Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C.

α₂ MACROGLOBULINA DE HEMOLINFA DE CAMARÓN BLANCO *Penaeus (=Litopenaeus) vannamei*

POR:

TERESA GOLLAS GALVÁN

TESIS APROBADA POR LA

DIRECCIÓN DE CIENCIA DE LOS ALIMENTOS

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTORADO EN CIENCIAS

HERMOSILLO, SONORA.

C.I.A.D, A.C.
RECIBIDO
08 OCT 2003
87-97
BIBLIOTECA

MAYO DEL 2002

APROBACION

Los miembros del comité designado para revisar la tesis de la M.C. Teresa Gollas Galván, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Doctor en ciencias.

Dr. Francisco Vargas Albores

Dra. Gloria Yepiz Plascencia

Dr. Rogerio Sotelo Mundo

Dr. Fernando García Carreño

Dra. Carolina Barillas Mury

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 créditos al CIAD, previa autorización escrita del manuscrito en cuestión, del director o directora de la tesis.

Dr. Inocencio Higuera Ciapara

Agradecimientos

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD) por darme el honor de integrarme a su postgrado.

A CONACYT por la beca otorgada durante el desarrollo del postgrado.

Dr. Inocencio Higuera por proporcionarnos las mejores condiciones para desarrollar este trabajo.

A La Dirección de Tecnología de Alimentos de Origen Animal (DTAOA) de manera muy especial al Dr. Ramón Pacheco su apoyo incondicional.

A mi asesor Dr. Francisco Vargas Albores, por ser la brújula en mi formación académica.

A la Dra. Gloria Yepiz Plascencia por enseñarme la belleza de las herramientas de biología molecular y por su apoyo.

A los Dres. Rogerio Sotelo, Carolina Barillas Mury y Fernando Garcia Carreño por darme su tiempo y compartir conmigo su gran experiencia.

A mis Padres por darme la vida y darme con amor la libertad, solo encausándome para no desviarme de mis metas.

A las M.C. Flor Jiménez, Claudia Vargas, Tania Reyes , Alba Irene Gómez (casi MC) y la Dra. Marina Ezquerra por su ayuda y amistad.

Al personal del CIBNOR Unidad Guaymas, en especial al Dr. Jorge Hernández López, Dr. Marco Linné y al M. C. Marco Porchas por apoyarme, en la obtención de organismos vivos.

A mis amigos y compañeros del Laboratorio de Biotecnología (1999-2002) quienes siempre me apoyaron y me animaron durante todo mi doctorado.

Dedicatoria

A Jorge Hernández López
A Itzi Elisa Hernández Gollas
A la porción de vida que late dentro de mi.

Jorge sin ti no seria lo que soy, una de las mujeres mas felices dentro de campo científico.

CONTENIDO

RESUMEN 7

ANTECEDENTES 9

SISTEMA DE ACTIVACIÓN DE LA PROFENOLOXIDASA 11
REGULACIÓN DE LA PROTEÓLISIS 14
ESTRUCTURA DE LA α_2 MACROGLOBULINA DE VERTEBRADOS 16
LA α_2 MACROGLOBULINA DE INVERTEBRADOS 18

HIPÓTESIS Y OBJETIVO 21

MATERIALES Y MÉTODOS 22

REACTIVOS 22
ORGANISMOS 22
OBTENCIÓN DE LA HEMOLINFA 22
CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS 23
ACTIVIDAD DE α_2M O PROTECCIÓN DE TRIPSINA 23
INHIBICIÓN CON METILAMINA 23
ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA SDS 24
DETECCIÓN CON ANTICUERPOS Y LECTINAS 24
OBTENCIÓN DE SECUENCIA N-TERMINAL 26
PURIFICACIÓN DE α_2M 26
CROMATOGRAFÍA DE FILTRACIÓN EN GEL 27
PREPARACIÓN DE LISADO DE HEMOCITOS 27
ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA 27
PURIFICACIÓN DE LA EAPFO 28
ACTIVACIÓN E INHIBICIÓN DEL SISTEMA PROFO 29
DISEÑO DE OLIGONUCLEÓTIDOS PARA α_2M 30
PURIFICACIÓN DE DNA GENÓMICO DE CAMARÓN BLANCO 31
AISLAMIENTO DE RNA MENSAJERO 31
SÍNTESIS DE cDNA 32
AMPLIFICACIÓN DE FRAGMENTOS POR REACCIÓN DE PCR 32
ANÁLISIS DE LOS PRODUCTOS DE PCR 33
CLONACIÓN DE PRODUCTOS DE PCR 33
LIBERACIÓN DE LOS INSERTOS 34
SECUENCIACIÓN Y ANÁLISIS DE SECUENCIAS 36

RESULTADOS Y DISCUSIÓN 37

DETECCIÓN DE α_2M EN PLASMA DE CAMARÓN 37
PURIFICACIÓN DE LA α_2M 40
CARACTERIZACIÓN DE LA α_2M DEL CAMARÓN 44
a) Masa molecular de la α_2M 44
b) N-Terminal 46

c) Requerimiento de ambiente salino 46
d) Reconocimiento por anticuerpos anti α_2M de humanos 48
e) Sensibilidad a Metilamina 49
f) Glicosilación de la α_2M 51
g) Especificidad de la α_2M 53
EL PAPEL DE LA α_2M EN EL SISTEMA DE ACTIVACIÓN DE LA PROFO 54
Purificación de la EAPFO 54
Inhibición de la activación de la proFO 56
SECUENCIACIÓN DE LA REGIÓN TIOL ÉSTER DE LA α_2M 59
Análisis del clon Pvalfa2M1 63
Análisis del clon Pvalfa2M2 65
DETECCIÓN DE mRNA DE LA α_2M 67
POSIBILIDAD DE USO COMO MARCADORES DE ESPECIE 68
CONCLUSIÓN 70
BIBLIOGRAFÍA 72

LISTA DE TABLAS

TABLA 1: SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS (PRIMERS) PARA LA α_2M DE CAMARÓN..... 30

TABLA 2: SECUENCIA AMINO TERMINAL DE α_2M DE CAMARÓN BLANCO Y COMPARACIÓN OTROS ORGANISMOS..... 46

TABLA 3: PROTEINASAS INHIBIDAS POR LA α_2M DE CAMARÓN BLANCO... 53

TABLA 4: ENSAYO DE INHIBICIÓN DE LA EAPFO POR LA α_2M DE CAMARÓN. 57

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: ACTIVIDAD DE INHIBIDORES DE PROTEINASAS PRESENTE EN HEMOLINFA DE CAMARÓN BLANCO. 38

FIGURA 2: ACTIVIDAD DE UN INHIBIDOR DE PROTEINASAS TIPO α_2M EN DIFERENTES CANTIDADES DE PLASMA DE CAMARÓN. 39

FIGURA 3: INHIBICIÓN DE LA α_2M DE HEMOLINFA DE CAMARÓN POR METILAMINA.. 40

FIGURA 4: CROMATOGRAFÍA DE LA α_2M EN BLUE SEPHAROSE. 42

FIGURA 5: A) CROMATOGRAMA DE LA PURIFICACIÓN DE LA α_2M UTILIZANDO PHENYL-SEPHAROSE. 43

FIGURA 6: BANDA DE α_2M PURIFICADA Y DETECTADA EN GEL DE POLIACRILAMIDA CON SDS.. 45

FIGURA 7: ESTABILIDAD DE LA α_2M DE CAMARÓN PURIFICADA POR PHENYL-SEPHAROSE.. 47

FIGURA 8: INMUNODETECCIÓN DE LA α_2M DE CAMARÓN UTILIZANDO ANTICUERPOS COMERCIALES ANTI α_2M DE HUMANO. 49

FIGURA 9: TIEMPO DE REACCIÓN DEL TIOL ÉSTER DE LA α_2M DE CAMARÓN 50

FIGURA 10: COMPARACIÓN DE LA REACCION DE α_2M-METILAMINA Y α_2M-PROTEASA. 51

FIGURA 11: DETECCIÓN DE AZÚCARES POR LECTINAS BIOTINILADAS, EN LOS FRAGMENTOS DE α_2M 52

FIGURA 12: CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD A STI UTILIZADA EN LA PURIFICACIÓN DE LA EAPFO DE HEMOCITOS DE CAMARÓN BLANCO..... 56

FIGURA 13: DETECCIÓN DE LA EAPFO PURIFICADA POR CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD. 57

FIGURA 14: PARTICIPACIÓN DE LA α_2M EN EL SISTEMA PROFENOLOXIDASA. 58

FIGURA 15: ESQUEMA REPRESENTATIVO DE LA ESTRUCTURA PRIMERIA DE LA α_2M Y "PRIMERS" DISEÑADOS EN BASE A SECUENCIAS CONSENSO DE α_2M DE OTROS ORGANISMOS 60

FIGURA 16: DNA GENÓMICO PURIFICADO DE MÚSCULO DE CAMARÓN BLANCO.. 61

FIGURA 17: FRAGMENTOS AMPLIFICADOS A PARTIR DE DNA GENÓMICO UTILIZANDO LOS OLIGONUCLEÓTIDOS DEGENERADOS THIOL AN FW Y REG 60 RV..... 61

FIGURA 18: DIGESTIONES DE DNA PLASMÍDICO PARA LIBERAR EL DNA INSERTADO, DE LOS CLONES PVALFA2M1 (338) Y PVALFA2M2 (445) 62

FIGURA 19: SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS ENTRE LA REGIÓN TIOL ÉSTER Y EL SITIO DE UNIÓN AL RECEPTOR..... 63

FIGURA 20: COMPARACIÓN DE LA SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS DE LA REGIÓN TIOL ÉSTER DE LA α_2M CAMARÓN CON REGIONES HOMÓLOGAS EN OTROS ORGANISMOS..... 65

FIGURA 21: COMPARACIÓN DE LAS SECUENCIAS NUCLEÓTIDICAS DE LOS CLONES PVALFA2M2 Y PVALFA2M1, OBTENIDOS POR AMPLIFICACIÓN DEL DNA GENÓMICO UTILIZANDO LOS MISMOS PRIMER..... 66

FIGURA 22: DETECCIÓN DEL mRNA EN HEMOCITOS Y HEPATOPÁNCREAS DE LA α_2M. 68

FIGURA 23: COMPARACIÓN DEL FRAGMENTO OBTENIDO POR PCR CON LOS OLIGONUCLEÓTIDOS DEGENERADOS THIOL FW Y REG60 RV, AL UTILIZAR DNA GENÓMICO DE 3 SP. DE CAMARÓN BLANCO..... 69

RESUMEN

En los artrópodos, posiblemente el grupo de invertebrados más estudiado, existe una respuesta celular y una respuesta humoral contra microorganismos patógenos y oportunistas.

La respuesta celular esta constituida por fagocitosis, encapsulación, formación de nódulos y citotoxicidad. La inmunidad humoral, por su parte, incluye factores moleculares como lectinas, aglutininas, enzimas, péptidos antibacterianos, citoquininas, factores líticos, coagulación y sistema profenoloxidasa.

El sistema de activación de la profenoloxidasa (proFO) ha sido considerado como un componente integrador del sistema inmune de artrópodos y responsable de las funciones de reconocimiento y defensa. La activación del sistema consiste en una serie de reacciones en cascada que involucra proteinasas, la más importante es la enzima activadora de la profenoloxidasa.

Para la regulación del sistema proFO se han descrito inhibidores plasmáticos tales como inhibidores de tripsina y α_2 macroglobulina (α_2M) Estos reguladores tienen como función principal reducir la actividad proteolítica generada durante la liberación del contenido granular de los hemocitos, evitando la acción de la proteinasa en lugares no deseados

El inhibidor de proteinasas tipo α_2M del plasma de camarón blanco *Penaeus (=Litopenaeus) vannamei* fue detectado y posteriormente purificado, mediante una columna de Blue-Sepharose y otra de Phenyl-Sepharose™. Utilizando SDS-PAGE, se calculó una masa molecular de 380kDa en condiciones no reductoras. Esta proteina perdió actividad al incubarse con metilamina, lo cual es característico de la familia de las α_2M y fue reconocida por anticuerpos anti-α_2M de humano. La α_2M de camarón presentó un amplio espectro de inhibición ya que fue capaz de inhibir proteinasas como tripsina, quimotripsina, elastasa y papaina. Interesantemente, la α_2M purificada de camarón perdió su actividad cuando se almacenó en ausencia de NaCl y esta inactivación no ocurrió cuando

se conservó a 0.45 M de NaCl, concentración equivalente a la salinidad del plasma del camarón.

Basándose en secuencias determinadas para otras especies y depositados en GenBank, se diseñaron primers que se utilizaron para amplificar la región tiol de la α_2M. Un fragmento de 0.33 kb fue amplificado y clonado usando DNA genómico como templado. El análisis de la secuencias obtenidas mostró que la α_2M de camarón también presenta la secuencia GCGEQ que caracteriza a la familia de las α_2Ms.

Finalmente, utilizando oligonucleótidos diseñados en base a la secuencia de α_2M obtenida se demostró por RT-PCR la presencia del mRNA de la α_2M en el hemocito, en mayor concentración que en hepatopancreas.

ANTECEDENTES

El sistema inmune de los invertebrados carece de inmunoglobulinas y células capaces de eliminar específicamente a un patógeno. Además, hasta la fecha, no ha sido posible demostrar una respuesta inmunológica con la duración y especificidad suficiente para definirla como una respuesta secundaria. En otras palabras, en los invertebrados no ha sido posible demostrar un sistema inmune adquirido. Sin embargo, a través de una respuesta inmune innata son capaces de reconocer y eliminar microorganismos patógenos y oportunistas.

Los artrópodos, posiblemente el grupo de invertebrados más estudiados, poseen una respuesta inmune celular que incluye: fagocitosis, encapsulamiento, formación de nódulos y citotoxicidad (Ratcliffe, 1985; Renwrantz, 1986; Lackie, 1988; Johansson y Söderhäll, 1989; Ratcliffe y cols., 1991; Johansson y Söderhäll, 1992). La respuesta humoral de los artrópodos, está conformada por proteínas plasmáticas, siendo las más estudiadas las lectinas o aglutininas, factores hemolíticos, citoquininas, los péptidos antimicrobianos y enzimas hidrolíticas (Vasta y Marchalonis, 1983; Vasta y Cohen, 1984; Söderhäll y cols., 1986; Ratanapo y Chulavatnatol, 1990; Vargas-Albores y cols., 1992; Guzmán-Murillo y cols., 1993; Vargas-Albores y cols., 1993; Vargas-Albores, 1995).

Aunque en algunos artrópodos, principalmente insectos, se han encontrados proteínas con dominios tipo inmunoglobulinas (Lanz-Mendoza y Faye, 1999), es clara la ausencia de inmunoglobulinas específicas requeridas para el reconocimiento. Sin embargo, los invertebrados poseen proteínas de reconocimiento para detectar y responder a microorganismos invasores (Vargas-Albores y Yepiz-Plascencia, 1998), las cuales tienen una

especificidad limitada a componentes de la superficie microbiana y no son inducibles. Varias proteínas de reconocimiento han sido aisladas y caracterizadas; por ejemplo: las proteínas que reconocen a los β-1,3-glucanos (BGBP) (Ochiai y Ashida, 1988; Söderhäll y cols., 1988; Duvic y Söderhäll, 1990; Seki y cols., 1994; Vargas-Albores y cols., 1997), proteínas que reconocen lipopolisacáridos (Sun y cols., 1990; Vargas-Albores y cols. , 1993; Lee y cols., 1996) y proteínas que responden a péptidoglucanos (Yoshida y cols., 1996; Kang y cols., 1998). En crustáceos, BGBP reacciona con β-glucanos y forma un complejo que se une específicamente a los hemocitos induciendo la adhesión y la degranulación parcial (Barracco y cols., 1991). La BGBP parece ser una proteína conservada, al menos dentro de los crustáceos, y compartiendo propiedades moleculares, funcionales y antigénicas (Duvic y Söderhäll, 1993; Vargas-Albores y cols., 1996; Vargas-Albores y cols. , 1997). La BGBP de crustáceos se ha descrito como una glicolipoproteína monomérica de 100 kDa (Duvic y Söderhäll, 1990; Duvic y Söderhäll, 1993; Vargas-Albores y cols. , 1997). En el langostino, *Pacifastacus leniusculus* (Hall y cols., 1995), como en el camarón blanco, *Penaeus vannamei* (Yepiz-Plascencia y cols., 1998), se ha demostrado que la BGBP y la lipoproteína de alta densidad (HDL) de hemolinfa son la misma molécula. Además, la BGBP del langostino ha sido clonada (Cerenius y cols., 1994) y su secuencia deducida, esto se ha realizado con la intención de buscar los sitios que le confieren su afinidad. Aunque BGBP también reacciona con heparina (Ochiai y Ashida, 1988, Jiménez-Vega, In press #2050) la secuencia característica no ha sido encontrada. Sin embargo posee la secuencia tipo integrina (Arg-Glu-Asp) lo que sugiere que es capaz de interactuar con las células (Ruoslahti, 1996).

Recientemente, se ha descrito en los hemocitos de *Penaeus monodon*, otra proteína de 31 kDa que reconoce β-glucanos (Sritunyalucksana y cols., 2002), pero su papel en el sistema de defensa no ha sido completamente dilucidado. Del mismo modo, las proteínas de reconocimiento que se unen a

LPS, han sido encontradas en muchos artrópodos y son conocidas como proteínas que se unen a LPS (Sun y cols. , 1990; Dimopoulos y cols., 1997) y en algunos casos se ha demostrado que incrementan la fagocitosis (Vargas-Albores, 1995); pero las características moleculares de este grupo de proteínas no han sido descritas.

Sistema de activación de la Profenoloxidasa

El sistema de activación de la profenoloxidasa (proFO) ha sido considerado como un componente integrador de la respuesta inmune de artrópodos y responsable de las funciones de reconocimiento y defensa (Söderhäll, 1982; Ashida y Söderhäll, 1984; Söderhäll y Häll, 1984; Renwrantz, 1986; Söderhäll y cols. , 1986; Ashida, 1990; Ashida y Yamazaki, 1990; Söderhäll, 1992). Esto se debe básicamente a que puede ser estimulado por pequeñas cantidades de polisacáridos microbianos (Ashida y cols., 1983; Söderhäll, 1992; Söderhäll y cols., 1994; Vargas-Albores, 1995) y los productos generados durante la activación estimulan funciones celulares de defensa (Ashida y Söderhäll, 1984; Ratcliffe y cols., 1984; Johansson y Söderhäll, 1989; Nappi y Seymour, 1991; Söderhäll, 1992).

El sistema de activación de la proFO consiste en una cascada de reacciones que involucra proteinasas y otros factores que son activados secuencialmente (Ratcliffe y cols. , 1984; Leonard y cols., 1985; Ratcliffe, 1985; Aspán y cols., 1990; Söderhäll, 1992). El componente final es la fenoloxidasa (FO; monofenol, L-DOPA:oxigeno:oxidoreductasa EC 1.14.18.1), la cual está involucrada en la formación de melanina al oxidar fenoles a quinonas. La FO puede formar quinonas a partir monofenoles, mediante una o-hidroxilación, se transforman en difenoles. La FO también puede reaccionar directamente con difenoles, transformándolos en quinonas, las cuales continuan, por una via no enzimatica, hasta melanina. La melanina es un pigmento café y, puede apreciarse depositada como manchas obscuras en la cutícula de los artrópodos donde ha habido una

lesión (Söderhäll, 1982; Sugumaran y cols., 1988). La melanina es un mecanismo de defensa, ya que promueve el encapsulamiento físico de hifas de hongos, tejidos aberrantes, bacterias y parásitos (Lackie, 1980; Söderhäll y cols., 1984; Rizki y Rizki, 1990). Además, la melanina y sus precursores pueden inhibir el crecimiento de hongos y bacterias (Söderhäll y Ajaxon, 1982). Y durante su síntesis se generan especies oxígeno reactivas como aniones superóxido y el radical hidroxilo, con importante actividad antimicrobiana (Song y Hsieh, 1994; Nappi y cols., 1995).

En general, tanto en insectos (Ashida, 1981; Saul y Sugumaran, 1987; Saul y Sugumaran, 1988; Bradley y cols., 1989; Ashida y Yamazaki, 1990), como en otros artrópodos (Söderhäll y Smith, 1983; Leonard y cols. , 1985; Ashida y cols., 1988; Johansson y Söderhäll, 1989; Asada y Fukumitsu, 1990; Vargas-Albores y cols., 1993; Hernández-López y cols., Enviado) los componentes del sistema proFO se encuentran en el interior de los hemocitos. Sin embargo, se han detectado excepciones en insectos (Yoshida y Ashida, 1986; Saul y Sugumaran, 1987; Saul y Sugumaran, 1988; Andersson y cols., 1989; Nappi y Seymour, 1991; Brivio y cols., 1992; Nayar y Bradley, 1994; Lee y cols., 2000) y en crustáceos (Nappi y Seymour, 1991; Hernández-López y cols. , Enviado), donde al menos uno de los componentes está fuera de la célula. Sin embargo, independientemente de la localización, la FO es producida por la hidrólisis parcial de la proFO (Söderhäll, 1982; Johansson y Söderhäll, 1989; Ashida, 1990), la cual es llevada a cabo por una proteína denominada enzima activadora de la profenoloxidasa (EAPFO) (Leonard y cols., 1985; Aspán y cols. , 1990; Aspán y Söderhäll, 1991) durante la respuesta inmune (Johansson y Söderhäll, 1985).

Varias proFO en crustáceos han sido purificadas.y clonadas. El análisis de secuencias de aminoácidos deducidos muestran alta similitud con la proFOs de insectos. El el trascrito de la proFO de *P. monodon* tiene 3002 pb,

con un marco de lectura abierto de 2121 pb que codifican para un polipéptido de 688 aminoácidos (78.7 kDa). La proteína purificada de hemocitos de *P. californiensis* es un monómero de masa molecular de 1 14 kDa determinada por SDS-PAGE (Gollas-Galván y cols., 1999). Aunque la masa calculada para la proFO clonada de *P. monodon* es mayor que la calculada para la purificada en *P. californiensis*, esto podría deberse a un proceso de modificación post-traduccional (Sritunyalucksana y cols., 1999).

En base a la comparación de las secuencias de aminoácidos, de las proFOs de artrópodos, éstas se clasifican en 2 grupos principales: proFOs de insectos y proFO de crustáceos (Sritunyalucksana y Söderhäll, 2000). Las secuencias de aminoácidos de proFOs de crustáceos son altamente similares a las secuencias de aminoácidos de hemocianinas de artrópodos (Sritunyalucksana y cols. , 1999). Los 6 residuos de histidina contenidos en los sitios de unión al cobre de la proFO son altamente conservados en todos los artrópodos, incluyendo proFO de camarón (Sritunyalucksana y cols. , 1999).

Por su parte, la EAPFO, ha sido purificada de la cutícula de *Bombyx mori* (Ashida y Dohke, 1980) y *Manduca sexta* (Jiang y cols., 1998), de la pupa de *Drosophila* (Chosa y cols., 1997) y del lisado de hemocitos de *Pacifastacus leniusculus* (Aspán y cols. , 1990). La característica común de la EAPFO de artrópodos es que son serin proteinasas y presentan dominios tipo clip (Jiang y Kanost, 2000; Wang y cols., 2001). En *P. leniusculus* se ha demostrado que solo se requiere una EAPFO para activar la proFO (Aspán y cols., 1990). La presencia del domino clip de la EAPFO también presente en β-defensinas, condujo a la idea de que este dominio podría tener actividad antimicrobiana. Al sobreexpresar este dominio se demostró que es capaz de inhibir en un 50% la actividad de bacterias Gram-positivas, tales como *Micrococcus luteus* y *Bacillus megaterius*. Estos resultado sugieren que el dominio clip de la EAPFO podría funcionar como un péptido antibacteriano,

sin embargo esto no ha sido comprobado con la molécula completa, ni en estudios *in vivo* (Wang y cols. , 2001).

Regulación de la proteólisis

Un sistema con alta actividad enzimática debe de contar con reguladores que permitan mantener su actividad dentro de parámetros fisiológicos adecuados. Durante la activación del sistema proFO, después de la liberación del contenido granular, se manifiesta una importante actividad proteolítica. Por ello, se ha propuesto que, los inhibidores plasmáticos de tripsina y la α_2M (Saul y Sugumaran, 1986; Hergenhahn y cols., 1988; Armstrong y cols., 1991; Brehélin y cols., 1991), deben controlar dicha actividad y evitar la acción de la proteinasa en lugares no deseados (Hergenhahn y cols. , 1988; Armstrong y cols. , 1991; Brehélin y cols. , 1991; Stöcker y cols., 1991; Liang y cols., 1992).

La hemolinfa de los artrópodos contiene relativamente altas concentraciones de inhibidores de proteinasas; por ejemplo, en la hemolinfa de *Manduca sexta* se han detectado, al menos, 15 inhibidores (Tomado de Kanost, 1999). Varios inhibidores plasmáticos de artrópodos han sido purificados y estudiados. Aunque se han establecido relaciones estructurales y se han deducido secuencias a partir de cDNA, el papel exacto en los procesos fisiológicos aún no se determina. Por ejemplo, en el capullo del gusano de seda, el papel de los inhibidores de proteinasas ha sido relacionado a la protección contra proteinasas provenientes de hongos y bacterias invasores (Armstrong y cols., 1996; Kurioka y cols., 1999). Pero también, es claro el papel de las proteinasas como reguladores en el proceso de coagulación (Miura y cols., 1995) y otros mecanismos de defensa donde participan éstas proteínas (Saul y Sugumaran, 1986; Liang y cols., 1997).

Los inhibidores de proteinasas han sido agrupados en familias y se clasifican dependiendo de la proteinasa que afectan. Algunos grupos son:

Serpins, Kunitz, α_2M, Kazal. Los inhibidores de proteinasas tipo Kazal, son proteínas almacenados en los gránulos y secretados en los jugos gástricos, tienen alta especificidad para inhibir principalmente quimotripsina, su función fisiológica no es aún muy clara, aunque en vertebrados han sido aislados de plasma seminal y albúmina de huevo en aves. En invertebrados como langostino de agua dulce y mosca, este tipo de inhibidores han sido caracterizados, provenientes de mitocondrias de hemocitos. Presentan bajo peso molecular de 5-25 kDa, caracterizadas por inhibir quimotripsina y subtilisina y tienen una importante participación como reguladores de la cascada de activación del sistema proFO, reguladores metabólicos y de procesos de metamorfosis. Un inhibidor de este tipo, específico para trombina, fue caracterizado en la chinche *Rhodnius prolixus*. En *Pacifastacus leniusculus* un inhibidor de 23 kDa de la familia Kazal fue aislado de hemocitos y el cDNA codificante fue clonado y secuenciado. Esta proteína contiene 4 dominios de la familia Kazal y es capaz de inhibir proteinasas tipo tripsina y elastasa (Johansson y cols., 1994; Kanost, 1999; Niimi y cols., 1999).

Por su parte de los inhibidores tipo Kunitz, están caracterizados por inhibir proteinasas tipo tripsina, presentando diferentes sitios reactivos, y por contener 6 residuos de cisteínas formando tres puentes disulfuro. Dentro de esta familia se han descrito toxinas de serpiente, las cuales presentan cuatro dominios, tres de éstas toxinas contenienen dominios tipo Kazal han sido purificadas, observando diferencias en su especificidad, así como en la actividad funcional en sus dominios. Inhibidores tipo Kunitz, han sido estudiados en invertebrados como *Limulus* y anémona de mar, inhibiendo tripsina y quimiotripsina. Así también inhibidores como la quelonianina, descrita en la tortuga roja, ha sido caracterizada por presentar dos dominios, uno que inhibe tripsina, y un segundo dominio que inhibe subtilisina; en el gusano de seda, se ha caracterizado un proteína llamada Lacunina, la cual contiene dominios tipo Kunitz, con función aparente en el

plegamiento de monocapas epiteliales en el desarrollo embriológico (Nakamura y cols., 1987; Girard y cols., 1989; Antuch y cols., 1993). En general, los inhibidores descritos anteriormente actúan específicamente sobre un tipo de proteinasa (Kanost, 1999). Sin embargo las α_2M, que tienen la capacidad de inhibir proteinasas de cualquier tipo.

Estructura de la α_2 Macroglobulina de vertebrados

La α_2M humana tiene una concentración de 2 mg/ml en plasma y participa en la regulación de la actividad de proteinasas de fibrinólisis, coagulación y complemento y puede afectar la acción de citoquininas con las cuales interactúa (Salvesen y Enghild, 1993). La α_2M humana tiene 4 subunidades, que tiene una masa de 180 kDa; dos subunidades forman puentes disulfuro, mientras que otras dos hacen contactos no covalentes para formar el tetrámero funcional de 720 kDa (Sjoberg y Pap, 1989). Cada una de las subunidad de α_2M de humano contiene 1451 residuos de los cuales ocho están glicosilados.

La estructura tridimensional de la α_2M nativa (α_2M-N) obtenida por microscopia electrónica consiste de dos formas tipo Z arregladas en una disposición lado por lado, con una región tipo cincel de alta densidad proteica en sus extremos distales (Boisset y cols., 1996; Schroeter y cols., 1996). La reconstrucción tridimensional de la α_2M, revela dimensiones que fueron estimadas de 200 y 140 Å, con una cavidad interna de 40 y 60 Å. La forma nativa contiene un tiol éster β-Cys-γ-Glu interno, formado por la Cys-949 y Glu-952, y la regione bait flexibles están relativamente cerca de la región tiol éster en cada una de las subunidades (Sottrup-Jensen, 1989). El tiol éster está localizado en la superficie interna de la cavidad central.

La forma nativa puede formar complejos con varias proteinasas. Esta formación de complejos es iniciada por una proteólisis limitada y específica

de la región bait (Barrett y Starkey, 1973) encontrada en los residuos 667-705. El rompimiento de la región bait inicia una serie de cambios conformacionales en las subunidades de la α_2M, resultando en un atrapamiento de la proteinasa dentro del tetrámero.

El resultado final de estos cambios es la forma transformada de la α_2M (Sottrup-Jensen, 1994). Durante su interacción con la proteinasa, el tiol éster es activado y esta activación resulta en la formación de un complejo α_2M-proteinasa en donde la unión covalente de la proteinasa es a través de ε- Lys y un-γ-Glu de la α_2M (Sottrup-Jensen y cols., 1990). En estas condiciones la proteinasa es aún activa, pero solo son accesibles sustratos o inhibidores pequeños. Dos proteinasas pequeñas, como la quimotripsina, pueden ser unidas a la α_2M tetramérica, pero solo una grande como la plasmina (Jacobsen, 1993).

La α_2M transformada por proteólisis tiene dos hebras densas, relativamente fuertes con extensivas conexiones aumentando la región central compacta con una cavidad interna secuestradora de proteinasas (Boisset y cols. , 1996). Los extremos tipo brazos de las hebras contiene los dominios de unión al receptor (Figler y cols., 1991). La proteinasa (s) en el complejo α_2M-proteinasa se presenta como un relleno en la amplia cavidad de la α_2M, la cual aparece vacía en el complejo α_2M-Metilamina (MA) (Boisset y cols. , 1996) (Sottrup-Jensen, 1989). La incubación de la α_2M con metilamina provoca también el rompimiento del tiol éster y la unión covalente con la metilamina. El cambio conformacional de la molécula resultante α_2M-metilamina se parece al complejo formado con α_2M-proteinasa. En la α_2M-MA las regiones bait están intactas pero pobremente accesibles (Imber y Pizzo, 1981).

La α_2M transformada parece una vista H, cuando es estudiada por microscopia electrónica. Sus dimensiones son 180-200 Å, 120-140 Å y 80-

90 Å. Los sitios de unión al receptor están localizados en la punta de cada uno de los brazos H (Sjoberg y Pap, 1989; Sottrup-Jensen, 1989). El análisis en tercera dimensión ha mostrado que la estructura de la α_2M-proteinasa y α_2M-MA son altamente homólogas (Schroeter y cols., 1992). Sin embargo, muchos autores han sostenido que el rompimiento de la región bait, y no solo la hidrólisis del tiol éster es requerido para la transformación estructural de la α_2M (Van Leuven y cols., 1982; Gron y cols., 1996). Un resultado señal del cambio conformacional es que el sitio en los dominios C-terminal (residuos 1314-1451) es expuesto para interaccionar con el receptor celular para el complejo α_2M-proteinasa. Este receptor ha sido encontrado idéntico al receptor de lipoproteínas de baja densidad (Barrett y Starkey, 1973; Bjork y cols., 1985).

Después de la formación del complejo α_2M-proteinasa, éste es capaz de unirse a receptores celulares para su internalización y degradación por lisosomas secundarios (Melchior y cols., 1994; Wu y cols., 1997). Las dos hebras con extremidades tipo brazos se ha demostrado que contienen dominios de unión al receptor involucrados en la endocitosis *in vivo* de la α_2M-proteinasa (Figler y cols. , 1991).

La α_2 Macroglobulina de invertebrados

En invertebrados, la α_2M de la cacerola de mar, *Limulus sp*, posiblemente sea la especie más estudiada y ha sido determinada como una glicoproteína que contiene 2 subunidades de 180 a 185 kDa, que conforman una proteína de 500-550 kDa (Quigley y Armstrong, 1985). La secuencia completa de la α_2M de *Limulus* fue la primera reportada y fue deducida a partir del cDNA codificante obtenido de un banco de genes de hemocitos. El marco de lectura abierto (ORF) codifica para un péptido señal de 25 residuos y una proteína madura de 1482 residuos. La secuencia completa tiene una similitud del 29% con la α_2M de humano e indudablemente

presenta las características de la familia de las α_2M: la presencia de un tiol éster y de la región "bait", la capacidad de inhibir diferentes tipos de proteinasas y, además, fue capaz de reaccionar con el receptor de la α_2M de mamíferos. En *Limulus*, la α_2M es sintetizada en hemocitos, pero no en hepatopáncreas, estómago, intestino, glándula coxal, cerebro y músculo. Específicamente, la α_2M de *Limulus* se almacena en los gránulos de los hemocitos (Iwaki y cols., 1996).

Por otra parte, debido a que el sistema de coagulación de *Limulus* involucra la acción de enzimas proteolíticas específicas (Tai y cols., 1977) y se propuso la participación de la la α_2M como un regulador de estas proteinasas. Sin embargo la α_2M no mostró la capacidad para inhibir las proteinasas del sistema de coagulación (Armstrong y cols., 1984). Aunque tiene la habilidad para eliminar proteinasas presentes en el plasma (Melchior y cols., 1995). La α_2M de *Limulus* también participa en la modulación de una proteína que se une a ácido siálico y tiene actividad hemolítica (Armstrong y cols., 1996)

En *Pacifastacus leniusculus* la α_2M fue purificada del plasma utilizando precipitación ácida, cromatografía de interacción hidrofóbica, cromatografía en concanavalina A y cromatografía de intercambio aniónico. La proteína presentó una masa molecular de 340 kDa, constituida por dos subunidades de 190 kDa, que forman fragmentos de 60 y 140 kDa, cuando son sometidos a tratamientos con calor (Hergenhahn y Söderhäll, 1985). La secuencia N-terminal de esta proteína presentó una alta similitud (91%) a la α_2M de otros crustáceos como *Astacus* (Stöcker y cols. , 1991) y *Homarus americanus* (Spycher y cols., 1987) donde también han sido purificadas y se ha demostrado que comparten características. La α_2M de *P. leniusculus* fue propuesta como un regulador del sistema proFO, sin embargo Hergenhahn et al., (1987) demostró que la α_2M no fue capaz de inhibir la activación de la proFO.

Otras α_2M también estudiadas son la del cangrejo araña (*Libinia emarginuta)*, y del cangrejo Joana (*Cancer borealis)*, las cuales constituyen 2-3% de la proteína total del plasma y tiene una masa molecular entre 460 y 480 kDa (Armstrong y cols., 1985). En insectos como *Drosophila* y *Anopheles* se han encontrado proteínas que contienen tiol éster conocidas como TEP (Thiolester-containing proteins) y son proteínas del tipo α_2M. Hasta la fecha para la mosca *Drosophila melanogaster* se han encontrado 4 genes TEP (Adams y cols., 2000).

Las α_2Ms presentan diferentes formas de multimerización. En el humano y en el caracol (*Helix pomatia*) la α_2M es homotetrámero (Yigzaw y cols., 2001), mientras que en vertebrados inferiores (Mutsuro y cols., 2000) y artrópodos (Hergenhahn y Söderhäll, 1985; Iwaki y cols. , 1996) son homodímeros y se han identificado formas monoméricas en roedores, aves y reptiles (Stöcker y cols. , 1991; Bender y Bayne, 1996; Iwaki y cols. , 1996; Mutsuro y cols. , 2000).

Miembros de la familia de las α_2M han sido identificados en todas clases de vertebrados, en artrópodos y en moluscos, indicando que la α_2M es un componente ancestral del sistema de defensa inmune habiéndose desarrollado antes de la divergencia evolutiva precámbrica de los artrópodos, moluscos y cordados y se puede suponer que es importante para la sobrevivencia ya que se ha mantenido durante la evolución en especies con diferentes planos corporales, hábitats y fisiología (Armstrong y cols. , 1996).

En los camarones peneidos, el único reporte existente es el de α_2M de *Penaeus japonicus* donde solo se ha demostrado su presencia utilizando anticuerpos (Bacheré y cols., 1995), sin embargo mas características de esta proteína no han sido reportadas en la literatura.

Hipótesis y Objetivo

La α_2-macroglobulina es una proteína que se encuentra en el plasma de camarón blanco *Penaeus vannamei*, que comparte características moleculares con otras α_2-macroglobulinas y participa en la regulación del sistema de activación de la profenoloxidasa.

OBJETIVO GENERAL

Purificar y caracterizar la α_2-macroglobulina del camarón blanco (*Penaeus vannamei*), así como determinar su papel como regulador del sistema proFO.

Objetivos particulares

1.-Detectar la actividad de α_2-macroglobulina en el plasma del camarón blanco.

2.-Purificar la α_2-macroglobulina plasmática.

3.-Caracterizar química y bioquímicamente a la molécula.

4.-Demostrar la participación de la α_2-macroglobulina como regulador del sistema proFO de camarón blanco.

5.-Determinar la secuencia de la región tiol característica de la familia.

6.-Determinar el sitio de síntesis de la α_2-macroglobulina.

MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos

Las lectinas biotiniladas y estándares de BSA se compraron a Pierce Chem. Co., (IL, USA). La membrana de difluoruro de polividileno (PVDF: Inmobilon P®) de 45 µm y 20 µm, los filtros de 0.22 µm para muestras y las unidades para concentrar (Centricons®) se compraron a Millipore Corp. (Bedford, MA, USA). La membrana de diálisis fue de Spectra/Por (Spectrum Medical Industries, Los Angeles, CA, USA). La mayoría de los reactivos fueron obtenidos comercialmente de Sigma Chem. Co. (St. Louis MO, USA). Cuando fue necesario, se utilizaron reactivos grado Biología Molecular, libres de nucleasas y pirógenos.

Organismos

Se utilizaron ejemplares juveniles y reproductores de camarón blanco *Penaeus vannamei*, entre 25 y 30 g, aparentemente sanos, obtenidos de la granja "Acualarvas" ubicada en Huatabampito, Son., México.

Obtención de la hemolinfa

La hemolinfa se obtuvo de acuerdo a la técnica descrita por (Vargas-Albores y cols. , 1993) utilizando jeringas estériles de 3 ml puncionando en el primer segmento abdominal localizado en la base de los pleópodos, en la región que comprenden el pleón y el pereión cerca del poro genital. Se extrajo un volumen de hemolinfa en dos volúmenes de solución isotónica para camarón (SIC; 0.45 M de NaCl, 10 mM de KCl, 10 mM de HEPES, pH 7.3 y 850 mOsm/kg), conteniendo 10 mM de EDTA-Na_2 como anticoagulante

(SIC-EDTA) preparada con agua libre de pirógenos (Vargas-Albores y cols. , 1993). Para separar el paquete celular, la hemolinfa fue centrifugada a 800x*g* por 3 min, a 4°C, utilizando una centrífuga BECKMAN GSR-15 (Beckman Instruments, Palo Alto, CA, USA). El plasma libre de células fue recuperado y utilizado como fuente de α_2M.

Cuantificación de proteínas

Para determinar la concentración de proteínas se utilizó el método de Bradford (1976), modificado para microplaca, el cual consistió en incubar 25 µl de la muestra con 250 µl de reactivo de Bradford (0.01% de Coomassie G, 5% de etanol al 95% y 10% de ácido orto-fosfórico al 85%) por 5 min. La absorbancia se determinó a 595 nm en un lector de microplaca (BioRad Model 550, Richmond VA, USA). Para calcular la concentración se utilizó una curva estándar de albúmina sérica bovina (BSA).

Actividad de α_2M o protección de tripsina

La actividad de α_2M se determinó siguiendo la metodología descrita por Barrett (1973) y modificada para microplaca por Hernández-López 2002 (Enviado). 100 µl de plasma o α_2M purificada se colocaron en una microplaca y se incubaron con 10 µl de tripsina (1 mg/ml) durante 20 min a 37°C, posteriormente se agregaron 10 µl de STI (Soybean trypsin inhibitor; 2 mg/ml) y la mezcla se incubó durante 10 min. Finalmente, se agregaron 200 µl de N-Benzoil-DL- arginina-p-nitroanilide (BAPNA) (1 mg/ml, previamente disuelto en 1 mM de DMSO) y, después de 2 horas, se leyó la absorbancia a 415 nm.

Inhibición con metilamina

Se incubaron 90 µl de muestra con 10 µl de metilamina (2 M disuelta en Tris 50 mM, pH 8) a temperatura ambiente, durante diferentes tiempos

(1, 4, 16 y 24 h). Posteriormente se midió la actividad residual de la α_2M y se comparó con el controlque consistió en la muestra incubada con Tris 50 mM, pH8, sin metilamina.

Electroforesis en geles de poliacrilamida SDS

La electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE) se llevó a cabo de acuerdo a Laemmli (1970). Para la electroforésis en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE), se usaron geles de 8x10x0.1 cm, tanto homogéneos (5% y 10%) como en gradiente (4-20%), aplicando una corriente constante de 15 mA/gel. La solución para los electrodos fue Tris 25 mM, glicina 192 mM, SDS 0.1% (pH 8.3), y la muestra se mezcló con un volumen igual de 125 mM Tris HCl, pH 6.8, 4% SDS, 20% glicerol, 0.5% azul de bromofenol. Para condiciones reductoras, se utilizó 280 mM DTT o 250 mM 2-mercaptoetanol (2ME) en la solución muestra. La mezcla se calentó 15 min, a 100°C.

Para poder calcular la masa molecular, se usaron estándares de masa molecular conocida: Nativos de alto rango (Pharmacia, Cat. 17-0445-01), desnaturalizantes de alto (Sigma M-3788) y bajo (Sigma Cat. M-3913) rango. En cualquier caso, se determinó el Rf de cada estándar, se graficó contra el logaritmo de la masa molecular y se estableció una regresión lineal utilizando el programa SigmaPlot® (Jandel Scientific).

Después de la electroforesis, los geles fueron teñidos con Coomassie (Harlow y Lane, 1988) o con nitrato de plata (Merril y Pratt, 1986).

Detección con anticuerpos y lectinas

En los experimentos de inmunodetección y detección con lectinas, después de la electroforesis, las bandas fueron electrotransferidas membranas Inmobilon P, utilizando una solución Tris 48 mM, glicina 39 mM, metanol

20%, SDS 0.037% (pH 9.2) en un sistema semi-seco Transblot Semy-Dry (Biorad, Richmond, CA, USA) a 18 volts constantes durante 45 min. Las membranas se bloquearon durante 2 h con una solución de BSA al 3% en PBS (137 mM de NaCl, 2.7 mM de KCl, 10 mM de Na_2HPO_4, 1.7 mM de KH_2PO_4, 0.01% de timerosal, pH 7.2) a temperatura ambiente y agitación suave. Posteriormente se lavaron con 30 ml de PBS conteniendo Tween 20 al 0.05% (PBS-Tween), tres veces durante 5 min (Harlow y Lane, 1988).

Para la inmunodetección, la membrana fue incubada por 2 hrs con el anticuerpo anti-α_2M de humano (Sigma, M-1893), diluido 1:5000, manteniendo en agitación suave, a temperatura ambiente. La membrana fue lavada 3 veces con PBS-Tween y se incubo durante 90 min con anti-IgG de conejo conjugado con peroxidasa (Sigma, A-4416) a una dilución 1:16,000 y se lavó tres veces con PBS-Tween. Para detectar la actividad de peroxidasa, la membrana se incubó con acetato de sodio 0.1 M (pH 5.4), por 1 min y se agregó el sustrato, 3,3 diaminobencidina (DAB) 0.2 mM disuelto en 10 ml de la solución de acetato de sodio, adicionando 2.5 µl de peróxido de hidrógeno al 30%. La reacción se suspendió con dos lavados de 20 ml de agua bidestilada.

Para la detección con lectinas, después de bloquear con BSA y lavarlas con PBS-Tween, las membranas fueron incubadas 2 h con 10 µg/ml de las lectinas biotiniladas (Pierce Cat. 41000): Concanavalina A (ConA), aglutinina de *Dolichos biflorus* (DBA), aglutinina de germen de trigo (WGA), aglutinina de cacahuate (PNA), aglutinina de *Pisum sativum* (PSA) y aglutinina de *Ricinus communis* (RCA). Posteriormente, las membranas fueron lavadas en PBS-Tween dos veces, e incubadas con extravidina-peroxidasa (Sigma, E-2636), diluida 1:2000, durante 2 h. La actividad de peroxidasa se determinó como se explicó en inmunodetección.

Obtención de secuencia N-terminal

Para poder determinar la secuencia del extremo amino, la α_2M purificada fue reducida con 2ME y separada por SDS-PAGE en geles al 7.5%. Las bandas de proteínas fueron electrotransferidas a una membrana de PVDF 0.2μ (Inmobilon P), utilizando una solución de 25 mM de Tris, 190 mM de glicina, 20% de etanol (Towbin y cols., 1979) en un sistema Mini Protean II Transblot (BioRad Laboratories) a 200 mA por 105 min, con sistema refrigerante. Las membranas fueron teñidas con Coomassie (Coomassie Brilliant Blue R 0.1%, metanol 50% en agua) durante 1 min, desteñidas con metanol al 50% y lavadas con agua desionizada. Las bandas de interés fueron cortadas y lavadas exhaustivamente con 5 litros de agua desionizada antes de ser enviadas a la Universidad de California, Davis (Molecular structure facility), para su secuenciación.

Purificación de α_2M

El plasma fue dializado contra la solución A (Tris 50 mM, pH 8.0), a 4°C, toda la noche, con un recambio y, posteriormente, centrifugado a 10,000x*g* durante 20 min, a 4°C. El sobrenadante (10 ml) se aplicó a una columna de Blue-Sepharose® de 20 ml, equilibrada con solución A, a un flujo de 0.2 ml/min, en un cromatografo Gradifrac® (Amersham Pharmacia, Uppsala, Suecia).

La columna se lavó con 60 ml de solución A, y se aplicó un gradiente lineal de 0 a 1 M de NaCl en solución A. Se colectaron fracciones de 2 ml a las cuales se les determinó concentración de proteínas y actividad de α_2M. Las fracciones que con actividad α_2M se mezclaron, se concentraron por ultrafiltración en unidades Centricon® (corte 100 kDa) y se dializaron contra la solución B (Tris 100 mM, pH 8). La concentración de NaCl de las fracciones se ajustó a 3 M y se centrifugó a 10,000 *g* durante 20 min, a 4°C, para eliminar las proteínas precipitadas. El sobrenadante fue aplicado a

una columna de Phenyl-Sepharose® HiTrap (Pharmacia) de 1 ml equilibrada con la solución B + NaCl 3 M (pH 8), a un flujo de 0.2 ml/min. La columna fue lavada con 15 ml de la misma solución y posteriormente se aplicó un gradiente lineal de 3 M a 0 M de NaCl en solución B. A las fracciones se les determinó proteína total, actividad α_2M y se analizaron por SDS-PAGE. Las fracciones conteniendo la α_2M purificada fueron concentradas por ultrafiltración y se les agregó NaCl a una concentración final de 0.45 M para mantener la estabilidad de la proteína.

Cromatografía de filtración en gel

Para determinar el peso molécular nativo de la α_2M se usó Bio-Gel A-5m(Bio-Rad), en una columna con 130 ml de gel, usando Tris 50 mM, pH 8 con 0.45 M de NaCl, como buffer de elusión. Para calcular el peso molecular se usaron marcadores (Gel filtration, Bio-Rad Cat. 151-1901).

Preparación de lisado de hemocitos

Los hemocitos se separaron del plasma por centrifugación, se lavaron dos veces con solución anticoagulante fría (4°C), se resuspendieron en amortiguador de cacodilatos 10 mM (pH 8) y se sonicaron (Brandson, Ultrasonic), en baño de hielo, con 4 pulsos de 30 seg cada uno. El lisado se centrifugó a 10,000x*g* durante 15 min a 4°C y el sobrenadante, llamado sobrenadante de lisado de hemocitos (SLH), fue separado y utilizado en la purificación de la EAPFO.

Actividad proteolítica

La actividad proteolítica fue cuantificada utilizando azoalbúmina como sustrato, de acuerdo a García-Carreño (1993). La muestra (100 µl) fue incubada con 500 µl de azoalbúmina (0.1% disuelta en Tris 50 mM, pH 8) durante 30 min, a 37°C. La reacción se suspendió con 200 µl de TCA (ácido

tricloroacético) al 20% y la proteína no digerida se separó por centrifugación a 10,000x*g* durante 15 min. La actividad se calculó determinando la densidad optica del sobrenadante a $A_{360\ nm}$ y comparándola contra una curva estándar de tripsina.

Para cuantificar la actividad proteolítica también se utilizó BAPNA según el método de Erlanger (1961) modificada para microplaca, donde 10 µl de muestra se incubaron por 30 min, con 200 µl de BAPNA (1 mg/ml en diluída en DMSO y posteriormente ajustando con agua a una concentración final de 1 mM). La A_{410nm} se determinó en un lector de microplaca. Se usó tripsina bovina comercial como control y la unidad de actividad amidolítica fue definida como la cantidad de enzima la cual puede hidrolizar 1 µM de BAPNA en 1 min (E_{410nm} de p-nitroanilina=8.8 cm^2/mmol).

Para detectar la actividad proteolítica en geles de poliacrilamida al 10%, se aplicaron 10-20 µg de muestra y se corrió la electroforesis a 15 mA durante 2.5 horas en condiciones desnaturalizantes no reductoras (Garcia-Carreño y cols. , 1993). Posteriormente los geles se lavaron con agua desionizada, se incubaron con Tris 50 mM (pH 8) durante 10 min y se incubaron 30 min a 4°C y 90 min a 25°C con una solución de caseína al 2% (en Tris 50 mM, pH 8). El gel se lavó con agua destilada para eliminar la caseína no absorbida y finalmente el gel se tiñó con colorante de Coomassie. Las bandas con actividad de proteinasa se observan como zonas claras con un fondo azul.

Purificación de la EAPFO

Para la purificación de la EAPFO, el STI fue inmovilizado en Sepharose, de acuerdo al manual técnico de Pharmacia Chemical (1979). Se pesaron 2 g de Sepharose 4B activada con bromuro de cianógeno (Sigma) y se adicionaron 20 ml de HCl 1 mN, incubándose durante 15 min a temperatura ambiente. Posteriormente el gel se lavó dos veces con 200 ml de la misma solución. Después de decantar el HCl, el gel se incubó con 10

ml de $NaHCO_3$ 0.1 M (pH 8.3) durante 5 min a temperatura ambiente y con agitación suave. Se permitió la sedimentación del gel, se decantó y se incubó con 10 ml de $NaHCO_3$, 15 min a temperatura ambiente, con agitación. El gel se decantó y se incubó 2 h a 25°C con 7 ml de solución de STI (5.5 mg/ml en amortiguador de $NaHCO_3$). Después se dejo sedimentar y el sobrenadante se eliminó por decantación. Posteriormente los grupos activos fueron bloqueados incubando el gel con glicina 0.2 M (pH 8.3), durante 48 h a 4°C. Finalmente el gel se lavó exhaustivamente con Tris 50 mM (pH 7.8) y se empacó una columna de 5 ml, equilibrada con la misma solución.

La muestra (2 mg de SLH) fue aplicada a la columna (flujo = 0.1 ml/min) y las proteínas no unidas al gel, consideradas como SLH libre de proteinasas, fueron eluídas con 15 ml de Tris 50 mM (pH 7.8). La proteína unida a la columna se eluyó utilizando HCl 1 mN. Se colectaron fracciones de 1 ml y a cada una se les determinó la concentración de proteína y actividad proteolítica.

Activación e inhibición del sistema proFO

Se incubaron 10 µl de SLH libre de proteinasa, con 10 µl de enzima activadora durante 30 min a 37°C. Finalmente se agregó L-DOPA para determinar la actividad fenoloxidasa de acuerdo a la metodología descrita por Hernández-López (1996). La reacción se monitoreo en forma cinética durante 10 min, tomando lecturas cada minutó, en un lector de microplacas (Bio-Rad) a 490 nm. Como control positivo de activación se utilizó tripsina (0.1 mg/ml).

La inhibición de la EAPFO se realizó incubando 10 µl de α_2M (1 µg/µl) con 10 µl de la EAPFO (0.5 µg/µl) o 10 µl de un lisado de hemocitos durante 30 min, a 37°C. El efecto inhibidor de la α_2M se midió, determinando la capacidad residual de la EAPFO para transformar la proFO. La cantidad de

proFO transformada se midió por la formación de dopacromo, el cual se leyó a 490 nm.

Diseño de oligonucleótidos para α_2M

Los oligonucleótidos o primers fueron diseñados basándose en las secuencias del N-terminal determinadas para la α_2M del camarón blanco. También se diseñaron primers para las regiones conservadas obtenidas por la alineación de las secuencias de α_2M de humano, *Limulus*, *Drosophila* y *Anopheles*, reportadas en el GeneBank (# de acceso AAH40071, D83196, Y11116, AF203333 respectivamente), utilizando el programa Clustal X 1.8. Las secuencias consenso y los primers diseñados son los se presentan en la tabla 1. El contenido de citocinas y guanidinas (G-C), la temperatura de alineación (Tm) y la formación de dímeros se calculó utilizando el programa Oligo Calculator (*http://www2.nwfsc.noaa.gov/protocols/Oligo*TMcalc.html). Los oligonucleótidos fueron sintetizados por Sigma-Genosys.

Tabla 1: Secuencia de nucleótidos (primers) diseñados en base a la secuencia de aminoácidos de regiones consenso de α_2M de diferententes organismos. El número en superíndice muestra la posición en la secuencia de la proteína de *Limulus*.

Identifacación del primer	Secuencia consenso	Secuencia de nucleótidos
Nam	LTPPQLANV	ACISCICCIYTICARYTIGCIAAYG
Bait Fw	^{823}YFPETWLW	TAYTTYCCIGARACITGGYTITGG
Bait Rv	^{823}YFPETWLW	CCAIARCCAIGTYTCIGGRAARTA
Thiol 1 Fw	^{1061}PYGCGEQN	GGITGYGGIGAGCAGAATATG
Thiol 1 Rv	^{1061}PYGCGEQN	CATRTTYTGYTCICCRCAICC
Thiol 2 Fw	^{1063}GCGEQNMV	GGITGYGGIGAGCAGAATATG
Thiol 2 Rv	^{1063}GCGEQNMV	CATRTTYTGYTCICCRCAICC
Rec Rv	^{1399}MKMVSGW	GGIATRAAICCISWIACCATYTTCA
Reg 60	^{1130}TWLTAFV	XACRAAXGCXGTYAACCAXGT

Purificación de DNA genómico de camarón blanco.

El DNA genómico fue purificado siguiendo la técnica de Bradfield y Wyatt, (1983) modificada por Barillas-Mury (1992). Tres gramos de músculo fresco de camarón fueron triturado en un mortero estéril con 6 ml de buffer de homogenización frío (SDS 0.5%, EDTA 100 mM, pH 8.0, proteinasa K 200 µg/ml). Posteriormente, se agregaron otros 12 ml de buffer de homogeneización y se incubó a 55°C durante 24 horas. El DNA fue extraído con 16 ml de fenol neutro (pH 8) saturado y 16 ml de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1). La mezcla se centrifugó a 500x*g* a temperatura ambiente, por 10 minutos y el sobrenadante fue removido y transferido a otro tubo para repetir el procedimiento. Finalmente el DNA se precipitó con 50 ml de etanol absoluto frío, lavado con etanol al 70% y resuspendido en 10 ml de Tris-HCl 10 mM, pH 7.5, NaCl 20 mM. La muestra fue incubada 30 minutos, a 60°C, con 100 µg/ml (concentración final) de RNAsa libre de DNAsa. Se agregó SDS hasta una concentración final de 0.5% y proteinasa K (100 µg/ml) y se mantuvo la incubación a 55°C durante 1 h. El DNA fue extraído, dos veces, con fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1), lavado con etanol al 70%, resuspendido en 3.0 ml de buffer TE (Tris-HCl, 10 mM, EDTA, 1 mM, pH 8.0) y se almacenó a 4°C hasta su utilización.

Aislamiento de RNA mensajero.

Hemocitos provenientes de 3 ml de hemolinfa, fueron resuspendidos en 1 ml de solución de lisis/unión (Tris HCl 10 mM pH 7.5, LiCl 500 mM, EDTA 10 mM pH 8, DTT 5 mM y LiDS 1%) y se homogenizaron, con 4 pulsos de 10 seg, en un sonicador Brandson. Para hepatopáncreas, 500 mg de tejido fueron homogenizados en 3 ml de solución de lisis/unión.

El mRNA de los hemocitos y del hepatopáncreas fue aislado utilizando oligo dT inmovilizado en partículas magnéticas Dynabeads Oligo $(dT)_{25}$ (Dynal®, Oslo Noruega), siguiendo las instrucciones del fabricante. En resumen, 1 ml

del lisado de tejido se incubaron 5 min a temperatura ambiente, con 250 µl de Dynabeads. Las Dynabeads se recuperaron con un magneto (Dynal MPC-E®) y se lavaron 3 veces con 1 ml de Tris-HCL 10 mM, LiCl 0.15 M, EDTA 1 mM (pH 8.0) y 3 lavados adicionales con Tris-HCL 10 mM, EDTA 1 mM (pH 8.0). Finalmente, el mRNA fue eluido de las esferas con 20 µl de EDTA 2 mM (pH 8), incubando 2 min, a 65°C, y sedimentando las esferas con el magneto.

Síntesis de cDNA.

La síntesis de cDNA se realizó utilizando la Superscript II™ RNase H- Reverse Transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). De acuerdo a las instrucciones del proveedor, 500 ng de mRNA aislado se mezclaron con 1 µl (500 µg/ml) de oligo $(dT)_{12-18}$, y se ajustó el volumen a 10 µl con agua estéril tratada con dietilpirocarbonato (DEPC) al 0.1%. La mezcla fue calentada 10 min a 70°C en un baño de agua y después fue enfriada en hielo durante 2 min. La mezcla se centrifugó 30 seg a 10000x*g*, a temperatura ambiente (para concentrar toda la solución en el fondo del tubo), y se añadieron 4 µl de Tris-HCl 250 mM, pH 8.0, KCl 375 mM, $MgCl_2$ 15 mM, 2 µl de DTT 0.1 M, 1 µl de mezcla de dNTP's (dATP, dTTP, dCTP, dGTP 10 mM c/u, pH 7.0). Los componentes de la mezcla fueron agitados suavemente e incubados a 42°C por 2 minutos. Posteriormente, se agregó 1 µl de Superscript II (200 U/ µl), mezclando perfectamente y se incubó a 42°C por 50 min. La enzima se inactivó por calor a 70°C, 15 min.

Amplificación de fragmentos por reacción de PCR

Las reacciones de PCR se hicieron utilizando DNA genómico de músculo y el cDNA obtenido a partir de mRNA de hemocitos y hepatopáncreas en un termociclador PTC 200 DNA Engine (MJ Research Inc, Waltham MA, USA). Se utilizaron varias combinaciones de los oligonucleótidos específicos para

α_2M. Las condiciones de amplificación aplicadas a las reacciones de PCR fueron las siguientes: un ciclo de desnaturalización de 94°C/3 min, alineación a 55°C/1 min y extensión a 72°C/1 min; un ciclo de desnaturalización a 94°C/1 min, alineación a 42°C/1 min y extensión a 72°C/3 min; 33 ciclos de desnaturalización a 94°C/1 min, alineación a 52°C/1 min y extensión a 72°C/3 min; por último, un ciclo de extensión a 72°C/10 minutos. Los controles negativos contenían todos los componentes excepto uno de los dos primers.

Análisis de los productos de PCR

Los productos obtenidos por PCR fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa al 1 y 1.6 % usando buffer TAE (Tris-acetato de sodio 0.04 M, EDTA 0.01 M, pH 8.0). Para determinar el tamaño de los fragmentos se utilizaron estándares de peso molecular de DNA 1 Kb ladder (Invitrogen, Gaithersburg, MD. EUA). Tanto a las muestras como a los estándares se les agregó buffer carga para DNA (0.15% azul de bromofenol, 0.15% de azul de xilen cianol y 33% de glicerol). Después de cargar las muestras (15 µl), los geles corrieron 90 min a 70 volts. Después de la electroforesis, los geles se tiñeron con bromuro de etidio (1 µg/ml) durante 1 min y se lavaron con agua destilada por 15 min. Las bandas se visualizaron, a 312 nm, utilizando un transiluminador TFX-35M (InvitroGen, Gaithersburg MD. EUA) y se fotografiaron con una cámara digital EDAS DC120 (Kodak, Rochester, NY).

Clonación de productos de PCR

Los productos de PCR se separaron por electroforesis en geles de agarosa de bajo punto de fusión y se eluyeron utilizando el kit QIAquick DNA extracción (Qiagen Inc. USA), siguiendo las instrucciones del proveedor.

La transformación se realizó, mezclando perfectamente, 2 µl de la reacción de ligación, realizada deacuerdo a las indicaciones de proveedor, a 50 µl de células de *Escherichia coli* (cepa DH5∝) químicamente competentes. La mezcla se incubó 20 min, en hielo y después a 42°C por 40-50 seg. La mezcla fue incubada nuevamente en hielo por 2 min, se añadieron 950 µl de medio SOC (triptona 2%, extracto de levadura 0.5%, NaCl 10 mM, KCl 2.5 mM, $MgCl_2$ 2M, glucosa 20 mM) y se incubó en un agitador orbital Lab-line 3527 (Lab-line, Melrose Park, IL, EUA) a 200 rpm, a 37°C, por 1.5 h.

Posteriormente, el cultivo se centrifugó 5 min a 800x*g* y el paquete bacteriano fue resuspendido en 200 µl de medio SOC. Finalmente 50 y 150 µl, se esparcieron sobre la superficie de placas de LB-ampicilina (100 µg/ml), con 40 µl/placa de IPTG (100 mM) y 40 µl/placa de X-gal (40 mg/ml). Las placas fueron incubadas a 37°C toda la noche.

Liberación de los insertos

El DNA plasmídico de los recombinantes fue aislado por extracción alcalina rápida o "minipreps" (Sambrook y cols., 1989). Las clonas recombinantes se sembraron en 5 ml de caldo LB con ampicilina (100 µg/ml) y se incubó toda la noche a 37°C, a 250 rpm. 1.5 ml del cultivo fueron centrifugados 10 min, a 10,000x*g* y temperatura ambiente. El paquete celular fue resuspendido en 250 µl de solución I (glucosa 50 mM, Tris-HCl 25 mM, pH 8.0, EDTA 10 mM) y se añadieron 250 µl de solución de lisis (solución II: NaOH 0.2 N, SDS 1%), la cual tiene que ser preparada inmediatamente antes de su utilización. Después de mezclar perfectamente la muestra se incubó 10 min, a temperatura ambiente. Posteriormente, se adicionaron 250 µl de solución III a 4°C (60 ml de acetato de potasio 5 M, 11.5 ml de ácido acético glacial, 28.5 ml de H_2O), se incubó en hielo por 15 min y se centrifugó por 10 minutos a 15,000 g. Se separó el sobrenadante, se le agregaron 500 µl de isopropanol y se centrifugó 30 min, a 15,000 g y 22°C. El sobrenadante se

eliminó y el precipitado, conteniendo el DNA plasmídico, se lavó con 300 µl de etanol al 70% frío, el cual fue eliminado por centrifugación. El DNA fue secado al vacío por 10 minutos en un concentrador Speedvac® Savant AES2010 (Holbrook, NY, EUA) y resuspendido en 50 µl de H_2O desionizada estéril. Se le añadió 1 µl de RNasa (10 mg/ml) y se incubó por 1 h a 37°C. Posteriormente, se le agregaron 350 µl de agua desionizada estéril y se hicieron dos extracciones con fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1), centrifugando entre cada extracción a 15,000x*g* por 2 minutos y recuperando la fase superior. Se agregó un volumen de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1) y el DNA (fase acuosa superior) se precipitó con dos volúmenes de etanol absoluto y 1/10 de volumen de acetato de sodio 3 M (pH 5.2) e incubando a –20°C por 1 hora. Finalmente, las muestras fueron centrifugadas 30 min, a 13,000x*g* y 4°C y el sobrenadante fue descartado. El precipitado se lavó con etanol al 70% frío (centrifugando a 15,000x*g* por 5 minutos) y el DNA plasmídico fue resuspendido en 20 µl con H_2O desionizada estéril.

La concentración del DNA plasmídico se determinó midiendo la absorbancia a 260 en un espectrofotómetro Lambda Bio 20 (Perkin Elmer, Norwalk, CT, EUA), considerando que una unidad de $A_{260\ nm}$ es equivalente a 50 µg/ml (Sambrook y cols. , 1989). Además se estimó la pureza por la relación $A_{260/280}$ (Sambrook y cols. , 1989).

Los insertos fueron liberados por digestión con *Eco*R I (Gibco), incubando durante 2 h, 1 µg de DNA plasmídico con 5 U de la enzima, 1 µl buffer 10X provisto por el fabricante y H_2O desionizada estéril para ajustar el volumen a 10 µl. Los productos de la reacción fueron separados por electroforesis en geles de agarosa al 1.6%.

Secuenciación y análisis de Secuencias.

Las muestras de DNA plasmídico purificado de los clones seleccionados, fueron enviados al Laboratory of Molecular and Systematic Evolution, de la Universidad de Arizona, para su secuenciación en un secuenciador automático 2 ABI 337.

Las secuencias fueron analizadas utilizando el programa DNASIS 2.5 (Hitachi Software Engineering America, Ltd. Alameda, CA, EUA). Posteriormente, las secuencias de nucleótidos y/o aminoácido deducidos, fueron comparadas en las bases de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information) utilizando el programa BLAST, (http/: www.ncbi.nlm.gov/blast).

Resultados y Discusión

En el sistema inmune del camarón existen varios componentes involucrados en los tres procesos importantes de la respuesta inmune: reconocimiento, liberación y activación de efectores y moléculas de control. Dentro de las moléculas de reconocimiento se pueden citar dos que han sido descritas: proteínas que reconocen LPS y proteínas que reconocen β-glucanos. Las moléculas que funcionan como efectores actúan coordinadamente en forma de sistemas como el de la profenoloxidasa y el de coagulación, asi como aquellas que presentan una acción propia como la lisozima y los péptidos antimicrobianos. Finalmente, debido a que los principales procesos de activación del sistema de defensa involucran proteólisis, los inhibidores de proteinasas han sido propuestos como reguladores.

Detección de α_2M en plasma de camarón

Los inhibidores de proteinasas están ampliamente distribuidos en los organismos y una de sus papeles fisiológicos es controlar la proteólisis no deseada (Laskowski y Kato, 1980). Utilizando un ensayo de inhibición de tripsina, se demostró que en el plasma del camarón existen inhibidores de proteinasas (Figura 1). Sin embargo, en plasma de artrópodos existen diferentes tipos de inhibidores (Hall y Söderhäll, 1982; Boigegrain y cols., 1992; Lanz y cols., 1993), entre los que se encuentran los tipo Kazal (Johansson y cols. , 1994), Kunitz (Nakamura y cols., 1987; Nirmala y cols., 2001) y α_2M (Spycher y cols. , 1987; Hergenhahn y cols. , 1988; Armstrong y cols. , 1991).

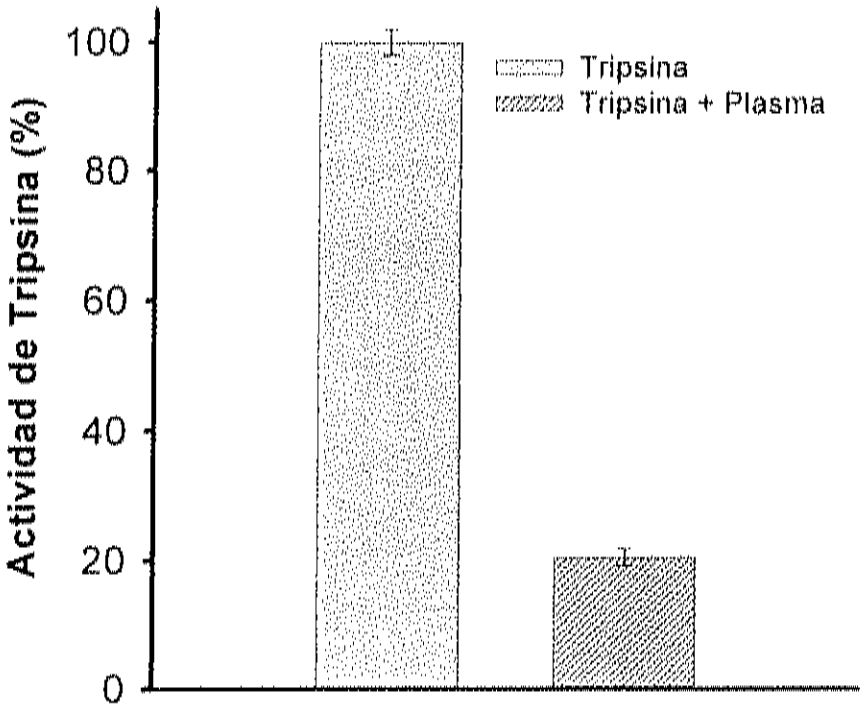

Figura 1: Actividad de inhibidores de proteinasas presente en hemolinfa de camarón blanco. Se usó azocaseína como sustrato. Try: tripsina, try-plasma: inhibición de tripsina al agregar plasma. La A_{336nm} mide la cantidad de sustrato digerido por la tripsina.

Para demostrar específicamente la presencia de inhibidores tipo α_2M, se tomaron alicuotas de tripsina (0.1 mg) que fueron incubadas con diferentes cantidades de plasma. Posteriormente la tripsina no atrapada dentro de la molécula de α_2M, fue bloqueada con STI. La actividad amidolítica sobre un sustrato de bajo peso molecular (BAPNA) demostró la existencia, en el plasma de camarón, de un inhibidor tipo α_2M. Esta actividad tuvo una relación directamente proporcional a la cantidad de plasma utilizada (Figura 2).

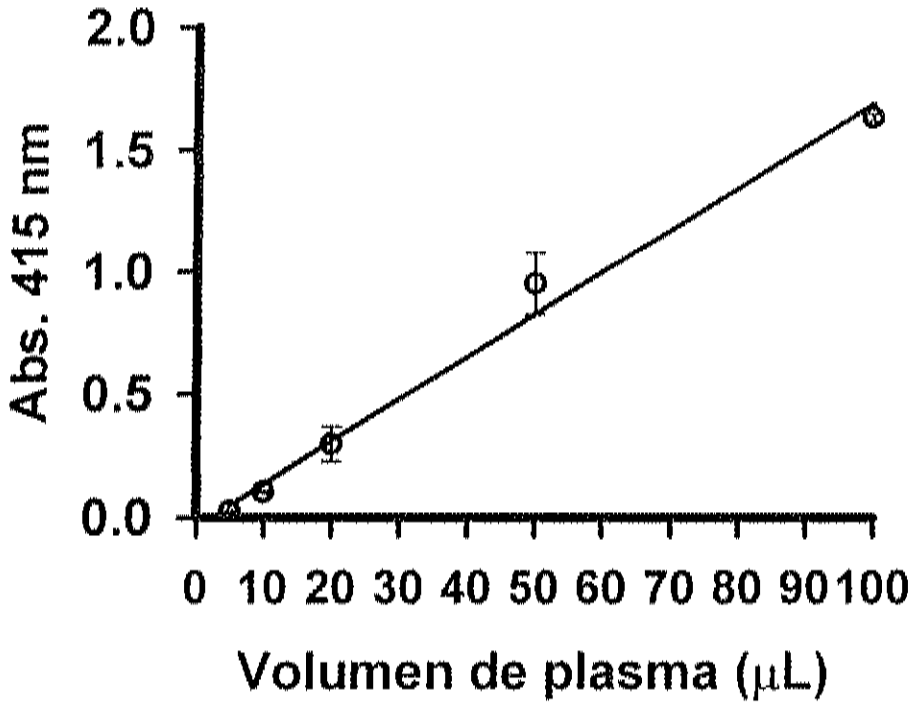

Figura 2: Actividad de un inhibidor de proteinasas tipo α_2M en diferentes cantidades de plasma de camarón. El ensayo se realizó usando el método de protección de la tripsina. La absorbancia a 495 nm mide la actividad.

Esto fue confirmado al incubar el plasma de camarón con metilamina y observar la pérdida de actividad inhibitoria del plasma (Figura 3). Esto está basado en el hecho que, las α_2M característicamente tienen un enlace tiol éster reactivo, formado entre una cisteína y una glutamina. El tiol éster de la α_2M puede reaccionar con aminas primarias pequeñas como amonio y metilamina. La unión amina de la primaria impide la unión de la proteinasa a la α_2M y por puede ser "protegida". La inactivación de α_2M por metilamina es una herramienta importante en la detección de α_2M (Armstrong y Quigley, 1999).

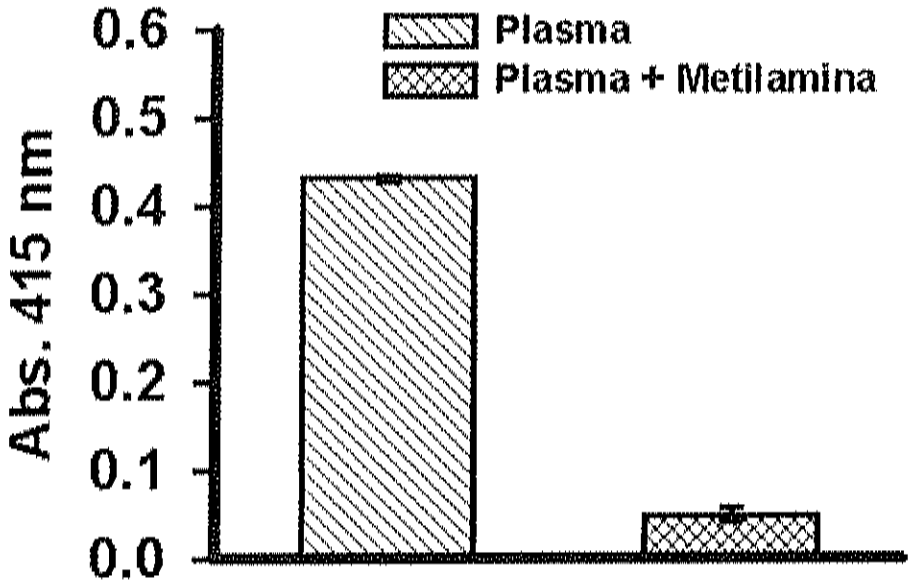

Figura 3: Inhibición de la α_2M de hemolinfa de camarón por metilamina. El ensayo se realizó incubando plasma con 200 mM de metilamina durante 24 horas.

Purificación de la α_2M

Para purificar la α_2M de camarón se utilizó plasma libre de células, el cual fue dializado con la intención de eliminar las sales, principalmente NaCl. El plasma del camarón contiene 450 mM de NaCl, 10 mM de KCl, con una fuerza osmótica de 850 mOsm/kg y un pH de 7.2 (Vargas-Albores y cols. , 1993). Durante la diálisis también se elimina la proteína llamada BGBP, la cual precipita cuando el plasma es dializado contra soluciones con baja salinidad (Vargas-Albores y cols. , 1997). El plasma dializado se aplicó a una columna de Blue-Sepharose, donde la mayor actividad α_2M no fue retenida por la columna (Figura 4A). Sin embargo, este procedimiento permitió separar la proteína de coagulación (CP), la cual tiene un tamaño similar y otras propiedades cromatográficas similares a la α_2M que dificulta su purificación. Sin embargo, la α_2M fue co-eluída con hemocianina (Figura

4B), otra proteína plasmática difícil de separar, y que frecuentemente, ha entorpecido los procesos de purificación de otras proteínas plasmáticas del camarón incluyendo CP (Montaño-Pérez y cols., 1999; Reyes-Izquierdo y Vargas-Albores, 2001), BGBP (Vargas-Albores y cols. , 1997) y proFO (Gollas-Galván y cols. , 1999).

La α_2M pudo separarse de la hemocianina en una columna de Phenyl-Sepharose, donde la α_2M se unió fuertemente a la matriz, mientras que las proteínas contaminantes, principalmente hemocianina, fueron eliminadas en el lavado. La α_2M fue eluida de la columna casi al final del gradiente de NaCl (Figura 5) como una proteína homogénea cuya pureza fue confirmada por PAGE teñido con nitrato de plata (Figura 5B).

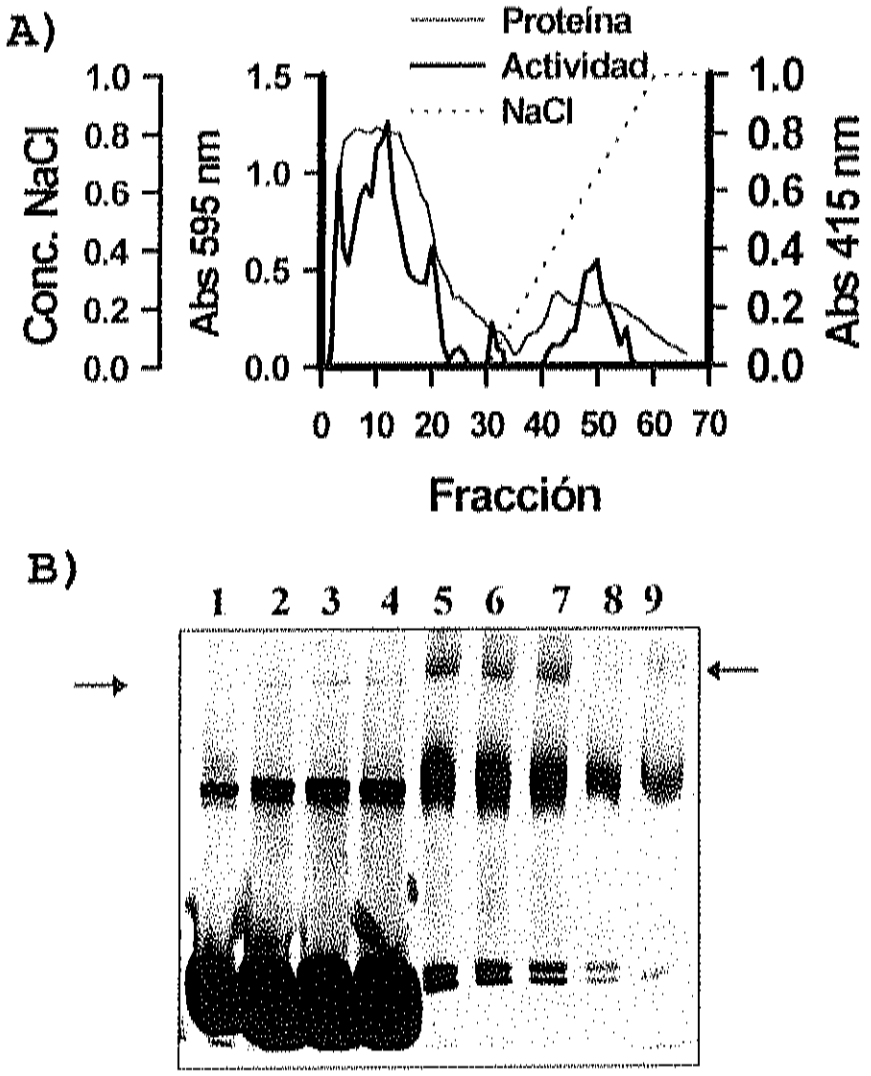

Figura 4: Cromatografía de la α_2M en Blue Sepharose. A) 1-4 fracciones con actividad α_2M, 5-9 fracciones sin actividad. B) Separación de las fracciones de Blue sepharose utilizando gel de poliacrilamida 5%, SDS no reducido. Flecha izquierda indica la banda de α_2M, flecha de la derecha indica la banda de la proteina coaguladora.

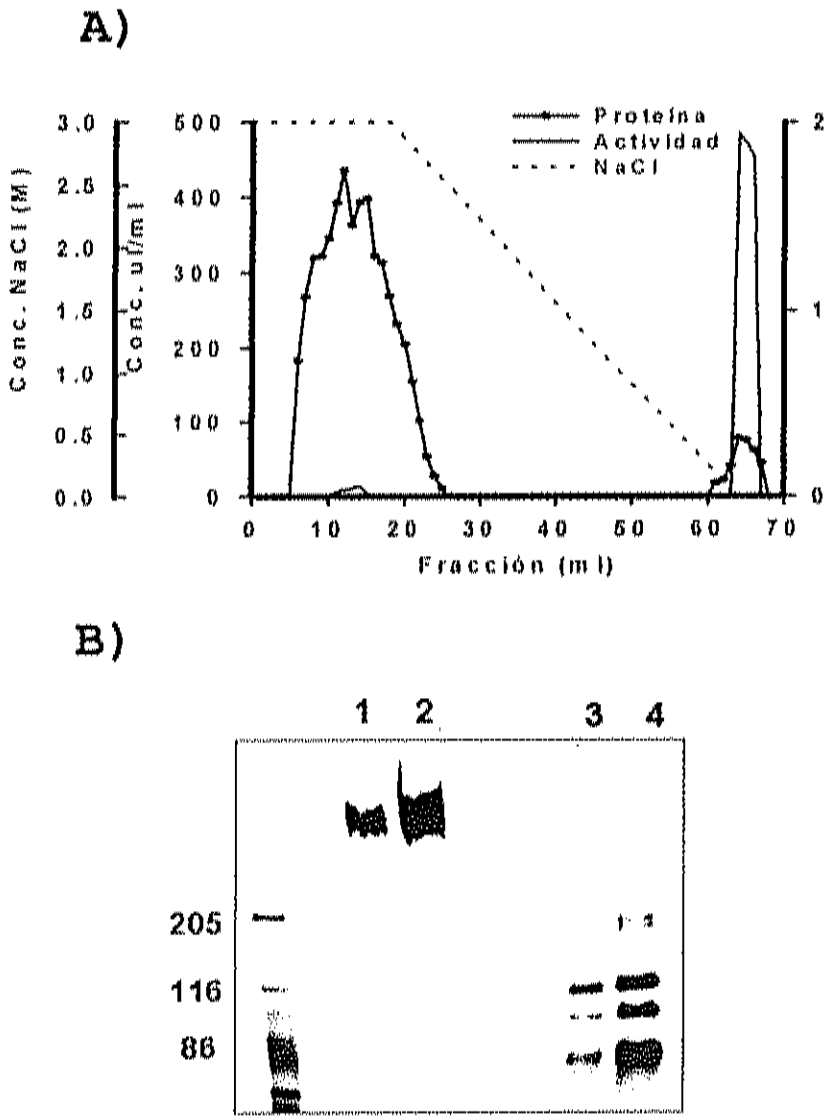

Figura 5: A) Cromatograma de la purificación de la α_2M utilizando Phenyl-Sepharose. Se aplicaron las fracciones con mas actividad provenientes de Blue-Sepharose. B) Gel de poliacrilamida 5%, SDS, carril 1 y 2 no reducido, carril 3, 4, reducido con b mercaptoetanol. Carriles 1 y 3 se aplicaron 5 µg, 2 y 4 se aplicaron 10 µg.

En el plasma de camarón, como en otros crustáceos, la proteína mas abundante es la hemocianina (95%) (Figueroa-Soto y cols., 1997) y su eliminación presenta dificultades técnicas. Dos métodos han sido utilizados para su eliminación: la utracentrifugación, utilizada en la purificación de

α_2M de *Astacus astacus* (Stöcker y cols. , 1991) y la precipitación con polietilen glicol, utilizada en la purificación de α_2M de *Limulus polyphemus* (Armstrong y cols. , 1991).

Utiliando polietilen glicol la α_2M se presipitó junto con la hemocianina y pedidia su actividad, la cual no se recuperaba cuando se eliminaba el polietilen glicol. En este trabajo la hemocianina fue removida exitosamente utilizando cromatografía en Phenyl-Sepharose.

Caracterización de la α_2M del camarón

a) Masa molecular de la α_2M

En condiciones nativas, por electroforesis en geles de gradiente del 4-15%, la α_2M de camarón presenta una masa molecular de 400 kDa (Figura 5B); mientras que utilizando cromatografía de filtración en gel (Bio A 5 M de Bio-Rad) se le calculó un peso molecular de 380 kDa. Cuando la α_2M de camarón fue reducida con 2-ME y analizada por SDS-PAGE, se detectaron cuatro bandas con masas moleculares de 180, 116, 95 y 86 kDa (Figura 5B). El mismo patrón de bandas fue obtenido cuando la proteína fue reducida con DTT. Sin embargo, cuando la α_2M de camarón fue incubada con metilamina y posteriormente reducida, solamente se detectó una banda de 180 kDa (Figura 6). Este resultado indica que la α_2M de camarón es un homodímero de 180 kDa y que la fragmentación observada, ocurre como un producto del tratamiento térmico durante la reducción.

El peso molecular determinado para la α_2M del camarón es similar al reportado para otros crustáceos. Por ejemplo, en *Astacus astacus* la α_2M tiene una masa molecular de 390 kDa y se encuentra formada por dos subunidades idénticas de 185 kDa (Stöcker y cols. , 1991). En otro astacus, *P. leniusculus*, la α_2M tiene un peso molecular ligeramente menor (340 kDa), aunque el peso reportado para sus subunidades es de 190 kDa

(Hergenhahn y cols. , 1988), Al igual que en camarón, cuando la subunidad de α_2M del langostino (*P. leniusculus*) es reducida, se fragmenta, aunque se produce dos fragmentos de 140 y 60 kDa respectivamente. Como es característico de las α_2M, este rompimiento puede evitarse incubando previamente la molécula con metilamina (Hergenhahn y cols. , 1988), ya que que la unión de metilamina al tiolester impide una ruptura del enlace peptídico del tiolester cuando la α_2M es reducida.

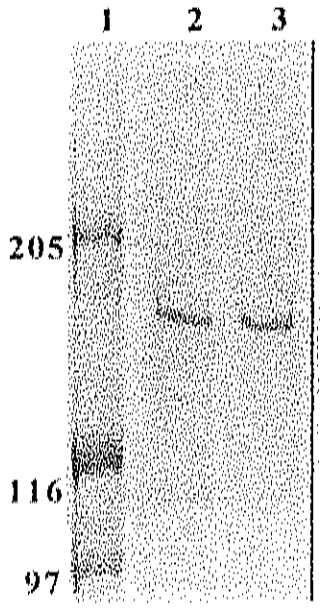

Figura 6: Banda de α_2M purificada y detectada en gel al 5% de poliacrilamida con SDS, la muestra fue corrida en condiciones desnaturalizantes y reductoras, previa incubación con metilamina, carril 2 y 3, carril 1 marcadores de masa molecular.

b) N-Terminal

Después de separar por PAGE, la banda de 180 kDa fue electrotransferida a membrana de PVDF y enviada para la secuenciación del extremo amino. Mediante este análisis se determinó la secuencia de 9 residuos (Tabla 2), los cuales fueron comparados con los extremos amino de la α_2M de otros organismos. La α_2M de camarón presentó un 40% de identidad con la α_2M de *Limulus sp.* (Armstrong y cols. , 1991), mientras que con *Astacus sp.* (Stöcker y cols. , 1991) y *Pacifastacus sp.* (Hergenhahn y cols. , 1988) presentó solo el 20% de identidad. Esta baja de similitu se debe a que el extremo amino de la α_2M es una región poco conservada (Iwaki y cols. , 1996). De hecho en Octopus sp. no existe similitud con esta región comparada con la de otros organismos.

Tabla 2: Secuencia amino terminal de α_2M de camarón blanco y comparación con la secuencia amino terminal de la α_2M de otros organismos. Las letras sombreadas indican resiuduos idénticos y las bold significan remplasamientos conservados.

										10											20			
P. vannamei	-	-	-	-	-	-	-	-	-	**L**	T	X	P	L	Q	L	-	-	-	-	-	A	N	v	-
Astacus[1]	-	-	-	-	-	-	S	**Y**	**I**	**I**	T	T	P	**R**	M	W	V	A	G	S	P	A	Q	v	-
Pacifastacus[2]	-	-	-	-	-	-	S	**Y**	**V**	**I**	T	T	P	**K**	M	W	V	-	-	-	-	-	-	-	-
Homarus[3]	-	-	-	-	-	-	S	**Y**	**I**	**I**	T	T	P	**R**	M	W	V	A	G	S	P	A	Q	v	-
Limulus[4]	-	-	-	-	K	S	G	F	I	L	T	A	P	K	S	L	T	P	G	K	S	N	I	L	N
Octopus[5]	D	E	I	D	E	G	H	Y	M	I	L	V	P	R	N	F	V	H	G	K	-	-	-	-	-
Humano[6]	S	V	S	G	K	P	Q	Y	M	L	-	V	P	S	L	L	H	T	E	T					

1 (Stöcker y cols. , 1991), 2 (Hergenhahn y cols., 1988), 3 (Spycher y cols., 1987), 4 (Iwaki y cols., 1996), 5 (Thogersen y cols., 1992), 6 (Sottrup-Jensen y cols., 1984)

c) Requerimiento de ambiente salino

Después de la purificación por Phenyl-Sepharose, la α_2M perdía su actividad durante el almacenamiento. Esto puede deberse a la ausencia del ambiente proteico aportado por el plasma y/o la baja salinidad en que se

b) N-Terminal

Después de separar por PAGE, la banda de 180 kDa fue electrotransferida a membrana de PVDF y enviada para la secuenciación del extremo amino. Mediante este análisis se determinó la secuencia de 9 residuos (Tabla 2), los cuales fueron comparados con los extremos amino de la α_2M de otros organismos. La α_2M de camarón presentó un 40% de identidad con la α_2M de *Limulus sp.* (Armstrong y cols. , 1991), mientras que con *Astacus sp.* (Stöcker y cols. , 1991) y *Pacifastacus sp.* (Hergenhahn y cols. , 1988) presentó solo el 20% de identidad. Esta baja de similitu se debe a que el extremo amino de la α_2M es una región poco conservada (Iwaki y cols. , 1996). De hecho en Octopus sp. no existe similitud con esta región comparada con la de otros organismos.

Tabla 2: Secuencia amino terminal de α_2M de camarón blanco y comparación con la secuencia amino terminal de la α_2M de otros organismos. Las letras sombreadas indican resiuduos idénticos y las bold significan remplasamientos conservados.

										10											20		
P. vannamei	-	-	-	-	-	-	-	-	-	**L**	T	X	P	L	Q	L	-	-	-	-	-	A	N	v	-
***Astacus*[1]**	-	-	-	-	-	-	S	**Y**	**I**	**I**	T	T	P	**R**	M	W	V	A	G	S	P	A	Q	v	-
***Pacifastacus*[2]**	-	-	-	-	-	-	S	**Y**	**V**	**I**	T	T	P	**K**	M	W	V	-	-	-	-	-	-	-	-
***Homarus*[3]**	-	-	-	-	-	-	S	**Y**	**I**	**I**	T	T	P	**R**	M	W	V	A	G	S	P	A	Q	v	-
***Limulus*[4]**	-	-	-	-	K	S	G	F	I	L	T	A	P	K	S	L	T	P	G	K	S	N	I	L	N
***Octopus*[5]**	D	E	I	D	E	G	H	Y	M	I	L	V	P	R	N	F	V	H	G	K	-	-	-	-	-
***Humano*[6]**	S	V	S	G	K	P	Q	Y	M	L	-	V	P	S	L	L	H	T	E	T					

1 (Stöcker y cols. , 1991), 2 (Hergenhahn y cols., 1988), 3 (Spycher y cols., 1987), 4 (Iwaki y cols., 1996), 5 (Thogersen y cols., 1992), 6 (Sottrup-Jensen y cols., 1984)

c) Requerimiento de ambiente salino

Después de la purificación por Phenyl-Sepharose, la α_2M perdia su actividad durante el almacenamiento. Esto puede deberse a la ausencia del ambiente proteico aportado por el plasma y/o la baja salinidad en que se

encuentra la proteína ya que al final de la purificación, la α_2M queda disuelta en solución con baja salinidad.

La necesidad de un ambiente proteico para la estabilidad de la α_2M se simuló mezclando la proteína purificada con 1 mg/ml de BSA. Aunque se observó un retrazo en la pérdida de actividad, la presencia de BSA no fue suficiente para mantenerla activa por más de 5 días. Por su parte, el almacenamiento de la α_2M en una solución conteniendo 0.45 M de NaCl (salinidad similar a la del plasma del camarón), la proteína se mantuvo estable al menos durante 8 días (Figura 7). Además, la pérdida de actividad de la α_2M en un ambiente de baja salinidad no es reversible; es decir, una vez inactivada, no fue posible recuperar la actividad al agregar NaCl.

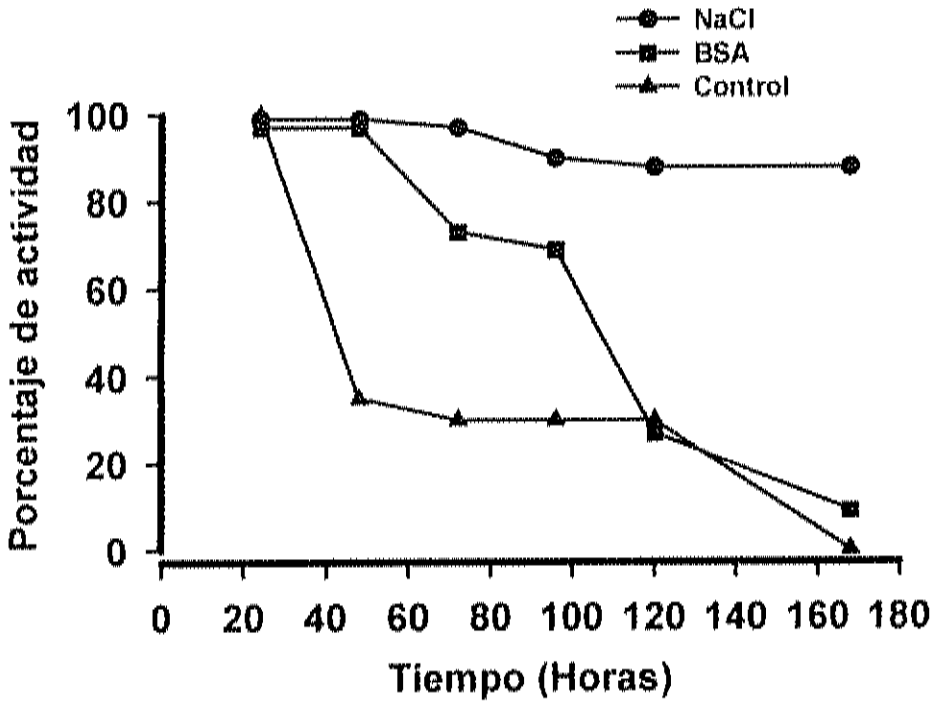

Figura 7: Estabilidad de la α_2M de camarón purificada por Phenyl-Sepharose. La actividad se realizó con el ensayo de protección de la tripsina. Las muestras fueron incubadas a 4°C durante el experimento.

Como en el caso del camarón, la inestabilidad de la α_2M se ha observado en otros organismos (Salvesen y Enghild, 1993) y aparentemente se debe a que, durante periodos prolongados de almacenamiento, suceden procesos de hidrólisis lenta del tiol éster, así como multimerización del disulfuro del tiol. En ambos casos la "inhabilitación" del tiol éster evita que la α_2M mantenga su capacidad inhibitoria.

d) Reconocimiento por anticuerpos anti α_2M de humanos

Los fragmentos producidos por reducción con 2ME, fueron inmovilizados en membrana e incubados con anticuerpos comerciales anti-α_2M de humano. En la Figura 8b se puede apreciar que los anticuerpos anti α_2M de humano reconocen solamente 3 de los 4 fragmentos producidos por la reducción (Figura 8a). Aunque el fragmento de 180 kDa no fue detectado por los anticuerpos, el reconocimiento de las otras bandas (116, 95 y 86 kDa) indica que, en la α_2M de camarón, existen regiones que son antigénicas y probablemente estructuralmente similares a la α_2M de humanos. Aunque la α_2M de humanos presenta 4 subunidades de 180 kDa y la de crustáceos es un dimero de 180-190 kDa, comparte características tanto estructurales como funcionales, además se han encontrado secuencias consenso características de las α_2M, entre ellas la región tiol.

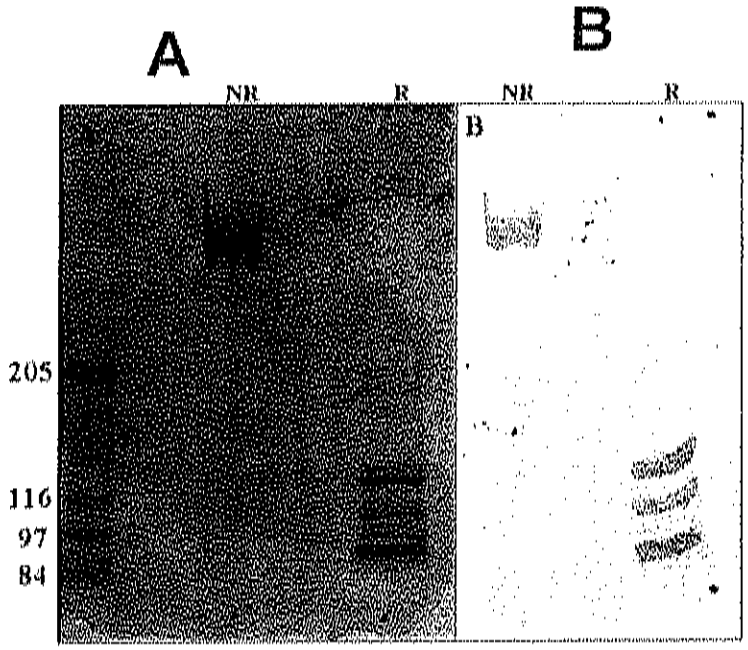

Figura 8: Inmunodetección de la α_2M de camarón utilizando anticuerpos comerciales antí α_2M de humano desarrollados en conejo. A) tinción con Coomassie, B) detección con anticuerpos. NR: No reducida y R:reducido con 2ME.

e) Sensibilidad a Metilamina

Otra característica de la α_2M es la sensibilidad a ser inhibida por la metilamina. Utilizando α_2M purificada de camarón, se probaron diferentes tiempos de incubación (1, 4, 12 y 24 h) con 200 mM de metilamina, encontrándose 50% de inhibición a las 4 horas (Figura 9) y que se requieren 24 h. para su inhibición total.

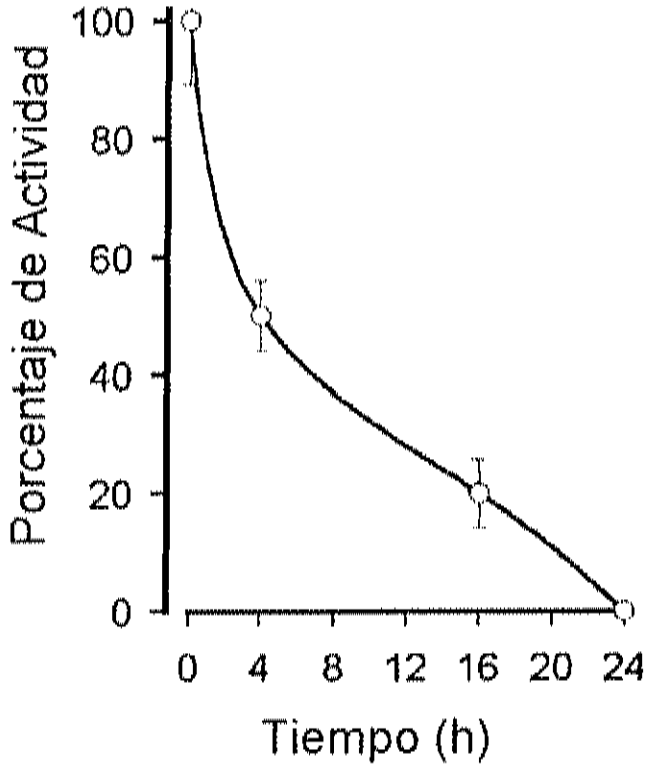

Figura 9: Tiempo de reacción del tiol éster de la α_2M de camarón purificada por Phenyl-Sepharose, con metilamina. Las reacciones se incubaron a temperatura ambiente.

En la reacción de formación de α_2M-proteinasa, de forma similar que en la reacción de formación de α_2M-metilamina, la activación y rompimiento del tiol éster interno de la α_2M expone un nuevo grupo tiol en la cisteína y un γ carbonil reactivo en el residuo glutamilo, el cual en *Limulus sp.* por ejemplo son la Cys^{999} y Glx^{1002}. El tiol éster reactivo interno es roto después de la proteólisis. Este rompimiento del tiol éster genera un γ-carbonilo activado del residuo glutamilo y un tiol libre de la cisteína (Figura 10). El glutamilo reactivo forma un enlace amida con la proteína (proteinasa) o con la metilamina. Sin embargo la reacción con la metilamina es lenta y ocurre en ausencia de proteólisis, pero al reaccionar con metilamina se impide que posteriormente pueda reaccionar con una proteinasa.

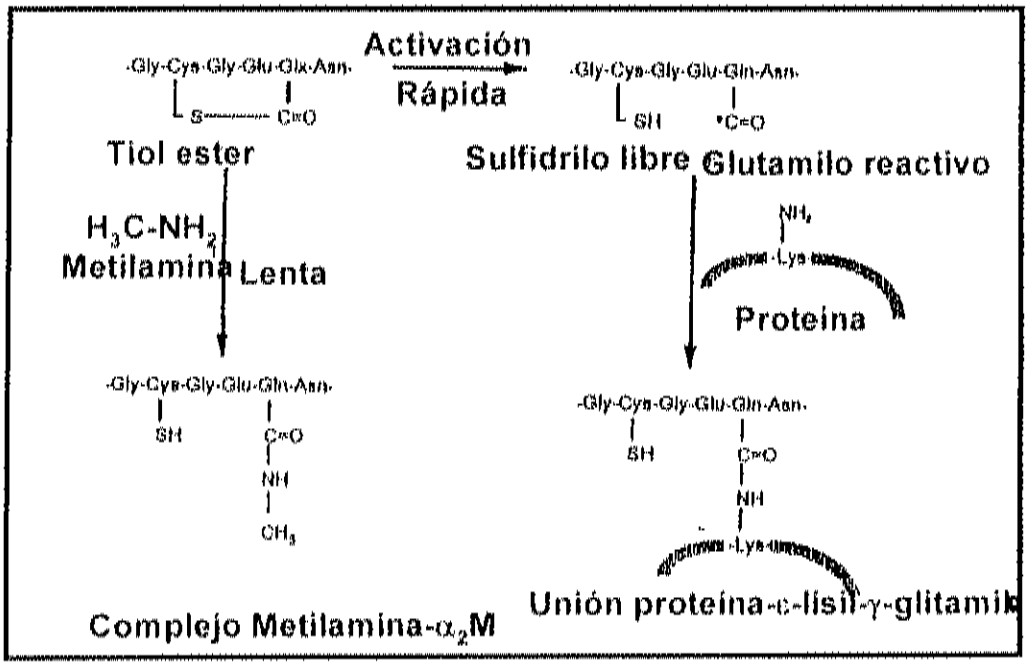

Figura 10: Comparación de la reaccion de α_2M-metilamina y α_2M-proteasa.

Aunque de manera general la reacción α_2M con metilamina es lenta, se ha visto que puede variar entre las α_2Ms de diferente orígenes (Salvesen y Enghild, 1993). Por ejemplo, la α_2M de *Biomphalaria sp.* se inhibe en un 89% a las 6 horas, mientras que la α_2M de *Astacus sp.* solamente requiere 48 horas para ser inhibida en un 85% (Stöcker y cols. , 1991).

f) Glicosilación de la α_2M

Para conocer el tipo de azúcares presentes en la α_2M del camarón, la proteína se inmovilizó y se incubó con lectinas biotiniladas. Como se puede ver en la Figura 11, 2 (PSA y WGA) de 6 las lectinas probadas fueron capaces de reaccionar con la α_2M de camarón, indicando que manosa y β-galactosa están presentes en esta glicoproteína. Estos resultados

concuerdan con lo obtenido en *Limulus sp.*, donde se ha reportado la presencia de manosa en la α_2M (Iwaki y cols. , 1996). En otros organismos como el caracol, *Helix pomatia*, (Yigzaw y cols. , 2001) y el langostino, *P. leniusculus*, (Hergenhahn y cols. , 1988; Kopácek y cols., 2000), también se ha reportado que la α_2M es una glicoproteína y que el contenido de carbohidratos puede llegar a representar el 20% de su masa.

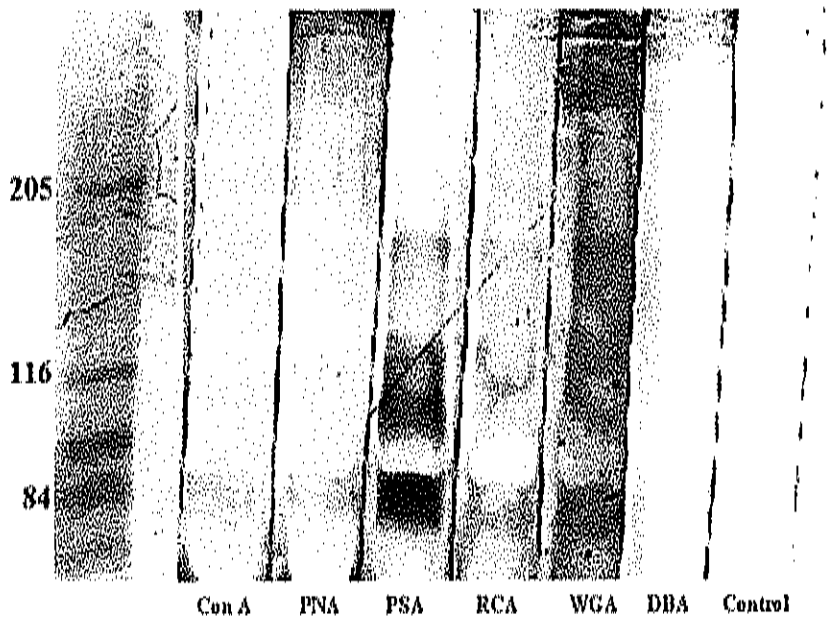

Figura 11: Detección de azúcares por lectinas biotiniladas, en los fragmentos de α_2M producto de la reducción con 2ME.

g) Especificidad de la α_2M

El espectro de inhibición de la α_2M purificada del plasma de camarón se probó con 5 proteinasas, utilizando azoalbúmina como sustrato. Como se puede ver en la tabla 3, la α_2M inhibio tanto endopeptidasas, como exopeptidasas, por lo menos en un 90% en las proteinasas probadas. La capacidad de la α_2M para inhibir a endopeptidasas que tienen diferente especificidad y mecanismo catalítico, está dada por la presencia de la región anzuelo. Esta región, constituida por 30 a 40 aminoácidos, es altamente flexible y contienen uno o más sitios susceptibles al ataque proteolítico para la mayoría de las proteinasas (Bjork y cols. , 1985; Iwaki y cols. , 1996, Armstrong, 1999 #1457).

Esta es una característica distintiva de los miembros de la familia de la α_2M que le proporciona el amplio espectro de inhibición. Dicha propiedad ha sido reportada también en otras especies de crustáceos como *Astacus sp.*, donde la α_2M es capaz de inhibir proteinasas del tipo serina, metalo y cisteína (Stöcker y cols. , 1991). De igual forma, el amplio espectro de inhibición se ha demostrado en moluscos: la α_2M de *Octopus sp.* inhibe elastasa, quimotripsina, tripsina y termolisina (Thogersen y cols. , 1992) la α_2M de *Biomphalaria glabrata* inhibe bromelina y termolisina (Kopácek y cols. , 2000).

Tabla 3: Proteinasas inhibidas por la α_2M de camarón blanco.

Enzima	Sin α_2M (Abs 366 nm)	Con α_2M (Abs 366 nm)
Leucinamino peptidasa	0.45 ± 0.02	0.02 ± 0.002
Tripsina	1.20 ± 0.13	0.09 ± 0.006
Quimotripsina	0.83 ± 0.06	0.12 ± 0.001
Elastasa	0.62 ± 0.03	0.03 ± 0.005
Papaina	1.1 ± 0.09	0.20 ± 0.09

El papel de la α_2M en el sistema de activación de la proFO

En el proceso de activación de la proFO, una proteinasa tipo serina es la responsable de transformar la proFO a FO (Söderhäll, 1981; Ashida y Söderhäll, 1984). Esta enzima, la EAPFO, se localiza como zimógeno en los gránulos de los hemocitos. Cuando los hemocitos son estimulados por un agente extraño se produce la exocitosis controlada de los gránulos, los cuales vierten su contenido al espacio extracelular o al plasma, si se encuentran en circulación. En camarón la EAPFO es activada por el calcio plasmático y se inicia la transformación de la proFO (Gollas-Galván y cols., 1997). Sin embargo, una vez liberada, las proteinasas mantiene la actividad y pueden llegar a lesionar los tejidos y proteínas propios.

Se ha propuesto que la α_2M y factores séricos del tipo antitripsina son los principales mecanismos de inactivación de la actividad proteolítica residual (Sugumaran y cols., 1985; Hergenhahn y cols. , 1988; Donovan y Laue, 1991; Armstrong y cols. , 1996). Para demostrar el papel de la α_2M en el sistema inmune de camarón fue necesario aislar los componentes proteicos involucrados (proFO, EAPFO y la α_2M) y reproducir *in vitro* la activación y desactivación de proteinasas.

Purificación de la EAPFO

Para la purificación de la EAPFO se utilizó una columna de STI-Sepharose. El STI fue inmovilizado en Sepharose activada con bromuro de cianógeno y la capacidad de la columna se probó aplicando tripsina comercial. La columna de 5 ml fue capaz de atrapar 1 mg de tripsina, la cual fue eluída con HCl 1 mM.

Para purificar la EAPFO, los hemocitos provenientes de 9 ml de hemolinfa fueron lisados y concentrados hasta 1.5 ml (2.4 mg de proteina total). La muestra se aplicó en la columna de STI-Sepharose y las proteínas no retenidas se eliminaron lavando con 25 ml de Tris 50 mM, pH 8. La proteína

unida a STI-Sepharose fue eluída utilizando HCl 1 mM, colectando fracciones de 1 ml. A las fracciones se les determinó la concentración de proteína por el método de Bradford y su actividad proteolítica utilizando BAPNA como sustrato.

Como puede observarse en la Figura 12, se detectaron dos picos de actividad en las fracciones eluídas con HCl. Las fracciones correspondientes a cada pico se mezclaron y se concentraron en microfiltros Amicon® con corte de 10 kDa, por separado. El primer pico, M1, contenía 15 μg de proteína/ml y 25 unidades; mientras que la segunda fracción activa, M2, tenía 8 μg de proteína/ml y una actividad catalítica equivalente a 10 unidades. Ambas fracciones fueron analizadas por SDS-PAGE y el gel fue teñido con nitrato de plata, observándose, para M1 y M2, los pesos moleculares de 20 Y 30 kDa, respectivamente. Utilizando la técnica de actividad de proteinasa en gel, se encontró que las bandas producidas por PAGE en las dos muestras analizadas presentan actividad proteolítica (Figura 13). La actividad de estas bandas fue observada en geles de poliacrilamida tanto nativo como desnaturalizante. La proteína de 30 kDa es más abundante en la fracción M1 y la de 20 kDa predomina en la M2. Solo la fracción M1 conteniendo la proteinasa de 30 kDa activó la proFO por lo que lo mas probable es que la EAPFO es esta proteinasa. Además este tamaño de proteinasa ha sido reportado para la EAPFO de *P. leniusculus* (Aspán y cols. , 1990; Wang y cols. , 2001). Por esta razón los siguientes experimentos se realizaron con la fracción M1.

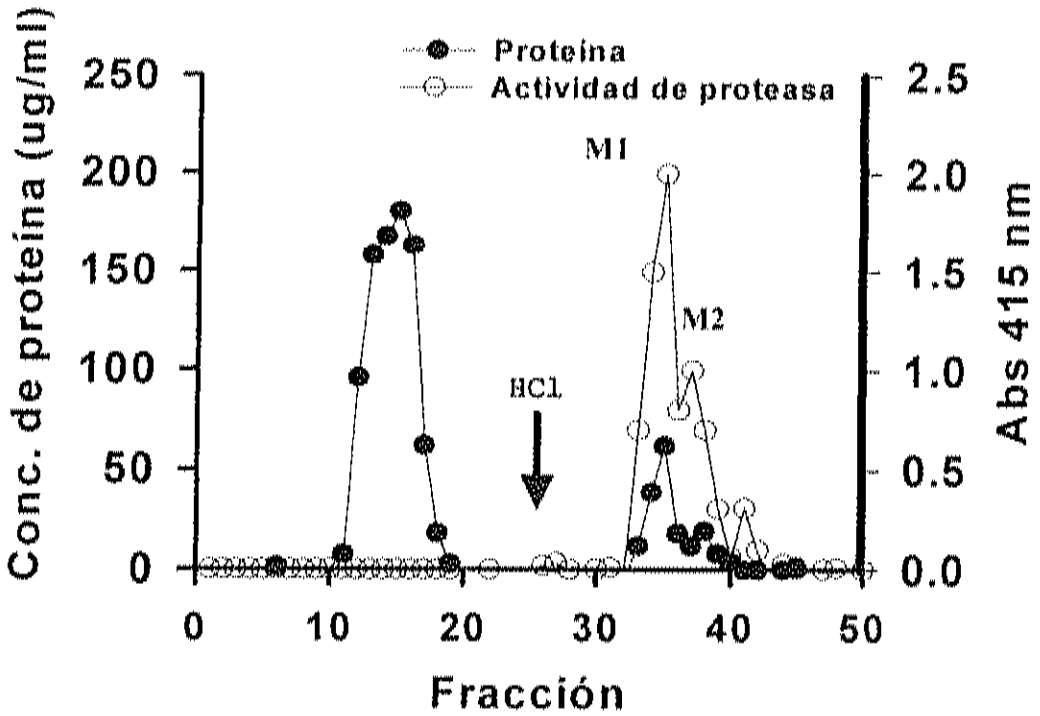

Figura 12: Cromatografía de afinidad a STI utilizada en la purificación de la EAPFO de hemocitos de camarón blanco. La actividad se midió usando BAPNA como sustrato.

Inhibición de la activación de la proFO

Las fracciones no retenidas en la columna de STI (Fig. 12) fueron utilizadas como fuente de proFO debido a que no presentaban actividad de proteinasa y el contenido de proFO era alto y de fenoloxidasa bajo o nulo.

La activación de la proFO se demostró incubando el HLS libre de proteinasas con la EAPFO aislada ó con tripsina comercial y observando una oxidación del sustrato L-DOPA (Figura 14). Sin embargo, cuando la EAPFO se incubó primeramente con la α_2M purificada, la actividad proteolítica de la EAPFO se perdió y no pudo utilizar azoalbúmina como sustrato (Tabla 4). Adicionalmente, cuando la mezcla (EAPFO y α_2M) se incubó con el lisado libre de EAPFO, la reacción de la L-DOPA fue negativa, mientras que en ausencia de α_2M la reacción fue positiva (Figura 14).

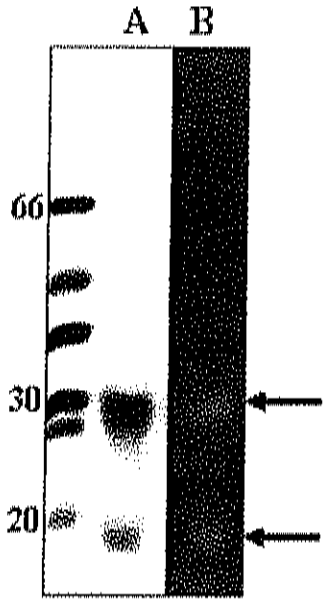

Figura 13: Detección de la EAPFO purificada por cromatografía de afinidad por electroforesis en geles de poliacrilamida al 10% en condiciones desnaturalizantes. A: teñido con Coomassie. B: detección de actividad proteinasa en gel.

Tabla 4: Inhibición de la actividad de proteinasa de EAPFO por la α_2M de camarón.

Enzima	Sin α_2M (Abs 366 nm)	Con α_2M (Abs 366 nm)
EAPFO	0.65 ± 0.07	0.03 ± 0.04
Tripsina	0.80 ± 0.13	0.03 ± 0.02

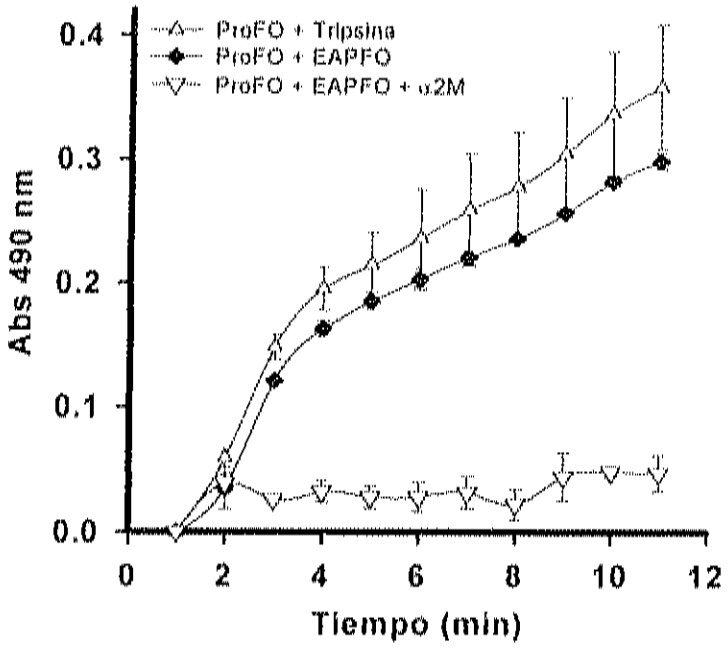

Figura 14: Participación de la α_2M en el sistema profenoloxidasa. La proFO de hemocitos se incubó con la EAPFO o tripsina comercial. La activación se midió utilizando L-DOPA como sustrato.

Estos resultados difieren de los reportados en el langostino, *P. leniusculus*, donde un inhibidor de proteinasas de 155 kDa, llamado pacifastina, y no la α_2M, es el inhibidor de la EAPFO (Hergenhahn y cols. , 1987; Liang y cols. , 1997). En ausencia de la descripción de otro inhibidor de proteinasas en el camarón, específicamente proveniente de los hemocitos, y la habilidad de inhibir la EAPFO *in vitro*, hasta el momento, en camarón queda demostrada la participación de la α_2M en el sistema proFO, aunque no se puede descartar la exisistencia de inhibidores homologos a la pacifastina y que puedan realizar esta función *in vivo*.

Secuenciación de la región tiol éster de la α_2M

Con la intención de obtener información adicional sobre la estructura y función de la α_2M se intentó la secuenciación de regiones conservada del gen. La α_2M posee 3 regiones principales importantes, la región anzuelo o "Bait", la región de unión al receptor y la región tiol (Iwaki y cols. , 1996).

Esta última es la más conservada e incluye la secuencia GCGEQ, característica de los miembros de la familia de la α_2M. Secuencias de esta región de α_2M de organismos donde esta proteína ha sido secuenciada, tanto en vertebrados (humano, ratón, carpa y lamprea) como en invertebrados (*Limulus, Drosophila y Anopheles*) fueron comparadas. En base a la secuencia consenso, se diseñaron los primers que pudieran ayudar en la amplificación de esta región. El tamaño esperado para los productos de PCR se calcularon tomando en cuenta la secuencia de *Limulus* (Figura 15).

Aunque se probaron diferentes combinaciones de primers (Figura 15) y diferentes templados (DNA genómico, cDNA de hemocitos y hepatopáncreas, banco de genes hemocitos y de hepatopáncreas), los mejores resultados se obtuvieron utilizando los primers Thiol2Fw y Reg60Rv, y DNA genómico como templado (Figura 16). Dos fragmentos, de 350 y 450 pb, fueron obtenidos (Figura 17), los cuales fueron aislados directamente del gel de agarosa, se insertaron en el vector pGEM-T Easy® y fueron clonados en *E. coli* DH5α. La clonación se comprobó por electroforesis del DNA superenrollado y por liberación del inserto del tamaño esperado, digiriendo el DNA plasmídico con *Eco*R I (Figura 18).

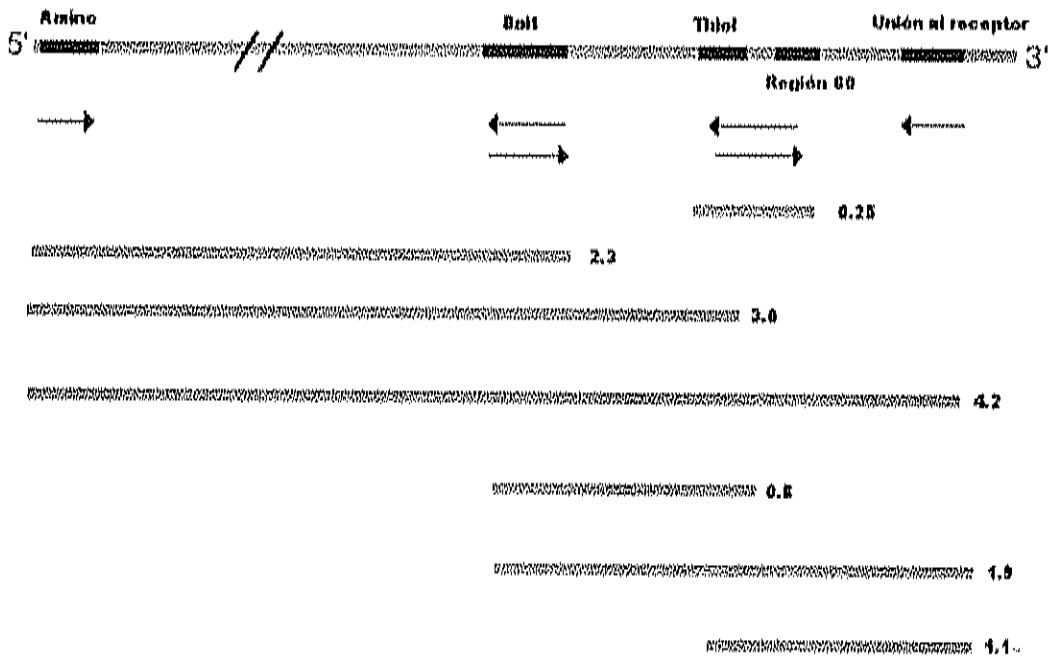

Figura 15: Esquema representativo de la estructura primeria de la α_2M y "primers" diseñados en base a secuencias consenso de α_2M de otros organismo y los fragmentos esperados al combinar dichos oligonucleótidos. Se indica también el tamaño en Kb, de los fragmentos esperados. Las flechas indican el sentido de los primers.

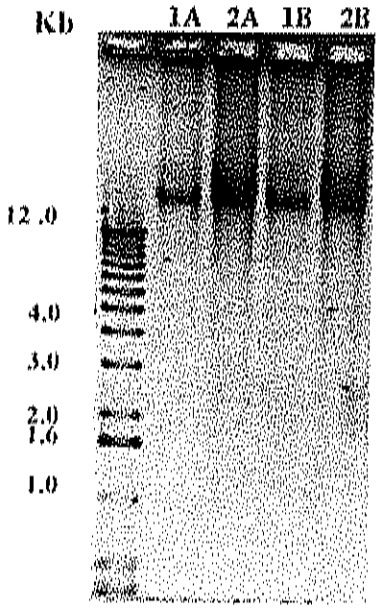

Figura 16: DNA genómico purificado de músculo de camarón blanco. A y B son dos muestras diferentes, 1 se aplicó 1 µg y en 2 se aplicaron 3 ug. Gel de agarosa al 1% y teñido con bromuro de etidio.

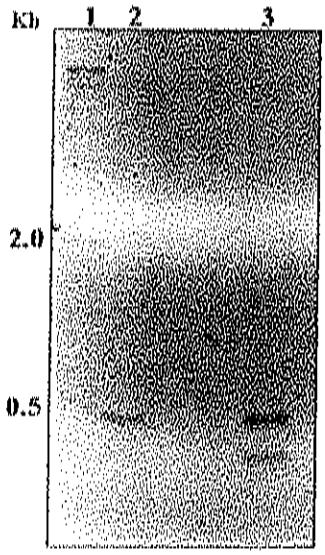

Figura 17: Fragmentos amplificados a partir de DNA genómico utilizando los oligonucleótidos degenerados Thiol AN Fw y Reg 60 Rv. Carril 1 marcador 1 Kb ladder, 2 y 3 muestras amplificadas y analizadas en geles de agarosa al 1.5%, se tiñeron con bromuro de etidio.

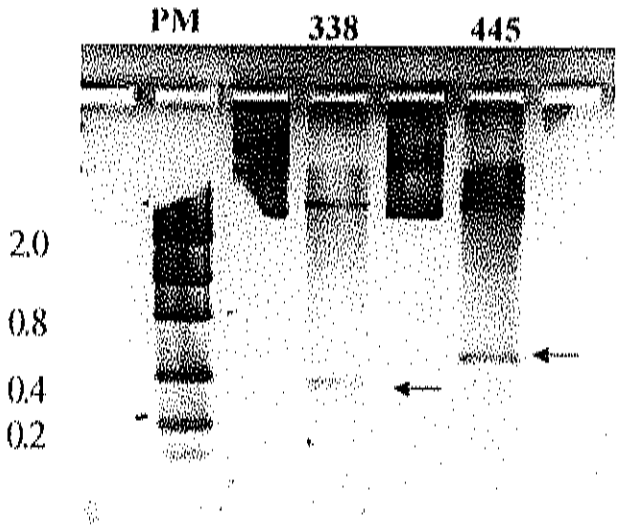

Figura 18: Digestiones de DNA plasmídico para liberar el DNA insertado, de los clones Pvalfa2M1 (338) y Pvalfa2M2 (445) . Carril 1 marcador de masa molécular. Las flechas indican los insertos obtenidos después de la digestión con *Eco*R I. Gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio.

Se preparó el DNA plasmídico de uno de los clones (Figura 18), de acuerdo con las recomendaciones del LMSE (Laboratory of Molecular Systematic Evolution) de la Universidad de Arizona y una muestra, se envió para determinar la secuencia nucleotídica . Utilizando el programa DNASIS, se eliminaron las secuencias del vector plasmídico y se alinearon las secuencias de ambas cadenas utilizando el MegAling (DNASTAR) obteniéndose la secuencia presentada en la Figura 19. El fragmento de la región tiol de la α_2M del camarón obtenido, presenta dos 2 ambigüedades, que no se pudieron resolver, aun repitiendo la secuenciación. Sin embargo, fue posible encontrar un marco de lectura con la secuencia indicada en la Figura 19 y que permitió la comparación con otras secuencias reportadas en GenBank (NCBI, http/:www.ncbi.nlm.gov/blast) utilizando los programas BLASTN y BLASTX.

```
  G  C  G  E  Q  N  M  V  N  F  A  P  N  I  Y  I  L  Q  Y  L
5'-GGGTGTGGGGAGCAGAATATGGTCAACTTTGCCCCAAATATCTACATCCTTCAGTATCTT
1         10        20        30        40        50        60

 K  G  T  N  Q  D  T  P  E  S  T  E  K  L  L  K  Y  M  K  A
AAGGGCACCAACCAAGACACACCAGAAAGCACCGAGAAACTCCTGAAGTATATGAAAGCA
61        70        80        90        100       110       120

 G  Q  S  L  P  P  H  V  L  Y  K  X  N  V  Q  R  R  X  T  F
GGTCAGTCCTTGCCACCACACGTTTTGTACAAGTAAAACGTACAAAGAAGGTGAACTTTT
121       130       140       150       160       170       180

 S  K  C  L  E  I  Q  I  D  L  R  R  L  K  E  N  K  L  S  G
AGCAAATGTCTCGAAATCCAGATTGATTTACGAAGACTAAAAGAAAACAAACTTTCAGGT
181       190       200       210       220       230       240

 Y  Q  R  E  L  L  Y  R  H  Y  N  G  S  F  S  A  F  G  E  A
TACCAGAGAGAGCTCCTGTACCGCCATTATAACGGGTCCTTCAGTGCATTTGGGGAAGCT
241       250       260       270       280       290       300

 D  N  S  G  S  T  W  L  T  A  F  V
GACAATTCTGGGTCTACCTGGCTCACCGCCTTCGTG-3'
301       310       320       330   336
```

Figura 19: Secuencia de nucleótidos entre la región tiol éster y el sitio de unión al receptor. El fragmento de DNA fue obtenido por PCR usando DNA genómico como templado.

Análisis del clon Pvalfa2M1

El fragmento que se encuentra en el clon Pvalfa2M1 tiene una secuencia de aminoácidos deducida con similitud a la α_2M de diferentes organismos, encontrándose una mayor similitud (43%) con la secuencia de α_2M de humano y un 39% al TEP de *Drosophila*. Debido a que no existen secuencias completas de la α_2M de otros crustáceos, la comparación se extendió a otros organismos de diferentes phyla. Como se puede observar en la Figura 20, el fragmento obtenido se ubica en el residuo 947 para la α_2M de humano y el 922 para la de *Drosophila*. La región 3' de este fragmento coincide con la región denominada, región 60 (Mutsuro y cols. , 2000) de las α_2Ms antes mencionadas, el cual esta ubicado en el aminoácido 1021 para

humano y 994 para *Drosophila*. La distancia entre la región tiol y la 60, es de 72 y 74 aminoácidos en la α_2M del humano y de la mosca, respectivamente.

Es notorio, que el fragmento obtenido en camarón, es de mayor tamaño (120 aa) con una inserción de casi 50 residuos (150 bp). Considerando que este fragmento se amplificó a partir de DNA genómico esta extensión podría deberse a la presencia de un intrón. Sin embargo, a partir de las secuencias obtenidas, se diseñaron primers específicos y se probaron con cDNA, donde se obtuvo un fragmento del mismo tamaño (Figura 22) y la secuencia fue la misma. Lo anterior confirma que esta inserción está presente en el mRNA y no es un intrón. Este tipo de inserciones también se han encontrado en otros genes del camarón como el de lisozima (Sotelo-Mundo y cols., Submitted) y el de la HDL-BGBP (Romo-Figueroa y Yepiz- Plascencia, comunicación personal). Independientemente del tamaño, la región tiol y la región 60 de la α_2M, la secuencia es muy similar a la reportada en otros organismos tanto vertebrados, como invertebrados (Figura 20) y que son características de la familia α_2M.

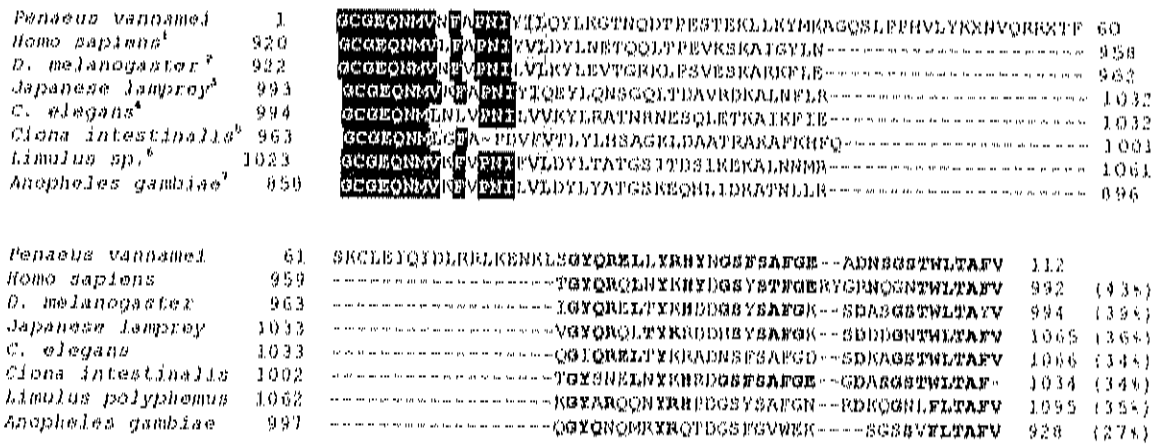

Figura 20: Comparación de la secuencia de aminoácidos de la región tiol éster (región sombreada) de la α_2M camarón con regiones homólogas en otros organismos. Los numeros en paréntesis indican el % de identidades. Las letras sombreadas en negro y en negritas representan aminoácidos idénticos.1: AAH40071, 2: Y11116, 3: T43166, 4: CAD24311, 5: T18544, 6: D83196, 7: AF203333.

Análisis del clon Pvalfa2M2

El segundo clon obtenido por amplificación del DNA genómico, fue secuenciado solamente de un lado, utilizando el primer M13 Rv. El clon tiene un inserto de 425 bp y, al compararse con el clon Pvalfa2M1, se observó que además de su tamaño tienen diferente secuencia (Fig.21). Aunque presentan alta similitud, especialmente en los extremos, la región intermedia presenta grandes diferencias. Los extremos, en consecuencia, muestran similitud con α_2M de camarón y otras especies. Sin embargo, mas análisis y experimentos son necesarios para determinar si se trata de un intrón (ya que fue amplificado de DNA genómico), o se trata de otra proteina que posee el grupo tiol. Utilizando los primers no degenerados, este fragmento no pudo ser observado mediante reacciones de RT-PCR.

```
Clon Pvalfa2M2 1   TGGGTGT-GGGAGCAGAATATGATCAACTTCGCCCCAAACGTCTACATGA 49
Clon Pvalfa2M1 1   TGGGTGTGGGGAGCAGAATATGGTCAACTTTGCCCCAAATATCTACATCC 50

Clon Pvalfa2M2 50  TGCAGTACCTGACGGCGACGAAGCAGAATACCCCCGAGAGCACAGAGAAG 99
Clon Pvalfa2M1 51  TTCAGTATCTTAAGGGCACCAACCAAGACACACCAGAAAGCACCGAGAAA 100

Clon Pvalfa2M2 100 CTCCTCAGGTTTATGAAGCTGGGTGAGTTGCGTGGAATGTTCTGTCTGTC 149
Clon Pvalfa2M1 101 CTCCTGAAGTATATGAA-AGC--------------------------- 120

Clon Pvalfa2M2 150 AATTATTATTACGTTTTGTTGTGGCGTGTCGCTTACGATAGATAGCTGGG 199
Clon Pvalfa2M1 120 ------------------------------------------------- 120

Clon Pvalfa2M2 200 TTTGTGATGCATGTATGTTTGGCATGTAAATTTATATCGGTTGAAAAAAG 249
Clon Pvalfa2M1 120 --AG-G--TCA-G--TCCTTGCCACCACACGTT-T-T--G-T---ACAAG 154

Clon Pvalfa2M2 250 AAATAGATGAATGAAATAAACGATTTTTTACATTCTTCAGCTTACTCTTA 299
Clon Pvalfa2M1 155 TAA-A-ACGTA-CAAAG-AA-GGTG-------------A----A--CTTT 180

Clon Pvalfa2M2 300 CGAAATGAATATGCGGTTGTGCAGAATACTTCAAAGATTGATTTAGTGTA 349
Clon Pvalfa2M1 181 T---A-GCAAA------TGTCTCG---AAATCC-AGATTGA--T--T-TA 211

Clon Pvalfa2M2 350 CTAATGTTACCGCAAAATCTTCCTGCAGGATACCAAAGGGAACTGCTTTA 399
Clon Pvalfa2M1 212 CGAAGACTAAAAGAAAACAAACTTTCAGGTTACCAGAGAGAGCTCCTGTA 261

Clon Pvalfa2M2 400 TCTCCGCAGCAATGGTTCCTACAGCGCCTTCNGGAACGCTGATGATTCTG 449
Clon Pvalfa2M1 262 CCGCCATTATAACGGGTCCTTCAGTGCATTTGGGGAAGCTGACAATTCTG 311

Clon Pvalfa2M2 450 GCTCAACCTGGCTCACCG-CTTCGTCA 475
Clon Pvalfa2M1 312 GGTCTACCTGGCTCACCGCCTTCGTGA 336
```

Figura 21: Comparación de las secuencias nucleótidicas de los clones Pvalfa2M2 y Pvalfa2M1, ambos obtenidos por amplificación del DNA genómico utilizando los mismos primer.

Detección de mRNA de la α_2M

Se sintetizó cDNA a partir de mRNA de hepatopáncreas y hemocitos de camarón blanco, para cada reacción de transcripción se usó la misma concentración de mRNA. Utilizando primers no degenerados y específicos para la α_2M de camarón correspondientes a la región tiol y la región 60 se hicieron PCRs teniéndose como templados losd cDNA sintetizados. Como se puede ver en la Figura 22, la señal de hemocitos es mas intensa y es directamente proporcional a la concentración de templado. Lo que nos estaría indicando que este organo podría ser el principal órgano de síntesis de α_2M. Aunque en hepatopáncreas se tuvo una ligera amplificación la señal fue la misma al usar 50 y 500 ng de templado (Figura 18, carril 1 y 2). Además es importante señalar que este órgano está muy irrigado y la señal podría deberse a mRNA de los hemocitos que se encuentran presente cuando se obtiene el hepatopáncreas. Por lo que es posible que el hepatopáncreas no sintetice α_2M o que la síntesis sea muy baja.

Este resultado coinciden con lo reportado para *Limulus* donde por análisis de RT-PCR de mRNA de diferentes tejidos demuestran que la α_2M solo se expresa en hemocitos y no en otros órganos como el hepatopáncreas (Iwaki y cols. , 1996). También en *P. leniusculus*, mediante microscopia electrónica utilizando anticuerpos acoplados a oro, se demostró que la α_2M se sintetiza en los hemocitos y no en otros tejidos (Liang y cols. , 1992).

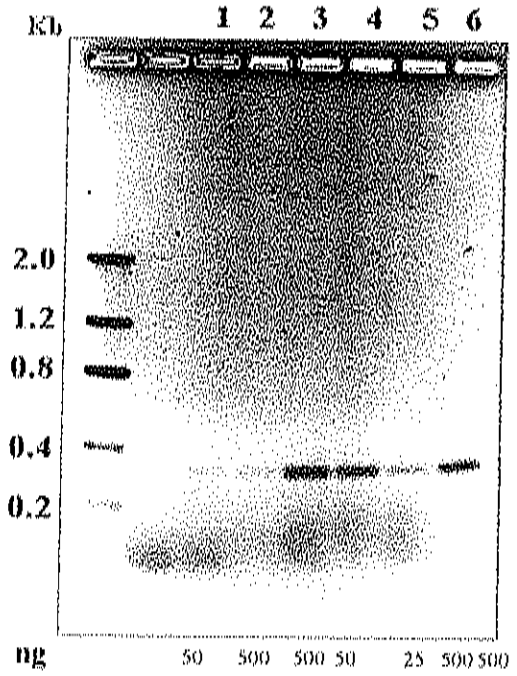

Figura 22: Detección del mRNA en hemocitos y hepatopáncreas de la α_2M. Los fragmentos fueron amplificados por PCR, analizados por geles de agarosa al 1.5% y teñidos con bromuro de etidio. Carril 1,2 cDNA hepatopáncreas. Carril 3,4,5 cDNA de hemocitos. Carril 6 DNA genómico. Los oligonucleótidos utilizados fueron Thiol ND F y Reg 60 ND Rv.

Posibilidad de uso como marcadores de especie

Los oligonucleótidos (Tiol F y Reg 60 Rv) correspondiente a la región tiol y región 60 se utilizaron para amplificar DNA genómico de camarón blanco (*P. vannamei*), café (*P. californiensis*) y azul (*P. stylirostris*). Se utilizaron 500 ng DNA, en las condiciones descritas en la metodología, incluyendo los controles. En la Figura 23 se puede observar que, interesantemente, los patrones de bandas obtenidos en las tres especies fueron diferentes. Como se había encontrado anteriormente, para el camarón blanco se detectaron dos bandas (338 y 450 pb); en el camarón azul se aprecian las dos mismas bandas aunque la de 338 pb está ligeramente disminuida. Por su parte, en

el camarón café se encontraron dos bandas con tamaños totalmente diferentes (600 y 900 pb).

Este resultado se confirmó haciendo el PCR a una mayor astringencia (55, 58, 62°C), permitiedo proponer que el uso de primers en las regiones conservadas de la α_2M, utilizando DNA genómico, como una herramienta para diferenciar entre especies. Sin embargo, cuando se probaron en las mismas condiciones, pero con lo oligonucleótidos no degenerados, no fue posible observar diferencias en el bandeo de los productos (Figura 24), lo que indica que similares, las secuencias de α_2M en los camarones no son idénticas.

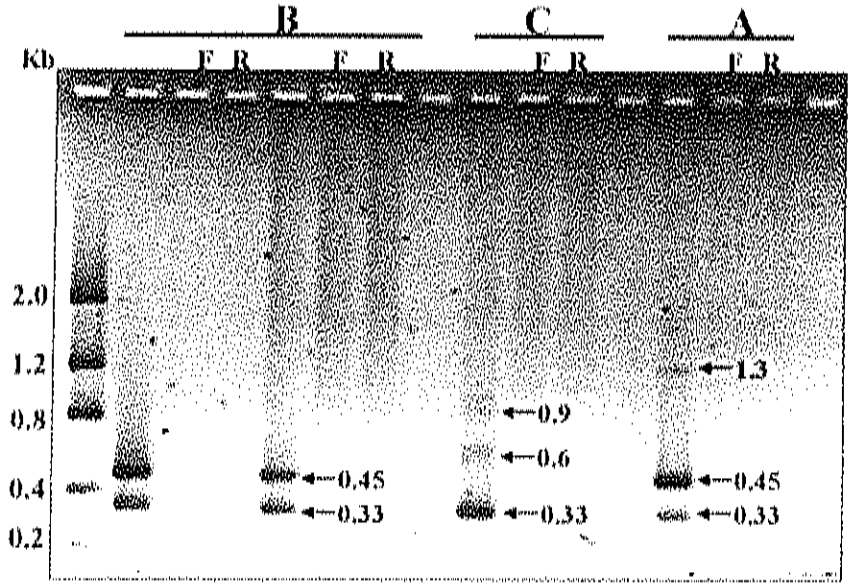

Figura 23: Comparación del fragmento obtenido por PCR con los oligonucleótidos degenerados Thiol Fw y Reg60 Rv, al utilizar DNA genómico de 3 sp. de camarón blanco (B), café (C) y azul (A). F, reacción solo con el oligonucleótido sentido, R reacción solo con el oligonucleótido antisentido Se usaron 500 ng de DNA genómico. Gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio. Los números indican los pesos en Kb.

CONCLUSIÓN

El uso de diferentes herramientas metodológicas ha permitido el conocimiento de la estructura y función de la α_2M del camarón blanco. Se ha encontrado un método de purificación basado en cromatografía de afinidad por colorantes e hidrofóbica. Se pudo determinar por electroforesis y electrotransferencias, la presencia de subunidades y sus respectivos tamaños, así como de tener una muestra para determinar la secuencia de aminoácidos del extremo amino. La presencia de residuos sacáridos, demostrada por reconocimiento por lectinas, permite indicar que la α_2M es una glicoproteína.

El almacenamiento de la α_2M pura en condiciones de baja salinidad produce una inactivación del inhibidor, la cual no es reversible. El tratamiento de la α_2M con metilamina, durante 24 horas produjo incapacidad de inhibir proteinasas. La α_2M presenta un amplio rango de inhibición, ya que fue capaz de inhibir proteinasas tales como: leucinaminopeptidasa, tripsina, quimotripsina, elastasa y papaina

La participación de la α_2M, en el sistema proFO del camarón, se demostró utilizando todos los componentes previamente (EAPFO y la α_2M) separados. La enzima activadora fue aislada de los hemocitos utilizando una cromatografía de afinidad a STI, en este aislado se obtuvieron 2 proteinasas (20 y 30 kDa) ambas con actividad de proteasas. Basándose en el peso molecular y en el hecho de que solo ésta sea capaz de activar a la proFO, se puede suponer que la EAPFO es la de 30 kDa ya que es mas parecido al reportado en otras especies como *Pacifastacus leniusculos* (Wang y cols. , 2001)

Utilizando oligonucleótidos degenerados diseñados a partir de secuencias consenso de la α_2M descritas en otras especies se amplificó y secuenció la región thiol de la α_2M de camarón blanco. El análisis de las secuencias nucleótidicas y la comparación de las secuencias de aaminoácidos deducidas de otras especies, mostró que la α_2M de camarón también presenta la secuencia GCGEQ que caracteriza a la familia de las α_2Ms. Utilizando cDNA sintetizado por transcripción reversa a partir de mRNA tanto de hepatopancreas como de hemocitos, se observó una señal mayor para el mRNA de α_2M en hemocitos, sugiriendo que éste es el órgano de mayor síntesis de α_2M en comparación con el hepatopáncreas.

Bibliografía

Adams, M.; Celniker, S.; Holt, R.; Evans, C.; Gocayne, J. and Et. al. (2000). The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* 287: 2185-2195.

Andersson, K.; Sun, S.-C.; Boman, H. G. and Steiner, H. (1989). Purification of the prophenoloxidase from *Hyalophora cecropia* and four proteins involved in its activation. *Insect Biochemistry* 19: 629-637.

Antuch, W.; Berndt, K.; Chavez, M. A.; Delfin, J. and Wuthrich, K. (1993). The NMR solution structure of a Kunitz-type proteinase inhibitor from the sea anemone *Stichodactyla helianthus*. *European Journal Biochemistry* 212: 675-684.

Armstrong, P. B.; Levin, J. and Quigley, J. P. (1984). Role of endogenous proteinases inhibitor in the regulation of the blood clotting system of the horseshoe crab, Limulus polyphemus. *Thrombosis and Haemostasis* 52: 117-120.

Armstrong, P. B.; Mangel, W. F.; Wall, J. S.; Hainfield, J. F.; Vanholde, K. E.; Ikai, A. and Quigley, J. P. (1991). Structure of α2 macroglobulin from the arthroped *Limulus polyphemus*. *Journal of Biological Chemistry* 266: 2526-2530.

Armstrong, P. B.; Melchior, R. and Quigley, J. P. (1996). Humoral immunity in long-lived arthropods. *Journal of Insect Physiology* 42: 53-64.

Armstrong, P. B. and Quigley, J. P. (1999). α2 -macroglobulin: an evolutionarily conserved arm of the innate immune system. *Developmental and Comparative Immunology* 23: 375-390.

Armstrong, P. B.; Rossner, M. and Quigley, J. P. (1985). An α_2-macroglobulinlike activity in the blood of chelicerate and mandibulate arthropods. *Journal of Experimental Zoology* 236: 1-9.

Armstrong, P. B.; Swarnakar, S.; Srimal, S.; Misquith, S.; Hahn, E. A.; Aimes, R. T. and Quigley, J. P. (1996). A cytolitic function for a sialic acid-binding lectin that is a member of the pentraxin family of proteins. *Journal of Biological Chemistry* 271: 14717-14721.

Asada, N. and Fukumitsu, T. (1990). Reaction mass formation in *Drosophila*, with notes on a phenoloxidase activation. *Zoological Science* 7: 79-84.

Ashida, M. (1981). A cane sugar factor suppressing activation of prophenoloxidase in haemolymph of the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochemistry* 11: 57-65.

Ashida, M. (1990). The prophenoloxidase cascade in insect immunity. *Research in Immunology* 141: 908-910.

Ashida, M. and Dohke, K. (1980). Activation of pro-phenoloxidase by the activation enzyme of the silkworm *Bombyx mory*. *Insect Biochemistry* 10: 37-47.

Ashida, M.; Ishizaki, Y. and Iwahana, H. (1983). Activation of pro-phenoloxidase by bacterial cell walls or β-1,3-glucans in plasma of the silkworm, *Bombyx mori*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 113: 562-568.

Ashida, M.; Ochiai, M. and Niki, T. (1988). Immunolocalization of prophenoloxidase among hemocytes of the silkworm, *Bombyx mori*. *Tissue and Cell* 20: 599-610.

Ashida, M. and Söderhäll, K. (1984). The prophenoloxidase activating system in crayfish. *Comparative Biochemistry and Physiology* 77B: 21-26.

Ashida, M. and Yamazaki, H. (1990). Biochemistry of the phenoloxidase system in insects: with special reference to its activation. in: Molting and Metamorphosis. Ohnishi, E. and Ishizaki, H. Berlin, Springer-Verlag: 239-265.

Aspán, A.; Hall, M. and Söderhäll, K. (1990). The effect of endogeneous proteinase inhibitors on the prophenoloxidase activating enzyme, a serine proteinase from crayfish haemocytes. *Insect Biochemistry* 20: 485-492.

Aspán, A. and Söderhäll, K. (1991). Purification of prophenoloxidase from crayfish blood cells, and its activation by an endogenous serine proteinase. *Insect Biochemistry* 21: 363-373.

Aspán, A.; Sturtevant, J.; Smith, V. J. and Söderhäll, K. (1990). Purification and characterization of a prophenoloxidase activating enzyme from crayfish blood cells. *Insect Biochemistry* 20: 709-718.

Bacheré, E.; Mialhe, E. and Rodriguez, J. (1995). Identification of defence effectors in the haemolymph of crustaceans with particular reference to the shrimp *Penaeus japonicus* (bate) - prospects and applications. *Fish & Shellfish Immunology* 5: 597-612.

Barillas-Mury, C. (1992). Molecular characterization of blood-meal induced tripsin from the mosquito *Aedes aegypti*. The University of Arizona Tucson, Arizona

Barracco, M. A.; Duvic, B. and Söderhäll, K. (1991). The β-1,3-glucan-binding protein from the crayfish *Pacifastacus leniusculus*, when reacted with a β-1,3-glucan, induces spreading and degranulation of crayfish granular cells. *Cell and Tissue Research* 266: 491-497.

Barrett, A. J. and Starkey, P. M. (1973). The interaction of α2-Macroglobulin with proteinases. Characteristics and specificity of the reaction and a hypotesis concerning its molecular mechanism. *Biochemical Journal* 133: 709-724.

Bender, R. C. and Bayne, C. J. (1996). Purification and characterization of a tetrameric a-macroglobulin proteinase inhibitor from the gastropod mollusc *Biomphalaria glabrata*. *Biochemical Journal* 316: 893-900.

Bjork, I.; Lindblom, T. and Lindahl, P. (1985). Changes of the proteinase binding properties and conformation of bovine α_2-macroglobulin on cleavage of the thio ester bonds by methylamine. *Biochemistry* 24: 2653-2660.

Boigegrain, R. A.; Mattras, H.; Brehelin, M.; Paroutaud, P. and Coletti, P.-M. A. (1992). Insect immunity: Two proteinase inhibitors from hemolymph of *Locusta migratoria*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 189: 790-793.

Boisset, N.; Taveau, J. C.; Pochon, F. and Lamy, J. (1996). Similar architectures of native and transformed human alpha2-macroglobulin suggest the transformation mechanism. *Journal of Biological Chemistry* 271: 25762-25769.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.

Bradley, R. S.; Stuart, G. S.; Stiles, B. and Hapner, K. D. (1989). Grasshopper haemagglutinin: Immunochemical localization in haemocytes and investigation of opsonic properties. *Journal of Insect Physiology* 35: 353-361.

Brehélin, M.; Boigegrain, R. A.; Drif, L. and Coletti-Previero, M. A. (1991). Purification of a protease inhibitor which controls prophenoloxidase activation in hemolymph of *Locusta migratoria* (Insecta). *Biochemical and Biophysical Research Communications* 179: 841-846.

Brivio, M. F.; Pagani, M. and Scari, G. (1992). Biochemical evidence of phenoloxidase activity (pro-PO system) in larvae of *Allogamus auricollis* (Insecta, Trichoptera). *Comparative Biochemistry and Physiology* 102B: 867-871.

Cerenius, L.; Liang, Z.; Duvic, B.; Keyser, P.; Hellman, U.; Tapio-Palva, E.; Iwanaga, S. and Söderhäll, K. (1994). Structure and biological activity of a 1,3-β-D-glucan-binding protein in crustacean blood. *Journal of Biological Chemistry* 269: 29462-29467.

Chosa, N.; Fukumitsu, T.; Fujimoto, K. and Ohnishi, E. (1997). Activation of phenoloxidase A1 by an activating enzyme in *Drosophila melanoganster*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 27: 61-68.

Dimopoulos, G.; Richman, A.; M., M. H. and Kafatos, F. C. (1997). Molecular immune responses of the mosquito Anopheles gambiae to bacteria and malaria parasites.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 94: 11508-11513.

Donovan, M., A. and Laue, T., M. (1991). A novel trypsin inhibitor from the hemolymph of the horseshoe crab *Limulus polyphemus*. *Journal of Biological Chemistry* 266: 2121-2125.

Duvic, B. and Söderhäll, K. (1990). Purification and characterization of a β-1,3-glucan binding protein from the plasma of the crayfish *Pacifastacus leniusculus*. *Journal of Biological Chemistry* 265: 9327-9337.

Duvic, B. and Söderhäll, K. (1993). β-1,3-glucan-binding proteins from plasma of the fresh-water crayfishes *Astacus astacus* and *Procambarus clarkii*. *Journal of Crustacean Biology* 13: 403-408.

Erlanger, B. F.; Kokowky, N. and Cohen, W. (1961). The preparations and properties of two new chromogenic substrate of trypsin. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 95: 271-278.

Figler, N.; Strickland, D. K.; Allietta, M. and Gonias, S. L. (1991). Immunoelectron microscopy studies with a monoclonal antibody directed against a receptor recognition site epitope in human alpha 2-macroglobulin. *Journal of Structural Biology* 106: 237-242.

Figueroa-Soto, C. G.; Calderón de la Barca, A. M.; Vâzquez-Moreno, L.; Higuera-Ciapara, I. and Yepiz-Plascencia, G. (1997). Purification of hemocyanin from the white shrimp (*Penaeus vannamei* Boone), by immobilized metal affinity chromatography. *Comparative Biochemistry and Physiology* 117B: 203-208.

García-Carreño, L. F.; Dimes, L. E. and Haard, N. F. (1993). Substrate-gel electrophoresis for composition and molecular weight of proteinases or proteinaceous proteinase inhibitors. *Analytical Biochemistry* 214: 65-9.

Girard, J. T.; Warren, A. L.; Novotny, F. W.; Liket, M., K.; Brown, G. S.; Miletich, P. J. and Broze, J. G. (1989). Functional significance of the Kunitz-type inhibitory domains of lipoprotein-associated coagulation inhibitor. *Nature* 338: 518-520.

Gollas-Galván, T.; Hernández-López, J. and Vargas-Albores, F. (1997). Effect of calcium on the prophenoloxidase system activation of the brown shrimp (*Penaeus californiensis*, Holmes). *Comparative Biochemistry and Physiology* 117A: 419-425.

Gollas-Galván, T.; Hernández-López, J. and Vargas-Albores, F. (1999). Prophenoloxidase from brown shrimp (*Penaeus californiensis*, Holmes) hemocytes. *Comparative Biochemistry and Physiology* 122B: 77-82.

Gron, H.; Thogersen, I. B.; Enghild, J. J. and Pizzo, S. V. (1996). Structural and functional analysis of the spontaneous re-formation of the thiol ester bond in human alpha 2-macroglobulin, rat alpha 1-inhibitor-3 and chemically modified derivatives. *Biochemical Journal* 318: 539-545.

Guzmán-Murillo, A.; Ochoa, J. L. and Vargas-Albores, F. (1993). The hemolytic activity in the haemolymph from brown shrimp (*Penaeus californiensis* Holmes). *Comparative Biochemistry and Physiology* 106A: 271-275.

Hall, L. and Söderhäll, K. (1982). Purification and properties of a protease inhibitor from crayfish hemolymph. *Journal of Invertebrate Pathology* 39: 29-37.

Hall, M.; Van Heusden, M. C. and Söderhäll, K. (1995). Identification of the major lipoproteins in crayfish hemolymph as proteins involved in immune recognition and clotting. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 216: 939-946.

Harlow, E. and Lane, D. (1988). Antibodies. A laboratory manual. United States of America, Cold Spring Harbor Laboratory.

Hergenhahn, H. G.; Aspán, A. and Söderhäll, K. (1987). Purification and characterization of a high-Mr proteinase inhibitor of pro-phenoloxidase activation from crayfish plasma. *Biochemical Journal* 248: 223-228.

Hergenhahn, H. G.; Hall, M. and Söderhäll, K. (1988). Purification and characterization of an α_2-macroglobulin-like proteinase inhibitor from plasma of the crayfish *Pacifastacus leniusculus*. *Biochemical Journal* 255: 801-806.

Hergenhahn, H. G. and Söderhäll, K. (1985). α_2-macroglobulin-like activity in plasma of the crayfish *Pacifastacus leniusculus*. *Comparative Biochemistry and Physiology* 81B: 833-835.

Hernández-López, J.; Gollas-Galván, T.; Gómez-Jiménez, S.; Portillo-Clark, G. and Vargas-Albores, F. (Enviado). Phenoloxidase activity in plasma of spiny lobster (*Panulirus interruptus*) from Baja California, México.

Hernández-López, J.; Gollas-Galván, T. and Vargas-Albores, F. (1996). Activation of the prophenoloxidase system of the brown shrimp (*Penaeus californiensis* Holmes). *Comparative Biochemistry and Physiology* 113C: 61-66.

Hernández-López, J.; Gollas-Galván, T. and Vargas-Albores, F. (Enviado). Micro methods for quantifying immune components of shrimp.

Imber, M. J. and Pizzo, S. V. (1981). Clearance and binding of two electrophoretic "fast" forms of human alpha 2-macroglobulin. *Journal of Biological Chemistry* 256: 8134-8139.

Iwaki, D.; Kawabata, S.; Miura, Y.; Kato, A.; Armstrong, P. B.; Quigley, J. P.; Nielsen, K. L.; Dolmer, K.; Sottrupjensen, L. and Iwanaga, S. (1996). Molecular cloning of *Limulus* α_2-macroglobulin. *European Journal of Biochemistry* 242: 822-831.

Jacobsen L, S.-J. L. (1993). Localization of epsilon-lysyl-gamma-glutamyl cross-links in α_2-macroglobulin-plasmin complex. *Biochemistry* 32: 120-126.

Jiang, H. and Kanost, M. R. (2000). The clip-domain family of serine proteinases in arthropods. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 30: 95-105.

Jiang, H.; Wang, Y. and Kanost, M. R. (1998). Pro-phenol oxidase activating proteinase from an insect, Manduca sexta: a bacteria-inducible protein similar to Drosophila easter. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95: 12220-12225.

Johansson, M. W.; Keyser, P. and Soderhall, K. (1994). Purification and cDNA cloning of a four-domain Kazal proteinase inhibitor from crayfish blood cells. *European Journal of Biochemistry* 223: 389-394.

Johansson, M. W. and Söderhäll, K. (1985). Exocytosis of the prophenoloxidase activating system from crayfish haemocytes. *Journal of Comparative Physiology* 156B: 175-181.

Johansson, M. W. and Söderhäll, K. (1989). A cell adhesion factor from crayfish haemocytes has degranulating activity towards crayfish granular cells. *Insect Biochemistry* 19: 183-190.

Johansson, M. W. and Söderhäll, K. (1989). Cellular immunity in crustaceans and the proPO system. *Parasitology Today* 5: 171-176.

Johansson, M. W. and Söderhäll, K. (1992). Cellular defence and cell adhesion in crustacean. *Animal Biology* 1: 97-107.

Kang, D.; Liu, G.; Lundström, A.; Gelius, E. and Steiner, H. (1998). A peptidoglycan recognition protein in innate immunity conserved from insects to humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95: 10078-10082.

Kanost, M. R. (1999). Serine proteinase inhibitors in arthropod immunity. *Developmental and Comparative Immunology* 23: 291-301.

Kopácek, P.; Weise, C.; Saravanan, T.; Vitova, K. and Grubhoffer, L. (2000). Characterization of an a-macroglobulin-like glycoprotein isolated from the plasma of the soft tick *Ornithodoros moubata*. *European Journal of Biochemistry* 267: 465-475.

Kurioka, A.; Yamazaki, M. and H., H. (1999). Primary structure and possible functions of a trypsin inhibitor of Bombyx mori. *European Journal of Biochemistry* 259: 120-126.

Lackie, A. M. (1980). Invertebrate immunity. *Parasitology* 80: 393-412.

Lackie, A. M. (1988). Immune mechanisms in insects. *Parasitology Today* 4: 98-105.

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.

Lanz, H.; Hernández, S.; Garrido-Guerrero, E.; Tsutsumi, V. and Aréchiga, H. (1993). Prophenoloxidase system activation in the crayfish *Procambarus clarkii*. *Developmental and Comparative Immunology* 17: 399-406.

Lanz-Mendoza, H. and Faye, I. (1999). Physiological aspects of the immunoglobulin super family in invertebrates. *Developmental and Comparative Immunology* 23: 359-374.

Laskowski, M. and Kato, I. (1980). Protein inhibitors of proteinases. *Annual Review Biochemistry* 49: 593-626.

Lee, K. M.; Lee, K. Y.; Choi, H. W.; Cho, M. Y.; Kwon, T. H.; Kawabata, S. and Lee, B. L. (2000). Activated phenoloxidase from *Tenebrio molitor* larvae enhances the synthesis of melanin by using a vitellogenin-like protein in the presence of dopamine. *European Journal of Biochemistry* 267: 3695-3703.

Lee, W. J.; Lee, J. D.; Kravchenko, V. V.; Ulevitch, R. J. and Brey, P. T. (1996). Purification and molecular cloning of an inducible Gram-negative bacteria-binding protein from the silkworm, *Bombyx mori*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93: 7888-7893.

Leonard, C.; Ratcliffe, N. A. and Rowley, A. F. (1985). The role of prophenoloxidase activation in non-self recognition and phagocytosis by insect blood cells. *Journal of Insect Physiology* 31: 789-799.

Leonard, C.; Söderhäll, K. and Ratcliffe, N. A. (1985). Studies on prophenoloxidase and protease activity of *Blaberus craniifer* haemocytes. *Insect Biochemistry* 15: 803-810.

Liang, Z.; Lindblad, P.; Beauvais, A.; Johansson, M. W.; Latge, J.-P.; Hall, M.; Cerenius, L. and Söderhäll, K. (1992). Crayfish α-macroglobulin and 76 kDa protein; their biosynthesis and subcellular localization of the 76 kDa protein. *Journal of Insect Physiology* 38: 987-995.

Liang, Z. C.; Sottrupjensen, L.; Aspán, A.; Hall, M. and Söderhäll, K. (1997). Pacifastin, a novel 155-kda heterodimeric proteinase inhibitor containing a unique transferrin chain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94: 6682-6687.

Melchior, R.; Quigley, J. P. and Armstrong, P. B. (1994). Clearance of Proteases from the Circulation of the American Horseshoe Crab, *Limulus polyphemus* : A Possible Function for α2-Macroglobulin. *Biological Bulletin, Marine Biological Laboratory, Woods Hole* 187: 228-229.

Melchior, R.; Quigley, J. P. and Armstrong, P. B. (1995). Alpha-2-Macroglobulin-mediated clearance of proteases from the plasma of the American horseshoe crab, *Limulus polyphemus*. *Journal of Biological Chemistry* 270: 13496-13502.

Merril, C. R. and Pratt, M. E. (1986). A silver stain for the rapid quantitative detection of proteins or nucleic acids on membranes or thin layer plates. *Analytical Biochemistry* 156: 96-110.

Miura, Y.; Kawabata, S.; Wakamiya, Y.; Nakamura, T. and Iwanaga, S. (1995). A limulus intracellular coagulation inhibitor type 2 - purification, characterization, cdna cloning, and tissue localization. *Journal of Biological Chemistry* 270: 558-565.

Montaño-Pérez, K.; Yepiz-Plascencia, G.; Higuera-Ciapara, I. and Vargas-Albores, F. (1999). Purification and characterization of the clotting protein from the white shrimp (*Penaeus vannamei*). *Comparative Biochemistry and Physiology* 122B: 381-387.

Mutsuro, J.; Nakao, M.; Fujiki, K. and Yano, T. (2000). Multiple forms of a2 -macroglobulin from a bony fish, the common carp (*Cyprinus carpio*): striking sequence diversity in functional sites. *Immunogenetics* 51: 847-855.

Nakamura, T.; Hirai, T.; Tokunaga, F.; Kawabata, S. and Iwanaga, S. (1987). Purification aminoacid sequence of kunitz-type protease inhibitor found in the hemocytes of horse crab (Tachypleus tridentatus). *Journal of Biological Chemistry* 101: 1297-1306.

Nakamura, T.; Hirai, T.; Tokunaga, F.; Kawabata, S. and Iwanaga, S. (1987). Purification and amino acid sequence of Kunitz-type protease inhibitor found in the hemocytes of horseshoe crab (*Tachypleus tridentatus*). *Journal of Biological Chemistry* 101: 1297-306.

Nappi, A. J. and Seymour, J. (1991). Hemolymph phenol oxidases in *Drosophila melanogaster, Locusta migratoria*, and *Austropotamobius pallipes*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 180: 748-754.

Nappi, A. J.; Vass, E.; Frey, F. and Carton, Y. (1995). Superoxide anion generation in Drosophila during melanotic encapsulation of parasites. *European Journal of Cell Biology* 68: 450-456.

Nayar, J. K. and Bradley, T. J. (1994). Comparative study of hemolymph phenoloxidase activity in *Aedes aegypti* and *Anopheles quadrimaculatus* and its role in encapsulation of *Brugia malayi* microfilariae. *Comparative Biochemistry and Physiology* 109A: 929-938.

Niimi, T.; Yokoyama, H.; Goto, A.; Beck, K. and Kitagawa, Y. (1999). A Drosophila gene encoding multiple splice variants of Kazal-type

serine protease inhibitor-like proteins with potential destinations of

mitochondria, cytosol and the secretory pathway. *European Journal of Biochemistry* 266: 282-292.

Nirmala, X.; Kodrik, D.; Zurovec, M. and Sehnal, F. (2001). Insect silk contains both a Kunitz-type and a unique Kazal-type proteinase inhibitor. *European Journal of Biochemistry* 268: 2064-2073.

Ochiai, M. and Ashida, M. (1988). Purification of a ß-1,3-glucan recognition protein in the prophenoloxidase activating system from hemolymph of the silkworm, *Bombyx mori*. *Journal of Biological Chemistry* 263: 12056-12062.

Quigley, J. P. and Armstrong, P. B. (1985). A homologue of α_2 Macroglobulin purified from the hemolymph of the horse crab *Limulus polyphemus*. *Journal of Biological Chemistry* 260: 12715-12719.

Ratanapo, S. and Chulavatnatol, M. (1990). Monodin, a new sialic acid-specific lectin from black tiger prawn (*Penaeus monodon*). *Comparative Biochemistry and Physiology* 97B: 515-520.

Ratcliffe, N. A. (1985). Invertebrate immunity - a primer for the non-specialist. *Immunology Letters* 10: 253-270.

Ratcliffe, N. A.; Brookman, J. L. and Rowley, A. F. (1991). Activation of the prophenoloxidase cascade and initiation of nodule formation in locusts by bacterial lipopolysaccharides. *Developmental and Comparative Immunology* 15: 33-39.

Ratcliffe, N. A.; Leonard, C. and Rowley, A. F. (1984). Prophenoloxidase activation: Non-self recognition and cell cooperation in insect immunity. *Science* 226: 557-559.

Renwrantz, L. (1986). Lectins in molluscs and arthropods: their occurence, origin and roles in immunity. *Symp. Zool. Soc. Lond.* 56: 81-93.

Reyes-Izquierdo, T. and Vargas-Albores, F. (2001). Proteinase activity in the white shrimp (*Penaeus vannamei*) clotting protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 287: 332-336.

Rizki, R. M. and Rizki, T. M. (1990). Encapsulation of parasitoid eggs in phenoloxidase-deficient mutants of *Drosophila melanogaster*. *Journal of Insect Physiology* 36: 523-529.

Ruoslahti, E. (1996). RGD and other recognition sequences for integrins. *Annual Review of Cell Developmental Biology* 12: 697-715.

Salvesen, G. and Enghild, J. (1993). Proteolytic and enzymes in coagulation, fibrinolysis, and complement activation. in: Methods in Enzymology. Lorand, L. and Mann, K. New York, Academic Press, INC. 223: 121-753.

Sambrook, J.; Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: primera parte, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Saul, S. J. and Sugumaran, M. (1986). Protease inhibitor controls pro-phenoloxidase activation in *Manduca sexta*. *FEBS Letters* 208: 113-116.

Saul, S. J. and Sugumaran, M. (1987). Protease mediated prophenoloxidase activation in the hemolymph of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 5: 1-11.

Saul, S. J. and Sugumaran, M. (1988). Prophenoloxidase activation in the hemolymph of *Sarcophaga bullata* larvae. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 7: 91-103.

Schroeter, J. P.; Bretaudiere, J. P.; Sass, R. L. and Goldstein, M. A. (1996). Three-dimensional structure of the Z band in a normal mammalian skeletal muscle. *Journal of Cell Biology* 133: 571-583.

Schroeter, J. P.; Kolodziej, S. J.; Wagenknecht, T.; Bretaudiere, J. P.; Tapon-Bretaudiere, J.; Strickland, D. K. and Stoops, J. K. (1992). Three-dimensional structures of the human alpha 2-macroglobulin-methylamine and chymotrypsin complexes. *Journal of Structural Biology* 109: 235-247.

Seki, N.; Muta, T.; Oda, T.; Iwaki, D.; Kuma, K.; Miyata, T. and Iwanaga, S. (1994). Horseshoe crab (1,3)-β-D-glucan-sensitive coagulation factor G. A serine protease zymogen heterodimer with similarities to beta -glucan-binding proteins. *Journal of Biological Chemistry* 269: 1370-1374.

Sjoberg, B. and Pap, S. (1989). Molecular organization of human plasma alpha 2-macroglobulin and its trypsin complexes. A small-angle x-ray scattering investigation. *Journal of Biological Chemistry* 264: 14686-14690.

Söderhäll, K. (1981). Fungal cell wall β-1,3-glucans induce clotting and phenoloxidase attachment to foreign surface of crayfish hemocyte lysate. *Developmental and Comparative Immunology* 5: 565-573.

Söderhäll, K. (1982). Prophenoloxidase activating system and melanization - a recognition system of arthropods? A review. *Developmental and Comparative Immunology* 6: 601-611.

Söderhäll, K. (1992). Biochemical and molecular aspects of cellular communication in arthropods. *Boll. Zool.* 59: 141-151.

Söderhäll, K. and Ajaxon, R. (1982). Effect of quinone and melanin on mycelial growth of *Aphanomyces* spp. and extracellular protease of *Aphanomyces astaci*, a parasite of crayfish. *Journal of Invertebrate Pathology* 39: 105-109.

Söderhäll, K.; Cerenius, L. and Johansson, M. W. (1994). The prophenoloxidase activating system and its role in invertebrate defense. *Annals of the New York Academy of Sciences* 712: 155-161.

Söderhäll, K. and Häll, L. (1984). Lipopolysaccharide-induced activation of prophenoloxidase activating system in crayfish haemocyte lysate. *Biochimica et Biophysica Acta* 797: 99-104.

Söderhäll, K.; Rögener, W.; Söderhäll, I.; Newton, R. P. and Ratcliffe, N. A. (1988). The properties and purification of a *Blaberus craniifer* plasma protein which enhances the activation of haemocyte prophenoloxidase by a ß-1,3-glucan. *Insect Biochemistry* 18: 323-330.

Söderhäll, K. and Smith, V. J. (1983). Separation of the haemocyte populations of *Carcinus maenas* and other marine decapods and phenoloxidase distribution. *Developmental and Comparative Immunology* 7: 229-239.

Söderhäll, K.; Smith, V. J. and Johansson, M. W. (1986). Exocitosis and uptake of bacteria by isolated haemocyte populations of two crustaceans: evidence for cellular co-operation in the defence reactions of arthropods. *Cell and Tissue Research* 245: 43-49.

Söderhäll, K.; Vey, A. and Ramstedt, M. (1984). Hemocyte lysate enhancement of fungal spore encapsulation by crayfish hemocytes. *Developmental and Comparative Immunology* 8: 23-29.

Song, Y. L. and Hsieh, Y. T. (1994). Immunostimulation of tiger shrimp (Penaeus monodon) hemocytes for generation of microbicidal substances: analysis of reactive oxygen species. *Developmental and Comparative Immunology* 18: 201-219.

Sotelo-Mundo, R.; Islas Osuna, M.; E., D. L. R.; Hernández-López, J.; Vargas-Albores, F. and Yepiz-Plascencia, G. (Submitted). Lysozyme from hemocytes of the white shrimp Penaeus vannamei:
cDNA sequencing and enzymatic activity. *Marine Biotechnology*.

Sottrup-Jensen, L. (1989). α-macroglobulin: structure, shape, and mechanism of proteinase complex formation. *Journal of Biological Chemistry* 264: 11539-11542.

Sottrup-Jensen, L. (1994). Role of internal thiol esters in the alpha-macroglobulin-proteinase binding mechanism. *Annals of the New York Academy of Sciences* 737: 172-187.

Sottrup-Jensen, L.; Hansen, H. F.; Pedersen, H. S. and Kristensen, L. (1990). Localization of epsilon-lysyl-gamma-glutamyl cross-links in five human alpha 2-macroglobulin-proteinase complexes. Nature of the high molecular weight cross-linked products. *Journal of Biological Chemistry* 265: 17727-17737.

Sottrup-Jensen, L.; Stepanik, T. M.; Kristensen, T.; Wierzbicki, D. M.; Jones, C. M.; Lonblad, P. B.; Magnusson, S. and Petersen, T. E. (1984). Primary structure of human alpha 2-macroglobulin. V. The complete structure. *Journal of Biological Chemistry* 259: 8318-83-27.

Spycher, S. E.; Arya, S.; Isenman, D. E. and Painter, R. H. (1987). A functional, thioester-containing α_2-macroglobulin homologue isolated from the hemolymph of the american lobster (*Homarus americanus*). *Journal of Biological Chemistry* 262: 14606-14611.

Sritunyalucksana, K.; Cerenius, L. and Söderhäll, K. (1999). Molecular cloning and characterization of prophenoloxidase in the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. *Developmental and Comparative Immunology* 23: 179-186.

Sritunyalucksana, K.; Lee, S. Y. and Soderhall, K. (2002). A beta-1,3-glucan binding protein from the black tiger shrimp, Penaeus monodon. *Developmental and Comparative Immunology* 3: 237-245.

Sritunyalucksana, K. and Söderhäll, K. (2000). The proPO and clotting system in crustaceans. *Aquaculture* 191: 53-69.

Stöcker, W.; Breit, S.; Sottrup-Jensen, L. and Zwilling, R. (1991). α2-macroglobulin from the haemolymph of the freshwater crayfish *Astacus astacus*. *Comparative Biochemistry and Physiology* 98B: 501-509.

Sugumaran, M.; Hennigan, B.; Semensi, V.; Mitchell, W. and Rivera, T. (1988). Differential mechanism of oxidation of N-acetyldopamine and N-acetylnorepinephrine by cuticular phenoloxidase from *Sarcophaga bullata*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 8: 229-241.

Sugumaran, M.; Saul, S. J. and Ramesh, N. (1985). Endogenous protease inhibitors prevent undesired activation of prophenolase in insect hemolymph. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 132: 1124-1129.

Sun, S. C.; Lindstrom, I.; Boman, H. G.; Faye, I. and Schmidt, O. (1990). Hemolin -An insect immune protein belonging to the immunoglobulin superfamily. *Science* 250: 1729-1732.

Tai, J. Y.; Seid, R. C.; Hun, R. D. and Liu, T.-Y. (1977). Studies on *Limulus* Amoebocytres Lysate II Purification of the coagulogen and the mechanism of clotting. *Journal of Biological Chemistry* 252: 4773-4776.

Thogersen, I. B.; Salvesen, G.; Brucato, F. H.; Pizzo, S. V. and Enghild, J. J. (1992). Purification and characterization of an α-macroglobulin proteinase inhibitor from the mollusc *Octopus vulgaris*. *Biochemical Journal* 285: 521-527.

Towbin, H.; Staehelin, T. and Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76: 4350-4354.

Van Leuven, F.; Marynen, P.; Cassiman, J. J. and Van den Berghe, H. (1982). Relation of internal thioesters to conformational change and receptor-recognition site in alpha 2-macroglobulin complexes. *Biochemical Journal* 203: 405-411.

Vargas-Albores, F. (1995). The defense system of brown shrimp (*Penaeus californiensis*): Humoral recognition and cellular responses. *Journal of Marine Biotechnology* 3: 153-156.

Vargas-Albores, F.; Guzmán-Murillo, A. and Ochoa, J. L. (1993). A Lipopolysaccharide-binding agglutinin isolated from brown shrimp (*Penaeus californiensis* HOLMES) haemolymph. *Comparative Biochemistry and Physiology* 104A: 407-413.

Vargas-Albores, F.; Guzmán-Murillo, M. A. and Ochoa, J.-L. (1992). Size-dependent haemagglutinating activity in the haemolymph from sub-adult blue shrimp (*Penaeus stylirostris* Stimpson). *Comparative Biochemistry and Physiology* 103A: 487-491.

Vargas-Albores, F.; Guzmán-Murillo, M. A. and Ochoa, J.-L. (1993). An anticoagulant solution for haemolymph collection and prophenoloxidase studies of Penaeid shrimp (*Penaeus californiensis*). *Comparative Biochemistry and Physiology* 106A: 299-303.

Vargas-Albores, F.; Jiménez-Vega, F. and Söderhäll, K. (1996). A plasma protein isolated from brown shrimp (*Penaeus californiensis*) which enhances the activation of prophenoloxidase system by β-1,3-glucan. *Developmental and Comparative Immunology* 20: 299-306.

Vargas-Albores, F.; Jiménez-Vega, F. and Yepiz-Plascencia, G. (1997). Purification and comparison of β-1,3-glucan binding protein from white shrimp (*Penaeus vannamei*). *Comparative Biochemistry and Physiology* 116B: 453-458.

Vargas-Albores, F. and Yepiz-Plascencia, G. (1998). Shrimp Immunity. *Trends in Comparative Biochemical & Physiology* 5: 197-210.

Vasta, G. R. and Cohen, E. (1984). Sialic acid binding lectins in the serum of american spiders the genus *Aphonopelma*. *Developmental and Comparative Immunology* 8: 515-522.

Vasta, G. R. and Marchalonis, J. J. (1983). Humoral recognition factors in the Arthropoda. The specificity of Chelicerata serum lectins. *American Zoologist* 23: 157-171.

Wang, R.; Lee, S. Y.; Cerenius, L. and Söderhäll, K. (2001). Properties of the prophenoloxidase activating enzyme of the freshwater crayfish, *Pacifastacus leniusculus*. *European Journal of Biochemistry* 268: 895-902.

Wu, S. M.; Boyer, M. C. and Pizzo, S. (1997). The binding of receptor-recognized α 2 - Macroglobulin to the low density lipoprotein receptor-related protein and the a 2 M signaling receptor is decoupled by oxidation. *Journal of Biological Chemistry* 272: 20627-20635.

Yepiz-Plascencia, G.; Vargas-Albores, F.; Jimenez-Vega, F.; Ruiz-Verdugo, L. M. and Romo-Figueroa, G. (1998). Shrimp plasma HDL and β-glucan binding protein (BGBP): comparison of biochemical characteristics. *Comparative Biochemistry and Physiology* 121B: 309–314.

Yigzaw, Y.; Gielens, C. and Préaux, G. (2001). Isolation and characterization of an K-macroglobulin from the gastropod mollusc *Helix pomatia* with tetrameric structure and preserved activity after methylamine treatment. *Biochimica et Biophysica Acta* 1545: 104-113.

Yoshida, H. and Ashida, M. (1986). Microbial activation of two serine enzymes and prophenoloxidase in the plasma fraction of hemolymph of the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochemistry* 16: 539-545.

Yoshida, H.; Kinoshita, K. and Ashida, M. (1996). Purification of a peptidoglycan recognition protein from hemolymph of the silkworm, *Bombyx mori*. *Journal of Biological Chemistry* 271: 13854-13860.

ELSEVIER

Comparative Biochemistry and Physiology 00:00-00

CBP

Purification and characterization of α2-macroglobuline from the white shrimp (Penaeus vannamei)

Teresa Gollas-Galván, Rogerio R. Sotelo-Mundo, Gloria Yepiz-Plascencia, Claudia Vargas-Requena and Francisco Vargas-Albores

Marine Biotechnology; CIAD, PO Box 1735; Hermosillo Son.; 83000, Mexico

Abstract

α2-macroglobulin (α2M) is a broad-spectrum protease-binding protein, which is abundant in plasma from vertebrates and several invertebrate phyla. This protein was purified from cell-free hemolymph of the white shrimp, Penaeus vannamei, using Blue-Sepharose and Phenyl-Sepharose chromatography. The shrimp α2M is a 380 kDa protein, a homodimer of two apparently identical subunits of ~180 kDa linked by disulfide bridges. The amino acid sequence of the N-terminus is similar to the Limulus α2M counterpart. The shrimp α2M has a wide inhibition spectrum against different proteinase types including: trypsin, leucine amino peptidase, chymotrypsin, elastase and papain. The secondary structure of shrimp α2M is mainly beta-sheet (36%), with a characteristic minimum elipticity at 217 nm. Evidence for a thiolester-mediated inhibition mechanism of proteases by α2M was provided by inactivation with methylamine.

Keywords: shrimp immunity, proteinase, penaeid, circular dicroism, dye affinity chromatography

Corresponding Author: Dr. Francisco Vargas-Albores, CIAD, PO Box 1735, Hermosillo, Son, 83000, Mexico, Tel: +52 (662) 289-24-00, Fax: +52 (662) 280-00-55, Email: fvargas@cascabel.ciad.mx

1. Introduction

α2-Macroglobulin (α2M) has been defined as a ubiquitous high-molecular weight proteinase inhibitor. Although most of the biochemical studies have been done with human α2M, this protein has been detected in mammals, birds, reptiles, amphibians and fishes. The α2M has also been identified and characterized in insects [1] and mollusk [2, 3] as well as crustaceans including freshwater crayfish [4, 5], lobster [6], and horseshoe crab [7, 8].

Active-site proteinase inhibitors usually are reactive against a limited variety of enzymes; however, α2M is notably promiscuous, reacting with members of all classes of proteases [8-10]. In addition, α2M does not block the catalytic site, but physically traps the proteinases inside a pocket or cage and sterically restricts the substrates access. Molecules small enough to diffuse into the cage are actively hydrolyzed, whereas for large proteins the access to the active site is restricted and are thus, protected from degradation.

The molecular trap model was proposed by Barrett and Starkey [11], and postulates that the proteinases cleave one or more sensitive peptide bonds located in a defined "bait" region of the α2M molecule [11, 12]. This leads to conformational changes of the α2M and the physical trapping of the proteinase within the α2M cage, without affecting the proteinase catalytic site. After binding and entrapment of the proteinase, a receptor recognition site is exposed , which permits the clearance of the α2M-proteinase complex from the circulatory system followed by degradation. Blood cells appear to be involved in this process [12]. Evidence for the conformational change of α2M upon proteinase binding or methylamine modification derives from electron microscopy [14], gel electrophoresis [15], analytical ultracentrifugation [16] and circular dichroism [17] analyses.

Although most of the biochemical studies have focused on human α2M, its role in immunity and the importance of regulation of proteolysis in invertebrates may have particular importance [18]. Several proteinases are involved in the activation of the coagulation process [19-21] and the prophenoloxidase activation system [22-25] in arthropods. Thus, proteinase inhibitors are required to control the proteinases activity in physiological range and to avoid tissue damage. α2M has been purified from some crustaceans [4-6], but not from marine penaeids. In this paper we report the purification and characterization of α2M from the Pacific white shrimp, Penaeus (=Litopenaeus) vannamei.

2. Materials and Methods

Hemolymph collection

Intermolt white shrimp (Penaeus vannamei) were obtained from a commercial farm (Aqualarvas, Son, Mexico) and kept in aerated seawater (36 ppt). The hemolymph was withdrawn from the ventral sinus located at the base of the first abdominal region, into two volumes of precooled shrimp anticoagulant solution [26]. The hemocytes were immediately separated from plasma by centrifugation at 800xg for 10 min at 4°C.

Purification of white shrimp α2M

Cell-free plasma (10 ml) was dialyzed overnight against 50 mM Tris (pH 8) and centrifuged at 10,000xg for 5 min at 4°C to eliminate precipitated proteins. The supernatant was applied to a Blue-Sepharose column (20 ml) previously equilibrated with 50 mM Tris (pH 8). The flow through α2M-containing fractions was concentrated by ultrafiltration in an YM-100

membrane (Amicon) to 6.5 mg/ml. The sample salinity was adjusted to 3 M NaCl and applied to a 1-ml Phenyl-Sepharose column (High Trap, Pharmacia), previously equilibrated with 3 M NaCl. Bound proteins were eluted using a linear gradient of NaCl (from 3 to 0 M). Fractions were analyzed for α2M activity and purity confirmed by PAGE; those containing α2M were pooled and used for further experiments. Molecular weight was determined by gel filtration in a 100-ml Bio gelA5 column calibrated with 0.2 M de NaCl 50 mM Tris (pH 8) and using gel filtration standards (Bio-Rad, 1511901): Bovine thyroglobulin (670 kDa), bovine gammaglobulin (158 kDa), Ovoalbumin (44 kDa), horse myoglobin (17 kDa) and Vitamin B12 (1.3 kDa).

Polyacrylamide gel electrophoresis

Analytical SDS-PAGE was performed using 6% homogeneous polyacrylamide gels in a Mini Protean II system (Bio-Rad) under reducing or non-reducing conditions [27]. For reducing conditions, either 2-mercaptoethanol (2ME) or dithiothreitol (DTT) was used. The gels were run using Tris-glycine buffer (25 mM Tris, 192 mM glycine, 0.1% SDS, pH 8.3) and stained either with a 0.1% Coomassie Brilliant Blue R 250 solution or silver stain [28].

Antibodies and lectins recognition

After separation by SDS-PAGE, the proteins were electrotransferred to a PVDF membrane (Immobilon P, Millipore), by soaking the gel in transfer buffer (25 mM Tris, 190 mM glycine, 20% methanol) using a Mini Protean II Transblot System (200 mA/105 min). For Western blotting, the membrane was blocked and incubated with rabbit anti-human α2M antibodies (Sigma, Cat. M-1893) diluted 1:5000, for 2 h. After washing three times with PBS-Tween (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na2HPO4, 1.7 mM KH2PO4, 0.05% Tween, pH 7.2), the membrane was incubated with peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG for 1.5 h. Detection was performed with 0.02 mM 3,3,N-diaminobenzidine [29]. For lectin recognition, after blocking the membrane was incubated with 10 μg/ml biotinylated lectins (Pierce) from: jack bean (Concanavalin A), Pisum sativum (PSA), peanut (PNA), wheat germ (WGA), soybean (SBA), horse gram (DBA) and castor bean (RCA). After washing, the reaction with the lectins was detected by using avidin-peroxidase and 3,3,N-diaminobenzidine as substrate.

N-Terminal sequence

Purified shrimp α2M was reduced with 2ME. The sample was run in 5% SDS-PAGE and electrotransferred to 0.45 μm Immobilon P membrane. The membrane was stained with 0.1% Coomassie Brilliant Blue R 250 and washed extensively with distilled water. N-terminal sequence determination was performed by the University of California, Davis (Molecular Structure Facility).

α2-Macroglobulin activity assay

α2M activity was measured in a microplate by incubating 50 μl of sample with 10 μl of 1 mg/ml trypsin for 15 min at 37°C. After the incubation, 10 μl of 2 mg/ml soybean trypsin inhibitor (STI) were added and incubated for 10 min at 37°C. Finally, 100 μl of 1 mg/ml BAPNA (N-Benzoyl-DL-arginine-p-nitroanilide) in Tris 50 mM, pH 8, were added and incubated 2 h at 37°C. Optical density at 415 nm was recorded and activity calculated as μg of trypsin trapped by α2M, using commercial trypsin (Sigma Chem. Co.) as reference.

Inhibitory assays

Shrimp α2M proteinase inhibitory activity was examined using leucine amino peptidase, trypsin, chymotrypsin, elastase and papain (Sigma Chem. Co.). α2M (100 μl) was incubated with 100 μl (2 U in 50 mM Tris, pH 7.0) of proteinase for 30 min a 22°C. Afterward, 0.4 ml of 0.5% azoalbumin, in 50 mM Tris (pH 8), were added and incubated 1 h at 37°C. Adding 0.5 ml of 10% trichloroacetic acid stopped the reaction and the absorbance at 366 nm of the supernatant was measured after centrifugation for 15 min, at 12,000xg.

Methylamine incubation

Shrimp α2M (0.6 μg/100 μl) was incubated at 22°C with 200 mM methylamine in 100 mM Tris buffer (pH 8) for 1, 4, 16 or 24 h. The capability of the shrimp α2M to protect trypsin was determined with BAPNA, as described above.

Circular dichroism of α2M

CD spectra were acquired in a Jasco 700 CD spectrophotopolarimeter using 1-cm path-length cells in the far-UV range (183-260 nm), previously calibrated with (+)-10-canphorsulphonic acid. The CD spectra were recorded at 25°C, every 1.0 nm with a 2-s averaging time/point and a 1 nm band-pass. Averaged spectra were corrected for the blank and smoothed. Secondary structure content was determined by analysis of the molar elipticities with the SELCON algorithm [30, 31]

3. Results and Discussion

α2M is a plasma protein that has been detected in all studied animals. It is a non-specific inhibitor for all types of proteinases using a singular mechanism. α2M forms a cage and physically entraps the proteinase avoiding proteolysis of large substrates but not small ones. This property is used to determine its presence in biological fluids where the α2M activity is referred as the activity of trapped trypsin against BAPNA. Based on the method described by [32], a miniaturized method was implemented in order to minimize the required sample volume.

The shrimp hemolymph was collected in an anticoagulant solution having the same ionic and osmotic values of shrimp hemolymph. This prevents the cellular activation and the release of proteins from hemocytes [26]. The plasma was dialyzed to equilibrate it with the initial buffer for dye affinity chromatography. In this process, a precipitate containing mainly the beta glucan binding protein (BGBP) [33] was observed. BGBP is a relatively abundant plasma protein and it is practically eliminated from plasma by dialysis [33].

Dialyzed and centrifugation-clarified plasma was applied to the Blue-Sepharose column. Although most α2M activity and hemocyanin (the most abundant shrimp plasma protein) were not retained in the column, other proteins including clotting protein (CP) were separated (Fig 1 A). This was an important step since CP is also a large dimeric protein [34-36] with size similar to α2M. The α2M-rich fractions were pooled and concentrated by ultrafiltration using a 100-kDa cutoff membrane. In this process the buffer was changed to 3 M NaCl, 100 mM Tris (pH 8), and the sample was applied to a Phenyl-Sepharose column. α2M interacted strongly with the matrix, eluting at the end of the NaCl gradient as a unique protein as demonstrated by PAGE (Fig 1B), while other proteins, mainly hemocyanin, were eliminated during the washing step.

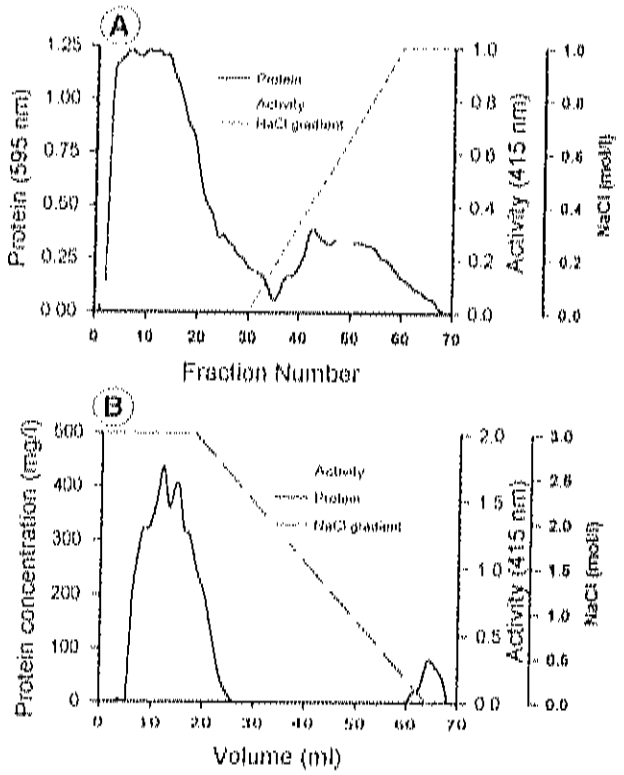

Figure 1; Elution profiles of shrimp α2M. (A) Blue-Sepharose column: Dialyzed plasma (10 ml) was applied to a 10 ml column. (B) Phenyl-Sepharose column: α2M-containing fractions from Blue-Sepharose were pooled, equilibrated with initial buffer and applied to the column. Collected fractions were analyzed by SDS-PAGE and α2M activity.

After dialysis and two chromatographic steps, 60 μg of pure α2M were obtained from 10 ml of shrimp plasma. Shrimp α2M showed a relative molecular weight of 400 kDa by gel filtration in Bio-A5M column in native conditions (data not shown) and 380 kDa by SDS-PAGE (4-15% gel). However, under reducing conditions using either 2ME or DTT, shrimp α2M was dissociated in four main bands (180, 116, 95 and 86 kDa). Conversely, when α2M was incubated with 200 mM methylamine before reduction, a unique band of 180 kDa was detected by SDS PAGE (Fig. 2). Similar fragmentation produced by heat treatment has also been observed in crayfish α2M, where the 190-kDa subunit is cleaved to fragments of 60 and 140 kDa and this cleavage could be prevented by prior treatment with methylamine [4]. This could be explained as a peptide-bond rupture at the thiol ester when α2M is incubated in SDS-PAGE reducing sample buffer under mild denaturing conditions [15, 37, 38].

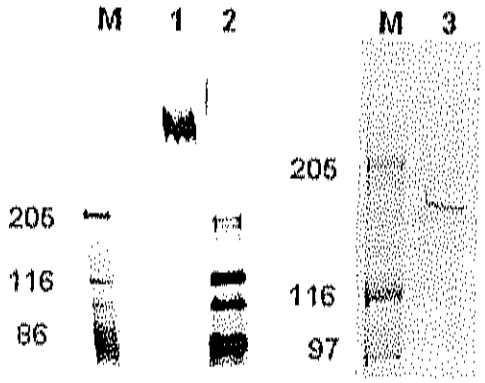

Figure 2: Electrophoretic analysis. SDS-PAGE was performed on 5% gels. M: molecular weight markers (kDa). Lane 1, shrimp α2M. Lane 2, shrimp α2M reduced with 2ME. Lane 3, α2M treated with 2ME previously incubated with 200 mM methylamine.

The N-terminal amino acid sequence of the 180-kDa subunit, separated by reducing SDS-PAGE and electrotransferred to Immobilon P, was determined. Ten amino acids were identified and they are similar to other invertebrate α2M N-terminal sequences (Fig. 3): 40% identity to Limulus [8], and ~20% to Pacifastacus [4] and Astacus [5] α2Ms, in agreement to the low known conservation in this region for α2M [8]. Notably, and despite this low conservation, alignment with human α2M [10] reveals also 3 residues in similar positions.

From Phenyl-Sepharose chromatography, α2M was recovered in very low salt solution, compared to the shrimp hemolymph salinity, which is equivalent to 450 mM NaCl [26]. Storing of purified shrimp α2M in low salinity solution resulted in loss of activity. Addition of BSA (1 mg/ml) did not prevent this inactivation; however, storing the α2M at Salinities similar to shrimp plasma, the activity remained considerable more stable (Fig.4 A). Since the loss of activity is irreversible, apparently the low salinity permits a slow hydrolysis of the thiolester bond as well as polymerization through newly formed disulphide bridges, provoking its inactivation [39].

										10														20		
Shrimp	-	-	-	-	-	-	-	-	-	**L**	T	X	P	L	Q	L	-	-	-	-	-	**A**	N	**V**	-	
Astacus	-	-	-	-	-	-	S	**Y**	**I**	**I**	T	T	P	**R**	M	W	V	A	G	S	P	A	Q	V	-	
Pacifastacus	-	-	-	-	-	-	S	**Y**	**V**	**I**	T	T	P	**K**	M	W	V	-	-	-	-	-	-	-	-	
Homarus	-	-	-	-	-	-	S	**Y**	**I**	**I**	T	T	P	**R**	M	W	V	A	G	S	P	A	Q	V	-	
Limulus	-	-	-	-	K	S	G	F	I	L	T	A	P	K	S	L	T	P	G	K	S	N	I	L	N	
Octopus	D	E	I	D	E	G	H	Y	M	I	L	V	P	R	N	F	V	H	G	K	-	-	-	-	-	
Human	S	V	S	G	K	P	Q	Y	M	L	-	V	P	S	L	L	H	T	E	T						

Figure 3: Comparison of N-Terminal sequence of shrimp α2M with other α2Ms. Identical residues in crustaceans are shaded and conservative replacements are shown in bold.

Other feature of the α2M family is the sensibility to methylamine. Purified shrimp α2M was incubated different times (1, 4, 12 and 24 hours) with 200 mM methylamine before testing its trypsin-arrest ability. After 4 h, the α2M ability was inhibited 50% (Fig. 4 B) and after 24 h shrimp α2M was unable to arrest trypsin. In general, the reaction of α2M with methylamine is slow, but variations can be observed among α2Ms of different origins [39]. For example, the *Biomphalaria* α2M trypsin arrest ability is inhibited 89% after 6 h incubation with methylamine [40], but the Astacus α2M requires 48 h to be inhibited 85% [5].

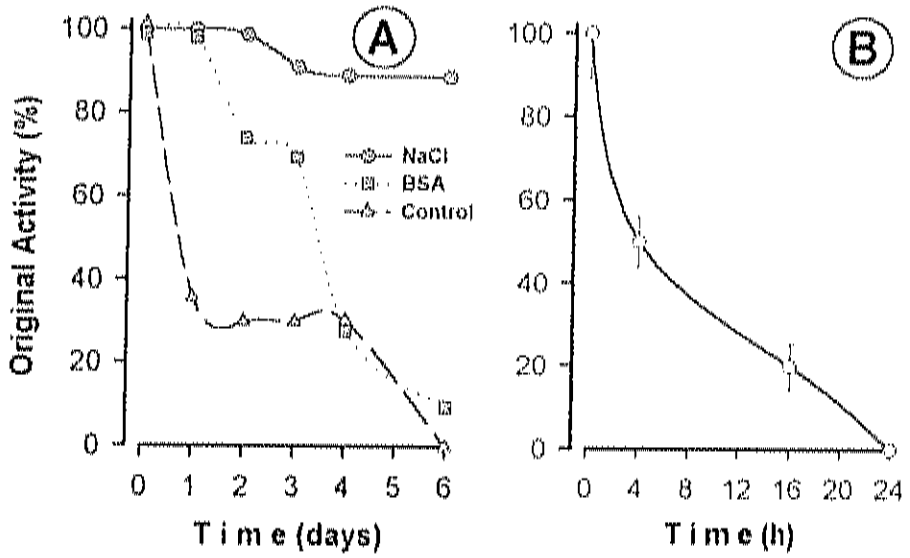

Figure 4: Reduction of shrimp α2M to arrest trypsin activity. (A) By low salinity: The samples were incubated at 4°C and the activity of α2M determined every 24 h. (B) By methylamine: Samples were incubated with 200 mM methylamine and the α2M protecting activity monitored.

The fragments produced by reduction with 2ME were immobilized in PVDF membrane and incubated with anti-human α2M antibodies and biotinylated lectins. Both antibodies and lectins strongly recognized 3 fragments, 116, 95 and 86-kDa, (data not shown), since 2ME reduction provoked fragmentation of the subunit, remaining only a minute amount of this polypeptide, the signal for the 180-kDa band was very faint. Antibodies recognition indicates that the shrimp α2M shares several structural similar epitopes with the human counterpart despite the differences in the number of subunits and other features [4, 5, 7]. Vertebrate and invertebrate known α2M have similar function, mechanism and very well conserved primary sequences in the bait, thiol, and receptor-biding region [8, 41]. The lectins PSA and WGA were capable of interacting with the shrimp α2M, indicating that mannose and β-galactose are presents in this glycoprotein. Although in Limulus α2M only mannose has been reported [8], it is clear that α2M contains a saccharide moiety that can comprise up to 20% of its mass, as found in the snail Helix pomatia, [2], the crayfish P. leniusculus, [4] and soft tick Ornithodoros moubata [42] proteins.

Shrimp α2M is a mainly beta-sheet structure in its native structure (Figure 5). Shrimp α2M CD data was analyzed with the SELCON algorithm and data in the literature has been analyzed with other methods; nevertheless, features such as a minima around 215 nm are reported for bovine, chicken and frog α2M, an indication of similar beta-sheet content in the proteins . Similarly, a single trough at approximately 215 nm in other α2M, is reported for the green turtle (Chelonia mydas japonica) [43], bovine [44, 45], human [46] and the horseshoe crab (Limulus polyphemus) [44]. Shrimp α2M CD was most similar to the frog Rana pipiens shrimp α2M, indicating 36% and 33% of beta-sheet structures, respectively, and coinciding also in the alpha-helix content with 9% and 11%, correspondingly to shrimp and frog α2Ms [47]. Due to the apparent conservation of secondary structure content, it is likely that shrimp α2M may also present a conformational change due to proteinase binding. Although important differences exist between mammalian and invertebrate α2Ms, a common feature seems to be the bait mechanism and the conformational shift associated to the thiol reaction. α2Ms remains as a paradigm for establishing structure-function relationships, due its diverse subunit composition and spatial arrangement of subunits, as studied by electron microscopy [see for example 43].

Table 1: Inhibitory effect of the shrimp α2M on different proteinases. Azoalbumin was used as substrate and A366nm was measured in a microplate reader. Average ± standard error (n=3).

Enzyme	Without α_2M	With α_2M
Leucine Aminopeptidase	0.45 ± 0.02	0.02 ± 0.01
Trypsin	1.20 ± 0.13	0.09 ± 0.01
Chymotrypsin	0.83 ± 0.06	0.12 ± 0.01
Elastase	0.62 ± 0.03	0.03 ± 0.01
Papain	1.10 ± 0.09	0.20 ± 0.09

Trapping and clearance of proteinases are well-characterized functions of α2M. The purified shrimp α2M was capable of arresting all tested proteinases (Table 1), reducing their catalytic action on azoalbumin up to 90%. The extensive spectrum of inhibition is distinctive for α2M family members and, besides to vertebrates, this has been reported in crustaceans, as Astacus [5] as well as in mollusks, as Octopus [3] and Biomphalaria glabrata [42]. Proteinase trapping begins by a proteolytic cleavage at the α2M bait region that is rich in Lys, Arg and Phe and contains susceptible sequences for endopeptidases. However, reduction of the leucine aminopeptidase activity can not be explained as a proteolytic attack to the bait region because this enzyme hydrolyzes peptide bonds adjacent to a free amino group. Considering that leucine aminopeptidase has thiolesterase activity, the interaction with α2M could be through a direct attack to this characteristic group.

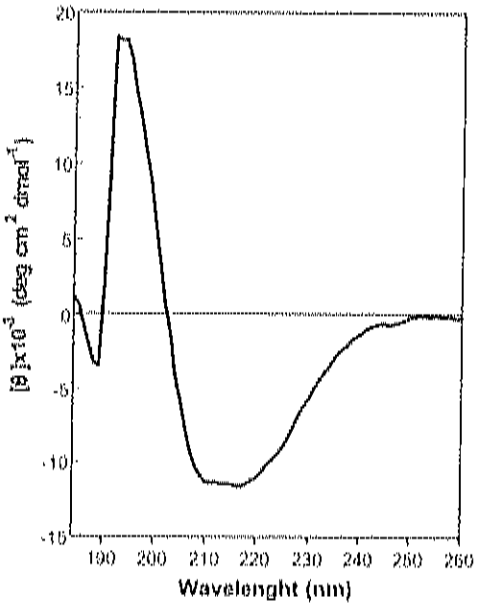

Figure 5: Far UV circular dichroism spectra of the shrimp α2M protein.

α2M is a plasma glycoprotein that arrests proteinases avoiding the degradation of host protein and removing them from circulation. This unique mechanism has been demonstrated in shrimp α2M, although a direct participation in physiological process like proPO activating system remains to be investigated. Most characteristics are shared with other member of the α2M family, but some particularities are noted in shrimp α2M. For example, this is the first report about the instability produced by low salinity and this may be explained as an adaptation necessary for a plasma protein from a marine organism. Whether a shrimp α2M-receptor binding site exists and its relation to a clearance mechanism in marine decapods is still unknown, but may be an important component of the innate humoral system of marine invertebrates.

Acknowledgments
This research was supported by grants from SIMAC, MEXUS and CONACyT (31544-B). We thank Drs. Adela Rodriguez-Romero and Alejandra Hernández-Santoyo for the use of equipment at Chemistry Institute, National University, Mexico (UNAM).

References

1. Brivio, M.F., M. Pagani, and G. Scari, *Biochemical evidence of phenoloxidase activity (pro-PO system) in larvae of Allogamus auricollis (Insecta, Trichoptera).* Comparative Biochemistry and Physiology, 1992. **102B**(4): p. 867-871.
2. Yigzaw, Y., C. Gielens, and G. Préaux, *Isolation and characterization of an K-macroglobulin from the gastropod mollusc Helix pomatia with tetrameric structure and preserved activity after methylamine treatment.* Biochimica et Biophysica Acta, 2001. **1545**: p. 104-113.
3. Thogersen, I.B., et al., *Purification and characterization of an α-macroglobulin proteinase inhibitor from the mollusc Octopus vulgaris.* Biochemical Journal, 1992. **285**: p. 521-527.
4. Hergenhahn, H.G., M. Hall, and K. Söderhäll, *Purification and characterization of an α_2-macroglobulin-like proteinase inhibitor from plasma of the crayfish Pacifastacus leniusculus.* Biochemical Journal, 1988. **255**: p. 801-806.
5. Stöcker, W., et al., *α2-macroglobulin from the haemolymph of the freshwater crayfish Astacus astacus.* Comparative Biochemistry and Physiology, 1991. **98B**(4): p. 501-509.
6. Spycher, S.E., et al., *A functional, thioester-containing α_2-macroglobulin homologue isolated from the hemolymph of the american lobster (Homarus americanus).* Journal of Biological Chemistry, 1987. **262**: p. 14606-14611.
7. Armstrong, P.B., et al., *Structure of α2 macroglobulin from the arthropod Limulus polyphemus.* Journal of Biological Chemistry, 1991. **266**: p. 2526-2530.
8. Iwaki, D., et al., *Molecular cloning of Limulus α_2-macroglobulin.* European Journal of Biochemistry, 1996. **242**(3): p. 822-831.
9. Quigley, J.P., et al., *Reaction of proteinases with α2-macroglobulin from the American horseshoe crab, Limulus.* Journal of Biological Chemistry, 1991. **266**(29): p. 19426-19431.
10. Sottrup-Jensen, L., *α-macroglobulin: structure, shape, and mechanism of proteinase complex formation.* Journal of Biological Chemistry, 1989. **264**: p. 11539-11542.
11. Barrett, A.J. and P.M. Starkey, *The interaction of α2-Macroglobulin with proteinases. Characteristics and specificity of the reaction and a hypotesis concerning its molecular mechanism.* Biochemical Journal, 1973. **133**: p. 709-724.
12. Armstrong, P.B. and J.P. Quigley, *α2 -macroglobulin: an evolutionarily conserved arm of the innate immune system.* Developmental and Comparative Immunology, 1999. **23**: p. 375-390.
13. Melchior, R., J.P. Quigley, and P.B. Armstrong, *Alpha-2-Macroglobulin-*

mediated clearance of proteases from the plasma of the American horseshoe crab, Limulus polyphemus. Journal of Biological Chemistry, 1995. **270**(22): p. 13496-13502.

14. Svehag, S.E., B. Chesebro, and B. Bloth, *Ultrastructure of gamma-M immunoglobulin and alpha macroglobulin: electron-microscopic study.* Science, 1967. **158**(803): p. 933-6.
15. Barrett, A.J., M.A. Brown, and C.A. Sayers, *The electrophoretically 'slow' and 'fast' forms of the alpha 2- macroglobulin molecule.* Biochem J, 1979. **181**(2): p. 401-18.
16. Gonias, S.L., J.A. Reynolds, and S.V. Pizzo, *Physical properties of human alpha 2-macroglobulin following reaction with methylamine and trypsin.* Biochim Biophys Acta, 1982. **705**(3): p. 306-14.
17. Bjork, I., T. Lindblom, and P. Lindahl, *Changes of the proteinase binding properties and conformation of bovine α_2-macroglobulin on cleavage of the thio ester bonds by methylamine.* Biochemistry, 1985. **24**: p. 2653-2660.
18. Kanost, M.R., *Serine proteinase inhibitors in arthropod immunity.* Developmental and Comparative Immunology, 1999. **23**: p. 291-301.
19. Muta, T., et al., *Proclotting enzyme from horseshoe crab hemocytes. cDNA cloning, disulfide locations, and subcellular localization.* Journal of Biological Chemistry, 1990. **265**(36): p. 22426-433.
20. Roth, R.I. and J. Levin, *Purification of Limulus polyphemus proclotting enzyme.* Journal of Biological Chemistry, 1992. **267**(33): p. 24097-24102.
21. Muta, T., et al., *Purified horseshoe crab factor G - reconstitution and characterizaton of the (1-3)-b-D-glucan-sensitive serine protease cascade.* Journal of Biological Chemistry, 1995. **270**(2): p. 892-897.
22. Aspán, A., et al., *Purification and characterization of a prophenoloxidase activating enzyme from crayfish blood cells.* Insect Biochemistry, 1990. **20**(7): p. 709-718.
23. Hernández-López, J., T. Gollas-Galván, and F. Vargas-Albores, *Activation of the prophenoloxidase system of the brown shrimp (Penaeus californiensis Holmes).* Comparative Biochemistry and Physiology, 1996. **113C**: p. 61-66.
24. Söderhäll, K. and L. Cerenius, *Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity.* Current Opinion in Immunology, 1998. **10**(1): p. 23-28.
25. Wang, R., et al., *Properties of the prophenoloxidase activating enzyme of the freshwater crayfish, Pacifastacus leniusculus.* European Journal of Biochemistry, 2001. **268**: p. 895-902.
26. Vargas-Albores, F., M.A. Guzmán-Murillo, and J.-L. Ochoa, *An anticoagulant solution for haemolymph collection and prophenoloxidase studies of Penaeid shrimp (Penaeus californiensis).* Comparative Biochemistry and Physiology, 1993. **106A**(2): p. 299-303.
27. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4.* Nature, 1970. **227**: p. 680-685.
28. Merril, C.R. and M.E. Pratt, *A silver stain for the rapid quantitative detection of proteins or nucleic acids on membranes or thin layer plates.* Analytical Biochemistry, 1986. **156**: p. 96-110.
29. Harlow, E. and D. Lane, *Antibodies. A laboratory manual.* Primera edición ed. 1988, United States of America: Cold Spring Harbor Laboratory.
30. Hennessey, J.P., Jr. and W.C. Johnson, Jr., *Information content in the circular dichroism of proteins.* Biochemistry, 1981. **20**(5): p. 1085-94.
31. Sreerama, N. and R.W. Woody, *Poly(pro)II helices in globular proteins: identification and circular dichroic analysis.* Biochemistry, 1994. **33**(33): p. 10022-5.

32. Ganrot, P.O., *Determination of alpha-2-macroglobulin as trypsin-protein esterase.* Clinica Chimica Acta, 1966. **14**: p. 493-501.
33. Vargas-Albores, F., F. Jiménez-Vega, and G. Yepiz-Plascencia, *Purification and comparison of β-1,3-glucan binding protein from white shrimp (Penaeus vannamei).* Comparative Biochemistry and Physiology, 1997. **116B**(4): p. 453-458.
34. Montaño-Pérez, K., et al., *Purification and characterization of the clotting protein from the white shrimp (Penaeus vannamei).* Comparative Biochemistry and Physiology, 1999. **122B**: p. 381-387.
35. Reyes-Izquierdo, T. and F. Vargas-Albores, *Proteinase activity in the white shrimp (Penaeus vannamei) clotting protein.* Biochemical and Biophysical Research Communications, 2001. **287**: p. 332-336.
36. Yepiz-Plascencia, G., et al., *Molecular characterization of the bifunctional VHDL-CP from the hemolymph of white shrimp Penaeus vannamei.* Comparative Biochemistry and Physiology, 2002.
37. Harpel, P.C., M.B. Hayes, and T.E. Hugli, *Heat-induced fragmentation of human alpha 2-macroglobulin.* Journal of Biological Chemistry, 1979. **254**: p. 8669-8678.
38. Howard, J.B., *Reactive site in human alpha 2-macroglobulin: circumstantial evidence for a thiolester.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 1981. **78**: p. 2235-2239.
39. Salvesen, G. and J. Enghild, *Proteolytic and enzymes in coagulation, fibrinolysis, and complement activation.*, in *Methods in Enzymology.*, L. Lorand and K. Mann, Editors. 1993, Academic Press, INC: New York. p. 121-753.
40. Bender, R.C. and C.J. Bayne, *Purification and characterization of a tetrameric α-macroglobulin proteinase inhibitor from the gastropod mollusc Biomphalaria glabrata.* Biochemical Journal, 1996. **316**: p. 893-900.
41. Mutsuro, J., et al., *Multiple forms of α2 - macroglobulin from a bony fish, the common carp (Cyprinus carpio): striking sequence diversity in functional sites.* Immunogenetics, 2000. **51**(10): p. 847-855.
42. Kopácek, P., et al., *Characterization of an α-macroglobulin-like glycoprotein isolated from the plasma of the soft tick Ornithodoros moubata.* European Journal of Biochemistry, 2000. **267**: p. 465-475.
43. Ikai, A., T. Osada, and M. Nishigai, *Conformational changes of alpha-macroglobulin and ovomacroglobulin from the green turtle (Chelonia mydas japonica).* J Biochem (Tokyo), 1988. **103**(2): p. 218-24.
44. Enghild, J.J., et al., *α-macroglobulin from Limulus polyphemus exhibits proteinase Inhibitory activity and participates in a hemolytic system.* Biochemistry, 1990. **29**: p. 10070-10080.
45. Strickland, D.K., et al., *Fluorescent probes as a measure of conformational alterations Induced by nucleophilic modification and proteolysis of bovine α_2-macroglobulin.* Biochemistry, 1984. **23**: p. 6679-6685.
46. Dangott, L.J., D. Puett, and L.W. Cunningham, *Conformational changes Induced in human α2-macroglobulin by protease and nucleophilic modification.* Biochemistry, 1983. **22**: p. 3647-3653.
47. Feldman, S.R. and S.V. Pizzo, *Purification and characterization of a "half-molecule" α_2-macroglobulin from the southern grass frog: absence of binding to the mammalian α_2-macroglobulin receptor.* Biochemistry, 1986. **25**: p. 721-727.