

## Cuantificación de receptores lectínicos en linfocitos B, T, T $\gamma$ y T $\mu$ . II. PHA, SBA, *Dolichos biflorus* y *Tetragonolobus purpureus*

I. de Dios\*, M. Manso, V. León y A. López-Borrasca

Servicio de Hematología  
Hospital Clínico Universitario  
Salamanca

(Recibido el 20 de junio de 1983)

I. DE DIOS, M. MANSO, V. LEON and A. LOPEZ-BORRASCA. *Quantification of Lectin Receptors in B, T, T $\gamma$  and T $\mu$  Lymphocytes. II. PHA, SBA, Dolichos biflorus and Tetragonolobus purpureus.* Rev. esp. Fisiol., 40, 265-270, 1984.

Plasma membranes composition and structure of B, T, T $\gamma$  and T $\mu$  lymphocytes from peripheral blood have been studied using four <sup>125</sup>I-labelled lectins. The results showed that B lymphocytes have a greater number of receptors for SBA and *Dolichos biflorus* lectins than T lymphocytes, whilst the opposite was observed for PHA-lectin. However, no significant differences between the two lymphocyte populations were found regarding the receptors for *Tetragonolobus purpureus* lectin. Among T lymphocyte subpopulations, SBA, *Dolichos biflorus* and *tetragonolobus purpureus* lectins appeared to have higher specificity for T $\gamma$  lymphocytes and PHA for T $\mu$ .

PHA-lectin had greater affinity for B lymphocytes, while the rest showed higher affinity for T lymphocytes. The T $\gamma$  subpopulation had lower association constant for PHA-lectin than T $\mu$  lymphocytes, whilst the contrary was found to be true for the other three lectins.

**Key words:** Lymphocytes, Lectinic receptors.

Las lectinas son sustancias, principalmente de origen vegetal, que se ligan específicamente a carbohidratos (12, 18), bien en estado soluble o unidos a estructuras celulares, tales como glicoproteínas o glicolípidos de membrana, actuando estos componentes como re-

ceptores. Por este motivo se utilizan para el aislamiento de polisacáridos y glicoproteínas (7, 16), así como para el estudio estructural de membranas celulares. Trabajos realizados anteriormente sobre receptores lectínicos han contribuido al conocimiento de anomalías en membranas plasmáticas celulares (20), a tipificar nuevos subgrupos sanguíneos, a la detección de antígenos de histocompatibilidad (19) y de receptores mitogé-

\* Departamento de Fisiología Animal, Facultad de Biología. Salamanca.

nicos (1, 9). Además, tienen una especificidad anomérica, según se comprobó utilizando  $\alpha$  y  $\beta$ -glicósidos como haptenos inhibidores (11). Por consiguiente, las lectinas suponen elementos útiles para el estudio de la composición y estructura química de la superficie celular.

En nuestro trabajo se han empleado cuatro lectinas, tres de ellas específicas por N-acetil galactosamina y la otra por L-fucosa, con el fin de estudiar posibles diferencias entre la membrana plasmática de linfocitos B y T y entre las subpoblaciones T $\gamma$  y T $\mu$ .

### Material y métodos

**Preparación de linfocitos.** Los linfocitos se separaron por centrifugación en gradiente de densidad de Ficoll (4) a partir de sangre venosa de sujetos normales. Los linfocitos T se aislaron mediante rosetas espontáneas con hematías de oveja tratados con AET (2-amino etilisotiuronio bromuro-hidrobromuro, Sigma) (10). Los linfocitos B se aislaron mediante rosetas EAC (eritrocito-anticuerpo-complemento) (2) a partir de linfocitos «non T». Por último se aislaron las subpoblaciones T $\gamma$  y T $\mu$  mediante rosetas EA (eritrocito-anticuerpo) con hematías de ternera sensibilizados con hemolisina IgG e IgM respectivamente (Cordis) (13).

**Marcaje de lectinas con I<sup>125</sup>.** Las lectinas *Phaseolus vulgaris* (PHA)-Sigma, *Glicine max* (SBA)-Sigma, *Dolichos biflorus*-Sigma y *Tetragonolobus purpureus*-Sigma, se marcaron con I<sup>125</sup> por la técnica de la lactoperoxidasa (17), modificada según se describió anteriormente (6). El I<sup>125</sup> libre se eliminó por elución cromatográfica en Biogel P-100 (Pharmacia).

**Incubación de linfocitos con lectinas iodadas.** Los linfocitos B, T, T $\gamma$  y T $\mu$

( $2 \times 10^6$ ) se incubaron con 5-159  $\mu$ g de lectinas iodadas (6). La integridad biológica de las lectinas marcadas con I<sup>125</sup> se comprobó mediante aglutinación plaquetaria (6). A continuación se calculó el número de moléculas de lectina ligadas a los linfocitos (6), teniendo en cuenta el peso molecular de las lectinas utilizadas (PHA: 110.000 daltones, SBA: 110.000 daltones, *Dolichos biflorus*: 140.000 daltones y *Tetragonolobus purpureus*: 120.000 daltones).

### Resultados

Después de eluir en Biogel P-100 las lectinas iodadas, se obtuvo un solo pico de proteína correspondiente a la lectina marcada, separada del I<sup>125</sup> libre (figura 1). Las lectinas iodadas mostraron el mismo poder de agregación plaquetaria que las lectinas no marcadas con I<sup>125</sup>.

La saturación de los receptores lectínicos linfocitarios se consiguió al aumentar la concentración de lectina añadida durante la incubación. La recta correspondiente a los dobles inversos de esta curva de saturación corta en ordenadas en un punto que representa el valor inverso del número de moléculas de lectina ligadas por célula (n) y la intersección con abscisas indica el valor inverso de la constante de asociación, que da una idea de la afinidad (k) (21) (figura 2). Los resultados indican que los linfocitos T ligaron mayor número de moléculas de PHA que los linfocitos B, mientras que a éstos se unieron mayor número de moléculas de SBA y *Dolichos biflorus*. Entre estas dos poblaciones de linfocitos no se apreciaron diferencias estadísticamente significativas con la lectina *Tetragonolobus purpureus*. Entre las subpoblaciones T $\gamma$  y T $\mu$  resultaron diferencias significativas, siendo las lectinas SBA, *Dolichos biflorus* y *Tetragonolobus purpureus* más específicas en su unión con linfocitos T $\gamma$  y

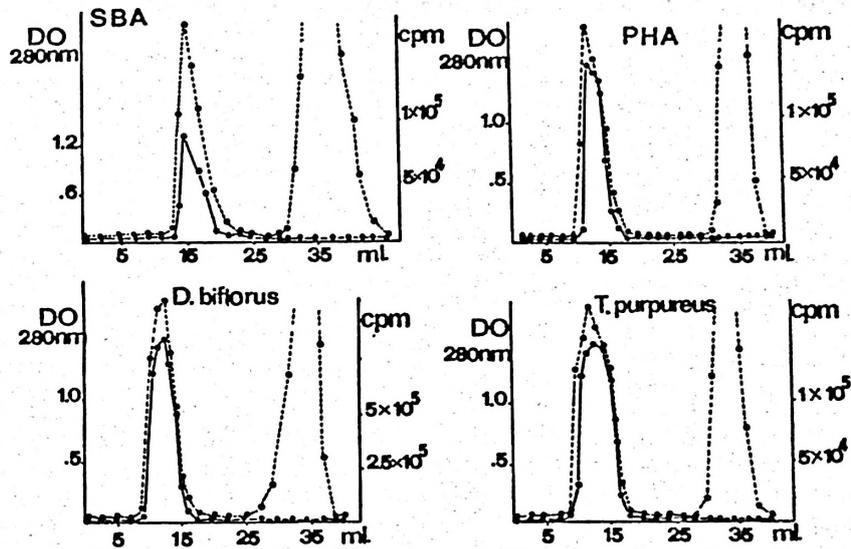


Fig. 1. Elución de las lectinas PHA, SBA, *D. biflorus* y *T. purpureus* marcadas con  $^{125}$  en columna de cromatografía de Biogel P-100. (—) D. O. 280 nm; (---) radioactividad en c.p.m.

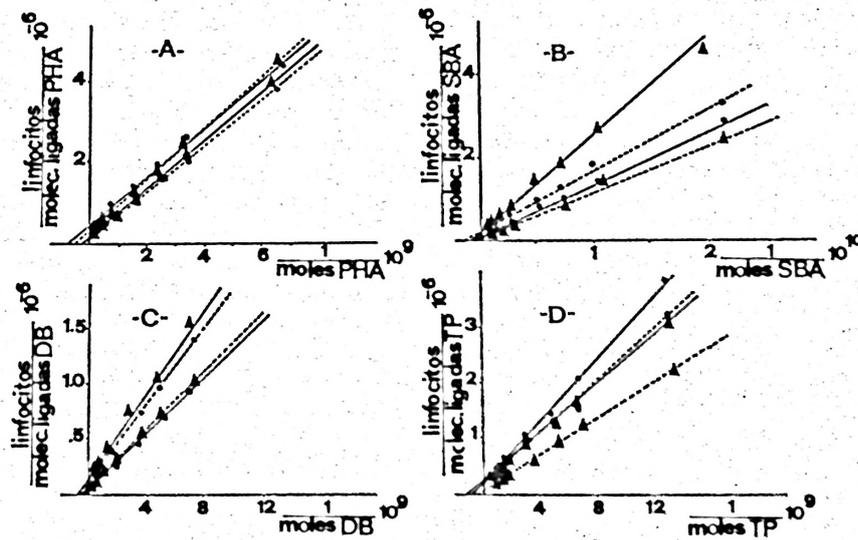


Fig. 2. Enlace de  $^{125}$ I-lectinas a linfocitos.

$2 \times 10^6$  linfocitos se incubaron a temperatura ambiente, 45 minutos en Medio 199 conteniendo albúmina bovina al 0,5 % y 8,5-138  $\mu$ g de  $^{125}$ I-PHA (A), 5-80  $\mu$ g de  $^{125}$ I-SBA (B), 9,5-159  $\mu$ g de  $^{125}$ I-*D. biflorus* (C) y 9-147  $\mu$ g de  $^{125}$ I-*T. purpureus* (D). (●—●) Linfocitos B; (●—●) Linfocitos T; (▲—▲) Linfocitos T, (▲—▲) Linfocitos T $\mu$ .

Table I. Número de receptores lectínicos en linfocitos B, T, T $\gamma$  y T $\mu$  (N = 11).

Lectina	Moléculas lectina/célula ( $\times 10^{-7}$ )			
	B	T	T $\gamma$	T $\mu$
PHA	0,26 $\pm$ 0,05	0,71 $\pm$ 0,09 <sup>a</sup>	0,33 $\pm$ 0,04	0,84 $\pm$ 0,08 <sup>b</sup>
SBA	0,84 $\pm$ 0,07	0,59 $\pm$ 0,06 <sup>a</sup>	1,02 $\pm$ 0,11	0,40 $\pm$ 0,05 <sup>b</sup>
<i>D. biflorus</i>	2,01 $\pm$ 0,15	0,71 $\pm$ 0,07 <sup>a</sup>	1,10 $\pm$ 0,08	0,62 $\pm$ 0,08 <sup>b</sup>
<i>T. purpureus</i>	0,51 $\pm$ 0,08	0,62 $\pm$ 0,08	1,21 $\pm$ 0,19	0,43 $\pm$ 0,08 <sup>b</sup>

(a) Diferencias estadísticamente significativas entre linfocitos B y T ( $p < 0,001$ ) por el test estadístico de la t de Student.(b) Diferencias estadísticamente significativas entre linfocitos T $\gamma$  y T $\mu$  ( $p < 0,001$ ) por el test estadístico de la t de Student.

PHA con T $\mu$  (tabla I). La lectina PHA mostró mayor afinidad por los linfocitos B y el resto de las lectinas con los linfocitos T y, en especial, con la subpoblación T $\mu$  (tabla II).

### Discusión

Utilizando cuatro lectinas como prueba molecular de la estructura celular, se han apreciado diferencias significativas en la composición y topografía de la membrana plasmática entre linfocitos B y T y entre las subpoblaciones T $\gamma$  y T $\mu$ .

Dado que las lectinas se unen a carbohidratos específicos, es evidente en este caso la presencia de terminales N-acetil galactosamina y L-fucosa en las glicoproteínas y/o glicolípidos de la superficie celular de los cuatro tipos de linfocitos estudiados, si bien varía el

número de los mismos de una población a otra, así como la localización y esteroisomería de los citados carbohidratos dentro de la membrana, ya que la afinidad, que depende de estos factores, también varía significativamente en las distintas poblaciones de linfocitos.

A pesar de que las lectinas PHA, SBA y *Dolichos biflorus* se unen específicamente a N-acetil galactosamina (12, 18), no manifestaron especificidad en el mismo sentido, hecho que cabía esperar ya que la propia estructura molecular de cada lectina es relevante en la interacción con el receptor (15). Se ligaron mayor número de moléculas a linfocitos T y en particular a la subpoblación T $\mu$ , resultado que puede estar relacionado con la respuesta blastogénica de esta subpoblación frente a la lectina PHA, efecto al que no respondieron los linfocitos T $\gamma$  (14). Resultó similar el número de moléculas de PHA ligadas a los linfo-

Tabla II. Constante de asociación de las lectinas con los linfocitos B, T, T $\gamma$  y T $\mu$  (N = 11).

Lectina	Constante de asociación $\times 10^{-7}$ M			
	B	T	T $\gamma$	T $\mu$
PHA	0,65 $\pm$ 0,06	2,10 $\pm$ 0,23 <sup>a</sup>	0,93 $\pm$ 0,06	2,35 $\pm$ 0,09 <sup>b</sup>
SBA	1,14 $\pm$ 0,07	0,89 $\pm$ 0,06 <sup>a</sup>	1,28 $\pm$ 0,11	1,00 $\pm$ 0,06 <sup>b</sup>
<i>D. biflorus</i>	2,66 $\pm$ 0,23	1,15 $\pm$ 0,06 <sup>a</sup>	1,44 $\pm$ 0,10	1,08 $\pm$ 0,10 <sup>b</sup>
<i>T. purpureus</i>	1,51 $\pm$ 0,10	1,36 $\pm$ 0,14 <sup>a</sup>	1,93 $\pm$ 0,18	0,83 $\pm$ 0,10 <sup>b</sup>

(a) Diferencias estadísticamente significativas entre linfocitos B y T ( $p < 0,001$ ) por el test estadístico de la t de Student.(b) Diferencias estadísticamente significativas entre linfocitos T $\gamma$  y T $\mu$  ( $p < 0,001$ ) por el test estadístico de la t de Student.

citó T $\gamma$  y a B, que tampoco sufren estimulación mitogénica por tratamiento con PHA (14). Este dato avala la hipótesis de otros investigadores (3), como que la respuesta mitogénica provocada por la lectina necesita un número mínimo de receptores en la membrana a los que se puedan ligar concentraciones suficientes de lectina para que se produzca transformación celular.

La lectina SBA se mostró más específica por la población de linfocitos B que por la población mixta de T, sin embargo, si ésta contuviera proporciones idénticas de las subpoblaciones T $\gamma$  y T $\mu$  no habría diferencias muy significativas entre las dos poblaciones mayoritarias de B y T, ya que a la subpoblación T $\gamma$  aislada se unió mayor número de moléculas de lectina que a linfocitos B, pero al ser minoritaria en la población de T (< 20 %) no provocó en ella aumentos significativos de la especificidad por SBA.

La lectina *Dolichos biflorus* expresó mayor especificidad por linfocitos B que por T, tanto en la población mixta como en las dos subpoblaciones aisladas. Sin embargo, la afinidad de ésta es mayor con los receptores de linfocitos T, que probablemente tengan gran cantidad de terminales N-acetil galactosamina unidos con enlaces tipo  $\alpha$  al resto de la glicoproteína, ya que es la esteroisomería específica para la interacción con el receptor (8).

La lectina *Tetragonolobus purpureus*, específica por L-fucosa (18), expresó mayor especificidad por la subpoblación T $\gamma$  que, al no ser mayoritaria en la población total de T, no incrementó excesivamente el valor medio del número de moléculas de lectina unidas por células respecto a linfocitos B, no apreciándose por consiguiente diferencias estadísticamente significativas entre ambas poblaciones de linfocitos B y T. Los linfocitos T manifestaron un aumento de afinidad con esta lectina respecto a B,

que podría explicar la mayor especificidad expresada por la población T en estudios de cromatografía de afinidad con esta lectina realizados anteriormente (5).

### Resumen

Se utilizan cuatro lectinas marcadas con I<sup>125</sup> en el estudio comparativo de la composición y estructura de la membrana plasmática de linfocitos B, T, T $\gamma$  y T $\mu$  de sangre periférica de sujetos normales. Los linfocitos B poseen mayor número de receptores que los linfocitos T para las lectinas SBA y *Dolichos biflorus*, mientras que los linfocitos T ligan mayor número de moléculas de PHA que los linfocitos B. No existen diferencias estadísticamente significativas en el número de receptores de *Tetragonolobus purpureus* entre ambas poblaciones de linfocitos. Las lectinas SBA, *Dolichos biflorus* y *Tetragonolobus purpureus* muestran mayor especificidad por los linfocitos T $\gamma$  y la lectina PHA por los T $\mu$ .

La interacción de PHA con los receptores específicos de linfocitos B es más idónea, en tanto que el resto de las lectinas expresan mayor afinidad con los receptores de linfocitos B. La subpoblación T $\gamma$  muestra menor constante de asociación con PHA que con T $\mu$  y el resto de las lectinas se ligaron con mayor afinidad a la subpoblación T $\mu$ .

### Bibliografía

1. ALLAN, D. y CRUMPTON, M. J.: *Biochem. J.*, 120, 133-143, 1970.
2. BIANCO, C., PATRICK, R. y NUSSENZWEIG, V.: *J. Exp. Med.*, 132, 702-720, 1970.
3. BOLDT, D., SKINNER, A. M. y KORNFELD, S.: *J. Clin. Invest.*, 51, 3225-3231, 1972.
4. BOYUM, A.: *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 21, 77-81, 1968.
5. DE DIOS, I., MANSO, M. y LÓPEZ BORRASCA, A.: *Rev. esp. Fisiol.*, 39, 423-428, 1983.
6. DE DIOS, I., MANSO, M., MARTIN, M. y LÓPEZ BORRASCA, A.: *Rev. esp. Fisiol.*, 40, 19-24, 1984.
7. DULANEY, T. J.: *Molec. Cell. Biochem.*, 21, 43-63, 1979.
8. ETZLER, E., GUPTA, S. y BORREBAECK, C.: *J. Biol. Chem.*, 256, 2367-2370, 1981.
9. HAYMAN, M. J. y CRUMPTON, M. J.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 47, 923-930, 1972.

10. KAPLAN, M. E. y CLARK, C.: *J. Immunol. Meth.*, **5**, 131-135, 1974.
11. KORNFELD, R. y FERRIS, C.: *J. Biol. Chem.*, **250**, 2614-2619, 1975.
12. LIS, H. y SHARON, N.: *Ann. Rev. Biochem.*, **42**, 541-574, 1973.
13. MINGARI, M. C., MORETTA, L. y MORETTA, A.: *J. Immunol.*, **121**, 767-770, 1978.
14. MORETTA, L., FERRARINI, M., MINGARI, M. C., MORETTA, A. y WEBB, S. R.: *J. Immunol.*, **117**, 2171-2179, 1976.
15. OCHOA, J. L.: *J. Chromatog.*, **215**, 351-360, 1981.
16. PEARLSTEIN, E.: *Exp. Cell. Res.*, **109**, 95-103, 1977.
17. PHILLIPS, D. R.: *Biochemistry*, **11**, 4582-4589, 1972.
18. SHARON, N. y LIS, H.: *Science*, **177**, 949-959, 1972.
19. SNARY, D., GOODFELLOW, P., BODMER, W. F. y CRUMPTON, M. J.: *Nature*, **247**, 457-461, 1974.
20. SPECKART, S. F., BOLDT, D. H. y McDERMOTT, R. P.: *Blood*, **52**, 681-695, 1978.
21. STECK, T. L. y WALLACH, D. F. H.: *Biochim. Biophys. Acta*, **97**, 510-522, 1965.