3% CD8<sup>+</sup> y presentaron un fenotipo virgen CD45RA<sup>+</sup> (41%) en mayor proporción que uno activado CD45RO<sup>+</sup> (14%).

Se han descrito cambios en la expresión de O-glicanos sobre los linfocitos T en diferentes estados de diferenciación y/o activación (Onami *et al.*, 2002, Baum *et al.*, 1995, Gillespie *et al.*, 1993, Piller *et al.*, 1988), lo cual sugiere que las células vírgenes o en estado de reposo presentan marcadores que modifican sus O-glicanos al activarse; esto se puede deber a la existencia de mecanismos relacionados con la expresión de las O-glicosiltransferasas, asociados a la activación y que los productos finales de esta modificación post-traducciona l indiquen una pérdida de la virginidad de los linfocitos T. Varias proteínas de membrana de los linfocitos T son reconocidas como marcadores de virginidad o de activación y memoria (Dutton *et al.*, 1998; Mackay, 1993, Morimoto y Schlossman, 1993), entre ellas se encuentra CD45 la cual presenta

distintas isoformas debido a su grado de O-glicosilación, dependiendo si se expresa en linfocitos T vírgenes (CD45RA en humanos y CD45RB en ratón) o en linfocitos ya activados o de memoria (CD45R0); la cadena  $\alpha$  del receptor para IL-2 o CD25, que se expresa una vez que la célula se ha activado, y CD69 que se considera un marcador de actividad muy temprana. ALL reconoce timocitos medulares murinos (Lascurain *et al.*, 1994), macrófagos peritoneales murinos no activados (Maldonado *et al.*, 1998; Gorocica *et al.*, 1998), linfocitos T humanos vírgenes (Lascurain *et al.*, 1997), linfocitos murinos vírgenes o activados tempranamente; se ha observado que la mayoría de los linfocitos T murinos reconocidos por ALL presentan un fenotipo CD62L<sup>hi</sup>CD45RB<sup>hi</sup>CD44<sup>lo/</sup>, es decir con características de células vírgenes (Ortiz *et al.*, 2002). En el presente trabajo las células ALL<sup>+</sup> en ambas especies muestran marcadores en una modalidad de linfocito T virgen, el 90% de los timocitos murinos fueron CD45RB<sup>+</sup>. En humano solo el 13% de los linfocitos T fueron CD69<sup>+</sup> y 26% CD25<sup>+</sup>, la proporción de linfocitos T ALL<sup>+</sup> CD45RA<sup>+</sup> fue mayor (41%) que la que presentó un fenotipo de memoria CD45R0<sup>+</sup> (14%). Lo anterior sugiere que la glicoproteína que reconoce ALL está presente principalmente en linfocitos T vírgenes o en reposo.

Ambos receptores tienen un peso de 70 kDa y presentan un 20% de azúcares; contienen residuos sacarídicos propios de O-glicanos en mayor proporción, si bien también muestran residuos como GlcNAc y manosa, los cuales pertenecen a estructuras N-glicosídicas. Los dos contienen ácido siálico. Uno y otro receptores mostraron una cantidad importante de residuos de treonina y serina (potenciales sitios de O-glicosilación) y también una cantidad significativa de prolina, la cual se ha visto que es importante para la

unión de la polipéptido GalNAc transferasa (GalNAcT); tanto el receptor presente en ratón como el de humano carecen de residuos de cisteína, lo cual indica que estas proteínas no presentan puentes disulfuro que le puedan conferir una conformación terciaria. El amino terminal del receptor para amaranto en ambas especies se encuentra bloqueado. Tanto el receptor para amaranto en ratón como en humano presentan varias isoformas las cuales se pueden separar por intercambio iónico, el receptor de ratón contiene 3 isoformas y el de humano 4. En el caso de ratón, la composición de aminoácidos de las 3 isoformas fue casi idéntico y las principales diferencias entre ellas se observaron en la concentración de azúcares y en el grado de sialilación, lo cual sugiere que la diferencia en la glicosilación podrían estar determinando las diferentes isoformas en ambos receptores. Estos dos receptores presentan proporciones diferentes de aminoácidos en su composición y en particular en los aminoácidos que participan en la O-glicosilación; no obstante, puede tratarse de la misma molécula, con diferencias debido a la distancia filogenética que existe entre ambas especies.

Existen O-glicoproteínas cuya función es modulada por las diferencias en la O-glicosilación y por el grado de sialilación. CD44 es una molécula de adhesión que actúa como el principal receptor del ácido hialurónico y que se encuentra en la superficie de la mayor parte de tipos celulares, además participa en muchos procesos biológicos y patológicos como la residencia (“homing”) de los linfocitos (Matsuki *et al.*, 2003). Se ha planteado que CD44 existe por lo menos en tres fases: como receptor transmembranal, como componente integral de la matriz extracelular y como proteína soluble que se encuentra en los fluidos del cuerpo; cada una de estas fases con funciones

biológicas diferentes (Cichy *et al.*, 2003). La transición de una isoforma inactiva a otra activa incluye, entre otras modificaciones, la glicosilación (Ponta *et al.*, 2003). La liberación espontánea del CD44 soluble es dependiente de la presencia de O-glicosilación parcial o completa de cuatro motivos de serina-glicina localizados en el ectodominio proximal a la membrana de CD44 (Gasbarri *et al.*, 2003). En el caso de la proteína cofactor de membrana (MCP) o CD46, las seis clases de cDNA identificadas difieren en la composición y el largo de un dominio extracelular, rico en serina, treonina y prolina, que es un sitio profusamente O-glicosilado (Post *et al.*, 1991). CD55 o factor de decaimiento acelerado (DAF) es una O-glicoproteína de membrana unida por un glicofosfolípido, encontrada en la mayor parte de las células. Al parecer los sitios O-glicosilados definen el nivel de expresión de esta molécula sobre la membrana celular, ya que al no estar presentes, DAF es roto de forma proteolítica tan pronto como alcanza la superficie celular (Reddy *et al.*, 1989). Para que las células T sean susceptibles a apoptosis mediada por galectina-1 deben expresar receptores glicoproteícos como CD7, el cual presenta oligosacáridos específicos para la galectina-1. CD7 se deja de expresar en los linfocitos T en el síndrome de Sezary y en la micosis fungoides (Scala *et al.*, 1999). Las células de Sezary son linfoproliferaciones cutáneas en estas dos patologías. En lesiones primarias y en líneas celulares de T, se ha demostrado la presencia de un "glicotipo" con O-glicanos núcleo 1 sialilados que promueven una resistencia a la galectina-1. (Roberts *et al.*, 2003). La expresión de CD7 es necesaria pero no suficiente para inducir la muerte mediada por galectina-1 de las líneas celulares de Sezary. Es muy probable que de forma similar, las distintas isoformas del receptor para ALL, con sus diferentes grados de O-



glicosilación y de sialilación, representen un medio de regular la actividad celular. En el modelo murino se ha encontrado que la expresión de enzima C2GnT está restringida a los timocitos corticales (Baum *et al.*, 1995); esta glucosaminil-transferasa permite la ramificación de los oligosacáridos sobre los O-glicanos, en tanto que los timocitos medulares expresan la enzima ST3Gal I (Kono *et al.*, 1997), la cual se une al antígeno T impidiendo que los O-glicanos se ramifiquen. Los O-glicanos ramificados a partir de la acción de la C2GnT forman secuencias lactosamínicas que son los receptores de la galectina-1, una lectina dimérica soluble la cual induce apoptosis en los timocitos corticales. Con la competencia que presenta la ST3Gal por el mismo sustrato impide esta ramificación en los timocitos medulares y por tanto puede estar impidiendo la apoptosis de estos timocitos reconocidos por ALL (Álvarez *et al.*, 1999). La mayoría de las células ALL<sup>+</sup> (73%) fueron CD27<sup>+</sup>. Este último marcador es el ligando de CD70 que es un miembro de la familia del TNF (Hendricks *et al.* 2003, Hlnzten, 1994) y se expresa principalmente en los linfocitos B, lo cual sugiere que el receptor para amaranto sobre los linfocitos T podría estar participando en las interacciones entre linfocitos T y B.

Los marcadores de residencia (“homing”) de los linfocitos T presentan patrones de expresión variables de acuerdo a su estado de diferenciación y activación; el patrón de unión de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> a ALL coincide con los observado en estos marcadores (Ortiz *et al.*, 2002), los cuales inicialmente se expresan en el estado simple positivo en la medula tímica y en los linfocitos T periféricos pero son regulados negativamente una vez que se han encontrado con su antígeno correspondiente en los órganos linfoides secundarios (Mackay

*et al.*, 1993), lo cual sugiere que ALLr podría ser relevante en la recirculación de los linfocitos T CD8<sup>+</sup>.

Tomados en su conjunto estos datos establecen que el receptor para amaranto es una O-glicoproteína de 70 kDa que contiene un 20% de azúcares, la cual presenta varias isoformas basadas en su grado de glicosilación y que podría tratarse de una glicoproteína semejante en ambas especies, ratón y humano. El grado de identidad que muestra con otras proteínas ya conocidas sugiere que se trata de un marcador molecular nuevo, presente principalmente en linfocitos T vírgenes o en reposo.

## CONCLUSIONES

§ El ALLr es una O-glicoproteína de 70 kDa con un 20% de azúcares y está presente en timocitos murinos y en linfocitos T humanos.

§ Los carbohidratos presentes en el receptor para la lectina de amaranto (ALLr) en ambas especies son tipo O-glicosídico.

§ El ALLr presenta varias isoformas tanto en timocitos murinos como en linfocitos T humanos. Es posible que estas isoformas se deban principalmente al grado de glicosilación de la proteína y particularmente al grado de sialilación.

§ La glicoproteína reconocida por la lectina de *Amaranthus leucocarpus* se encuentra principalmente en linfocitos T vírgenes o en reposo.

§ Debido al grado de identidad que presenta con otras glicoproteínas se sugiere que ALLr es un marcador fenotípico nuevo.

## **PERSPECTIVAS**

§ Secuenciación de aminoácidos de las glicoproteínas reconocidas por la lectina de *Amaranthus leucocarpus*.

§ Determinación de la participación del receptor de la lectina de *Amaranthus leucocarpus* en la transducción de señales.

§ Estudio del receptor de la lectina de *Amaranthus leucocarpus* como marcador fenotípico de distintos estadios de maduración y activación, así como en diversos estados patológicos.

## BIBLIOGRAFÍA

- \* Álvarez, G., Lascurain, R., Hernández-Cruz, P., Tetaert, D., Degand, P., Gorocica, P., Espinosa, B., Zenteno, E., Chávez, R. (2006). Differential O-glycosilation in cortical and medullary thymocytes. *Biochim. Biophys. Acta* 1760: 1235-1240.
- \* Álvarez, G., Lascurain, R., Pérez, A., Degand, P., Montaña, L.F., Martínez-Cairo, S., y Zenteno, E. (1999). Relevance of sialoglycoconjugates in murine thymocytes during maturation and selection un thymus. *Immunol. Invest.* 28: 9-18.
- \* Ardman, B., Sikorski, M.A., Staunton, D. E. (1992). CD43 interferes with T-lymphocyte adhesion. *Proc Natl Acad. Sci. USA* 89: 5001.
- \* Baum, L., Pang, M., Perillo, n., Wu, T., Delegeane, A., Uittenbogaart, C.H., Fukuda, M., Seilhamer, J.J. (1995). Human thymic epithelial cells express an endogenous lectin, galectin-1, which binds to core 2 O-glycans on thymocytes and lymphoblastoids cells. *J. Exp. Med.* 181: 877-887.
- \* Barondes, S.H. (1981). Lectins: Their multiple endogenous cellular functions. *Ann. Rev. Biochem.* 50: 207-231.
- \* Carlsson, S.R. and Fukuda, M. (1986) Isolation and characterization of leukosialin, a mayor syaloglycoprotein on human leukocytes. *J. Biol. Chem.* 261: 12779-12786
- \* Cichy, J. and Pure E. (2003). The liberation of CD44. *J. Cell Biol.* 161: 839-843.
- \* Croft, M., Dubey, C., (1997). Accesory molecule and costimulation requirements for CD4 T cell response. *Crit. Rev. Immunol.* 17: 89-118.

\* Dalziel, M., Whitehouse, C., McFarlane, Brockhausen, I., Gschmeissner, S., Schwientek, T., Clausen, H., Burchell, J. M., and Taylor-Papadimitriou, J. (2001). The relative activities of the C2GnT1 and ST3Gal-I glycosyltransferases determine O-Glycan structure and expression of a tumor-associated epitope on MUC1. *J. Biol. Chem.* 276: 11007–11015.

\* Daniels, M.A., Devine, L., Miller, J.D., Moser, J.M., Lukacher, A.E., Altman, J.D., Kavathas, P., Hogquist, K.A. and Jameson, S.C. (2001). CD8 binding to MHC class I molecules is influenced by T cell maturation and glycosylation. *Immunity* 15: 1051-1061.

\* De Dios, I., Manso, M., Leon, V., and Lopez Borrascas, A. (1986) Separation of human lymphocytes subclasses by rosettes with latex-lectin particules. *Biochem. Med. Metab. Biol.* 35: 12-17.

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

\* Doyle, H.A. and Mamula, M.J. (2001). Post-translational protein modifications in antigen recognition and autoimmunity. *Trends in Immunol.* 22: 443-449.

\* Dutton, R.W., Bradley, L.M., Swain, S.L. (1998). T cell memory. *Annu. Rev. Immunol.* 16: 201-223.

\* Dziegielewska, K.M., Brown, W.M., Casey, S., Christie, D.L., Foreman, R.C. Hill, R.M. and Saunders N.R. (1990). The complete cDNA amino acid sequence of bovine fetuin. *J. Biol. Chem.* 265: 4354-4357.

- \* Ellies L.G., Tsuboi S., Petryniak B., Lowe J.B., Fukuda M. y Marth J.D. (1998). Core 2 oligosaccharide biosynthesis distinguishes between selectin ligands essential for leukocyte homing and inflammation. *Immunity* 9: 881-890.
- \* Feizi, T. (1985). Demonstration by monoclonal antibodies that carbohydrate structures of glycoproteins and glycolipids are onco-developmental antigens. *Nature* 314: 53-57.
- \* Fernandes-Alnemri, T., Armstrong, R.C., Krebs, J., Srinivasula, S.M., Wang, L., Bullrich, F., Fritz, L.C., Trapani, J.A., Tomaselli, K.J., Litwack, G., and Alnamri, 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., Walker, J., Lefrancois, M., Lehner, T. (1994). The expression of carbohydrate antigens on activated T cells and in autoimmune diseases. *Scand. J. Immunol.* 40: 636-642.
- \* 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. Med.* 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.
- \* Fukuda, M. (1991). Leukosialin, a mayor O-glycan-containing sialoglycoprotein defining leukocyte differentiation and malignancy. *Glycobiology* 1: 347-356.
- \* Fukuda, M. (1985). Cell surface glycoconjugates as onco-differetiation markers in hematopoietic cell. *Biochim. Biophys. Acta* 780: 119-150.

- \* Galvan, M., Muralihrishna, K., Baum, L.G., Ahmed, R. (1998) Alterations in cell surface carbohydrates on T cells from virally infected mice can distinguish effector/memory CD8(+) T cells from naïve T cells. *J. Immunol.* 161:641-648.
- \* Gasbarri, A., Del Prete, F., Girnita, L., Martegani, M.P., Natali, P.G., Bartolazzi, A. (2003). CD44s adhesive function spontaneous and PMA-inducible CD44 cleavage are regulated at post-translational level in cells of melanocytic lineage. *Melanoma Res.* 13:325-337
- \* Gillespie, W., Paulson, J.C., Kelm, S., Pang, M., Baum, L.G. (1993). Regulation of  $\alpha$ 2,3-sialyltransferase expression correlates with conversion of peanut agglutinin (PNA<sup>+</sup>) to PNA<sup>-</sup> phenotype in developing thymocytes. *J. Biol. Chem.* 268: 3801-3811.
- \* Gorocica, P., Lascurain, R., Hernández, P., Porras, F., Bouquelet, S., Vázquez, L., and Zenteno, E. (1998) Isolation of the receptor for *Amaranthus leucocarpus* lectin from murine peritoneal macrophages. *Glycoconj. J.* 15: 809-814.
- \* Gross, C., Schmidt-Wolf, I.G., Nagaraj, S., Gastpar, R., Ellwart, J., Kunz-Schughart, L.A., Multhoff, G. (2003). Heat shock protein 70-reactivity is associated with increased cell surface density of CD94/CD56 on primary natural killer cells. *Cell Stress Chaperones.* 8: 348-360.
- \* Hanisch, F. G., Uhlenbruck, G., Peter-Katalinic, J., Egge, H., Dabrowski, J., and Dabrowski, U. (1989). Structures of neutral O-linked polylactosaminoglycans on human skim milk mucins. A novel type of linearly extended poly-N-acetyllactosamine backbones with Gal $\beta$ (1-4)GlcNAc $\beta$ (1-6) repeating units. *J. Biol. Chem.* 264, 872–883.



- \* Harrington, L.E., Galvan, M., Baum, L.G., Altman, J.D., Ahmed, R. (2000). Differentiating between memory and effector T CD8 T cells by altered expression of cell surface O-glycans. *J. Exp. Med.* 191: 1241-1246.
- \* Haurum, J.S., Hoier, I.B., Arsequell, G., Neisig, A., Valencia, G., Zeuthen, J., Neefjes, J., Elliott, T. (1999). Presentation of cytosolic glycosylated peptides by human class I major histocompatibility complex molecules in vivo. *J. Exp. Med.* 190: 145-150.
- \* Hellstrom, U., Hammarstrom, M.L. Hammarstrom, S., Permann, P. (1984) Fractionation of human lymphocytes on *Helix pomatia* hamagglutinin-sepharose and wheat germ agglutinin-sepharose. *Methods enzymol.* 108: 153-168.
- \* Hendricks, J., Xiao, Y., Borst, J. (2003). CD27 promotes survival of activated T cells and complements CD28 in generation and establishment of the effector T cell pool. *J. Exp. Med.* 198: 1369-1380.
- \* Hernández, P., Tetaert, G., Vergoten, G., Debray, H., Porras, F., Alvarez, G., Agundis, C., Degand, P., Zenteno, E. (2004). Specificity of *Amaranthus leucocarpus* lectin for O-glycopeptides. *Biochim. Biophys. Acta* 1674: 282-290.
- \* Hernández; P., Bacilio, M., Porras, F., Juárez, S., Debray, H., Zenteno, E., Ortiz, B. (1999). A comparative study on the purification of *Amaranthus leucocarpus syn. hypocondriacus* lectin. *Prep. Biochem. & Biotechnol.* 29: 219-234.
- \* Hintzen, R.Q. (1994). Characterization of the human CD27 ligand, a novel member of TNF gene family. *J. Immunol.* 152: 1762-1773.
- \* Hounsell, E.F., Davies, M.J., and Renouf, D.V. (1996). O-linked protein glycosylation structure and function. *Glycoconjugate J.* 13: 19-26.

- \* Ishikawa, K., Nagase, T., Suyama, M., Miyajima, N., Tanaka, A., Kotani, H., Nombra 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.
- \* Jentoft, N. (1990). Why are proteins O-glycosylated? *TIBS* 15: 291-294.
- \* Johnson, N.A., Meyer, C.M., Pingel, J.T., and Thomas, M.L. (1989). Sequence conservation in potential regulatory regions of the mouse and human leukocyte common antigen gene. *J. Biol. Chem.* 264: 6220-6229.
- \* Kono, M., Ohyama, Y., Lee, Y.C. Hamamoto, T., Kojima, N., and Tsuji, S. (1997). Mouse beta-galactoside alpha2,3-syalil transferase comparison in vitro substrate specificities and tissue specificity expression. *Glycobiology* 7(4): 469-479.
- \* Kundu, S.K., and Menezes, J. (1991). Role of *Vicia villosa*-adherent CD8+ T cells in the immune response to Epstein-Barr virus. *Viral Immunol.* 4: 23-32.
- \* Lascurain, R., Porras, F., Baez, R., Chávez, R., Martínez-Cairo, S., Álvarez, G., and Zenteno E. (1997) *Amaranthus leucocarpus* lectin recognizes human naive T cell subpopulations. *Immunol. Invest.* 26: 579-587.
- \* Lascurain, R., Chávez, R., Gorocica, P., Pérez, A., Montaña, L.F., and Zenteno, E. (1994) Recognition of a CD4<sup>+</sup> mouse medullary thymocytes subpopulation by *Amaranthus leucocarpus* lectin. *Immunology* 83: 410-413.
- \* Leahy, D.J., Axel. R., and Hendrickson, W.A. (1992). Crystal structure of a soluble form of the human T cell coreceptor CD8 at 2.6 Å resolution. *Cell* 68:1145-1162.

- \* Lefebvre, J.C., Giordanengo, V., Limouse, M., Doglio, A., Cucchiarini, M., Monpoux, F., Mariani, R., and Peyron, J.F. (1994). Altered glycosylation of leukosialin, CD43, in HIV-1-infected cells of the CEM line. *J. Exp. Med.* 189: 1609-1617.
- \* Lis, H., Sharon, N. (1986). Lectins as molecules and as tools. *Ann. Rev. Biochem.* 55: 35-67.
- \* Lloyd, K. O., Burchell, J., Kudryashov, V., Yin, B. W. T., and Taylor-Papadimitriou, J. (1996). Comparison of O-linked carbohydrate chains in MUC-1 mucin from normal breast epithelial cell lines and breast carcinoma cell lines. Demonstration of simpler and fewer glycan chains in tumor cells. *J. Biol. Chem.* 271, 33325–33334.
- \* Mackay, C.R. (1993). Homing of naive, memory and effector lymphocytes. *Curr. Opin. Immunol.* 5:423-427.
- \* Maldonado, G., Gorocica, P., Agundis, C., Pérez, A., Molina, J., Zenteno, E. (1998). Inhibition of phagocytic activity by the N-acetyl-D-galactosamine-specific lectin from *Amaranthus leucocarpus*. *Glycoconjugate J.* 15: 615-622.
- \* Mamula, M.J., Gee, R.J., Elliott, J.I., Sette, A., Southwood, S., Jones, P.J., Blier, P.R. (1999). Isoaspartyl post-translational modification triggers autoimmune responses to self-proteins. *J. Biol. Chem.* 274: 22321-22327.
- \* Matsuki, H., Yonesawa, K., Obata, K., Iwata, k., Nakamura, H., Okada, Y., and Siki, M. (2003). Monoclonal antibodies with defined recognition sequences in the stem region of CD44: Detection of differential glycosylation of CD44 between tumor and stromal cells in tissue. *Cancer Res.* 63: 8278-8283.

\* Meadows, L., Wang, W., den Haan, J.M., Blokland, E., Reinhardus, C., Drijfhout, J.W., Shabanowitz, J., Pierce, R., Agulnik, A.I., Bishop, C.E., Hunt, D.F., Goulmy, E., Engelhard, V.H. (1997). The HLA-A\*0201-restricted H-Y antigen contains a posttranslationally modified cysteine that significantly affects T cell recognition. *Immunity* 6: 273-281.

\* Moody, A.M., North, S.J., Reinhold, B., Van Dyken, S.J., Rogers, M.E., Panico, M., Dell, A., Morris, H.R., Marth, J.D., and Reinherz, E.L. (2003). Sialic acid capping of CD8 beta core 1-O-glycans controls thymocytes-major histocompatibility complex class I interaction. *J. Biol. Chem.* 278: 7240-7246.

\* Moody, A.M., Chui, D., Reche, P.A., Priatel, J.J., Marth, J.D., and Reinherz, E.L. (2001). Developmentally regulated glycosylation of the CD8 $\alpha\beta$  co-receptor stalk modulates ligand binding. *Cell* 107: 501-512.

\* Morimoto, C. and Schlossman, S.F. (1993). Human naive and memory T cells revisited: new markers (CD31 and CD27) that help define CD4+ T cell subsets. *Clin. Exp. Reumatol* 11(3): 241-247.

\* Muroi, K., Amemiya, Y., Sievers, E.L., Miura, Y., Hakamori, S.E., and Loken, M.R. (1997) Expression of sialosyl-T and disialosyl T antigens in erythroid cells. *Leukemia Lymphoma* 25: 403-414.

\* Nesser, R., Koellreutter, B., Wuersch, P. (1986). Oligomanoside type glycopeptides inhibiting adhesion of *Escherichia coli* strains mediated by type 1 pili. Preparation of potent inhibitors from plant glycopeptides. *Infect. Immunol* 52: 428-436.

- \* Nguyen, J.T., Evans, D.P., Galvan, M., Pace, K.E., Leitenberg, D., Bui, T.N., Baum, L.G. (2001). CD45 modulates galectin-1-induced T cell death: regulation by expression of core 2 O-glycans. *J. Immunol.* 167: 5697-5707.
- \* Onami, T.M., Harrington, L.E., Williams, M.A., Galvan, M., Larsen, C.P., Pearson, T.C., Manjunath, N., Baum, L.G., Pearce, B.D., and Ahmed, R. (2002). Dynamic regulation of T Cell immunity by CD43. *J. Immunol.* 168: 6022–6031.
- \* Ortiz, B., Porras, F., Hernández, P., Martínez-Cairo, S., Lascurain, R., Zenteno, E. (2002). Differential expression of a 70 kDa O-glycoprotein on T cells: a possible marker of naive and early activated murine T cells. *Cell. Immunol.* 218: 34-45.
- \* Peacock, J.S., Colsky, A.S., Pinto, V.B. (1990) Lectins and antibodies as tools for studying cellular interactions. *J. Immunol Methods* 126: 147-157.
- \* Perillo, N.L., Pace, K.E., Seilhamer, J.J., Baum, L.G. (1995). Apoptosis of T cells mediated by galectin-1. *Nature* 378: 736-739.
- \* Piller, F., Le Deist, F., Weinberg, K.I., Parkman, R., and Fukuda, M. (1991). Altered O-glycan synthesis in lymphocytes from patient with Wiskott-Aldrich syndrome. *J. Exp. Med.* 173: 1501-1510.
- \* Piller, F., Piller, V., Fox, R.I., and Fukuda, M. (1988). Human T-lymphocyte activation is associated with changes in O-glycan synthesis. *J. Biol. Chem.* 263: 15146-15150.
- \* Pisano, A., Redmond, J.W., Williams, K.L., Gooley, A.A. (1993). Glycosylation sites identified by solid-phase Edman degradation: O-linked glycosylation motifs on human glycophorin A. *Glycobiology* 3:429-435.

\* Ponta, H. Sherman, L. and Herrlich, P.A. (2003). CD44: from adhesion molecules to signalling regulators. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4: 33-45.

\* Porras, F. Efectos biológicos de la lectina de *Amaranthus leucocarpus*. Tesis de Licenciatura. Noviembre de 1992. Facultad de Ciencias, UNAM.

\* Post, T.W., Liszewski, M.K., Adams, E.M., Tedja, I., Miller, E.A., Atkinson, J.P. (1991). Membrane cofactor protein of the complement system: alternative splicing of serine/threonine/proline-rich exons and cytoplasmic tails produces multiple isoforms that correlate with protein phenotype. *J. Exp. Med.* 174: 93-102.

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

\* Reddy, P., Caras, I., Krieger, M. (1989). Effects of O-linked glycosylation on the cell surface expression and stability of decay-accelerating factor, a glycopospholipid-anchored membrane protein. *J. Biol. Chem.* 264: 17329-17336

\* Reisner, Y., and Sharon, N. (1984) Fractionation of subpopulations of mouse and human lymphocytes by peanut agglutinin or soybean agglutinin. *Methods Enzymol.* 108: 168-179.

\* Reisner, Y. (1983). Differential agglutination by soybean agglutinin of human leukaemia and neuroblastoma cell lines: potential application to autologous bone marrow transplantation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:6657-6661.

- \* Reisner, Y., Ravid, A., Sharon, N. (1976b). Use of soybean agglutinin for the separation of mouse B and T lymphocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 72: 1585-1591.
- \* Reisner, Y., 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.
- \* Roberts, A.A., Amano, M., Felten, C., Galvan, M., Sulur, G., Pinter-Brown, L., Dobbeling, U., Burg, G., Said, J., Baum, L.G. (2003). Galectin-1-mediated apoptosis in mycosis fungoides: the roles of CD7 and cell surface glycosylation. *Mod. Pathol.* 16: 543-551.
- \* Saitoh, O., Piller, F., Fox, R.I., and Fukuda, M. (1991). T-lymphocyte leukemia expresses complex branched O-linked oligosaccharides on major sialoglycoprotein, leukosialin. *Blood* 77:1491-1499.
- \* Scala, E., Russo, G., Cadoni, S., Narducci, M.G., Girardelli, C.R., De Pita, O., and Puddu, P. (1999) . Skewed expression of activation, differentiation and homing-related antigens in circulating cells from patients with cutaneous T cell lymphoma associated with CD7 - T helper lymphocytes expansion. *J. Invest. Dermatol.* 113: 622.
- \* Schachter, H., and Brockhausen, I. (1992). The biosynthesis of serine (threonine)-N-acetylgalactosamine-linked carbohydrate moieties. In *Glycoconjugates. Composition, Structure, and function.* Eds. Allen, H.J. and Kisailus, E.C. Edit. Marcel Dekker, New York EUA. Pags. 263-332.

- \* Schoenbeck, S., Hammen, M.G., Kagnoff, M.F. (1989). *Vicia villosa* agglutinin separates freshly isolated Peyer's patch T cells into interleukin 5- or interleukin 2-producing subsets. *J. Exp. Med.* 169: 1491-1496.
- \* Sempowski, G.D., Lee, D.M., Kaufman, R. E., and Haynes B. F. (1999). Structure and function of the CD7 molecule. *Crit. Rev. Immunol.* 19: 331.
- \* Shanker, P.N., Wilkinson, K.D. Goldstein, I. (1976). An N-acetylglucosamine binding lectin from *Bandereia simplicifolia* seeds. *Arch. Biochem. Biophys.* 177: 330-333.
- \* Sharon, N. (1983) Lectin receptors as lymphocyte surface markers. *Adv. Immunol* 34: 213-218.
- \* Shimizu, Y., and Shaw, S. (1993). Mucins in the mainstream. *Nature* 366: 630-631.
- \* Skipper, J.C., Hendrickson, R.C., Gulden, P.H., Brichard, V., Van Pel, A., Chen, Y., Shabanowitz, J., Wolfel, T., Slingluff, C.L. Jr., Boon, T., Hunt, D.F., Engelhard, V.H. (1996). An HLA-A2-restricted tyrosinase antigen on melanoma cells results from posttranslational modification and suggests a novel pathway for processing of membrane proteins. *J. Exp. Med.* 183: 527-534.
- \* Sprent, J. (1989) In Paul, W.E. (Ed.), *T Lymphocytes and the Thymus. Fundamental Immunology*, Second edition. Raven Press, New York, pp 69-93.
- \* Susuki, A., Shioda, 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.



- \* Testi, R., D'Ambrossio, D., De Maria, R., Santoni, A. (1994). The CD69 receptor: a multipurpose cell-surface trigger for hematopoietic cells. *Immunol. Today* 15: 479-483.
- \* Thomas, M.L. (1989). The leukocyte common antigen family. *Ann. Rev. Immunol.* 7: 339-369.
- \* Tsuboi, S., Fukuda, M. (2001). Roles of O-linked oligosaccharides in immune responses. *BioEssays* 23: 46-53.
- \* Tsuboi, S., Fukuda, M. (1998). Overexpression of branched O-linked oligosaccharides on T cell surface glycoproteins impairs humoral immune responses in transgenic mice. *J. Biol. Chem.* 273: 30680-30687.
- \* Tsuboi, S., Fukuda, M. (1997). Branched O-linked oligosaccharides ectopically expressed in transgenic mice reduce T-cell primary immune responses. *EMBO J.* 16: 6364-6373.
- \* Vandebroek, K., Alloza, I., Brehmer, D., Billiau, A., Proost, P., McFerran, N., Rudiger, S., Walker, B. (2002). The conserved helix C region in the superfamily of interferon-gamma/interleukin 10-related cytokines corresponds to a high affinity binding site for HSP70 chaperone DnaK. *J. Biol. Chem.* 277: 25668-25676.
- \* Van den Steen, P., Rudd, P.M., Dwek, R.A., and Opdenakker, G. (1998). Concepts and principles of O-linked glycosylation. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 33:151-208.
- \* Varki A., Cummings R., Jeffrey Esko., Freeze H., Hart G., y Marth J. Eds. (1999). O-glycans. En: *Essentials of Glycobiology*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York. Pags 101-113.

\* Xu, Z., and Wiss, A. (2002). Negative regulation of CD45 by differential homodimerization of the alternatively spliced isoforms. *Nat. Immunol.* 3: 764-771.

\* Zarling, A.L., Ficarro, S.B., White, F.M., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., Engelhard, V.H. (2000). Phosphorylated peptides are naturally processed and presented by major histocompatibility complex class I molecules in vivo. *J. Exp. Med.* 192(12): 1755-1762.

\* Zenteno, E., Lascurain, R., Montaña, L.F., Vázquez, L., Debray, H., and Montreuil, J. (1992). Specificity of *Amaranthus leucocarpus* lectin. *Glycoconjugate J.* 9: 204-20877.

\* Zenteno, E., 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., Montaña, M., Ruiz, B., and Carvajal R. (1985). *Macharocereus eruca* and *Amaranthus leucocarpus* lectins: biological activity and immune response cells. In Bog-Hansen, T.C., Breborowicz, J. de Gruyter W. (Eds.), *Lectins Biology, Biochemistry, Clinical Chemistry*. Vol. 4. Ed. W. de Gruyter, Berlin, pp. 437-445.