

Fraccionamiento de linfocitos mediante cromatografía de afinidad con nueve lectinas

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

Servicio de Hematología
Hospital Clínico.
Salamanca

(Recibido el 9 de marzo de 1983)

I. DE DIOS, M. MANSO and A. LOPEZ-BORRASCA. *Fractionation of Lymphocytes by Affinity Chromatography with Nine Lectins*. Rev. esp. Fisiol., 39, 423-428, 1983.

Lymphocyte subclasses from normal peripheral blood have been fractionated by affinity chromatography with lectins. Concanavalin A (Con A), *Lens culinaris* lectin (LC), *Pisum sativum* lectin (PS), *Phaseolus vulgaris* lectin (PHA), *Dolichos biflorus* lectin (DB), *Glycine max* lectin (SBA), *Ricinus communis* lectin (RCA II), *Tetragonolobus purpureus* lectin (TP) and *Triticum vulgare* lectin (WGA), were coupled to Sepharose 6MB, and lymphocytes labelled with ¹²⁵I were eluted through the chromatographic columns. The binding of lymphocytes to WGA and SBA lectins was 32 % and 13 % respectively. The binding to the other lectins tested were found to be between 32 % and 13 %. When solutions of increasing concentrations of specific sugar were added to the columns a progressive elution of bound lymphocytes was observed. These results indicate the existence of a large range of lymphocyte subclasses, with different binding capacity to lectins, which was a function of the receptor number or/and receptor affinity to each lectin. Furthermore, these two parameters were found to vary in each functional population. Even though all the lymphocytes had lectin receptors, T lymphocytes showed higher affinity for Con A, PHA and TP lectins, while B lymphocytes appeared to be more specific for LC, PS, SBA, DB, RCAII and WGA lectins.

La competencia inmunológica depende de complejas interacciones entre las distintas poblaciones de linfocitos, las cuales se han identificado por sus antígenos de superficie, con antisuero heterólogos (14, 19) y anticuerpos monoclonales (23) y por receptores de superficie, tales como los del fragmento Fc de las Inmunoglobu-

linas (8, 9), del 3.^{er} elemento del complemento (1), de hematíes de oveja (15) y otros. Sin embargo, se han establecido subclases dentro de cada población por su capacidad para ligarse y ser estimuladas por diferentes lectinas (10, 11). Esta especificidad puede estar relacionada con diferencias en la composición química de las glicoproteínas de membrana. Algunos estudios con lectinas se han realizado ya para identificar subclases de linfocitos (5, 10, 11, 17, 20).

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

El objeto de este trabajo es apreciar diferencias entre linfocitos B y T respecto a la especificidad por nueve lectinas, que estará en función de la composición química de las glicoproteínas de membrana, criterio útil para diferenciar subclases de linfocitos dentro de las poblaciones funcionales ya definidas inmunológicamente.

Material y métodos

Preparación celular. Los linfocitos humanos se aislaron a partir de sangre venosa de donantes voluntarios, según el método descrito por BOYUM (6).

Preparación de Sepharosa 6MB-lectinas. Las lectinas Concanavalina A (Con A), *Lens culinaris* (LC), *Glicine max* (SBA), *Phaseolus vulgaris* (PHA), *Pisum sativum* (PS), *Ricinus communis* (RCA II), *Tetragonolobus purpureus* (TP), *Dolichos biflorus* (DB) y *Triticum vulgare* (WGA), todas ellas Sigma, se ligaron covalentemente a un gel de CNBr de Sepharosa 6MB (Pharmacia). Una solución de cada lectina en Co_3HNa 0,1 M ClNa 0,5 M, se mezcló con el gel (3 mg/ml de gel) y se incubó durante 12 h a 4°C, con agitación constante. La lectina no ligada se lavó con la solución anterior y los grupos activos del gel libres se bloquearon al añadir una solución de etanolamina 1 M, ClNa 0,5 M e incubar durante 1 h a temperatura ambiente, con agitación constante. Para remover la lectina adsorbida espontáneamente, se efectuaron tres ciclos consecutivos de lavados, alternando también acetato 0,1 M, ClNa 0,5 M, pH 5, con otro de borato 0,1 M, ClNa 0,5 M, pH 8. El gel se equilibró con solución salina de Hank (Difco) pH 7,2.

Iodinación de linfocitos. Los linfocitos totales se marcaron con I^{125}Na y lactoperoxidasa- H_2O_2 , según una variante del método de PHILLIPS (18). A una

suspensión de linfocitos en Medio 199 (Difco) que contenía 2×10^6 cel/ml, se añadieron 20 μg de lactoperoxidasa, 1 μmol de IK y 0,1 mCi de I^{125}Na (Amersham). La reacción comenzó al añadir lentamente 100 μl de H_2O_2 al 0,03 % y se mantuvo 45 min a temperatura ambiente con agitación suave, añadiendo otras dos alícuotas de H_2O_2 al 0,03 % (50 μl) cada 15 min. El I^{125} libre se eliminó tras sucesivos lavados con Medio 199, por centrifugación a 500 g, 10 min a 4°C.

Afinidad cromatográfica. Columnas de plástico de 5×1 cm, conteniendo 1 ml de CNBr-Sepharosa 6MB-lectina, sirvieron para fraccionar los linfocitos según la técnica descrita por BOLDT y LYONS (2), modificada. Los linfocitos marcados con I^{125} ($0,5-5 \times 10^6$ cel/ml) se incubaron con el gel, 4 h, a temperatura ambiente, con agitación constante.

Elución de linfocitos no ligados a la lectina (fracción no adherente).

La columna de cromatografía, que contenía los linfocitos ligados, se eluyó con Medio 199 y albúmina bovina (Sigma) al 0,1 %, hasta que dejó de aparecer radiactividad en los tubos. De una alícuota del eluido (100 μl) se midió la radiactividad en c.p.m. en un contador de radiaciones gamma, a partir de cuyo resultado se dedujo la cantidad de linfocitos no ligados a la lectina, dado en porcentaje de radiactividad. La diferencia de la radiactividad total y la eluida supone la cantidad de linfocitos ligados a la lectina, teniendo en cuenta la radiactividad inespecífica que se hubiera ligado al gel.

Elución de linfocitos ligados a la lectina (fracción adherente).

Los linfocitos marcados con I^{125} (4×10^6 cel/ml) de radiactividad conocida, se incubaron con CNBr-Sepharosa 6MB-lectina, 4 h, a temperatura ambiente, con agitación constante. A continuación, se añadieron concentraciones crecientes del azúcar específico para cada lectina desde 0,025 M a 0,30 M (D-manosa, N-acetil

galactosamina, N-acetil glucosamina y L-fucosa, Merck), incubando 4 h, a temperatura ambiente con agitación constante. La columna se eluyó después de este tiempo con Medio 199 y albúmina bovina al 0,1 %, hasta la eliminación total de la radiactividad. Se midió la radiactividad de una alícuota del eluido en c.p.m. y a partir de este valor se calculó la cantidad de linfocitos eluidos y ligados a cada lectina con cada una de las concentraciones del azúcar específico añadido.

Formación de rosetas. Mediante rosetas espontáneas con hematíes de oveja (21) y rosetas EAC (eritrocito-anticuerpo-complemento) (1), se calcularon los porcentajes de linfocitos T y B, respectivamente, en las dos fracciones cromatografiadas (no adherente y adherente).

Resultados

La radiactividad inespecífica ligada al gel de cromatografía se tuvo en cuenta como factor de corrección de los valores obtenidos con las lectinas. Este valor resultó ser el $5,30\% \pm 0,87$ de la radiactividad inicial, correspondiente a los linfocitos marcados que se incubaron en la columna de cromatografía conteniendo el mismo volumen de gel que en los ex-

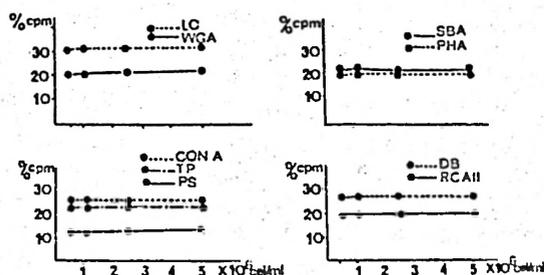


Fig. 1. Cantidad de linfocitos eluidos por cromatografía en CNBr-Sepharosa 6MB-lectinas.

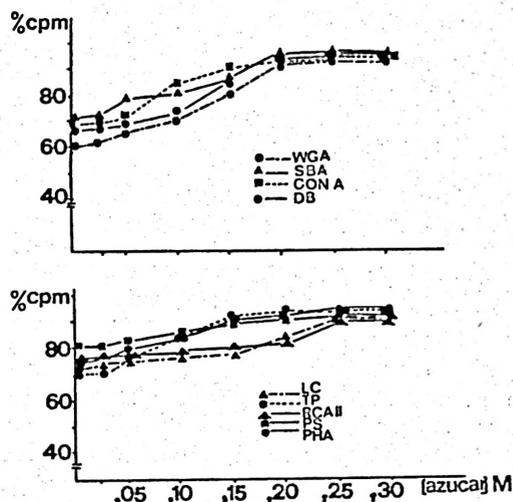


Fig. 2. Fraccionamiento de linfocitos con lectinas en presencia de concentraciones crecientes del azúcar específico.

perimentos sucesivos, pero sin lectina acoplada.

Un número variable de linfocitos marcados con I^{125} ($0,5-5 \times 10^6$) se aplicaron a las columnas conteniendo las lectinas ensayadas. Las c.p.m. de los eluidos se mantuvieron constantes para cada lectina, lo que implica que, a pesar de variar el número de células sometidas a incubación, siempre se ligó al gel la misma cantidad: LC, 21 %; WGA, 32 %; PHA, 21 %; SBA, 22 %; Con A, 26 %; TP, 24 %; PS, 13 %; DB, 27 %, y RCAII, 20 % (figura 1).

Las células se eluyeron de las columnas (fig. 2) a medida que se añadieron concentraciones crecientes de azúcares específicos para los linfocitos ligados a lectinas, según se detalla en la tabla I, en donde se dan los porcentajes de linfocitos T y B de la fracción adherente y no adherente resultantes de la cromatografía de afinidad con cada una de las lectinas, que fueron determinados mediante rosetas espontáneas E y EAC respectivamente.

Tabla I. Porcentaje de rosetas espontáneas E y EAC de las fracciones adherente y no adherente para cada lectina.

Entre paréntesis concentración mínima de azúcar específico para la elución total de los linfocitos ligados a la lectina. D-manosa (D-Man), N-acetil galactosamina ((NAGA), D-galactosa (D-Gal), L-fucosa (L-Fuc) y N-acetil glucosamina (N-acgl).

		% E (AET)	% EAC
Con A (0,25 M D-Man)	no adherente	58,29 ± 2,50	20,86 ± 2,97
	adherente	74,43 ± 3,69	8,00 ± 3,92
LC (0,25 M D-Man)	no adherente	65,14 ± 3,89	14,43 ± 3,31
	adherente	60,57 ± 3,87	19,29 ± 3,50
PS (0,25 M D-Man)	no adherente	65,00 ± 4,20	13,14 ± 2,54
	adherente	65,00 ± 4,20	16,14 ± 4,06
PHA (0,25 M NAGA)	no adherente	59,14 ± 1,07	20,29 ± 3,09
	adherente	71,71 ± 4,82	10,43 ± 3,05
SBA (0,25 M NAGA)	no adherente	68,43 ± 2,99	9,86 ± 1,35
	adherente	61,14 ± 3,93	20,86 ± 1,57
DB (0,20 M NAGA)	no adherente	64,71 ± 2,68	14,00 ± 1,63
	adherente	60,85 ± 2,19	21,29 ± 1,80
RCA II (0,25 M D-Gal)	no adherente	65,29 ± 3,35	16,57 ± 2,15
	adherente	61,17 ± 3,60	17,29 ± 2,56
TP (0,20 M L-Fuc)	no adherente	56,57 ± 3,26	72,86 ± 3,02
	adherente	22,29 ± 3,68	10,71 ± 2,21
WGA (0,25 M N-acgl)	no adherente	68,43 ± 2,86	10,14 ± 3,77
	adherente	59,86 ± 3,98	20,14 ± 3,13

Discusión

Se ha comprobado, por los resultados obtenidos, que una población mixta de linfocitos tiene mayor número de receptores para la lectina WGA, hecho que se explica por el alto contenido de ácido siálico y N-acetil glucosamida de las membranas plasmáticas celulares (16), azúcares específicos para esta lectina (7). Es apreciable que la lectina SBA requiere concentraciones de N-acetil galactosamina relativamente elevadas para eluir el escaso número de linfocitos ligados, sin embargo, la lectina *Dolichos biflorus*, con especificidad por el mismo carbohidrato, precisa concentraciones menores de éste a pesar de haber retenido gran número de células (figura 2). Este hecho induce a pensar que la cantidad de azúcar especí-

fico capaz de inhibir el enlace lectina-linfocito no depende únicamente del número de receptores lectínicos, sino además de la afinidad de enlace, que es consecuencia de la disposición especial de éstos en la membrana y de la estructura tridimensional de la propia molécula de lectina. Asimismo, las lectinas Con A, LC y PS necesitan 0,25 M de D-manosa para eluir un número diferente de linfocitos ligados. La lectina WGA, a pesar de la gran cantidad de linfocitos unidos, requiere una concentración de azúcar específico similar al resto de las lectinas ensayadas. La lectina TP necesita bajas concentraciones de L-fucosa, que se puede explicar por la alta especificidad de esta lectina por el citado azúcar en estado soluble (22), además de una localización interna y escasa presencia de L-fucosa

en las glicoproteínas de membrana (13).

Es evidente que las lectinas no establecen una selección funcional, sino que cada población contiene células de variada composición que, posiblemente, se correspondan con estadios distintos de maduración (12). Sin embargo, se puede apreciar cierta especificidad de cada lectina por una u otra población funcional que está en relación con el porcentaje de las mismas en la fracción adherente. Según esto, los linfocitos T contienen mayor cantidad de células con receptores específicos para las lectinas Con A, PHA y TP, mientras que los linfocitos B mostraron mayor especificidad que T para el resto de las lectinas. Esta especificidad tiene un significado fisiológico, así se ha demostrado que la magnitud de respuesta mitogénica a ciertas lectinas es mayor en linfocitos de la fracción adherente después de un proceso de cromatografía de afinidad (3, 4). Es muy probable que la abundancia de receptores lectínicos sea determinante para que la lectina que actúa como mitógeno se ligue a la membrana celular, como paso previo a la estimulación.

Estos experimentos demuestran la existencia de una gran variedad de subclases de linfocitos en sangre periférica de sujetos normales y se comprueba que, cada población funcional es heterogénea en lo que se refiere al número y localización de los receptores lectínicos de la membrana plasmática. Las técnicas de afinidad con lectinas son selectivas para aislar dichas subclases, ofreciendo mayores ventajas que otras técnicas utilizadas, tales como lectinas inmovilizadas en fibras de nylon, placas Petri, bolas de poliacrilamida y Sepharosa (3, 10, 11).

Resumen

Se separan subclases de linfocitos de sangre periférica de sujetos normales mediante la técnica de cromatografía de afinidad con nueve lectinas. Las

lectinas Concanavalina A, *Lens culinaris*, *Pisum sativum*, *Phaseolus vulgaris* (PHA), *Dolichos biflorus*, *Glicine max* (SBA), *Tetragonolobus purpureus*, y *Triticum vulgaris* (WGA) se acoplaron a Sepharosa 6MB y linfocitos marcados con 125 I se incubaron con este gel en columnas de cromatografía. El 32 % de los linfocitos se ligaron a la lectina WGA, el 13 % a SBA y porcentajes comprendidos entre estos dos valores se unieron al resto de las lectinas ensayadas. Al añadir el azúcar específico para cada lectina en estado soluble, a concentraciones crecientes, eluyeron paulatinamente los linfocitos ligados al gel, demostrándose la existencia de un amplio espectro de subclases, con diferente capacidad de unión a las lectinas, que está en función del número de receptores o/y afinidad de éstos por cada lectina, variando dichos parámetros dentro de una misma población funcional. A pesar de la presencia de todos los receptores lectínicos estudiados tanto en linfocitos B como en T, se aprecia una especificidad de las lectinas Concanavalina A, PHA y *Tetragonolobus purpureus* por linfocitos T y de *Len culinaris*, *Pisum sativum*, *Glicine max*, *Dolichos biflorus*, *Ricinus communis* y *Triticum vulgaris* por linfocitos B.

Bibliografía

1. BIANCO, C., PATRICK, R. y NUSSENZWEIG, V.: *J. Exp. Med.*, 132, 702-720, 1970.
2. BOLDT, D. y LYONS, R. D.: *Cell. Immunol.*, 43, 82-90, 1979.
3. BOLDT, D. y LYONS, R. D.: *J. Immunol.*, 123, 808-816, 1979.
4. BOLDT, D., SKINNER, Sr. A. M. y KORNFELD, S.: *J. Clin. Invest.*, 51, 3225-3233, 1972.
5. BOLDT, D., SKINNER, Sr. A. M., SCHLOSSMAN, S. E. y CHES, L.: *J. Exp. Med.*, 145, 221-228, 1977.
6. BOYUM, A.: *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 21, 77, 1968.
7. CALLOW, J. A.: *Current Adv. Plant Sci.*, 18, 181-193, 1975.
8. DICKLER, H. B., KUNKEL, H. G.: *J. Exp. Med.*, 136, 191-196, 1972.
9. FERRARINI, M., MORETTA, L., ABRILE, R. y DURANTE, M. L.: *Eur. J. Immunol.*, 5, 70-72, 1975.
10. HELLSTROM, U., MELLSTEDT, H., PERLMAN, P., HOLM, G. y PETTERSON, D.: *Clin. Exp. Immunol.*, 26, 196-202, 1976.
11. HELLSTROM, U., PERLMAN, P. y ROBERTSON,

- E. S.: *Scand. J. Immunol.*, **7**, 191-197, 1978.
12. HOESLI, D., BRON, G. y PINK, R. L.: *Nature* (Londres), **283**, 576-578.
13. HUBBARD, S. C. y IVART, R. J.: *Ann. Rev. Biochem.*, **50**, 555-583, 1981.
14. JANOSY, G.: En «Methods in Haematology» (Catoovsky, D. ed.). Churchill Livingstone, Londres, 1981, p. 849.
15. JONDAL, M., HOLM, G. y WIGZELL, H.: *J. Exp. Med.*, **136**, 207-215, 1972.
16. MEHRISHI, J. N.: *Thromb. Diath. Haemorrhag.*, **26**, 370-381, 1971.
17. NAKANO, T., IMAI, Y., NAIKI, M. y OSAWA, T.: *J. Immunol.*, **125**, 1928-1936, 1980.
18. PHILLIPS, D. R.: *Biochemistry*, **11**, 4582-4587, 1972.
19. PRATT, M. D., SCHLOSSMAN, S. F. y STOMINGER, J. L.: *J. Immunol.*, **14**, 1449-1460, 1980.
20. RAWSON, A. J. y HUANG, T. C.: *Cell. Immunol.*, **17**, 310-315, 1975.
21. SAXON, A., FELDHAIS, J. L. y ROBBINS, R. A.: *J. Immunol. Meth.*, **12**, 285-288, 1976.
22. SHARON, N. y LIS H.: *Science*, **117**, 949-959, 1972.
23. WORMSLEY, S. B., COLLINS, L. M. y ROYSTON, I.: *Blood*, **57**, 657-662, 1981.