

*Centro de Investigación en Alimentación
y Desarrollo, S. de C. v.*

*Identificación de Estructuras Glicosídicas
Reconocidas por la Lectina PF2 en Fetuina y
Tejidos Linfoides*

POR:

Gabriel Urbano Hernández

Tesis Aprobada por la

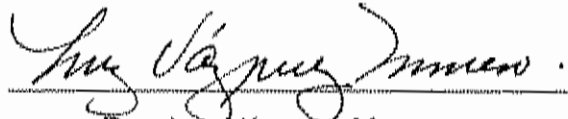
Comisión de Ciencias e Ingenierías

Como requisito Parcial Para Obtener el Grado de

DOCTORADO EN CIENCIAS

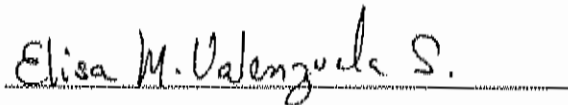
APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para revisar la tesis del M en C Gabriel Urbano Hernández, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Doctorado en Ciencias.



Dra. Luz Vázquez Moreno

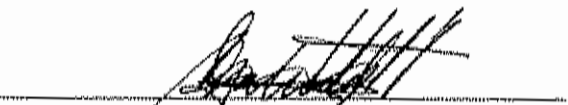
Directora de Tesis



Dra. Elisa Miriam Valenzuela Soto



Dra. María del Carmen Candia Plata

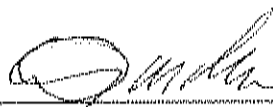


Dra. Gabriela Ramos Clamont-Montfort

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor, siempre y cuando se dé el crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita del director del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD).

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del manuscrito en cuestión, del director o directora de tesis.



Dr. Alfonso A. Gardea Béjar

Director General

AGRADECIMIENTOS

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C., al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, el apoyo que me brindaron para formar parte en el programa de Doctorado en Ciencias del CIAD, A.C.

Agradezco a la **Dra. Luz Vázquez Moreno** por su dirección, asesoría, enseñanzas, paciencia y ser fuente de conocimiento para la realización de este trabajo de investigación, con profunda admiración mil gracias por haberme dado la oportunidad de ser parte de su equipo de laboratorio, y dejar abiertas las puertas del conocimiento.

Agradezco a la **Dra. Carmen Candía Plata** y al **Dr. Guillermo López Cervantes** por ser fuente de conocimiento, paciencia, ejemplo, fuerza, apoyo y amistad, gracias por haberme dado la oportunidad de haberlos conocido y haber compartido el conocimiento conmigo.

Así mismo expreso mi gratitud a la **Dra. Elisa Miriam Valenzuela Soto** y la **Dra. Gabriela Ramos Clamont** por su colaboración para el mejoramiento de este trabajo de tesis, ustedes saben lo importante que fue su participación para llegar a buen término esta investigación.

Agradezco de manera especial a mi equipo de laboratorio nacional **M en C Ana María Guzmán Partida** y a la **M en C María del Refugio Robles Burgueño**, e internacional a la **Histotecnóloga Sofía Obdulia López Valenzuela** (HIES) por su amistad apoyo técnico y rudo, por su disposición para discutir (conceptos y definiciones) y compartir conocimientos, las quiero mucho.

A mis compañeros y amigos **Ana Lourdes, Dora, Ana Irene, Irlanda, Andre-i, Moncho, Claudia, Susana, Yolanda, Malena, Dra. Mayra de la Torre, Dra. Ana Maria Calderón, Silvia, Dra. Adela, Lolís y Chayito**, gracias por haberme dado lo mejor de su cariño y apoyo, cada uno de ustedes le dio un plus a estos cuatro años de mi vida, por haber compartido momentos de felicidad.

Agradezco también y de manera muy especial a **Marisa**, por todo su cariño, paciencia y comprensión, la quiero mucho marisilla, al personal de Coordinación **Anita, Vero, Laurita, Héctor, Don Héctor** y de la Biblioteca **Luis y Gerardo**, gracias por haberme dado la oportunidad de conocerlos por entregarme se cariño y por haber dejado huella en mi historia.

Finalmente, doy las gracias por su apoyo, cariño, fortaleza, paciencia y amor a mis papás **Carolina y Heriberto**, mis Hermanos, **Heriberto, Alejandra, Héctor, María Josefina**, sobrinas y sobrinos **Maura, Lilliana, Héctor Gabriel, Leonardo**. Saben que siempre han sido parte esencial en este proyecto de vida.

DEDICATORIA

A **Dios**, por darme la bendición de la vida y permitirme hacer mi búsqueda.

A mis padres **Carolina** y **Heriberto**, que a pesar de la distancia, siempre han estado conmigo, los admiro, los quiero mucho y los extraño, a ustedes les debo lo que soy. A mis hermanos, **Heriberto**, **Alejandra**, **Héctor**, **María Josefina**. Sobrinas y Sobrinos **Maura**, **Liliana**, **Héctor Gabriel**, **Leonardo**. Gracias por seguir formando parte de mi historia de vida, por estar a mi lado en la lucha y ser siempre el estandarte de mis batallas.

A todos los que me dejaron hablar, mirar, moverme, quejarme ya que en ocasiones pareciera ingrato este oficio. Aquellos que me dejaron jugar con puntos y comas, de andar buscando cualquier cosa, y de arruinarme la cabeza con el rompecabezas de buscar en nada, todo aquello que las palabras me permitan ¿Quién Sabe? por estar en el lugar exacto que aun no estoy seguro, para que radique, si es que alguien lo permite en alguna parte. Hoy el vientre de mi tesis se ha dejado acariciar y he de confesar que entre tanto flirteo me he llevado la mejor parte.

CONTENIDO

| | Página |
|--|--------|
| RESUMEN..... | V |
| INTRODUCCIÓN | 1 |
| ANTECEDENTES | 4 |
| Importancia de los Oligosacáridos | 4 |
| Lectinas..... | 7 |
| Propiedades Biológicas de las Lectinas..... | 7 |
| Clasificación de las Lectinas..... | 8 |
| Fuentes de las Lectinas..... | 9 |
| Estructura de las Lectinas de Leguminosas..... | 11 |
| Lectinas de Leguminosas Silvestres..... | 13 |
| Lectinas de Palo Fierro..... | 15 |
| Aislamiento y Purificación de Lectinas..... | 16 |
| Metodologías para la Caracterización de Carbohidratos..... | 17 |
| Electroforesis de Carbohidratos Asistida con un Fluoróforo (FACE)..... | 17 |
| Lectino-Ensayos | 18 |
| Espectrometría de Masas | 19 |
| PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA..... | 21 |
| OBJETIVOS | 23 |
| METODOLOGÍA..... | 24 |
| RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... | 28 |
| BIBLIOGRAFIA..... | 37 |

COMUNICACIONES CIENTIFICAS

| | |
|--|-----------|
| Artículo 1: Binding of <i>Oleaya Tesota</i> (PF2) lectin to human lymph nodes and thymus tissues..... | 45 |
| Artículo 2: Purification of a Glycoprotein from Human Spleen Tissue Using Affinity Chromatography with Immobilized PF2 Lectin (<i>Oleaya tesota</i>) | 66 |
| Artículo 3: Identification of a <i>N</i>-linked Oligosaccharide Recognized by PF2 Lectin in Glycoproteins from Lymphoid Tissues by Liquid Chromatography–Mass Spectrometry..... | 89 |

RESUMEN

Las lectinas son proteínas o glicoproteínas de origen no inmune, que comparten en común la habilidad de enlazarse de forma específica y reversible a los carbohidratos expresados en la superficie de la membrana celular. Originalmente las lectinas fueron descubiertas en plantas, también han sido detectadas en otros organismos vivos como vertebrados, invertebrados y microorganismos. El objetivo de esta investigación fue el de determinar las estructuras oligosacáridas reconocidas por la lectina de palo fierro 2 (PF2) en fetuina (glicoproteína modelo) y en tejidos linfoides mediante cromatografía de líquidos de alta resolución acoplada a masas (HPLC-Masas). Se evaluó la interacción de la lectina PF2 de las semillas de palo fierro (*Onyia tesota*) hacia tejidos linfoides mediante técnicas de histoquímica, utilizando como control la lectina de *Phaseolus vulgaris* Fitohemaglutinina-E (PHA-E). Se demostró que la lectina PF2 presentó interacción con zonas ricas en linfocitos B (centros germinales de ganglios linfáticos y folículos linfoides en timo); la reacción que se observó fue similar a la del anticuerpo anti-CD20. En ensayos previos de inhibición con glicoproteínas se demostró que PF2 reconoce oligosacáridos complejos. En base a estos hallazgos la lectina PF2 puede ser utilizada como marcador específico de células B.

En la segunda etapa experimental se aislaron y purificaron las glicoproteínas de los tejidos reconocidas por PF2, utilizando cromatografía de intercambio iónico en una matriz de carboximetil celulosa (CM-celulosa) y cromatografía de afinidad (Agarosa-PF2). El perfil electroforético mostró una glicoproteína monomérica abundante de 14 kDa en bazo y ganglio (GP14). En timo se encontraron seis glicoproteínas de 14, 20, 30, 34, 60 y 66 kDa. La glicoproteína del bazo GP14 fue digerida con una proteasa y los seis péptidos identificados presentaron alta homología con las proteínas de choque térmico de la familia de las HSP70. Esta glicoproteína (GP14) no ha sido reportada anteriormente.

cromatografía de afinidad (Ajarosa- PF2). El perfil electroforético mostró una glicoproteína monomérica abundante de 14 kDa en bazo y ganglio (GP14). En tino se encontraron seis glicoproteínas de 14, 20, 30, 34, 40 y 41 kDa. La glicoproteína del bazo GP14 fue digerida con una proteasa y los seis péptidos identificados presentaron alta homología con las proteínas de choque térmico de la familia de las HSP70. Esta glicoproteína (GP14) no ha sido reportada anteriormente.

Posteriormente, los carbohidratos de las glicoproteínas del bazo, del tino y fetuina (control) fueron liberados químicamente, se identificaron y caracterizaron estructuralmente mediante cromatografía de alta resolución acoplada a masas. El oligosacárido reconocido específicamente por PF2 fue identificado como complejo del tipo triantenario tetrasialilado, el cual es diferente al que reconoce la lectina PHA-E (oligosacárido complejo del tipo biantenario bisectado).

INTRODUCCION

El comportamiento social de la célula viva que comprende la comunicación intracelular, la regulación del crecimiento, su diferenciación, la respuesta inmune y posiblemente la aparición de tumores malignos, está mediado principalmente por la superficie celular, más concretamente, por las moléculas de oligosacáridos complejos presentes en los glicoconjugados, que forman la arquitectura de toda la superficie de la célula. Para el estudio de estos glicoconjugados, se emplean entre otras herramientas a las lectinas. Las lectinas son proteínas o glicoproteínas que se unen de manera específica a los oligosacáridos presentes en la membrana celular. Estas moléculas han sido empleadas como herramientas histoquímicas para investigar la arquitectura de la membrana celular, gracias a la propiedad que muestran de unirse a residuos glicosídicos (Jaffe y col., 1980; Goldstein y col., 2002).

Las lectinas poseen múltiples sitios de unión a los que se unen sacáridos, colocando en mutua conexión a un gran número de células, provocando su aglutinación o reagrupación (Lis y Sharon, 1986). Cada lectina se une de forma específica a un determinado carbohidrato. A esta característica de selectividad deben su nombre las lectinas, que les fue asignado en 1954 por uno de los pioneros en este campo, William C. Boyd. Debido a la selectividad de aglutinación, las lectinas sirven como sustancias de prueba para la identificación, localización y estudio de la distribución de los oligosacáridos sobre la superficie de las células (Liener y col., 1986).

Las lectinas pueden distinguir entre glóbulos rojos de distinto grupo sanguíneo. Debido a la facilidad con que aglutinan a las células malignas, algunas aglutininas son capaces de diferenciarlas de las células normales, poniendo de manifiesto los cambios que sufre la célula cuando es maligna. Por otra parte, las lectinas estimulan la división de linfocitos, células pertenecientes al sistema inmune (Lis y col., 1986; Sharon y Lis, 1989). Se ha demostrado que las lectinas tienen efectos antifisiológicos, ya que alteran las funciones en la mucosa intestinal al unirse a las microvellosidades del intestino, impidiendo la absorción de algunos nutrientes, lo cual se refleja en la pérdida de peso corporal. Sin embargo, en función a la característica que muestran de afectar el crecimiento de células transformadas, se les considera como una fuente de estudio importante (Pusztai y col., 1993).

El Palo Fierro (*Olneya tesota*) es una leguminosa silvestre presente en el Desierto de Sonora. Sus semillas contienen 3 lectinas, purificadas por cromatografía de afinidad, denominadas PF1, PF2 y PF3. Particularmente, PF2 es un tetrámero formado por subunidades de 33 kDa y es la molécula más abundante en la semillas (3% de la proteína total). La lectina PF2 es inhibida solamente por carbohidratos complejos de glicoproteínas. La secuencia del extremo amino-terminal y de algunas secuencias internas de PF2 presentan alta homología con la lectina de *Phaseolus vulgaris* Fitohemaglutinina-E (PHA-E) (Vázquez-Moreno y col., 2000), la cual reconoce estructuras de oligosacáridos complejos del tipo biantenarío bisectado, presentes en la membrana celular de eritrocitos.

En base a lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue aislar e identificar las estructuras oligosacáridas que reconoce la lectina PF2 derivadas de fetuina y tejidos linfoides, utilizando cromatografía de afinidad y la técnica más precisa y moderna que actualmente existe, cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masas (HPLC-MS).

ANTECEDENTES

Importancia de los Oligosacáridos

Los oligosacáridos son moléculas esenciales en los seres vivos, son parte integral de las glicoproteínas y glicolípidos que se encuentran en la membrana celular y en líquidos extracelulares. Los oligosacáridos participan en interacciones celulares en una amplia variedad de sistemas biológicos. Estas moléculas afectan las funciones fisicoquímicas y biológicas de las proteínas por ejemplo, plegado, estructura tridimensional, solubilidad y estabilidad (Itoh y col., 2006), así como el tiempo de vida de alguna célula en circulación; además, la presencia de oligosacáridos ayuda a proteger a las moléculas contra la acción de las proteasas, entre otras (Kobata, 1992; Varki y col., 1999).

Los oligosacáridos presentes en las glicoproteínas les confieren mayor polaridad, facilitando su interacción con el medio acuoso, es decir, mayor solubilidad. Además, los residuos de ácido siálico aportan numerosas cargas negativas a las proteínas, protegiéndolas de la acción de proteasas. Con respecto al aclaramiento, se ha reportado que la presencia de ácido siálico en las glicoproteínas es la señal que determina si la glicoproteína continúa en circulación o es removida por receptores de asialoglicoproteínas. La presencia del oligosacárido influye en el proceso de plegamiento correcto de la molécula, y brinda estabilidad a la glicoproteína (Leurouge y Faye, 1996).

Los oligosacáridos unidos a lípidos o a proteínas de la superficie celular, pueden determinar la individualidad antigénica tanto del tipo de tejido como del propio individuo (Power, 1997). Así, las sustancias que determinan la especificidad de grupo sanguíneo de la superficie del eritrocito son oligosacáridos complejos (Sharon y Lis, 1990).

Los oligosacáridos más comúnmente encontrados en las proteínas de la membrana celular están definidos de acuerdo a la naturaleza de su unión, siendo las más frecuentes las del tipo O y N como se muestra en la Figura 1. Los oligosacáridos del tipo N (N-glicanos) se unen a un residuo de asparagina de la cadena polipeptídica dentro de una secuencia Asn-X-Ser/Thr, generalmente vía N-acetilglucosamina. Los oligosacáridos del tipo O (O-glicanos) se unen a un residuo de serina/treonina (Ser/Thr-O) vía N-acetilgalactosamina (Varki y col., 1999).

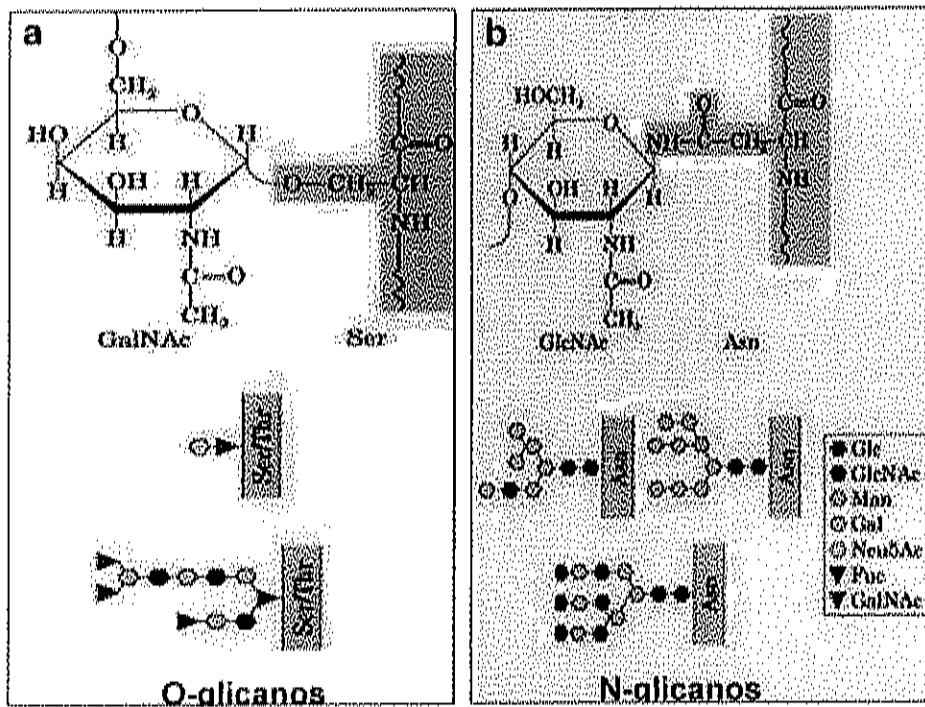


Figura 1. Ejemplos de oligosacáridos complejos presentes en la membrana celular. (a) O- glicanos, (b) N-glicanos (<http://www.docencia.izt.uan.mx>).

Lectinas

Propiedades Biológicas de las Lectinas

Las lectinas son un grupo de glicoproteínas o proteínas de origen no inmune que tienen la habilidad de reconocer carbohidratos libres o conjugados con alta especificidad (Goldstein y col., 1980; Sharon y Lis, 1989; Fukuda, 1993). Las lectinas presentan la capacidad de aglutinar eritrocitos y otras células, la estimulación mitogénica de linfocitos, la generación de células supresoras, efectos parecidos a la insulina en células grasas, toxicidad hacia células, inhibición del crecimiento de células tumorales, entre otros (Lis y Sharon, 1986).

Algunas lectinas son tóxicas para células y mamíferos, actúan en la inhibición del crecimiento fúngico y participan en la inhibición del cultivo en células tumorales, entre otras propiedades. La función biológica de las lectinas se lleva a cabo mediante la interacción lectina-carbohidrato en las superficies celulares, por medio de enlaces no-covalentes y reversibles como los que se presentan en la enzima con su sustrato o entre un anticuerpo con su antígeno (Lis y Sharon, 1986; Sharon y Lis, 1989).

Aun cuando la acción de las lectinas es semejante a la acción de los anticuerpos sobre los antígenos, existen diferencias, ya que los anticuerpos son producto del sistema inmune de animales, además de que la especificidad de los anticuerpos no se limita únicamente a los carbohidratos, como es el caso de las lectinas (Figueroa y Lajolo, 1997).

La capacidad de aglutinar células es una de las características de las lectinas que las distingue de otro tipo de moléculas; ya que muestran afinidades diferenciales hacia eritrocitos humanos, han sido empleadas para tipificar los diferentes tipos sanguíneos (Roth, 1978; Lee y Lee, 1991). La aglutinación puede parecer un fenómeno hasta cierto punto simple, pero no es así, ya que es un fenómeno que es afectado por condiciones de mezclado, temperatura y concentración celular (Sharon y Lis, 1972), lo cual permite utilizar a las lectinas en la investigación de la arquitectura de las superficies celulares. El principio anterior también ha sido utilizado para tratar de esclarecer los fenómenos de transformación y diferenciación de células transformadas (Yu y Kanost, 2000).

Algunas lectinas presentan efectos antinutricios como la concanavalina A (Con A), la aglutinina de germen de trigo (WGA) y la fitohemaglutinina (PHA); se presentan cuando se establece una unión a los sitios receptores específicos de las células epiteliales de la mucosa intestinal, causando lesión, desorganización y desarrollo anormal de las microvellosidades, en consecuencia, provocando náusea, diarrea y vómito, así como edema en humanos (Lis y Sharon, 1986; Sharon y Lis, 1989). Otra de las funciones importantes de las lectinas es la unión de las bacterias fijadoras de nitrógeno en leguminosas y protección contra patógenos (Strosberg y col., 1986).

Clasificación de las Lectinas

Las lectinas tienen la capacidad de reconocer y unirse con alta afinidad a los carbohidratos simples o a los provenientes de los glicoconjugados tales

como glicoproteínas, glicolípidos y polisacáridos (Van Damme y col., 1993; Goldstein y col., 1980). Las lectinas han sido clasificadas de acuerdo a su especificidad en lectinas que reconocen a: L-fucosa, manosa/glucosa, galactosa/N-acetilgalactosamina, N-acetilglucosamina, ácido N-acetilneuramínico y oligosacáridos complejos (Loris y col., 1998) (Cuadro 1). Las lectinas exhiben un rango muy amplio de actividades biológicas, las cuales dependen de su habilidad para ligar carbohidratos específicos de manera reversible.

Algunas lectinas interaccionan selectivamente con eritrocitos de diferente tipo sanguíneo y con ciertas subpoblaciones de linfocitos. Algunas otras son potentes mitógenos de linfocitos T o B, estimulando a estas células para dividirse y producir citocinas; además pueden inducir la lisis de células blanco a través de células T citotóxicas y algunas lectinas de plantas son altamente tóxicas para células de mamíferos (Sharon y Lis, 1990; Pusztai y col., 1991).

Fuentes de las Lectinas

Las lectinas fueron descubiertas en plantas, pero también han sido encontradas en otras clases de organismos, como vertebrados (Lenter y col., 1994; Kasai e Hirabayashi, 1996; Blanchard y col., 1999; Ohtani y col., 1999; Graversen y col., 2000), invertebrados (Andrews y col., 1997; Giuffrida y col., 1997; Yu y Kanost, 2000; Bonay y Fresno, 2000) y microorganismos (Barondes,

Cuadro 1. Clasificación de lectinas de acuerdo a su especificidad

| LECTINAS | Referencia |
|---|--|
| <p>Específicas a manosa <i>Galanthus nivalis</i></p> | <p>Kaku y col., 1991; Pusztai y col., 1995; Battelli y col., 1997</p> |
| <p>Específicas a manosa/glucosa <i>Canavalia ensiformis</i> (Con A) <i>Pisum sativum</i> (Chícharo) (PSA) <i>Lens culinaris</i> (LCA)</p> | <p>Kaku y col., 1991; Kiss y col. 1997 Kaku y col., 1991 Dam y col., 2000</p> |
| <p>Específicas a N-acetilglucosamina <i>Griffonia simplicifolia II</i> (GSA-II) <i>Triticum vulgare</i> (WGA) <i>Datura stramonium</i> (DSA)</p> | <p>Kiss y col., 1997 Di Virgilio, 1998</p> |
| <p>Específicas a N-acetilgalactosamina <i>Amaranthus caudatus</i> <i>Arachis hypogaea</i> <i>Glycine max</i> <i>Phaseolus mungo</i> <i>Ricinus communis II</i> <i>Sophora japonica</i></p> | <p>Yu y col., 1993 Boland y col., 1991 Sanford y Harris-Hooker, 1990 Jordan y Goldstein, 1995 Scocco y col., 1996 Van Damme y col., 1997</p> |
| <p>Específicas a fucosa <i>Lotus tetragonolobus</i> (LTA) <i>Aleuria aurantia</i> (AAA) <i>Ulex europaeus</i> (UEA-I)</p> | <p>Scocco y col., 1996 Yan y col., 1997 Yamashita y col., 1985</p> |
| <p>Específicas a ácido siálico <i>Maackia amurensis</i> <i>Sambucus nigra</i></p> | <p>Shigeta y col., 1994, Alvarez y col., 1999, Imbert y col., 2000 Van Damme y col., 1997, Battelli y col., 1997, Fang y col., 1998</p> |
| <p>Específicas a oligosacáridos complejos <i>Phaseolus vulgaris</i> PHA-E PHA-L <i>Griffonia simplicifolia IV</i> <i>Olearya tesota</i> Palo fierro 2</p> | <p>Kiss y col., 1997 Kiss y col., 1997 Scocco y col., 1996 Vázquez-Moreno y col., 2000</p> |

1981; Weis y Drickamer, 1996; Guillén y col., 1999). Algunos estudios con lectinas de plantas sugieren que pueden ser excretadas y funcionar como proteínas extracelulares (Barondes, 1984).

Las lectinas han sido detectadas en más de 1000 especies de plantas, encontrándose que las fuentes más ricas de estas proteínas son las semillas maduras de leguminosas, ya que en éstas constituyen hasta un 10 % de la proteína total (Sharon y Lis, 1989; Van Damme y col., 1997). La fuente de lectinas de leguminosas más investigadas son *Lens culinaris* (Wold y col., 1994), *Phaseolus vulgaris*, *Dolichus biflorus* y *Lotus tetranogonolobus*, entre otras (González de Mejía y col., 1989).

Estructura de las Lectinas de Leguminosas

Las lectinas de leguminosas están constituidas de dos a cuatro subunidades de 25–30 kDa (Strosberg y col., 1986; Sharon, 1994). Cada subunidad cuenta con un sitio enlazador de carbohidratos (Van Damme y col., 1997; Dam y col., 2000) y para que se lleve a cabo el reconocimiento, en ocasiones requiere la presencia de Ca^{2+} y Mn^{2+} (u otro metal de transición) (Sharon, 1994; Graversen y col., 2000; Imberty y col., 2000). Se han empleado técnicas químicas y de genética molecular para establecer la estructura primaria de más de 80 lectinas de leguminosas (Imberty y col., 2000) encontrándose que más del 20 % de la secuencia de aminoácidos permanece invariable. En estas secuencias se localizan los sitios de unión a carbohidratos de las lectinas (Sharon, 1994; Mo y Goldstein, 1994; Van Damme y col., 1997).

La mayoría de las lectinas son relativamente ricas en ácido aspártico, serina y treonina (Weimar y col., 2000), constituyendo aproximadamente el 30% de su contenido de aminoácidos, además presentan un contenido relativamente bajo de aminoácidos azufrados (Sharon y Lis, 1972; Guillot y col., 1991; Hamelryck y col., 1996).

Se han realizado estudios sobre la estructura tridimensional de lectinas de leguminosas empleando cristalografía de rayos X de alta resolución 2.0 – 2.9 Å, entre los que se encuentra a la Concanavalina A (Con A), la lectina de haba (*Vicia fava*), la lectina de chícharo (*Pisium sativum*), la lectina de *Erythrina corallodendron*, la isolectina I de *Lathyrus ochrus* y la isolectina de *Griffonia simplicifolia*. Los resultados indican que las subunidades de estas lectinas presentan la forma de media cúpula. Además tienen un sitio combinante formando una depresión poco profunda en su ápice, y sus estructuras terciarias casi no pueden empalmarse; es decir, las diferencias entre las estructuras están confinadas primeramente a regiones curvas. Las lectinas de leguminosas carecen de α -hélices y contienen una gran cantidad de láminas β antiparalelas. Lo anterior indica que la totalidad de la estructura tridimensional de estas proteínas está estrechamente relacionada y mejor conservada que en su estructura primaria (Sharon, 1994).

En 1995, Jordan y colaboradores realizaron estudios de mutagénesis sitio-dirigida en la lectina de frijol lima. En este experimento se determinó que una sustitución en la región de enlace de la lectina es suficiente para causar un cambio en su especificidad hacia carbohidratos. Ellos mencionan que tanto los

puentes de hidrógeno como las fuerzas de van der Waals se encuentran involucrados en la unión de los carbohidratos. El paso inicial de la interacción de las lectinas con las células es la unión a sitios receptores de sacáridos específicos en la superficie celular figura 2 (Gullot y col., 1991; Mody y col., 1995; Wawotzny y col., 1995; Jordan y Goldstein, 1995; Van Damme y col., 1997).

Lectinas de Leguminosas Silvestres

La mayoría de los estudios de lectinas están enfocados en los provenientes de leguminosas cultivadas como la soya (*Glycine max*), el chícharo (*Pisium sativum*), el cacahuete (*Arachis hypogea*) y el frijol (*Phaseolus vulgaris*). Los estudios en leguminosas silvestres se han enfocado principalmente a la lectina del frijol teparí (*Phaseolus acutifolius*) (González de Mejía y col., 1989) y a las lectinas de leguminosas del desierto de Sonora.

Con relación a estas últimas, Ortega-Nieblas (1996), Vázquez-Moreno y col. (2000) y Guzmán-Partida y col. (2004), reportaron la purificación y caracterización de algunas lectinas de semillas de leguminosas silvestres como *Cercidium praecox*, *Caesalpinia caladenia*, *Olneya tesota* y *Acacia constricta*, que reconocen oligosacáridos complejos.

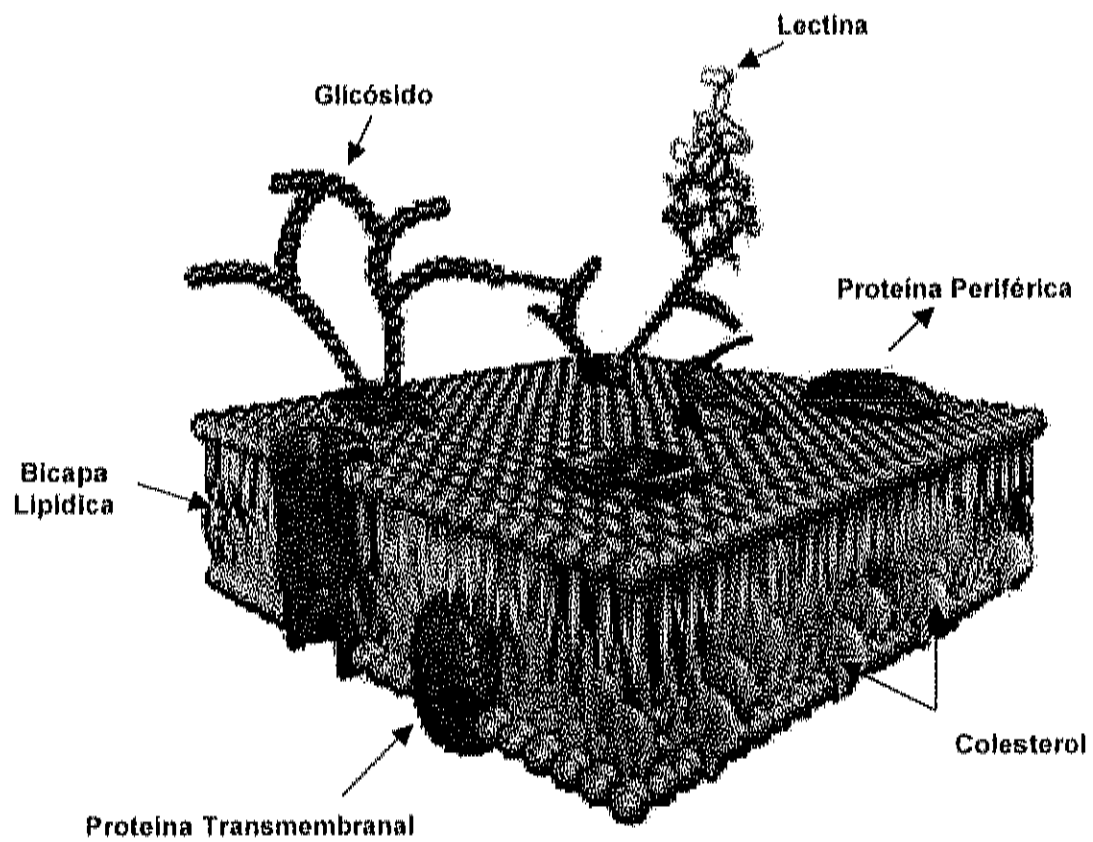


Figura 2. Representación esquemática del reconocimiento entre lectinas y carbohidratos de la membrana celular (<http://chemistry.mtv.edu>).

Lectinas de Palo Fierro

El Palo Fierro (*Olneya tesota*) es una leguminosa silvestre del desierto de Sonora. Los pobladores de la región utilizan sus semillas para la elaboración de panes. Sus semillas contienen tres lectinas, purificadas por cromatografía de afinidad, denominadas PF1, PF2 y PF3. La lectina PF1 es un trímero de subunidades de 45 kDa, PF2 es un tetrámero de subunidades de 33 kDa, mientras que PF3 es un monómero de 66 kDa (Vázquez-Moreno y col., 2000). PF2 es la más abundante (3% de la proteína total). La lectina PF1, al igual que la mayoría de las lectinas de leguminosas cultivadas, presenta afinidad por monosacáridos libres (D-glucosa y D-galactosa), mientras que PF2 y PF3 son específicamente inhibidas por carbohidratos complejos derivados de glicoproteínas.

La secuencia del extremo amino-terminal y de algunas secuencias internas de PF2 muestran alta homología con la lectina de *Phaseolus vulgaris* (PHA) (Vázquez-Moreno y col., 2000), mientras que estudios realizados por López-Laredo (2005) mostraron que la lectina PF2 es una glicoproteína conformada por N-oligosacáridos del tipo biantenarico.

Tanto la lectina PF2 como PHA, forman tetrámeros y sus subunidades tienen una masa molecular de 33 kDa, y son inhibidas sólo por carbohidratos complejos. Sin embargo, experimentos de reconocimiento celular e inducción de la actividad mitogénica indican que existen claras diferencias entre la actividad de estas dos lectinas, sugiriendo por tanto que su especificidad es

diferente. PF2 es tóxica para *Z. subfasciatus*, mientras que la lectina de frijol no inhibe el desarrollo de estos insectos (Vázquez-Moreno y col., 2000).

Aislamiento y Purificación de Lectinas

Tradicionalmente, las lectinas se han purificado empleando métodos para el fraccionamiento de proteínas, precipitación con sales, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de exclusión molecular y más recientemente cromatografía de afinidad (Roth, 1978; Lee y Lee, 1991). Para la purificación de una lectina por afinidad debe determinarse su especificidad, ya que cada molécula de lectina posee al menos dos regiones de enlace, cada uno de los cuales puede acoplarse a una molécula complementaria de un carbohidrato o a varias unidades pertenecientes a un polisacárido al que es específico (Lee y Lee, 1991).

Muchas lectinas han sido aisladas por cromatografía de afinidad utilizando geles de O-glicosil-poliacrilamida. Algunas de estas lectinas son: *Ononis spinosa*, *Ricinus communis*, *Anguilla anguilla*, *Vicia cracca*, *Phaseolus lunatus*, *Glycine soja*, *Dolichus biflorus*, *Maclura pomifera*, *Sarothamnus scoparius*, *Helix pomatia*, *Canavalia ensiformis* (Kiss y col., 1997), *Clytocybe nebularis*, *Fomes fomentarius* (Horejsí y col., 1978), *Sambucus nigra* (Van Damme y col., 1997; Battelli y col., 1997). Adicionalmente se han aislado lectinas de diferentes leguminosas del desierto de Sonora, utilizando matrices de agarosa activada con divinil-sulfona (Mini Leak ®) a las que se les ha

acoplado fetuina bovina. Estas lectinas son provenientes de *Cerciduum praecox*, *Caesalpinia calodeni* (Felipe-Ortega, 1996), *Oneya tesota* (Vázquez-Moreno y col., 2000) y *Acacia constricta* (Guzmán-Partida y col., 2004) entre otras.

Metodologías para la Caracterización de Carbohidratos

A pesar de la importancia de los oligosacáridos complejos en todos los procesos antes mencionados, son pocas las estructuras de oligosacáridos complejos de la membrana celular que han sido elucidadas completamente. Para la caracterización e identificación de los oligosacáridos complejos se han empleado diferentes técnicas como la electroforesis de carbohidratos asistida por un fluoróforo (FACE), los ensayos con lectinas y la cromatografía de líquidos de alta resolución acoplados a masas, entre otras (Dell y col., 1994; Gou-fu, 1997)

Electroforesis de Carbohidratos Asistida con un Fluoróforo (FACE)

FACE es una técnica que combina el alto poder de resolución del gel de electroforesis de poliacrilamida (PAGE) con la sensibilidad y visibilidad de la fluorescencia. Puede ser combinada con la liberación enzimática de N-oligosacáridos u O-oligosacáridos para analizar los componentes oligosacáridos de las glicoproteínas (Gou-fu, 1997). Los carbohidratos liberados de las glicoproteínas, se someten a un método químico o enzimático utilizando endoglicosidasas. Este tratamiento permite revelar rápidamente información

estructural de los oligosacáridos en una mezcla (Raju, 2003). Los carbohidratos tienen un extremo reductor que se hace reaccionar con un fluoróforo que presenta un grupo amino primario. El producto formado (base de Schiff) es estabilizado por aminación reductiva utilizando cianoborohidruro de sodio. Posteriormente, los oligosacáridos marcados son separados por electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE) y por último son detectados y cuantificados por fluorescencia generada, utilizando luz UV (Gou-fu, 1997).

El fluoróforo que más se utiliza para marcar carbohidratos es el ácido 8-aminonaftaleno-1,3,6-trisulfónico (ANTS). Este marcador, además de convertir al oligosacárido en un compuesto fluorescente hace que las moléculas neutras adquieran carga negativa, permitiéndoles migrar en un campo eléctrico. Entre las ventajas de este método, además de ser muy sensible y rápido, se encuentran su costo relativamente bajo, además, pueden analizarse carbohidratos que provienen de distintas fuentes y la muestra puede reutilizarse para experimentos posteriores. En este sistema no se necesita separar oligosacáridos cargados de los no cargados, simplificando así el perfil y la secuenciación. La capacidad de analizar múltiples muestras en el mismo gel hace de éste, un sistema muy útil para complementar el análisis de carbohidratos por otros métodos (Gou-fu, 1997).

Lectino-Ensayos

Esta técnica es altamente sensible por la gran especificidad de las lectinas por carbohidratos, que además de proporcionar información sobre el

PHA y PF2 son inhibidas sólo por carbohidratos complejos, sin embargo, diversos experimentos de reconocimiento celular e inducción de actividad mitogénica indican que existen claras diferencias entre la actividad de estas dos lectinas, sugiriendo por tanto que su especificidad es diferente. Cuando el extremo amino y algunas secuencias internas de PF2 fueron comparadas con secuencias de bancos de datos, el análisis mostró una gran homología con las lectinas de la familia de *Phaseolus vulgaris* (Vázquez-Moreno y col., 2000).

En base a lo anterior, se considera que la lectina PF2 reconoce carbohidratos complejos cuya estructura debe ser diferente a la reconocida por PHA. Esta investigación planteó la caracterización de estos oligosacáridos y su identificación en tejidos linfoides humanos empleando técnicas modernas y de alta precisión.

OBJETIVOS

General

- Determinar las estructuras oligosacáridas reconocidas por la lectina PF2 de *Oleaya tesota* en fetuina (glicoproteína modelo) y en tejidos linfoides mediante HPLC-MS.

Particulares

- Purificar la lectina de Palo Fierro PF2, por cromatografía de afinidad, en cantidades suficientes para los ensayos (0.5-1g).
- Comparar el reconocimiento histoquímico de las lectinas PHA-E y PF2 en tejidos linfoides.
- Aislar y purificar a las glicoproteínas reconocidas por la lectina PF2 en los tejidos linfoides.
- Identificar las estructuras oligosacáridas, reconocidas por la lectina PF2, derivadas de fetuina y tejidos linfoides, mediante HPLC-MS.

ESQUEMA GENERAL DE TRABAJO

Este estudio se dividió en tres etapas como se muestra a continuación.

1. Diferenciación histoquímica de células T y B de tejidos linfoides usando las lectinas PF2, PHA-E y anticuerpos específicos.
2. Aislamiento, purificación y caracterización de las glicoproteínas de tejidos linfoides reconocidas por la lectina PF2.
3. Purificación, identificación y caracterización de los oligosacáridos reconocidos por PF2, en fetuina (control) y en glicoproteínas de tejidos linfoides (bazo y timo).

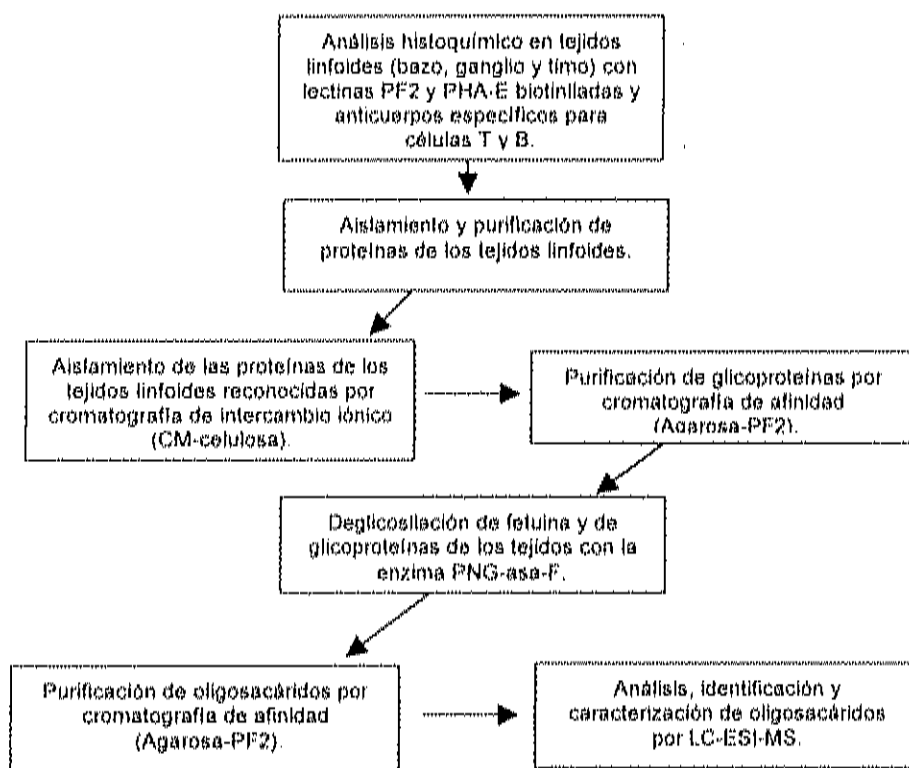


Figura 3. Esquema de trabajo para la identificación y caracterización del oligosacárido reconocido por la lectina PF2.

METODOLOGIA

Este estudio se inició con la evaluación del reconocimiento histológico de lectina PF2 por tejidos linfoides; sabemos que esta lectina reconoce estructuras de oligosacáridos complejos que son abundantes en las membranas celulares. Para el análisis histoquímico se incubó a la lectina PF2 con tres tejidos linfáticos (bazo, ganglio y timo) y se comparó con la tinción presentada por la lectina PHA-E (que reconoce oligosacáridos en linfocitos tipo T). En el marcaje o diferenciación de los patrones de tinción se empleó una escala arbitraria con los siguientes atributos: negativo (-), leve (+), moderada (++) e intensa (+++).

Se localizaron las zonas marcadas por las lectinas mediante una ampliación 10 X. Las zonas con mayor densidad de linfocitos T y B fueron identificadas mediante sueros monoclonales específicos para linfocitos T (anti-CD5) y linfocitos B (anti-CD20), respectivamente. El marcaje con estos dos antisueros (controles positivos) permitió identificar las zonas titulares que son afines a las lectinas (**Artículo 1. pp 45-66**).

Para la segunda etapa experimental se realizó el aislamiento y purificación de las glicoproteínas reconocidas por la lectina PF2 en los tres tejidos; esto mediante cromatografía de intercambio iónico seguido por cromatografía de afinidad utilizando a la lectina PF2 inmovilizada en agarosa, (**Artículo 2. pp 67-84**). Posteriormente se procedió a caracterizar parcialmente a las glicoproteínas.

El aislamiento de proteínas derivadas de los distintos tejidos se efectuó por cromatografía de intercambio iónico de acuerdo a lo descrito por Martínez-

Pomares y col. (1999) y Ketcham y col. (1985). Los tejidos fueron homogenizados a 4 °C en un buffer de extracción 10 mM, pH 7.5, conteniendo Tween 20, NaCl, NaN₃ y EDTA, además de inhibidores de proteasas.

El precipitado obtenido después de ultracentrifugar se lavó y se dializó durante 48 h a pH 7.2. Posteriormente, el extracto de proteínas se mezcló de CM-celulosa previamente acondicionada, los lavados subsiguientes promovieron la remoción de la hemoglobina contaminante. La matriz cromatográfica se empacó en una columna de vidrio y las proteínas que interactuaron fueron eluidas mediante el cambio de fuerza iónica con NaCl al 0.5 M, pH 7.2.

Las proteínas obtenidas de la cromatografía de intercambio iónico se aplicaron a la columna de afinidad agarosa-PF2 utilizando PBS pH 7.2 como fase móvil, la elución fue realizada con ácido fórmico al 1%.

Las glicoproteínas del bazo y timo fueron separadas en geles de poliacrilamida al 12%, en condiciones desnaturizantes y reductoras (SDS-PAGE). Después de teñir con nitrato de plata, las bandas visibles fueron cortadas del gel y enviadas a secuenciar al centro Protéomique del l'Est du Québec, Canada para su posterior identificación empleando los bancos de datos que contienen secuencias de proteínas de origen humano <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> (**Artículo 2. pp 67-84**).

La tercera etapa de este estudio incluyó la definición de las estructuras de los oligosacáridos reconocidos por la lectina PF2. Las glicoproteínas descritas en la sección anterior y la fetuina (control positivo) fueron sometidas a

un proceso de deglicosilación con PNG-asa-F, para la recuperación de sus N-glicanos.

Estos oligosacáridos se aplicaron a la columna agarosa-PF2 y aquellos reconocidos fueron eluidos con ácido fórmico al 1%. Los carbohidratos fueron sometidos a un proceso de reducción para la formación de alditoles con NaBH_4 , separados, identificados y caracterizados por cromatografía de líquidos acoplada a masas en un equipo Agilent serie 1100, en modo de ion negativo y de acuerdo a la metodología propuesta por Karlsson y Packer (2002) e Itoh y col. (2002) (**Artículo 3. pp 85-98**).

RESULTADOS Y DISCUSION

Los estudios histológicos de ganglios linfáticos realizados con la lectina de Palo fierro 2, mostraron que esta lectina reconoce células localizadas en el centro germinal, esta es una zona con alta densidad en células B. El antisuero anti-células B (anti-CD20) marco intensamente la misma zona, exactamente con la misma distribución. CD20 es un antígeno específico de linfocitos B (Elliot y col., 2004), se expresa en la última etapa de maduración de células, esta molécula no se expresa en otro tipo de células normales (Mitoyoshi y col., 1990). Estas dos observaciones permitieron suponer que la lectina PF2 tiene afinidad por los linfocitos B de los ganglios linfáticos.

En contraste, el manto del ganglio linfático no fue teñido con anti-CD20 ni con PF2. El patrón de tinción mostrado por la lectina PHA-E en los cortes de ganglio linfático demostró su afinidad por el manto y el espacio subcapsular de forma similar pero menos intensa que el anti-CD5. Esto concuerda con la expresión de CD5 en ganglios linfáticos de humanos, ya que este complejo se presenta en membrana de las células T inmaduras durante el desarrollo celular y está presente en la última etapa de maduración de las células T. El complejo CD5 se expresa solamente en linfocitos T y no se expresa en otro tipo de células con la posible excepción de las células Purkinje en cerebelo (Garson y col., 1982). Estas observaciones confirman que la lectina PF2 presenta una interacción diferente con respecto a la lectina PHA-E (**Artículo 1. pp 45-66**).

Por otro lado, la lectina PF2 también mostró afinidad por el patrón reticular de los ganglios linfáticos, lo cual significa que los componentes del

patrón reticular (glicosaminoglicanos y algunas glicoproteínas principalmente están siendo reconocidas por la lectina.

En los ensayos histoquímicos en timo, la lectina PF2 tiñe de forma intensa el patrón reticular y los cuerpos de Hassall, pero muy escasas células distribuidas heterogéneamente en el tejido. En contraste la lectina PHA-E mostró afinidad intensa por las células del timo, de la misma forma que el anti-CD5. Cabe mencionar que la lectina PHA-E presentó una interacción débil con el patrón reticular y nulo con los cuerpos de Hassall's. El centro germinal del timo no fue teñido con PF2, en cambio la lectina PHA-E interaccionó fuertemente con estas áreas foliculares de la misma forma que anti-CD5.

La expresión de oligosacáridos complejos presentes en los linfocitos T y B fue investigada mediante el reconocimiento de lectinas biotiniladas (PF2 y PHA-E) en los tejidos linfoides de niños de aproximadamente tres meses de edad, por el método estándar de la estrepta-avidina-peroxidasa y el análisis por microscopia de luz. El reconocimiento de zonas celulares en las secciones de tejido de bazo, timo y ganglio con las lectinas mostró que cada lectina presentó interacción en diferentes zonas en los tejidos linfoides contrateñidos con hematoxilina, revelando información sobre los patrones de tinción de PHA-E y PF2.

El reconocimiento de células en los tres tejidos fue comparado mediante la tinción con hematoxilina, mostrando una diferencia directa en los patrones de tinción y de localización entre las lectinas PHA-E y PF2, indicando que, en las diferentes regiones del bazo y ganglio, PHA-E reconoció de manera selectiva y

restringida linfocitos T, localizados en la zona marginal y alrededor de las áreas foliculares de los centros germinales, mientras que PF2 interaccionó con células que corresponden directamente a centros y folículos linfoides en estos tejidos. Las interacciones de las lectinas con estos dos tejidos fueron claramente distintivas. Mientras que en el timo la lectina con mayor interacción fue PHA-E, la PF2 reaccionó de manera mas intensa con el células reticulares y con los cuerpos de Hassall's.

Las lectinas han sido utilizadas como herramienta en el estudio de la distribución celular de los glicoconjugados y el cambio que estos puedan presentar durante la diferenciación y maduración celular (Pastor y col., 2003).

La lectina PF2 y el anticuerpo anti-CD20 interaccionaron con las células B presentes en los tejidos linfoides. En bazo y ganglio la interacción se localizó en los centros germinales y folículos linfoides en donde los linfocitos B maduros están localizados listos para entrar a circulación (Youinoy y col., 2006). Mientras que en timo, la interacción de ambas macromoléculas se presentó en células B distribuidas de manera dispersa.

En contraste, la lectina PHA-E y el anticuerpo anti-CD5 interaccionaron con las células T presentes en los tres tejidos. En bazo y en ganglio las células estaban localizadas en la zona marginal y alrededor de las áreas foliculares. Mientras que en timo se observó una distribución más dispersa de las células T. La lectina PHA-E *in vivo* ha sido utilizada como inductor mitogénico de linfocitos T maduros, esta lectina ha sido ampliamente usada en histoquímica para la

diferenciación de linfocitos T de B al igual que el anticuerpo anti-CD5 (Wilkinson y col., 1995), (**Artículo 1 pp. 45-66**).

Después de haber evaluado la afinidad de la lectina PF2 en los tejidos linfoides y haber mostrado que ésta presenta un reconocimiento diferente al de la lectina PHA-E se procedió al aislamiento y purificación de las glicoproteínas (**Artículo 2 pp. 67-84**).

Para el aislamiento de proteínas de los tres tejidos se utilizó una columna de intercambio iónico, el extracto proteico de cada uno de los tejidos fue aplicado individualmente a la matriz de carboximetil celulosa (CM-celulosa) en donde las proteínas que interactuaron con esta resina fueron eluidas con una solución amortiguadora de fosfatos (PBS) pH 7.2 con 0.5 M de NaCl. Las eluciones fueron concentradas hasta 1 mg/ml de proteína total.

Para la purificación de glicoproteínas de estos tejidos se utilizó una columna de afinidad, en donde la lectina PF2 estaba inmovilizada en agarosa. La fracción proteica previamente obtenida por CM-celulosa fue aplicada a la cromatografía de afinidad (1.1 mg en 10 ml de PBS pH 7.2). Se obtuvieron dos fracciones, la fracción de lavado en PBS, conteniendo 0.73 mg de proteína y la fracción de elución en Glicina-HCl pH 3.0, con 0.19 mg de glicoproteínas.

Posteriormente estas fracciones que interactuaron con PF2 fueron analizadas mediante electroforesis en condiciones desnaturizantes y reductoras (SDS-PAGE) con el fin de evaluar su pureza y masa molecular. El perfil electroforético de las fracciones proteicas del bazo y ganglio mostró la presencia de una proteína abundante con masa molecular de 14 kDa, mientras

que las fracciones proteicas del timo mostraron la presencia, de 6 bandas proteicas de 14, 20, 30, 34, 60 y 66 kDa, respectivamente.

Está bien documentado que la lectina PF2 es una lectina que reconoce oligosacáridos complejos, por lo que se asume que las proteínas observadas por SDS-PAGE son glicoproteínas (Vázquez-Moreno y col., 2000) Estas glicoproteínas no pudieron teñirse con azul Coomassie, cabe mencionar que algunas glicoproteínas como la MUC 1 no se tiñen con azul Coomassie debido a la gran cantidad de carbohidratos; estas glicoproteínas típicamente han sido teñidas con plata o con el reactivo de PAS (Mather, 2000).

En este estudio las proteínas de 14 kDa del bazo y ganglio, al igual que la MUC1 únicamente pudieron ser teñidas con nitrato de plata. La glicoproteína del bazo, presentó en SDS-PAGE y en PAGE nativo una masa molecular de 14 kDa, confirmando así que es un monómero, debido a su masa, esta glicoproteína fue llamada GP14.

La digestión triptica (realizada en the Center Protéomique del l'Est du Québec, Canada), generó seis péptidos de 12 a 17 aminoácidos, que fueron secuenciados y comparados con secuencias de proteínas de la base de datos <http://ncbi.nlm.nih.gov/blast/ALIGNMENTS>. Los resultados mostraron gran homología entre la GP14 y las proteínas de choque térmico por sus siglas en ingles HSP. Particularmente, con la familia de las HSP de 70 kDa se presentó 100% de homología, específicamente con la HSP de 71 kDa, HSP de 54 kDa y HSP de 70 kDa (Isoforma β variante 2) (gi/32467, gi/11526573, gi/62896815). Además, la GP14 presentó dos péptidos LDKSQIHDIVLVGGSTR y

STAGDTHLGGEDFDNR con alta homología (90%) hacia los dos únicos péptidos reportados de la glicoproteína GP62 (PT73 AQIHDLVLVGGSTR y PT36 ATAGDTHLGGEDFDN); GP62 es la mayor glicoproteína de estrés en células de rata, y presenta homología parcial con las HSP70 de mamíferos (Jethmalani y Henle, 1997). Por su masa molecular, la GP14 podría incluirse entre los miembros de la familia de las proteínas de choque térmico con masas moleculares de 12 a 42 kDa (Kim y col., 2004; Jiao y col., 2005; Marins-Ferreira y col., 2006).

Los seis péptidos obtenidos de la GP14 pertenecen a los sitios altamente conservados de la familia de las HSP70, por ello es de gran importancia que en posteriores estudios esta glicoproteína sea secuenciada completamente para terminar su caracterización (**Artículo 2 pp. 66-84**).

Para la etapa final de este estudio se realizó la liberación de N-oligosacáridos de fetuina y de las glicoproteínas purificadas de los distintos tejidos linfoides, mediante la utilización de la enzima PNGasa-F; los productos liberados fueron reducidos a alditoles utilizando NaBH₄. La deglicosilación de las glicoproteínas fue confirmada por SDS-PAGE (datos no mostrados). La purificación de oligosacáridos fue realizada mediante cromatografía de afinidad PF2-agarosa, y finalmente fueron caracterizados estructuralmente por cromatografía de alta resolución acoplada a espectrometría de masas (LC/MS) (**Artículo 3 pp. 85-98**).

La glicoproteína modelo utilizada en estudio fue la fetuina debido a que está bien documentado la presencia de tres sitios de N-glicosilación

conteniendo oligosacáridos bi, tri y tetrasialilados y bi y triantenarios (Itoh y col., 2002; Karlsson y Packer, 2002).

El mapeo de los oligosacáridos alditoles fue realizado mediante LC/MS con columna de carbón grafitizado. El equipo de masas fue utilizado en el modo de ion negativo utilizando como eluyente un gradiente de 18-38 % de acetato de amonio 0.05 mM pH 9.0 conteniendo 2% de acetonitrilo durante 40 min (**Artículo 3 pp 85-98**). En la figura 1, se muestra el espectro de masas de iones del N-oligosacárido (Kawasaki y col., 2000).

En la figura 1A, B y C (**Artículo 3 pp. 98**) se muestran los espectros de masas de los iones más abundantes del oligosacárido de fetuina y de las glicoproteínas del bazo y timo.

El espectro de masas de los picos más abundantes a, y b se muestran en la Figura 1. En fetuina, bazo y timo los iones más abundantes estaban cargados como -4H y -3H. Particularmente en fetuina y bazo, el ion de m/z más abundante fue 792.1 (-4H). También fue observada la presencia de un ion poco abundante de 1056.3 m/z con carga -3H. Estos dos iones corresponden a la m/z teórica del carbohidrato complejo triantenario tetrasialilado de una masa de 3171.84 reportado Karlsson y Packer, (2002).

En el timo el ion mas abundante fue el de 1056.5 m/z (Figura 1C) con carga -3H, el ion menos abundante fue el de 792.1 (-4H), estos iones pertenecen también al oligosacárido complejo de 3171.84.

El espectro de masas conteniendo los picos más abundantes a y b de fetuina y las glicoproteínas de los tejidos linfoides, correspondieron al

oligosacárido complejo de m/z de 3171.1 que se encuentra cargado con -4H, y -3H respectivamente. En base a estos dos iones y fragmentos obtenidos la estructura puede ser asignada al oligosacárido complejo del tipo triantenario tetrasialilado (Green y col.1988; Karlsson y Packer, 2002).

Es importante mencionar que la cromatografía de afinidad con lectinas ha sido utilizada en la glicoproteómica, ya que algunas lectinas tienen la habilidad de reconocer oligosacáridos complejos en glicoproteínas celulares por ejemplo, la lectina PHA-E reconoce oligosacáridos bi y triantenarios complejos (Cummins, 1994; Merkle y Cummins, 1987). En contraste con la lectina PF2, que reconoció un oligosacárido del tipo complejo triantenario tetrasialilado, como lo demuestra el resultado analizado por espectrometría de masas (Figura 4).

En conclusión, en este trabajo se demostró que la lectina PF2 reconoce estructuras de oligosacáridos asociados a proteínas y presentes en células linfoides del tipo B. Además PF2 reconoce a una glicoproteína de 14 kDa (GP14) del bazo, la cual presentó una gran homología con las proteínas de choque térmico HSP70. Por otro lado el oligosacárido reconocido por la lectina PF2 es del tipo triantenario tetrasialilado, mostrando así que las lectinas PF2 y PHA-E presentan especificidad, hacia estructuras de oligosacáridos complejos diferentes de fetuina.

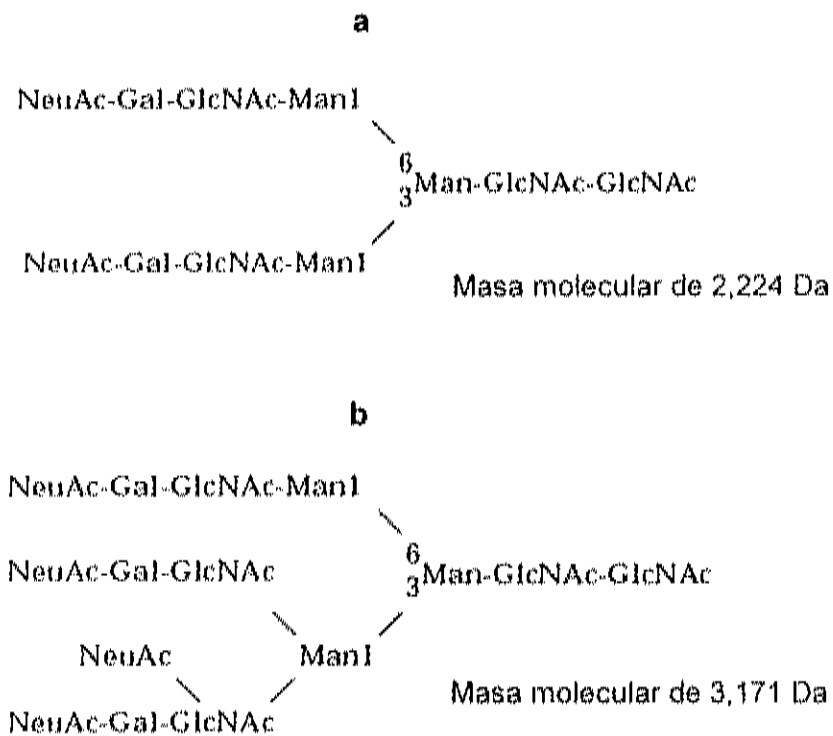


Figura 4. Estructuras de los oligosacáridos complejos de la fetuina reconocidos por las lectinas (a) PHA-E (Cummings, 1994) y PF2 (b).

BIBLIOGRAFÍA

- Alvarez-Fernández E, Carretero-Albiñana.** 1999. Lectin histochemistry of normal bronchopulmonary tissues and common forms of bronchogenic carcinoma. *Arch. Pathol.* 114: 475-481.
- Andrews L, Laughinghouse A, and Sina BJ.** 1997. Lectin binding characteristics of male and female salivary gland proteins of *Anopheles gambiae*: Identification and characterization of female specific glycoproteins. *Insect. Biochem. Molec. Biol.* 27 (2): 159-166.
- Barondes SH.** 1981. Lectins: Their multiple endogenous cellular fractions. *Anal. Review Biochem.* 50: 207-31
- Barondes SH.** 1984. Soluble lectins: A new class of extracellular proteins. *Science.* 223: 1259-1264.
- Battelli MG, Barbieri L, Bolognesi A, Bounamici L, Valbonesi P, Polito L, Van Damme EJM, Poumans WJ, and Stirpe F.** 1997. Ribosome-inactivating lectins with polynucleotide: adenosine glycosidase activity. *FEBS Lett.* 408: 355-359.
- Blanchard F, Duplomb L, Raheer S, Vusio P, Hoflack B, Jacques Y, and Godard A.** 1999. Mannose 6-phosphate/insuline-like growth factor II receptor mediates internalization and degradation of leukemia inhibitory factor but not signal transduction. *J. Biol. Chem.* 274 (35): 24685-24693.
- Boland CR, Chen YF, Rinderle SL, Resau JH, Luk GD, Lynda HT, and Goldstein I J.** 1991. Use of the lectin from *Amaranthus caudatus* as a histochemical probe of proliferating colonic epithelial cells. *Cancer Res.* 51: 657-665.
- Bonay MP, and Fresno M.** 2000. Lectins from tropical sponges. Purification and characterization from genus *Aplysina*. *J. Biol. Chem.* 275 (38): 29283-29289.
- Cullina MJ, Greally JF.** 1993. A novel lectin-based enzyme-linked immunoabsorbent munoabsorbent assay measurement of IgA1 in serum and secretory IgA1 in secretions. *Clin Chim. Acta.* 216: 23-38.
- Cummings RD, and Kornfeld, S.** 1982. Fractionation of asparagine-linked oligosaccharides by serial lectin-agarose affinity chromatography. *J Biol. Chem.* 257: 11235-11240.
- Cummings RD.** 1994. Use of Lectins in Analysis of Glycoconjugates. *Meth. Enzymol.* 230: 66-86.

- Dam TK, Roy R, Das SK, Oscarson S, and Brewer F.** 2000. Binding of multivalent carbohydrate to *Concanavalina A* and *Dioclea grandifolia* lectin. *J. Biol. Chem.* 275 (19): 14223-14230.
- Dell A, Reason JA, Kay-Hoo K, Panico M, McDowell AR, Morris RH.** 1994. Mass Spectrometry of carbohydrate-Containing Biopolymers in guide to techniques in Glycobiology. Academic Press, Inc. San Diego, California. 108.
- DiVirgilio SNA.** 1998. High performance lectin affinity chromatography for fractionation and sequence determination of oligosaccharides. *Lectins, Biology, Biochem. Clin. Biochem.* 12.
- Elliott B, Cook MG, John JR, Powell BWEM, Pandha H, Dalgleisha AG.** 2004 Successful live cell harvest from bisected sentinel lymph nodes research report. *J Immunol. Methods.* 291: 71-78.
- Fang B, Hanover JA, and Miller MW.** 1998. An evaluation of isolation of nucleoporin p62. *Arch. Biochem. Biophys.* 357(1): 95-100.
- Felipe-Ortega X.** 1996. Aislamiento y caracterización de las lectinas de leguminosas silvestres del Desierto de Sonora; *Cercidium praecox* (palo de brea) y *caesalpinia* (palo dorado). Tesis de Licenciatura. Universidad de Sonora.
- Figueroa MOR, and Lajolo FM.** 1997. Effect of Chemical Modifications of *Phaseolus vulgaris* Lectins on Their Biological Properties. *J. Agric. Food Chem.* 45 (3): 639 – 643.
- Fukuda MN.** 1993. Congenital dyserythropoietic anemia type II (HEMPAS) and its molecular basis. In Bailliere's Clin Hema J.A. Tanner and DJ, Anstee, editors Bailliere Tindall, London. 493-511.
- Garson JA, Beverly PCL, Coakham HB, Harker EL.** 1982. Monoclonal antibodies against human T lymphocytes label Purkinje neurons of many species. *Nature.* 298: 375-377.
- Giuffrida A, Focarelli R, Lampariello R, and Rosati F.** 1997. Glycan chains play a role in the axonemal cytoskeleton disassembly activity of the 35 kDa glycoprotein of the spermathecal extract of *Eyprepocnemis plorans* (insecta, Orthoptera). *Insect. Biochem. Molec. Biol.* 27(4): 315-321.
- Goldstein IJ, Hughes RC, Monsigny M, Osawa T, and Sharon N.** 1980. What should be called a lectin?. *Nature.* Vol. 285: 66.
- Goldstein IJ.** 2002. Lectin structure. Activity: The history is never over. *Journal Agric Food Chem.* Vol. 50: 6583-6585.
- González de Mejía E, Hankins CN, Paredes-López O, and Shannon LM.** 1989. The lectins and lectin-like proteins of tepary beans (*Phaseolus acutifolius*) and tepary common bean (*Phaseolus vulgaris*) hybrids. *J. Food Chemistry.* 14: 117-126.

Gou-Fu H. 1997. Analysis of Protein-Carbohydrate Interactions by FACE/Gel retardation Assay in A Laboratory Guide to Glicoconjugate Analysis. Birkhauser Verlag. Germany. 349-350.

Graversen JH, Jacobsen C, Sigurskjold BW, Lorentsen RH, Moestrup SK, Thogersen HC, and Etzerodt M. 2000. Mutational analysis of affinity and selectivity of Kringle-Tetranectin interaction. *J. Biol. Chem.* 275 (48): 37390-37396.

Green ED, Adelt G, Baenziger JU, Wilson S, and Van Halbeek H. 1988 The asparagine-linked oligosaccharides on bovine fetuin. Structural analysis of N-glycanase-released oligosaccharides by 500-megaHertz ¹H NMR spectroscopy. *J. Biol. Chem.* 263: 18253–18268.

Guillen E, Abeijon C, and Hirschberg CB. 1999. The genes for the Golgi apparatus N-Acetylglucosaminyltransferase and the UDP-N-acetylglucosamine transporter are contiguous in *Kluyveromyces lactis*. *J. Biol. Chem.* 274 (10): 6641-6646.

Guillot J, Giollant M, Damez M, and Dusser M. 1991. Isolation and characterization of a lectin from the mushroom, *Lactarius deliciosus*. *J. Biochemie.* 109 (6): 840-845.

Guzmán-Partida A, Robles- Burgeño MR, Ortega Nieblas MM, Vázquez-Moreno L. 2004. Purification of complex carbohydrate specific isolectins from wild legume seeds: *Acacia constricta* (Vinorama) highly homologous to *Phaseolus vulgaris* lectin. *Biochemie.* 86: 335-342.

Hamelryck TW, Dao-Thi MH, Poortmans F, Chrispeels MJ, Wyns L, and Poortmans F. 1996. The crystallographic structure of phytohaemagglutinin-L. *J. Biol. Chem.* 271 (34): 20479-20485.

ICE ņō ĄŁd and Kocourek. 1978. Studies on lectins: XXXVI. Properties of some lectins prepared by affinity chromatography on O-glycosyl polyacrylamide gels. *Acta. Biochim. Biophys.* . 532: 92-97 and 538: 299-315.

Imberty A, Gautier C, Lescar J, Pérez S, Wyns L, and Loris R. 2000. An unusual carbohydrate binding site revealed by the structures of two *Maackia amurensis* lectins complexed with sialic acid-containing oligosaccharides. *J. Biol. Chem.* 275 (23): 17541-17548.

Itoh S, Kawasaki N, Ohta M, Hayakawa T. 2002. Structural analysis of a glycoprotein by liquid chromatography–mass spectrometry and liquid chromatography with tandem mass spectrometry Application to recombinant human thrombomodulin. *J. Chromatogr. A.* 978: 141–152.

Itoh S, Kawasaki N, Ohta M, Hyuga M, Hyuga S, Hayakawa T. 2002. Simultaneous microanalysis of N-linked oligosaccharides in a glycoprotein using microbore graphitized carbon column liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.* 968: 89–100.

- Itoh SN, Kawasaki N, Hashii A, Harazono Y, Matsuishi T, Hayakawa T, Kawanishi T.** 2006. N-linked oligosaccharide analysis of rat brain Thy-1 by liquid chromatography with graphitized carbon column/ion trap-Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry in positive and negative ion modes. *J. Chromatogr. A.* 1103: 296–306
- Jaffe W.** 1980. Hemagglutinins (lectins). In: *Toxic Constituents in Plant Foodstuff*. Chap. 3, Liener I.E., ed. Acad. Press. New York, NY, pp. 73-102.
- Jethmalani MS, and Henle JK.** 1997. Intracellular Distribution of Stress Glycoproteins in a Heat-Resistant cell Model Expressing Human HSP70, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 237: 382-387.
- Jiao W, Li P, Zhang J, Zhang H, Chang Z.** 2005. Small heat-shock proteins function in the insoluble protein complex. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 335: 227–231.
- Jordan T, and Goldstein IJ.** 1995. Site-directed mutagenesis studies on the lima bean lectin. Altered carbohydrate-binding specificities result from single amino acid substitutions. *Eur. J. Biochem.* 230: 948-964.
- Kaku H, and Goldstein IJ.** 1991. Interactions of five D-mannose-specific lectins with a series of synthetic branched trisaccharides. *Carbohydr. Res.* 213: 109-116.
- Karas M, and Bahr U.** 1993. Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry of Bioorganic Molecules in *Spectroscopic Methods and Analysis*. Humana Press, New Jersey, E.U.A. 215-227.
- Karlsson NG, and Packer NH.** 2002. Analysis of O-Linked Reducing Oligosaccharides Released by an In-line Flow System. *Anal. Biochem.* 305: 173–185.
- Kasai KI, and Hirabayashi J.** 1996. Galectins: A family of animal lectins that decipher glycocodes. *J. Biochem.* 119 (1): 1-8.
- Kawasaki N, Ohta M, Hyuga S, Hyuga M, and Hayakawa T.** 2000. Application of Liquid Chromatography/Mass Spectrometry and Liquid Chromatography with Tandem Mass Spectrometry to the Analysis of the Site-Specific Carbohydrate Heterogeneity in Erythropoietin. *Anal. Biochem.* 285: 82–91.
- Ketcham CM, Baumbach GA, Bazer FW, and Roberts RM.** 1985. The type 5, Acid Phosphatase from Spleen of Humans with Hairy Cell Leukemia. *J. Biol. Chem.* 260: 5768-5776.
- Kim MV, Seit-Nebi AS, Marston SB, and Gusev NB.** 2004. Some properties of human small heat shock protein Hsp22 (H11 or HspB8), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 315: 796–801.
- Kiss R, Camby I, Duckworth C, Decker R, Salmon I, Pasteels JL, Danguy A, and Yeaton P.** (1997). *In vitro* influence of *Phaseolus vulgaris*, *Griffonia*

simplicifolia, Concanavalin A, wheat germ and peanut agglutinins on HCT-15, LoVo and SW 837 human colorectal cancer cell growth. *Gut* 40 (2): 253-261.

Kobata A. 1992. Structures and functions of the sugar chains of glycoproteins. *Eur. J. Biochem.* 209: 483-501.

Kottgen AE, Hell KB, Muller C, Tauber R. 1993. Glycoprotein-Lectin_Immunoabsorbent Assay (GLIA) en lectins and Glycobiology, Springer Verlag Press, Germany. 141.

Kumar V, Cotran RS, Robbins SL. 1999. Patología humana McGraw Hill Interamericana. Sexta edición. 372-428.

Lee IC, and Lee RT. 1991. Neoglycoconjugates: Fundamentals and recent progresses. In: *Cancer and Lectins*. Gabius y Gabius (Eds). 53-69.

Lenter M, Levinovitz A, Isenmann S, and Vestweber D. 1994. Monospecific and common glycoprotein ligands for E- and P-selectin on myeloid cells. *J. Cell. Biol.* 125 (2): 471-481.

Leurouge P, and Faye L. 1996. Recent development in structural analysis of N-glycans from plant glycoproteins. *Plant. Physiol. Biochem.* 34: 263-271.

Liener I, Sharon N, Goldstein U. 1986. The lectins: properties, Function and Application in Biology and Medicine Academic Press London. 35-93.

Lis H, Sharon N. 1986. Applications of lectins. En: *The lectins*. 193-357.

Lis, H, Sharon, N. 1986. Biological properties of lectins. En: *The lectins*. 266-285.

López-Laredo AR. 2005. Caracterización de los oligosacáridos de las lectinas de *Olneya tesota* PF2 y sus isoforma mas abundante (IF2) y establecer la relación con la función de reconocimiento. Tesis de Maestría. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo. A.C.

Loris R, hamelryck J, Bouckaert J, Wyns L. 1998. Legume lectins structure. *Acta Biochem. Biophys.* 1383: 9-36.

Marins-Ferreira R, Rodrigues de Andrade L, Barros-Dutra MM, Farina de Souza, VM, Flosi-PascVM, Flosi-Paschoalin, J. 2006. Purification and characterization of the chaperone-like Hsp26 from *Saccharomyces cerevisiae*. *Protein. Expression. Purif.* 47: 384–392.

Martínez-Pomares L, Crocker PR, Da Silva R, Holmes N, Colominas C, Rudd P Dwek, R, and Gordon S. 1999. Cell-specific Glycoforms of sialoadhesin and CD45 are Counter-receptors for the Cysteine-rich Domain the Mannose Receptor, *J. Biol. Chem.* 274: 35211-35218.

Mather IH. 2000. A Review and Proposed Nomenclature for Major Proteins of the Milk-Fat Globule Membrane. *J. Dairy. Sci.* 83: 203-247.

Merkle RK, and Cummings RD. 1987. Lectin affinity chromatography of glycopeptides *Meth.. Enzymol.* 138: 232-259.

- Mo H, Goldstein J.** 1994. Isolation and characterization of a Forssman antigen-binding lectin from velvet bean (*Mucuna derringtoniana*) seeds. *Glycoconj. J.* 11: 424-431.
- Mody RM, Joshi S, and Chaney W.** 1995. Use of lectins as diagnostic and therapeutic tools for cancer. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods.* 33(1): 1-10
- Motoyoshi F, Naomi K, Tadeo O.** 1990. Appearance of bisected N-Acetylglucosamine Residues of biantennary Sugar Chain and Decrease of High Molecular Weight Oligosaccharides of Human Lymphocytic Cell Membranes during Differentiation. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 54: 495-499.
- Nangia-Makker P, Conklin J, Hogan V, Raz A.** 2002 Carbohydrate-binding proteins en cancer, and their ligans as therapeutic agents. *Trends. Mol. Med.* 8. 187-191.
- Ohtani K, Suzuki Y, Eda S, Kawai T, Kase T, Keshi H, Sakai Y, Yamamoto S, Sakamoto T and Wakamiya N.** 1999. High-level and effective production of human mannan-binding lectin (MBL) in Chinese hamster ovary (CHO) cells. *J. Immunol. Methods,* 222:135-144.
- Ortega Nieblas MM.** 1993. Estudio de algunas semillas de leguminosas del Desierto de Sonora. Factores antinutricionales y calidad de sus propiedades y aceites. Tesis de Maestría. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo. A.C.
- Pastor LM, Morales E, Polo LA, Calvo AI, Pallarés J, and De La Viesca S.** 2003. Histochemical study of glycoconjugates in active and photoperiodically-regressed testis of hamster (*Mesocricetus auratus*). *Acta Histochem.* 105 (2): 165--173.
- Power D.** 1997. Summary of clinical trial with liposome- adjuvant influenza A virus vaccine in elderly adults. *Immunology.* 179-188.
- Pusztai A, Ewen AWB, Grant G, Peumans WJ, Van Damme EJM, Coates ME, and Bardócz S.** 1995. Lectins and also bacteria modify the glycosylation of gut surface receptors in the rat. *Glycoconj. J.* 12: 22-35.
- Pusztai A, Ewen SWB, Grant G, Brown DS, Stewart JC, Peumans WJ, Van Damme EJM, and Bardócz S.** 1993. Antinutritive effects of wheat-germ agglutinin and other N-acetylglucosamine-specific lectins. *Br. J. Nutr.* 70: 313-321.
- Pusztai A.** 1991. *Plant Lectins.* Cambridge University Press. Cambridge.UK.
- Raju S.** 2003. Electrophoretic methods for the analysis of N-linked oligosaccharides. *Anal. Biochem.* 283:125-132.
- Roth, J.** 1978. *The lectins: Molecular probes in cell biology and membrane research.* VEB Gustav Verlag Jena. 9: 11.

- Mo H, Goldstein J.** 1994. Isolation and characterization of a Forssman antigen-binding lectin from velvet bean (*Mucuna derringtoniana*) seeds. *Glycoconj. J.* 11: 424-431.
- Mody RM, Joshi S, and Chaney W.** 1995. Use of lectins as diagnostic and therapeutic tools for cancer. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods.* 33(1): 1-10
- Motoyoshi F, Naomi K, Tadeo O.** 1990. Appearance of bisected N-Acetylglucosamine Residues of biantennary Sugar Chain and Decrease of High Molecular Weight Oligosaccharides of Human Lymphocytic Cell Membranes during Differentiation. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 54: 495-499.
- Nangia-Makker P, Conklin J, Hogan V, Raz A.** 2002 Carbohydrate-binding proteins in cancer, and their ligands as therapeutic agents. *Trends. Mol. Med.* 8. 187-191.
- Ohtani K, Suzuki Y, Eda S, Kawai T, Kase T, Keshi H, Sakai Y, Yamamoto S, Sakamoto T and Wakamiya N.** 1999. High-level and effective production of human mannan-binding lectin (MBL) in Chinese hamster ovary (CHO) cells. *J. Immunol. Methods,* 222:135-144.
- Ortega Nieblas MM.** 1993. Estudio de algunas semillas de leguminosas del Desierto de Sonora. Factores antinutricionales y calidad de sus propiedades y aceites. Tesis de Maestría. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo. A.C.
- Pastor LM, Morales E, Polo LA, Calvo AI, Pallarés J, and De La Viesca S.** 2003. Histochemical study of glycoconjugates in active and photoperiodically-regressed testis of hamster (*Mesocricetus auratus*). *Acta Histochem.* 105 (2): 165-173.
- Power D.** 1997. Summary of clinical trial with liposome- adjuvant influenza A virus vaccine in elderly adults. *Immunology.* 179-188.
- Pusztai A, Ewen AWB, Grant G, Peumans WJ, Van Damme EJM, Coates ME, and Bardócz S.** 1995. Lectins and also bacteria modify the glycosylation of gut surface receptors in the rat. *Glycoconj. J.* 12: 22-35.
- Pusztai A, Ewen SWB, Grant G, Brown DS, Stewart JC, Peumans WJ, Van Damme EJM, and Bardócz S.** 1993. Antinutritive effects of wheat-germ agglutinin and other N-acetylglucosamine-specific lectins. *Br. J. Nutr.* 70: 313-321.
- Pusztai A.** 1991. *Plant Lectins.* Cambridge University Press. Cambridge, UK.
- Raju S.** 2003. Electrophoretic methods for the analysis of N-linked oligosaccharides. *Anal. Biochem.* 283:125-132.
- Roth, J.** 1978. *The lectins: Molecular probes in cell biology and membrane research.* VEB Gustav Verlag Jena. 9: 11.

- Sagi D, Peter-Katalinic J, Conradt HS, Nimtz M.** 2002. Sequencing of tri- and tetraantennary N-glycans containing sialic acid by negative mode ESI QTOF tandem MS. *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.* 13: 1138–1148.
- Sanford GL and Harris-Hooker SA.** 1990. Stimulation of Vascular Cell Proliferation by β -Galactoside Specific Lectins. *FASEB J.* 4: 2912-2918
- Scocco P, Ceccarelli P, and Menghi G.** 1996. Glycohistochemistry of the *Tilapia* spp. stomach. *J. Fish Biol.* 49: 584–593.
- Sharon N, Lis H.** 1972. Lectins: Cell-agglutinating and sugar-specific proteins. *Science.* 177: 949-959.
- Sharon N, Lis H.** 1989. Lectins. Chapman and Hall, London.
- Sharon N, Lis H.** 1990. Legume lectins a large family of homologous proteins. *FASEB J.* 4: 3198-3208.
- Sharon N.** 1990. Molecular basis of lectin-carbohydrate interactions. In *Lectins and Cancer*. Gabius and Gabius (Eds.) 1-12
- Sharon N.** 1994. Lectin-carbohydrate interactions at the atomic level. Lectin blocking, publicado por Gustav Fischer, Stuttgart. 1-13.
- Shigeta S, Winter HC, and Goldstein IJ.** 1994. α -(2-3) and α -(2-6)-sialyltransferasa activities present in three variants of Ehrlich tumor cells: identification of the products derived from N-acetylactosamine and β -D-Gal-(1-3)- α -D-GalNAc-(1-O)-Bn. *Carbohydr. Res.* 264, 111-121.
- Strosberg AD, Buffard D, Lauwereys M, and Foriers A.** 1986. Legume lectins: A large family of homologous proteins. En: *The lectins.* 251-263.
- Sumar N, Bodman J, Bourrillon R.** 1993. Glycoprotein-Lectin-Immunoabsorbent Assay (GLIA) in lectins *Glycobiology.* Springer Verlag press, Germany 158.
- Van Damme EJM, Barre A, Rougé P, and Peumans WJ.** 1997. Molecular cloning of the bark and seed lectins from the japanese pagoda tree (*Sophora japonica*). *Plant. Mol. Biol.* 33: 523-536.
- Van Damme EJM, Peumans WJ and Goldstein IJ.** 1993. Purification and characterization of a mannose-specific lectin from shallot (*Allium ascalonicum*) bulbs. *Arch. Biochem. Biophys.* 306: 431-438.
- Varki A, Cummings R, Esko J, Freeze H, Hart G, Martin J.** 1999. Essentials of glycobiology. Protein-Glycan Interactions. Cold Spring Harbor laboratory Press. 41-59.
- Vázquez-Moreno L, Ortega NM, Robles BM, and Ramos CG.** 2000. Purification of complex carbohydrate specific lectins from *Olivea tesota* seeds using tandem affinity chromatography. *Int. J. Biochromatogr.* 5(2): 83-90.
- Wawotzny R, André S, Dong X, Joshi SS, and Gabius HS.** 1995. Are matrix-immobilized neoglycoproteins, plants and human lectins and carbohydrate-

binding antibodies from human serum mediators of adhesion *in vitro* for carcinoma and lymphosarcoma cells?. *Anticancer Res.* 15: 169-174.

Weimar T, Bukowski RN, Martin Y. 2000. The conformation of the T-antigen Dissacharide Bound to *Maclura pomifera* Agglutinin in Aqueous Solution. *J. Biol. Chem.* 275: 37006-37010.

Weiss WI, Drickamer K. 1996. Structural basis of lectin-carbohydrate recognition. *Annu. Rev. Biochem.* 65: 441-473.

Wilkinson R, Barton M, Kotlarki I. 1995. Identification of koala T lymphocytes using an anti-human CD3 antibody. *Developmental and comparative Immunology.* 19 (6): 537-545.

Wold A, Motas C, Svanvong C, Mestecky J. 1994. Lectin receptor on IgA isotypes. *Scand. Immunol.* 39. 195-201.

Yamashita K, Kochibe N, Ohkura T, Ueda I, Kobata A. 1985. Fractionation of L-fucosa-containing oligosaccharides on immobilized *Aleuria aurantia* lectin. *J. Biol. Chem.* 260: 4688-4693.

Yan L, Wilkins PP, Alvarez-Manilla G, Do Su-II, Smith DF, and Cummings RD. Immobilized *Lotus tetragonolobus* agglutinin binds oligosaccharides containing the Lex determinant. *Glycoconj. J.* 14: 1573-4986

Youinou P, Hillion S, Jamin C, Pers JO, Saraux A, Renaudineau Y. 2006. B lymphocytes on the front line of autoimmunity. *Autoimmunity Reviews.* 5: 215-221.

Yu L, Ferning DC, Smith JA, Milton JD, and Rhodes JM. 1993. Reversible inhibition of proliferation of epithelial cell lines by *Agaricus bisporus* (edible mushroom) lectin. *Cancer Res.* 53: 4627-4632.

Yu XQ, and Kanost MR. 2000. Immunolectin-2, a lipopolysaccharide-specific lectin from an insect, *Manduca sexta*, is induced in response to Gram-negative bacteria. *J. Biol. Chem.* 275: 37373-37381.

Binding of *Olneya Tesota* (PF2) lectin to human lymph nodes and thymus tissues

Urbano-Hernández G^a. López-Cervantes G^b. Candia-Plata M.C^c. López-Valenzuela S.O^b. Vázquez-Moreno, L^{a*}.

^a *Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. C. Apartado Postal 1735. Hermosillo Sonora, México*

^b *Departamento de Patología, Hospital Infantil del Estado de Sonora. Hermosillo Sonora, México.*

^c *Laboratorio de Inmunohematología Universidad de Sonora. Hermosillo Sonora, México.*

Author whom correspondence should be sent. Luz Vázquez Moreno, PhD. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Carretera a la Victoria Km. 0.6, Hermosillo 83000, Sonora, México. Tel/Fax:+52 (662) 2 80 00 58 ext. , e-mail: lvazquez@cascabel.ciad.mx

Running title: *Olneya tesota* lectin

Abstract

Palo fierro 2 lectin (PF2) is obtained from Palo fierro (*Olneya tesota*) seeds, a legume from Sonoran Desert. PF2 presents high affinity towards complex carbohydrates from fetuin, similar to PHA-E (*Phaseolus vulgaris* erythroagglutinin). In this work both lectins were biotinilated, incubated with sections of fixed lymph nodes and thymus, and then revealed with streptavidin-peroxidase. Labeling of lymph node sections with PF2 lectin showed that, of different node regions, stained lymphocytes were abundantly and selectively located within the cortical germinal centers, whereas PHA-E-labeled lymphocytes were scarce and located in the mantle zone of germinal centers and paracortex around follicular areas. Staining activity of PF2 in thymus was found to be located in disperse few cells both in medulla and cortex while PHA-E interacted with cells in all tissue. Also, the PF2 lectin stained extracellular reticular fibers in nodes and the Hassall's bodies in thymus. In conclusion, these results demonstrated that PHA-E and PF2 lectins have differences in specificity toward lymphoid tissues despite of their similar legume origin and affinity toward fetuin. This also suggested that PHE-E and PF2 lectins have differences in carbohydrate specifics.

Keywords: *Olneya tesota*; PF2 lectin, PHA-E lectin, complex carbohydrates

Abbreviations: PF2, Palo fierro 2 lectin; PHA-E, Phytohemagglutinin- E; SP streptavidin-peroxidase.

Introduction

Lectins are defined as proteins or glycoproteins, that bind specifically and reversibly to carbohydrates, resulting in cell agglutination or precipitation of polysaccharides and glycoconjugates (Goldstein *et al.*, 1980; Sharon and Lis, 1989). Lectins presented high specificity towards carbohydrates and then are used as valuable reagents in glycobiological research, for example in detection and preliminary characterization of glycoconjugates from membrane cells (Loris *et al.*, 1998).

Seed of legumes have long been known to be a rich source of lectins, which constitutes about 10% of their soluble total protein (Van Damme *et al.*, 1997). Legume lectins are a large family of homologous proteins that possess a strong similarity at the level of their amino acid sequences and tertiary structures; however, their carbohydrate specificities and quaternary structures vary widely (Van Damme *et al.*, 1998). Among the best-characterized seed legume lectins are those isolated from red kidney bean agglutinin (PHA) (Lis and Sharon, 1973). The PHA-E, an isoform of PHA, presents affinity toward the bisected biantennary type of complex oligosaccharides from the membrane of T lymphocytes (Jones *et al.*, 2003). However, information about lectins from seeds of wild legumes is scarce.

In Mexico there are approximately 1,500 species of legumes localized in different regions. A third of those belong to the Sonoran Desert (Felger and Nabhan, 1978). Seeds from *Olneya tesota*, *Cercidium praecox*, *Caesalpinia*

caladenia, *Parkinsonia aculeata* and *Acacia constricta* wild legumes are among the main legume sources of lectins purified and characterized by Vázquez-Moreno *et al.* (2000), Felipe-Ortega, (1996) and Guzmán-Partida *et al.* (2004). Particularly, *Olneya tesota* legume (Palo fierro) has a tetrameric lectin called PF2 with subunits of 33 kDa. This lectin is specifically inhibited by complex carbohydrates of glycoproteins such as fetuin and mucine but not by simple sugars (Vázquez-Moreno *et al.*, 2000). Because PF2 lectin specificity had been not completely characterized towards tissues, the objective of this work was to establish PF2 lectin specificity towards human normal nodes and thymus tissues.

Materials and Methods

Tissue samples

Human thymus and lymph node tissues were retrieved by Dr. Guillermo López Cervantes from the pediatric post mortem pathology files of the Department of Pathology, Hospital Infantil del Estado de Sonora (HIES).

Tissues were obtained under ethical and legal request of Mexican official prescriptions in NOM-087-ECOL-SSA1-2002. Post-mortem lymphoid tissues were obtained from patients aged about three months. Agarose activated with divinylsulfone (Mini-Leak[®]) was from Kem-Étec (Hellrup, Denmark). PHA-E lectin was purchased from Sigma Chemicals Co. Uppsala, Sweden). Broad

range SDS-PAGE molecular weight standards were from BioRad (Hercules, CA, USA). All other reagents were purchased from Sigma Chemicals Co. (St Louis, MO, USA).

Immunohistochemistry

Fixed tissues in 10% formaldehyde overnight were embedded in paraffin wax and sectioned at two-micrometer thickness.

Anti-human CD5 and CD20 were used as a positive staining of lymphoid tissues due to their high affinity towards thymus and nodes, respectively. Serial 2- μ m thick sections of paraffin wax embedded tissues were mounted on slides coated with 3-aminopropyltriethoxy-silane (Sigma Diagnostics, St Louis, MO, USA). After tissues were dried overnight at 37 °C, they were dewaxed in xylene, and hydrated through a graded series of alcohol (100 to 50%). Then, tissues were rehydrated in deionized water and the technique of heat induced epitope retrieval (HIER) (Mason, 1991) was applied using 1% Tween 20 in sodium citrate buffer, pH 7.2, and then rinsing three times in deionized water and phosphate-buffered saline (0.01 M PBS, pH 7.2.). To quench endogenous peroxidase, the slides were covered with 3% H₂O₂ during 5 minutes. To block unspecific binding, slides containing different tissues were incubated with 1% bovine serum albumin (BSA) in 0.01 M PBS, pH 7.2. All sections were incubated during 45 minutes at room temperature with anti-CD5 or anti-CD20 mAbs (Dako, Denmark) diluted 1:25 (v/v) and 1:50 (v/v) in PBS, pH 7.2 respectively. Tissues were then incubated with biotinylated multilink anti-IgG during 30 minutes

(Vector stain SP kit, Burlingame, CA, USA) to reveal binding. After five additional rinses in PBS, binding was revealed by incubation with streptavidin-peroxidase (SP) during 30 minutes (Vector lab. Inc), and then immersed in 0.005% 3, 3'-diaminobenzidine 4 HCl (DAB, 0.2 mg/ml) - H₂O₂ for 10 seconds at room temperature. Finally, tissues were rinsed in water, counterstained with Mayer's Hematoxylin, dehydrated, cleared and mounted (Mason *et al.*, 1991).

Lectin Histochemistry

Binding of *Phaseolus vulgaris* erythroagglutinin (PHA-E) to lymphoid tissues was compared to histochemical reactivity of *Olneya tesota* (PF2) lectin. The lectin PF2 was purified as previously described by Vázquez-Moreno *et al.* (2000) and commercial PHA-E was used as a positive staining control since this lectin recognizes T cells (Wilkinson *et al.*, 1995). Both lectins were biotinilated using the protocol proposed by Hofmann *et al.* (1982).

Paraffin wax-embedded sections (2 µm) from thymus and lymph nodes were used to assay the affinity of PF2 lectin. Tissues were dried overnight at 37°C, dewaxed in xylene and hydrated through a graded series of alcohol (100 to 50%). The HIER technique was applied on rehydrated tissues as previously described. To block unspecific binding sites, tissues were covered with 1% bovine serum albumin (BSA) in 0.01 M PBS, PH 7.2. The slides were then incubated at room temperature with either PF2 or PHA-E (20 µg/mL) biotinylated lectins during 45 minutes and the binding was revealed by incubation with SP during 30 minutes (Vector Lab. Inc. USA) and then immersed

in 3,3'-diaminobenzidine 4 HCl (DAB, 0.2 mg/ml) H₂O₂ (0.005%) for 10 seconds at room temperature. Finally, tissues were rinsed in water, counterstained with Mayer's Hematoxylin, dehydrated, cleared and mounted. The intensity of antibodies and lectins binding was subjectively scale into four categories (-) negative, (+) weak, (++) moderate and strong (+++) as reported by Aoki *et al.* (1990). To assess the specificity of lectin staining the following controls were used: (1) pre-absorption of the lectins with fetuin, ovoalbumin, and albumin at a concentration of 0.2 M; and (2) substitution of conjugated lectin by PBS to determine the presence of endogenous peroxidase activity.

Results

Staining reactions with anti-CD5, anti-CD20 mAbs, PHA-E and PF2 lectins in normal human lymphoid nodes and thymus are summarized in Table 1.

Immune staining with anti-CD5 and antiCD20 mAbs labeled slides as expected. Anti-CD5, a T-cell specific mAb, showed positive staining of mantle zone and subcapsular space on lymph nodes slides. This is in contrast to thymus, were anti-CD5 marked homogeneously the slide. Furthermore, the reactivity of anti-CD5 with thymus was also more intense (+++) than the corresponding reactivity with lymph nodes (++) (Fig. 1, 2). Germinal centers of lymph nodes, where B lymphocytes are abundant, stained with acti-CD20 in an

intense way (+++) (Fig. 3). However, anti-CD20 reacted weakly (+) with thymus since staining was observed only in zones where B-lymphocytes are localized in medulla and cortex (Fig. 4).

Staining of mesenteric nodes sections with PF2 lectin revealed a striking localization of reactivity to the lymphoid follicles; intense distribution (+++) of PF2 lectin staining was detected specially in the germinal centers (Fig. 5). Lymphocytes in germinal centers appeared to exhibit surface localization of the lectin. Also, this lectin showed moderate affinity (++) to extracellular reticular fibers of lymph nodes. However, neither mantle nor paracortical zones of lymph nodes, were stained with PF2.

Reactive thymus tissues showed a distinct pattern of staining, since only an intense staining (+++) of Hassall's bodies with PF2 lectin were demonstrated (Fig. 6). Moreover, as showed by anti-CD20, PF2 lectin only bonded to few lymphocytes heterogeneously distributed in the thymus slides. The staining of PF2 was completely inhibited by fetuin but neither by albumin nor ovalbumin.

Contrary to PF2, PHA-E lectin showed an intense reaction (+++) with lymphocytes in germinal centers from thymus but scarcely and weakly (+) with germinal centers of nodes (Fig. 7). In addition Hassall's bodies in thymus were not stained with PHA-E and the extracellular reticular fibers showed only a weak interaction to the lectin (Fig. 8).

Discussion

The different surface expression of antigenic determinants underscores the normal and pathologic behavior of human tissues (Abdul-Salam *et al.*, 2000). Lectins are among the useful tools for studying changes taking place during tissue maturation and pathologies (Pastor *et al.*, 2003). However, many of them, especially lectins from Sonoran Desert remain uncharacterized in terms of their tissue specificity. In the present report, the distinct labeling among thymus and lymph nodes has been sought using the complex oligosaccharide-binding lectins PF2 and PHA-E.

The PF2 lectin labeling was restricted to areas corresponding to cortical lymph nodes. Similar to anti-CD20, PF2 strongly bonded to cells in germinal centers where differentiated B lymphocytes are the most abundant cells (Youinou *et al.*, 2006). The interaction was apparently mediated by complex carbohydrates since it was inhibited by fetuin but neither by albumin nor ovoalbumin, this in agreement with the known protein specificity of PF2 lectin (Vázquez-Moreno *et al.*, 2000). PHA-E-labeled lymphocytes were not located at germinal centers unlike PF2; PHA-E stain was selectively located within the paracortex and the mantle zone surrounding follicular areas. The staining profile of PHA-E was similar to the binding pattern of anti-CD5 since the CD5 epitope is expressed in normal early T cells (Böhm, 2004) and B cells (Dono *et al.*, 2004) located at the mantle zone and paracortex of nodes.

On the other hand, PF2 lectin presented strong binding towards extracellular reticular fibers in nodes, and stained the Hassall's bodies and

reticular endothelial cells in thymus. The staining activity of PF2 was also found to be located in a few cells dispersed both in medulla and cortex of thymus while PHA-E interacted with cells in all tissue.

The distinct binding pattern showed by PF2 and PHA-E lectins suggested the distinct terminally glycoconjugates recognized on lymphocytes by each lectin. Even though the results from inhibition assays with fetuin and ovalbumin suggested that PF2 recognizes complex-oligosaccharides, the specific carbohydrate sequences and cells subpopulations recognized by PF2 remains to be elucidated. Meanwhile, a possible application of this lectin could be the study of changes in the cellularity of follicle centers of nodes since PF2 strongly stained the lymphocytes from germinal centers. Also this lectin may be useful as a tool to search for the architecture of extracellular fibers in nodes and the Hassall's bodies in thymus since the presence of this last structure within the human thymic medulla has been used as an indicator of ongoing or recent thymopoiesis (Hale and Markert, 2004).

Conclusion

In this study, it was demonstrated that PF2 presented specificity towards lymphocytes and stained preferably lymphocytes in germinal centers of lymph nodes. In thymus, the Hassall's bodies were the mainly structures stained by PF2 while only scarce and disseminated cells were stained by the lectin.

Despite the fact that PF2 showed similar inhibition by complex carbohydrates as PHA-E, the observed lectin binding pattern to nodes and thymus was different. This suggested that PHA-E and PF2 lectins have differences in carbohydrate specificities that remains to be elucidated.

LITERATURE CITED

- Abdul-Salam F, Moulana MGR, Mansour MH. Age-related structural modulation of T lymphocyte-associated CD45 isoforms. *Mech. Age Develop.* 2000; 114: 21–35.
- Aoki DMD, Shiro NMD, Rihachi IMD, Hayato K, Hiroshi HMD. Differences in lectin binding patterns of normal endometrium and endometrium adenocarcinoma, with special reference to satining with *Ulex europaeus* Agglutinin 1 and peanut Agglutinin. *Gynecologic oncology* 1990; 37: 338-345.
- Böhm I. Increased peripheral blood B-cells expressing the CD5 molecules in association to autoantibodies in patients with lupus erythematosus and evidence to selectively down-modulate them. *Biomedicine & Pharmacotherapy.* 2004; 58: 338–343.
- Dono M, Cerruti G, Zupoc S. Cells in focus: The CD5+ B-cell. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology.* 2004; 36: 2105–2111.
- Felger SR, Nabhan GP. Agroecosystem: a model from the Sonora Desert, in: AAAS, selected Symposium No. 10 (Ed.), *Social and Technological Management in Dry Lands. Past and Present, Indigenous and imposed*, 1978; 129-148.
- Goldstein IJ, Hughes RC, Monsigny M, Osawa T, Sharon N. What should be called a lectin? *Nature* 1980; 285: 66.
- Guzmán-Partida AM, Robles-Burgueño MR, Ortega-Nieblas M and Vázquez-Moreno L. Purification and characterization of complex carbohydrate specific isolectins from wild legume seeds: *Acacia constricta* (vinorama) is highly homologous to *Phaseolus vulgaris* lectins. *Biochimie* 2004. 86: 335-342.
- Hale LP, and Markert ML. Corticosteroids Regulate Epithelial Cell Differentiation and Hassall Body Formation in the Human Thymus. *The Journal of Immunology*, 2004, 172: 617-624.
- Hofmann K, Titus G, Montibeller JA. Avidin binding of carboxyl-substituted biotin and analogs. *Biochemistry.* 1982; 21: 978-984.
- Jones CJP, Cateni C, Guarinoc FM, Paulesu LR. Glycosylation of the Materno-foetal Interface in the Pregnant Viviparous Placentotrophic Lizard

- Chalcides chalcides: a Lectin Histochemical Study. *Placenta* 2003; 24: 489–500.
- Lis H, Sharon N. The biochemical of plant lectins (phytohemagglutinins), *Annu. Rev. Biochem.* 1973; 42: 541-574.
 - Loris R, Hamelryck T, Bouckaert J, Wins L. Legume lectin structure, *Biochem. Biophys. Acta.* 1998; 1383: 9-36.
 - Mason DY, Cordell J Tse AGD, Van Donger JM, Carel JM, Van Noesel JM, Gatter KC. The IgM-associated protein mb-1 as marker of normal and neoplastic B cell. *J. Immunol.* 1991; 147:2474-2482.
 - Felipe-Ortega X. Aislamiento y caracterización de las lectinas de leguminosas silvestres del desierto de Sonora: *Cercidium praecox* (palo de brea) y *Caesalpinia caladenia* (palo dorado), Tesis de licenciatura, Universidad de Sonora, México. 1996
 - Pastor LM, Morales E, Polo LA, Calvo AI, Pallarés J, and De La Viesca S. Histochemical study of glycoconjugates in active and photoperiodically-regressed testis of hamster (*Mesocricetus auratus*). *Acta Histochem.* 2003; 105:2 165–173.
 - Sharon N, Lis H. 1989. *Lectins*. Chapman and Hall, London.
 - Van Damme EJM, Peumans WJ, Barre A, and Rouge P. *Crit. Rev Plant Sci.* 1998; 17: 575-692.
 - Van Damme EJM, Van Leuvent F, Peumans WJ. Isolation, characterization and molecular cloning of the bark lectins from *Maackia amurensis*, *J Glyconjugate* 1997; 14: 449-456.
 - Vázquez-Moreno L, Ortega-Nieblas MM, Robles-Burgueño MR, Ramos-Clamont G. Purification of complex carbohydrate specific lectins from *Olneya tesota* seeds using tandem affinity chromatography. *J.B.C* 2000; 5: 83-90.
 - Wilkinson R, Barton M, Kollarki I. Identification of koala T lymphocytes using an anti-human CD3 antibody. *Developmental and comparative Immunology* 1995; 19:6. 537-545.
 - Youinou P, Hillion S, Jamin Ch, Pers JO, Saraux A, Renaudineau Y. B lymphocytes on the front line of autoimmunity. *Autoimmunity Reviews.* 2006; 5: 215– 221.

Table. 1. Binding pattern of tissues to anti-CD5, anti-CD20 and legume lectins (PHA-E y PF2)

| Tissues | Localization | Anti-CD5 | Anti-CD20 | PHA-E lectin | PF2 lectin |
|-------------------|---------------------|-----------------|------------------|---------------------|-------------------|
| | Sub capsular space | +++ | - | ++ | - |
| Lymph Node | Germinal Center | - | +++ | - | +++ |
| | Pattern reticular | - | - | + | +++ |
| | Cortex and Mantle | +++ | - | ++ | - |
| Thymus | Germinal Center | +++ | - | +++ | - |
| | Hassal Bodies | - | - | + | +++ |
| | Pattern reticular | - | - | + | +++ |

The intensity of antibodies and lectins binding was subjectively scale into four categories (-) negative, (+) weak, (++) moderate and strong (+++).

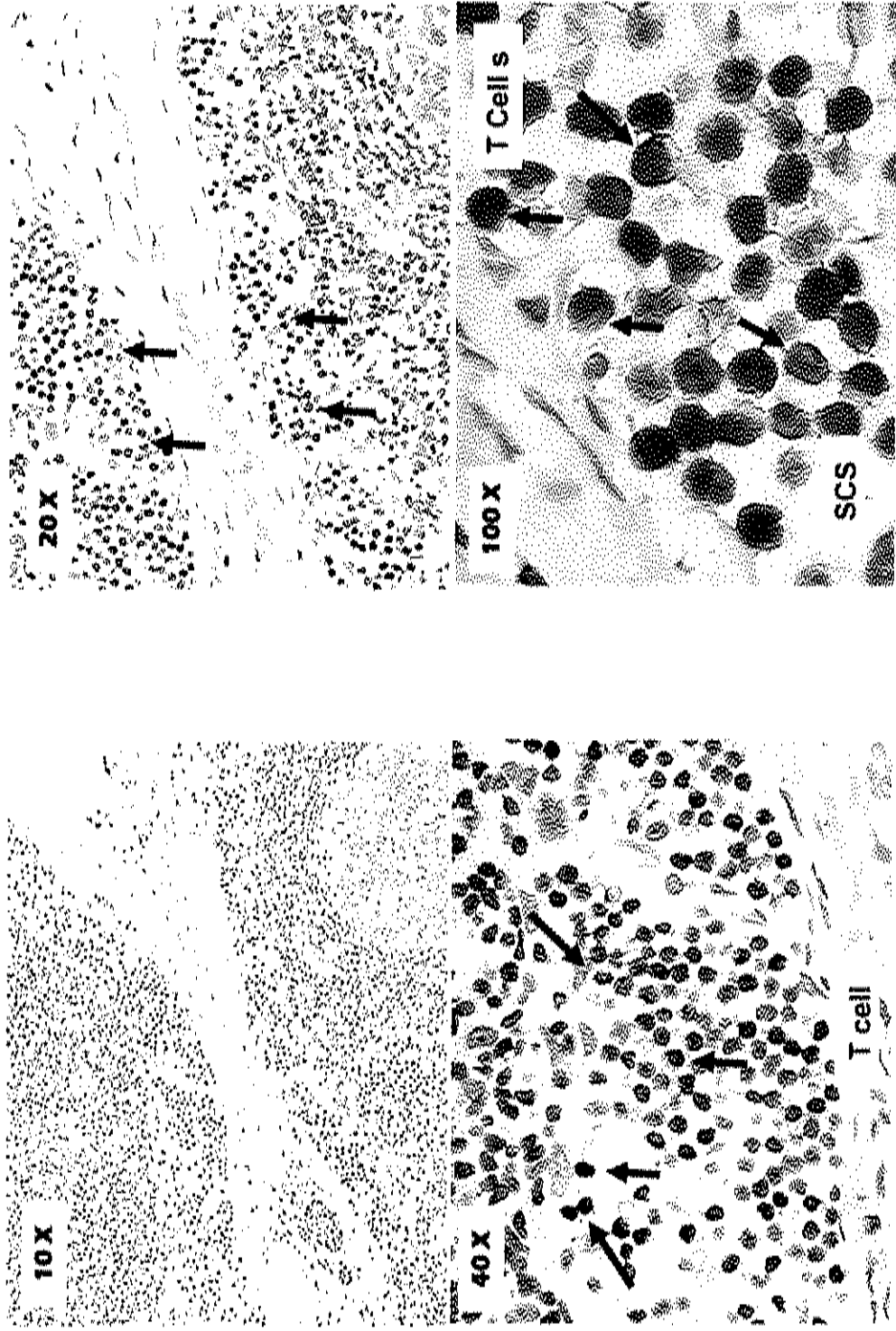


Fig. 1. Light microphotographs of lymph node sections processed with anti-CD5 immunohistochemistry, were stained an intense way on areas that are located in the sub capsular space (SCS).

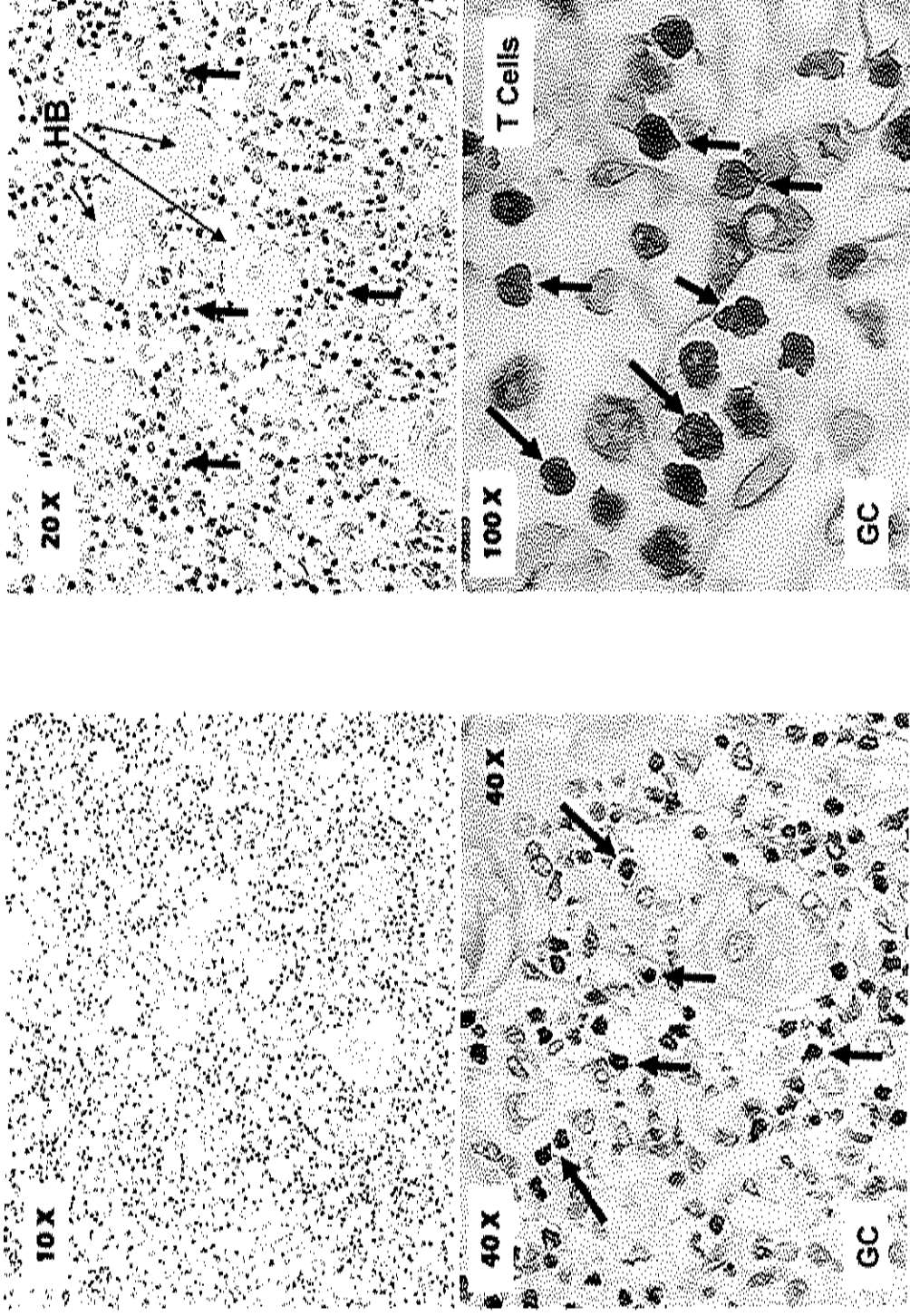


Fig. 2. Light microphotographs of thymus sections processed with anti-CD5 immunohistochemistry, were stained an intense way on areas that are located in the germinal centers or lymphoid follicles. Hassall's Bodies (HB)

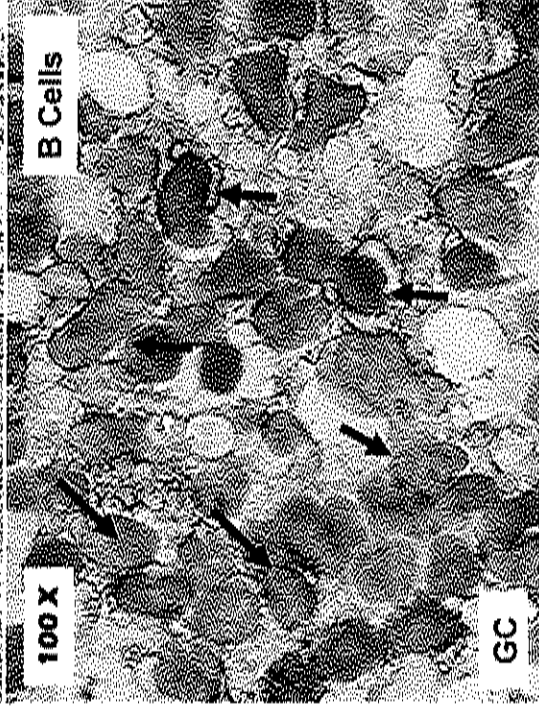
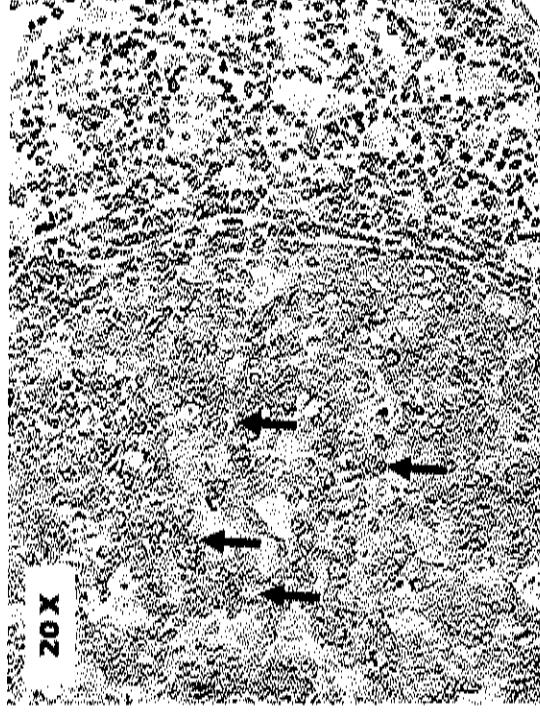
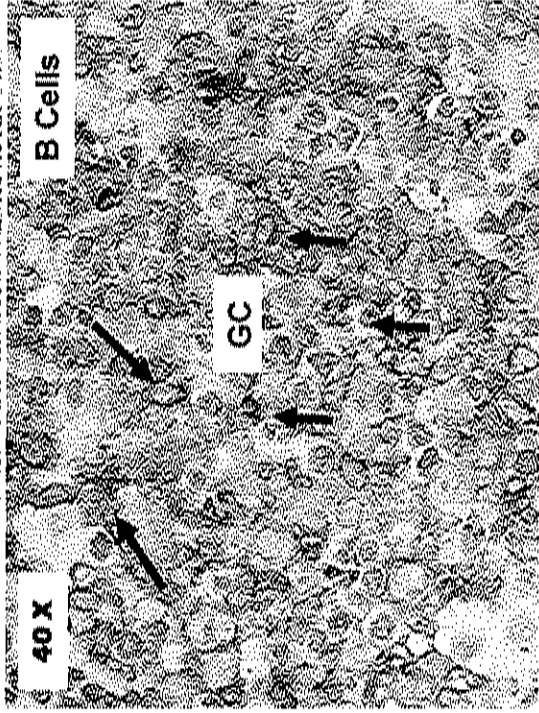
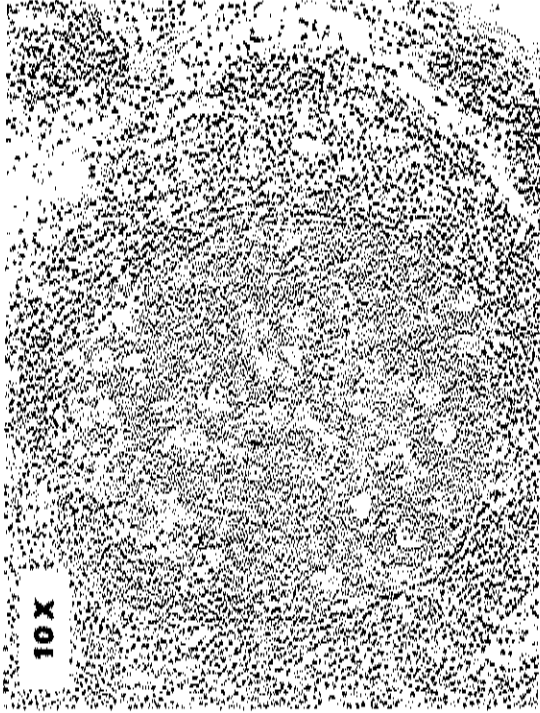


Fig. 3. Light microphotographs of lymph node sections processed with anti-CD20 immunohistochemistry were stained an intense way on areas that are located in the germinal centers (GC) and lymphoid follicles.

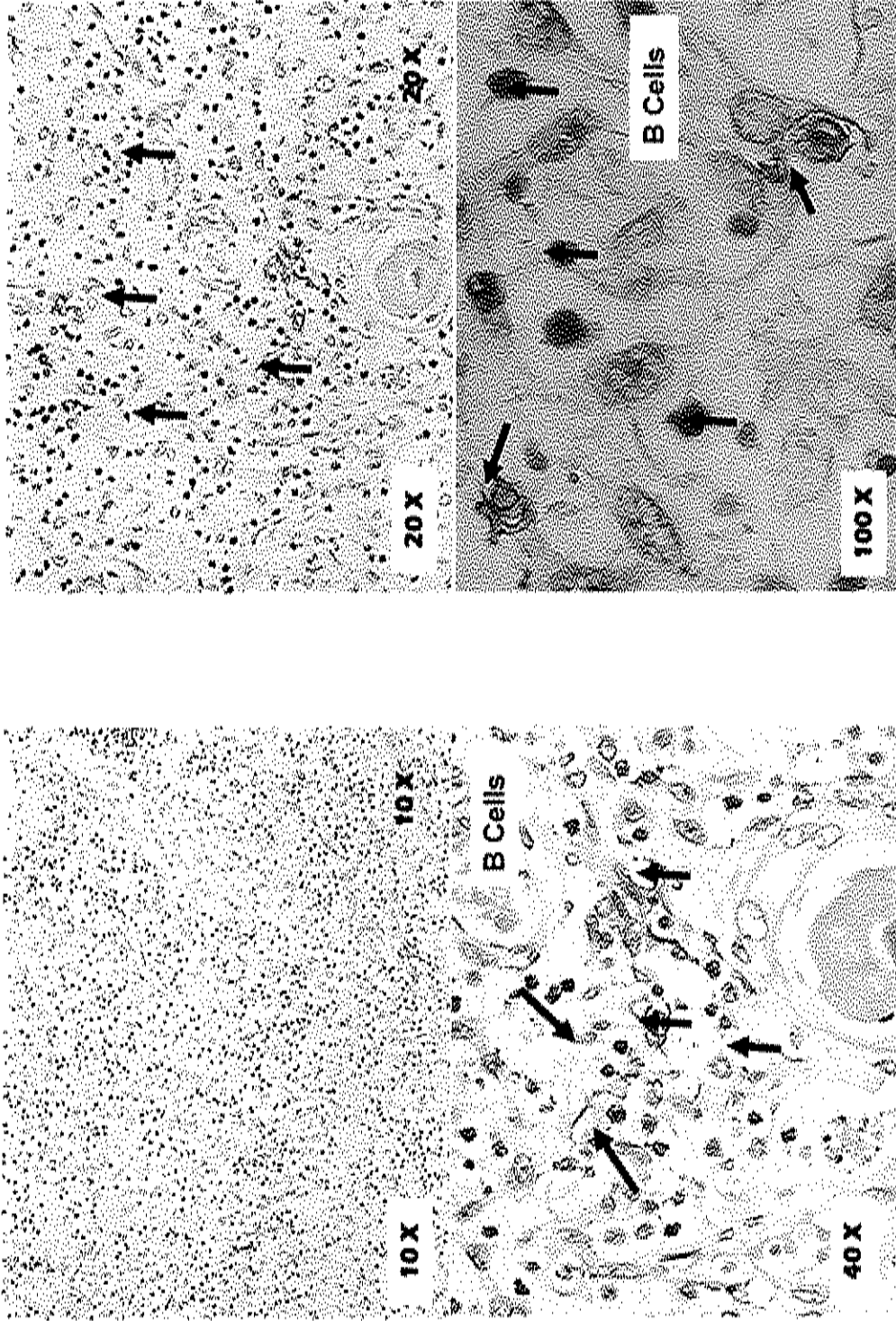


Fig. 4. Light microphotographs of thymus sections processed with anti-CD20 immunohistochemistry were stained an weak way on areas that are located disperse form.

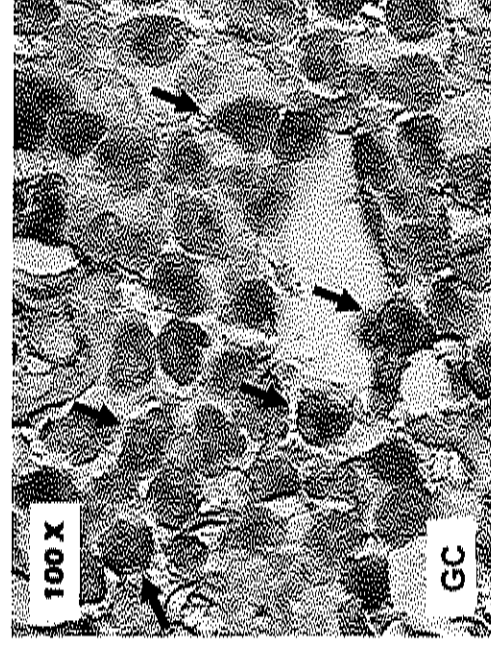
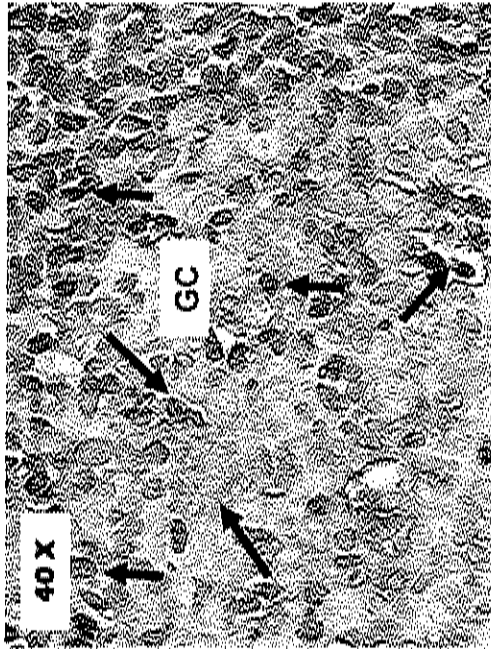
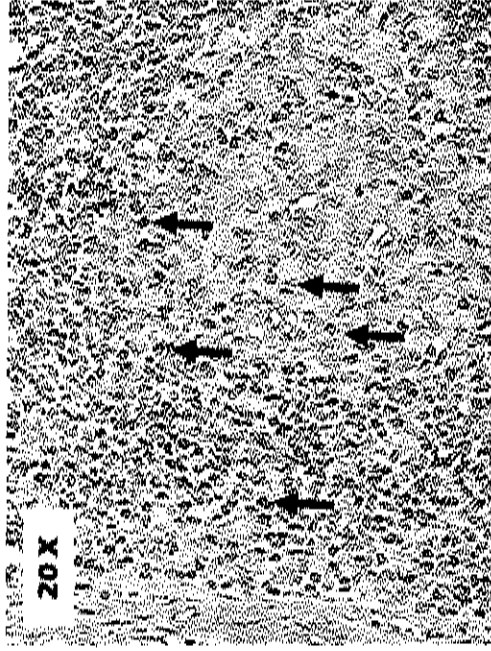
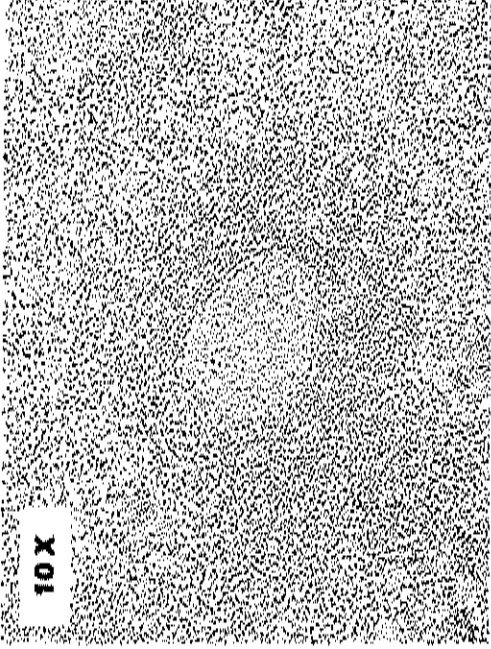


Fig. 5. Light microphotographs of Lymph node sections processed with PF2 lectin immunohistochemistry were stained an intense way on areas that are located in GC.

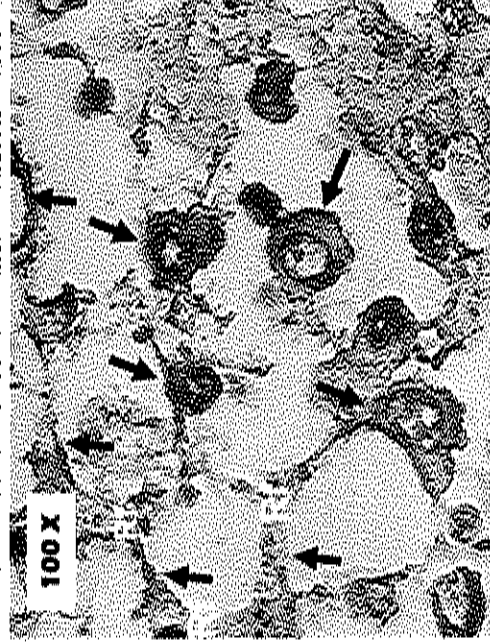
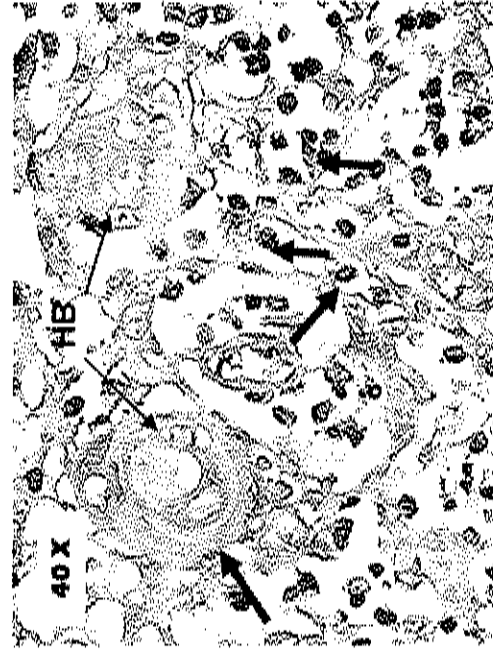
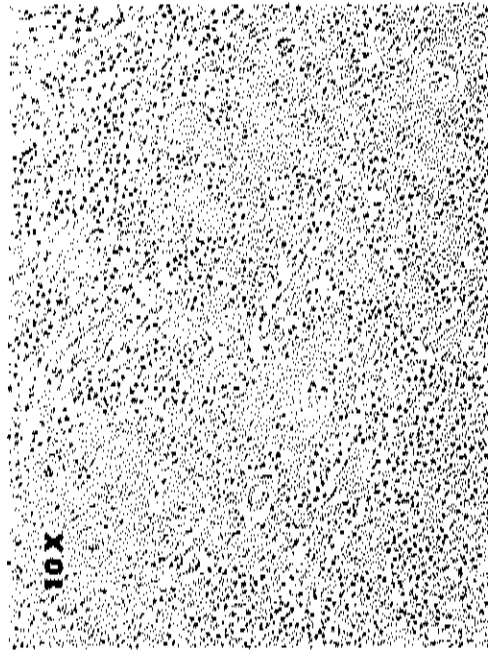


Fig. 6. Light microphotographs of Lymph node sections processed with PF2 lectin immunohistochemistry were stained an intense way cells Hassall's Bodies (HB) and reticular fibers (Rf) red arrow.

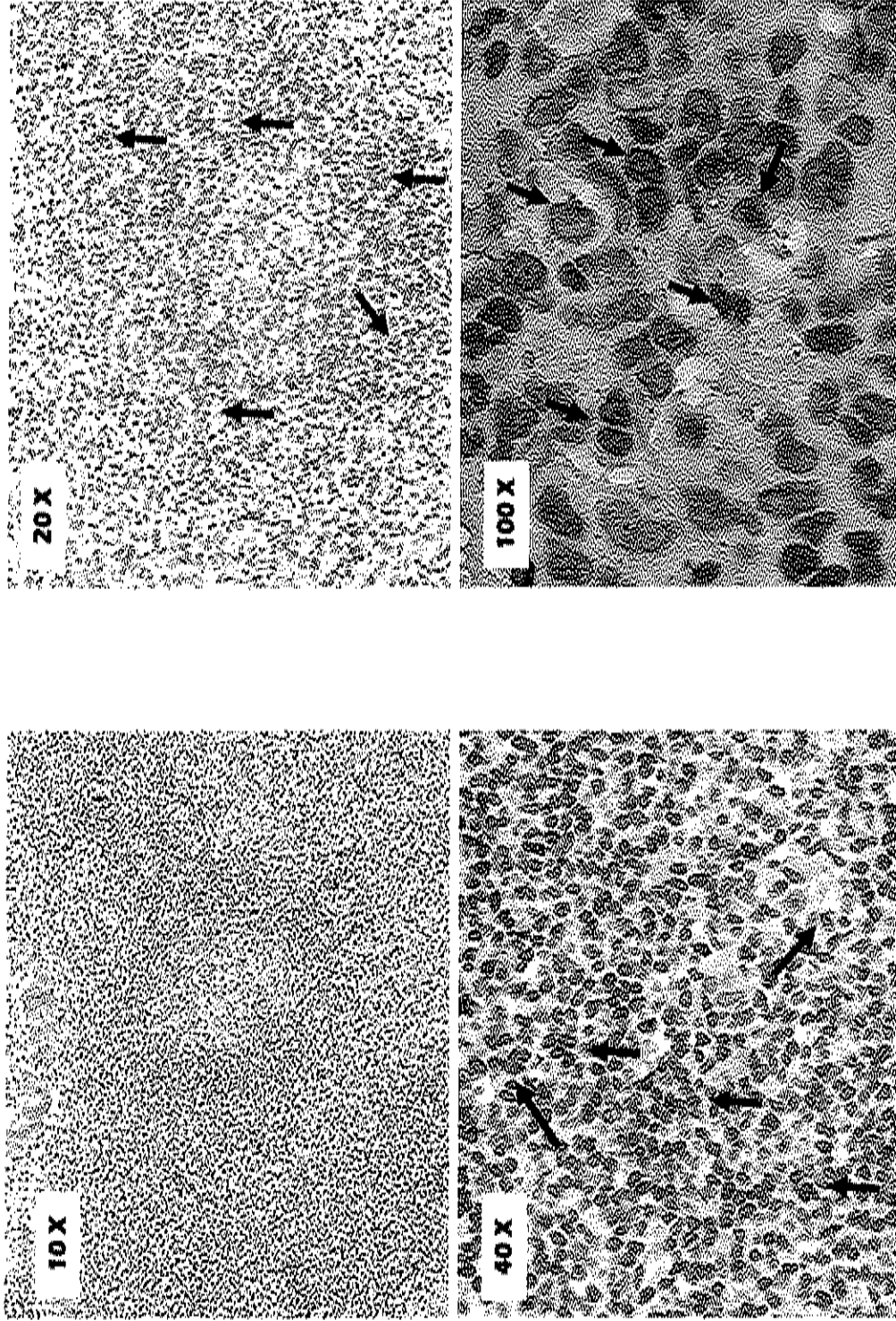


Fig. 7. Light microphotographs of Lymph node sections processed with PHA-E lectin immunohistochemistry were stained an moderate sub capsular space, cortex and mantle.

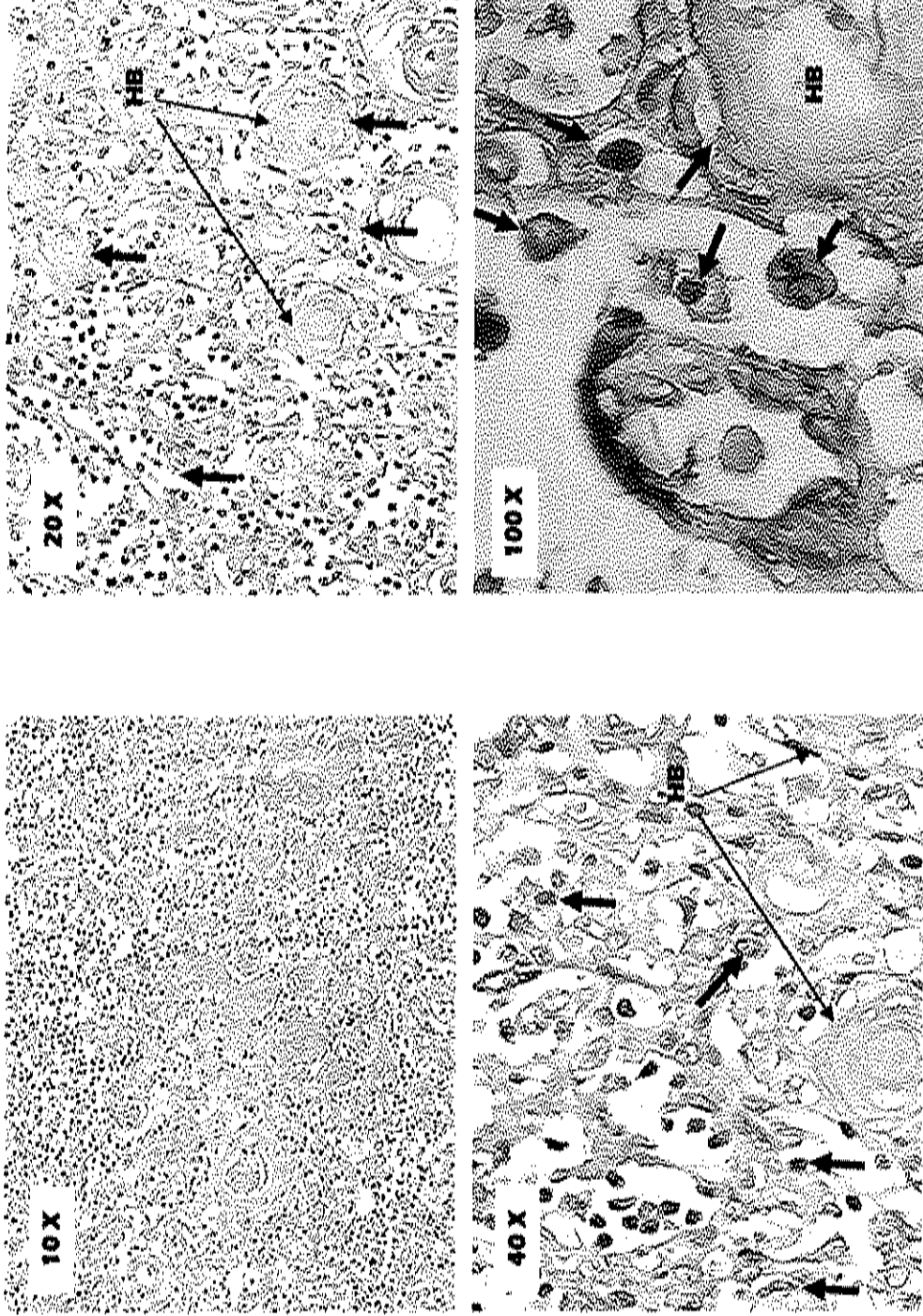


Fig. 8. Light microphotographs of thymus sections processed with PHA-E lectin immunohistochemistry were stained an intense germinal center (GC) moreover and stained weak Hassall's Bodies (HB) and reticular fibers (Rf).

Ana Maria Guzman

De: "luz vazquez" <luzvazquez@yahoo.com>
Para: <gupa@cascabel.ciad.mx>; "Gabriel Urbano" <gabrielurbano74@hotmail.com>
Enviado: Lunes, 11 de Junio de 2007 04:27 p.m.
Asunto: Rv: Submission Confirmation

This message was transferred with a trial version of CommuniGate(r) Pro
X-CIAD A.C.-MailScanner: Found to be clean
X-CIAD A.C.-MailScanner-From: luzvazquez@yahoo.com

--- Biochimie <Redaction.Biochimie@ibpc.fr> escribió:

> De: "Biochimie" <Redaction.Biochimie@ibpc.fr>
> Para: <lvazquez@cascabel.ciad.mx>
> Asunto: Submission Confirmation
> Fecha: Mon, 11 Jun 2007 22:32:54 +0100
>
> *This message was transferred with a trial version
> of CommuniGate(r) Pro*
> X-CIAD A.C.-MailScanner: Found to be clean
> X-CIAD A.C.-MailScanner-From:
> redaction.biochimie@ibpc.fr
>
> Dear lvazquez,
>
> Your submission entitled "Purification of a
> Glycoprotein from Human Spleen Using Affinity
> Chromatography with Immobilized PF2 lectin (Olneya
> tesota)" has been received by journal Biochimie
>
> You will be able to check on the progress of your
> paper by logging on to Elsevier Editorial System as
> an author. The URL is
> <http://ees.elsevier.com/biochi/>.
>
> Your manuscript will be given a reference number
> once an Editor has been assigned.
>
> Thank you for submitting your work to this journal.
>
> Kind regards,
>
> Biochimie
>
>
> _
> Este mensaje ha sido analizado por MailScanner
> en busca de virus y otros contenidos peligrosos,
> y se considera que está limpio.

> MailScanner agradece a transtec Computers por su
> apoyo.
>
>
>

Dra. Luz Vázquez Moreno
Coordinadora de Ciencia de los Alimentos
CIAD A.C.
México

Correo Yahoo!

Espacio para todos tus mensajes, antivirus y antispam ¡gratis!
Regístrate ya - <http://correo.espanol.yahoo.com/>

--
Este mensaje ha sido analizado por MailScanner
en busca de virus y otros contenidos peligrosos,
y se considera que está limpio.
MailScanner agradece a transtec Computers por su apoyo.

----- Original Message -----

From: "luz vazquez" <luzvazquez@yahoo.com>

To: "Biochimie" <Redaction.Biochimie@ibpc.fr>

Sent: Monday, June 11, 2007 4:25 PM

Subject: Re: Your PDF Purification of a Glycoprotein from Human Spleen Using Affinity Chromatography with Immobilized PF2 lectin (Olneya tesota) has been built and requires approval

-- Biochimie <Redaction.Biochimie@ibpc.fr> escribió:

- > *This message was transferred with a trial version
- > of CommuniGate(r) Pro*
- > X-CIAD A.C.-MailScanner: Found to be clean
- > X-CIAD A.C.-MailScanner-From:
- > redaction.biochimie@ibpc.fr
- >
- >
- >
- > Dear Dr vazquez-moreno,
- >
- > The PDF for your submission, "Purification of a
- > Glycoprotein from Human Spleen Using Affinity
- > Chromatography with Immobilized PF2 lectin (Olneya
- > tesota)" is ready for viewing.
- >
- > Please go to <http://ees.elsevier.com/biochi/> to
- > approve your submission.
- >
- > Your submission must be approved in order to
- > complete the submission process and send the
- > manuscript to the Biochimie editorial office.
- >
- > Please view the submission before approving it to be
- > certain that your submission remains free of any
- > errors.
- >
- > Thank you for your time and patience.
- >
- > Editorial Office Staff
- > Biochimie
- > <http://ees.elsevier.com/biochi/>
- >

**Purification of a Glycoprotein from Human Spleen Using Affinity
Chromatography with Immobilized PF2 lectin (*Olnya tesota*)**

G. Urbano-Hernández^a, M.C. Candia-Plata^b, G. López-Cervantes^c, A.M.
Guzmán-Partida^a, L. Vázquez-Moreno ^{a*},

^a Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Apartado Postal
1735. Hermosillo Sonora, México.

^b Laboratorio de Inmunohematología Universidad de Sonora. Hermosillo
Sonora, México.

^c Departamento de Patología, Hospital Infantil del Estado de Sonora. Hermosillo
Sonora, México

* Author to whom correspondence should be sent. Luz Vázquez Moreno, PhD.;
Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Carretera a la
Victoria Km 0.6 Hermosillo Sonora, México. C.P. 83000, Tel/Fax:+52 (662) 2 80
00 58, e-mail: lvazquez@cascabel.ciad.mx

Running title: Lectin-purified glycoprotein from human spleen.

Abstract

PF2 is a lectin from *Olneya tesota* (Palo fierro) seeds that presents high affinity towards complex carbohydrates but not for simple sugars. The goal of this study was to use the immobilized lectin as affinity chromatography matrix to identify glycoproteins in spleen human tissue that interacted with PF2. Two chromatographic steps, using ion exchange chromatography (CM-cellulose) and affinity chromatography (PF2-agarose), made possible the purification of a protein from crude extracts. Both SDS-PAGE and PAGE showed a 14-kDa monomeric glycoprotein (GP14). GP14 was protease digested and six peptides identified. Peptides presented 100% homology to sequences of 70-kDa family of heat shock proteins (HSP70) of humans. PF2 lectin biotinilated, were incubated with sections of fixed spleen tissue and then revealed with streptavidin-peroxidase, showing that, of different regions, stained lymphocytes were abundantly and selectively located within the cortical germinal centers of lymphoid follicles. Also, the PF2 lectin stained extracellular reticular fibers in spleen. In conclusion, it was possible to purify and identify a (GP14) that appears to be a novel stress glycoprotein. PF2 lectin have specificity toward lymphoid tissue glycoconjugated express in the membrane cellular of B cells, Hassalls bodies and reticaluar fibers.

Keywords: *Olneya tesota*; PF2 lectin; spleen; glycoproteins; heat shock proteins

Abbreviations: PF2, Palo fierro lectin 2, HSP, Heat shock proteins.

1. Introduction

Lectins are defined as proteins or glycoproteins that bind specifically and reversibly to carbohydrates, resulting in cell agglutination or precipitation of polysaccharides and glycoconjugates [1, 2]. Lectins are ubiquitous, found in virus, bacteria, fungi, plants and animals [3, 4]. In the plant kingdom, seeds of legumes have been known to be a rich source of lectins, constituting about 10% of their total soluble protein [5].

Seed plant lectins show high affinity towards carbohydrates, and they are used as valuable reagents in glycobiology research, for example in detection and preliminary characterization of glycoconjugates from membrane cells [6]. In addition, immobilized lectins are used as an attractive technique for separating carbohydrate-containing molecules in complex mixtures [7]. Particularly, PF2 which is a tetrameric lectin from *Olneya tesota* legume (Palo fierro) seeds, with subunits of 33 kDa, binds complex carbohydrates of glycoprotein (fetuin) and is not inhibited by monosaccharides [8], thus PF2 could be used to identify glycoproteins.

Several glycoconjugates from animal tissues have been purified by affinity chromatography using immobilized plant lectins. Purified glycoproteins include those involved in cellular development, differentiation as well as in pathological conditions such as infection, inflammation and trauma [9-11]. Heat shock proteins (HSP) are among proteins that can be purified from human tissues using lectin-affinity chromatography, as many of them are glycoproteins induced or constitutively expressed by cells from all human tissues [12,13].

The specificity of PF2 lectin toward human glycoconjugates has not been determined, thus the objective of this work was to evaluate the ability of PF2 lectin to purify glycoproteins from human spleen tissue and establish PF2 lectin specificity towards humans normal spleen tissues.

2. Materials and Methods

The spleen tissue sections were kindly provided by the Pathology Department of the Hospital Infantil del Estado de Sonora. Tissues were obtained under ethical and legal request of Mexican official guidelines in NOM-087-ECOL-SSA1-2002. Post mortem splenic tissues were obtained from patients aged about three months. Agarose activated with divinylsulfone (Mini-LeaK^R) was from Kem-Entec (Hellrup, Denmark); Protease Inhibitor Cocktail Tablets (COMPLETE, EDTA-free) from Roche Diagnostic (Indianapolis, IN, USA). Polyacrylamide gels were obtained from Amersham Biosciences (Uppsala, Sweden) and broad range SDS-PAGE molecular weight standards from BioRad (Hercules, CA, USA). The antibody anti-CD20 mAb was purchase from Dako (Denmark) diluted 1:50 (v/v) in PBS, pH 7.2. Streptavidin-peroxidase (Vector lab. Inc), Mayer's Hematoxylin. All other reagents were purchased from Sigma Chemicals Co. (St Louis, MO, USA)

2.1. Isolation of spleen proteins

Protein isolation from spleen tissue was according to Martínez-Pomares *et al.*, [14] and Ketcham *et al.*, [15]. Tissue was cut into slices and the outer fascia removed. Slices were diced, homogenized at 4 °C in extraction buffer (buffer A) containing 10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 2.5 % (v/v) Tween 20, 150 mM NaCl, 10 mM NaN₃, 2 mM EDTA and protease inhibitors (5 mM iodoacetamide, 2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, and 1µg/mL leupeptin), using a Branson Sonifier 250 (Branson Ultrasonics Corporation U.S.A) at 4 pulses per 10

seconds. A volume of 90 ml of extraction buffer was used for each 60 g of tissue. The homogenate was centrifuged at 12,500 *g* during 30 min at 4 °C using Allegra TM 64 R Centrifuge (Beckman Coulter). The supernatant was centrifuged again at 66,200 *g* for 60 min at 4°C. The pellet was washed twice in buffer A containing protease inhibitors 2 % (v/v) Triton X-100 instead of Tween 20 after centrifugation at 164, 000 *g* for 30 min at 4°C in a Beckman TC-100 centrifuge to remove insoluble material. Supernatants were dialyzed during 48 h against PBS (0.02 M KH₂PO₄/K₂HPO₄, 0.9% NaCl and 0.02 % NaN₃ pH 7.2). Slurry (50 ml) of CM-cellulose was added to supernatant and stirred for 48 h at 4 °C. This material was filtered using Whatman No. 4 filter paper on a Buchner funnel and washed five times with PBS. The CM-cellulose was suspended in PBS and packed into a glass column of 1.5 x 30 cm; non-bound proteins were washed until absorbance at 280 nm was under 0.02 AU. Proteins bound to column eluted with 0.5 M NaCl (isocratic separation) in PBS and collected in 2 ml fractions. Fractions from each peak were pooled, dialyzed against water, freeze-dried and stored at – 40 °C until further analysis.

2.2. Glycoprotein purification by affinity chromatography

PF2-agarose was produced according to Vazquez-Moreno *et al.*, [8]. PF2 lectin (40 mg) was coupled to activated agarose (1 g) and 2-ml of PF2-agarose was packed in a glass column and equilibrated with PBS. Glycoprotein purification was done by loading elution fractions from CM-cellulose (1 mg/10 ml PBS) to agarose-PF2. The unbound protein fraction was removed by extensive washing with PBS and bound proteins eluted by pH change, using 0.02 M

glycine–HCl buffer, pH 3.0. Chromatography steps were monitored at 280 nm and 1-ml fractions were collected. Pool of eluted fractions was dialyzed against water, freeze-dried and stored at - 40 °C until analysis.

2.3. Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE)

Relative molecular mass (M_r) subunits obtained from affinity chromatography were estimated by SDS-PAGE in a Phast System Instrument (Amersham Bioscience) using 8-25 % linear gradient according to Separation Technique File No. 110. Four μg of the protein from chromatographic flow through and elution fractions were loaded in each slot and the gels were stained with silver nitrate [16]. M_r was estimated by comparison with broad range molecular weight markers (BioRad, Hercules, CA USA). Similarly, native molecular mass was determined by PAGE using a high density Phast gel (Separation Technique File No. 112). Each slot contained 10 μg of protein.

2.4. Protein determination

Protein concentration was estimated as described by Lowry *et al.*, [17] using bovine serum albumin as a standard.

2.5. Analysis of peptides from 14- kDa protein by liquid chromatography and tandem mass spectrometry (LC-MS/MS)

The GP14 glycoprotein purified by PF2-affinity chromatography was recovered from polyacrilamide gels and sent to the Center Protéomique del l'Est du Québec, Canada for analysis. GP14 was treated with trypsin and direct analysis of peptide sequences were done by LC-MS/MS according to Link *et al.*, [18]. The high confidence portion of peptides was examined for homology with other known proteins, using Blast tools from the National Center for Biotechnology Information available at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Deduced amino acid sequences were obtained using the ExpASY Proteomics Server available at <http://www.expasy.gov>. Multiple alignments of proteins sequences were produced with the CLUSTAL W program.

Immunohistochemistry and Lectin Histochemistry

The lectin PF2 was purified as previously described by Vázquez-Moreno *et al.* [8]. The lectin was biotinilated using the protocol proposed by Hofmann *et al.*, [19]. The antibody anti-CD20 was used as a positive staining of lymphoid tissues

Paraffin wax-embedded sections (2 μ m) from spleen tissue were used to assay the affinity of PF2 lectin. Tissues were dried overnight at 37°C, dewaxed in xylene and hydrated through a graded series of alcohol (100 to 50%). The HIER technique was applied on rehydrated tissues. To block unspecific binding sites, tissues were covered with 1% bovine serum albumin (BSA) in 0.01 M PBS, PH 7.2. The slides were then incubated at room temperature with either

PF2 (20 µg/mL) biotinylated lectin during 45 minutes and the binding was revealed by incubation with Streptavidin-peroxidase during 30 minutes (Vector Lab. Inc. USA) and then immersed in 3,3'-diaminobenzidine 4 HCl (DAB, 0.2 mg/ml) H₂O₂ (0.005%) for 10 seconds at room temperature. Finally, tissues were rinsed in water, counterstained with Mayer's Hematoxylin, dehydrated, cleared and mounted [20]. The intensity of antibody and lectin binding (anti-CD20 and PF2) was subjectively scale into four categories (-) negative, (+) weak, (++) moderate and strong (+++) as reported by Aoki *et al.*, [21]. To assess the specificity of lectin staining the following controls were used: (1) pre-absorption of the lectins with fetuin, ovoalbumin, and albumin at a concentration of 0.2 M; and (2) substitution of conjugated lectin by PBS to determine the presence of endogenous peroxidase activity.

3. Results

Isolation of spleen proteins by ion exchange chromatography

Protein isolation from spleen tissue was made using CM-cellulose. Unadsorbed proteins ($18 \text{ mg} \pm 0.7$) remained in the wash fraction (Table I) while adsorbed proteins eluted mainly as a single peak (Fig 1A) with 0.5 M NaCl in PBS, pH 7.2. These fractions were pooled and freeze dried, obtaining a total of $3.3 \pm 0.05 \text{ mg}$ (Table I).

Purification of glycoproteins from spleen tissue by affinity chromatography

Purification of glycoproteins from splenic tissue was made using affinity chromatography with PF2 lectin immobilized to Agarose. The protein fraction obtained from CM-cellulose ($1.1 \text{ mg}/10 \text{ ml}$ PBS, pH 7.2) was loaded to PF2-agarose column and two peaks were obtained. Flow-through fractions (Fig. 1B, peak 1) were wash from the column using PBS, pH 7.2 and contained 0.73 mg of unbound proteins. Elution fraction (Fig. 1B, peak 2) was obtained using 0.50 mM glycine-HCl buffer, pH 3.0 and contained 0.19 mg of glycoproteins (Table I).

Determination of relative molecular mass

Elution fraction obtained by affinity chromatography was applied to SDS-PAGE to evaluate its purity and subunit mass. Electrophoretic analysis revealed an intense band corresponding to a relative molecular mass of 14 kDa (Fig. 2A). Additionally, this elution fraction was subjected to PAGE and a single band was

observed with mobility of 14 kDa (Fig. 2B). According to this analysis, the purified glycoprotein from spleen tissue is a monomer and was named GP14. It is important to mention that GP14 could be only stained with silver nitrate but not with Coomassie blue. Similar behavior has been reported for other glycoproteins such as MUC 1, these glycoproteins typically stain well in gels with PAS reagent and silver stain because their large content of carbohydrates [22].

Peptide analysis

GP14 was subjected to analysis by LC-MS/MS. Trypsin digestion of GP14 produced six identifiable peptide fragments containing from 12 to 17 amino acids. The deduced amino acid sequences of the peptides is significantly homologous, up to 95-100%, to *heat shock proteins* of 70 kDa (HSP70) (Table II). Also, all six GP14 peptides showed 100 % homology to other HSP, these include, the 71-kDa HSP cognate protein (HSC70), HSP cognate of 54 kDa and HSP8 isoform 2 variant of 70 kDa. The HSP8 (70 kDa) isoform 2 variant and HSP2 presented a single amino acid substitution amino acid (data no shown).

Also, from analysis of sequences it was found that GP62, which is a mayor stress glycoprotein expressed in rat cells, have two of GP14 peptides, PT73 (**A**QIHDLVLVGGSTR) and PT36 (**A**TAGDTHLGGEDFDN). In GP14, both peptides present a substitution of serine for alanine (in bold). This substitution has already been reported in human and other species [23].

Lectin Histochemistry

Staining of spleen sections with PF2 lectin revealed a striking localization of reactivity to the lymphoid follicles; intense distribution (+++) of PF2 lectin staining was detected specially in the germinal centers (Fig. 3A). Lymphocytes in germinal centers (GC) appeared to exhibit surface localization of the lectin. Also, this lectin showed moderate affinity (++) to extracellular reticular fibers of spleen. Immune staining with anti-CD20 mAb labeled slides as expected. Germinal centers of spleen, where B lymphocytes are abundant, stained with anti-CD20 in an intense way (+++) (Fig. 3B). Both interactions were very similar as for intensity and cell locating.

4. Discussion

Lectins from animal and plant organisms are widely used for identification and isolation of glycoproteins from human tissues. In particular, cells or glycoproteins from lymphoid organs have been studied using lectins such as *Peanut agglutinin* and *Helix pomatia* [24], *Vicia villosa* [25], *Amaranthus leucocarpus*, *Dolicus biflorus*, *Lens culinaris*, *Concanavalin A* and *Phaseolus vulgaris* [26].

The lectin from *Olneya tesota* seeds (named PF2) is a tetrameric lectin with 33-kDa subunits that has high affinity toward complex carbohydrates present in fetuin and it is not inhibited by simple sugars [8]. Other characteristic of PF2 lectin is its high affinity to lymphoid tissues such as thymus and

lymphatic ganglia demonstrated by histochemical analysis (manuscript in preparation). For these reasons, the goal of this work was to assess the ability of PF2 to purify glycoproteins from human splenic tissue.

Human spleen tissue was initially fractionated using cationic exchange chromatography and the eluted fractions loaded into PF2-agarose. Proteins bounded to affinity matrix were recovered and SDS-PAGE and PAGE analysis showed a pure 14- kDa protein (named GP14). Five other runs were performed on identical chromatographic conditions, and results, as expected, were in agreement to the high stability and specificity of the affinity matrix [8].

Peptide analysis data showed that GP14 could be included as part of the *heat shock proteins* family, a highly conserved group of proteins that have been identified in virtually all eukaryotic and prokaryotic species examined to date [27].

HSP are traditionally classified by their molecular weight; the best understood are the so-called major HSP with a molecular weight of 110, 90, 70 and 60 kDa [28, 29]. Recently, the HSP60, HSP70 subfamilies have attracted increasing attention because of their potential roles in immunologically relevant processes. Several studies have identified HSP as targets of immune responses during microbial infections [30].

In spleen and lymph nodes members of the HSP70 protein family are very closely related with a distinction that the 73-kDa molecule (HSC70) is expressed constitutively and the 72-kDa molecule (HSP70) is induced by stress

[31], this size difference could be explained in terms of amino acid difference or post-translational modification (such as glycosylation). In spleen there are not reports of heat shock proteins with low molecular weight. In humans small heat shock proteins have been classified as molecular chaperones and they share the following common features: the low homology between its members and subunits of 12–40 kDa [32].

The analysis of GP14 peptides showed 100% homology to highly conserved fragments of *heat shock proteins* (of about 70 kDa). This was unexpected since it's been no report of low molecular weight HSP in this tissue. Two peptides LDKSQIHDIVLVGGSTR and STAGDTHLGGEDFDNR of GP14 exhibits high homology with two peptides of GP62. The GP62 is the major stress glycoprotein in rat cells and its expression from Rat-1 to human cells originated a cell line that correlates with heat resistance [33]. The peptide PT36 of GP62 presents high homology (100%) with *heat shock proteins* of 70 kDa and the peptide PT73 showed partial homology with HSP70 and Heat Shock Cognate of 70 kDa (HSC70) from humans [34]. Some heat shock protein of family of HSP70 present at less three potential sites N- glycosylation one of which belongs to the NRTTPSYVAFTDTER sequence [35], which would explain the potential glycosylated status of GP14 at the TTPSYVAFTDTER peptide. Currently we are focused on the characterization GP14.

The lectins are useful tools for studying distribution patterns of cellular glycoconjugates and changes taking place during cell differentiation and maturation [36]. The PF2 lectin labeling was restricted to areas corresponding to

germinal center and lymphoid follicle in spleen similar at anti-CD20. Only are presents mature B lymphocytes enter the lymphoid follicles to make up germinal center, this cells participate in the immune response and non-circulating B cells consist of marginal zone [37]. The characteristics ascribed to B and T lymphocytes subpopulations underscore the complexity of the developmental pathways and activation requirements of their constituent subsets, which is manifested by the coordinated expression of distinct combinations of differentiation markers [38]. In particular, the oligosaccharides determinant constitutes a significant source of structural variability and may add another level of complexity to mechanisms controlling the lymphocyte surface.

BIBLIOGRAPHY

1. Goldstein I.J., Hughes R.C., Monsigny M., Osawa T., Sharon N., What should be called a lectin? *Nature* 285 (1980) 66.
2. Sharon N., Lis H., Lectins. Chapman and Hall, London and New York (1989).
3. Goldstein I.J., Poretz R.D., Isolation, physicochemical characterization, and carbohydrate-binding specificity of lectins, in: Liener I., Sharon N., Goldstein U., (Eds.), *The lectins: properties, function and application in biology and medicine*, Academic Press London (1986) 33-93.
4. Kim M.V., Seit-Nebi A.S., Marston S.B., Gusev N.B., Some properties of human small heat shock protein Hsp22 (H11 or HspB8), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 315 (2004) 796-801.
5. Van Damme E.J.M., Barre A., Rougé P., Peumans W.J., Molecular cloning of the bark and seed lectins from the Japanese pagoda tree (*Sophora japonica*), *Plant. Mol. Biol.* 33 (1997) 523-536.
6. Loris R., Hamelryck T., Bouckaert J., Wins L., Legume lectin structure, *Biochem. Biophys. Acta* 1383 (1998) 9-36.
7. Merkle R.K., Cummings R.D., Lectin affinity chromatography of glycopeptides *Methods. Enzymol.* 138 (1987) 232-259.
8. Vázquez-Moreno L., Ortega-Nieblas M., Robles-Burgueño M.R., Ramos-Clamont G., Purification of complex carbohydrate specific lectins from *Oneya tesota* seeds using tandem affinity chromatography, *I.J.B.C.* 5 (2000) 83-90.
9. Porras F., Urrea F., Ortiz B., Martínez-Cairo S., Bouquelet S., Martínez G., Lascurain R., Zenteno E., Isolation of the receptor for the *Amaranthus leucocarpus* lectin from human T lymphocytes, *Biochem. Biophys. Acta* 1724 (2005) 155-162.
10. Muroi K., Amemiya Y., Sievers E.L., Miura Y., Hakomori S.E., Loken M.R., Expression of sialosyl-T and disialosyl-T antigens in erythroid cells, *Leuk. Lymphoma.* 25 (1997) 403-414.
11. Tsuboi S., Fukuda M., Roles of O-linked oligosaccharides in immune responses, *BioEssays* 23 (2001) 46-53.
12. Dahlman-Wright K., Wright A., Carlstedt-Duke J., Gustafsson J.A., DNA-binding by the glucocorticoid receptor: a structural and functional analysis, *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* 41 (1992) 249-272.
13. Chen Z., Enhua W., Heat shock protein 90 suppresses tumor necrosis factor alpha induced apoptosis by preventing the cleavage of Bid in NIH3T3 fibroblasts, *Cell. Signal* 16 (2004) 313-321.
14. Martínez-Pomares L., Crocker P.R., Da Silva R., Holmes N., Colominas C., Rudd P., Dwek R., Gordon S., Cell-specific glycoforms of sialoadhesin and CD45 are counter-receptors for the cysteine-rich domain the mannose receptor, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 35211-35218.
15. Ketcham C.M., Baumbach G.A., Bazer F.W., Roberts R.M., The type 5, acid phosphatase from spleen of humans with hairy cell leukemia.

- Purification, properties immunological characterization, and comparison with porcine uteroferrin, *J. Biol. Chem.* 260 (1985) 5768-5776.
16. Wray W., Boulikas T., Wray V.P., Hancock R., Silver staining of proteins in the in polyacrylamide gels, *Anal. Biochem.* 118 (1981) 197-203.
 17. Lowry O.H., Rosenbrough N.J., Lewis F.A., Randall R.J., Protein measurement with the folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.* (1951) 265-275.
 18. Link A.J., Eng J., Schieltz D.M., Carmack E., Mize G.J., Morris D.R., Garvik III B.M., Yates J.R., Direct analysis of protein complexes using mass spectrometry, *Nat. Biotechnol.* 17 (1999) 676-682.
 19. Hofmann K, Titus G, Montibeller JA. Avidin binding of carboxyl-substituted biotin and analogs. *Biochemistry.* 1982; 21: 978-984.
 20. Schorge J.O., Lea J.S., Garner E.O., Duska L.R., Miller D.S., Coleman R. L., Cervical adenocarcinoma survival among Hispanic and white women: A multicenter cohort study, *Am J Obstet Gynecol.* 2003;188:640-4.
 21. Aoki DMD, Shiro NMD, Rihachi IMD, Hayato K, Hiroshi HMD. Differences in lectin binding patterns of normal endometrium and endometrium adenocarcinoma, with special reference to satining with *Ulex europaeus* Agglutinin 1 and peanut Agglutinin. *Gynecologic oncology* 1990; 37: 338-345.
 22. Mather I.H., A review and proposed nomenclature for major proteins of the milk-fat globule membrane, *J. Dairy Sci.* 83 (2000) 203-247.
 23. Jethmalani M.S., Henle J.K., Partial homology of stress glycoprotein GP62 with HSP70, *Exp. Cell. Res.* 232 (1997) 8-16.
 24. De-Petris S., Tackacs B., Relationship between mouse lymphocyte receptors for peanut agglutinin (PNA) and *Helix pomatia* agglutinin (HPA), *Eur. J. Immunol.* 13 (1983) 831– 840.
 25. Fortune F., Lehner T., Phenotypic expression of *Vicia villosa* binding T cell subsets, as markers of contrasuppressor cells in systemic lupus erythematosus, *Clin. Exp. Immunol.* 74 (1998)100– 104.
 26. De-Dios I., Manso M., Leon V., Lopez-Borrasca A., Separation of human lymphocyte subclasses by rosettes with latex-lectin particles, *Biochem. Med. Metab. Biol.* 35 (1986) 12-17.
 27. Wheeler D.S., Wong H.R., Heat shock response and acute lung injury, *Free. Radic. Biol. Med.* 42 (2007) 1–14.
 28. Prohászka Z., Füst G., Immunological aspects of heat-shock proteins-the optimum stress of life. *Mol. Immunol.* 41, (2004) 29–44.
 29. Füst G., Beck Z., Bánhegyi D., Kocsis J., Biró A., Prohászka Z., Antibodies against heat shock proteins and cholesterol in HIV infection, *Mol. Immunol.* 42 (2005) 79–85.
 30. Habich C., Kempe K., Burkart V., Van Der Zee R., Lillicrap M., Gaston H., Kolb H., Identification of the heat shock protein 60 epitope involved in receptor binding on macrophages, *FEBS Lett.* 568 (2004) 65–69.
 31. Welch W. J., The mammalian stress response: Cell physiology and biochemistry of stress proteins, in: Morimoto R.I., Tissières A.,

- Georgopoulos C., stress proteins in biology and medicine (Eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. (1990) 223-278.
32. Fu X., Liu Ch., Liu Y., Feng X., Gu L., Chen X., Chang Z., Small heat shock protein Hsp16.3 modulates its chaperone activity by adjusting the rate of oligomérica dissociation, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 310 (2003) 412–420.
 33. Henle K.J., Jethmalani S.M., Li L., Li G.C., Protein Glycosylation in a heat-resistant rat fibroblast cell model expressing human HSP70, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 232 (1997) 26-32.
 34. Jethmalani S.M., Henle K.J., Interaction of heat stress glycoprotein GP50 with classical heat-shock proteins, *Exp. Cell. Res.* 239 (1997) 8-16.
 35. <http://expasy.org>. www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/ (consults in June of the 2007).
 36. Pastor LM, Morales E, Polo LA, Calvo AI, Pallarés J, and De La Viesca S. Histochemical study of glycoconjugates in active and photoperiodically-regressed testis of hamster (*Mesocricetus auratus*). *Acta Histochem.* 2003; 105:2 165–173.
 37. Youinou P, Hillion S, Jamin Ch, Pers JO, Saraux A, Renaudineau Y. B lymphocytes on the front line of autoimmunity. *Autoimmunity Reviews.* 2006; 5: 215– 221.
 38. Mansour MH, Abdul-Sa F, Tahany AS. Distinct binding patterns of fucose-specific lectins from *Biomphalaria alexandrina* and *Lotus tetragonolobus* to murine lymphocyte subsets. *Immunobiology* 2005; 210: 335–348.

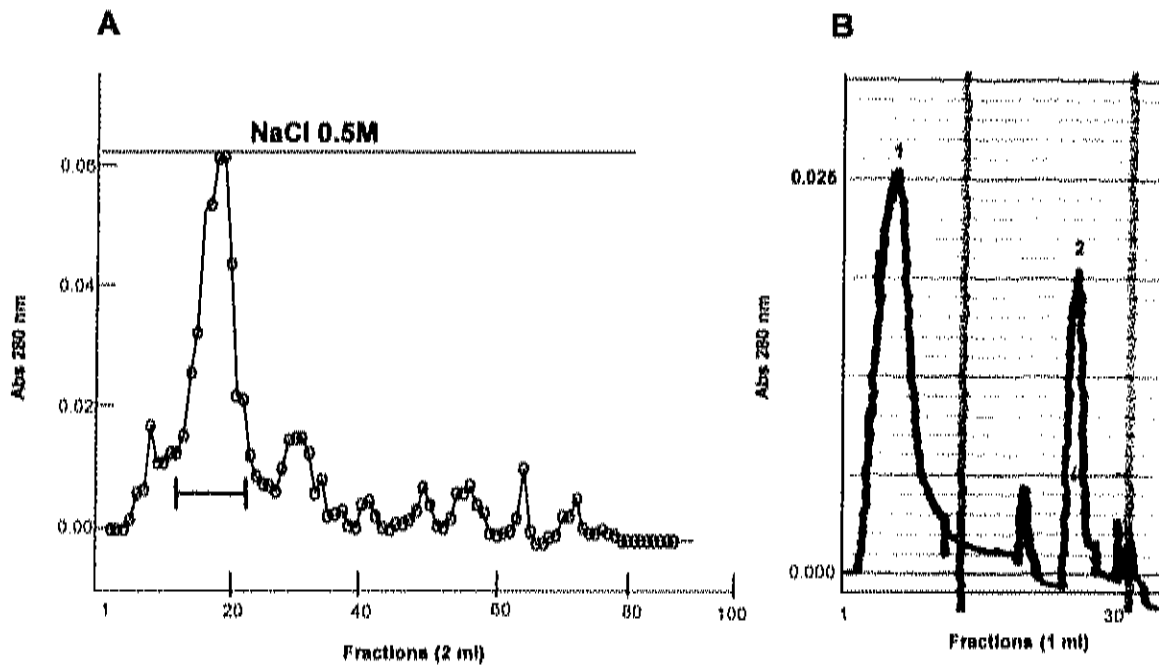


Fig.1 Purification of glycoprotein of spleen tissue by **(A)** ion exchange chromatography in CM-cellulose (isocratic separation) and **(B)** affinity chromatography on (agarose-PF2). In **(A)** proteins bound to CM-cellulose were eluted with PBS pH 7.2 containing 0.5 M NaCl and a main peak was obtained (—). In **(B)** Proteins eluted from CM-cellulose were applied to agarose-PF2 (1) non bound and (2) bound protein. Detection of the optical density of each fraction was at 280 nm.

Table 1. Purification of proteins from spleen by ion exchange and PF2 affinity chromatography.

| Chromatographic step | Applied Protein (mg) | Unadsorbed Protein (mg) | Adsorbed Protein (mg) |
|--|-----------------------------|--------------------------------|------------------------------|
| Ion Exchange Chromatography (CM-cellulose ^a) | 22 ± 0.9 | 18 ± 0.7 | 3.3 ± 0.05 |
| Affinity Chromatography (agarose-PF2 ^b) | 1.1 ± 0.2 | 0.73 ± 0.1 | 0.19 ± 0.03 |

^a 50 ml bed volume.

^b 2 ml bed volume.

[‡] Standard deviation from six runs.

Table II. Amino acid sequences of tryptic peptides generated from GP14 digestion and comparison with amino acid complete sequences of known proteins (HSP70).

| Proteins | Amino acid sequences | |
|---|---------------------------------|---|
| 71 Kd heat shock cognate protein gi/32467/ Heat shock cognate protein 54 gi/11526573/ HSP8 isoform 2 variant gi/62896815/ HSP8 isoform 2 variant gi/62897129/ GP14 (peptides) | 37 37 37 37 37 | TTPSYVAFTDTER TTPSYVAFTDTER TTPSYVAFTDTER TTPSYVAFTDTER TTPSYVAFTDTER ***** |
| | 172 | IINEPTAAAIAYGLDKK IINEPTAAAIAYGLDKK IINEPTAAAIAYGLDKK IINEPTAAAIAYGLDKK IINEPTAAAIAYGLDKK ***** |
| | 188 | IINEPTAAAIAYGLDKK IINEPTAAAIAYGLDKK IINEPTAAAIAYGLDKK IINEPTAAAIAYGLDKK IINEPTAAAIAYGLDKK ***** |
| 71 Kd heat shock cognate protein gi/32467/ Heat shock cognate protein 54 gi/11526573/ HSP8 isoform 2 variant gi/62896815/ HSP8 isoform 2 variant gi/62897129/ GP14 (peptides) | 221 221 221 221 221 | STAGDTHLGGEDFDNR STAGDTHLGGEDFDNR STAGDTHLGGEDFDNR STAGDTHLGGEDFDNR STAGDTHLGGEDFDNR ***** |
| | 300 | ARFEELNADLER ARFEELNADLER ARFEELNADLER ARFEELNADLER ARFEELNADLER ***** |
| | 311 | ARFEELNADLER ARFEELNADLER ARFEELNADLER ARFEELNADLER ARFEELNADLER ***** |
| 71 Kd heat shock cognate protein gi/32467/ Heat shock cognate protein 54 gi/11526573/ HSP8 isoform 2 variant gi/62896815/ HSP8 isoform 2 variant gi/62897129/ GP14 (peptides) | 326 326 326 326 326 | LDKSQIHDIIVLWGGSTR LDKSQIHDIIVLWGGSTR LDKSQIHDIIVLWGGSTR LDKSQIHDIIVLWGGSTR LDKSQIHDIIVLWGGSTR ***** |
| | 342 | LDKSQIHDIIVLWGGSTR LDKSQIHDIIVLWGGSTR LDKSQIHDIIVLWGGSTR LDKSQIHDIIVLWGGSTR LDKSQIHDIIVLWGGSTR ***** |
| | 349 | LLQDFNCKELNK LLQDFNCKELNK LLQDFNCKELNK LLQDFNCKELNK LLQDFNCKELNK ***** |
| | 361 | LLQDFNCKELNK LLQDFNCKELNK LLQDFNCKELNK LLQDFNCKELNK LLQDFNCKELNK ***** |

GP14 is a 14-kDa glycoprotein obtained from spleen tissue

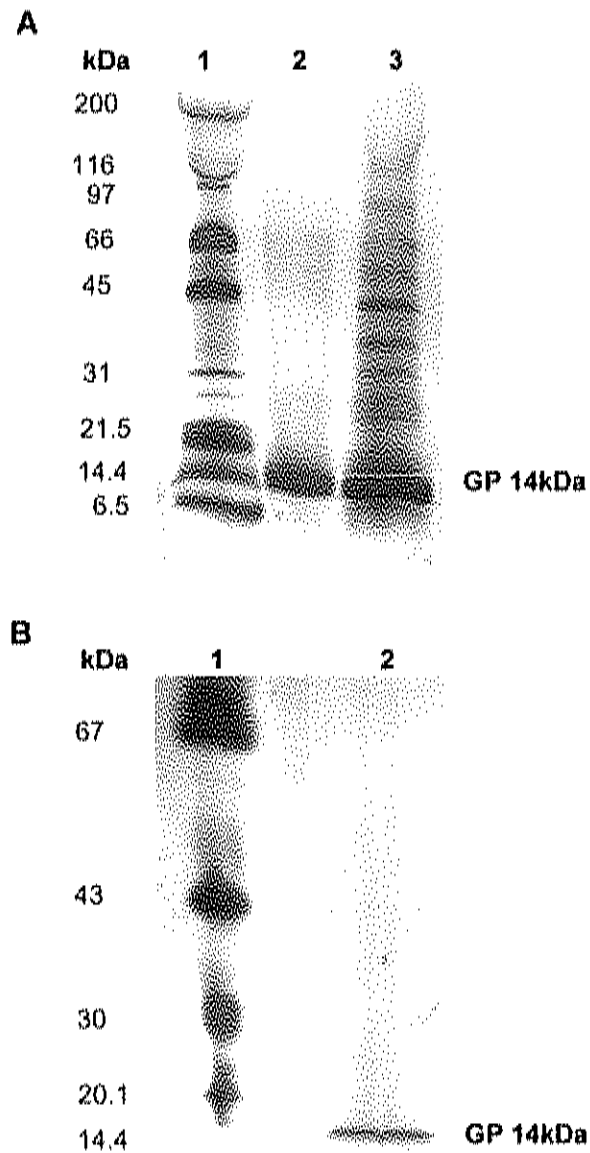


Fig. 2. Polyacrylamide gels electrophoresis. **(A)** SDS-PAGE analysis of glycoproteins fractions obtained by affinity chromatography. (1) MW standards, (2) elution fraction from agarose-PF2 chromatography and (3) crude extract from splenic tissue. **(B)** PAGE of glycoproteins (1) MW standard, (2) fraction eluted from agarose-PF2 chromatography. Both gels were silver stained.

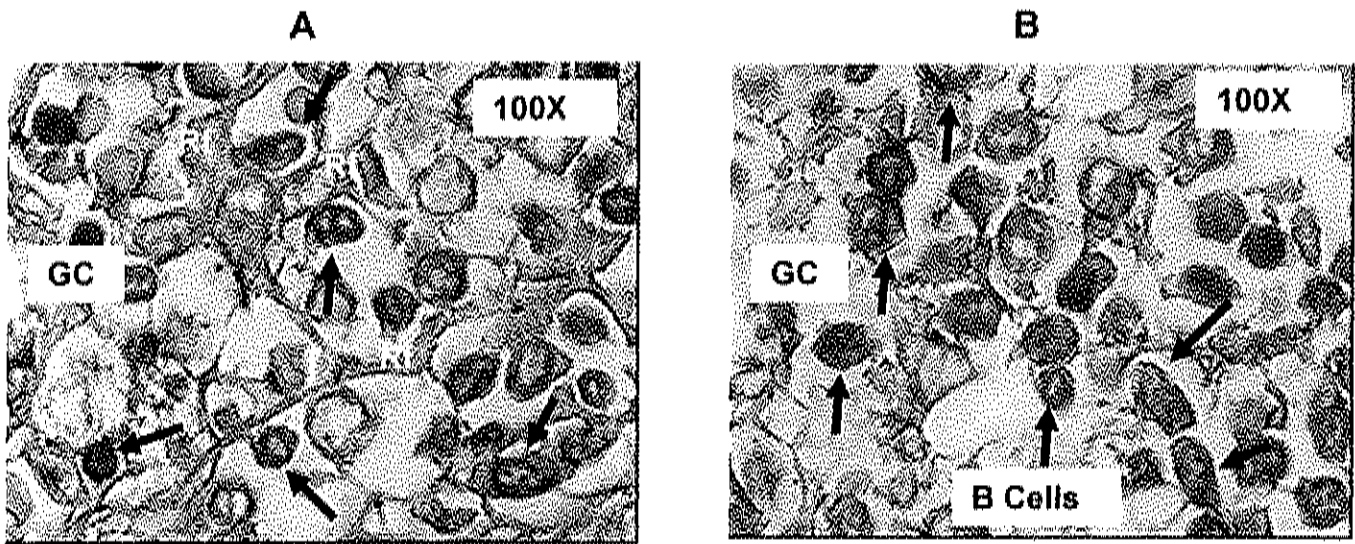


Fig. 3. Light microphotographs of spleen (lymphoid tissue) sections processed with PF2 lectin (A) and anti-CD20 immunohistochemistry (B), were stained an intense way on areas that are located in the germinal centers and lymphoid follicles. Reticular fibers (Rf)

Identification of a *N*-linked Oligosaccharide Recognized by PF2 Lectin in Glycoproteins from Lymphoid Tissues by Liquid Chromatography–Mass Spectrometry

Gabriel Urbano-Hernández^a, Guillermo López-Cervantes^b, Maria del Refugio Robles-Burgueño^a, Luz Vázquez-Moreno^{a*}

^a Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Apartado Postal 1735. Hermosillo Sonora, México.

^b Departamento de Patología, Hospital Infantil del Estado de Sonora. Hermosillo, Sonora, México.

* Author whom correspondence should be sent. Luz Vázquez Moreno, PhD. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. P.O. BOX 1735, Hermosillo 83000, Sonora, México. Tel/Fax: +52 (662) 2 80 00 58, e-mail: lvazquez@cascabel.ciad.mx

Running title: complex oligosaccharide characterization

Abstract

PF2 is a lectin from *Olneya tesota* (palo fierro) seeds that presents high affinity only towards complex carbohydrates. Immobilized fetuin is been used to purify PF2. The goal of this study was to identify and characterize the oligosaccharide from fetuin and glycoproteins of spleen and thymus tissues recognized by PF2. The oligosaccharides from these glycoproteins were released by an enzymatic method (PNGaseF) and purified by using Agarose-PF2 column.

The method involved the separation and characterization of oligosaccharides by lectin affinity chromatography combined with LC-ESI-MS, the analysis in the negative ion mode. The mass spectra were analyzed in www.glycosciences.de/tools/GlycoFragments/fragment. Mass spectrometry of oligosaccharides obtained from fetuin (control glycoprotein) showed the presence of two ions that correspond to $[M-3H]^{3-}$ ions and $[M-4H]^{4-}$ ions of an oligosaccharide tetrasialylated triantennary with mass of 3171.84.

On another hand, the oligosaccharides of glycoprotein of spleen and thymus, that interacts with PF2, presented identical ions that the observed in the mass spectra of for the oligosaccharide of fetuin. The mass spectra obtained of oligosaccharides from tissues confirmed that PF2 lectin recognized a tetrasialylated triantennary complex type oligosaccharide present in fetuin and in glycoproteins from spleen and thymus.

Keywords: PF2 lectin; glycoproteins; liquid chromatography-mass spectrometry.

1. Introduction

The glycosylation is one of the most frequent post-translational modifications of proteins (1-3), influences the biological functions (4), as well as the physicochemical properties of proteins, i.e., folding, solubility, aggregation, and stability in many proteins (5-7).

Structural analyses of the carbohydrates of glycoproteins have been performed by using carbohydrates released from glycoproteins chemical or enzymatically (8-11). In particular, graphitized carbon column liquid chromatography-mass spectrometry (GCC-LC-MS) is very useful for the separation, analysis and fragmentation can be done in one-step of carbohydrates in glycoproteins (12).

In recent years, a large number of methods for analysis and identification of oligosaccharides has reached a high degree of development to elucidate glycoconjugate structures (13, 14). One of the most effective techniques for determining the site-specific carbohydrate heterogeneity of glycoproteins is the mass spectrometric (15, 16). Consequently, the combination of MS with high performance liquid chromatography (HPLC) using an electrospray (ESI) interface has become invaluable for obtaining total glycan profiles from glycoproteins (17, 18). The ESI is not very used due to the multistage generation, so that the interpretation of the spectra of masses is hindered by a reason it is used MALDI.

Other method utilized for characterizing carbohydrates, is affinity chromatography with immobilized lectins (19, 20), which can be compatible and combined with LC-ESI-MS.

Lectins are carbohydrate-binding proteins with a principal function in the recognition of carbohydrates present at cell surfaces (21, 22). Particularly *Onyia tesofa* legume seed have a lectin called PF2 that present four subunits of 33 kDa. This lectin is specifically inhibited by complex carbohydrates of glycoproteins as fetuin, ovoalbumin and mucine but not by simple sugars (23). Fetuin is a glycoprotein with a mass about 68 kDa that is has been widely studied and it has been utilized as a model glycoprotein. Its use with different methods permits to purify and to identify oligosaccharides structure (24, 25). Fetuin has six carbohydrate chains, three O-linked and three N-linked to complex-type oligosaccharide chains (26, 27).

Other lectins have the ability to recognize complex oligosaccharides in human cells, for example, PHA-E recognizes bisected, bi and triantennary oligosaccharides, PHA-L triantennary and tetraantennary oligosaccharides (28), but the specificity of PF2 lectin toward human carbohydrates has not been determined. Lectin affinity chromatography was combined with LC-ESI-MS to identify and characterized a N-linked oligosaccharide recognized by PF2 lectin of fetuin and glycoproteins of lymphoid tissues.

2. Materials and Methods

Fetuin was purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA). Enzymatic deglycosylation kit was purchase from PROzyme (San Leandro CA, USA). Carbograph Columns were from Alltech (Deerfield, IL, USA). Hypercarb column was from (Thermoelectron Co. USA). The water used was obtained from a Milli-Q water system (Millipore, Bedford, MA, USA). All other chemicals used were of the highest purity available.

2.1. Reduction and S-carboxymethylation of fetuin and glycoproteins

Protein isolation from spleen and thymus was according to Martínez-Pomares *et al.*, (29) and Ketcham *et al.*, (30) and glycoprotein purification by affinity chromatography agarose–PF2 according to Vazquez-Moreno *et al.*, (23). Desalted and lyophilized fetuin and glycoproteins a stock solution of 1 µg/µl, a 360 µg of glycoproteins were dissolved in 360 µl of 0.5 M de Tris-HCl buffer, pH 8.6, containing 8M guanidine hydrochloride and 5 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA). After addition of 2.6 µl of 2-mercaptoethanol, the mixture was allowed to stand at room temperature for 2 h. To this solution, 7.56 mg of monoiodoacetic acid was added, and incubation continues for 2 h in the dark. The reaction mixture was dialyzed and lyophilized until further use (5).

2.2. Preparation of N-linked oligosaccharide alditols.

Fetuin and glycoproteins of tissues (100 µg) were deglycosylated according manufacture PROzyme. Protein was precipitated with 1 000 µl of cold ethanol and the supernatant was dried. The oligosaccharides were dissolved in 1 000 µl of water. To the oligosaccharide solution, 1 000 ul of 0.5 M NaBH₄ was added, and the mixture was incubated at room temperature for 2 h. Diluted acetic acid (100 µl) was added to the mixture to decompose excess NaBH₄ and to adjust the pH to 7.0. The reaction mixture was applied to a clean carbograph column for desalting. Oligosaccharide alditols (borohydride-reduced oligosaccharides) were eluted with 30 % acetonitrile containing 5 mM ammonium acetate. The eluate was lyophilized and maintained -20 °C until further use.

2.3. Isolation of oligosaccharides recognized by PF2

Purification process of oligosaccharides from lymphoid tissues and fetuin was made using affinity chromatography with PF2 lectin immobilized in agarose. The oligosaccharides were dissolved in PBS (10 ml pH 7.2) and loaded to this column. Non-recognized oligosaccharides were removed from the column with PBS pH 7.2. Elution fraction was obtained using formic acid 1% pH 3.0. The recognized oligosaccharides were applied to a clean carbograph column for desalting. Oligosaccharide alditols were eluted with 30% acetonitrile containing 5 mM ammonium acetate and the sample was freeze-dried. Samples were dissolved in 5 mM ammonium acetate, pH 9.6 containing 2% acetonitrile for them to be analyzed by LC-MS.

2.4. HPLC Separation of N-oligosaccharides alditols

Aliquots (10 μ l/equivalent to 1–10 μ g glycoprotein) were injected into 5 μ m, 100 X 2.1 mm column packed with graphitized carbon particles (Hypercarb) (Thermoelectron Co. USA). HPLC was carried out using an Agilent 1100 series HPLC system. Eluents were 5 mM ammonium acetate, pH 9.6 containing 2% acetonitrile (pump A); and 5 mM Ammonium acetate, pH 9.6 containing 80% acetonitrile (pump B). The oligosaccharides alditols eluted at a flow-rate of 50 μ l/min with a gradient of 18-38 % of pump B for 40 min. The effluent was monitored at 206 nm.

2.5. Electrospray ionization MS of oligosaccharide alditols

Mass spectra were obtained on LC Agilent 1100 series connected to ion Trap XL mass spectrometer equipped with an electrospray ion source (ESI Agilent). The ionization parameter were negative mode, full scan m/z 100-2200, the ESI voltage was set at 2000 V, and the capillary temperature was set at 325°C. The pressure of the sheath gas was 15 p.s.i. Dry gas nitrogen flow-rate of 8 L/min.

3. Results and Discussion

Lectins are valuable tools for biochemical studies such as glycan purification and identification. Lectins have become a strong tool for glycoproteomics, however it is important to define the fine structure they recognize. Although (*Phaseolus vulgaris* lectin (PHA) recognizes complex carbohydrates, PHA isolectins specificity varies, i.e., PHA-E recognizes bisected, bi-antennary oligosaccharides while PHA-L tetra-antennary oligosaccharides (31-33). Moreover, it is well documented that PF2 lectin has high affinity toward complex carbohydrates present in fetuin it is not inhibited by simple sugars (22). Additionally, PF2 presented affinity to structures of glycoconjugates present in spleen and thymus tissues (Manuscript in preparation).

In order to achieve the complete characterization of complex type N-linked oligosaccharides from glycoproteins (lymphoid tissues) and fetuin, the oligosaccharides were released with PNGaseF treatment. Deglycosylation was confirmed by a faster mobility of glycoproteins in SDS-PAGE (data not shown).

Oligosaccharides from fetuin and tissues glycoproteins were reduced to alditols with NaBH₄, loaded to a Agarose-PF2 column. Elution fraction was obtained using formic acid 1 % pH 3.0. The recognized oligosaccharides were applied to clean Carbohydrate column for desalting (3, 12). Oligosaccharides alditols eluted with 30 % acetonitrile containing 5 mM ammonium acetate, pH 9.6 containing 2 % acetonitrile. The sugar mapping of alditols was conducted by

LC/MS with graphitized carbon column (GCC), in the ion negative mode using acetonitrile-ammonium acetate as an eluent. This method was possible to elucidate the structure in a single analysis. The negative-ion mode provides high sensitivity in negatively charged oligosaccharides (sialylated oligosaccharides) and for neutral oligosaccharides than the positive-ion mode (7). Figure 1, shows mass-spectra of N-linked oligosaccharides alditols from fetuin (Fig 1A), spleen and thymus (Fig 1B and C), which were separated with gradient of 18-38 % of 5 mM ammonium acetate, pH 9.6 containing 80% acetonitrile in of 40 min.

The mass spectra of oligosaccharides of fetuin showed two peaks marked as (a) and (b) (Fig 1A). The m/z value most abundant ion was at 792.1 (peak a) that corresponded to $[M-4H]^{4-}$ and the less abundant ion was at 1056.3 (peak b) that corresponded to $[M-3H]^{3-}$ of oligosaccharide with mass 3171.8 (Table 1). These ions are identical to sialylated ions from fetuin NeuAc₄Hex₆HexNAc reported by Karlsson *et al.*, (3), Itoh *et al.*, (12) and Green *et al.*, (24). Thus, PF2 lectin recognized an oligosaccharide triantennary tetrasialylated of fetuin with mass of 3171.84.

On the hand, the fragments originated from oligosaccharides of glycoproteins of spleen and thymus (Fig. 1B and C) compared and analyzed in www.glycosciences.de/tools/GlycoFragments/fragment, and generated by HPLC-ESI-MS, both presented similarity to them reported in the Figure 1A. In spleen, the oligosaccharides m/z value most abundant ion was at 792.1 charged -4H (peak a) and the less abundant ion was at 1056.3 charged -3H (peak b). While in thymus, the most abundant ion is 1056.3 m/z and the less abundant ion

was at 792.8 m/z that correspond with charge $-3H$ and $-4H$ respectively (Table 1). Moreover this figures shows singly charged fragments $(M-H)^-$ ions at m/z 847.28, 947 and 1034.8 corresponded to $Hex_2HexNAc_4$ and $Hex_4HexNAc_4$ respectively, they consists of structures of six to eight monosaccharide units as GlcNAc, Man and Gal. Then, according to the ions obtained from tissues and their fragments charged $(M-H)^-$ corresponded to structures founded in fetuin (3). The mass spectra result suggests that in spleen and thymus exist glycoproteins with N-oligosaccharide tetrasialylated triantennary.

Conclusion

In this study, a complex oligosaccharide was purified from glycoproteins of spleen and thymus cells using PF2 lectin and bovine fetuin was used as a model glycoprotein. The LC-ESI-MS analyses showed the structure of this complex oligosaccharide that corresponds to an N-glycan tetrasialylated triantennary.

REFERENCES

1. S. Itoh, N. Kawasaki, N. Hashii, A. Harazono, Y. Matsuishi, T. Hayakawa, T. Kawanishi, *J. Chromatogr. A* 1103 (2006) 296–306.
2. W. Morelle, A. Page and J.C. Michalski, *Rapid Commun. Mass. Spectrom.* 19 (2005) 1145–1158.
3. N.G. Karlsson and N.H. Packer, *Anal. Biochem.* 305 (2002) 173–185.
4. M. Hyuga, S. Itoh, N. Kawasaki, M. Ohta, A. Ishii, S. Hyuga, T. Hayakawa, *Biologicals*, 32 (2004) 70-77.
5. S. Itoh, N. Kawasaki, M. Ohta, T. Hayakawa, *J. Chromatogr. A* 978 (2002) 141–152
6. J. Charlwood, J. Mark Skehel, and P. Camilleri, *Anal. Biochem.* 284 (2000) 49–59.
7. N. Kawasaki, M. Ohta, S. Hyuga, M. Hyuga, and T. Hayakawa, *Anal. Biochem.* 285 (2000) 82–91.
8. N. Kawasaki, M. Ohta, S. Itoh, M. Hyuga, S. Hyuga and T. Hayakawa, *Biologicals* 30 (2002) 113–123.
9. M. Ohta, N. Kawasaki, S. Hyuga, M. Hyuga, T. Hayakawa, *J. Chromatogr. A* 910 (2001) 1–11.
10. S. F. Wheeler and D. J. Harvey, *Anal. Biochem.* 296 (2001) 92–100.
11. M. Wührer, C. A.M. Koeleman, C. H. Hokke, A. M. Deelder, *Int. J. Mass. Spectrom.* 232 (2004) 51–57.
12. N. Kawasaki, M. Ohta, S. Hyuga, O. Hashimoto, and T. Hayakawa *Anal. Biochem.* 269 (1999) 297–303.
13. E. Lattova, H. Perreault, *J. Chromatogr. B* 793 (2003) 167–179.
14. A. Harazono, N. Kawasaki, S. Itoh, N. Hashii, A. Ishii-Watabe, T. Kawanishi, T. Hayakawa, *Anal. Biochem.* 348 (2006) 259–268.
15. E. Lattova, and H. Perreault, O. Krokhin, *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.* 15 (2004) 725–735.
16. S. Itoh, N. Kawasaki, A. Harazono, N. Hashii, Y. Matsuishi, T. Kawanishi, T. Hayakawa, *J. Chromatogr. A* 1094 (2005) 105–117.
17. Y. Satomi, Y. Shimonishi, T. Takao, *FEBS Lett.* 576 (2004) 51–56.
18. E. Lattova, H. Perreault, *J. Chromatogr. A* 1016 (2003) 71–87.
19. K.F. Medzihradzsky, *Methods. Enzymol.* 405 (2005) 116-138
20. K. Higai, Y. Azuma, Y. Aoki, K. Matsumoto, *Clin. Chim. Acta.* 329 (2003) 117–125
21. C.H. Grün, S.J. van Vliet, E.C.M. M.C. Wietske, C. Schiphorst, Bank, S. Meyer, I. van Die, Y. van Kooyk, *Anal. Biochem.* xxx (2006) xxx–xxx
22. L. Vázquez-Moreno, M. Ortega-Nieblas, M.R. Robles-Burgueño, G. Ramos-Clamont, *I.J.B.C.* 5 (2000) 83-90.
23. C.J.P. Jones, C. Cateni, F.M. Guarino, and L.R. Paulesu, Glycosylation of the Materno-foetal Interface in the Pregnant Viviparous Placentotrophic Lizard *Chalcides chalcides*: a Lectin Histochemical Study. *Placenta* 24 (2003) 489–500.
24. L. Martínez-Pomares, P.R. Crocker, R. Da Silva, N. Holmes, C.

- Colominas, P. Rudd, R. Dwek, and S. Gordon, Cell-specific Glycoforms of sialoadhesin and CD45 are Counter-receptors for the Cysteine-rich Domain the Mannose Receptor, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 35211-35218.
25. C.M. Ketcham, G. A. Baumbach, F.W. Bazer and R.M. Roberts. The type 5, Acid Phosphatase from Spleen of Humans with Hairy Cell Leukemia. *J. Biol. Chem.* 260 (1985) 5768-5776
- 26. H. Lis and N. Sharon, *Biol. Carbohydr.* 2, (1984) 1.**
27. R. D. Cummings and S. Kornfeld, *J. Biol. Chem.* 257, (1982) 11235.
28. R.K. Merkle and R. D. Cummings. *Methods. Enzymol.* 138 (1987).
29. S. Itoh, N. Kawasaki, M. Ohta, M. Hyuga, S. Hyuga, T. Hayakawa, *J. Chromatogr. A* 968 (2002) 89–100
30. E.D. Green, G. Adet, J.U. Baenziger, S. Wilson, H. Van Halbeek, *J. Biol. Chem.* 263 (1988) 18253.

Table I. Theoretical masses and observed *m/z* values and structure of the oligosaccharide and fragments observed.

Ions of fetuin

| Molecular mass (Da) | | Proposed composition | Structure N-linked |
|---|--------------------------------------|--|-----------------------|
| (M-xH) ^{x-} _{obs} | (M-xH) ^{x-} _{calc} | | |
| 791.98 (4-) 1056.33 (3-) | 792.1 1056.3 | NeuAc₁Hex₆HexNAc₃ | |
| Ions and some of their fragments from lymphoid tissues | | | |
| 791.98 (4-) 1056.33 (3-) | 792.8 1056.3 | NeuAc₁Hex₆HexNAc₃ | |
| 803.2569 805.2726 | 803.0 805.2 | Hex₂HexNAc₃ A _{4,4,3,2} ⁺ H- A _{4,4,0} ⁺ H- | |
| 847.0 (1-) 847.7 (1-) | 847 | Hex₂HexNAc₃ A _{4,4,3,2} ⁺ H- | |
| 946 (1-) 947 (1-) 1033.4 (1-) 1034.8 (1-) | 948 1035 | Hex₃HexNAc₃ B _{4,4,3,2} ⁺ H- B _{4,4,3,2} ⁺ H- | |

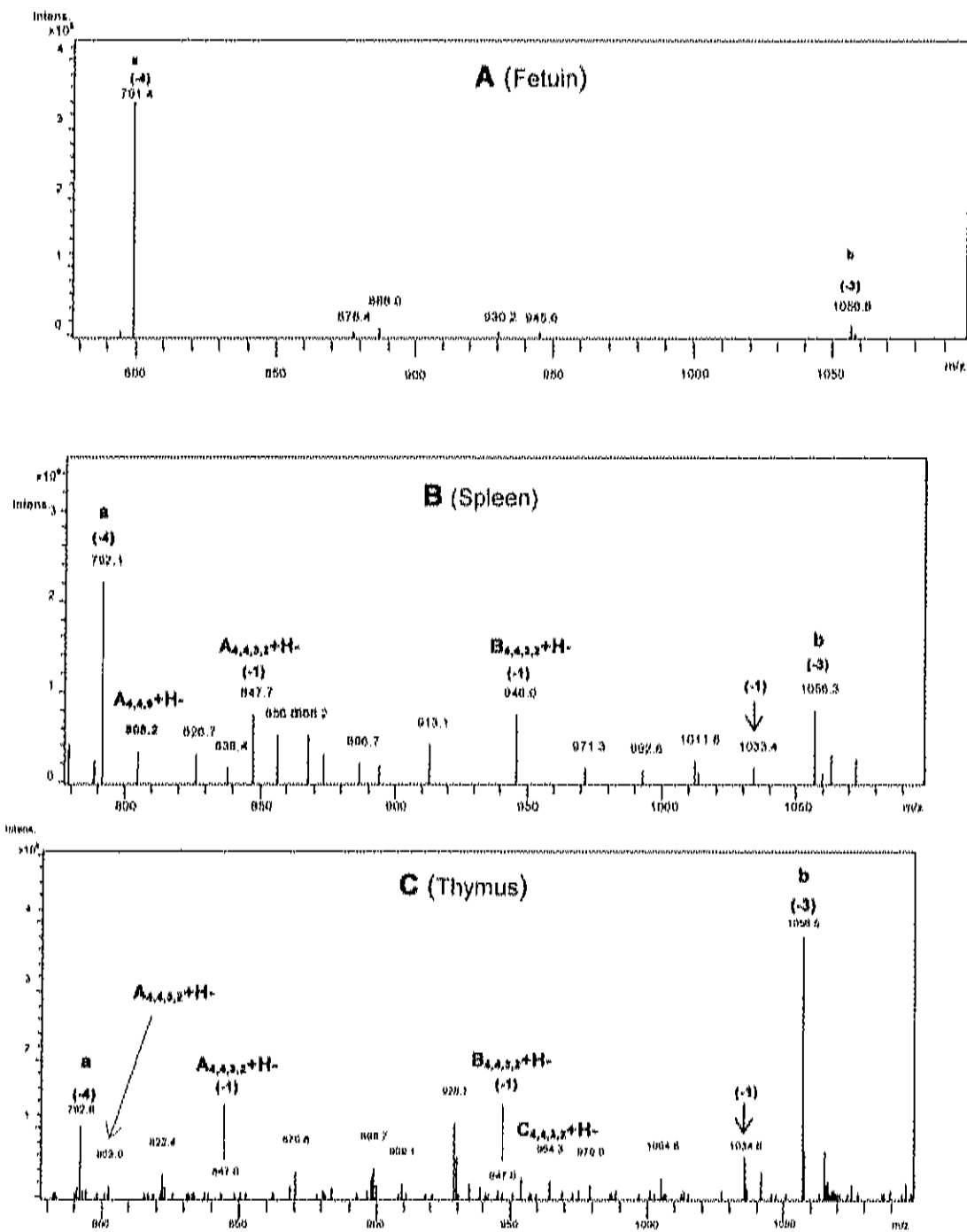


Figure 1. Negative ion mass spectrometry of N-linked oligosaccharide alditol released by PNGase-F from bovine fetuin (A), spleen (B) and thymus (C). Number in parentheses refers to charge state.

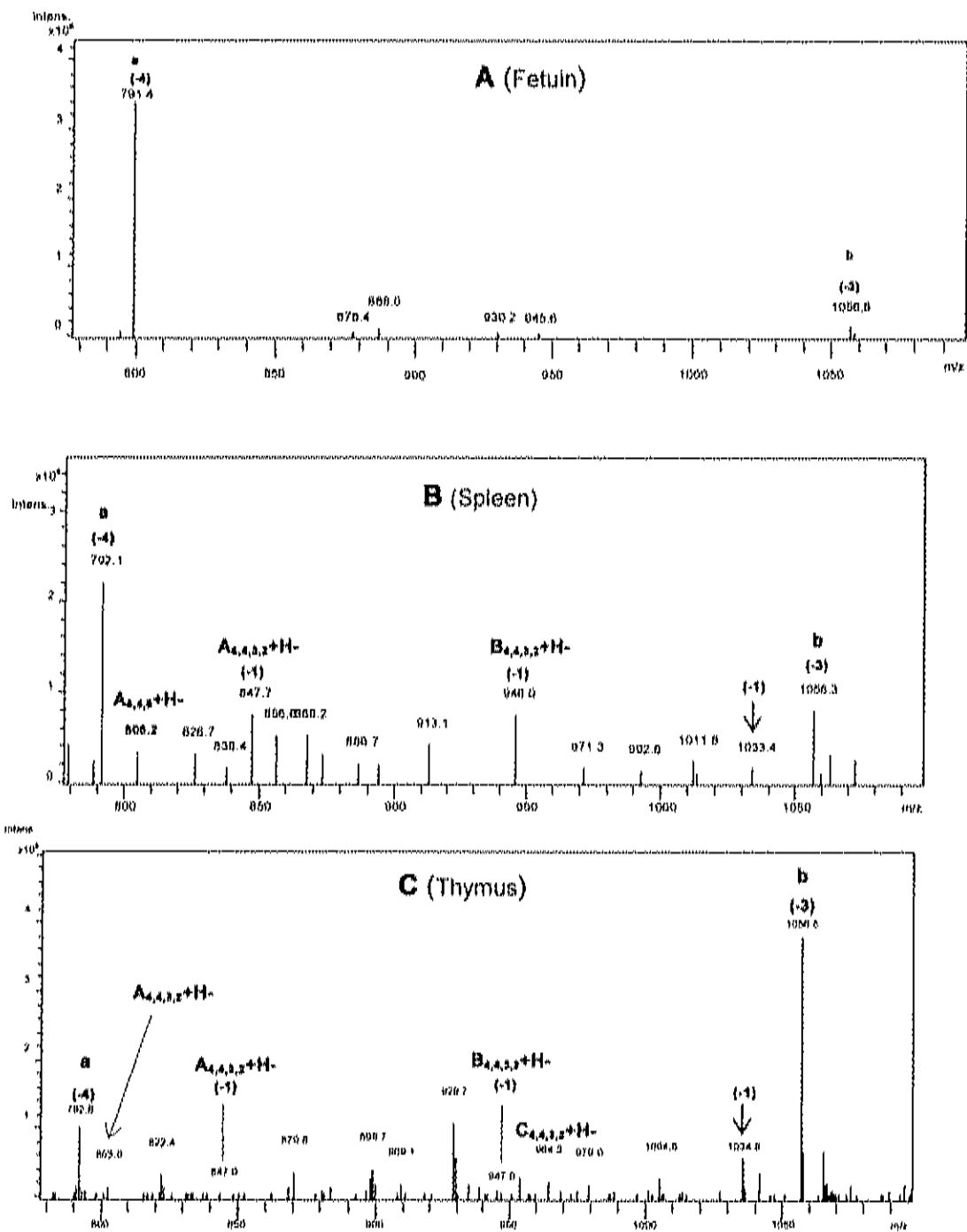


Figure 1. Negative ion mass spectrometry of N-linked oligosaccharide alditol released by PNGase-F from bovine fetuin (A), spleen (B) and thymus (C). Number in parentheses refers to charge state.