

Efecto de enzimas galactosidásicas sobre glicoproteínas de la membrana plaquetaria, determinado con lectinas

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

Servicio de Hematología
Hospital Clínico Universitario
37007 Salamanca (España)

(Recibido el 16 de octubre de 1984)

M. MANSO, I. DE DIOS and A. LOPEZ-BORRASCA. *Effect of Galactosidase Enzymes on Platelet Membrane Glycoproteins as Determined by Lectins*. Rev. esp. Fisiol., 41, 267-274. 1985.

Eight lectins specific for different ¹²⁵I-labelled carbohydrates were employed to study the effect of the neuraminidase, α -galactosidase, and β -galactosidase enzymes on the glycoproteins and terminal carbohydrates of platelet membranes. Neuraminidase was seen to cause a decrease in molecular weight, as measured by polyacrylamide gradient electrophoresis, in glycoproteins IIb and III; this was apparently due to an almost 50 % decrease in N-acetyl-D-glucosamine terminals. At the same time, new D-mannose and D-galactose terminals became accessible to the lectins. The α - and β -galactosidases did not seem to affect the molecular weight of the glycoproteins appreciably, though the N-acetyl-D-glucosamine terminals decreased and D-galactose debris increased; differences were observed in the effects of both enzymes. The results confirm that N-acetyl-D-glucosamine, D-mannose and D-galactose are the most abundant membrane carbohydrates and suggest that the first is found as a terminal whereas the others must also be located in the internal zones of the glycoproteins.

Key words: Lectins, Neuraminidase, Platelet glycoproteins, α -galactosidase, β -galactosidase.

Las primeras observaciones de la membrana plaquetaria, efectuadas por microscopía electrónica, ya mostraron gran abundancia de hidratos de carbono (glicocalix) que se prolongaban más de 200 Å de la superficie externa (1). En la membrana plaquetaria existe un número

indeterminado de glicoproteínas, algunas de ellas involucradas en la adhesión plaquetaria con el subendotelio vascular (glicoproteína Ib) (2, 6, 19) y en los fenómenos de agregación plaquetaria (glicoproteínas IIb y III) (6, 18); su purificación ha permitido conocer su elevado porcentaje glucídico (2, 13, 16). El marcado carácter aniónico de la membrana se debe mayoritariamente al ácido siálico, de glicoproteínas y glicolípidos (15). Las lectinas, por unirse específicamente a

* A quien debe dirigirse la correspondencia: Departamento de Fisiología Animal. Facultad de Biología. 37008 Salamanca.

glúcidos, se han aplicado a la caracterización de glicoproteínas, tanto solubles como con función estructural y receptora (10, 11), habiéndose detectado así en la membrana externa plaquetaria una elevada proporción de D-manosa, N-acetil-D-glucosamina y D-galactosa (12).

El objeto de este trabajo es identificar nuevos componentes glucídicos en la membrana plaquetaria mediante la utilización conjunta de enzimas hidrolíticos específicos y de lectinas.

Material y Métodos

Obtención de plaquetas. Se obtuvo plasma rico en plaquetas, a partir de sangre venosa de sujetos normales, por centrifugación a 150 g, 20 min, a temperatura ambiente. Las plaquetas se separaron del plasma por elución cromatográfica en Sepharosa 2B (Pharmacia), con tampón Tris-ClH 0,01 M de pH 7,5; 0,15 M ClNa; 0,0025 M EDTA y 200 µg/ml apirasa (Sigma) (20).

Tratamiento de plaquetas con neuraminidasa, α -galactosidasa y β -galactosidasa. Alícuotas de suspensión con 10^9 plaquetas/ml se incubaron a 37°C con 10 U de neuraminidasa de *Vibrio cholerae* (Sigma) durante 15 min (14); o con 0,6 U de α -galactosidasa (Sigma) durante 30 min; o con 0,2 U de β -galactosidasa (Sigma) durante 30 min. Después de la incubación se centrifugaba dos veces a 2.000 g, durante 10 min a 4°C, y el sedimento de plaquetas se resuspendía en el volumen inicial del medio de elución.

Marcaje de plaquetas con I^{125} . Las plaquetas (10^9 /ml) se marcaron con 0,2 mCi de Na I^{125} (Amersham) mediante el enzima lactoperoxidasa (17).

Electroforesis en gradiente de poliacrilamida. Se basó en la técnica de LAEMM LI (7), aplicada a placas de poliacrila-

mida en gradiente del 4-30 %. Las plaquetas marcadas con I^{125} se solubilizaron y redujeron con tampón Tris-ClH 0,0625 M; pH 6,8; 2 % SDS; 10% glicerol; 5 % DTT; 0,001 % de azul de bromofenol, durante 30 min a 37°C y 2 min a 100°C. La electroforesis se efectuó con muestras de 50 µg, a 25 mA por placa (8 × 7 × 0,2 cm). Los pesos moleculares se determinaron por comparación con patrones conocidos: α_2 -macroglobulina, apoferritina, catalasa, ceruloplasmina y albúmina. La radiactividad de las bandas electroforéticas se determinó por conteo de las fracciones de gel cortadas a 0,5 mm, en contador de radiaciones gamma.

Inmunoelectroforesis bidimensional. Se siguió la técnica de LAURELL (9), con muestras de 10 µl de suspensión de plaquetas marcadas (10 mg/ml), en placas de agarosa tipo I (Sigma) al 0,75 %, utilizando 175 µl de antisuero de conejo contra membranas plaquetarias.

Autorradiografías. Las placas de inmunoelectroforesis bidimensional (BIE) se autorradiografiaron con película Valca Rápida 90, durante 1-12 h a -80°C.

Marcaje de lectinas con I^{125} . Las lectinas de Concanavalina A (ConA), *Ricinus communis* II (RCA II), *Triticum vulgaris* (WGA), *Tetragonolobus purpureus* (TP), *Pisum sativum* (PS), *Lens culinaris* (LC), *Dolichos biflorus* (DB) y Fitohe-maglutinina P (PHA) (Sigma) (10 mg/ml) se marcaron con 0,2 mCi de Na I^{125} por la técnica de la lactoperoxidasa (3, 4). El I^{125} libre se separó por cromatografía en Biogel P-100 (Pharmacia) con tampón Tris-ClH 0,01 M de pH 7,5, con 0,1 % de albúmina bovina. La proteína se detectó con un Uvicord III (LKB).

Marcaje de plaquetas con lectinas I^{125} . Las plaquetas controles y las sometidas a la acción de enzimas (30×10^6 /100 µl)

se incubaron con ocho concentraciones distintas de cada lectina iodada (100 μ l), durante 45 min, a temperatura ambiente. La lectina iodada no ligada a las células se eliminó por dos centrifugaciones sucesivas a 2.000 g, 10 min, a 4°C. La incorporación de radiactividad a las plaquetas se midió en c.p.m.

Valoración del número de moléculas de lectina ligadas a las plaquetas. Se aplicó la técnica de STECK y WALLACH (21). La cantidad de proteína lectínica medida a 280 nm, se convirtió en mg/ml. A partir de la radiactividad incorporada se conocía la concentración de lectina unida a las plaquetas y sabiendo el peso molecular de las lectinas empleadas (ConA: 110.000, WGA: 35.000, RCA II: 120.000, TP: 120.000, PS: 53.000, LC: 48.000, DB: 140.000 y PHA: 110.000), se calculaba el correspondiente número de moles, y el consiguiente número de moléculas de lectina fijadas por célula.

Resultados

Primeramente se estudiaron los efectos enzimáticos de la neuramidasa, α -galactosidasa y β -galactosidasa sobre los componentes glucídicos, mediante las ocho lectinas. Se obtuvieron las gráficas de la cinética de saturación de los receptores plaquetarios por moléculas de lectina en plaquetas controles y en plaquetas sometidas a la acción de las enzimas. La representación gráfica de las dobles inversas (fig. 1) dio una recta cuya intersección con ordenadas representa el inverso del valor máximo de moléculas de lectina ligadas por plaqueta y la intersección en abscisas da idea de la afinidad (K), que es el valor inverso de la constante de asociación. En la Tabla I se indican los valores medios correspondientes a los siete experimentos realizados para cada

caso, con su desviación estandar y la significación estadística (t de Student) de sus diferencias con los valores control. La incubación con neuraminidasa reduce casi en un 50 % la fijación de WGA a la membrana plaquetaria, mientras que incrementa algo la fijación de ConA, DB y RCA II.

El tratamiento de plaquetas con α -galactosidasa y β -galactosidasa produce un ligero descenso en la fijación de WGA, con aumento de la unión con RCA II. La α -galactosidasa no modifica la unión de ConA, pero aumenta la de TP. La β -galactosidasa provoca el descenso de la fijación de LC y PS, sin que varíe la de ConA, e incrementando la de DB.

Se investigó luego el efecto de las enzimas sobre las glicoproteínas de la membrana plaquetaria, consideradas como receptoras de las lectinas. Para ello se estudió: a) el efecto hidrolítico sobre las glicoproteínas de plaquetas controles marcadas con I^{125} (fig. 2a), y b) efectuada la incubación enzimática, se marcaban las plaquetas con I^{125} , investigando las posibles diferencias entre unas y otras membranas mediante electroforesis (figura 2b). La hidrólisis con la neuraminidasa afecta a las glicoproteínas IIb y III, cuyos pesos moleculares descienden de 128.000 y 120.000 a 122.000 y 90.000 respectivamente (fig. 2a). El marcaje posterior a la incubación enzimática muestra un ligero incremento en la iodación de estas glicoproteínas, que mantienen alteradas sus movilidades electroforéticas (fig. 2a). La α - y β -galactosidasa no alteran de forma ostensible a las glicoproteínas (fig. 2a) que conservan pesos moleculares semejantes al control. El marcaje posterior a la incubación produce ligeros incrementos en la incorporación radiactiva de algunas glicoproteínas (figura 2b).

El estudio de las glicoproteínas por BIE (fig. 3) permite apreciar que la neuraminidasa provoca un incremento en la

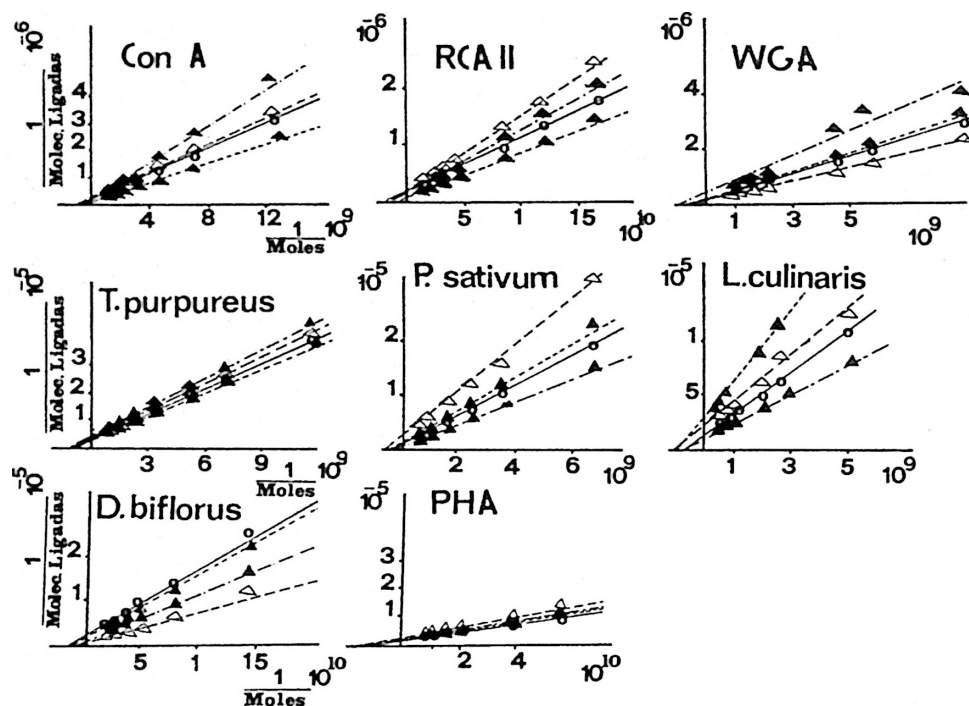


Fig. 1. Enlace de I^{125} -lectinas a plaquetas.

Se incubaron a temperatura ambiente, durante 45 min, 30×10^6 plaquetas/ $100 \mu\text{l}$ con $8\text{--}120 \mu\text{g}$ de I^{125} -Con A (Concanavalina A), $19\text{--}290 \mu\text{g}$ de I^{125} -RCA II (*Ricinus communis* II), $2\text{--}32 \mu\text{g}$ de I^{125} -WGA (*Triticum vulgaris*), $10\text{--}150 \mu\text{g}$ de I^{125} -TP (*Tetragonolobus purpureus*), $8\text{--}131 \mu\text{g}$ de I^{125} -PS (*Pisum sativum*), $8\text{--}125 \mu\text{g}$ de I^{125} -LC (*Lens culinaris*), $10\text{--}155 \mu\text{g}$ de I^{125} -DB (*Dolichos biflorus*) y $7\text{--}108 \mu\text{g}$ de I^{125} -PHA (Fitoheماغلوتينina). (—) Plaquetas controles, (····) Tratadas con neuraminidasa, (····) α -galactosidasa, (---) β -galactosidasa.

altura de la inmunoprecipitación de la glicoproteína IIb, mientras que no se aprecian alteraciones con las otras hidrolasas.

Discusión

La neuraminidasa se ha empleado anteriormente en estudios de la membrana plaquetaria (14), como paso previo en el marcaje de la membrana con I^{125} por el método de la galactosa-oxidasa, a fin de eliminar el ácido siálico y otros componentes glucídicos unidos a él, dejando

libres restos de galactosa (19). El efecto hidrolítico del enzima provoca una disminución en los pesos moleculares de las glicoproteínas IIb y III, que puede atribuirse a la drástica disminución del número de moléculas de N-acetil-D-glucosamina (componente del ácido siálico), que la neuraminidasa hidroliza específicamente en la membrana plaquetaria (5) y en otros tipos de células (8) y que en el presente estudio puede evaluarse en un 50 %, de acuerdo con el descenso en la capacidad de fijación de la lectina WGA, específica de este amino-azúcar. Con la hidrólisis, quedarían al descubierto mo-

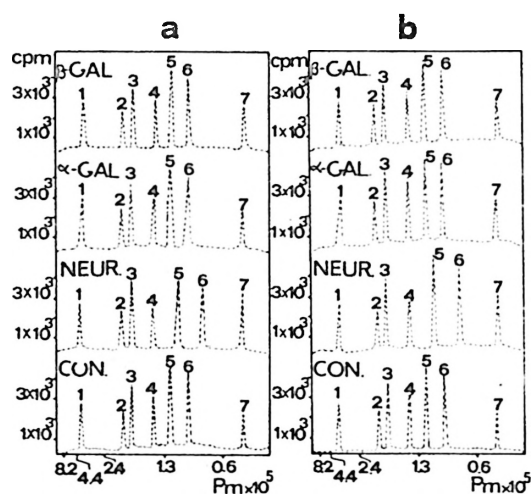


Fig. 2. Incorporación de radiactividad ^{125}I en las glicoproteínas de la membrana plaquetaria tras electroforesis en gradiente de acrilamida. a) marcado anterior a la incubación enzimática; b) marcado posterior a la incubación enzimática. Plaquetas control (Con), tratadas con neuraminidasa (Neur), con α -galactosidasa (α -gal) y β -galactosidasa (β -gal). 1-fibrinógeno, 2-glicoproteína Ia, 3-glicoproteína IIa, 4-glicoproteína Ib α , 5-glicoproteína IIb α , 6-glicoproteína III y 7-glicoproteína IIb β y/o glicoproteína Ib β .

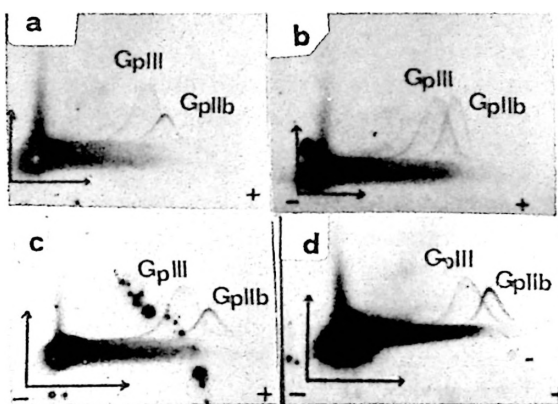


Fig. 3. Autorradiografía de inmunoelectroforesis bidimensional de plaquetas control (a) y de plaquetas tratadas con neuraminidasa (b), α -galactosidasa (c) y β -galactosidasa (d). GpIIb: glicoproteína IIb, GpIII: glicoproteína III.

lécúlas de D-manosa y D-galactosa, antes inaccesibles por la masa de ácido siálico, como sugiere la mayor fijación de ConA y RCA II, lectinas específicas para esos azúcares, lo que coincide con su elevada proporción en glicoproteínas purificadas (2, 13, 16). Por otro lado, la eli-

Tabla I. Moléculas de lectina ligadas por plaqueta ($\times 10^4$). Número de receptores lectínicos de plaquetas controles y tratadas con neuraminidasa, α -galactosidasa (α -Gal) y con β -galactosidasa (β -Gal). Grado de significación de diferencia con el control según la t de Student ($p < 0,01$: *), $N = 7$.

Lectina	Control	Neuraminidasa	α -Gal.	β -Gal.
Con A	$3,68 \pm 0,19$	$4,09 \pm 0,26^*$	$4,03 \pm 0,25$	$3,66 \pm 0,25$
LC	$0,61 \pm 0,05$	$0,64 \pm 0,05$	$0,53 \pm 0,07$	$0,42 \pm 0,08^*$
PS	$0,82 \pm 0,07$	$1,02 \pm 0,12^*$	$0,80 \pm 0,08$	$0,52 \pm 0,06^*$
RCA II	$2,48 \pm 0,12$	$3,98 \pm 0,13^*$	$4,61 \pm 0,10^*$	$3,34 \pm 0,16^*$
PHA	$0,38 \pm 0,11$	$0,46 \pm 0,08$	$0,48 \pm 0,11$	$0,48 \pm 0,11$
WGA	$2,85 \pm 0,14$	$1,57 \pm 0,09^*$	$2,54 \pm 0,07^*$	$2,39 \pm 0,13^*$
TP	$0,31 \pm 0,05$	$0,39 \pm 0,04$	$0,42 \pm 0,05^*$	$0,36 \pm 0,06$
DB	$0,75 \pm 0,08$	$0,84 \pm 0,05^*$	$0,83 \pm 0,04$	$0,92 \pm 0,05^*$

minación de los terminales glucídicos externos facilita la fijación del I^{125} por los restos tirosina de la glicoproteína, lo que explicaría el incremento de radiactividad de las bandas electroforéticas correspondientes a las glicoproteínas IIb y III, al ser marcada la membrana después del tratamiento con neuraminidasa: La eliminación de algunos terminales glucídicos en la glicoproteína IIb facilitaría la reacción inmunológica con el antisero, lo que podría explicar el incremento en la altura de su inmunoprecipitación en la BIE.

El efecto de las α - y β -galactosidasas no provoca alteraciones de las glicoproteínas, detectables por electroforesis; sin embargo ambas enzimas deben hidrolizar también terminales de N-acetil-D-glucosaminasa (cambios en la fijación de WGA) dejando al descubierto D-galactosa (aumento de fijación de RCA II), lo que asemeja su acción a la de la neuraminidasa, pero a un nivel más superficial de la membrana. La β -galactosidasa parece eliminar terminales D-manosa (disminuye la fijación de ConA) sin que sea detectable la aparición de nuevos terminales, quizá porque éstos tengan una localización inaccesible a las lectinas. El aumento de unión de DB, específica para terminales de N-acetil-D-galactosamina, por la acción de la β -galactosidasa y de TP, específico de L-fucosa, por efecto de la α -galactosidasa, manifiestan diferencias de ambas enzimas en su acción sobre la membrana plaquetaria.

Los resultados evidencian que la membrana plaquetaria posee gran abundancia de glucídicos, de los que la N-acetil-D-glucosamina parece estar situada al menos preferentemente como terminal externo, mientras que la D-manosa y la D-galactosa deben encontrarse tanto en terminales, como en niveles internos del componente glucídico de las glicoproteínas. Por último, la L-fucosa y la N-acetil-D-galactosamina deben variar en su loca-

lización y se encuentran en menor proporción en la membrana.

Resumen

Mediante ocho lectinas específicas para diversos glúcidos, marcadas con I^{125} , se estudia el efecto de las enzimas neuraminidasa, α -galactosidasa y β -galactosidasa sobre las glicoproteínas y glúcidos terminales de la membrana plaquetaria. La neuraminidasa provoca un descenso del peso molecular, medido por electroforesis en gradiente de poliacrilamida, en las glicoproteínas IIb y III, que parece ser debido a la disminución en casi un 50 % de los terminales de N-acetil-D-glucosamina, al tiempo que pasan a ser accesibles a las lectinas nuevos terminales de D-manosa y D-galactosa. Las enzimas α - y β -galactosidasa no parecen afectar apreciablemente al peso molecular de las glicoproteínas, aunque disminuyen los terminales de N-acetil-D-glucosamina y aumentan los restos de D-galactosa; se observan diferencias en los efectos de ambas enzimas. Los resultados confirman que N-acetil-D-glucosamina, D-manosa y D-galactosa son los monosacáridos más abundantes de la membrana plaquetaria y sugieren que el primero se encuentra como terminal, mientras que los otros deben estar también en zonas internas de las glicoproteínas.

Bibliografía

1. BEHNKE, O.: *J. Ultrastruc. Res.*, **24**, 51-56, 1968.
2. CLEMENTSON, K. J., PFUELLER, S. L., LUSCHER, E. F. y JENKINS, C. S. P.: *Biochim. Biophys. Acta*, **464**, 493-508, 1977.
3. DE DIOS, I., MANSO, M., MARTIN, M. y LÓPEZ-BORRASCA, A.: *Rev. esp. Fisiol.*, **40**, 19-24, 1984.
4. DE DIOS, I., MANSO, M., LEÓN, V. y LÓPEZ-BORRASCA, A.: *Rev. esp. Fisiol.*, **40**, 265-270, 1984.
5. GANGULY, P. y FOSSET, N. G.: *Blood*, **63**, 181-187, 1984.
6. HAGEN, I., NURDEN, A. T., BIERRUM, O. J., SOLUM, N. I. y CAEN, J. P.: *J. Clin. Invest.*, **65**, 722-729, 1980.
7. LAEMMLI, V. K.: *Nature*, **227**, 680-685, 1970.

8. LA RUSSA, V., SIEBER, F., SESENBRENER, L. L. y SHARKIS, J. S.: *Blood*, 63, 784-788, 1984.
9. LAURELL, C. B.: *J. Clin. Invest.*, 29, 124-129, 1972.
10. LIS, H. y SHARON, N.: *Ann. Rev. Biochem.*, 42, 541-574, 1973.
11. LIS, H. y SHARON, N.: En «The Antigens» (Sela, M., ed.) Academic Press, Nueva York, 1977, pp. 429-529.
12. MANO, M., DE DIOS, I. y LÓPEZ BORRASCÁ, A.: *Sangre*, 29, 141-147, 1984.
13. McEVER, C., BAEZINGER, N. L. y MAJERUS, P. W.: *Blood*, 59, 80-85, 1982.
14. MCGREGOR, J. L., CLEMENTSON, K. J., JAMES, E. y GREENLAND, T.: *Br. J. Haematol.*, 46, 99-107, 1980.
15. MEHRISI, J. N.: *Thromb. Diath. Haemorrh.*, 26, 370-375, 1971.
16. OKUMURA, T., LOMBART, C. y JAMIESON, G. A.: *J. Biol. Chem.*, 251, 5950-5955, 1976.
17. PHILLIPS, D. R.: *Biochemistry*, 11, 4582-4587, 1972.
18. PHILLIPS, D. R. y AGIN, P. P.: *J. Clin. Invest.*, 60, 535-540, 1977.
19. PHILLIPS, D. R.: En «Progress in Hemostasis and Thrombosis» (Spaet, T. H., ed.). Grune Stratton, Nueva York, 1980, vol. V, p. 80.
20. TANGEN, O., BERMAN, H. S. y MAPAY, P.: *Thromb. Diath. Haemorrh.*, 25, 66-68, 1972.
21. STECK, T. L. y WALLACH, D. F. H.: *Biochim. Biophys. Acta*, 97, 510-522, 1965.

