

Cuantificación de receptores lectínicos en linfocitos B, T, T γ y T μ . I. Concanavalina A, *Pisum sativum*, *Lens culinaris* y WGA

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

Servicio de Hematología
Hospital Clínico Universitario
Salamanca (España)

(Recibido el 5 de mayo de 1983)

I. DE DIOS, M. MANSO, M. MARTIN and A. LOPEZ-BORRASCA. *Quantification of Lectin Receptors in B, T, T γ and T μ Lymphocytes. I. Concanavalin A, Pisum sativum, Lens culinaris and WGA.* Rev. esp. Fisiol., 40, 19-24. 1984.

The immune system is formed of different lymphocyte subpopulations, each one having a defined role to defend the organism. Their plasma membranes present differences in the glycoproteinic or/and glycolipidic composition, as detected with labelled ¹²⁵I-lectins. B lymphocytes have a greater number of receptors for the *Pisum sativum*, *Lens culinaris* and WGA lectins than T lymphocytes. On the other hand, T lymphocytes bind a greater number of Concanavalin A molecules than B lymphocytes. WGA lectin appeared to be more specific for T μ subpopulation, while Con A and *Pisum sativum* lectins were bound preferentially to T γ lymphocytes while no significant differences were observed between both subpopulations for *Lens culinaris* lectin. From the affinity of each lectin to each lymphocyte population it could be deduced that the receptor structure, conformation and arrangement on the membrane was optimal in B lymphocytes for Con A and WGA binding, and T lymphocytes for *Lens culinaris* and *Pisum sativum* binding.

Key words: Lymphocyte, Lectin-receptors.

Se han realizado numerosos trabajos para diferenciar distintas poblaciones de linfocitos por los antígenos de superficie

(2, 6, 7, 22), marcadores inmunológicos de membrana (16, 21), marcadores enzimáticos y citoquímicos (8, 17) y, cada vez se toma mayor interés en el estudio de las glicoproteínas de membrana, ya que su estructura y composición son un reflejo de la fisiología celular (10). Dado que la población de linfocitos es heterogénea y cada tipo tiene una función específica en el sistema inmune, es de suponer exista

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

** Servicio de Medicina Nuclear. Departamento de Radiología y Medicina Física. Hospital Clínico Universitario. Salamanca.

una especialización de receptores, representados en su mayor parte por glicoproteínas. Para el estudio de tales componentes se consideran a las lectinas elementos útiles, por unirse específicamente a carbohidratos.

En nuestro trabajo cuantificamos en linfocitos B, T, T γ y T μ de sangre periférica de sujetos normales el número de receptores lectínicos y la afinidad de las lectinas Concanavalina A (Con A), *Lens culinaris*, *Pisum sativum*, específicas de D-manosa, y *Triticum vulgare* (WGA), específica de N-acetil-glucosamina, estableciendo una comparación entre las distintas poblaciones.

Material y métodos

Preparación de linfocitos. A partir de sangre venosa de donantes voluntarios se separaron linfocitos por centrifugación en gradiente de densidad sobre Ficoll (5). Los linfocitos T se aislaron mediante rosetas espontáneas con hematíes de carnero tratados con AET (2-amino etil isotiouonio bromuro hidrobromuro-Sigma) (12). Los linfocitos B se aislaron mediante rosetas EAC (eritrocito-anticuerpo-complemento) (4), a partir de linfocitos «non T», separados previamente de linfocitos T por centrifugación en gradiente de densidad sobre Ficoll. Los linfocitos T γ y T μ se aislaron a partir de linfocitos T mediante rosetas EA (eritrocito-anticuerpo) con hematíes de ternera sensibilizados con hemolisina IgG e IgM (Cordis) respectivamente (14).

Marcaje de lectinas I¹²⁵. Las lectinas con A, *L. culinaris*, *P. sativum* y WGA (Sigma), se marcaron con I¹²⁵ por la técnica de la lactoperoxidasa (15). A 10 mg de lectina disuelta en tampón Tris-ClH, 0.01 M pH 7.5, se añadieron 20 μ g de lactoperoxidasa (Sigma), 1 μ mol de IK y 0.1 mCi de I¹²⁵Na (Amersham); la reacción comenzó con la adición de 100 μ l de

H₂O₂ al 0,03 % y se mantuvo a temperatura ambiente 45 min, añadiendo otras dos alícuotas de 50 μ l de H₂O₂ cada 15 min. Se paró la reacción con 1 mmol de IK. El I¹²⁵Na libre se eliminó por elución cromatográfica en Biogel P-100 (Pharmacia). La radiactividad se determinó en c.p.m. en un contador de radiaciones gamma.

Incubación de linfocitos con lectinas iodadas. Los linfocitos B, T, T γ y T μ (2 \times 10⁶) se incubaron con 4-144 μ g de lectinas iodadas en Medio 199 (Difco) conteniendo albúmina bovina al 0,5 %, 45 min a temperatura ambiente con agitación constante. La lectina libre se eliminó por sucesivos lavados con Medio 199-albúmina bovina, por centrifugación a 400 g, 10 min a temperatura ambiente, hasta que desapareció la radiactividad del medio de lavado. La radiactividad incorporada en las células se midió en c.p.m. en un contador de radiaciones gamma.

Valoración del número de moléculas de lectina ligadas a los linfocitos. La cantidad de proteína lectínica eluida por cromatografía se midió en un Uvicord III a D. O. de 280 nm y se convirtió a valores de concentración de proteína en mg/ml según una D. O. de 750 nm. Conocida la concentración de lectina en mg/ml añadida a los linfocitos en cada una de las incubaciones efectuadas, es factible deducir el correspondiente número de moles sabiendo el peso molecular de las lectinas utilizadas (Con A: 110.000 daltones, *L. culinaris*: 48.000 daltones, *P. sativum*: 53.000 daltones y WGA: 35.000 daltones). Asimismo, a partir de la radiactividad incorporada en las células, es posible deducir el número de moles de lectina ligadas por célula y el consiguiente número de moléculas.

Prueba de la integridad biológica de las lectinas marcadas con I¹²⁵. La integri-

dad biológica de las lectinas iodadas se comprobó mediante aglutinación plaquetaria. A partir de sangre total se obtuvo el plasma rico en plaquetas por centrifugación a 150 g, 15 min. La contaminación plasmática y eritrocítica se eliminó después de 5 lavados con tampón Tris-ClH 0,01 M pH 7,5, 0,15 M ClNa, 0,0025 M EDTA y 200 μ g/ml de apirasa, mediante centrifugación a 2.000 g, 15 min a 4°C. La aglutinación plaquetaria con las lectinas se efectuó en un agregómetro al añadir a 100 μ l de suspensión de plaquetas (2×10^7 plaquetas/ml) 10 μ l de solución de las lectinas (1 mg/ml) no marcadas y marcadas con I^{125} .

Resultados

Las lectinas marcadas con I^{125} se separaron del I^{125} libre por cromatografía en Biogel P-100, obteniendo después de la elución un único pico correspondiente a la lectina, perfectamente separado del I^{125}

libre. Coincide el máximo de concentración de proteínas con el de la radiactividad incorporada en ella (fig. 1). Es patente pues la ausencia de contaminación con otros productos marcados. La prueba rutinaria de la medida de agregación plaquetaria aseguró la integridad biológica de las lectinas después del marcaje con I^{125} , apreciándose el mismo grado de agregación que con las lectinas no marcadas.

Distintas concentraciones de las lectinas iodadas se incubaron con linfocitos B, T, $T\gamma$ y $T\mu$ hasta conseguir la saturación de los receptores lectínicos. Con los valores dobles inversos correspondientes a la curva de saturación de receptores se construyó una recta, cuya intersección con ordenadas representa el valor inverso del número de moléculas de lectina ligadas por célula (n) y la intersección con abscisas es una medida de la afinidad (K) y representa el valor inverso de la constante de asociación (20). Las gráficas representadas en la figura 2 corresponden a

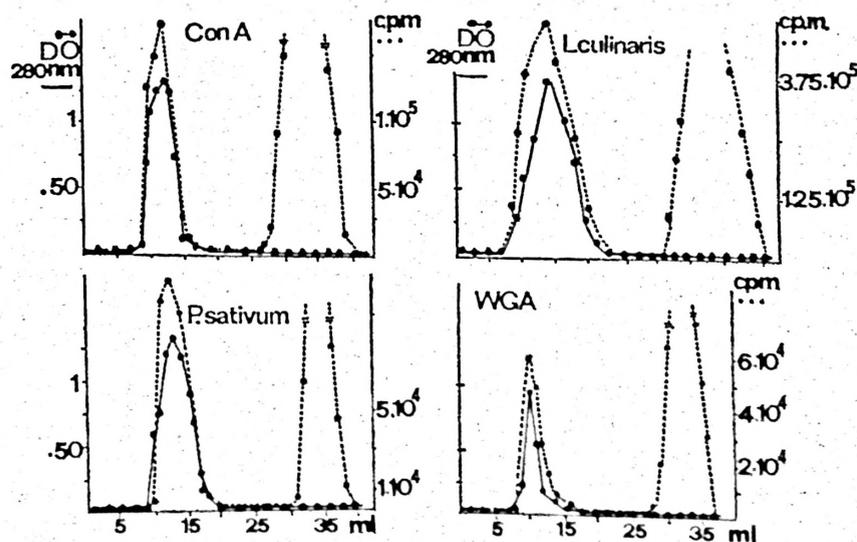
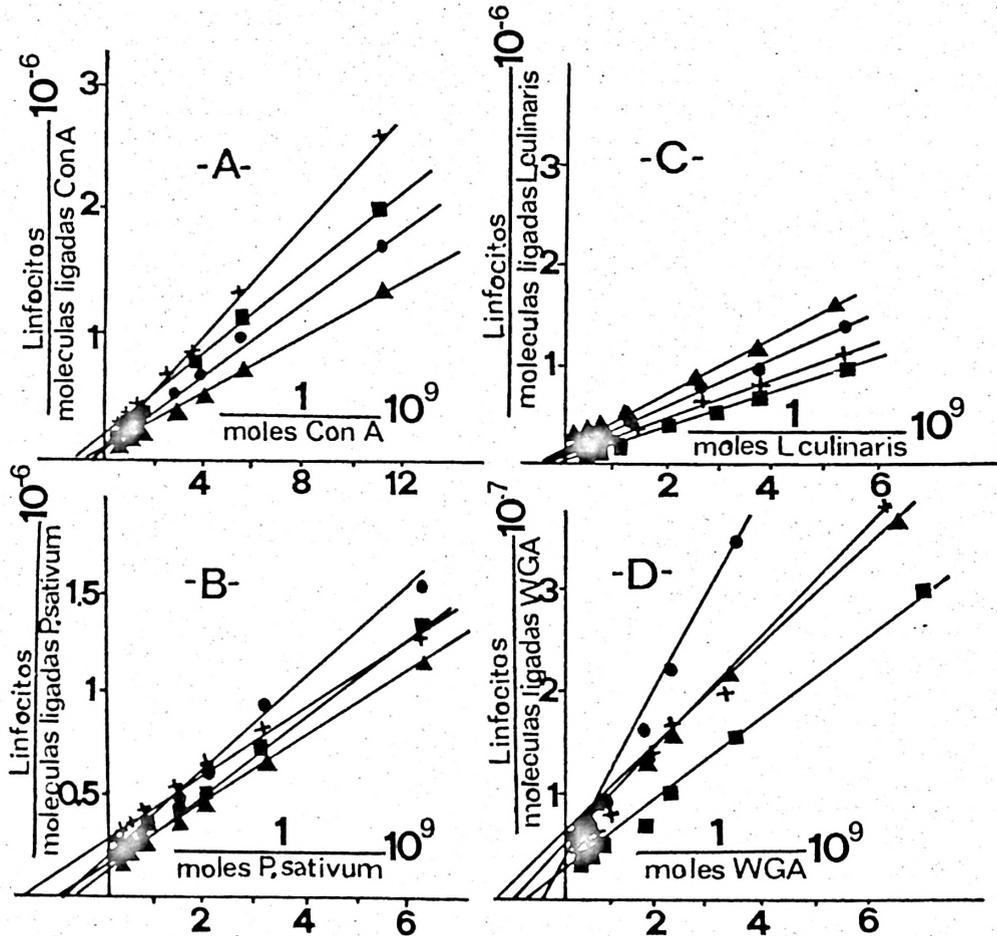


Fig. 1. Elución de las lectinas Con A, L. culinaris, P. sativum y WGA marcadas con I^{125} en columna de cromatografía de Biogel P-100.

● —● DO 280 nm; ● ····● radiactividad en c.p.m.

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

2×10^6 linfocitos se incubaron a temperatura ambiente, 45 min en Medio 199 conteniendo albúmina bovina al 0,5 % y 9-144 μg de ^{125}I -Con A (A); 9-144 μg de ^{125}I -*P. sativum* (B); 5,5-88 μg de ^{125}I -*L. culinaris* (C) y 4-56 μg de ^{125}I -WGA (D). ■ Linfocitos B; ● Linfocitos T; ▲ Linfocitos $T\gamma$, y + Linfocitos $T\mu$.

Tabla 1. Número de receptores lectínicos en linfocitos B, T, $T\gamma$ y $T\mu$. Grado de significación según la t de Student ($p < 0,01$): 1) Diferencia entre linfocitos B y T; 2) diferencia entre linfocitos $T\gamma$ y $T\mu$. N = 11.

Lectina	B	Moléculas/célula ($\times 10^{-7}$)		
		T	$T\gamma$	$T\mu$
Con A	$0,53 \pm 0,08$	$0,74 \pm 0,09$	$1,07 \pm 0,16$	$0,63 \pm 0,10^2$
<i>L. culinaris</i>	$2,00 \pm 0,13$	$1,08 \pm 0,17^1$	$0,71 \pm 0,09$	$1,10 \pm 0,09$
<i>P. sativum</i>	$0,79 \pm 0,08$	$0,49 \pm 0,07^1$	$0,66 \pm 0,05$	$0,35 \pm 0,06^2$
WGA	$5,32 \pm 0,42$	$3,07 \pm 0,29^1$	$1,78 \pm 0,13$	$2,21 \pm 0,25^2$

Tabla II. Constante de asociación de las lectinas con linfocitos B, T, T γ y T μ . Grado de significación según la t de Student ($p < 0,01$): 1) Diferencia entre linfocitos B y T; 2) diferencia entre linfocitos T γ y T μ . N = 11.

Lectina	Constante de asociación x 10 ⁻⁹ M			
	B	T	T γ	T μ
Con A	0,94 \pm 0,09	1,07 \pm 0,13	1,17 \pm 0,15	1,20 \pm 0,18
<i>L. culinaris</i>	3,86 \pm 0,22	2,86 \pm 0,25 ¹	1,92 \pm 0,12	1,82 \pm 0,11 ²
<i>P. sativum</i>	1,58 \pm 0,16	1,02 \pm 0,17 ¹	1,15 \pm 0,12	0,52 \pm 0,07 ²
WGA	2,20 \pm 0,35	2,70 \pm 0,43 ¹	0,83 \pm 0,12	1,16 \pm 0,20 ²

la media de 11 experimentos realizados para cada caso. De ellas se dedujo que linfocitos B ligaron mayor número de moléculas de las lectinas *Lens culinaris*, *Pisum sativum* y WGA que linfocitos T, no apreciándose diferencias estadísticamente significativas entre ambas poblaciones de linfocitos con la lectina Con A. A linfocitos T γ se unieron mayor número de moléculas de Con A y *Pisum sativum* que a T μ ; sin embargo, a T μ se unieron las lectinas *Lens culinaris* y WGA en mayor proporción que a T γ (tabla I). Las lectinas *Lens culinaris*, *Pisum sativum* y WGA mostraron mayor afinidad con linfocitos T que con B, no apreciándose diferencias significativas entre ambos respecto a Con A. *Lens culinaris* y *Pisum sativum* manifestaron mayor afinidad por la subpoblación T μ , WGA por T γ y escasas diferencias se observaron entre ambas subpoblaciones con la lectina Con A (tabla II).

Discusión

A pesar de que las lectinas Con A, *L. culinaris* y *P. sativum* se unen específicamente a D-manosa (13, 18), no mostraron especificidad en el mismo sentido en su unión a los receptores de los distintos tipos de linfocitos estudiados. Cabía esperar estos resultados, ya que la especificidad de las lectinas no sólo depende de la

composición química del receptor, sino además de la estructura y configuración espacial de éste en la membrana.

Linfocitos T ligaron mayor número de moléculas de Con A que linfocitos B, pero con diferencias poco significativas. Estudios realizados en nuestro laboratorio mediante rosetas de látex-Con A demostraron la existencia en linfocitos T de una subclase específica de esta lectina de doble proporción que en linfocitos B, lo que implica la existencia de una subclase con gran abundancia de receptores para esta lectina y otra subclase carente de éstos. Si la subpoblación T γ estuviera representada en mayor proporción en la población total de T, el número medio en moléculas de Con A ligadas estaría aumentado en linfocitos T respecto a B, ya que se aprecian diferencias significativas entre esta subpoblación y la de linfocitos T μ . El bajo grado de afinidad de las dos subpoblaciones conlleva a un descenso del valor medio de la misma respecto a B. Por el contrario, *L. culinaris* y *P. sativum* se ligaron en mayor cantidad a linfocitos B. Con la lectina *L. culinaris* se ha aislado una glicoproteína mayoritaria propia de células B de 35.000 daltones que se homóloga con el antígeno Ia (4) o el antígeno HLA ligado a células B (19); otras glicoproteínas se han purificado con esta lectina (3), de las cuales la mayoría están presentes en linfocitos T. Tales hechos demuestran la existencia de receptores

para *L. culinaris* en ambas poblaciones de linfocitos, si bien el déficit acusado en T probablemente sea debido a la carencia de la Gp 35, más específica para la unión con la lectina. La lectina WGA se une específicamente a N-acetilglucosamina y ácido siálico (1). El número de moléculas de lectina ligadas a las células estudiadas es muy superior al resto de las lectinas, y se explica por la elevada cantidad de ácido siálico que compone la membrana plasmática de las células maduras (11). Esta lectina mostró mayor especificidad por linfocitos B, tanto en lo que se refiere al número de moléculas ligadas como en el grado de afinidad. Asimismo se puede considerar a la subpoblación T μ más específica, hecho que podría justificar su mayor movilidad electroforética respecto a T γ (9), al contener mayor concentración de ácido siálico que aumentaría la densidad de cargas negativas.

Resumen

El sistema inmune está integrado por distintas poblaciones y subpoblaciones de linfocitos, cada uno con un papel definido en la defensa del organismo y cuyas membranas plasmáticas presentan diferencias en la composición de las glicoproteínas y/o glicolípidos, tal como se ha detectado con lectinas marcadas con I¹²⁵. Los linfocitos B tienen mayor número de receptores para las lectinas *Lens culinaris*, *Pisum sativum* y WGA, mientras que los linfocitos T ligan mayor número de moléculas de Con A que los linfocitos T. La lectina WGA se muestra más específica por la subpoblación de T μ . Con A y *P. sativum* se unieron preferentemente a linfocitos T γ y no se apreciaron diferencias significativas entre ambas subpoblaciones respecto a *L. culinaris*. Por el grado de afinidad se deduce que la disposición espacial y estructura de los receptores es más idónea para la unión con Con A y WGA en linfocitos B y para *L. culinaris* y *P. sativum* en linfocitos T.

Bibliografía

1. ADAIR, W. E. y KORNFIELD, S.: *J. Biol. Chem.*, **249**, 4696-4705, 1974.
2. ADES, E. W., FERRONE, S. y BALCH, C. H.: *Scand. J. Immunol.*, **12**, 519-523, 1980.
3. BANDERET, E. y DESPONT, J. P.: *Int. Archs. Allergy Appl. Immunol.*, **61**, 1-8, 1980.
4. BIANCO, C., PATRICK, R. y NUSSENZWEIG, V.: *J. Exp. Med.*, **132**, 702-720, 1970.
5. BOYUM, A.: *J. Clin. Lab. Invest.*, **21**, 77-81, 1968.
6. CANTOR, H. y BOYSE, E. A.: *J. Exp. Med.*, **141**, 1376-1381, 1975.
7. CANTOR, H., SIMPSON, E., SATO, V. L., FATHMANN, C. G. y HENZENBERG, L. A.: *Cell Immunol.*, **15**, 180-186, 1975.
8. CHANG, L. M. S. y BOLLUM, F. J.: *J. Biol. Chem.*, **246**, 909-916, 1971.
9. GUPTA, S. y GOOD, R. A.: *Seminars in Hematology*, **17**, 1-29, 1980.
10. GURTNER, L. G., LEFRANC, S. M. y CLEVE, H.: *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **360**, 1829-1835, 1979.
11. HOESLI, D., BRON, G. y PINK, R. L.: *Nature (London)*, **283**, 576-578, 1980.
12. KAPLAN, M. E. y CLARK, C.: *J. Immunol. Meth.*, **5**, 541-574, 1973.
13. LIS, H. y SHARON, N.: *Ann. Rev. Biochem.*, **42**, 541-574, 1973.
14. MINGARI, M. C., MORETTA, L. y MORETTA, A.: *J. Immunol.*, **121**, 767-770, 1978.
15. PHILLIPS, D. R.: *Biochemistry*, **11**, 4582-4589, 1972.
16. REVILLARD, J. R., SAMARUT, C., CORDIER, G., LETHIBICHTHUY, J. C. y BROCHIER, J.: *C. R. Sci. Soc. Biol.*, **174**, 686-692, 1980.
17. SCHWARZE, W. W.: *Lancet*, **2**, 1264-1269, 1975.
18. SHARON, N. y LIS, H.: *Science*, **117**, 949-959, 1972.
19. SPRINGER, T. A., KAUFMAN, J. F., TERHORST, C. y STROMINGER, J. L.: *Nature (London)*, **268**, 213-218, 1977.
20. STECK, T. L. y WALLACH, D. F. H.: *Biochem. Biophys. Acta*, **97**, 510-522, 1965.
21. WINCHESTER, R. R. J., FU, S. M. y HOFFMAN, T.: *J. Immunol.*, **114**, 1210-1212, 1965.
22. WORMSLEY, S. B., COLLINS, L. M. y ROYSTON, I.: *Blood*, **57**, 657-662, 1981.