

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

Caracterización y Expresión de los Genes de
Superóxido Dismutasa con Manganeso en Camarón
Blanco (*Litopenaeus vannamei*)

POR:

Gracia Alicia Gómez Anduro


Tesis Aprobada por la Coordinación de Tecnología de Alimentos de
Origen Animal

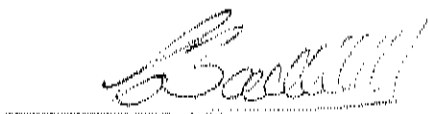
Como Requisito Parcial para Obtener el Grado de

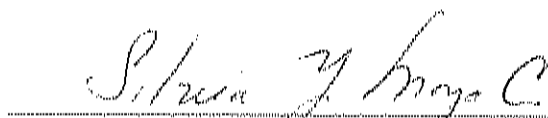
DOCTORADO EN CIENCIAS

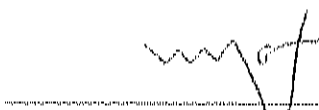
APROBACIÓN

Los miembros del comité designados para revisar la tesis de Gracia Alicia Gómez Anduro, la han encontrado satisfactoria y recomiendan sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Doctorado en Ciencias.


Dra. Gloria Lepi Plascencia
Directora de Tesis


Dra. Carolina Barillas Mury


Dra. Silvia Moya Camarena

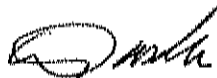

Dra. Maria Auxiliadora Islas Osuma


Dr. Rogerio Sorelo Mundo

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 producción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita del director del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD).

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



Dr. Alfonso A. Gardea Béjar
Director General

DEDICATORIAS

A Dios

Que me dio el amor, la fuerza y la vida para cumplir con éxito este objetivo. Porqué: "Todo lo puedo en Cristo que me fortalece".

A mi esposo y mi hija

Por la alegría y la felicidad que me dan a cada instante, por el amor reflejado en cada beso, en cada caricia y en cada palabra.

Santiago: Cielo, quizá no puedas imaginar lo inmensamente feliz que vive mi corazón a tu lado, gracias por enseñarme a vivir amando, por la paciencia con que me tratas y por el apoyo que siempre me das incondicional ... TE AMO CIELO.

Grecita: Mi pequeño pedacito de amor, gracias por aliviar mi cansancio con tus sonrisas y por enseñarme la dicha de ser una feliz mamá. ... Dios te bendiga mi hijita.



A mi mamá

La mujer que me dio la vida, que me abrazó y besó para consolar mi llanto, que me protegió de mucho dolor aún a costa del suyo propio. A ti que te quedaste conmigo en las buenas, en las malas y en las peores. A ti que guardaste muy dentro de tu corazón tantas cosas dolorosas de mi niñez para que no me dañaran, te doy las gracias.

Tú me trajiste al mundo y me enseñaste con el ejemplo a andar en él, a luchar por lo que creo y quiero... y no sabes que valioso es eso en mi vida. TE AMO MAMI, con todo el corazón de una hija agradecida.

A Gloria

Por enseñarme sin duros tropiezos lo bello de la biología molecular, por confiar siempre en mí, por dejarme probar, por dejarme opinar. Mi muy querida Gloria me voy feliz, porque me siento satisfecha del trabajo que hicimos juntas y se que ocuparé parte de tus recuerdos y tu corazón como tú de los míos. Te quiere mucho, tu estudiante: Gracia.

AGRADECIMIENTOS

A CONACYT (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología), por la beca que facilitó el camino al Doctorado. Al proyecto CONACYT 36926 "La expresión de los genes de HDL-BGDP, SOD, y Catalasa, como modelo molecular de la inmunestimulación en camarón", bajo la responsabilidad de la Dra. Gloria Yepiz Plascencia.

A CIAD (Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo), por brindarme instalaciones, material y equipo pero sobre todo el calor humano que me ayudó en el momento más difícil de mi vida. A todo el personal que me apoyó durante mi enfermedad, en especial al Dr. Gardea, Dra. Ana María Calderón, Dr. Pacheco, Dra. Gloria y por supuesto todo el grupo de BMOA, estudiantes de CIAD y a la Dra. Tere Gollas.

A CIBNOR Hermosillo (centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste), encabezado por el Dr. Jorge Hernández, por el apoyo incondicional para la realización de esta tesis.

National Institute of Health (NIH), Por la beca otorgada para una estancia de 3 meses en sus instalaciones, y en especial a la Dra. Carolina Barillas (por sus palabras certeras en momentos precisos), a Alvaro, Lalita_Gupta y Sanjeev Kumar.

A mi familia: a Santiago (mi compañero, amigo y amante, con quien me es grato compartir la vida), a Grecia (mi pequeño tesoro), a mi mamá: Gracia Anduro (mi querida amiga, consejera y paño de lágrimas), mis hermanos: Vladimir (el artista de la casa, a quien amo, con quien compartí las experiencias de mi niñez y adolescencia que hicieron entre nosotros un lazo especial), José (mi bebé por muchos años y ahora el niño más brillante que conozco) y Adán (el pequeño de la casa, que no deja de sorprendernos cada día con sus nuevas ocurrencias).

A mis tíos: Faly y Germán (por el apoyo paternal que siempre tienen para mí), Irma y José (por enseñarme que se puede vivir una vida loca), Héctor (por enseñarme a ver las cosas con conciencia), Rogelio y César (que crecieron con nosotros sus sobrinos), Tere (por su ternura y amor).

A mi abuelo Rogelio, por su apoyo incondicional

A mis primos (Ivan, Idalia, Iris, Isaúl, Paco Martha y María de Jesús y María Guadalupe, Gandi, Valerio, Germán, Evelyn, Yonatan, Gaby y Juanito),

A mis cuñadas y cuñados: Brenda (por su entusiasmo y esfuerzo, por su amor a la familia), Chayito, Fabiola, Titi, Jesús Enrique.

Amigos: Del Templo Cristiano Sinahí, a Carlos (Pastor), Noemí, Cintia, Tere, Olga y Manuel, a mis amigos de siempre: Frijolito, Regina, Cexy, Rafa, Amelia, Enrique, Chayito, Marina, Erika, a mis amigos de Nutrición: Graciela Caire, René Valenzuela, Adriana, Javier, Humberto, Jesús, También a Citlalli Harris, Nidia, Deysi, Graciela, Citlalli Velásquez.

A mis amigos de laboratorio BMOA: Alma (por su amistad tan sincera), Karina (por sus comentarios tan certeros y su amistad), Adriana (por su entusiasmo para ver la vida), Alejandro, Edgar, Carmen, Arturo, José Gpe. (experto en clonación y amigo), Mariana (la niña bonita del laboratorio), Alejandra (la bebé chipilona), Olivierth, Ivan (mi primo querido), Martha, Aldo, Luis Enrique. En general a todos ustedes por su bonita amistad.

A los maestros que dejaron huella en mi camino: Armando Zatow, Francisco Kawano, José Antonio Alcantar, Lucila R y Moisés Navarro, Ramón Pacheco, Ana María Calderón, Gloria Yepiz

A mi comité: Roger, Mary, Gloria, Silvia y Carolina

CONTENIDO

	Página
RESUMEN.....	VI
INTRODUCCIÓN	VII
ANTECEDENTES	IX
SUPERÓXIDO DISMUTASA	IX
IMPORTANCIA DE LA SUPERÓXIDO DISMUTASA	X
TIPOS DE SUPERÓXIDOS DISMUTASAS.....	XI
SUPERÓXIDO DISMUTASA CON MANGANESO	XII
CARACTERÍSTICAS DEL TRANSPORTE A MITOCONDRIAS.....	XIII
REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE MnSOD.....	XVI
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA EN ESTUDIO.....	XVIII
OBJETIVOS.....	XIX
GENERAL	XIX
PARTICULARES.....	XIX
METODOLOGÍA	XX
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	XXI
REFERENCIAS.....	XXVI
APENDICES	50

COMUNICACIONES CIENTÍFICAS

Artículo 1:

- Gómez-Anduro GA, Barillas-Mury CV, Peregrino-Uriarte AB, Gupta L, Gollas-Galván T, Hernández-López J and Yepiz-Plascencia G.** The cytosolic manganese superoxide dismutase from the shrimp *Litopenaeus vannamei*: molecular cloning and expression. *Developmental and Comparative Immunology*. Submitted 1

Artículo 2:

- Gómez-Anduro GA, Sotelo-Mundo RR and Yepiz-Plascencia G.** Cytosolic Manganese Superoxide Dismutase Genes from the white shrimp *Litopenaeus vannamei*, protein molecular modeling and tissue-specific expression. *Gene*. In process..... 23

RESUMEN

La superóxido dismutasa con manganeso (MnSOD) es típicamente una enzima mitocondrial con función antioxidante, codificada en el núcleo celular. Hace pocos años, se encontró una MnSOD citoplasmática (cMnSOD) en crustáceos que utilizan hemocianina para el transporte de oxígeno. En este trabajo se caracterizaron tres genes y un cDNA de la cMnSOD del camarón blanco, además se estudió su expresión en 8 tejidos y el efecto de la infección con virus de la mancha blanca en los niveles de acumulación del mRNA. Los tamaños de los genes son de 2626, 2473 y 864 pb, los 2 primeros tienen seis exones que codifican para 31, 49, 49, 64, 42 y 52 aminoácidos, respectivamente, y cinco intrones. Todos los intrones presentan secuencias consenso GT-AG de corte y empalme en los extremos 5' y 3' del pre-mRNA y tienen secuencias homopoliméricas repetidas. Los exones de los 3 genes son muy conservados entre sí y su secuencia deducida de aminoácidos difiere en 2 posiciones que no son determinantes para la actividad de la enzima, como se predijo por modelación de la proteína. Se analizaron 995 pb antes del codón de inicio (metionina) del gen 2 y se predijeron 2 sitios de unión para factores de transcripción: NF κ B que favorecen la expresión de genes y AP2 que la desfavorece y una región potenciadora. La secuencia del cDNA es de 1341 pb, contiene una región 5' y 3' no traducida de 54 y 423 pb (respectivamente) y una región codificante de 861 pb. El análisis filogenético mostró que la secuencia deducida de aminoácidos agrupa con otras cMnSOD. Esta secuencia deducida es de 287 aminoácidos con una extensión de 63 aminoácidos en el N-terminal, comparada con la MnSOD mitocondrial precursora y deducida de la jaiba azul *Callinectes sapidus*. La expresión de cMnSOD es tejido específica, ya que en sistema nervioso se expresa el gen 1 y en hepatopáncreas y hemocitos el gen 2. La expresión de cMnSOD es inducible por infección con virus de la mancha blanca, aumentando 3.6 veces en la primera hora de infección para posteriormente reprimirse hasta los niveles del control a las 6 h y continúa haciéndolo hasta las 12 h. En conclusión, la cMnSOD es una proteína novedosa codificada por al menos 3 genes, 2 de ellos con múltiples intrones, su expresión es tejido específica y modificada en respuesta a la infección por el virus de mancha blanca.

INTRODUCCIÓN

Los organismos aerobios generan grandes cantidades de radicales libres, también conocidos como especies reactivas de oxígeno (reactive oxygen species o ROS, por sus siglas en inglés) como parte del metabolismo normal y en respuesta a estímulos externos resultando en estrés oxidativo (Mezes et al., 1997). Los radicales libres son moléculas con un fuerte poder oxidante dado por los electrones desapareados del oxígeno que buscan su estabilidad al añadir otro electrón (Altman, 1996). Las concentraciones elevadas de radicales libres en la célula están asociadas con daño a DNA, carbohidratos y proteínas, promoviendo el desarrollo de enfermedades degenerativas como el cáncer (Bendich, 1993). Sin embargo, la célula tiene mecanismos para evitar el daño a su integridad, disminuyendo la concentración de ROS mediante enzimas antioxidantes. Entre las principales enzimas antioxidantes están la glutatión peroxidasa, catalasa y superóxido dismutasa (SOD) (Bendich, 1993; Mezes et al., 1997).

Las enzimas superóxido dismutasas (SOD, EC 1.15.1.1) son proteínas cuya función es transformar el radical superóxido en moléculas menos dañinas como peróxido de hidrógeno y oxígeno molecular (Pipe et al., 1993). Posteriormente el peróxido de hidrógeno es transformado en oxígeno y agua por la enzima catalasa (Bendich, 1993). Para realizar la catálisis, las SOD requieren de un metal como cofactor, es así como se clasifican en 6 tipos: SODs con cobre-zinc (CuZnSOD)(Hallewell et al., 1985), hierro (FeSOD)(Bowler et al., 1989), níquel (NiSOD) (Youn et al., 1996), manganeso-hierro (MnFeSOD) (Amo et al., 2003), hierro-zinc (FeZnSOD) (Kim et al., 1996) y manganeso (MnSOD)(Bowler et al., 1989).

La MnSOD es una proteína codificada en el genoma del núcleo celular, cuya función antioxidante tradicionalmente se conocía en mitocondria. El reporte de una MnSOD localizada en el citoplasma celular (cMnSOD) de jaiba azul (*Callinectes sapidus*), es uno de los pocos ejemplos de MnSOD citosólica (Brouwer et al., 1997). Comúnmente en las células eucariotas animales la MnSOD es la forma mitocondrial, mientras que la forma citosólica es una CuZnSOD, pero ésta última no pudo ser

detectada en *C. sapidus*, contrastando con la detección de una MnSOD citosólica, por lo que los autores (Brouwer et al., 2003), propusieron que la cMnSOD sustituye a la CuZnSOD para evitar la competencia con el cobre, que es central para ligar el oxígeno en la hemocianina. Las principales diferencias que se conocen entre la mMnSOD y cMnSOD están en el extremo amino terminal de la proteína precursora, pues la cMnSOD carece de la secuencia aminoacídica que forma el péptido señal necesario para la importación a la mitocondria (Brouwer et al., 1997). También la estructura cuaternaria de ambas proteínas es diferente, aunque ambas están formadas por monómeros de ~25 KDa, la cMnSOD se encuentra generalmente como dímero, mientras que la mMnSOD como tetramero (Brouwer et al., 1997).

Estos resultados incentivaron la investigación sobre la MnSOD en otros crustáceos que al igual que la jaiba azul, utilizan hemocianina como transportador de oxígeno. Los estudios del mismo grupo, han demostrado que la actividad de la cMnSOD en la jaiba azul, aumenta durante la intermuda (Brouwer et al., 1997). Hasta el momento, además de crustáceos, se ha reportado que en la levadura *Candida albicans* -un eucariote muy distante de los crustáceos-, existe una forma rara de MnSOD en el citosol, que se expresa solo durante la fase estacionaria de la levadura (Lamarre et al., 2001).

Así pues, las cMnSOD empiezan a ser estudiadas. Hasta el momento hay 4 secuencias de cDNAs publicadas: una es de la levadura *C. albicans* (Lamarre et al., 2001); la de la jaiba azul (*C. sapidus*) (Brouwer et al., 2003), la del langostino gigante de agua dulce *Macrobrachium rosenbergii* (Cheng et al., 2006) y la del camarón tigre *Penaeus monodon* que está solo depositada en la base de datos de secuencias GenBank (número de acceso [AAW50395](#)). También están depositadas en GenBank varias secuencias parciales de cMnSODs, incluyendo las de camarón café, *Farfantepenaeus aztecus* (GenBank [AY211085](#)), el camarón *Palaemonetes pugio* (GenBank [AY211084](#)) y el del camarón kuruma, *Marsupenaeus japonicus* (GenBank [AB079877.1](#)), pero no existen publicaciones completas sobre éstas últimas.

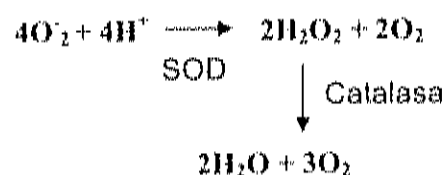
El objetivo de esta tesis es contribuir al conocimiento de enzimas antioxidantes de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*), caracterizando el gen y el

cDNA de cMnSOD, así como haciendo la deducción de la estructura primaria e investigando su expresión en diferentes tejidos y ante la infección por virus de mancha blanca.

ANTECEDENTES

Superóxido Dismutasa

La superóxido dismutasa (SOD, EC 1.15.1.1) es una enzima antioxidante que protege a la célula contra radicales libres transformando el radical superóxido en oxígeno molecular y peróxido de hidrógeno (Pipe et al., 1993). El efecto oxidante del peróxido de hidrógeno se contrarresta por acción de la enzima catalasa que lo transforma en agua y oxígeno molecular (Bendich, 1993).



Los radicales libres son moléculas con alto poder oxidante que se generan por vías endógenas y exógenas; endógenamente se producen durante el metabolismo normal, desarrollo, diferenciación o división celular (Mezes et al., 1997). También de forma endógena se producen como mecanismo de defensa en respuesta al ataque de patógenos (Anderson, 1982) y durante el transporte de electrones en las mitocondrias, en donde al unirse 1 o 2 electrones al NADH, se forma el anión radical superóxido (Grisham and Mc Cord, 1986). La producción de radicales libres en respuesta a factores exógenos ocurre en el tabaquismo, exposición a pesticidas, radiación, solventes orgánicos entre otros (Slater, 1987).

Importancia de la Superóxido Dismutasa

El efecto oxidante de los radicales libres, está asociado con enfermedades degenerativas, cáncer y vejez puesto que dañan membranas celulares, enzimas, carbohidratos y ácidos nucleicos (Bendich, 1993). Existen algunos estudios que muestran el papel tan importante de las enzimas antioxidantes dentro de los organismos; en humanos, por ejemplo, se sabe que la deficiencia de SODs está relacionada con anemia hemolítica (Fridovich, 1989). También en humanos, se demostró que las SODs están involucradas en la protección vascular, puesto que evitan el aumento de ROS en sangre que es un causante directo de la disfunción vascular y el crecimiento celular anormal como la hipertrofia del músculo (Faraci and Didion, 2004). Hay además otros muchos problemas relacionados con defectos o mutaciones en enzimas antioxidantes, un ejemplo de ello es que mutaciones puntuales en los genes de MnSOD y FeSOD en *Pseudomonas* sp presentaron una disminución en la vida media (Britigan *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 1996).

Existen además reportes de estudios de sobreexpresión de genes que codifican para proteínas antioxidantes y que intentan explicar el efecto benéfico de estas enzimas sobre los organismos. La sobreexpresión de CuZnSOD y catalasa en moscas transgénicas aumentó la actividad enzimática en un 26% y 73% respectivamente, disminuyendo en 2.5% la concentración de H₂O₂ en la mitocondria y aumentando la vida media de las moscas (Sohal *et al.*, 1995). Posteriores, se ha reportado que la sobreexpresión de MnSOD en la esta misma especie de mosca, disminuye en un 4-5 % la longevidad de la misma (Mockett *et al.*, 1999) y que la expresión de catalasa intramitocondrial disminuye la concentración de H₂O₂ en mitocondria (Kwong *et al.*, 2000). Posteriormente se reportó que la sobreexpresión simultánea de CuZnSOD, MnSOD, catalasa y tioredoxina reductasa, aunque resultó en un aumento en estas actividades enzimáticas, no se observó un efecto en la vida media (Orr *et al.*, 2003). El mismo grupo de autores publicó que la sobreexpresión de catalasa en la mosca de la fruta, aumenta la resistencia al estrés pero no la longevidad de la misma (Mockett *et al.*, 2003). El mismo año, los autores de los artículos citados anteriormente, hacen una crítica del diseño experimental empleado para los análisis de sobreexpresión,

argumentando que se utilizaron cepas con vida media corta, lo que no permitió ver un efecto claro en la longevidad de las moscas (Orr and Sohal, 2003). En conclusión la sobreexpresión de CuZnSOD y MnSOD puede extender la vida media de la mosca de la fruta, sin embargo los resultados que se obtengan dependen del método de sobreexpresión que se use y de las cepas mismas usadas (Landis and Tower, 2005).

De la misma forma se ha reportado que la sobreexpresión de MnSOD en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* aumentó la vida cronológica de la levadura, pero disminuyó la división celular (Harris et al., 2003). Además, en la línea celular 32D c13 (derivada de células hematopoyéticas murinas), se observó que la sobreexpresión de MnSOD, protege a las células contra la apoptosis causada por el factor de necrosis tumoral (TNF α) o interleucina tres (IL3) (Epperly et al., 2003). Dos años mas tarde se encontró que la sobreexpresión de una SOD extracelular, disminuye la toxicidad inducida en el pulmón de ratón por radiación (Rabbani et al., 2005). Aunque los resultados parecen contradecirse, indican que la relación entre las diferentes enzimas antioxidantes es sumamente importante y que la modificación de alguna de ellas, podría afectar a las otras, siendo pues, un mecanismo de acción complejo.

Tipos de Superóxidos Dismutasas

De acuerdo al metal que contienen, las enzimas SODs se clasifican en seis tipos: 1) la superóxido dismutasa con cobre y zinc (CuZnSOD), que está presente en el citoplasma, compartimentos extracelulares de eucariotes y periplasma de bacterias Gram (-) (Brouwer et al., 1997), 2) la superóxido dismutasa con hierro y zinc (FeZnSOD) que se encontró en *Streptomyces coelicolor Muller* (Kim et al., 1998); 3) la superóxido dismutasa con manganeso y hierro (MnFeSOD) que se encuentra en *Toxoplasma gondii* (Odberg-Ferragut et al., 2000); 4) la superóxido dismutasa con hierro (FeSOD), que se ha encontrado en procaríotes y plantas (Brouwer et al., 1997); 5) la superóxido dismutasa con níquel (NiSOD) que se encontró en *Streptomyces seoulensis* (Choudhury et al., 1999) y 6) la superóxido dismutasa con manganeso (MnSOD), que está localizada en procaríotes y mitocondria de eucariotes (Yukishi et

al., 1999), así como en el citoplasma de células de crustáceos que usan hemocianina como molécula transportadora de oxígeno (Brouwer et al., 1997).

A pesar de que los 6 tipos de enzimas realizan la misma función, presentan diferencias en estructura; mientras que las MnSOD y FeSOD tienen principalmente hélices alfa, la CuZnSOD tiene mayoritariamente hojas beta (Miao and Gaynor, 1993). La capacidad de inhibición por cianuro y peróxido de hidrógeno también las diferencia, ya que la MnSOD es resistente a ambos, la CuZnSOD es sensible y la FeSOD solo es resistente a cianuro (Okamoto et al., 2001).

Superóxido Dismutasa Con Manganeso

La MnSOD es una superóxido dismutasa que realiza su función antioxidante utilizando como cofactor el manganeso, el cual se encuentra coordinado por 3 histidinas y un ácido aspártico, cuyas posiciones pueden variar según la especie. Para *Caenorhabditis elegans* se conocen las posiciones de 2 MnSODs, en la primera son His-50, His-98, Asp-182 e His-186 como los responsables del sitio activo y en la segunda His-50, His-98, Asp-179 e His-183 (Hunter et al., 1997). En *Onchocerca volvulus*, se encontraron las posiciones His-26, His-74, Asp-160 e His-164 como formadoras del sitio activo (Henkle et al., 1995). En general, la secuencia de aminoácidos de la MnSOD de animales, plantas o bacterias se mantiene muy conservada al igual que su sitio catalítico (Brouwer et al., 1997). La proteína, está formada por subunidades idénticas de ≈ 25 kDa (Pan et al., 1997) conteniendo 90% de hélices alfa en su estructura secundaria (Leclere et al., 2001).

El gen de la MnSOD se encuentra localizado en el genoma del núcleo celular y su función la realiza ya sea en citoplasma (cMnSOD), como sucede en crustáceos que utilizan la hemocianina como molécula transportadora de oxígeno (Brouwer et al., 1997) o más comúnmente en mitocondria (mMnSOD) (Fridovich, 1989). Las diferencias entre la mMnSOD y cMnSOD mas marcadas y conocidas hasta hoy se encuentran en la región amino terminal de la proteína precursora. La mMnSOD tiene en el extremo amino un péptido señal que le permite entrar a la mitocondria, después

de ser reconocido por proteínas específicas de la membrana externa e interna de la mitocondria (Scherer et al., 1990). La estructura cuaternaria de ambas proteínas también es diferente, la mMnSOD se encuentra como homotetrámero en las células de eucariotes, mientras que la cMnSOD se encuentra principalmente como homodímero (Brouwer et al., 2003); salvo algunas excepciones como la cMnSOD de levadura (*C. albicans*) en donde se encuentra como tetrámero (Lamarre et al., 2001).

Características del Transporte a Mitocondrias

Después de que el mensaje maduro de mMnSOD y cMnSOD salen del núcleo celular hacia el citoplasma, se lleva a cabo el proceso de traducción mediado por los ribosomas. La traducción da como resultado dos proteínas inmaduras, una de las cuales (mMnSOD) tiene en el extremo amino un péptido señal que le permitirá ingresar a la mitocondria, mientras la otra se queda secuestrada en el citoplasma (Brouwer et al., 2003).

El transporte de las proteínas a la mitocondria involucra una serie de factores intrínsecos de la proteína, así como de proteínas presentes en el citoplasma celular, la membrana mitocondrial y matriz mitocondrial (Scherer et al., 1990). La principal característica de la proteína que va a entrar a la mitocondria es el péptido señal, el cual es una secuencia de aproximadamente 55 aminoácidos cargado positivamente (Bowler et al., 1989). Dependiendo del organismo de estudio, se han encontrado tamaños de péptido señal que varían desde los 24 a los 52 aminoácidos (Scherer *et al.*, 1990; Van *et al.*, 1986). Este péptido tiene un contenido alto de residuos básicos y carece de residuos ácidos, además tiene la capacidad para formar hélices alfa en condiciones de alta hidrofobicidad (Van et al., 1986). En general el péptido señal consta de 4 a 8 cargas positivas entre argininas y lisinas que le dan la carga que se requiere para entrar a la mitocondria (Bowler *et al.*, 1989; Hunter *et al.*, 1997; White and Scandalios, 1989).

En la membrana mitocondrial está la maquinaria necesaria para que la proteína se transporte al interior de la mitocondria (Fig. 1), primero ocurre un reconocimiento

del péptido señal y después el transporte a través del canal transmembranal (Takatlidis and Schatz, 1999). El reconocimiento del péptido señal es mediado por proteínas que se encuentran en la parte externa de la membrana, conocidas como TOM (Transmembranal outer matrix) en humanos y como P32 en *S. cerevisiae* (Murakami *et al.*, 1993; Scherer *et al.*, 1990). Posterior al reconocimiento, la pre-proteína pasa al espacio intermembranal gracias al potencial de cargas producido por la carga del péptido señal (Scherer *et al.*, 1990). Ya en la membrana interna, la pre-proteína entra a la mitocondria por un espacio de 20 Å formado por el canal transmembranal (Takatlidis and Schatz, 1999). En humanos están caracterizadas las 2 subunidades proteicas de 17 y 23 kDa que forman el canal transmembranal conocidas como TIM (Transmembranal inner matrix) (Takatlidis and Schatz, 1999). El paso de la pre-proteína por el canal, requiere proteínas que participen en el desdoblamiento de la proteína hacia la matriz como son las proteínas del choque térmico (Maarse *et al.*, 1992). Dentro de la matriz mitocondrial las enzimas proteolíticas cortan el péptido señal liberando la proteína madura y activa hacia el interior de la mitocondria (Maarse *et al.*, 1992; Van *et al.*, 1986).

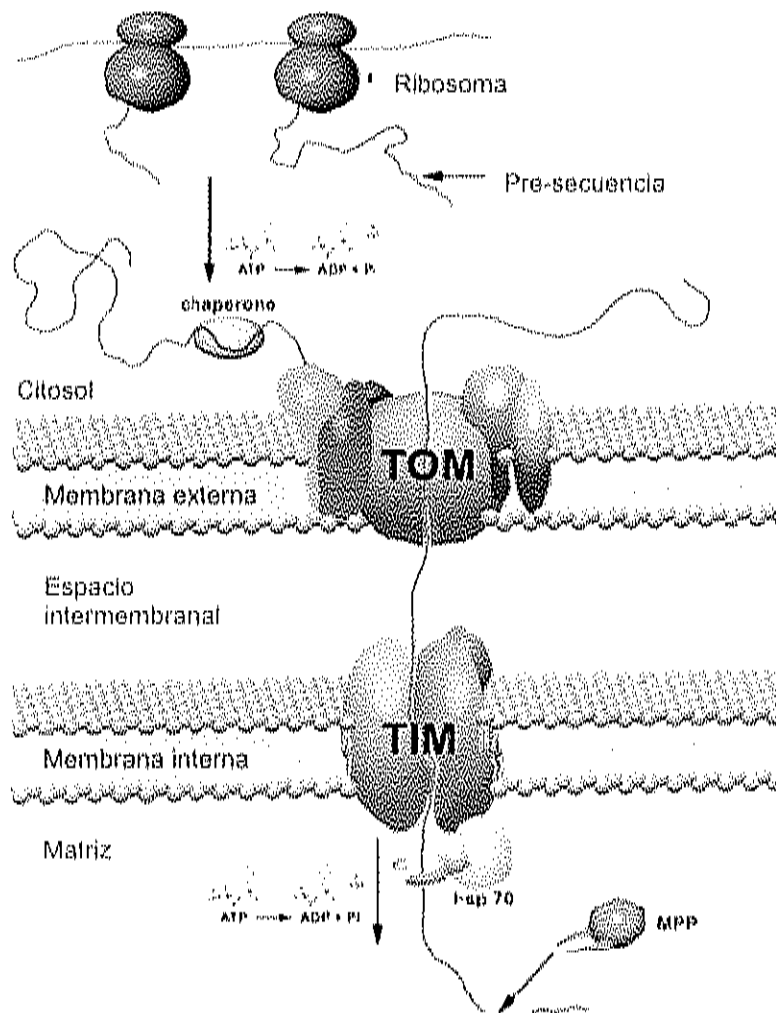


Figura 1. Transporte de proteínas a mitocondria. Disponible en: <http://www.biochem.biomedchem.uwa.edu.au/page/40238>

Regulación de la Expresión Génica de MnSOD

En jaiba azul, se sabe que aunque la eMnSOD y mMnSOD realizan la misma función, están codificadas en genes diferentes (Brouwer et al., 2003). El número de copias de genes para la mMnSOD puede variar dependiendo de la especie, desde 1 copia como sucede en humanos (Kuo et al., 1999), hasta varias copias como en el caso del maíz (Zhu and Scandalios, 1993). Algunos de los genes de MnSOD estudiados, tienen intrones interrumpiendo la región codificante, tal es el caso del gen de *mMnSOD* en *C. elegans* que tiene 4 intrones (Hunter et al., 1997) y el gen de la *mMnSOD* de *Hevea brasiliensis* que tiene 5 intrones (Miao and Gaynor, 1993). La información que existe sobre los genes de la eMnSOD es más limitada, se conoce el gen de la levadura *C. albicans*, el cual se expresa solo durante la fase estacionaria y tiene que remover un intrón para producir el transcrito maduro que se traduce a proteína (Lamarre et al., 2001).

Tanto la expresión de los genes de mMnSOD como los de eMnSOD es modulada por agentes físicos, químicos y biológicos (St-Clair et al., 2002), y podría ser también el caso en crustáceos, ya que recientemente se publicó que la hipoxia en *C. sapidus* disminuye la cantidad del mRNA y la actividad enzimática de SODs (Brouwer et al., 2004). También se ha reportado que la actividad enzimática de SODs (totales) en camarón blanco (*L. vannamei*) disminuyó en respuesta a la inoculación con *Vibrio alginolyticus* (Wang and Chen, 2005). Igualmente se ha visto que otras moléculas como beta glucanos o lipopolisacáridos, tienen el efecto contrario (aumento en la actividad de SODs) en camarones expuestos por inmersión a estos compuestos, aunque no se reportó cual de las SODs es afectada por este tratamiento (Campa-Cordova et al., 2002). Un estudio reciente en *M. rosenbergii* encontró que la inoculación de *Lactococcus garvieae*, disminuye la expresión de eMnSOD (mRNA) en hepatopáncreas, pero no en hemocitos (Cheng et al., 2006).

La regulación de la expresión de los genes de la MnSOD de humanos es mediada por las regiones promotoras, las regiones potenciadoras, las proteínas específicas SP1 y las proteínas activadoras AP-2 (St-Clair et al., 2002). La región

promotora de los genes de mMnSOD de humanos y de células pulmonares de rata carecen de caja TATA (Burke and Kadonaga, 1997; Kuo et al., 1999), pero la de *D. melanogaster* tienen el promotor clásico, con caja TATA (Duttaroy et al., 1997). Los promotores sin caja TATA, tienen en su lugar regiones ricas en GC inmediatamente corriente arriba del inicio de la transcripción como se demostró en la mMnSOD de células de fibroblasto de hígado de embrión humano (Yeh et al., 1998). Este sitio permite la regulación de los genes con promotores sin caja TATA, ya que sirve de unión a proteínas que favorecen la transcripción como son las SP1. Estas proteínas se unen por dedos de zinc a secuencias conservadas de GGGCGG (Dyran and Tijan, 1983; Kuo et al., 1999).

Las regiones de regulación del gen de MnSOD, pueden encontrarse antes o después del codón de iniciación. En la levadura *Schizosaccharomyces pombe* y en humanos, las regiones promotoras se localizan antes del codón de iniciación, en las posiciones -943 pb y de -419 a +62, respectivamente (Jung et al., 2002). Sin embargo en la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster*, el elemento regulador se encontró corriente abajo en la posición +35, con secuencias consenso (A/G)G(A/T)CGTG y una región control para el iniciación de la transcripción (Inr) (YYA⁺N(T/A)YY) (Burke and Kadonaga, 1997). En el gen de la MnSOD de humanos se ha localizada una región potenciadora en el segundo intrón del gen (St-Clair et al., 2002).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA EN ESTUDIO

Las enzimas antioxidantes mantienen el equilibrio de oxidación-reducción, proceso, que ocurre naturalmente en los organismos que requieren oxígeno para subsistir. El destino o localización celular de estas enzimas, resulta de diferencias estructurales que derivan de su secuencia de aminoácidos y ésta a su vez, del gen del cual proviene. Respecto a las SODs, una célula eucariota animal contiene comúnmente CuZnSOD en el citoplasma y la MnSOD en la mitocondria ejerciendo la misma función y satisfaciendo las necesidades particulares de la célula. Es claro pensar que la compartimentalización celular provee las condiciones ambientales necesarias para que las enzimas puedan realizar la catálisis. Basados en este principio, Brouwer y sus colaboradores en 1997 (Brouwer et al., 1997), demostraron que los crustáceos que utilizan hemocianina para transportar el oxígeno tenían una cMnSOD en lugar de la CuZnSOD. Estos autores argumentan que el elevado uso de cobre para soportar el alto recambio de hemocianina que ocurre durante la muda en crustáceos, ha derivado en la presencia de una cMnSOD que evita la competencia por ese metal entre la hemocianina y la CuZnSOD (Brouwer et al., 1997).

Hasta el momento se ha propuesto que la cMnSOD queda secuestrada en el citoplasma debido a la prolongación del extremo amino. Si la fisiología de estos organismos requiere de esta particular enzima en el citoplasma, es necesario conocer cómo se expresa, como se regula y cómo son sus genes. Recientemente se están reportando investigaciones al respecto, puesto que el gen de cMnSOD se considera novedoso. A la fecha se conocen las secuencias de cDNA de cMnSOD de varios organismos (Brouwer *et al.*, 2003; Cheng *et al.*, 2006; Lamarre *et al.*, 2001), entre ellos el del camarón tigre *Penaeus monodon* (número de acceso: GenBank [AAW50395](#)) que es muy cercano al camarón blanco. Este trabajo se enfocó a determinar las secuencias nucleotídicas de los cDNAs y genes de cMnSOD en camarón blanco, para deducir la secuencia de aminoácidos primaria y predecir la estructura terciaria de la proteína. Además, se propuso evaluar la acumulación del mRNA en diferentes tejidos y la inducción de su expresión en respuesta a la infección por el virus de la mancha blanca en hemocitos.

OBJETIVOS

General

Contribuir al conocimiento de enzimas antioxidantes de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*), caracterizando los genes y el cDNA de cMnSOD, así como haciendo la deducción de la estructura e investigando su expresión en diferentes tejidos y ante la infección por virus de mancha blanca.

Particulares

Caracterizar el gen completo y el cDNA de la cMnSOD para deducir la secuencia de aminoácidos y hacer análisis comparativos de estructura y filogenéticos.

Detectar la presencia del mRNA de la cMnSOD para inferir su contribución a la actividad antioxidante en diferentes tejidos.

Investigar cambios en la expresión de cMnSOD en camarón blanco por ataque de patógenos, tomando como modelo el virus de mancha blanca (WSSV).

METODOLOGÍA

Para determinar la secuencia del cDNA de cMnSOD se diseñaron iniciadores específicos para un fragmento interno de cMnSOD en base a una secuencia parcial de camarón blanco (*L. vannamei*) disponible en GenBank ([AY278201](#)). Para obtener el cDNA completo se utilizó una técnica modificada de amplificación rápida de extremos de cDNA (RACE por sus siglas en inglés) para obtener los extremos 5' y 3' (Artículo 1, página 5). Después de tener la secuencia completa del cDNA de cMnSOD, se diseñaron iniciadores (Artículo 2, página 26) que abarcaran toda la región codificante para usarlos en la búsqueda de los genes de cMnSOD. La amplificación de los genes de cMnSOD se hizo a partir de DNA genómico proveniente de músculo de camarón y la región anterior al ATG inicial, se buscó con la técnica de PCR inversa (Artículo 2, página 28).

El estudio de la expresión de la cMnSOD en tejidos de camarón, se realizó utilizando RNA proveniente de hepatopáncreas, corazón, intestino, sistema nervioso, músculo, pleópodos, branquias y hemocitos (Artículo 1, página 6). Para estudiar la expresión de la cMnSOD en respuesta a infección por virus de la mancha blanca (White Spot Syndrome Virus, WSSV siglas en inglés), se realizó un bioensayo en camarones aparentemente sanos, los cuales se inocularon con WSSV, se sacrificaron después de transcurrida 1, 6 y 12 horas y se les extrajo hemolinfa para obtener el RNA utilizando TRIzol (Invitrogen) y los niveles de mRNA de cMnSOD y del virus de mancha blanca, se analizaron por PCR en tiempo real (Artículo 1, página 7). Para los anteriores estudios de expresión se utilizó como control interno, el gen constitutivo de la proteína ribosomal L8 (GenBank [DQ316258](#)). La expresión diferencial de los genes en cada uno de los tejidos de camarón, se realizó utilizando iniciadores específicos para cada gen y bajo condiciones de astringencia elevadas para asegurar su especificidad y probadas previamente con los clones correspondientes a cada uno de los genes (Artículo 2, página 29). Los análisis de identidad de la cMnSOD con las SODs de otros organismos, sus relaciones filogenéticas, así como la modelación de estructura terciaria de cMnSOD para análisis comparativo de los genes se describen en los artículos 1, página 6 y artículo 2, páginas 27.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el presente trabajo se obtuvo la secuencia completa del cDNA de cMnSOD de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*). El tamaño de la región codificante es de 861 pb, la región no traducida en el extremo 5' es de 54 bp y en el extremo 3' de 361 pb (previa a la secuencia de polyA⁺). En el extremo 3' se encontró una señal de poliadenilación (AATATA) y una región rica en ATTTA, cuya presencia en el gen de *HGRG* (high glucose related gen) en células humanas se ha relacionado con inestabilidad del mensaje (Abdel Wahab et al., 1998) (Artículo 1, página 19).

La secuencia de aminoácidos deducida corresponde a una proteína precursora de 287 residuos. Se propone que la proteína madura inicia en el aminoácido 62 (indicado con una flecha en el artículo 1, página 20), por comparación con el N-terminal de la proteína madura de cMnSOD de la jaiba azul *C. sapidus* (Brouwer et al., 1997). El peso molecular calculado para la proteína madura de cMnSOD de *L. vannamei* es de 24.8 KDa, y el punto isoelectrico teórico es de 6.04.

La identificación de la secuencia obtenida del cDNA, como una MnSOD citoplasmática, se hizo por medio del algoritmo BLAST X (Artículo 1, página 9). La secuencia nucleotídica obtenida para el cDNA de la SOD de camarón mostró homología con cMnSODs de *Farfantepenaeus aztecus* (97%), *Marsupenaeus japonicus* (89%), *C. sapidus* (82%) y *Palaemonetes pugio* (87%). También se hizo un análisis filogenético (Artículo 1, página 21), el cual claramente muestra 2 grupos, uno en donde agrupa las MnSODs mitocondriales y otro con las MnSODs citosólicas, la secuencia de MnSOD obtenida en este estudio se incluye en el grupo de las cMnSOD. Entre eucariotes se ha observado que las mMnSODs tienen regiones muy conservadas, por lo que se ha sugerido que provienen de un ancestro común, y que las relaciones filogenéticas se pueden explicar diciendo que la cMnSOD aparece primero en los crustáceos y de allí derivan las proteínas homólogas de otros organismos (Brouwer et al., 1997). Probablemente la cMnSOD resulta de una duplicación genética de mMnSOD que produce una proteína con una nueva localización celular.

Para caracterizar el gen de la cMnSOD, se utilizaron iniciadores que abarcaran toda la región codificante y se hizo PCR utilizando gDNA como templado. Los resultados de estas amplificaciones mostraron la presencia de 4 bandas (Figura 2), indicando posiblemente 4 genes, de los cuales, 3 fueron estudiados en este trabajo y llamados *cMnSOD1*, *cMnSOD2* y *cMnSOD3*; en donde los primeros 2 tienen 5 intrones, mientras que el último no es interrumpido por intrones y presentando un marco de lectura continuo (Artículo 2, página 47). Por medio de PCR inversa se determinaron 995 nucleótidos antes del codón de inicio del gen de *cMnSOD2* (metionina) (apéndice I o artículo 2, página 41), buscando el promotor. La secuencia se analizó con la herramienta disponible en: <http://bimas.dert.nih.gov/molbio/proscan> (Prestridge, 1995), sin encontrar un promotor clásico. Los resultados del análisis de la secuencia mostraron 14 pares de bases antes del codón de inicio, que corresponden a la región no traducida 5' del cDNA del gen *cMnSOD2*. Sin embargo, de la posición -15 a la -995 (tomando como 1 la adenina del codón de inicio) no se lograron detectar los otros 40 nucleótidos encontrados en la región 5' no traducida del cDNA. El análisis más detallado muestra en los nucleótidos -15 y -16 la secuencia AG, característica del extremo 3' de los intrones presentes en los genes *cMnSOD1* y *cMnSOD2*. Por lo anterior, es posible que exista otro intrón en la región 5' no traducida del cDNA en la posición -15 del gen y que el promotor de la cMnSOD esté localizado más allá de la región analiz. Para predecir regiones potenciadoras de la transcripción y sitios de unión para factores de transcripción, se utilizó la herramienta disponible en: <http://www.ifi.org/cgi-bin/ifi/TFsitescan.pl>. En la región anterior a la metionina inicial del gen *cMnSOD2*, se detectó 1 región potenciadora en la posición -531 (Artículo 2, página 46) además se detectó una señal débil de potenciador en el intrón 2. En la mMnSOD de humanos existe una región potenciadora localizada en el segundo intrón del gen (St Clair et al., 2002). Con la misma herramienta, se dedujeron sitios de unión para 2 factores de transcripción; AP-2 que tiene un papel negativo en la expresión de mMnSOD humana (Xu et al., 2002) y NFκβ que favorecen la expresión de genes.

Es importante mencionar que los 3 genes caracterizados provienen de un solo camarón, codifican para la cMnSOD madura de 24.8 kDa y las diferencias en la

secuencia de aminoácidos de estas proteínas se presentan claramente en el apéndice 1. Mediante el análisis del modelo tridimensional de la proteína (Artículo 2, página 43) se concluyó que los cambios de aminoácidos no afectan el sitio activo por lo que se podría pensar que tienen la misma actividad, sin embargo, esto requiere demostrarse experimentalmente. Interesantemente, se encontró que aunque la cMnSOD se expresó en todos los tejidos analizados (Artículo 1, página 22, panel A), la expresión es diferencial es decir, existen genes que se expresan en forma tejido-específica (Artículo 2, página 44, panel B). En hepatopáncreas y hemocitos se expresa el *cMnSOD2*, mientras que en sistema nervioso se expresa *cMnSOD1* y en todos los tejidos analizados, excepto hemocitos, parece expresarse un gen diferente a *cMnSOD1*, *cMnSOD2* y *cMnSOD3*. Algo similar ocurre con la MnSOD de *D. melanogaster* la cual se expresa diferencialmente en gónadas de machos y hembras (Paul and Duttaroy, 2003).

Aunque la evaluación de la expresión de los tejidos de camarón no fue cuantitativa, se encontró que contrario a lo esperado, tejidos como branquias, pleópodos, sistema digestivo y corazón, que se consideran muy importantes en la formación de radicales libres, expresan solo un gen (diferente a *cMnSOD1*, *cMnSOD2* y *cMnSOD3*). Al evaluar la expresión de cMnSOD en sistema nervioso y hepatopáncreas se observó que se expresan 2 genes de cMnSOD, uno de ellos (*cMnSOD2*) fué identificado en este trabajo pero el otro no. En el caso de hepatopáncreas, es posible que la diversidad de funciones de esta glándula genere gran cantidad de radicales libres, aunada a la acumulación de mRNA de la cMnSOD. Sin embargo, ¿que pasa entonces con sistema nervioso?, ¿es acaso un tejido tan especializado que solo aquí se expresó el *cMnSOD1*?. ¿Qué implicaciones o qué importancia tiene este posible cuarto gen que al parecer se expresa en todos los tejidos, excepto en hemocitos?, La explicación puede estar en la evolución y especialización de los tejidos que en ciertos casos, requieran mas enzima antioxidante que otros por estar mayormente expuestos a radicales superóxido. Sin embargo esta pregunta solo podrá ser abordada en investigaciones posteriores, utilizando como base la información que en este estudio se presenta.

Investigamos también la expresión de la cMnSOD en respuesta a infección con virus de mancha blanca, como se puede observar en la página 22, panel B, la expresión es modulada. En la primera hora de infección, se observó un aumento en 3.6 veces la expresión de cMnSOD, comparado con camarones no infectados, después de esto la expresión se reprime hasta observar el 50% de la expresión a las 12 h comparado con el control, tiempo suficiente para que el virus se replique y estimule los sistemas de defensa del camarón (Meng-Feng et al., 2000). Probablemente el efecto de la infección puede variar dependiendo del tejido, en el caso de *M. rosenbergii*, se observó que la infección con *Lactococcus garvieae* disminuye la expresión de cMnSOD en hepatopáncreas pero no en hemocitos (Cheng et al., 2006).

En conclusión, este trabajo presenta por primera vez la secuencia de 3 genes de cMnSOD cuya secuencia deducida de aminoácidos difiere en 2 posiciones sin afectar aparentemente la estructura y sitio activo de la proteína. La expresión de los 3 genes es diferencial en branquias, pleópodos, sistema nervioso, intestino, corazón, hepatopáncreas y hemocitos. No se encontró una región promotora en la región analizada, pero sí se detectaron 2 sitios de unión para factores de transcripción y una región potenciadora, además se demostró que la cMnSOD es un gen inducible, por infección con virus de mancha blanca.

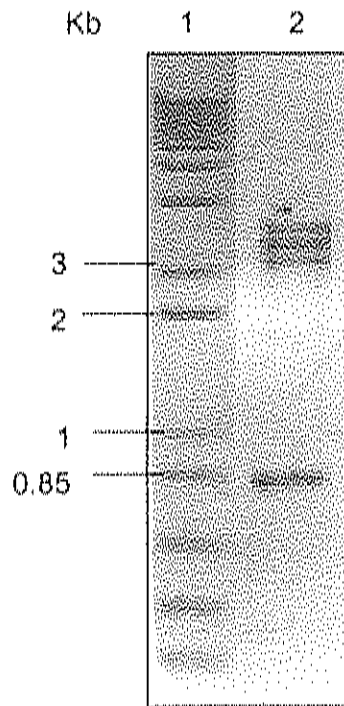


Figura 2. Amplificación por PCR de cMnSOD utilizando gDNA como templado.
Carril 1: Marcador de peso molecular, carril 2: amplificación de 4 genes de cMnSOD.

REFERENCIAS

- Abdel Wahab N, Gibbs J, Mason RM. 1998. Regulation of gene expression by alternative polyadenylation and mRNA instability in hyperglycaemic mesangial cells. *Biochem J* 336:405-411.
- Altman N. 1996. Terapias de oxígeno, Second edition. ed. Mexico, D.F. 30-34 p.
- Amo T, Atomi H, Imanaka T. 2003. Biochemical properties and regulated gene expression of the superoxide dismutase from the facultatively aerobic hyperthermophile *Pyrobaculum calidifontis*. *J Bacteriol* 185:6340-6347.
- Anderson R. 1982. Ascorbic acid and immune functions: Mechanism of immunostimulation. Londres (Inglaterra): Appl Science. 362-365 p.
- Bendich A. 1993. Antioxidants, immune response and animal function. Physiological role of antioxidants in the immune system. *J Dairy Sci* 76:2789-2794.
- Bowler C, Alliotte T, Van Den Bulcke M, Bauw G, Vandekerckhove J, Van Montagu M, Inzt D. 1989. Genetics a plant manganese superoxide dismutase is efficiently imported and correctly processed by yeast mitochondria (complementation analyses/*Escherichia coli*/evolutionary conservation/*Nicotiana plumbaginifolia*). *Proc Natl Acad Sci USA* 86:3237-3241.
- Britigan B, Miller R, Hassett D, Pfaller M, McCormick M, Rasmussen G. 2001. Antioxidant enzyme expression in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*: Identification of an atypical form of manganese superoxide dismutase. *Infect Immunol* 69:7396-7401.
- Brouwer M, Brouwer TH, Grater W, Enghild JJ, Thogersen IB. 1997. The paradigm that all oxygen-respiring eukaryotes have cytosolic CuZn-superoxide dismutase and that Mn-superoxide dismutase is localized to the mitochondria does not apply to a large group of marine arthropods. *Biochem* 36:13381-13388.
- Brouwer M, Hoexum Brouwer T, Grater W, Brown-Peterson N. 2003. Replacement of a cytosolic copper/zinc superoxide dismutase by a novel cytosolic manganese superoxide dismutase in crustaceans that use copper (haemocyanin) for oxygen transport. *Biochem J* 374:219-228.
- Brouwer M, Larkin P, Brown-Peterson N, King C, Manning S, Denslow N. 2004. Effects of hypoxia on gene and protein expression in the blue crab, *Callinectes sapidus*. *Mar Environ Res* 58:787-792.
- Burke T, Kadonaga J. 1997. Drosophila TFIIID binds to a conserved downstream basal promoter element that is present in many TATA-box-deficient promoters. *Genes Dev* 10:711-724.
- Campa-Cordova A, Hernandez-Saavedra N, Ascencio F. 2002. Superoxide dismutase as modulator of immune function in American white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Comp Biochem and Physiol* 133(C):557-565.
- Cheng W, Tung YS, Liu C-H, Chen JC. 2006. Molecular cloning and characterisation of cytosolic manganese superoxide dismutase (cytMn-SOD) from the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Fish Shellfish Immunol*. in press.

- Choudhury S, Lee J, Davidson G, Yim Y, Bose K, Sharma M, Kang S, Cabelli D, Maroney M. 1999. Examination of the nickel site structure and reaction mechanism in *Streptomyces scouletensis* superoxide dismutase. *Biochem* 38:3744-3752.
- Dynan W, Tijan R. 1983. The promoter-specific transcription factor SP1 binds to upstream Sequences in the SV40 early promoter. *Cell* 35:79-87.
- Duttaroy A, Parkes T, Emtage P, Kirby K, Boulianne GL, Wang X, Hiliker AJ, Phillips JP. 1997. The manganese superoxide dismutase gene of *Drosophila*: structure, expression, and evidence for regulation by MAP kinase. *DNA and Cell Biol* 16(4):391-399.
- Epperly MW, Bernarding M, Gretton J, Jefferson M, Nie S, Greenberger JS. 2003. Overexpression of the transgene for manganese superoxide dismutase (MnSOD) in 32D cl 3 cells prevents apoptosis induction by TNF- α , IL-3 withdrawal, and ionizing radiation. *Exp Hematol* 31:465-474.
- Faraci FM, Didion SP. 2004. Vascular protection superoxide dismutase isoforms in the vessel wall. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24:1-7.
- Fridovich I. 1989. Superoxide Dismutases. *J Biol Chem* 264:7761-7764.
- Grisham M, Mc Cord J. 1986. Chemistry and cytotoxicity of reactive oxygen metabolites. Barcelona (España): The Williams and Wilkins Company. p.128.
- Hallewell R, Masiarz F, Najarian R, Puma J, Quiroga M, Randolph A, Sanchez-Pescador R, Scandella C, Smith B, Steimer K, Mullenbach G. 1985. Human Cu/Zn superoxide dismutase cDNA: isolation of clones synthesising high levels of active or inactive enzyme from an expression library. *Nucleic Acids Res* 13:2017-2034.
- Harris N, Costa V, Maclean M, Mollapour M, Moradas-Ferreira P, Piper PW. 2003. MnSOD Overexpression Extends the Yeast Chronological (G0) Life Span but Acts Independently Of Sir2p Histone Deacetylase to Shorten the Replicative Life Span of Dividing Cells. *Free Radic Biol & Med* 34:1599-1606.
- Henkle DK, Tawe W, Warnecke C, Walter RD. 1995. Characterization of the manganese superoxide dismutase cDNA and gene from the human parasite *Onchocerca volvulus*. *Biochem J* 308:441-446.
- Hunter T, Bannister WH, Hunter GJ. 1997. Cloning, expression and characterization of two manganese superoxide dismutases from *Caenorhabditis elegans*. *J Biol Chem* 272:28652-28659.
- Jung H, Lee Y, Lim H, Ahn K, Park E, Lim C. 2002. Regulation of the manganese-containing superoxide dismutase gene from fission yeast. *Mol Cells* 14:300-304.
- Kim E, Chung H, Suh B, Hah Y, JH R. 1998. Expression and regulation of the SODF gene encoding iron- and zinc-containing superoxide dismutase in *Streptomyces coelicolor* Muller. *J Bacteriol* 180:2014-2020.
- Kim F, Kim H, Hah Y, Roe J. 1996. Differential expression of superoxide dismutases containing Ni and Fe/Zn in *Streptomyces coelicolor*. *Eur J Biochem* 241:178-185.
- Knudsen S. 1999. Promoter 2.0: for the recognition of POU promoter sequences. *Bioinformatics* 15:356-361.

- Kuo S, Chesrown SE, Mellot JK, Rogers RJ, Hsu J-L, Nick HS. 1999. In vivo architecture of the manganese superoxide dismutase promoter. *J Biol Chem* 274:3345–3354.
- Kwong LK, Mockett RJ, Bayne A-CV, Orr WC, Sohal RS. 2000. Decreased mitochondrial hydrogen peroxide release in transgenic *Drosophila melanogaster* expressing intramitochondrial catalase. *Arch Biochem Biophys* 383:303–308.
- Lamarre C, LeMay J-D, Deslauriers NI, Bourbonnais Y. 2001. *Candida albicans* expresses an unusual cytoplasmic manganese containing superoxide dismutase (SOD3 Gene Product) upon the entry and during the stationary phase. *J Biol Chem* 276:43784–43791.
- Landis GN, Tower J. 2005. Superoxide dismutase evolution and life span regulation. *Mech Ageing Dev* 126(3): 365-379.
- Leclere V, Chotteau L, Gansel F, Imbert M, Blondeau R. 2001. Occurrence of two superoxide dismutases in *Aeromonas hydrophila* : Molecular cloning and differential expression of the *sodA* and *sodB* genes. *Microbiol* 147:3105-3111.
- Maarse A, Blom J, Grivell L, Meijer M. 1992. MP11, an essential gene encoding a mitochondrial membrane protein, is possibly involved in protein import into yeast mitochondria. *EMBO J* 11:3619-3628.
- Meng-Feng T, Chu-Fang L, van Hulst M, Huey-Fen T, Chih-Ming C, Chang-Jen H, Chung-Hsiung W, Jung-Yaw L, Viak JM, Guang-Hsiung K. 2000. Transcriptional analysis of the ribonucleotide reductase genes of shrimp white spot syndrome virus. *Virology* 277:92-99.
- Mezes M, Surai P, Salyi G, Speake B, Gaal T, Maldjian A. 1997. Nutritional metabolic diseases of poultry and disorders of the biological antioxidant defence system. *Acta Vet Hung* 45:349-360.
- Miao Z, Gaynor J. 1993. Molecular cloning, characterization and expression of Mn-superoxide dismutase from the rubber tree (*Hevea brasiliensis*). *Plant Mol Biol* 23:267-277.
- Mockett RJ, Bayne A-CV, Kwong LK, Orr WC, Sohal RS. 2003. Ectopic expression of catalase in *Drosophila* mitochondria increases stress resistance but not longevity. *Free Radic Biol & Med* 34:207–217.
- Mockett RJ, Orr WC, Rahmandar JJ, Benes JJ, Radyuk SN, Klichko VI, Sohal RS. 1999. Overexpression of Mn-containing superoxide dismutase in transgenic *Drosophila melanogaster*. *Arch of Biochem Biophys* 371:260–269.
- Murakami H, Volver G, Pain D. 1993. Signal sequence region of mitochondrial precursor proteins binds to mitochondrial import receptor. *Proc Nat Acad Sci USA* 90:3358-3362.
- Odberg-Ferragut C, Renault J, Viscogliosi E, Toursel C, Briche I, Engels A, Lepage G, Morgenstern-Badarau I, Camus D, Tomavo S, Dive D. 2000. Molecular cloning, expression analysis and iron metal cofactor characterisation of a superoxide dismutase from *Toxoplasma gondii*. *Mol Biochem Parasitol* 106:121-129.
- Okamoto O, Robertson D, Fagan T, Hastings J. 2001. Different regulatory mechanisms modulate the expression of a dinoflagellate iron-superoxide dismutase. *J Biol Chem* 276:19989-19993.

- Orr WC, Mockett RJ, Benes JJ, Sohal RS. 2003. Effects of overexpression of copper-zinc and manganese superoxide dismutases, catalase, and thioredoxin reductase genes on longevity in *Drosophila melanogaster*. *J Biol Chem* 278:26418-26422.
- Orr WC, Sohal RS. 2003. Does overexpression of Cu,Zn-SOD extend life span in *Drosophila melanogaster*? *Exp Gerontol* 38:227-230.
- Pan S, Ye J, Hseu R. 1997. Purification and characterization of manganese superoxide dismutase from *Ganoderma microsporum*. *Biochem Mol Biol Int* 42:1035-1043.
- Paul A, Duttaroy A. 2003. Genomic regions responsible for manganese superoxide dismutase regulation in *Drosophila melanogaster*. *Aging Cell* 2:223-231.
- Pipe R, Porte C, Livingstone D. 1993. Antioxidant enzymes associated with the blood cells and haemolymph of the mussel *Mytilus edulis*. *Fish Shellfish Immunol* 3:221-233.
- Prestridge DS. 1995. Predicting Pol II Promoter Sequences Using Transcription Factor Binding Sites. *J Mol Biol* 249:923-932.
- Rabhani ZN, Anscher MS, Folz RJ, Archer E, Huang H, Chen L, Golson ML, Samulski TS, Dewhirst MW, Vujaskovic Z. 2005. Overexpression of extracellular superoxide dismutase reduces acute radiation induced lung toxicity. *BMC Cancer* 5.
- Scherer P, Krieg U, Hwang S, Vestweber D, Schatz G. 1990. A precursor protein partly translocated into yeast mitochondria is bound to a 70 kd mitochondrial stress protein. *EMBO J* 9:4315-4322.
- Slater T. 1987. Free radical-mediated tissue damage. *Nutrition* 87:46-50.
- Sohal R, Agarwal A, Agarwal S, Orr W. 1995. Simultaneous overexpression of copper- and zinc-containing superoxide dismutase and catalase retards age-related oxidative damage and increases metabolic potential in *Drosophila melanogaster*. *J Biol Chem* 270:15671-15674.
- St-Clair D, Porntadavity S, Xu Y, Kiningham K. 2002. Transcription regulation of human manganese superoxide dismutase gene. *Methods Enzymol* 349:306-312.
- Takatlidis K, Schatz G. 1999. Biogenesis of mitochondrial inner membrane proteins. *J Biol Chem* 274:35285-35288.
- Van S, Oudshoorn P, Van H, Polman J, Grivell L. 1986. Targeting efficiency of a mitochondrial pre-sequence is dependent on the passenger protein. *EMBO J* 5:3643-3650.
- Wang SH, Chen JC. 2005. The protective effect of chitin and chitosan against *Vibrio alginolyticus* in white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Fish Shellfish Immunol* 19:191-204.
- White J, Scandalios J. 1989. Deletion analysis of the maize mitochondrial superoxide dismutase transit peptide. *Proc Nat Acad Sci USA* 86:3534-3538.
- Xu Y, Porntadavity S, St Clair DK. 2002. Transcriptional regulation of the human manganese superoxide dismutase gene: The role of specificity protein 1 (Sp1) and activating protein-2 (AP-2). *Biochem J* 362:401-412.
- Yeh C, Wan X, St Clair D. 1998. Transcriptional regulation of the 5' proximal promoter of the human manganese superoxide dismutase gene. *DNA Cell Biol* 17:921-930.

- Youn H-D, Kim E-J, Roe J-H, Hah YC, Kang S-O. 1996. A novel nickel-containing superoxide dismutase from *Streptomyces* spp. *Biochem J* 318:889-896.
- Yukishi A, Go I, Hisanori S, Koaru A, Hideyoshi Y. 1999. Primary structure and function of superoxide dismutase from the *Ascidian halocynthia roretzi*. *Cell Biol Prot* 122 (B):321-326.
- Zhu D, Scandalios JG. 1993. Maize mitochondrial manganese superoxide dismutase are encoded by a differentially expressed multigene family. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:9310-9314.

The cytosolic manganese superoxide dismutase from the shrimp *Litopenaeus vannamei*: molecular cloning and expression

Gracia A. Gómez-Anduro¹, Carolina-V. Barillas-Mury², Alma B. Peregrino-Uriarte¹,
Lalita Gupta², Teresa Gollas-Galván¹, Jorge Hernández-López³ and Gloria Yepiz-
Plascencia^{1*}

¹Aquatic Molecular Biology Laboratory, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, PO Box 1735; Hermosillo Son; 83000, México. ²Laboratory of Malaria and Vector Research, National Institute of Health, Bethesda, MD. ³Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, Unidad Hermosillo. Hermosillo, Sonora, C.P. 83260 México.

Corresponding author: Gloria Yepiz-Plascencia, Ph.D.

Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo,
A.C., PO Box 1735, Hermosillo, Son, 83000, México.
Tel: +52 (662) 289-24-00, Fax: +52 (662) 280-04-21
email: gyepiz@cascabel.ciad.mx

Artículo enviado a Developmental and Comparative Immunology

Abstract

Manganese containing superoxide dismutase (SOD) is normally a nuclear-encoded mitochondrial enzyme in eukaryotic organisms, however a cytoplasmic manganese SOD (cMnSOD) was found in crustaceans that use hemocyanin as oxygen carrier. The complete cDNA and deduced amino acid sequence of a cMnSOD from *Litopenaeus vannamei* were determined. The coding sequence predicts a 287 residues protein with a unique 61 amino acids extension at the N-terminus and lacking a mitochondrial targeting sequence. Phylogenetic analysis clusters cMnSODs and mMnSODs in two separate groups. cMnSOD transcripts were detected in hemocytes, heart, hepatopancreas, intestine, nervous system, muscle, pleopods and gills. Since hemocytes are key defense cells and their reactions produce superoxide radicals, the infection by White Spot Syndrome Virus (WSSV) on the cMnSOD transcript levels were investigated and found to increase transiently one h post-infection and then decrease as the viral infection progressed to levels significantly lower than uninfected controls by 12 h post-infection.

Keywords: antioxidant; cytoplasmic MnSOD; cDNA; expression; WSSV

1. Introduction

Reactive oxygen species (ROS) and reactive oxygen intermediates (ROI) are produced during normal aerobic metabolism and increase in physiological conditions that result in oxidative stress and during defense reactions [1]. ROI and ROS are rapidly eliminated by antioxidant enzymes such as superoxide dismutase (SOD), catalase, glutathione peroxidase, glutathione reductase, glutaredoxin, thioredoxin-reductase, etc. [2-4]. SOD detoxifies superoxide radicals by converting them to hydrogen peroxide and oxygen [5]. Hydrogen peroxide is then transformed to water and oxygen by catalase, resulting in innocuous compounds to the cell [6].

SOD requires a metal cofactor for catalysis, and currently, six types are known: copper zinc SOD (CuZnSOD) [7], nickel SOD (NiSOD) [8], manganese-iron SOD (MnFeSOD) [9], iron-zinc SOD (FeZnSOD) [10], iron SOD (FeSOD) and manganese SOD (MnSOD) [11]. Commonly animal eukaryotic cells have two SODs, a cytoplasmic CuZnSOD and a mitochondrial MnSOD. While the eukaryotic MnSOD is normally a nuclear encoded mitochondrial enzyme, crustaceans that use hemocyanin for oxygen transport were reported to have an unusual cytoplasmic MnSOD (cMnSOD) [12]. These two MnSODs also differ in their subunit composition, since the mitochondrial MnSOD (mMnSOD) is a homotetramer and the cytosolic enzyme is a homodimer, both formed by ~25 kDa subunits in the blue crab *Callinectes sapidus* [12]. The nuclear encoded mMnSOD precursor protein is translocated to the mitochondria by recognition of the N-terminal

signal peptide by a mitochondrial translocon; conversely, the cMnSOD, lacks the signal peptide and is retained in the cytosol [12].

Hemocytes are key cells for innate invertebrate defense reactions. One of their reactions is the production of ROS and ROI to attack invaders [13]. Since the accumulation of these reactive molecules causes cell damage, the enzymatic antioxidant system has evolved to be highly effective. Lower total SOD activity were found in *L. vannamei* with higher susceptibility to *Vibrio alginolyticus* [14], similarly, lower total SOD activity levels were found upon infection with White Spot Syndrome Virus (WSSV) in the shrimp *Penaeus monodon* [15] and *Fenneropenaeus indicus* [16]. Several key evolutionary differences have been found in some crustacean genes compared to other arthropods. Some shrimp protein sequences appear to be more similar to their vertebrate homologs than to invertebrate ones. Examples include catalase [17], mu-glutathione S-transferase [18] and lysozyme which also contains novel sequences unique to penaeid crustacean [19]. Cytoplasmic MnSODs have only been found in crustaceans and proposed to substitute the function of CuZnSOD in other systems as an adaptation for the need of unusual copper levels in the blood due to hemocyanin, a Cu⁺⁺ based oxygen carrier [12]. To gain new insights into the shrimp SOD, its complete cDNA was cloned and sequenced. Its expression was detected in several tissues and in hemocytes infected with White Spot Syndrome Virus (WSSV) in temporal-specific manner.,

2. Materials and Methods

2.1. RNA isolation, Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE) and sequence determination

Juvenile intermolt shrimp (8-10 g), were obtained from CIBNOR (Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, Hermosillo, Son., México). Total RNA was isolated from hemocytes, heart, hepatopancreas, intestine, nervous system, muscle, pleopods and gills using TRIzol (Invitrogen) and its integrity was confirmed by 1% agarose-formaldehyde gel electrophoresis [20].

To obtain the cDNA sequences, RT-PCR fragments were obtained from hemocyte poly A+ isolated from 1 µg of total RNA using Dynabeads (DYNAL AS) following the manufacturer recommendations. The cDNA was synthesized using the SMART cDNA Library Construction Kit (Clontech) and amplified with the CDS III/3' and 5'-PCR primers under the following conditions: 95°C, 1 min; followed by 12 cycles of 95°C, 10 sec, 68 °C, 6 min; an extension of 72 °C, 10 min and then used for PCR of the cMnSOD.

The primers used for PCR were designed based on a partial sequence (GenBank accession number [AB108065](#)) of SOD from *L. vannamei* and were: FwcMnSOD (5'-GGGCTTCATTAACAACCTAATTGC-3') and RvcMnSOD (5'-ATGTTGGTCCAGAAGATGGTGT-3') for the forward and reverse primers, respectively. PCR was done in a 25 µL reaction containing 1 µl of cDNA from hemocytes, 0.5 µM each primer and 21 µl platinum PCR Supermix (Invitrogen) under the following conditions: 95°C, 1 min; followed by 30 cycles of 95°C, 30 sec, 60 °C, 1 min, 68 °C, 1 min; an extension of 72 °C, 10 min. The fragment containing the 5' end of the cDNA was obtained using the 5'

2. Materials and Methods

2.1. RNA isolation, Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE) and sequence determination

Juvenile intermolt shrimp (8-10 g), were obtained from CIBNOR (Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, Hermosillo, Son., México). Total RNA was isolated from hemocytes, heart, hepatopancreas, intestine, nervous system, muscle, pleopods and gills using TRIzol (Invitrogen) and its integrity was confirmed by 1% agarose-formaldehyde gel electrophoresis [20].

To obtain the cDNA sequences, RT-PCR fragments were obtained from hemocyte poly A+ isolated from 1 µg of total RNA using Dynabeads (DYNAL AS) following the manufacturer recommendations. The cDNA was synthesized using the SMART cDNA Library Construction Kit (Clontech) and amplified with the CDS III/3' and 5'-PCR primers under the following conditions: 95°C, 1 min; followed by 12 cycles of 95°C, 10 sec, 68 °C, 6 min; an extension of 72 °C, 10 min and then used for PCR of the eMnSOD.

The primers used for PCR were designed based on a partial sequence (GenBank accession number [AB108065](#)) of SOD from *L. vannamei* and were: FvcMnSOD (5'-GGGCTTCATTAACAACCTAATTGC-3') and RvcMnSOD (5'-ATGTTGGTCCAGAAGATGGTGT-3') for the forward and reverse primers, respectively. PCR was done in a 25 µL reaction containing 1 µl of cDNA from hemocytes, 0.5 µM each primer and 21 µl platinum PCR Supermix (Invitrogen) under the following conditions: 95°C, 1 min; followed by 30 cycles of 95°C, 30 sec, 60 °C, 1 min, 68 °C, 1 min; an extension of 72 °C, 10 min. The fragment containing the 5' end of the cDNA was obtained using the 5'

PCR primer (5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT-3') and RvcMnSOD as mentioned before. The 3' end was obtained using 40 cycles with CDS III/3' PCR (5'-ATTCTAGAGGCCGAGGCGGCCGACATG-d(T)30N-1N-3') and FwcMnSOD primers, under the previously mentioned conditions in a DNA Thermal Cycler (PTC-200 DNA Engine, MJ Research). The internal PCR and the RACE-PCR products, containing the 5' and 3' ends, were cloned using the pCR II TOPO cloning system (Invitrogen) following the manufacturer recommendations and sequenced. The deduced amino acid sequence was obtained using the web site <http://arbl.cvmb.colostate.edu/molkit/translate/> and aligned with other MnSODs using Clustal W [21]. The aligned sequences were analyzed using the SEQBOOT algorithm from Felsenstein's PHYLIP package using maximum likelihood to obtain 100 data sets by bootstrap resampling [22]. The multiple data sets were used to calculate the 100 most probable trees with PROML and used in the CONSENSE that calculates a majority rule consensus tree. The nucleotide and deduced protein sequences were compared to non redundant nucleotide and protein databases using the BLAST algorithm at the National Center for Biotechnology Information, (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) [23].

2.2. *cMnSOD mRNA detection*

Shrimp cMnSOD mRNA was detected by reverse transcription and PCR (RT-PCR). Approximately 2 µg from hemocytes and pleopods and 1 µg of total RNA from hemocytes, heart, hepatopancreas, intestine, nervous system, muscle and gills were reverse transcribed using oligo dT₍₁₂₋₁₈₎ and SuperScript II reverse transcriptase

(Invitrogen). Amplifications were done using the FwIcMnSOD (5'-ATGGCTGAGGCAAAGGAAGCTTAC-3') and RvcMnSOD (previously mentioned) primers to produce a 498 bp fragment under the following conditions: 95°C, 1 min, 95°C, 30 s, 60°C, 1 min, 68°C, 1 min (27 cycles, only pleopods was amplified 35 cycles); 72°C, 10 min and kept at 4°C until used. A ribosomal protein L8 producing a 430 bp fragment, GenBank [DQ316258](#) was amplified side by side for comparisons using the forward and reverse primers, (5'-GAAGAGGATCGGTGTTCAAGT-3' and 5'-CTCCTGAAGGAAGCTTTACAC-3'), respectively.

To investigate the effect of virus infection on hemocytes cMnSOD transcript levels, total RNA was isolated from healthy and WSSV-infected shrimp (Gollas-Galvan et al., to be reported elsewhere) 1, 6 and 12 h post infection. Hemocytes from 3 shrimp were pooled and for each time point, 3 independent pools, representing 9 shrimp in total were prepared and analyzed separately. Total RNA (~500 ng) samples were used as templates for reverse transcription using the QuantiTect kit (Qiagen, Valencia, CA) according to the manufacturer instructions. RNA samples were incubated in "gDNA wipeout" buffer at 42°C for 5 min to remove any potential contamination with genomic DNA. cDNA was synthesized at 42°C for 30 min, using random hexamer primers. When the reaction was completed, reverse transcriptase was inactivated by heating the sample at 95°C for 3 min. PCRs were performed in 20 µl reactions using the cDNA template synthesized from 25 ng of total RNA in an Opticon-Chromo 4 system (MJ Research) using SYBR green qRT-PCR kit (DyNAmo HS, Finnzymes, New England Biolabs, Ipswich, MA). The PCR involved incubation at 95°C for 15 min followed by 45 cycles of 10 sec at 94°C, 20 sec at

58°C and 30 sec at 72°C, Fluorescence readings were taken at 72°C after each cycle. A final extension at 72°C for 5 min was completed before deriving a melting curve (70°C to 95°C) to confirm the identity of the PCR products. qRT-PCR measurements were made in triplicate. Results were normalized with ribosomal protein L8 as an internal standard, also measured by qRT-PCR, and expressed as copies/hemocytes. The following primers were used for PCR amplifications: MnSOD: FcMnSODr 5'-GGGCTACATTAACAACCTAATTGC-3' and RcMnSODr 5'-ATGTTGGTCCAGAAGATGGTGT-3', Virus WSSV: Hm20WSSVfw 5'-GCTGGTGGGGGATGATACTA-3' and Hm20WSSVrv 5'-GTCTCCCGTCACCGTCTTTA-3', corresponding to the WSSV gen product WSV 230 (GenBank AF332093) and L8 ribosomal protein primers L8F2 (TAGGCAATGTCATCCCCATT) and L8R2 (TCCTGAAGGAAGCTTTACACG).

3. Results and discussion

3.1. Shrimp cMnSOD nucleotide sequence and predicted protein

The full length cDNA sequence (GenBank accession number [DQ005531](#)) was deduced from 3 overlapping cDNA fragments that were thoroughly sequenced. A small 152 bp fragment was cloned by RT-PCR amplification of hemocyte mRNA based on 161 bp partial sequence information available (GenBank [AY278201](#)) that was 97% identical to the one reported herein and contained frame shifts. The cDNA sequence was extended in the 5' and 3' direction by using RACE-PCR. A 1313 bp (before the polyA⁺ tail) sequence

was obtained by PCR from hemocytes cDNA (Fig 1). The coding sequence is 861 pb and corresponds to a predicted polypeptide of 287 amino acids. Based on the N-terminal sequenced determined from the *C. sapidus* cMnSOD, the mature protein is predicted to initiate at amino acid 62, after cleavage of the first 61 N-terminal amino acids [12]. The calculated molecular weight of the mature cleaved shrimp cMnSOD is 24.8 kDa, and has a theoretical pI 6.04, that was obtained using ProtParam, available in <http://us.expasy.org/tools/protparam.html>. Recently a MnSOD proposed to be a homodimer and composed by 21.7 kDa subunits was purified from the fresh water shrimp *Macrobrachium nipponense* and may correspond to the cMnSOD, although this was not reported by the authors [24]. Two short fragments of 54 bp and a 361 bp correspond to the 5'UTR and 3'UTR (without polyA⁺ sequence), respectively (Fig. 1). A polyadenylation signal (AATATA) and an ATTTA rich region, known to be involved in regulating mRNA stability, were found in the 3' UTR [25].

The complete shrimp cMnSOD predicted amino acid sequence is highly similar to MnSOD sequences from the crustaceans *Farfantepenaeus aztecus* partial sequence (97%), *Marsupenaeus japonicus* (89%), *C. sapidus* (82%) and *Palaemonetes pugio* (87%) (see Figure 3 for GenBank accession numbers). Two forms of MnSOD are found in the blue crab *C. sapidus* with different cell localization; a dimeric MnSOD is localized in the cell cytoplasm while a tetrameric MnSOD is localized inside the mitochondria [26]. Cytosolic and mitochondrial MnSOD are coded by two different genes with key changes in their 5'- regions. Cytosolic MnSODs have a conserved N-terminal extension not present in mMnSOD, lacking a mitochondrial targeting sequence (Fig 2).

As shown in Fig 2, the major differences among the mitochondrial and cytosolic SODs are located in the N-terminal region and this region appears to be enough to group separately cytosolic and mitochondrial MnSODs. Secondary structure predictions of this region revealed that the crab cMnSOD α -helix lacks the amphiphilic structure characteristic of mitochondrial-targeting sequences and the protein is retained in the cytosol [12]. Since shrimp cMnSOD is homologous to the crab gene, it is likely to be also localized in the cytosol. A mMnSOD may also be present in the shrimp *L. vannamei*, but it is still not reported.

Invariant amino acids responsible for manganese coordination are His-111, His-159, Asp-244 and His-248 and are located in the most highly conserved regions (Fig. 2). Lysine 237 plays a relevant role in the structural stabilization of the active site [27] and was identified based on *Propionibacterium shermanii* MnSOD (Fig 2).

For molecular phylogeny studies, cytoplasmic and mitochondrial MnSODs were compared and found to cluster in two groups with robust separate branches corresponding to mMnSOD and cMnSOD (Fig 3). The cMnSOD sequence of the white shrimp *L. vannamei*, groups with the homologues from brown shrimp *F. aztecus*, tiger shrimp *Penaeus monodon*, (GenBank BI784454), Kuruma shrimp *M. japonicus*, blue crab *C. sapidus*, *P. pugio* and European spiny lobster (*Palinurus vulgaris*, GenBank [X64063](#)). Interestingly, all known cMnSODs are found in crustaceans, which use hemocyanin as oxygen carrier protein, in agreement with the proposal of Brower et al [12]. The shrimp cMnSODs from *L. vannamei*, *F. aztecus*, *P. monodon* and *M. japonicus* clusters together as a separate group when compared to cMnSODs from other crustaceans. Sequences for

both mMnSOD and cMnSOD are available for the blue crab *C. sapidus* and, interestingly, these two enzymes segregated into these two divergent groups. The phylogenetic analysis suggests that while mMnSODs have an ancient common ancestor with that of other eukaryotes and have remained highly conserved, cMnSODs appeared for the first time in crustaceans, after they had diverged from other animals. This new gene probably resulted from a gene duplication that produced a protein with a novel sub cellular localization.

3.2. The cMnSOD transcript is present in different shrimp tissues and regulated upon WSSV infection

cMnSOD mRNA presence was detected by RT-PCR in all tissues tested (hemocytes, heart, hepatopancreas, intestine, nervous system, muscle, pleopods and gills), with apparent different relative abundances (Fig. 4, panel A). cMnSOD mRNA was most abundant in gills and pleopods, while expression in heart and muscle tissues was the lowest. Since the tissues examined are highly vascularized, hemocyte-derived transcripts contribution can not be completely ruled out. However, since equal amounts of RNA were used for all the experiments the signal would be rather small. Since hemocytes are key immune cells and respond to invaders by producing superoxide radicals [13], we investigated whether the relative mRNA levels of the cMnSOD were affected by WSSV infection. Relative levels of viral and cMnSOD mRNAs were determined at different times post-infection using quantitative real-time PCR and ribosomal protein L8 mRNA as an internal control to standardize for the abundance of cDNA template. Viral

infection in hemocytes was confirmed by determining the relative viral levels at different times post-infection using real-time PCR (Fig. 4, panel B). As expected, the virus could not be detected in control uninfected hemocytes, but 6 h post-infection viral levels were 36 fold higher compared to 1 h after infection, confirming viral transcription (the mRNA level 1 h post-infection was given an arbitrary value of 1). By 12 h viral levels decreased and were 24 fold higher than 1 h post-infection. One hour after virus infection, the cMnSOD levels were significantly higher (3.6 fold, $p < 0.001$ in ANOVA test) compared to non-infected control shrimp. However, as the viral infection progressed, the cMnSOD values decreased, reaching similar levels to the uninfected control by 6 h and becoming significantly lower (50%, $p = 0.002$ in ANOVA test) by 12 h post-infection.

The early induction of cMnSOD expression could be due to a transient systemic response to the injury inflicted during viral infection that would be expected to generate increased systemic levels of ROS. Hemocyte cMnSOD induction could be part of an early ROS detoxification response. The steady decrease in cMnSOD expression as the viral infection progressed would be expected to generate higher local levels of ROS that could be important to limit viral replication in hemocytes.

MnSOD tissue-specific expression in crustaceans may respond to particular types of invaders, since inoculation of *Macrobrachium rosenbergii* with *Lactococcus garvieae* decreased cMnSOD transcripts by approximately 3-fold in hepatopancreas, but not in hemocytes [28]. Similarly, upon infection of *L. vannamei* with *Vibrio alginolyticus* total

SOD activity was reported to decrease [29], although the effect on the transcript level was not evaluated.

In summary, we present the cDNA coding sequence of the cMnSOD from the shrimp *L. vannamei* and show that mRNA transcript levels in hemocytes change rapidly and dynamically in response to WSSV infection. The mechanisms whereby these changes occur and their effect on viral replication are currently under investigations.

Acknowledgements

This work was financed by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México grant 36926. We thank Dr. R. Sotelo-Mundo for critical reading of the manuscript.

References

1. Mezes M, Surai P, Salyi G, Speake B, Gaal T, Maldjian A. Nutritional metabolic diseases of poultry and disorders of the biological antioxidant defence system. *Acta Vet Hung* 1997; 45: 349-360.
2. Rudneva I. Antioxidant system of black sea animals in early development. *Comp Biochem Physiol* 1999; 122C: 265-271.
3. Bell K, Smith V. Occurrence and distribution of antioxidant enzymes in the haemolymph of the shore crab *Carcinus maenas*. *Mar Biol* 1994; 123: 829-836.
4. Burton G, Ingold K. beta-Carotene: an unusual type of lipid antioxidant. *Science* 1984; 224: 569-573.
5. Pipe R, Porte C, Livingstone D. Antioxidant enzymes associated with the blood cells and haemolymph of the mussel *Mytilus edulis*. *Fish Shellfish Immunol* 1993; 3: 221-233.
6. Bendich A. Antioxidants, immune response and animal function. Physiological role of antioxidants in the immune system. *J Dairy Sci* 1993; 76: 2789-2794.
7. Hallewell R, Masiarz F, Najarian R, Puma J, Quiroga M, Randolph A, Sanchez-Pescador R, Scandella C, Smith B, Steimer K, Mullenbach G. Human Cu/Zn superoxide dismutase cDNA: isolation of clones synthesizing high levels of active or inactive enzyme from an expression library. *Nucleic Acids Res* 1985; 13: 2017-2034.
8. Youn H-D, Kim EJ, Roe JH, Hah YC, Kang SO. A novel nickel-containing superoxide dismutase from *Streptomyces spp.* *Biochem J* 1996; 318: 889-896.

9. Amo T, Atomi H, Imanaka T. Biochemical properties and regulated gene expression of the superoxide dismutase from the facultatively aerobic hyperthermophile *Pyrobaculum calidifontis*. J Bacteriol 2003; 185: 6340-6347.
10. Kim F, Kim H, Hah Y, Roe J. Differential expression of superoxide dismutases containing Ni and Fe/Zn in *Streptomyces coelicolor*. Eur J Biochem 1996; 241: 178-185.
11. Bowler C, Alliotte T, Van Den Buleke M, Bauw G, Vandekerckhove J, Van Montagu M, Inzt D. Genetics a plant manganese superoxide dismutase is efficiently imported and correctly processed by yeast mitochondria (complementation analyses/*Escherichia coli*/evolutionary conservation/*Nicotiana plumbaginifolia*). Proc Natl Acad Sci USA 1989; 86: 3237-3241.
12. Brouwer M, Brouwer TH, Grater W, Enghild JJ, Thogersen IB. The paradigm that all oxygen-respiring eukaryotes have cytosolic CuZn-superoxide dismutase and that Mn-superoxide dismutase is localized to the mitochondria does not apply to a large group of marine arthropods. Biochem 1997; 36: 13381-13388.
13. Bell KL, Smith VJ. In vitro superoxido production by hialine cells of the shore crab *Carcinus maenas* (L.). Dev Comp Immunol 1993; 17: 211-219.
14. Wang L, Chen J. The immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its susceptibility to *Vibrio alginolyticus* at different salinity levels. Fish Shellfish Immunol 2005; 18: 269-278.

15. Chang C, Su M, Chen H, Liao I. Dietary beta-1,3-glucan effectively improves immunity and survival of *Penaeus monodon* challenged with white spot syndrome virus. *Fish Shellfish Immunol* 2003; 15: 297-310.
16. Mohankumar K, Ramasamy P. White spot syndrome virus infection decreases the activity of antioxidant enzymes in *Fenneropenaeus indicus*. *Virus Res* 2006; 115(1):69-75.
17. Tavares-Sanchez OL, Gomez-Anduro GA, Felipe-Ortega X, Islas-Osuna MA, Sotelo-Mundo RR, Barillas-Mury C, Yepiz-Plascencia G. Catalase from the white shrimp *Penaeus (Litopenaeus) vannamei*: Molecular cloning and protein detection. *Comp Biochem and Physiol* 2004; 138 (B): 331-337.
18. Contreras-Vergara CA, Harris-Valle C, Sotelo-Mundo RR, Yepiz-Plascencia G. A Mu-class glutathione S-transferase from the marine shrimp *Litopenaeus vannamei*: Molecular cloning and active-site structural modeling. *J. Biochem Mol Toxicol* 2004; 18: 245-252.
19. Sotelo-Mundo R, Islas-Osuna M, De-la-Re-Vega E, Hernandez-Lopez J, Vargas-Albores F, Yepiz-Plascencia G. cDNA cloning of the lysozyme of the white shrimp *Penaeus vannamei*. *Fish and Shellfish Immunol* 2003; 15: 325-331.
20. Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T. *Molecular cloning: A laboratory manual*. New York, NY, USA; 1989.

21. Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 1994; 22: 4673-4680.
22. Felsenstein J. PHYLIP: Phylogeny inference package, version 3.6. University of Washington, Seattle, WA; 2004.
23. Altschull SF, Gisha W, Millerb W, Meyerse EW, Lipmana DJ. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 1990; 215: 403-410.
24. Yao CL, Wang AL, Wang WN, Sun RY. Purification and partial characterization of Mn superoxide dismutase from muscle tissue of the shrimp *Macrobrachium nipponense*. *Aquaculture* 2004; 241: 621-631.
25. Malter J, Hong Y. A redox switch and phosphorylation are involved in the post-translational up-regulation of the adenosine-uridine binding factor by phorbol ester and ionophore. *J Biol Chem* 1991; 266: 3167-3171.
26. Brouwer M, Hoexum Brouwer T, Grater W, Brown-Peterson N. Replacement of a cytosolic copper/zinc superoxide dismutase by a novel cytosolic manganese superoxide dismutase in crustaceans that use copper (haemocyanin) for oxygen transport. *Biochem J* 2003; 374: 219-228.
27. Gabbianelli R, Battistoni A, Polticelli F, Meier B, Schmidt M, Rotilio G, Desideri A. Effect of lys175 mutation on structure function properties of *Propionibacterium shermanii* superoxide dismutase. *Prot Engin* 1997; 10: 1067-1070.

28. Cheng W, Tung YS, Liu C-H, Chen JC. Molecular cloning and characterisation of cytosolic manganese superoxide dismutase (cytMn-SOD) from the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Fish Shellfish Immunol* in press (2006).
29. Liu C, Chen J. Effect of ammonia on the immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its susceptibility to *Vibrio alginolyticus*. *Fish Shellfish Immunol* 2004; 16: 321-334.

```

-54 ----- GACAGCTTCACCAACCTGCTTGGCGTTAGACGTCCCCCTCGAATAAGTAAAATC
1  M A E A K E A Y I S I L E K K L A E L T G I E V D Q I
1  ATGGCTGAGGCAAAGGAAGCTTACATCTCCATCCTGGAGAAGAGTTAGCTGAGCTGACTGGAAATTGAGGTGGATCAGAT
   >>>> Fw1cMnSOD >>>>
28  K K N Q F A N A A D E A V A I R E M A S Y V K G I V
91  CAAGAGGAATCAGTTCCGCAAAATGCAGCAGATGAGGCTGTCCGCATCCGTGAGATGGCTTCATACGTAGAGGGTATTGTCCG
54  V Q Q A G V A Q A G T V S P Q T A Q M P A H I N A E L
161 GTACAGCAGGCTGGTGTTCCTCAGGCTGGSCACAGTCCCTCAGATTGSCACAGATGTTTGGCCATATCAATGCTGAATT
83  G E E R G A H A L P P D K Y D P N A L E P H I S G M
241 GGGTAGGAACGAGGTGCTCATGCTTTGCCACCCCTCAAGTATGATTTCAACGCCCTTGAACCTCACATCTCCGGCATGA
107 I M E I H H T K H H Q G Y I N N L I A A T K K L V E A
321 TCATGGAGATCCACCACACAAAGCATCACCAGGGCTACATTAAACAACCTAATTGCCGCTACGAAGAAGTTGGTTGAGGGCG
   >> Fw2cMnSOD >>
134 E A A N D V S A M N A L L P A I K F N G G G H L N H T
401 GAGGCAGCCCAATGACGTAAAGCCCAATGAATGCCCTTCTACCAGCTATCAAGTTCAATGGAGGCGGCCACTTGAACCCACAC
161  I P W T N M A P D A G G E F Q G A V A Q A I D E S F
481 CATCTCTGGAACCAACATGGGCTCCCGATGCTGGTGGCGAGCCCAAGGAGCTGTTGCACAAGCCATFGACGAGAGGCTTTG
   << RvcMnSOD <<
187 G S F Q S P K D K F S A A S V G V K G S G W G W L G Y
561 GATCATTCAGTCCCTTCAAGGACAAATTTCTGCTGCCAGCGTTGGAGTGAAGGCTCTGGCTGGGGATGGCTCGGCAT
214 C P N Q N K L E I A T C Q N Q D P L Q I T H G L V P L
641 TGCCCCAATCAGAACAAGCTTGGAGATGCCCACTTGCAGAACCCAGGATCCCTTGCAAATCACTCAGGGGCTGGTTCGGTT
241  L G L D V W E H A Y Y L Q Y K H L R A D Y V K A F F
721 GCTTGGCCTTGAAGTGTGGGAGCATGCTTACTACCTTCAGTACAAGAACCCTCCGTGCAGATTACCTGAAGGCTTCTTCA
267 N V I N W E N V N E R Y E N A R K N A G H *
801 ATGTATTAACTGGGAGAAGCTGAATGAGCSTTATGAGAATGCTGTAAGAATGCAGGTCATTGACTTCTCGTGGCGACC
   <<<< Rv1cMnSOD <<<<
881 AAAGATCAATTCAGTGTCAAAAGGCGCTTCTCTCACATTTGTAACFCAGAAGCTGACCCGGCTATTGTGATAGTGCACIA
961 CTGCATCTTCACGTTAATCTTGTAAAGTGCCTCTAAAAACATGAACAACAACAAGATAAATTTTGTCTTTTGAAG
1041 ACCACAGAAGTGGCTCTTAAATTTTATGAAAATACTCAGCACAAGACATTTCTTCTGCTCACTAAAAAGGGCATGGTCTT
1121 GTGTATTGGTATTTAAGTACATTTATGTAAGCTTGTATCTGCTCATGGTTTATATGTTGAAGTATTAAACACCCCTT
1201 TAAGTATTACAAATATAAGGGATTTATAAACAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

```

Fig. 1. Nucleotide and deduced amino acid sequences of shrimp *L. vannamei* cMnSOD. The RACE primers are shown in bold, primers to amplify the coding sequence are bold and underlined, while the ATTTA rich region, probably involved in mRNA stability is in bold and italics, polyadenylation signal is enclosed in a rectangle and the stop codon is indicated with asterisk.

<i>L. vannamei</i> cMnSOD	1	M A E A R L A Y T S I L E K K L A E L E G T E V D Q I K K N Q F A N A A C E L V A T R E M A S Y V E G T I V V G Q A G V A
<i>C. sapidus</i> cMnSOD	1	- M A R S L Y T A A L E K K L A E L E G T E V D Q I K K N Q L A N A S E E A R S I R E M A S Y V E G T I V V G Q A G V A
<i>P. monodon</i> cMnSOD	2	M A E A R L A Y T S I L E K K L A E L E G T E V D Q I K K N Q F A N A A C E L V A T R E M A S Y V E G T I V V G Q A G V A
<i>M. japonicus</i> cMnSOD	1	M A E A R L A Y T S I L E K K L A E L E G T E V D Q I K K N Q F A N A A C E L V A T R E M A S Y V E G T I V V G Q A G V A
<i>C. sapidus</i> mMnSOD	1	-----
<i>D. melanogaster</i> mMnSOD	1	-----
<i>C. elegans</i> mMnSOD	1	-----
		↓
<i>L. vannamei</i> cMnSOD	61	Q A G T V P O S L A M P F A H I A E L G E E R G A N A L P P L K Y D A N A L E P H I E S M I M E I H N T K H R C G Y I
<i>C. sapidus</i> cMnSOD	60	I T G E V P O S L A M P F A H I R A E L G E E R G V H L P P L S Y D Y A L E P H I C T T I M I H N T K H R C G Y I
<i>P. monodon</i> cMnSOD	62	E A S T V P O S L A M P F A H I A E L G E E R G A N A L P P L K Y D A N A L E P H I E S M I M E I H N T K H R C G Y I
<i>M. japonicus</i> cMnSOD	61	Q A G T V P O S L A M P F A H I A E L G E E R G A N A L P P L K Y D A N A L E P H I E S M I M E I H N T K H R C G Y I
<i>C. sapidus</i> mMnSOD	1	- - - H E L A R A F L F A R S A A A G L W C R N H L D L P L P D Y A L E P T I G S I M S H H R H R C H C T Y E
<i>D. melanogaster</i> mMnSOD	1	----- F V A R R I S T A S L A V R K R A L D L P L P D Y A L E P T I G R E I M E S H R C K H C H C T Y E
<i>C. elegans</i> mMnSOD	1	- M L Q N V N C V S K L V Q P T F G S A V R S K H L D L P L P D Y S L E E V I G H R I M S H H R C K H A T Y E
		*
<i>L. vannamei</i> cMnSOD	121	N N L A A T T K L V E A R A A N D V E A M N A L L P A I K F N G G G H L N H T I F W T N M A P D A G G E P G A L A Q
<i>C. sapidus</i> cMnSOD	120	N N L A A V E K I T E A E A N D V E A M N A L L P A I K F N G G G H L N H T I F W T N M A P A G G E P G S A R
<i>P. monodon</i> cMnSOD	121	N N L A A T T K L V E A R A A N D V E A M N A L L P A I K F N G G G H L N H T I F W T N M A P D A G G E P G A L A Q
<i>M. japonicus</i> cMnSOD	121	N N L A A T T K L V E A R A A N D V E A M N A L L P A I K F N G G G H L N H T I F W T N M A P D A G G E P G A L A Q
<i>C. sapidus</i> mMnSOD	58	N N L N V A E R K L A E A K E K D V T T I L A P A L K F N G G G H A N H I F W C N S E A D G E P P G S E L A
<i>D. melanogaster</i> mMnSOD	53	N N L N A A E C L E E A K S K S T T A Y I Q L A P A L K F N G G G H R H T I F W C N S E A D G E P P D D T E K
<i>C. elegans</i> mMnSOD	60	N N L N Q I E R L H E A R V S K S V I C E A I A L C P A L K F N G G G H S N H I F W T N M A P D A G G E P G S E E L T
		*
<i>L. vannamei</i> cMnSOD	181	A I D R E T F G S P Q S F R K P S A A V V V G S G W G W L G Y C E N Q N K I E A T C G N Q D P L Q I T I G L V P L
<i>C. sapidus</i> cMnSOD	180	M I N R D V G S P Q S F R K P S S A V V V G S G W G W L G Y C E K K N K L A A T C G N Q D P L Q I T I G L V P L
<i>P. monodon</i> cMnSOD	181	A I D S F G S P Q S F R K P S A A V V V G S G W G W L G Y C A N N N K I E A T C G N Q D P L Q I T I G L V P L
<i>M. japonicus</i> cMnSOD	181	A I D R S L D H S V P Q Q P S A S V E -----
<i>C. sapidus</i> mMnSOD	117	A I N R D F G S V E N N K N Q L E A A V V V G S G W G W L G Y N K Q K G T I E A T C G N Q D P L E A T I G L V P L
<i>D. melanogaster</i> mMnSOD	112	A I D S F G S L D N L Q R L S A S V V V G S G W G W L G Y C R K K S K I E A T C G N Q D P L E A T I G L V P L
<i>C. elegans</i> mMnSOD	119	A I R S D T F G S L D N L Q R L S A S V V V G S G W G W L G Y C P K G R T L E A T C G N Q D P L E A T I G L V P L
		*
<i>L. vannamei</i> cMnSOD	241	L C D V W E H A Y Y L O Y K N R A D Y V K A F N V T N N S N V N E R S E N A R K N I G H
<i>C. sapidus</i> cMnSOD	240	L C D V W E H A Y Y L O Y K N R A D Y V K A F N V T N N A N V N E R S E A A S R A I G H
<i>P. monodon</i> cMnSOD	241	L C D V W E H A Y Y L O Y K N R A D Y V K A F N V T N N S N V N E R S E K A R I D I G H
<i>M. japonicus</i> cMnSOD		-----
<i>C. sapidus</i> mMnSOD	177	F C D V W E H A Y Y L O Y K N R P D Y V K A F N V A N N K S T T A R H N A S -----
<i>D. melanogaster</i> mMnSOD	172	F C D V W E H A Y Y L O Y K N R P S Y V E A T N S A N N S S C R P Q E A R K I S C -
<i>C. elegans</i> mMnSOD	179	F C D V W E H A Y Y L O Y K N R P D Y V N A L N S A N N S V S E R I A K A Q Q -----

Fig. 2. Alignment of the deduced amino acid sequence of the *L. vannamei* cMnSOD with selected SODs. The amino acids responsible for coordinating the metal are indicated with asterisks and are deduced by similarity with the aligned sequences of the cMnSOD from *C. sapidus* (GenBank accession number [AAF74771.1](#)) and mMnSOD from *C. sapidus* (GenBank accession number [AAF74770.1](#)). A lysine probably involved in structural stabilization of the active site is indicated with a circle and the arrow (↓) marks the predicted N-terminal of the mature protein. The black shaded regions represent identical amino acids among the different sources, while the gray shaded regions are conservative replacements. The N-terminal sequence of the mature crab mMnSOD starts in KHTLP and this region aligns with residue 86 of the *P. vannamei* cMnSOD.

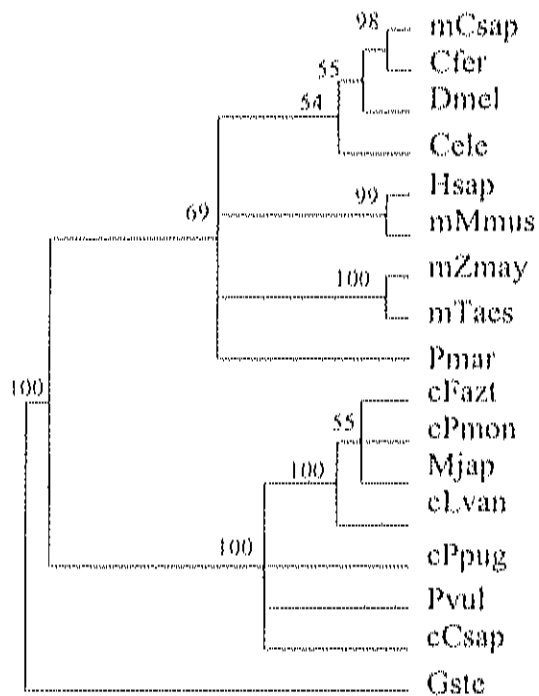


Fig. 3. Phylogenetic relationships from 17 MnSODs, including *L. vannamei* (cLvan). The outgroup used to root the tree was *Geobacillus stearothermophilus* (Gste, GenBank M26646). The numbers at the forks indicate the number of times the group consisting of the species which are to the right of that fork, occurred among the 100 calculated trees. "c" stands for cytosolic, "m" for mitochondrial, when specified in the data available, all the sequence existing for each case was used for the analysis. The sequences are available at National Center of Biotechnology Information Entrez Protein Database (unless otherwise specified), the accession number are: brown shrimp (*Farfantepenaeus aztecus*, cFazt, AY211085), tiger shrimp (*Penaeus monodon*, cPmon, B1784454), Kuruma shrimp (*Marsupenaeus japonicus*, Mjap, AB079877), blue crab (*C.s. sapidus*, cCsap and mCsap, AF264029 and AF264030), *Palaemonetes pugio*, (cPpug, AY211084), European spiny lobster (*Palinurus vulgaris*, Pvul, X64063), *Caenorhabditis elegans* (Cele, D12984), fruit fly (*Drosophila melanogaster*, Dmel, L34276), bred wheat (*Triticum aestivum*, mTaes, AF092524), maize (*Zea mays*, mZmay, L19463), crab (*Charybdis ferussacii*, Cfer, AF019411), sea lamprey (*Petromyzon marinus*, Pmar, X64059), house mouse (*Mus musculus*, mMmus, NP_038699) and *Homo sapiens* (Hsap, CAA68791).

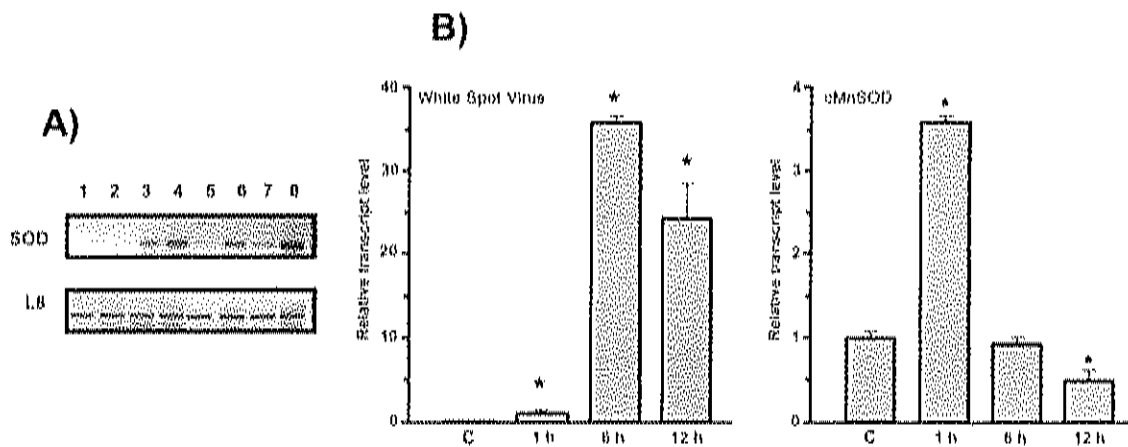


Fig. 4. Detection of cMnSOD transcripts by RT-PCR. Panel A) RT-PCR products analyzed in a 1.5% agarose gel and compared to ribosomal protein L8. Lanes 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, and 8: hemocytes, heart, hepatopancreas, intestine, nervous system, muscle, gills and pleopods respectively. Panel B) Detection of cMnSOD transcript levels after WSSV infection by quantitative RT-PCR (qRT-PCR). Hemocytes were collected from healthy uninfected shrimp and 1, 6 and 12 h post-infection. Bars represent mean \pm standard errors (n=9). All the measurements were done in triplicate. cMnSOD levels significantly different from those of uninfected control are labeled with asterisks (ANOVA $p < 0.002$). Ribosomal protein L8 mRNA levels were also determined by qRT-PCR and used as internal controls to normalize for cDNA template abundance (data not shown).

**Cytosolic manganese superoxide dismutase genes from the white shrimp
Litopenaeus vannamei, protein molecular modeling
and tissue-specific expression**

Key words: antioxidant, gene family, introns, MnSOD

Gracia A. Gómez-Anduro, Rogelio R. Sotelo-Mundo and Gloria Yepiz-Plascencia*

Aquatic Molecular Biology Laboratory, Centro de Investigación en Alimentación y
Desarrollo, PO Box 1735; Hermosillo Son, 83000, México.

Address for correspondence: Gloria Yepiz-Plascencia, Ph.D.

Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo,
A.C., PO Box 1735, Hermosillo, Son, 83000, Mexico.
Tel: +52 (662) 289-24-00, Fax: +52 (662) 280-04-21
e-mail: gyepiz@cascabel.ciad.mx

Abstract

Manganese superoxide dismutase (MnSOD) is an antioxidant enzyme present in basically all organisms. MnSOD is usually a mitochondrial enzyme and there are only a few examples of cytosolic MnSODs (cMnSOD). We have previously characterized a cMnSOD cDNA from the white shrimp *Litopenaeus vannamei* and to obtain new insights into the genomic organization and structure of crustacean MnSODs, we characterized three different cMnSOD genes (*cMnSOD1*, *cMnSOD2* and *cMnSOD3*) and modeled the three-dimensional protein structure using human MnSOD as a template. The first two genes contain five introns in the same positions and are flanked by canonical 5'-GT----AG-3' intron splice-site junctions; while the third one is intron-less. Intron three is the largest in both genes, and contains homopolymeric sequences. The predicted gene products of the three cMnSODs have the same number of amino acid residues and differ in only one amino acid with respect to the other two. Four differences in nucleotide sequence in the coding region are silent. A 995 bp region upstream of the coding sequence of *cMnSOD2* contains putative binding sites for transcription factors. The cMnSOD genes are differentially expressed in gills, pleopods, nervous system, intestine, heart, hepatopancreas and hemocytes as detected by RT-PCR. The structural protein model supports the function of the gene products as a *bona fide* superoxide dismutase with proper coordination for the enzymatic activity.

I. Introduction

Superoxide dismutase (EC 1.15.1.1) catalyzes the conversion of two molecules of superoxide anion to one molecule of hydrogen peroxide and one of oxygen (Pipe et al., 1993). SODs can have different metallic cofactors such as: copper zinc SOD (CuZnSOD) (Hallewell et al., 1985), nickel SOD (NiSOD) (Youn et al., 1996), manganese-iron SOD (MnFeSOD) (Amo et al., 2003), iron-zinc SOD (FeZnSOD) (Kim et al., 1996), iron SOD (FeSOD) and manganese SOD (MnSOD). Crustaceans have the typical mitochondrial MnSOD (mMnSOD) and an additional cytoplasmic MnSOD (cMnSOD). The former is a homotetramer and the later a homodimer of ~25 kDa subunits (Brouwer et al., 1997; Atzenhofer et al., 2002) coded by different genes (Brouwer et al., 2003). The cMnSOD was proposed to replace the normal cytosolic CuZnSOD in the blue crab *Callinectes sapidus* as an adaptation to cope with the need of high blood copper levels in hemocyanin, a Cu-based oxygen-carrier that is highly mobilized during molting in this crab and in other crustaceans (Brouwer et al., 2003).

Although there are complete cDNA sequences for some crustacean cMnSODs such as the blue crab *C. sapidus* (GenBank [AF264030.1](#)) (Brouwer et al., 2003), the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* (Cheng et al., in press (2006)), the shrimp *Penaeus monodon* (GenBank [AAW50395](#)), *Litopenaeus vannamei* (GenBank [DQ005531](#)) (Gómez-Anduro et al., submitted); and partial sequences from *Farfantepenaeus aztecus*, ([AY211085](#)); *Palaemonetes pugio*, ([AY211084](#)) and *Marsupenaeus japonicus* ([AB079877](#)), the genomic organization of none of these cMnSODs is known. In this

study, we report the characterization of three cMnSOD genes from the shrimp *L. vannamei* and describe their differences and tissue-specific expression. Structure protein modeling indicates that the deduced amino acids fold and have the SOD enzymatic activity and the slight differences in sequences from the three genes do not affect the tertiary and quaternary protein structure.

2. Materials and Methods

2.1 Amplification and cloning of cMnSOD genes

High quality genomic DNA was isolated from 2 g of muscle using proteinase K digestion, repeated phenol-chloroform extraction and precipitation with cold ethanol. The DNA fibers were collected using a glass rod and resuspended in 10 mM Tris-HCl, pH 8, 1 mM EDTA (Bradfield and Wyatt, 1983) and used for PCR. The forward cMnSODF and reverse cMnSODR primers were designed based on the cMnSOD cDNA from white shrimp (GenBank accession number [DQ005531](#)), (Table 1). The PCR was done in a 25 μ L reaction containing 100 ng of genomic DNA, 0.5 μ M each primer and 21 μ L of platinum PCR Supermix (Invitrogen). The PCR cycling conditions were: 95°C, 1 min (one time), 95°C, 30 s, 63°C, 1 min, 68°C, 3 min (one cycle); 95°C, 30 s, 60°C, 1 min, 68°C, 3 min (34 cycles); 72°C, 10 min in a DNA Thermal Cycler (PTC-200 DNA Engine, MJ Research) and kept at 4°C until used. The DNA fragments were cloned into the pCR 2.1 TOPO vector using TOP 10 *E. coli* cells (Invitrogen). All the clones were

thoroughly sequenced in both strands at the GATC facility (Genomic Analysis and Technology Core), The University of Arizona.

2.2 Molecular analysis of the cMnSOD genes

The sequences were analyzed using DNASIS v 2.5 (Hitachi Software Engineering America). The nucleotide and deduced protein sequences were compared to non redundant nucleotide and protein databases using the BLAST algorithm (Altschull et al., 1990). For initial protein modeling, the human MnSOD sequence (GenBank **P04179**) was selected as the most similar protein to shrimp cMnSOD and aligned with the deduced amino acids from the *L. vannamei* genes *cMnSOD1*, *cMnSOD2* and *cMnSOD3* using Clustal W (Thompson et al., 1994). Putative enhancer regions and transcription factor binding sites were found using [http://www.jfi.org/cgi-bin/jfi/T\[sitescan.pl](http://www.jfi.org/cgi-bin/jfi/T[sitescan.pl) (Prestridge, 1991). The three-dimensional structure of shrimp cMnSOD was obtained by homology modeling using a human MnSOD structure (PDB **1VAR**) (Borgstahl et al., 1992). The selection of this template was not trivial, since this structure is a variant of the human mitochondrial MnSOD that destabilizes the tetrameric interface (Borgstahl et al., 1992). Crustacean cMnSODs are postulated to be dimeric (Brouwer et al., 1997; Brouwer et al., 2003) and we considered that **1VAR** was a better choice for the homology model. The modeling was started using the Swiss-Model server (Schwede et al., 2003), and the crustacean sequence did not included the cytosolic amino terminal residues 1-85, since they do not have significant similarity to the template model. The Refmac5 program

(Murshudov et al., 1997) of the CCP4 crystallographic computational suite (Potterton et al., 2002; Winn, 2003) was used to refine the model (fix bond distances, angles, and dihedrals) for a dimeric molecule. A Mn-atom and a water molecule were included in the model on each monomer active site. The structural model figures were made with Bobscript (Esnouf, 1999) and Raster3D programs (Merritt and Bacon, 1997).

2.3 Ligation mediated polymerase chain reaction

To obtain information about the 5'UTR region, 5 µg of genomic DNA were heated 15 min, 75°C, placed on ice and digested with 20 U of *Hind*III overnight at 37°C. Digested DNA was ligated using 500 ng, 2 U of T4 DNA ligase, 10 µl of 10X ligation buffer in a large volume (100 µl reaction) at 16°C overnight (Ochman et al., 1988). The PCR reaction was done using 7 µl of the ligation reaction, 1.5 µl of each primer (20 µM) and 25 µl platinum PCR Supermix (Invitrogen) under the following conditions: 75°C, 3 min; 94°C, 4 min; followed by 3 cycles of 94°C, 1 min; 60 °C, 1 min; 68 °C, 4 min; and 37 cycles of 94°C, 1 min; 55 °C, 1 min; 68 °C, 4 min and a final extension of 68 °C, 10 min. A reamplification was done using 1 µl of the previous PCR reaction, 1.5 µl of each primer (20 µM) and 25 µl platinum PCR Supermix (Invitrogen) in 35 µl of final reaction, using the conditions previously mentioned. The primers used for inverse PCR were designed based on the cDNA sequence of the eMnSOD (GenBank accession number **DQ005531**) from *L. vannamei* and were: eMnSODF5 and eMnSODR5 for the forward and reverse primers, respectively (Table 1). The PCR products were cloned and thoroughly sequenced.

2.4 Differential gene expression by RT-PCR

Healthy juvenile intermolt shrimp from CIBNOR (Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, Hermosillo, Son., México) were used to obtain gills (G), pleopods (P), nervous system (NS), intestine (I), heart (H), hepatopancreas (Hp) and hemocytes (Hm) that were immediately frozen in liquid nitrogen and used for total RNA isolation using TRIzol (Invitrogen,); RNA integrity was confirmed by 1% agarose-formaldehyde gel electrophoresis (Sambrook et al., 1989).

Based on the sequence determined from each gene, specific primers were designed to distinguish differences in one base (Table 1). PCR reactions were optimized using specific clones for every gene until the conditions for unambiguous detection of their derived transcripts were found. The cMnSOD mRNAs were detected by reverse transcription and PCR (RT-PCR) using 5 µg of total RNA that were reverse transcribed with oligo dT₍₁₂₋₁₈₎ and SuperScript II reverse transcriptase (Invitrogen) in a 22 µl final reaction volume. Differential expression from each gene was done using specific primers for *cMnSOD1* (cMnSODF1 and cMnSODR1), *cMnSOD2* (cMnSODF2 and cMnSODR2) and *cMnSOD3* (cMnSODF3 and cMnSODR3); also a positive control was included using a pair of primers that amplifies the mRNAs from the three genes (cMnSODF and cMnSODR) (Table 1). The PCR reaction was done in 25 µl containing 2.5 µl of 10X PCR buffer (100 mM Tris-HCl, pH 8.3, 500 mM KCl), 3 µl of 50 mM MgCl₂, 2 µl of 2.5 mM dNTP mix, 1 µl of 20 µM each primer, 1 µl of cDNA from each tissue and 1 U of Taq DNA polymerase (Invitrogen,). The amplifications were done using the following

conditions: 95°C, 1 min, 95°C, 30 s, 70°C, 1 min, 72°C, 1 min (30 cycles); 72°C, 10 min and kept at 4°C until used. The PCR products were analyzed in 1% agarose gel.

3. Results and discussion

3.1 Shrimp *cMnSOD* gene sequences and predicted polypeptides

Three genes encoding *cMnSOD* were identified using the primers designed based on the 5' and 3' ends of the coding sequence of the *cMnSOD* cDNA (Gómez-Anduro et al., submitted). They were named *cMnSOD1*, *cMnSOD2* and *cMnSOD3* and are 2,626, 2,473 and 864 bp long, respectively (GenBank [DQ298206](#), [DQ298207](#), [DQ298208](#)), the complete sequence of the three genes is found in the supplementary material (Fig. 5, 6, 7). The fragments were obtained by PCR using genomic DNA and were thoroughly sequenced, overlapped and aligned to obtain the complete sequences. The introns were deduced by direct comparison of the genomic DNA and cDNA sequences. *cMnSOD1* and *cMnSOD2* are interrupted by five introns located at the same positions (Fig. 1). Two glycine codons are split by introns two and five. The intron/exon boundaries are flanked by canonical 5'-GT--AG-3' intron splice-site junctions (Henkle et al., 1995), as was reported for the *MnSOD* gene from the parasite *Onchocerca volvulus* (Henkle et al., 1995) and the *FeSOD* gene from the protist *Perkinsus marinus* (Schott et al., 2003). An adenine necessary for intron splicing by the spliceosome is located five to eleven nucleotides upstream of the 3' splice junction of all the introns. Intron three is the largest (1012 and 858 bp, respectively for *cMnSOD1* and *cMnSOD2*), contains homopolymeric sequences and is the most divergent (Table 2) with 20-30% GC, while the exons are

conserved among the three genes and have higher GC content (40-50%). The *cMnSOD3* gene is intron-less, suggesting that it is probably the result of a retrotransposition event in which, a spliced cDNA was reverse-transcribed and inserted into the genome. It has been suggested that a bias in synonymous codon usage may be useful in identifying highly or lowly expressed genes (Stenico et al., 1994; Gupta et al., 2005; Jia and Li, 2005) but no significant differences were found in codon usage between the three genes. In all the cases, the deduced polypeptide is 287 amino acid long with the same predicted molecular weight of 24.5 kDa for the mature protein and small predicted pI differences (6.09, 6.04 and 6.17, for *cMnSOD1*, *cMnSOD2* and *cMnSOD3*, respectively). The deduced amino acid sequence comparison showed 96% identity with cMnSOD from the shrimp *P. monodon* (GenBank [AAW50395](#)), 79% with that of *M. rosenbergii* (GenBank [AAV79405](#)), and 78% with the blue crab *C. sapidus* (GenBank [AAF74771](#)).

To find potential promoter and regulatory regions for the *cMnSOD* gene, a fragment of 995 bp upstream the Met initiation codon was amplified using inverse PCR from genomic DNA digested with *HindIII* and sequenced. Only one *HindIII* site was present in this sequence, indicating a proper circularization of a single genomic DNA fragment. Analysis of the sequence identified part of the 5' and 3'UTRs obtained previously from the complete cDNA that correspond to the transcript of the *cMnSOD2* gene (Gómez-Anduro et al., submitted). Only 14 nucleotides are identical to the 5'UTR (upstream the initiator ATG (Met)) and 289 bp correspond to the 3'UTR downstream the stop codon determined from the cDNA sequence, where exactly the *HindIII* site is present, confirming a *bona fide* fragment adjacent to the gene; however the sequence beyond the

14 bp flanking the 5'-coding region is different. Further analysis predicted an enhancer region and two transcription factor binding sites in this 995 bp using an algorithm to detect consensus sequences for vertebrates transcription factors (Prestridge, 1991). Putative enhancer is found in positions -531 a second weak enhancer was found in the second intron this might be similar similar to the human mMnSOD gene that contains an enhancer in the second intron (St-Clair et al., 2002). Putative transcription factors binding sites for AP-2, (known to repress) (Xu et al., 2002) and NF κ B, (to induce) human mMnSOD expression were in positions -783 and -821 (are indicated in the supplementary material, fig. 6). No clear putative promoter was found in this region and therefore, we tried to identify other features in this region. Since the base composition is 38% GC, close to the data for introns, it is possible that this is an intron in the 5'-UTR of the gene. Moreover, 15 pb upstream the ATG (starting methionine) there is an AG, that might correspond to a 3' intron-boundary, with the 5'- splice site further upstream the sequenced region (Henkle et al., 1995; Schott et al., 2003); a report of the two introns in the 5'-UTR of the 5HT gene from the shrimp *Metapenaeus ensis* recently available (Tiu et al., 2005).

3.2 Structural analysis of cMnSOD sequence.

The predicted amino acid alignment for the three genes is shown in Figure 2. Amino acids responsible for binding manganese are all conserved and found in the following positions: His-115, His-159, Asp-244 and His-248 in comparison with human cMnSOD (Hearn et al., 2001). Only three differences in amino acids were found among the three

genes (Fig. 2) and only one change was found in each gene. A change in Pro 174 to Leu in *cMnSOD2*, Glu 273 to Gly in *cMnSOD3* and Tyr 278 to His in *cMnSOD1*; however, there are no reports that these amino acid have a critical role for structure or catalysis of the MnSOD protein (Hearn et al., 2001; Hearn et al., 2003).

To gain further insights about the deduced amino acid sequence and to predict the effect of the differences between *MnSOD1*, *MnSOD2* and *MnSOD3*, a homology model was constructed using the human MnSOD as a template (Borgstahl et al., 1992). The structural model of crustacean cytosolic MnSOD was very similar and no important structural conflicts were found for folding assignment (Fig. 3, panel A). The cMnSOD structure is predicted to be comprised of seven α -helices and three antiparallel β -sheets, considering that the mature N-terminus was assumed at residue 86. The main feature of the model is the conservation of the histidines at the active site and the proper coordination of the prosthetic group by invariant residues H115, H159, H248 and D244 (Figure 3, panel B). A water molecule is predicted to occupy the fifth-coordination position, since no structural conflict interferes in the theoretical model. Although structure modeling must be confirmed by experimental structural determination, it appears that the changes in *cMnSOD2* and *cMnSOD3* do not interfere with the overall folding. For example, the P174L change in *cMnSOD2*, is located in a non-structured loop and the leucine can accommodate the turn. The change present in *cMnSOD1*, Y278H, is likely to have a more subtle effect, since it possibly disrupts a hydrophobic interaction between the tyrosine and Y213 and a helix from a symmetry related monomer. All these single-site residue changes may lead to slight differences of the gene products, such as

pK, optimal pH, stability or marginal changes in kinetic properties. All these hypotheses must be tested experimentally; but nonetheless, the overall fold and structure appears to be highly conserved from crustacean to humans.

3.3 Differential gene expression

The complete cDNA sequence and the detection of the transcripts in hemocytes, heart, hepatopancreas, intestine, nervous system, muscle, gills and pleopods was previously reported (Gómez-Anduro et al., submitted). The identification of several genes for the shrimp cMnSOD, prompted us to investigate tissue specific expression, as SOD genes have been shown to be differentially regulated; for example, the maize mitochondrial MnSOD are spatially and developmentally regulated (Zhu and Scandalios, 1993) and a MnSOD from *Candida albicans* called *SOD3* is strongly stimulated upon the entry and stationary phase, while *SOD1* is repressed (Lamarre et al., 2001).

We analysed by RT-PCR gills, pleopods, nervous system, intestine, heart, hepatopancreas and hemocytes using gene-specific primers in conditions that were optimized with specific clones (Fig. 4, panel A) to amplify only the appropriate cDNA. Specific expression of *cMnSOD1* was found in the nervous system, while *cMnSOD2* was highly expressed in hepatopancreas and hemocytes. No PCR product for any of the three cMnSOD genes herein characterized was found in gills, pleopods, intestine and heart cDNA, although the RT-PCR product was clearly detected with the primer that amplify the three genes (Fig. 4, panel B). The intensity of the bands produced with the cMnSODs primers suggests the existence of at least another cMnSOD gene, indicating the need for

these antioxidant proteins in these very active metabolic tissues and remains to be investigated.

Mutations can have different effects on protein functions, depending on their mapping sites respect to active, contact or interaction sites. A dramatic example of isozymes with different localizations are the adenylate kinases. In humans, the cytosolic, mitochondrial matrix and mitochondrial intermembrane space enzymes are 30% similar, have a structural root mean deviation (RMSD) of 2 Å and in the central core of 0.9 Å RMSD (Schlauderer and Schulz, 1996). More related to SODs, a mutation in an active-site histidine residue H30N, which disrupts the hydrogen-bond network at the active site and drops 5-fold the catalytic efficiency, show only a 0.56 Å RMSD vs the wild-type structure (Ramilo et al., 1999). Additionally, it must be considered that 85 residues of the N-terminus are missing and they may be key for regulation of expression and the postulated dimerization found in the crustacean cMnSODs. Future experimental work will reveal the role and function of these sequences in terms of the high conservation of the core sequences that involve the dismutase enzymatic activity.

In summary, to our knowledge, this is the first report of a crustacean family of cMnSOD genes. They were found coded by at least three genes, one intron-less and the other two interrupted by multiple introns and have differential-tissue expression. The high conservation at the amino acid sequence strongly supports the predicted three-dimensional model and the invariant residues required for metal coordination suggest that the gene product is a Mn-bound protein. The study of regulation of the expression of crustacean SOD will likely reveal very interesting features about promoters and other

regulatory elements. This knowledge is essential for the development of reporter systems and expression vectors.

Acknowledgements

This work was financed by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México Grants 36926 and 45964. We thank Dr. Jorge Hernández for providing the experimental shrimp, José Guadalupe Soñanes and Chrystian Mariana Rodríguez for technical help. We are grateful to Dr. Carolina Barillas-Mury (Laboratory of Malaria and Vector Research, NIAID NIH), for helpful suggestions and critical reading of the manuscript.

REFERENCES

- Altschull, S.F., Gisha, W., Millerb, W., Meyerse, E.W. and Lipmana, D.J., 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215, 403-410.
- Amo, T., Atomi, H. and Imanaka, T., 2003. Biochemical properties and regulated gene expression of the superoxide dismutase from the facultatively aerobic hyperthermophile *Pyrobaculum calidifontis*. *J. Bacteriol.* 185, 6340–6347.
- Atzenhofer, W., Regelsberger, G., Jacob, U., Peschek, G.A., Furtmuller, P.G., Huber, R. and Obinger, C., 2002. The 2.0 Å resolution structure of the catalytic portion of a cyanobacterial membrane-bound manganese superoxide dismutase. *J Mol Biol* 321 479–489.
- Borgstahl, G., Parge, H., Hickey, M., Beyer, W., Hallewell, R., Jr and Tainer, J., 1992. The structure of human mitochondrial manganese superoxide dismutase reveals a novel tetrameric interface of two 4-helix bundles. *Cell* 71, 107-118.
- Bradfield, J. and Wyatt, G.: X-linkage of a vitellogenin gene in *Locusta migratoria*, 1983. *Chrom* 88, 190-193.
- Brouwer, M., Brouwer, T.H., Grater, W., Enghild, J.J. and Thogersen, I.B., 1997. The paradigm that all oxygen-respiring eukaryotes have cytosolic CuZn-superoxide dismutase and that Mn-superoxide dismutase is localized to the mitochondria does not apply to a large group of marine arthropods. *Biochem.* 36, 13381-13388.
- Brouwer, M., Hoexum Brouwer, T., Grater, W. and Brown-Peterson, N., 2003. Replacement of a cytosolic copper/zinc superoxide dismutase by a novel cytosolic manganese superoxide dismutase in crustaceans that use copper (haemocyanin) for oxygen transport. *Biochem. J.* 374, 219-228.
- Cheng, W., Tung, Y.S., Liu, C.-H. and Chen, J.C., 2006. Molecular cloning and characterisation of cytosolic manganese superoxide dismutase (cytMn-SOD) from the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Fish Shellfish Immunol*, 20, 438-449.
- Esnouf, R.M., 1999. Further additions to MolScript version 1.4, including reading and contouring of electron-density maps. *Acta Crystallographica*. D55, 938-940.

- Gómez-Anduro, G.A., Barillas-Mury, C.V., Peregrino-Uriarte, A.B., Gupta, L., Gollas-Galván, T., Hernández-López, J. and Yepiz-Plascencia, G.M.: 2006. The cytosolic manganese superoxide dismutase from the shrimp *Litopenaeus vannamei*: molecular cloning and expression. *Dev. Comp. Immunol.* (submitted).
- Gupta, S., Banerjee, T., Basak, S., Sahu, K., Sau, S. and Ghosh, T., 2005. Studies on codon usage in *Thermoplasma acidophilum* and its possible implications on the occurrences of lateral gene transfer. *J. Basic Microbiol.* 45, 344-54.
- Hallewell, R., Masiarz, F., Najarian, R., Puma, J., Quiroga, M., Randolph, A., Sanchez-Pescador, R., Scandella, C., Smith, B., Steimer, K. and Mullenbach, G., 1985. Human Cu/Zn superoxide dismutase cDNA: isolation of clones synthesizing high levels of active or inactive enzyme from an expression library. *Nucleic Acids Res.* 13, 2017-2034.
- Hearn, A.S., Stroupe, M.E., Cabelli, D.E., Lepock, J.R., Tainer, J.A., Nick, H.S. and Silverman, D.N., 2001. Kinetic analysis of product inhibition in human manganese superoxide dismutase. *Biochem.* 40, 12051-12058.
- Hearn, A.S., Stroupe, M.E., Cabelli, D.E., Ramilo, C.A., Luba, J.P., Tainer, J.A., Nick, H.S. and Silverman, D.N., 2003. Catalytic and structural effects of amino acid substitution at histidine 30 in human manganese superoxide dismutase: Insertion of valine C gamma into the substrate access channel. *Biochem.* 42, 2781-2789.
- Henkle, D.K., Tawe, W., Warnecke, C. and Walter, R.D., 1995. Characterization of the manganese superoxide dismutase cDNA and gene from the human parasite *Onchocerca volvulus*. *Biochem. J.* 308, 441-446.
- Jia, M. and Li, Y., 2005. The relationship among gene expression, folding free energy and codon usage bias in *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* 579, 5333-5337.
- Kim, F., Kim, H., Hah, Y. and Roe, J., 1996. Differential expression of superoxide dismutases containing Ni and Fe/Zn in *Streptomyces coelicolor*. *Eur. J. Biochem.* 241, 178-185.
- Lamarre, C., LeMay, J.-D., Deslauriers, N.L. and Bourbonnais, Y., 2001. *Candida albicans* expresses an unusual cytoplasmic manganese containing superoxide

- dismutase (SOD3 Gene Product) upon the entry and during the stationary phase. *J. Biol. Chem.* 276, 43784–43791.
- Merritt, E. and Bacon, D., 1997. Raster3D: Photorealistic molecular graphics. *Methods Enzymol.* 277, 505-524.
- Murshudov, G., Vagin, A. and Dodson, E., 1997. Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta Crystallogr. Biol. Crystallogr.* 53(D), 240-255.
- Ochman, H., Gerber, A.S. and Hart, D.L., 1988. Genetic applications of an inverse polymerase chain reaction. *Genetics.* 120, 621-623.
- Pipe, R., Porte, C. and Livingstone, D., 1993. Antioxidant enzymes associated with the blood cells and haemolymph of the mussel *Mytilus edulis*. *Fish Shellfish Immunol.* 3, 221-233.
- Potterton, E., McNicholas, S., Krissinel, E., Cowtan, K. and Noble, M., 2002. The CCP4 molecular-graphics project. *Acta Crystallogr. Biol. Crystallogr.* 58 (D), 1955-1957.
- Prestridge, D., 1991. SIGNAL SCAN: A computer program that scans DNA sequences for eukaryotic transcriptional elements. *CABIOS.* 7, 203-206.
- Ramilo, C., Leveque, V., Guan, Y., Lepock, J., Tainer, J., Nick, H. and Silverman, D., 1999. Interrupting the hydrogen bond network at the active site of human manganese superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* 274, 27711-27716.
- Sambrook, J., Fritsch, E. and Maniatis, T., 1989. *Molecular cloning: A Laboratory Manual.*, Cold Spring Harbor, New York, NY, USA.
- Schlauderer, G. and Schulz, G., 1996. The structure of bovine mitochondrial adenylate kinase: Comparison with isoenzymes in other compartments. *Prot. Sci.* 5, 434-441.
- Schott, E.J., Robledo, J.A., Wright, A.C., Silva, A.M. and Vasta, G.R., 2003. Gene organization and homology modeling of two iron superoxide dismutases of the early branching protist *Perkinsus marinus*. *Gene.* 309, 1-9.
- Schwede, T., Kopp, J., Guex, N. and Peitsch, M., 2003. SWISS-MODEL: an automated protein homology-modeling server. *Nucleic Acids Res.* 31, 3381-3385.

- St-Clair, D., Porntadavity, S., Xu, Y. and Kiningham, K., 2002. Transcription regulation of human manganese superoxide dismutase gene. *Methods Enzymol.* 349, 306-312.
- Stenico, M., Lloyd, A. and Sharp, P., 1994. Codon usage in *Caenorhabditis elegans*: Delineation of translational selection and mutational biases. *Nucleic Acids Res.* 22, 2437-2446.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G. and Gibson, T.J., 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22, 4673-4680.
- Tiu, S.H., He, J.-G. and Chan, S.-M., 2005. Organization and expression study of the shrimp (*Metapenaeus ensis*) putative 5-HT receptor: Up-regulation in the brain by 5-HT. *Gene.* 353, 41 – 52.
- Winn, M., 2003. An overview of the CCP4 project in protein crystallography: An example of a collaborative project. *J. Synchrotron Radiat.* 10, 23-25.
- Xu, Y., Porntadavity, S. and St Clair, D.K., 2002. Transcriptional regulation of the human manganese superoxide dismutase gene: The role of specificity protein 1 (Sp1) and activating protein-2 (AP-2). *Biochem. J.* 362, 401-412.
- Youn, H.-D., Kim, E.J., Roe, J.H., Hah, Y.C. and Kang, S.O., 1996. A novel nickel-containing superoxide dismutase from *Streptomyces spp.* *Biochem. J.* 318, 889-896.
- Zhu, D. and Scandalios, J.G., 1993. Maize mitochondrial manganese superoxide dismutase are encoded by a differentially expressed multigene family. *Proc Natl Acad Sci USA* 90 9310-9314.

- St-Clair, D., Porntadavity, S., Xu, Y. and Kinningham, K., 2002. Transcription regulation of human manganese superoxide dismutase gene. *Methods Enzymol.* 349, 306-312.
- Stenico, M., Lloyd, A. and Sharp, P., 1994. Codon usage in *Caenorhabditis elegans*: Delineation of translational selection and mutational biases. *Nucleic Acids Res.* 22, 2437-2446.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G. and Gibson, T.J., 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22, 4673-4680.
- Tiu, S.H., He, J.-G. and Chan, S.-M., 2005. Organization and expression study of the shrimp (*Metapenaeus ensis*) putative 5-HT receptor: Up-regulation in the brain by 5-HT. *Gene.* 353, 41 – 52.
- Winn, M., 2003. An overview of the CCP4 project in protein crystallography: An example of a collaborative project. *J. Synchrotron Radiat.* 10, 23-25.
- Xu, Y., Porntadavity, S. and St Clair, D.K., 2002. Transcriptional regulation of the human manganese superoxide dismutase gene: The role of specificity protein 1 (Sp1) and activating protein-2 (AP-2). *Biochem. J.* 362, 401-412.
- Youn, H.-D., Kim, E.J., Roe, J.H., Hah, Y.C. and Kang, S.O., 1996. A novel nickel-containing superoxide dismutase from *Streptomyces spp.* *Biochem. J.* 318, 889-896.
- Zhu, D. and Scandalios, J.G., 1993. Maize mitochondrial manganese superoxide dismutase are encoded by a differentially expressed multigene family. *Proc Natl Acad Sci USA* 90 9310-9314.

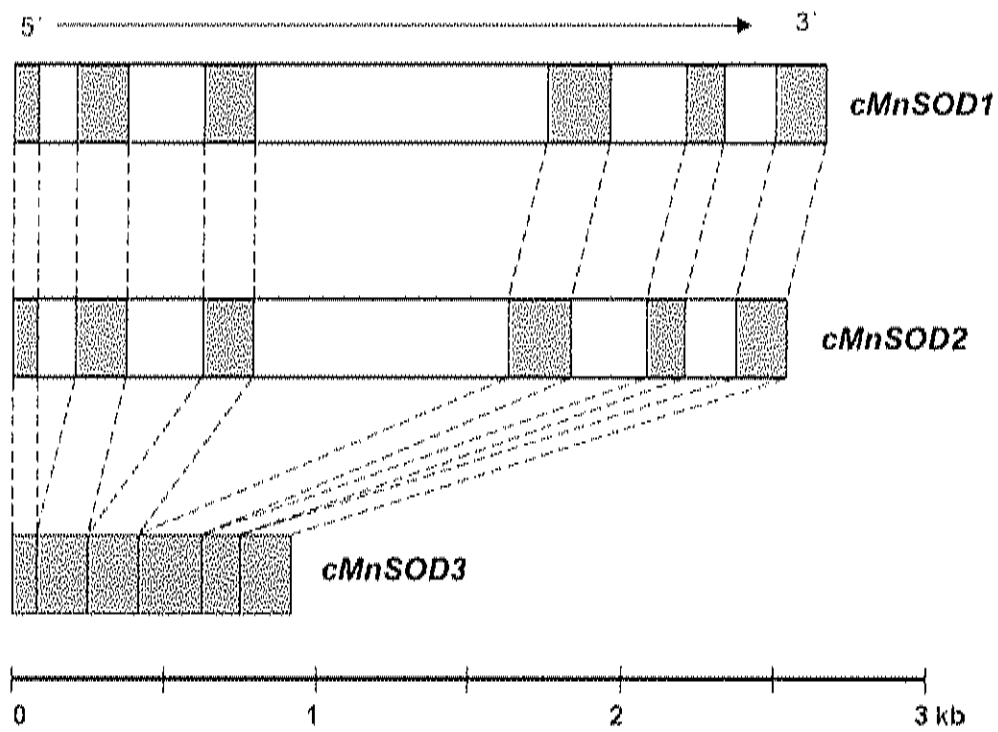


Fig. 1. Gene organization of the cMnSOD genes from the shrimp *L. vannamei*. The grey boxes indicate exons, while the white boxes designate the introns.

```

cMnSOD1 1 MAEAREAYISLLEKKLAELTGLIEVDQIKKNQFANAADAEVAIREMASYVEGIVVQQAGVA
cMnSOD2 1 MAEAREAYISLLEKKLAELTGLIEVDQIKKNQFANAADAEVAIREMASYVEGIVVQQAGVA
cMnSOD3 1 MAEAREAYISLLEKKLAELTGLIEVDQIKKNQFANAADAEVAIREMASYVEGIVVQQAGVA

cMnSOD1 61 QAGTVSPQIAQMPFAHINAELGSEERGAHALPPLKYDFNALEPHISGMIMETIHTTRHHQGYI
cMnSOD2 61 QAGTVSPQIAQMPFAHINAELGSEERGAHALPPLKYDFNALEPHISGMIMETIHTTRHHQGYI
cMnSOD3 61 QAGTVSPQIAQMPFAHINAELGSEERGAHALPPLKYDFNALEPHISGMIMETIHTTRHHQGYI
mMnSOD 1 -----NHSLPDLFYDSSGALEPHI*QIM*QHH*QHH*QHY*
SS TTTTTTTTTHHH HHHHTHHHHH

cMnSOD1 121 NNLI*AATKILVEEAFAANDV*SAMNALLPAIKFNGGGHLNHTYFWTNMAPDAGGE*PQAVAC
cMnSOD2 121 NNLI*AATKILVEEAFAANDV*SAMNALLPAIKFNGGGHLNHTYFWTNMAPDAGGE*PQAVAC
cMnSOD3 121 NNLI*AATKILVEEAFAANDV*SAMNALLPAIKFNGGGHLNHTYFWTNMAPDAGGE*PQAVAC
mMnSOD 36 NNLYVTEELVQEAFLKEDY*LAG*AL*PAIK*NGGGH*NH*IFW*TN*MAP*DAGGE*PQAVAC
HHHHHHHHHHHHHHHTT HHHHHHHHTHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHTTT S SHHH

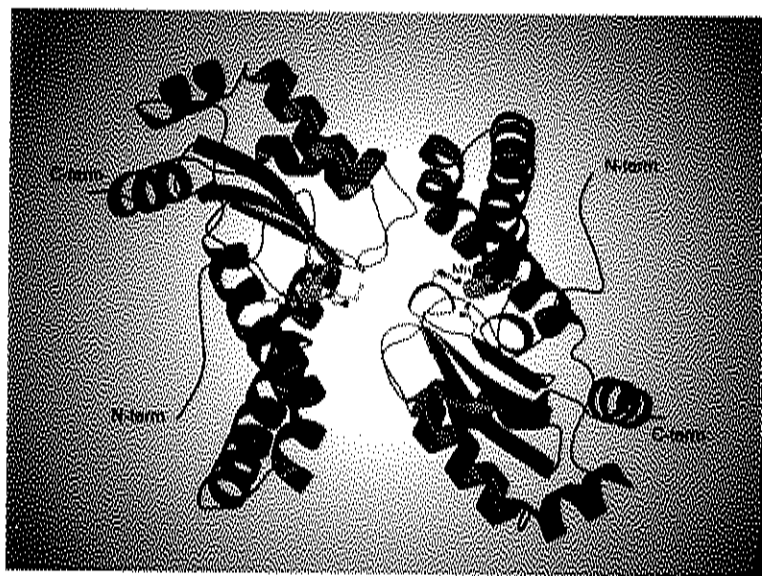
cMnSOD1 181 AIDSEFGSFGSFDK*FSAASVGVKGSQGWLG*YCPNQN*LEIAT*CONQD*PLQIT*HGLVPL
cMnSOD2 181 AIDSEFGSFGSFDK*FSAASVGVKGSQGWLG*YCPNQN*LEIAT*CONQD*PLQIT*HGLVPL
cMnSOD3 181 AIDSEFGSFGSFDK*FSAASVGVKGSQGWLG*YCPNQN*LEIAT*CONQD*PLQIT*HGLVPL
mMnSOD 96 ATRR*FGSFGSFDK*FSAASVGVKGSQGWLG*YCPNQN*LEIAT*CONQD*PLQIT*HGLVPL
RRHHHTTTHHHHHHHHHHHHHH SSSSEEEEEETTTTTEEEEEETT HHHHH EE

cMnSOD1 241 LGLD*VWEHAYYLQYK*NLRADYV*KAF*FNVINWEN*VNER*YENARK*NAGH
cMnSOD2 241 LGLD*VWEHAYYLQYK*NLRADYV*KAF*FNVINWEN*VNER*YENARK*NAGH
cMnSOD3 241 LGLD*VWEHAYYLQYK*NLRADYV*KAF*FNVINWEN*VNER*YENARK*NAGH
mMnSOD 156 LGLD*VWEHAYYLQYK*NLRADYV*KAF*FNVINWEN*VNER*YENARK*NAGH
EEEE SGGCTTHHHHTTTTHHHHHHHHTTSB HHHHHHHHTT

```

Fig. 2. Alignment of the predicted amino acid sequences of the cMnSOD genes from *L. vannamei* and mitochondrial human MnSOD. The catalytic amino acids of the shrimp cMnSOD are indicated with asterisks. The aligned sequences are: cMnSOD1, cMnSOD2 and cMnSOD3 from *L. vannamei* and mMnSOD amino acid sequence of the mature mitochondrial MnSOD from *Homo sapiens* (GenBank [P04179](#)). The black shaded regions represent identical amino acids among the different sources, while the gray shaded regions represent conservative replacements. Secondary structure was assigned from the crystallographic structure of human mMnSOD (PDB [1VAR](#)) and is reported as a single letter code. The assignments are: H=helix; B=residue in isolated beta bridge; E=extended beta strand; G=3₁₀ helix; I=π helix; T=hydrogen bonded turn; S=bend .

A)



B)

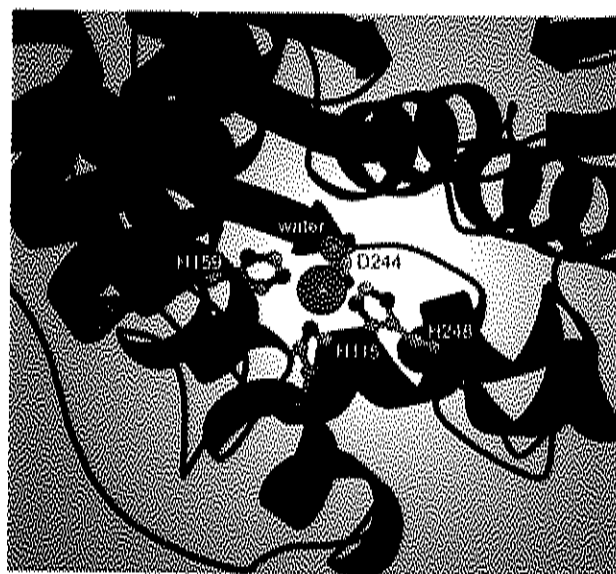


Fig. 3. Molecular modeling of cMnSOD from shrimp *L. vannamei*. Panel A: Representation of the homodimer and the Mn-metal cofactors, N-terminus starts at residue 86 and C-terminus ends at residue 283. Panel B: Representation of the active site with the metal cofactor coordinated by invariant His and Asp residues. Numbering is from the crustacean predicted protein.

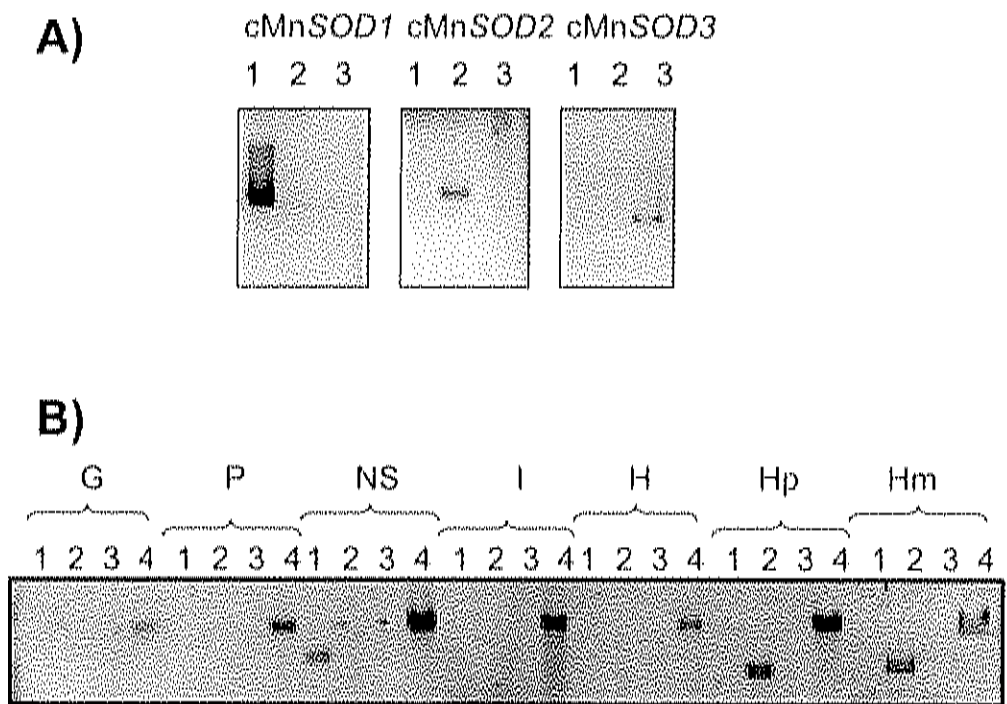


Fig. 4. Shrimp cMnSOD gene-specific-tissue expression. Panel A: Detection of gene-specific PCR products by optimized amplification conditions using purified clones with primers pairs 1, 2 and 3 for *cMnSOD1*, *cMnSOD2* and *cMnSOD3*, respectively. Panel B: Differential expression of cMnSOD transcripts in seven tissues. Number one, two and three are specific expression of *cMnSOD1*, *cMnSOD2* and *cMnSOD3*; number four is a control for expression of all the three cMnSODs genes, G is gills, P is pleopods, NS is nervous system, I is intestine, H is heart, Hp is hepatopancreas and Hm is hemocytes.

1 M A E A K R A Y Y S I L E R K L A E L T Q I E V D Q I R E N
1 ATGGCTGAGGCAAGGAGAGCTTACATCTCCATCCCTGGAGAAAGTTAGCTGAGCTGACTGGAAATGAGGTTGATTCAGATCAAGAAAGAT
11 Q
91 CAGtaagtggtatgallatacctcttgcattctcgaatgcaagattctgagaccctctcttctagaagggaattgcaagaccatctctctctct
12 P A H A A D E A V A I R E M A S Y V
181 ct,aaaaacctglat,caaaact,laggtatazattt,lcagttcccaaaatgcagcagatgaggctctgcccacccgctgagatggcttcatfacct
59 R G I V V Q Q A S V A Q A G T V S P Q I A Q M P A H I N A S
271 AGAAGGTATTCTGTACAGCAGGCTGGTGTCTCAGGCTGCGACAGTCTAGTCTCTCAGATTGCACAGATGTTTGCCTCATATCAATGCTTGA
80 L
361 ATTGGtaagtgtaaacctggagacct,ctt,caaaaaactgaagaatctggtaattgctgtaaatctggcaaatctggccatgctgatgctogaaggtctcaatag
451 aacctgtagaattctctcclaaagctatactctctctgggctgggtaaatcagattct
81 G H E
541 catgtgcatgaagaactcaagtgctgact
84 R G A H A L P P L K Y D F M A L E S P H I S G M I M E I H R T
631 cgaagctgctcaatgcttttgcacacctcaastatgattttcaacgaccttgaacctcagatctcgggcatgatcagatggagatccacacacac
114 K H H Q G Y I N H L I A A T K R
721 AAGCATCACACAGGCTACATTAACAACTTAATTTGCCCTTACAGAAAGgttaggcactctggggaactctcgaagacatctagtgcaactctla
811 gcccctagtagatggaatctctcaatgtagctctgcaataatagccacacct
991 gcttgcctgggtct
991 aattct
1081 tcaataaggtgagtgtaggtaactctgatactcgaagaatggtctgatact
1171 tgaagaatctgctgtagcct
1261 tgcct
1381 ctctgatactgctctctcaaatgggacctctcaaaagggggggagacacact
1441 aaaaactctgctgagct
1531 tct
1621 tgaatggctcagataagactgagccagctgggttaactcatgtctcccccct
110 L V E A E A A
1711 tcaattgtaaaaaactgagaggaatctgaacgaacaaaggggaaagctcaaaaggaacctctctctctctctctctctctctctctctctctctct
137 H D V S A M N A L L P A J K P N G G G H L N H T J F W T N M
1861 ccaatgacgttaagcgaatggaatgacct
167 A P D A G G E P Q G A V A Q A I D E S P Q S P Q S P K
1891 ggcctcccaatgct
1981 ctctg
2071 aatcaatcaaaaatgctg
194 D R F S A A S V G V K G S G W Q W L G Y C P
2161 agtataatct
216 R Q H K L E J A T C Q M Q D P L Q I T H
2251 ATGAAACAAAGCTTGGATTCGCCACTTGGCAAAACAGGATTCCTTGCAAATCACTCAAGgttaaatcaatagactcaatctctgtaactgat.
2341 tgcgaatcaggaaaaatctggtaattctgattct
236 G L V P L L G L D V W E H A Y Y L Q
2411 atcatatgcaaacattatctgct
253 Y K H L R A D Y V K A P P N V I H W E R V N E R H E N A R K
2521 GTACAAGAACTCCGTGCAGATTACGTGAAGGCTCTCTCAATGTCATTAACTGGGAGAACGTAATGAGGCTCATGACAAATGCTCTTAA
283 H A G H A
2611 GAAATGCAGGTCATTTGA

Fig. 5. *cMnSOD1* nucleotide and deduced aminoacid sequence. Capital letters indicate exons and small letters are introns, the asterisk is the stop codon.


```

1  M A E A R E E A Y I S I L E K K L A E L T G I R V D Q Y R K H
1  ATGGCTGAGGCAAAAGGAAGCTTACATCTCCATCCTGGAGNAGAAGTTAGCTGAGCTGACTGGAAATGGAGGTGGATCAGATCAAGAAGAAT
31  Q F A N A A D E A V A I P E M A S Y V E G I V V Q Q A G V A
91  CAGTTCCCAAAATGCAGCAGATGAGGGCTGTCCCATCCGTGAGATGCGCTTCATACGTTAGAGGGTATTTCTCGTACAGCCAGGCTGGTGTTCCT
61  Q A G T V S P Q I A Q M F A H I N A E L G E E R G A H A L P
181  CAGGCTGGCACAGTCACTCCACATGGCACAGATGTTTGGCCATATCAATGCTGAATGGGTGAGGAAAGAGGTGCTCATGCTTTGCCA
91  P L R Y D P N A L E P H I S Q M I M E I H R T K H H Q Q Y I
271  CCTCTCAAGTATGATTTCAAGCCCTTGAACCTCAATCTCCGATGATCATGGAGATCCACCCACACAAAAGCATCACCCAGGCTACATT
121  N N L I A A T K K L V K A K A A H D V S A R N A L L P A I E
161  AACAACTTAATTCGCCCTACGAAAGATTTGGTTGAGGCGAGGCAAGCCAAATGACCTAAGCGCAATGAAATGCCCTTCTACCAAGCTATCAAG
151  F N G Q Q H L P H T I P W T H M A P D A Q G E F Q S A V A Q
451  TTCATGGAGGCGCCACTTGAACCAACCATCTTCTGGACCAACATGCGTCCCGATGCTGGTGGCGAGCCGCAAGGAGCTGTTCACAAA
181  A I D E S P Q S F Q S E K D K P S A A S V G V E G S G W G W
541  GCCATTGACGAGAGCTTTGGATCATTTCAATCCCTCAAGGACAAATTTCTGCTGCCAGGCTTGGAGTGAAGAAGCTCTGCTGGGATGG
211  L G Y C P N Q N K L E I A T C Q N Q D P L Q I T H G L V P L
621  CTCGGCTATTGCCCAATCAGAACAGCTTGAGATGCCCACTTGCACAGAACAGGATCCCTTGCAAATCACTCAAGGACTGGTTCCGTTG
241  L G L D V W E H A Y Y L Q Y E N L R A D Y V R A P F N V I R
721  CTTGGCTTGCAGTCTGGGAGCATGCTTACTACCTTCAATACAGAACTCCGTCAGATTAAGTGAAGGCTTCTTCAATGCTATTAAC
271  W G N V H E R Y E N A R K N A Q H *
811  TGGGGAAAGCTGAATGAGCCTTATGAGAAATGCTGCTAAGAAATGCAGGTCATTGA

```

Fig. 7. *eMmSOD3* nucleotide and deduced aminoacid sequence. The asterisk indicates the stop codon.

Table 1. Name, sequence and position of the primers in the MnSOD cDNA sequence

Primer name	Sequence (5' - 3')	cDNA [#] position (nt)
cMnSODF	ATGGCTGAGGCAAAGGAAGCTTAC	1-24
cMnSODR	CAATGACCTGCATTCTTACGAG	864-842
cMnSODF1	CTCATGCTTTGCCACCC	257-273
cMnSODF2	TAACAACCTAATTGCCGCTACA	360-381
cMnSODF3	TGCTCATGCTTTGCCACCT	255-273
cMnSODF4	CTCGTAAGAATGCAGGTCATTG	842-864
cMnSODR1	CATGACGCTCATTACGTTCT	835-815
cMnSODR2	CTCATAACGCTCATTACGTTCT	837-815
cMnSODR3	CATAACGCTCATTACGTTCC	835-815
cMnSODR4	AGTGTAAGCTTCCTTTGCCTCAGC	27-4
cMnSODF5	CTCGTAAGAATGCAGGTCATTG	24-1
cMnSODR5	AGTGTAAGCTTCCTTTGCCTCAGC	842-864

[#] from Gómez-Anduro et al, submitted

Table 2. Characteristics from *cMnSOD1* and *cMnSOD2* genes

Exon-Intron number	<i>cMnSOD1</i>	<i>cMnSOD2</i>	Identity %
	Length in bp and GC content (%)		
Exon 1	93 (46)	93 (46)	100
Exon 2	148 (51)	148 (51)	100
Exon 3	146 (50)	146 (49)	98
Exon 4	192 (54)	192 (54)	98
Exon 5	127 (54)	127 (54)	100
Exon 6	158 (48)	158 (48)	98
Intron 1	124 (30)	127 (28)	92
Intron 2	257 (35)	256 (33)	90
Intron 3	1012 (40)	858 (40)	79
Intron 4	211 (36)	210 (35)	99
Intron 5	158 (30)	158 (30)	100

APÉNDICE I

Comparación de las secuencias nucleotídicas de los 3 genes. En mayúscula y cursiva la región obtenida por PCR inversa, en mayúscula y negrita la región correspondiente a exón y en minúscula lo correspondiente a intrón, los asteriscos indican nucleótidos idénticos.

cMnSOD1	
cMnSOD2	- 995 <i>ATATTAAACCAGTCCCTCAATGACAGATAGTTACAGCTATGGCTGGCTTGGTTATGOC</i> TTT
cMnSOD3	
cMnSOD1	
cMnSOD2	- 935 <i>GCAATTACAAGCTATTCCGTGCATGGCTAAAATTAGCTGCAGCTAGAGAGAAAGGCTCATT</i> C
cMnSOD3	
cMnSOD1	
cMnSOD2	- 875 <i>AGGGTCTTCGTTAGATACCCTTTAAGGCCACATGTCAAATCTATTGGGGGATTCGCTGAGG</i>
cMnSOD3	
cMnSOD1	
cMnSOD2	- 815 <i>GACAATAGGTGGTGTGCATGGCTCTGATTTGGGGATTTTATAGAAAATAGGGCAATA</i> TTTAGCT
cMnSOD3	
cMnSOD1	
cMnSOD2	- 755 <i>CATAATTTATTAACCTGCTTTCCCTTAAAGGTAAACACACTGAAAAATTTTCACTCTTG</i>
cMnSOD3	
cMnSOD1	
cMnSOD2	- 695 <i>CTGCTGGGGTGAACCTGTAGGTAAC</i> TTTTCGCAATAGTTTTCATGATCAGTCTCTCAATT
cMnSOD3	
cMnSOD1	
cMnSOD2	- 635 <i>CAACTAGGGACATAAGCAACCGTCTTGAAATATGACACGGAAAGGGAACTACTCAAGCTGT</i>
cMnSOD3	
cMnSOD1	
cMnSOD2	- 575 <i>GAGAGTAGCAGCCCTGCTTTGCTGCA</i> TACAATCTCTTACATGAGACTAAGGTTTGGGAAA
cMnSOD3	
cMnSOD1	
cMnSOD2	- 515 <i>CAAAA</i> CTTGTCTTGTTTTATCCACAAATTCATTCATCTTTACACAGAGCATAACA
cMnSOD3	
cMnSOD1	
cMnSOD2	- 455 <i>CCCAAATTTAT</i> TGAGATGGTCTAACTTACAAGAGTAGGCTTCAATAAGGTTCAATCCAACT
cMnSOD3	
cMnSOD1	
cMnSOD2	- 395 <i>GAAA</i> TTGATGTCAAAACCTCTCAATATGCTGTACTATTAATCTTGGTTTGGATACCAAATAA
cMnSOD3	
cMnSOD1	
cMnSOD2	- 335 <i>TT</i> CAAAAAGAAAATAAGTTGGTAAAGCATGTCAAGAGTGATATGCCAAGTTGGAAATAGGA
cMnSOD3	
cMnSOD1	
cMnSOD2	- 275 <i>TCAGGAGGCAAA</i> CCCACTCAGCTGTAAAATACCCCTTGGAGTAGAATCCAAGCACACTGCCAA
cMnSOD3	

cMnSOD1
cMnSOD2 -215 ATTCTCCCTGGAGGCCAATTGGGTTGATTATTGTAAAACCTGTTGATGTTACTTCCCAJGCT
cMnSOD3

cMnSOD1
cMnSOD2 -155 CAATCAATTGTCACCCCAAAGTTCCTGGTAGATGTAGTGAAGGTTCTTCAJACCTAGAAAA
cMnSOD3

cMnSOD1
cMnSOD2 -95 TGTATCACTAAGTATTGATTTTGAAAAGTTTGTCAJAAATTGGAAGAGAAACATTAATT
cMnSOD3

cMnSOD1 1 ATGGCTGAGGCCAAGGAAGCTTACA
cMnSOD2 -35 ACATTTTAAATGTTTCAGGAATAAGTAAAATC*****
cMnSOD3 1 *****

cMnSOD1 26 TCTCCATCCTGGAGAAGAAGTTAGCTGAGCTGACTGGAATTGAGGTGGATCAGATCAAGA
cMnSOD2 26 *****
cMnSOD3 26 *****

cMnSOD1 86 AGAATCAGgtaagtggtatgatattatltttgcatctctgaaatgacagaaatttgagacccta
cMnSOD2 86 *****a*****c*****a*****
cMnSOD3 86 *****

cMnSOD1 146 ttttagaagggaaattgacagatccata ttttatcttataaacctgtattcaaaccta
cMnSOD2 146 ***a*****ata*****g
cMnSOD3

cMnSOD1 203 ggtatacaatcttcagTTCGCAANTGCACACAGATGAGGCTGTGCGCCATCCGTGAGATGGCT
cMnSOD2 206 *a*****
cMnSOD3 94 *****

cMnSOD1 263 TCATACGTAGAGGGTATTGTCTGTACAGCAGGCTGGTGTGCTCAGGCTGGCACAGTCAGT
cMnSOD2 266 *****
cMnSOD3 139 *****

cMnSOD1 323 CCTCAGATTGCACAGATGTTTGGCCATATCAATGCTGAAATTGGgtaagtgtaaatcggag
cMnSOD2 326 *****tg*
cMnSOD3 199 *****

cMnSOD1 383 ccttttcaaaaactgaaagattggtaattggtgaaaattggccatggtgatgctcgaagg
cMnSOD2 386 *****aaagtc*****t*****t*****
cMnSOD3

cMnSOD1 443 ttacatagatccctgtagsatttctctaaagttatctctttcgggttggtaaaatcagattt
cMnSOD2 445 *****c***c***c***aa*****
cMnSOD3

cMnSOD1 503 tatttatacttggtagtacagtatccatattctgaaaccatggtgcatgaagatctaaagtg
cMnSOD2 505 g*a*****a*****g**t*****
cMnSOD3

cMnSOD1 563 tgtactttacttccctgctcagtttacadaactttctcttataaaagtgactcccatctgcag
cMnSOD2 565 *a**t*****t*****aca*****
cMnSOD3

cMnSOD1 623 GTGAGGAACCGAGGTGCTCATGCTTTGCCACCCCTCAAGTATGATTTCAACGCCCTTGAAC
cMnSOD2 625 *****T*****
cMnSOD3 242 *****

cMnSOD1 1636 actgagccagctgggttaactcatgtccaccccc ttcaccca acattgtcaccacaatt
cMnSOD2 1484 *****g*****c*****gg*****
cMnSOD3

cMnSOD1 1694 atg acagtgccatttgtcattgtaaaaacatgagaggaatatgaaacgaacaaaggggaa
cMnSOD2 1544 ***g***** ***** a****
cMnSOD3

cMnSOD1 1753 agctaaaaggaaacctttatctttcagTTGGTTGAGGCGGAGGCCAATGACCTAAGC
cMnSOD2 1662 *****C*****
cMnSOD3 388 *****

cMnSOD1 1813 GCAATGAATGCCCTTCTACCAGCTATCAAGTTCAATGGAGGCGGCCACTTGAACCAACC
cMnSOD2 1662 *****
cMnSOD3 421 *****

cMnSOD1 1873 ATCTTCTGACCAACATGGCTCCCGATGCTGGTGGCGAGCCGCAAGGAGCTGTTCACAA
cMnSOD2 1722 *****T*****
cMnSOD3 481 *****
Cambio de aa P/L

cMnSOD1 1933 GCCATTGACGAGAGCTTTGGATCATTCAGTCCCTTCAAAGgtgggtttcttggatgggtca
cMnSOD2 1782 *****
cMnSOD3 541 *****

cMnSOD1 1993 gtttttattctagtgtttagttaagagcagataatgtcacaagtaattaaaaaaagaaa
cMnSOD2 1842 *****
cMnSOD3

cMnSOD1 2053 aaagaagggggggggggaaataaataacaaatgtgtgtgcttcatacaattttcttaactt
cMnSOD2 1902 ***g*****
cMnSOD3

cMnSOD1 2113 ctctttatcctttgtctctctctctcccttttcttctctctctgaagtataatctact
cMnSOD2 1961 *****
cMnSOD3

cMnSOD1 2173 tctcttcagGACAAATTTCTGCTGCCAGCGTTGGAGTGAAGGCTCTGGCTGGGGATG
cMnSOD2 2021 *****g*****
cMnSOD3 580 *****

cMnSOD1 2233 GCTCGGCTATTGCCCAATCAGAACAAAGCTTGAGATCGCCACTTGCAGAACAGGATCC
cMnSOD2 2081 *****
cMnSOD3 630 *****

cMnSOD1 2293 CTTGCAATCACTCAGGgtaaatatagactaatcttctgtactgatbgcaataggaaa
cMnSOD2 2141 *****
cMnSOD3 690 *****

cMnSOD1 2353 aattggatcttgatttatttggatgcaaaagccagtgacctgctttaaacaatcagcaagtga
cMnSOD2 2201 *****
cMnSOD3

cMnSOD1 2413 tctctcagaaatttgtccatataatgcaaacattatattgtattacttgcattacagGACTG
cMnSOD2 2261 *****
cMnSOD3 707 *****

cMnSOD1 2473 GTTCCGTTGCTTGGCCTTGACCTCTGGAGCATGCTTACTACCTTCAGTACAAGAACCTC
cMnSOD2 2321 *****C*****
cMnSOD3 712 *****

cMnSOD1 2533 CGTGCAGATTACGTGAAGGCCCTTCTTCAATGTCATPAACTGGGAGAACCGTGAATGAGCGT
cMnSOD2 2381 *****
cMnSOD3 772 *****G*****
Cambio de aa E/G

cMnSOD1 2593 CATGAGAATGCTCGTAAGAATGCAGGTCATTGA
cMnSOD2 2441 T*****CTTCTCGTGGCCACCAAGATCCAAAT
cMnSOD3 832 T*****
Cambio de aa H/Y

cMnSOD1
cMnSOD2 2501 CAGTGTACAAAGGGCGTTTCTCTCACTTGTAACTCAGAAGCTGACCCGGCTATTGTGATAG
cMnSOD3

cMnSOD1
cMnSOD2 2561 TGCACACTGCTGTCTTCACGTPAATCTTGTAAAGGTGCCCTCTAAAACATGAAACAAACA
cMnSOD3

cMnSOD1
cMnSOD2 2621 CAAGATAATTTTTTTTGTCTTTTGAAGACCACAGAAGTTGCCCTCTAATTTTTAGTTGAAA
cMnSOD3

cMnSOD1
cMnSOD2 2681 ATACTCAGCAAAGACATTTCTTTGCTGTCACTAAAAGGGCATGGTCTTGTGATTTGGTATT
cMnSOD3

cMnSOD1
cMnSOD2 2741 TAAGTACATTTATGTAAGCTTGTATCTGGTCATGTGTTTATATGTTGAAGTATTAAAAACA
cMnSOD3

cMnSOD1
cMnSOD2 2801 CCCCCTTTAAGTATTACAATATAAGGGAATTATAAAC
cMnSOD3

APÉNDICE II

Posición de los iniciadores para cDNA de cMnSOD. Con flechas sobre la secuencia están indicados los iniciadores sentido y antisentido.

```

1          GACAGCTTCACCAACCTGCTT
          cMnSOD-R-GY
          ←-----
61  GCGCGTTAGACGTCCCCTCGAATAAGTAAAATCATGGCTGAGGCCAAAGGAAGCTTACATC
          -----→
          AbcMnSODF y AcMnSODF2 (HPLC)
121  CCCATCCTGGAGAAGAAGTTAGCTGAGCTGACTGGAATGAGGTGGATCAGATCAAGAAG
181  AATCAGTTCGCAAATGCAGCAGATGAGGCTGTCCGCATCCGTGAGATGGCTTCATACGTA
241  GAGGGTATTGTCGTACAGCAGGCTGGTGTGCTCAGGCTGGCACAGTCAGTCCTCAGATT
          ←-----
          AbcMnSODR y AMnSODR2 (HPLC)
301  GCACAGATGTTFGCCCATATCAATGCTGAATTGGGTGAGGAACGAGGTGCTCATGCTTTG
361  CCACCTCTCAAGTATGATTTCAACGCCCTTGAACCTCACATCTCCGGCATGATCATGGAG
          cMnSODF2
          -----→
421  ATCCACCACACAAAGCATCACCAGGGCTTCATTAACAACCTAATTGCCGCTACAAAGAAG
          -----→
          FcMnSODr
481  TTGGTTGAGGCCGAGGCAGCCAATGACGTAAGCGCAATGAATGCCCTTCTACCAGCTATC
          cMnSODR2
          ←-----
541  AAGTTCAATGGAGGCCGCCACTTGAACCACACCATCTTCTGGACCAACATGGCTCCCGAT
          ←-----
          RcMnSODr
601  GCTGGTGGCGAGCCGCAAGGAGCTGTTGCACAAGCCATTGATGAGAGCTTTGGATCATTC
661  CAGTCCCTCAAGGACAAATTTCTGCTGCCAGCGTTGGAGTGAAAGGCTCTGGCTGGGGA
721  TGGCTCGGCTATTGCCCAATGAGAACAAGCTTGAGATCGCCACTTGCCAGAACCAGGAT
781  CCTTGCAAATCACTCACGGACTGGTTCCSTTGTCTGGCCTTGACGTCGGGAGCATGCT
841  TACTACCTTCAGTACAAGAACCPCCGTGCAGATTACGTGAAGGCCTTCTTCAATGTTCATT
901  AACTGGGAGAACGTGAATGAGCGTTATGAGAATGCTCGTAAGAATGCAGGTCATTGACTT
          cMnSODR3 *
          -----→
          cMnSOD-F-GY
961  CTCGTGGCGACCAAAGATCCAATTCAGTGTCAACAAGGGCGTTTCTCTCACTTGTAACTCA
1021  GAAGCTGACCGGCTATTGTGATAGTGCACACTACTGCTGTCTTACGTTAATCTTGTAAAGGT
1081  GCCCTCTAAAACATGAAAACAAACACAAGATAATTTTTTTTGTCTTTTGAAGACCACAGAA
1141  GTTGCCTCTTATTTTTAGTTGAAAATACTCAGCAAAGACATTCCTTGTCTGTCACTAAAAG
1201  GGCATGGTCTTGTGTATTGGTATTTAAGTACATTTATGTAAGCTTGTATCTGGTTCATGTG
1261  TTTATATGTTGAAGTATTAABACACCCCCCTTAAGTATTACAATATAAGGGATTTATAAA
1321  CAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

```


PRIMERS PARA EXPRESION DIFERENCIAL

Primer name	Tm	Sequence (5' - 3')	cDNA position (nt)
cMnSODF6	63	CTCATGCTTTGCCACCC	257-273
cMnSODF8	63.1	TAACAACCTAATTGCCGCTACA	360-381
cMnSODF7	67	TGCTCATGCTTTGCCACCT	255-273
cMnSODR6	65.1	CATGACGCTCATTACGTTCT	835-815
cMnSODR8	64.1	CTCATAACGCTCATTACGTTCT	837-815
cMnSODR7	64.2	CATAACGCTCATTACGTTCC	835-815

PRIMERS SOBRE INTRON 3

Nombre	Tm	Secuencia (5' - 3')
cMnSODFw4	62.9	CACAGAAAGCCCTAAGCTAGATG
cMnSODRv4	64.1	CAGCTGGCTCAGTCTTTCTG