

Analisis proteomico de la subunidad LsL1 de la lectina del Camaron Blanco del Golfo de México *Litopenaeus setiferus*.

Proteomic analysis of LsL1 subunit of one lectin from shrimp *Litopenaeus setiferus*.

Alpuche-Osorno, J^{a,b}, Pereyra, M^a, Vazquez, L^c, Agundis, C^a, Rosas, C^d, Zenteno, E^a. ^{a a}
Laboratorio de Inmunología, Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, ^b
Alumno del Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología, ^cLaboratorio de lectinas CIQ,
UAEM. ^dLaboratorio de Ecología y Biología Marina Experimental, Fac. de Ciencias UNAM,
04510 México, DF. Apdo. postal 70-159

Ver curriculum y contactar en <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/alpuche>



RESUMEN

Se purificó por filtración en Sephacryl S-300 una subunidad de 84 kDa de la lectina de *L. setiferus* (*LsL1*), específica para azúcares N-acetilados. Por dicroísmo circular se encontró que *LsL1* contiene en su estructura secundaria 49% de hojas plegadas beta y 6.9% de alfa hélices. La secuencia de aminoácidos de la subunidad *LsL1* se determinó por MALDI-TOF a partir de péptidos trípticos. Comparando los valores con la base de datos NCBI (Swiss-Prot 2003/08/06), esta subunidad mostró 23% de similitud con el precursor hemocianina, proteína responsable de la respiración en crustáceos, que a su vez ha sido relacionada con la generación de péptidos de defensa; al alinear el péptido con otras proteínas involucradas con la defensa en crustáceos muestran una similitud del 80% con hemocianina, y profenoloxidasas, por lo que podemos asumir que las lectinas de esta especie participan en procesos de defensa.

Abstract

By filtration in a column of Sephacryl S-300 was purified a subunit of 84 kDa of the lectin of *L. setiferus* (*LsL1*), specific for N-acetylated sugars. By Circular dichroism we found that *LsL1* in its secondary structure contains 49% of sheet beta and 6.9% of alfa helix. The sequence of amino acids of the subunit *LsL1* were assayed from triptic peptides by MALDI-TOF and they had a rank of mass from 768.36 to 3379.76 m/z. Comparing these data with relative values obtained of the database NCBI (Swiss-Prot 2003/08/06), this protein showed 23% of homology with a precursor of the responsible protein for the respiration in crustaceans, the one that besides has related to the generation of defense peptides. Alignments with other proteins related to mechanisms of defense in crustaceans indicate a homology of the 80% with similar proteins to the hemocyanin, and the profenoloxidase. We can assume that functionally lectins of this species participate actively in processes of defense.

Key words: *Litopenaeus setiferus*, Lectin, MALDI TOF, Circular dichroism, Defense mechanism.

Introducción

Las lectinas son proteínas de amplia distribución en todos los reinos de la naturaleza, con la capacidad de reconocer en forma específica una gran variedad de carbohidratos. Algunos microorganismos, como bacterias Gram negativas, poseen en su pared celular carbohidratos que pueden ser reconocidos por lectinas e inducir su aglutinación, igualmente pueden dirigir algunos eventos celulares como la fagocitosis (Bayne, 1990). También se considera que las lectinas funcionan como opsoninas lo que permite a grupos celulares (hemocitos) fagocitar a algunos microorganismos que son reconocidos tanto por la lectina (Vasta, 1992). Se ha identificado la presencia de lectina en la hemolinfa de prácticamente todas las especies de crustáceos decápodos estudiadas, tanto en las membranas de hemocitos como en las de gránulos citoplasmáticos, con características estructurales y especificidad idéntica a la de las lectinas séricas, por lo que se asume que las lectinas son sintetizadas por los hemocitos y liberadas posteriormente al hemocele (Sierra et al, 1998); de tal suerte que proponemos que las lectinas de membrana participan en el reconocimiento a lo extraño como mediadora en eventos de cooperación celular, mientras que la lectina soluble podría participar en el transporte de carbohidratos (Mullainadhan y Renwranz, 1986; Vázquez et al., 1997b., Agundis et al, 2000, Zenteno et al 2004).

La proteómica es una ciencia nueva, se define como un área de la Biología cuyo objetivo fundamental es el estudio de los proteomas. Un proteoma es el conjunto de proteínas expresadas por una parte del genoma. La proteómica proporciona herramientas muy poderosas para el estudio a gran escala de la función de los genes a nivel de proteína. La importancia de este análisis es su habilidad para estudiar modificaciones post-transcripcionales y post-traduccionales de las proteínas. En este análisis, la parte medular es el estudio de la secuencia de aminoácidos de las proteínas por espectrofotometría de masas, los datos que se obtienen se comparan con bases de datos de proteínas disponibles en internet, y a merced de esas comparaciones se determinan homologías, con otras proteínas. Mediante el empleo de complicados algoritmos matemáticos y utilizando homologías de estructuras primarias se puede proponer una estructura secundaria e incluso terciaria de las proteínas problema.

Material y métodos

Se utilizaron organismos adultos de *Litopenaeus setiferus* obtenidos de estanques circulares de 20 Ton., mantenidos bajo condiciones controladas en el Laboratorio de Biología Marina Experimental de la Facultad de Ciencias de la UNAM, sede Ciudad del Carmen, Campeche.

Extracción y purificación de la lectina

La hemolinfa fue extraída directamente del seno pericardial del camarón en la base del primer segmento abdominal permitiéndose la coagulación durante 16-24 hrs. a 4 °C. La hemolinfa se separó del coágulo por centrifugación a 16,000 x g, 10 min a 4°C., posteriormente, la hemolinfa se dializó contra agua y se mantuvo en congelación a -70 °C en pequeñas alícuotas, hasta su uso posterior.

Para la purificación de la lectina, el suero se aplicó a una columna de filtración de Sephacryl S-300 (Pharmacia, Upsala, Suecia); a un flujo de 10 ml/h y una presión máxima de 4 bars en un sistema de FPLC, como fase móvil se usó SS (NaCl 0.9%). Se colectaron fracciones de 1 ml, a cada una se le determinó DO a 280 nm y actividad aglutinante en presencia de eritrocitos de conejo al 2% (p/v) en SS.

Determinación de proteína.

La concentración de proteína de la lectina fue determinada por el método de Bradford (1976) empleando albúmina sérica bovina (BSA) como estándar.

Determinación del peso molecular de la lectina (SDS PAGE)

El peso molecular y el grado de pureza de la lectina obtenida se evaluaron por electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) de acuerdo al método descrito por Laemmli (1970), se utilizaron geles de poliacrilamida al 10% en condiciones reductoras. Las muestras conteniendo entre 10 a 75 µg/ml se diluyeron 1:2 en amortiguador de muestra (Tris-HCl 75 mM, glicerol 10%, SDS 2%, □ mercaptoetanol 0.2%, azul de bromofenol 0.001%, pH 8.8). La muestra se sometió a ebullición en baño seco por 10 min. Se emplearon estándares de peso molecular conocido, con un rango de 6.5 a 103 kDa (Sigma Ch. Co). La migración electroforética se realizó aplicando un voltaje constante de 100V, en amortiguador de corrida (Tris 0.025 M, glicina 0.192M, y SDS 0.1%, pH 8.3). Se calcularon los Rf de los estándares con la fórmula: $R_f = \text{distancia de migración de la proteína} / \text{distancia de migración del colorante}$, se construyó una gráfica estándar. Los pesos moleculares de las lectinas purificadas se calcularon en la gráfica de PM vs. Rf, interpolando los valores de Rf.

Determinación de la estructura primaria de la lectina por MALDI

La secuencia de aminoácidos de LsL se determinó por MALDI-TOF en péptidos obtenidos por digestión con tripsina. Después de la electroforésis, las bandas conteniendo las fracciones proteicas, fueron separadas del gel y digeridas con 0.05 mg de tripsina en 500 μ l de bicarbonato de amonio, pH 8.0 a 37°C durante 24 horas. El efecto de la tripsina se inhibió manteniendo la mezcla a 2°C por 4 horas. La mezcla lectina-enzima digerida se secó por evaporación en un Gyrovap (Howe, Londres). Las muestras fueron preparadas mezclando directamente en el blanco 1 μ l de los productos de reacción (50 pM) y 1 μ l de una matriz de ácido 2,5-dihidroxibenzoico (12 mg/ml en carbonatos), y al cabo de unas horas a temperatura ambiente la mezcla se cristaliza. Los iones positivos de los péptidos se analizaron por MALDI TOF, en un espectrofotómetro de masas Vision 2000 (Finnigan MAT Bremen, Germany) equipado con un lector UV a 337 nm. Los espectros de masa se midieron en un reflectrón bajo 8 keV voltaje de aceleración y detección positiva. Como control se utilizó Tripsina para identificar los péptidos libres y Angiotensin como estándar (Mr 296.7) (Helman et al., 1995). Las masas de los iones fueron comparadas con la base de datos de NCBIInr (Profound 2003/08/06).

Estructura secundaria por dicroísmo circular

Las muestras se sometieron a análisis de dicroísmo circular, el cual se llevó a cabo en el espectropolarímetro JASCO J-700 del Depto. de Bioquímica del Instituto de Química, UNAM, México. Se usaron 300 μ g de LsL/ml en amortiguador de fosfatos (PB, 0.01 M, pH 7.2); se uso una celda de cuarzo de 5mm de paso de luz y el rango de scanner fue 180 - 240 nm. Para calcular el porcentaje de estructuras secundarias se uso el programa Devcomvolution.

Análisis por computadora

La secuencia de aminoácidos de la lectina fue obtenida a partir de la homología de los péptidos, con la hemocianina. La secuencia de aminoácidos se sometió a varios análisis para determinar la homología que presente con otras proteínas de la hemolinfa de camarones, estas secuencias se alinearon usando el programa ClustalW (<http://us.expasy.org/>). Los resultados se muestran en gráficas, organizadas por secuencias con mayor similitud.

Resultados

La lectina de adultos de *Litopenaeus setiferus* se purifico por filtración en gel en una columna de Sephacryl S-300, ver figura 1 se colectaron 140 fracciones. Solamente una fracción, con un contenido de proteína de 0.7 mg/ml presentó actividad aglutinante. Con este procedimiento, se obtuvo un incremento en la actividad específica así de 64 UHA/mg en la hemolinfa, en la lectina pura fue de 32,520

UHA/mg, que representa un incremento de 508 veces la actividad específica de la lectina con respecto a la hemolinfa.

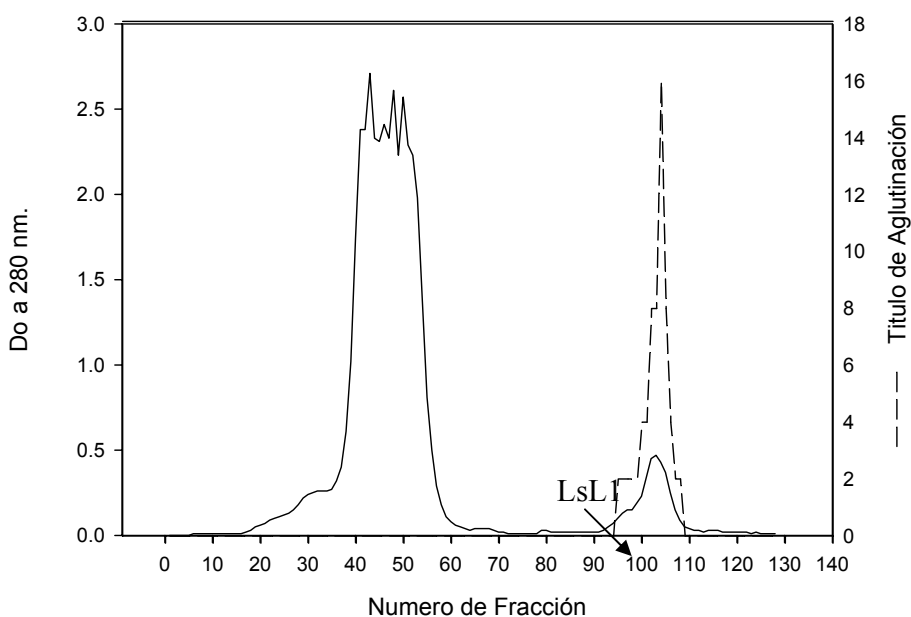


Fig 1. Purificación de LsL1 por filtración en gel en columna S-300.

La determinación del peso molecular de lectina purificada, realizado por SDS-PAGE, nos da un peso molecular de 84 kDa (figura 2).

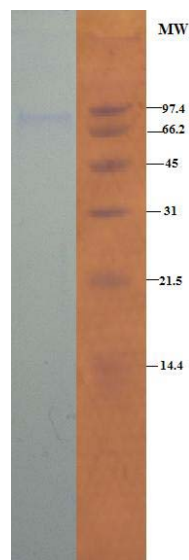


Figura 2. Determinación de peso molecular de LsL1.

Secuencia de Aminoácidos por MALDI-TOF

Por digestión trípica se obtuvieron 96 péptidos con un rango de masas de 768.36 a 3379.76, estas masas se sometieron a una búsqueda en la base de datos de NCBI nr (Profound 2003/08/06) y se encontró un 23% de similitud con el precursor de hemocianina de *Penaeus vannamei* (NCBI: S55387) en la secuencia de esta proteína se incluyen 15 péptidos provenientes de LsL.

La secuencia obtenida de los 15 péptidos da un total de 209 aminoácidos. (Figura 3a). Esta secuencia muestra un 95% de similitud con la porción que contiene cobre (Cu), de la molécula de hemocianina, en la región comprendida entre el aminoácido 100 al 180. (Figura 3). En un alineamiento de las dos secuencias, se manifiesta que la secuencia de LsL1 tiene similitud con la porción de la secuencia de la hemocianina que contiene cobre (Cu). Los alineamientos de esta proteína con la secuencia de otras proteínas de la hemolinfa, mostraron regiones conservadas, sin embargo, estas regiones son mayores cuando se comparan con la secuencia del precursor de hemocianina.

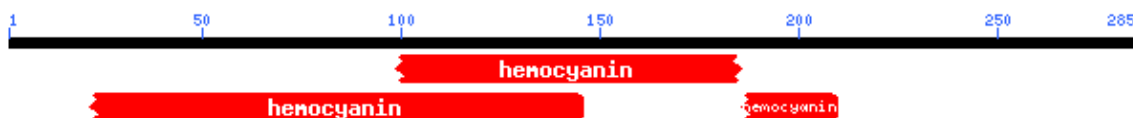


Fig. 3.- Secuencias de LsL1 similares al precursor de hemocianina de *L. vannamei*.

El espectro de dicroísmo circular de LsL presentó una absorción negativa máxima en la región UV a 185 nm, los datos obtenidos y analizados en el programa Deconvolution revelaron que la estructura secundaria de la proteína contiene 8.3% de hélices alfa, 50.5% de laminas antiparalelas.

Discusión

Las lectinas involucradas en el sistema inmune de crustáceos, se han estudiado poco, en reportes recientes, se ha sugerido que su principal función es el reconocimiento del material extraño, como activadores de mecanismos de defensa, lo que no dista mucho de las funciones que tienen las proteínas que participan en mecanismos de defensa en los vertebrados.

El estudio de la inmunidad de camarones se ha enfocado principalmente al conocimiento de los factores séricos que pueden participar en la respuesta inmune. Los estudios mas importantes se han realizado en *Litopenaeus vannamei*, especie que se

ha convertido en la de mayor importancia para la acuicultura en el continente americano. (Gross, 2001). El sistema inmune de *L. vannamei*, es uno de los que mejor se conocen en camarones peneidos; estos estudios se han avocado fundamentalmente a la caracterización de mecanismos de defensa, como el sistema de la proPO, y a la identificación de proteínas relacionadas con su sistema de defensa (péptidos antimicrobianos, proteínas de la coagulación, proteínas de choque térmico, lectinas, penaedinas, peroxinectinas). *L. vannamei* es una especie endémica del Océano Pacífico de gran importancia comercial, sometida a estrés por sobreexplotación. Se ha propuesto *L. setiferus* como alternativa de cultivo, debido a que no es comercialmente importante para la acuicultura, y además se considera que esta libre de enfermedades. Sin embargo, poco se sabe del sistema inmune de esta especie. En un reporte reciente, Gross y colaboradores (2001), reportan el descubrimiento de los péptidos denominados crustinas con actividad antimicrobiana y especificidad hacia bacterias Gram-positivas y hongos (Destomieux, 1999, 2000); en este mismo reporte se da a conocer el descubrimiento de otro péptido antimicrobiano de 11.5 kDa de peso, y la presencia de penaedinas, peroxinectinas, proteínas de coagulación, y algunas lectinas. Sin embargo, la descripción de cada una de estas moléculas y su relación con el sistema inmune de la especie, aún se desconoce.

En peneidos se han identificado lectinas con un amplio rango de peso molecular, desde 30 kDa hasta 440 kDa y con gran diversidad estructural, con subunidades que varían desde 27 hasta 41 kDa. El análisis electroforético de la proteína purificada nos indican que tiene un peso molecular de 85 kDa.

En el análisis de la composición de aminoácidos por MALDI TOF, los aminoácidos que se encuentran en mayor proporción son ácido aspártico, ácido glutámico y leucina, en tanto que los que están en menor proporción son metionina y cisteína. La mayor proporción de los aminoácidos encontrados son no polares, los cuales transfieren características de hidrofobicidad a la proteína, así mismo, existe una porción considerable de aminoácidos que generan estabilidad a la estructura al permitir la formación de hojas beta plegadas, lo que sugiere que se trata de una proteína fibrilar; la poca presencia de aminoácidos con cisteína demuestra que es una proteína de fácil disociación, puesto que forma pocos puentes disulfuro.

Esta proteína contiene 15 péptidos con un total de 209 aminoácidos, la secuencia de aminoácidos muestra un 95% de similitud con la porción de hemocianina que contiene cobre, en la región comprendida entre el aminoácido 100 al 180. En el alineamiento de las dos secuencias, vemos que la secuencia de LsL tiene su principal homología en la porción de la secuencia de hemocianina que contiene cobre.

En algunos reportes se ha demostrado que varias moléculas relacionadas al sistema inmune en crustáceos son generados por porciones de hemocianina; algunos péptidos antifúngicos por la porción C terminal en respuesta a un estímulo antigénico (Destomieux-Garzón, 2001). Estos péptidos presentan similitud de más del 90% con la secuencia terminal de la hemocianina. Se ha demostrado que componentes de los hemocitos pueden convertir porciones de la hemocianina en una enzima parecida a la fenol oxidasa (Adachi, K., 2002). En el análisis de la secuencia de aminoácidos, deducida del gen de la peroxinectina (Sritunyalucksana, K. 2001) hay homologías con la secuencia de un precursor de la hemocianina. Estos datos ponen de manifiesto la importancia de la hemocianina en el sistema inmune ya que la hemocianina tiene homología con varias proteínas del sistema inmune, y ante el hecho de que estímulos antigénicos posiblemente desencadenen reacciones donde la hemocianina genera moléculas inmunoreactivas, a través de mecanismos hasta ahora desconocidos, le otorga a este sistema gran complejidad. En el análisis por dicroísmo circular de la estructura secundaria de LsL se encontró que es una proteína con hojas beta plegadas en un 57%, lo que sugiere es una proteína fibrilar, confirmado por el contenido de aminoácidos. Esta característica es compartida por las estructuras secundarias de los dominios constantes de las moléculas de anticuerpo en vertebrados. Los resultados obtenidos aportan evidencia de que la respuesta inmune en crustáceos es poco especializada y cuenta con moléculas multifuncionales.

Bibliografía

- Agundis, C., Pereyra, A., Zenteno, R., Brassart, C., Sierra, C., Vazquez, L., Zenteno, E. (2000), Quantification of lectin in freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) hemolymph by ELISA. *Com. Biochem. Physiol. B*:127: 165-172.
- Bayne, C.J. (1990), Phagocytosis and non-self recognition in invertebrates. *Bioscience* 40:723-731.
- Bradford, M. (1976), A rapid and sensitive method for the quantitation of protein utilizing the principles of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Destomieux, D., Bulet, P., Strub, J., Van Dorsselaer, A., Bachère, E., (1999), Recombinant expression and range of activity of penaeidins, antimicrobial peptides from penaeid shrimp. *Eur J Biochem* 266:335-346.
- Destomieux, D., Munoz, M., Cosseau, C., Rodriguez, J., Bulet, P., Comps, M., Bachère, E., (2000) Penaeidins, antimicrobial peptides with chitin-binding activity, are produced and stored in shrimp granulocytes and released after microbial challenge. *J Cell Sci* 113:461-469.
- Gross, P.S., Barlett, T.C., Browdy, C.L., Champman, R.W., Warr, G.W., (2001). Immune gene discovery by expressed tag analysis of hemocytes and hepatopancreas in the Pacific White Shrimp, *Litopenaeus vannamei*, and the Atlantic White Shrimp, *L. setiferus*. *Dev. Comp. Immunol.* 25: 565-577.
- Laemli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.

- Mullainadhan, P. y L. Renwranz (1986), Lectin-dependent recognition of foreign cells by hemocytes of the mussel, *Mytilus edulis*. Immunobiology 171: 263-273.
- Sierra, C., Pérez, A., Agundis, C., Zenteno, E., and Vázquez, L. (1999) Subcellular organization of the seric lectin in haemocytes from the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* (Decapoda, Nanantia). In: Schram, F.R., von Vaupel Klein, J.C. (Eds.), Crustaceans and the Biodiversity Crisis, vol. I. Brill, Leiden, pp. 961–970.
- Vasta, G.R., Quesenberry, M., Ahmed, H., O’Leary, N., (1999). C-type lectins and galectins mediate innate and adaptive immune functions: their roles in the complement activation pathway. Dev. Comp. Immunol. 23, 401–420.
- Vázquez, L., Maldonado; G., Agundis, C., Pérez; A., Cooper, E., Zenteno, E., (1997): Participation of a sialic acid specific lectin from the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* hemocytes, in the recognition of non-self cells. J. Exp. Zoology. 279:265- 272.

Escrito recibido el 22/10/04, nº de referencia 020503_REDVET. Enviado por su autor principal, **alpuche**, miembro de la [Comunidad Virtual Veterinaria.org](http://www.veterinaria.org) ®. Publicado en REDVET® el 01/02/04.

(Copyright) 1996-2005. [Revista Electrónica de Veterinaria REDVET®](http://www.veterinaria.org), ISSN 1695-7504 - [Veterinaria.org®](http://www.veterinaria.org) - [Comunidad Virtual Veterinaria.org®](http://www.veterinaria.org) - Veterinaria Organización S.L.®

Se autoriza la difusión y reenvío de esta publicación electrónica en su totalidad o parcialmente, siempre que se cite la fuente, enlace con [Veterinaria.org](http://www.veterinaria.org) -www.veterinaria.org y REDVET® www.veterinaria.org/revistas/redvet y se cumplan los requisitos indicados en [Copyright](http://www.veterinaria.org/revistas/redvet)

Alpuche-Osorno, J.; Pereyra, M.; Vazquez, L.; Agundis, C.; Rosas, C.; Zenteno, E - **Análisis proteómico de la subunidad IsI1 de la lectina del Camaron Blanco del Golfo de México *Litopenaeus setiferus***.- Revista Electrónica de Veterinaria REDVET ®, ISSN 1695-7504, Vol. VI, nº 02, Febrero/2005. [Veterinaria.org](http://www.veterinaria.org) ® - [Comunidad Virtual Veterinaria.org](http://www.veterinaria.org) ® - Veterinaria Organización S.L.® España. Mensual. Disponible en <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet> y más específicamente en <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n020205.html>