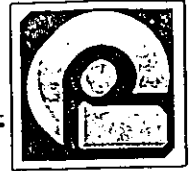


00591

17



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO



DIRECCIÓN GENERAL DE ESTUDIOS DE POSGRADO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS
FACULTAD DE QUÍMICA

292393

Caracterización biológica, estructural y
bioquímica de la lectina del langostino
Macrobrachium rosenbergii (De Man, 1879).

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS
(BIOQUÍMICA)

P R E S E N T A:

M. en C. ROBERTO ZENTENO CUEVAS

TUTOR: DR. EDGAR ZENTENO GALINDO

CIUDAD UNIVERSITARIA, MÉXICO, MAYO DEL 2001





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

A Roberto:
**Gracias por regalarme la alegría de tu presencia y darle un nuevo sentido a mi porqué
y para qué.**

A Luisa:
Simplemente te amo, gracias.

A mis padres:
Por que siempre me han acompañado.

A mis hermanos:
Por que siempre estemos unidos.

Gracias:
A todos los que han formado y forman parte de mi gran familia.

Agradecimientos :

Mi mas profundo y sincero agradecimiento a todas y cada una de las personas e instituciones que intervinieron para la realización y conclusión de este trabajo.

ESTE TRABAJO FUE FINANCIADO POR:

CONACYT No. 27609-M y 26068N.

DGAPA PAPIIT-UNAM No. IN224598.

PROGRAMA ECOS, México-Francia No. M97B05.

IMSS, Coordinación de Investigación Clínica.

UNAM, Dirección General de Estudios de Posgrado.

INDICE

CAPÍTULO	Página.
L- ABSTRACT/RESUMEN	5/6
II- INTRODUCCIÓN	7
Glicoconjugados	7
Lectinas de Invertebrados	7
Lectinas de crustáceos decápodos	9
III- ANTECEDENTES	12
IV.- JUSTIFICACIÓN HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	14
V.- MATERIAL Y MÉTODOS	15
Extracción y purificación de MrL del langostino juvenil y adulto	15
Caracterización química de MrL del langostino juvenil y adulto	16
Cromatoenfoco de MrL del langostino juvenil y adulto	16
Composición de carbohidratos de las isolectinas del langostino juvenil	17
Caracterización de la porción sacarídica de MrL del langostino adulto	17
Secuencia de aminoácidos de MrL del langostino adulto por MALDI-TOF	17
Dicroísmo circular y predicción de la estructura secundaria de MrL del langostino adulto	19
Determinación de la actividad aglutinante y especificidad sacarídica de MrL de langostino juvenil y adulto	19
VI- RESULTADOS	22
Purificación y caracterización de MrL de langostino juvenil y adulto	22
Cromatoenfoco de MrL del langostino juvenil y adulto	26
Composición de carbohidratos de las isolectinas del langostino juvenil	28
Caracterización de la porción sacarídica de MrL del langostino adulto	29
Secuencia de aminoácidos de MrL del langostino adulto	30
Dicroísmo circular y predicción de la estructura secundaria de MrL del langostino adulto	31
Actividad aglutinante y especificidad sacarídica de MrL del langostino juvenil y adulto	32

VII.- DISCUSIÓN	34
Isolectinas de MrL de langostino juvenil y adulto	34
Porción sacarídica de MrL de langostino adulto	37
Porción proteica de MrL de langostino adulto	39
Especificidad sacarídica de MrL de langostino juvenil y adulto	42
VIII.- CONCLUSIONES	46
IX.- REFERENCIAS	47
X.- Identificación de isoformas en la lectina MrL del langostino juvenil de agua dulce <i>Macrobrachium rosenbergii</i> (de Man, 1879)	54
XII.- Caracterización química de la lectina del langostino de agua dulce <i>Macrobrachium rosenbergii</i> (de Man, 1879), por MALDI-TOF	63
XIII.- GLOSARIO DE TÉRMINOS	71

I- ABSTRACT

Lectins from decapods seem to mediate immune recognition. In the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* hemolymph, there is a 19 kDa glycosylated lectin (MrL), specific for N-acetylated sugar residues such as N-acetyl galactosamine, N-acetyl glucosamine and sialic acid derivatives. In young stages of the prawn, the lectin have a higher concentration but lower agglutinating activity, however the adults stages have a lower concentration and higher agglutinating activity. This oscillations on the concentration and agglutinating activity have a correlation with experimental observations about the high susceptibility of youngs prawns to suffer infections. With the goal of better understand the participation of MrL on this phenomenon, the lectins from the young and adult stages and the protein and saccharidic portions from the adult prawn were characterized. The lectins in both stages were purified by affinity chromatography using stroma from rat erythrocytes. The results show that the molecular weight and amino acid composition of the lectin from youngs and adults prawns are similar; however, chromatofocusing assays identified four isolectins in the young (at pI: 5.6, 5.1, 4.6, 4.2) and only one in adult (at pI: 4.2). Their functional characterization shows different recognition capability and glycosilation rates.

MrL from adult prawn contain 11% of glycans, its characterization by affinity chromatography with lectins and gas chromatography indicated the presence of 2 N-glycans 1) $\text{Manose}_3\text{N-acetylglucosamine}_2\text{Galactose}_{1,3}$, 2) $\text{Manose}_3\text{N-acetylglucosamine}_{2,8}$, and probably one O-glycan, $\text{Galactose}_3\text{N-acetylglucosamine}_3\text{N-acetylgalactosamine}_{0,4}$ sialic acid_{0,2}. The amino acid sequence obtained by mass spectrometry MALDI-TOF, have a 54% of identity with the hyperglucemic hormone from *M. rosenbergii* and 22 % and 27% with the variable portion of the κ and λ chain from human antibody respectively, however this sequence not show identity with any animal lectin. The combination of circular dichroism and secondary structure prediction show a content and a pattern of 4 β strands, alternated by 3 random coil and two α helix, similar to the folding of the immunoglobulin superfamily. Our results indicated that the saccharidic portion could be responsible of generating isolectins with different recognition capability, and that MrL could be a new member of the immunoglobulin superfamily proteins.

I.- RESUMEN

Las lectinas de decápodos son responsables del reconocimiento inmune. En la hemolinfa del langostino de agua dulce *Macrobrachium rosenbergii*, se encuentra una lectina glicosilada de 19 kDa (MrL), específica para azúcares N-acetilados y derivados de ácido siálico. En estados juveniles del langostino la lectina tiene una concentración alta pero una baja actividad aglutinante, sin embargo los estados adultos poseen una baja concentración pero mayor actividad aglutinante. Estas oscilaciones en la concentración y la actividad aglutinante, correlacionan con observaciones en donde el langostino juvenil es altamente susceptible a infecciones. Con la finalidad de entender la participación de MrL en este fenómeno, se caracterizó la MrL de langostino juvenil, así como la porción proteica y sacarídica del adulto.

La lectina de ambos estadios de maduración se purificó por cromatografía de afinidad empleando estroma de eritrocitos de rata. Los resultados muestran que el peso molecular y la composición de aminoácidos de MrL de ambos estados no presentan diferencias, sin embargo, por cromatoenfoco se identificaron en la lectina del langostino juvenil cuatro isolectinas (a pI: 5.6, 5.,4.2) y sólo una en el adulto (a pI:4.2), y como única característica particular, poseen diferentes porcentajes de glicosilación y capacidades aglutinantes.

La MrL del langostino adulto contiene un 11% de carbohidratos, su purificación y caracterización por cromatografía de afinidad con lectinas y cromatografía de gases, indican 2 N-glicanos constituidos por: 1) Manosa₃N-acetil-glucosamina₂Galactosa_{1,3}, 2)Manosa₃N-acetil-glucosamina_{2,8}, y 1 O-glicano, Galactosa₃N-acetil-glucosamina₃N-acetil-galactosamina_{0,4} ácido siálico_{0,2}. La secuencia de aminoácidos obtenida por espectrometría de masas (MALDI -TOF), no mostró similitud con ninguna lectina animal, pero sí un 54% de identidad con la hormona hiperglucémica de *M. rosenbergii* y 22 y 27% con la porción variable de las cadenas κ y λ de anticuerpo humano. La combinación de dicroísmo circular y predicción de estructura secundaria mostró que MrL de langostino adulto posee un contenido y un patrón estructural de 3 hebras beta, alternado por 6 estructuras aleatorias y dos alfa hélices, similar al plegamiento de la superfamilia de las inmunoglobulinas. En conclusión, nuestros resultados indican que la porción sacarídica podría ser la responsable de generar isolectinas con diferentes capacidades de reconocimiento, y que MrL del langostino adulto podría ser un nuevo miembro de la superfamilia de las inmunoglobulinas.

II. INTRODUCCIÓN

Glicoconjugados

Durante las últimas 3 décadas la química y la biología de los glicoconjugados, carbohidratos unidos covalentemente a proteínas y lípidos, ha adquirido gran importancia (Varki, 1993; Varki *et al.*, 2000), ya que pueden participar en: 1) influenciar la conformación estructural de una proteína (Oheda *et al.*, 1990); 2) funcionar como receptores de diversos agentes patógenos como bacterias o virus (Zenteno *et al.*, 1998a); 3) como glicoantígenos, modular la respuesta inmune y permitir por enmascaramiento la evasión inmunológica de patógenos (Wetzler *et al.*, 1992); 4) determinar el periodo de vida de glicoproteínas y células de acuerdo al nivel de glicosilación de ciertos glicoconjugados de superficie (Drickamer, 1991); 5) pueden funcionar como receptores para hormonas y patógenos (Glick *et al.*, 1991); 6) controlar la permeabilidad de la membrana y regular el metabolismo y la división celular, debido a ciertos glicoconjugados de superficie celular (Fermini y Nathan, 1991); 7) ser los responsables del reconocimiento y adhesión celular, manteniendo a órganos y tejidos en sus puntos de confinamiento (St. John *et al.*, 1990) y sus alteraciones están íntimamente relacionadas con una gran cantidad de patologías y metástasis de cánceres (Varki *et al.*, 2000).

Lectinas de Invertebrados

Una de las herramientas importantes para el estudio de los glicoconjugados han sido las lectinas, proteínas con capacidad de reconocer carbohidratos de manera específica. Estas proteínas se encuentran en todas las entidades biológicas conocidas, desde animales hasta virus, pasando por plantas, insectos y protozoarios (Lis y Sharon, 1999).

La capacidad de las lectinas para aglutinar eritrocitos es una propiedad que ha permitido su identificación en tejidos, diversos órganos (Komano y Natori, 1985), fluido celómico, seminal y hemolinfa de varias especies de invertebrados (Arason, 1996). Uno de los primeros reportes de lectinas en invertebrados proviene de Camus (1899), quien identificó una lectina en el tejido de

varias especies de caracoles del género *Helix*. En 1903 Noguchi (1903) demostró la presencia de una lectina en la hemolinfa del cangrejo cacerola *Limulus polyphemus* y de la langosta *Homarus americanus*, con lo que se confirmó la presencia de lectinas asociadas a membrana y solubles en la hemolinfa. La primera fase en la caracterización de las lectinas en invertebrados se basó en identificar su funcionalidad y proponer su participación como elementos importantes para el reconocimiento y respuesta inmune (Cheng y Sander, 1962). La segunda fase se inició a partir de la identificación en la ostra *Saxidomus giganteus* (Jonson, 1964) y en el caracol *Helix hortensis* (Prokop *et al.*, 1965) de lectinas con capacidad de identificar grupos sanguíneos humanos A y B respectivamente, lo cual colocó a las lectinas de invertebrados como herramientas útiles para la tipificación sanguínea. Las tercera y última etapa se inició a principios de la década de los 70's, con trabajos tendientes a identificar y caracterizar lectinas de invertebrados desde un punto de vista molecular, bioquímico, estructural y fisiológico, con el objetivo de establecer con mayor certeza sus papeles biológicos y su aplicación como herramientas para la caracterización de glicoconjugados (Vasta, 1992; Varki, 1993; Varki *et al.*, 2000).

Papeles biológicos de las lectinas de invertebrados

Dentro de los papeles biológicos plenamente identificados en las lectinas de invertebrados se puede mencionar que: 1) Confieren protección al huevo contra patógenos y permiten el desarrollo embrionario, como ocurre con los embriones del cangrejo cacerola *Tachypleus gigas* (Shishikura y Sekiguchi, 1984). 2) Varias lectinas con diferentes especificidades, en protozoarios de vida libre, como *Acanthamoeba spp.*, están implicadas en el reconocimiento y unión de partículas o de alimento (Brown *et al.*, 1975). 3) Algunas lectinas regulan las interacciones simbióticas específicas, como ocurre con ciertas especies bacterianas y el alga *Didemnum prochloron* (Muller *et al.*, 1984). 4) Las células espermáticas de todas las especies de invertebrados poseen en su superficie, lectinas y glicoconjugados con receptores específicos en la superficie de los oocitos los cuales poseen también lectinas y glicoconjugados, por lo que las interacciones entre ambos son sumamente específicas y son las responsables de la restricción de la fecundación entre especies, como ocurre con las restricciones de diversas especies de erizos de mar (Vacquier y Moll, 1977). 5) Algunas lectinas de superficie celular reconocen ligandos

endógenos y son las responsables de formar agregados celulares, como ocurre con las lectinas de esponjas (Yeaton, 1981). 6) La variación en la concentración de lectinas antes, durante y después de la metamorfosis de los insectos sugiere su participación en la reorganización de tejidos y construcción del exoesqueleto (Mauchamp, 1982). 7) La localización de lectinas en epitelios, secreciones mucosa, hemolinfa, y en la membrana de ciertas células circulantes, conjuntamente con su capacidad por reconocer elementos ajenos, ubica a las lectinas como las principales responsables del reconocimiento de lo no propio y de la fagocitosis en invertebrados (Trip, 1960; Cohan *et al.*, 1984).

Lectinas de decápodos

Dentro de los invertebrados, los decápodos poseen una posición especial debido a su fácil adaptación para la acuicultura y considerable valor alimenticio, lo que los coloca como especies muy apreciadas y de importancia económica. Poseen un sistema circulatorio abierto, el cual contiene hemolinfa (tejido sanguíneo) por la cual viajan libremente, nutrientes, oxígeno, hormonas y células. Precisamente, es en la hemolinfa en donde se han identificado lectinas, con diversas funciones, pesos moleculares, números y tamaños de subunidades (Tabla 1). La mayoría de las lectinas identificadas en este grupo poseen especificidad para carbohidratos N-acetilados, tales como N-acetil-D-glucosamina (GlcNAc), N-acetil-D-galactosamina (GalNAc) y algunas poseen especificidad para derivados O y N-acetilados de ácido siálico y en pocas ocasiones para fucosa y galactosa. La mayoría de estas lectinas son dependientes de cationes divalentes, por lo general calcio, y son sensibles a la quelación (Nalini *et al.*, 1994, Vázquez *et al.*, 1998). Desafortunadamente se tiene escasa información relacionada con la secuencia génica, proteica y organización estructural de las lectinas de crustáceos, información de suma importancia para entender su participación en los mecanismos de reconocimiento inmune y, derivado de este reconocimiento, los procesos de respuesta inmune.

Papel biológico de las lectinas en decápodos

Se ha propuesto que las lectinas de decápodos poseen, en general, las mismas funciones biológicas que las lectinas del resto de los invertebrados. Participan en el transporte de carbohidratos, glicoproteínas y calcio (Vasta, 1992; Vázquez *et al.*, 1998), en la adhesión celular, migración y apoptosis de grupos celulares (Ni y Tizard, 1996). Pero en donde destaca la participación es en el reconocimiento de lo no propio, ya que la mayoría de las lectinas presentes en la hemolinfa de decápodos son específicas para carbohidratos que se localizan en la pared y membrana de bacterias y virus, tales como lipopolisacárido (Kopacek *et al.*, 1993), ácido siálico y derivados N y O acetilados (Vázquez *et al.*, 1993), GlcNAc y GalNAc (Freire-Márquez y Barraco, 2000) y β -1,3-glucano (Duvic y Soderhall 1992). Del mismo modo, las lectinas asociadas a hemocitos, una vez que reconocen su ligando, son las responsables de iniciar varios mecanismos de respuesta inmune tales como la activación del sistema de profenoloxidasa (proPO), (Smith y Soderhall, 1983; Soderhall y Cerenius, 1998), liberación de factores de adhesión (Thornqvist *et al.*, 1994), liberación de factores inductores de la coagulación de la hemolinfa (Kopacek *et al.*, 1993), liberación de proteínas y péptidos antimicrobianos (Kawabata *et al.*, 1996), fagocitosis (Tyson y Jenkin 1974; Vazquez *et al.*, 1998; Sierra *et al.*, 1999) y encapsulación de partículas que no pueden ser fagocitadas (Persson *et al.*, 1987).

Tabla 1. Propiedades de algunas lectinas de decápodos.

Crustáceo	Catión	Peso Molecular kDa	Subunidad kDa	Especificidad	Actividad Biológica	Referencia
Langostino						
<i>Macrobrachium rosenbergii</i>	CD	19	9.6	NeuAc, GalNAc, GlcNac	Aglutinación Bacteriana	Vázquez <i>et al.</i> , 1996
Cangrejos						
<i>Scylla serrata</i>	CD	55.7	25-30	NeuGc, Ac. colomico, MSB	Opsonización	Kongtawelert, 1998
<i>Charibdis japonicus</i>	CD	300	19	α -galactosil, α -glucosil	n.d.	Umetsu <i>et al.</i> , 1991
Langosta						
<i>Homarus americanus</i>	CD	19	5	NeuAc	n.d.	Hall y Rowlands 1974
<i>Jasus verreauxi</i>	CD	n.d.	n.d.	MSB, Fet, NeuAc, GlcNac	Opsonización	Imai <i>et al.</i> , 1994
Cangrejo de río						
<i>Pasifastacus leniusculus</i>	CD	420	65-80	MSP, MSB, Fet, LPS	Opsonización	Kopacek <i>et al.</i> , 1993
<i>A. pallipes</i>	CPD	n.d.	n.d.	Fet.	n.d.	Middleton <i>et al.</i> , 1996
Lapa						
<i>Megabalanus rosa</i>	CD	330	22	Gal	Biomíneralización	Muramoto <i>et al.</i> , 1985
<i>Balanus rostratus</i>	CD	120	25	Gal, Lac, Mel	Biomíneralización (-)	Toda <i>et al.</i> , 1998
Esquilla						
<i>Mantis shrimp</i>	CD	192	-	Fucosa	Formación Cápsula	Amirante y Basso, 1984
Penaeidos						
<i>Peneaus japonicus</i>	CD	330	33	GlcNac, GalNac, NeuAc	Opsonización	Kondo <i>et al.</i> , 1998
<i>Peneaus californiensis</i>	CD	174	41	GlcNac, GalNac, NeuAc	Aglutinación bacteriana	Vargas-Albores 1995

CD y CPD, catión dependiente y parcialmente dependiente. NeuAc-ácido siálico, GalNac-Nacetil-galactosamina, GlcNac-Nacetil-glucosamina, NeuGc-glicosil ácido siálico, Fet-fetuina, Gal-galactosa, Lac-lactosa, Mel- Melobiosa, MSB y MSP-mucina submaxilar bovina y porcina.

III. ANTECEDENTES

El langostino de agua dulce *Macrobrachium rosenbergii* es un decápodo que posee una gran adaptabilidad y rápido desarrollo, y es importante en la acuicultura debido a su alto valor alimenticio y económico (New, 1995). Sin embargo, una de las limitantes importantes para su óptima explotación ha sido la alta tasa de infecciones mortales en los estadios larvarios y juveniles, ocasionado por levaduras en invierno y enterococos en verano, infecciones que disminuyen de manera considerable conforme se desarrolla el langostino (Cheng y Chen, 1998; Bachere, 2000). Los trabajos relacionados con la ecología del langostino y prácticas de cultivo son abundantes y los relacionados a los aspectos bioquímicos y fisiológicos se enfocan al impacto de contaminantes en el metabolismo y desarrollo del langostino (Vijayram, 1996; Lee *et al.*, 1997; Cavalli *et al.*, 2000). Por otro lado los trabajos relacionados con la descripción de los mecanismos de respuesta inmune son más abundantes y se pueden clasificar en tres grupos: 1) Influencia del medio ambiente: en donde se ha demostrado que un incremento en la temperatura y oxígeno inducen un aumento en la cantidad de hemocitos y la activación del sistema proPO. El incremento sostenido del pH a 8.8-9.5 y de la temperatura a 33-34 °C, exacerban infecciones por enterococos, las cuales pueden llegar a reducirse por una disminución de la salinidad (5-10 ppm) (Cheng y Chen, 1998, 2000). 2) Respuesta inmune celular: se han identificado en *M. rosenbergii* tres tipos de hemocitos: a) fusiformes o hialinos, b) ovoides grandes o granulares y c) redondos pequeños o semigranulares. Los hemocitos ovoides grandes o granulares son los responsables de actividad fagocítica, activación del sistema proPO y citotoxicidad, por lo que representan la principal línea de defensa celular (Vázquez *et al.*, 1997; Zenteno *et al.*, 1998b; Sung *et al.*, 1998, 1999; Soderhall, 1998). 3) Respuesta inmune humoral: en la hemolinfa del langostino *M. rosenbergii* se ha confirmado la presencia de una lectina de 20 kDa, dimérica con 9.6 kDa por subunidad y un 11% de carbohidratos (Vázquez *et al.*, 1993, 1996). Esta lectina es capaz de aglutinar eritrocitos de rata, conejo, gallina y ciertas cepas bacterianas como: *Aeromonas sp.*, *Bacillus cereus*, *Pasteurella haemolytica* biotipo A serotipo 12, *Pasteurella multocida* y con menor afinidad, *Salmonella aureus* coagulasa positiva y *Escherichia coli* (Vázquez *et al.*, 1997), todo lo cual permite ubicar a esta lectina como un

elemento importante para el reconocimiento de componentes extraños. Mediante el empleo de anticuerpos policlonales específicos para MrL sérica, se observó por microscopía electrónica, la presencia de MrL asociada a Golgi, gránulos secretores y membrana de hemocitos ovoides o granulares. La lectina asociada a la membrana de hemocitos posee la misma especificidad para carbohidratos y eritrocitos de rata, gallina y conejo, que la lectina soluble, y además reconoce y fagocita eritrocitos y bacterias conteniendo carbohidratos N y O-acetilados (Vázquez *et al.*, 1997; Sierra *et al.*, 1999). Todo lo anterior confirma tres cosas; 1) que los hemocitos son los responsables de la síntesis de MrL; 2) la existencia de una variante de lectina asociada a membrana y 3) en la síntesis de MrL podrían existir rearrreglos moleculares similares a los existentes en los anticuerpos solubles y asociados a la membrana de los linfocitos B.

A partir de la cuantificación de lectina en la hemolinfa de varios estadios de desarrollo de *M. rosenbergii*, por medio de un anticuerpo monoclonal se concluyó que el estado juvenil del langostino posee una mayor concentración de lectina (2.6 mg por ml de hemolinfa), pero con una capacidad aglutinante notablemente disminuída; mientras que en el langostino adulto la lectina tiene una menor concentración (1.5 mg por ml de hemolinfa), pero una mayor capacidad aglutinante (Agundis *et al.*, 2000). Esta correlación entre MrL de langostino juvenil con baja capacidad de reconocimiento y la alta tendencia a sufrir infecciones en este período, permite confirmar la participación de esta lectina en el mecanismo de reconocimiento inmune. Sin embargo, se ignora cómo podría llevarse a cabo la regulación de la actividad de MrL o si varias isolectinas están implicadas.

IV. JUSTIFICACIÓN

En la hemolinfa del decápodo *M. rosenbergii* se encuentra una lectina (MrL), sintetizada por hemocitos y una variante de ésta se encuentra asociada a membrana. Tanto la lectina de membrana como la sérica reconocen grupos celulares que contienen el mismo determinante sacarídico, y se considera que forman la primera línea de defensa inmune en el langostino. La lectina sérica muestra una mayor concentración pero menor actividad aglutinante en el estadio juvenil que en el adulto, comportamiento que coincide con la alta tendencia de organismos juveniles a padecer diversas infecciones.

Se desconocen las propiedades bioquímicas de la lectina en fase juvenil, por lo cual proponemos que la diversidad funcional de la actividad aglutinante podría estar relacionada con fenómenos de microheterogeneidad de la proteína, y regulada a su vez por la maduración del langostino, lo cual genera isolectinas que pudieran explicar este comportamiento. Trabajos previos indican que la lectina aislada del langostino en fase adulta es una glicoproteína, lo cual también estaría generando una alternativa de diversidad en la lectina en los diferentes estadios de desarrollo. Por estas razones, en este trabajo se pretende caracterizar las propiedades bioquímicas y estructurales de la lectina obtenida en el estadio juvenil y adulto, con la intención de entender y explicar su papel en la biología y respuesta inmune del langostino.

IV. HIPÓTESIS

La diferencia en la capacidad de reconocimiento y respuesta inmune entre el langostino juvenil y adulto se debe a la existencia de isolectinas con diferentes características y capacidades de reconocimiento por sus carbohidratos.

IV. OBJETIVOS

- 1.- Purificar y caracterizar a la lectina del langostino *M. rosenbergii* en estadio juvenil y adulto y realizar un análisis comparativo, bioquímico y funcional de la lectina en ambas etapas de maduración.
- 2.- Realizar la caracterización bioquímica y estructural de la porción proteica y sacarídica de MrL de langostino adulto.

V.- MATERIALES Y MÉTODOS

Extracción y purificación de MrL de langostino juvenil y adulto

El langostino de agua dulce *Macrobrachium rosenbergii* se obtuvo de granjas dulceacuícolas en Jojutla Morelos, México. Los estadios de maduración se determinaron con base en el peso y características corporales de acuerdo a los parámetros de Peebles (1977) y Wickins y Beard (1974). Los grupos analizados fueron: a) juvenil (Post-larva), con una longitud de 7 ± 0.5 cm ($n=20$) y b) adulto (especímenes en intermuda) de 10.3 ± 0.9 cm ($n=24$).

La hemolinfa fue extraída del seno pericárdico mediante punción utilizando una aguja de 25 mm; se dejó coagular a temperatura ambiente durante 30 min y posteriormente el suero obtenido, después de someterlo a centrifugación a $16,000 \times g$, a 4°C por 30 min, se dializó contra amortiguador TBS (Tris-HCl 50 mM, NaCl 0.15 M, CaCl_2 3 mM, pH 7.4). La lectina se purificó por cromatografía de afinidad en una columna (1.5 X 25 cm) conteniendo estroma de eritrocitos de rata fijados con glutaraldehído y atrapados en Sephadex G-25 (Vázquez L., *et al*, 1997). La columna se equilibró previamente con TBS a un flujo de 10 ml/h. 1.5 ml de hemolinfa, conteniendo 266 mg de proteína; posteriormente se depositó en la columna y la fracción no retenida se eluyó con TBS hasta que la densidad óptica (DO) a 280 nm fue igual a cero y la fracción retenida se eluyó de la columna por la adición de ácido acético al 3% (v:v) en agua (Vázquez L., 1994). Se colectaron fracciones de 1.5 ml, se dializaron con amortiguador Bis-Tris (25mM Bis-Tris, 25mM ácido iminodiácetico, pH 7.2), y finalmente se determinó la DO a 280nm así como su actividad aglutinante para eritrocitos de rata al 2% en TBS. Las fracciones conteniendo a la lectina (MrL) fueron concentradas por ultrafiltración en un AMICON con una membrana con un límite de corte de 10,000. La concentración de proteína se determinó de acuerdo al método de Bradford (1976), empleando albúmina sérica bovina como estándar. El proceso de purificación se realizó en condiciones idénticas para la hemolinfa obtenida de organismos juvenil y adulto.

Purificación de MrL por intercambio iónico

Con la finalidad de evaluar la pureza de MrL de langostino obtenida por cromatografía de afinidad, la lectina del langostino adulto se purificó por separado en una columna preempacada mono P HR 5/5 mm (Pharmacia), en forma aniónica a pH 7.1 y equilibrada con amortiguador 50 mM Bis-Tris, con un flujo de 1 ml/min, y una presión de 40 bars, durante 60 min, en un sistema de FPLC (Pharmacia). La lectina se eluyó de la columna con un gradiente discontinuo de 0-1 M de NaCl en amortiguador Bis-Tris. Se colectaron fracciones de 1ml y la DO se monitoreó a 280 nm. Cada fracción eluída se dializó contra agua destilada y se liofilizó para posteriores estudios.

Caracterización química de MrL de langostino juvenil y adulto

Electroforesis SDS-PAGE

La masa molecular y homogeneidad de la lectina purificada en los dos estadios de maduración del langostino se evaluó en geles de poliacrilamida al 10% en condiciones reductoras, en presencia de 0.1% dodecil sulfato de sodio (SDS) y beta-mercaptoetanol al 5%, empleando el sistema de amortiguadores de Laemmli (1970). El gel se tiñó con 0.1% azul brillante de Coomassie.

Composición de aminoácidos

100 µg de lectina purificada de langostino adulto y juvenil se sometieron a hidrólisis por 24 h con 2 ml de HCl 6N y ácido per fórmico al 1% para evitar oxidación de aminoácidos sulfurados y fenilalanina. La hidrólisis se realizó a 110°C en contenedores sellados al vacío y posteriormente, el hidrolizado se examinó en un analizador de aminoácidos Beckman 119-CL (Bidlingmeyer *et al.*, 1984).

Determinación del punto isoelectrico por cromatoenfoque de MrL del langostino juvenil y adulto

Las lectinas purificadas de los organismos juvenil y adulto se aplicaron por separado a una columna pre-empacada mono P HR 5/5 mm (Pharmacia, Upsala, Suecia). La columna se equilibró con amortiguador Bis-Tris a un flujo de 1 ml/min con una presión máxima de 4 bars en un sistema HPLC (Pharmacia, Upssala, Suecia). Las isolectinas de lectina se eluyeron de la columna con un gradiente de pH continuo, en un programa de 60 min, empleando el poli-amortiguador de 7 a 4 (Pharmacia) (Zenteno *et al.*, 1994). Se colectaron fracciones de 1 ml, a cada una se determinó su pH, DO a 280 nm y la actividad hemaglutinante para eritrocitos de rata al 2% (p.v) en TBS.

Composición de carbohidratos de las isolectinas del langostino juvenil

La composición de carbohidratos para la lectina del langostino juvenil y adulta se determinó a partir de derivados heptafluorobutirato de O-metil-glicósidos, obtenidos después de hidrólisis con metanol-HCl 0.5 N por 24 h a 100°C. Los O-metil-glicósidos se purificaron empleando una columna capilar (2.5 x 0.32 mm) conteniendo silicona OV 210 al 5% (Applied Science Lab. Bufalo, NY), en un cromatógrafo de gases Varian 2100 (Orsay France). El gas acarreador fue helio a una presión de 0.6 bar y la temperatura programada abarco desde los 100 a 240°C a razón de 2°C por minuto (Zanetta *et al.*, 1994). L-Lisina (Sigma) se empleó como estándar interno. La identificación de cada residuo de azúcar se confirmó por espectrometría de masas, empleando el espectrómetro de masas Automass Finnigan II.

Caracterización de la porción sacarídica de MrL de langostino adulto

Los glicopéptidos de MrL de langostino adulto (MrL-Gp) se prepararon incubando 2 mg de la lectina en 0.5 ml de Tris-acetato (Tris-acetato 150 mM y CaCl₂ 15 mM, pH 8) y 1 mg de

pronasa (*Streptomyces griseus*, Sigma) por 48 h a 36° C. La mezcla se hirvió 5 min para detener la reacción enzimática y los glicopéptidos se filtraron en una columna conteniendo BioGel P2 (100 X 1.2 cm) equilibrada con agua destilada. La purificación de los glicopéptidos se realizó por cromatografía de afinidad en 1 columna con 10 mg de lectina Concanavalina A (Con A) y 1 columna con 10 mg de la lectina de lenteja, *Lens culinaris* (LCA), ambas unidas covalentemente a Sepharosa 4B-CL (Sigma). Las columnas se equilibraron con el amortiguador de acetatos (acetato de sodio 5 mM, NaCl 0.14 M y CaCl₂ 5 mM, pH 5.2), y se aplicaron a cada una 200 µg de glicopéptidos de MrL en 200 µl de amortiguador de acetatos. El material no retenido se eluyó con amortiguador de acetatos hasta que la DO a 215 nm fue cero; las fracciones retenidas en ambas columnas se eluyeron con 200 mM de α -metil-manósido (Debray *et al.*, 1981). Las fracciones retenidas y no retenidas se colectaron y desalaron en una columna de Biogel P2 (100 X 1.2 cm), previamente equilibrada con agua destilada, a una velocidad de flujo de 10 ml/h. La composición sacarídica de las fracciones conteniendo glicopéptidos se determinó por cromatografía de gases, de acuerdo al protocolo previamente descrito (Zanetta *et al.*, 1994) y se correlacionó con la especificidad por oligosacáridos determinada para las lectinas ConA y LCA (Debray *et al.*, 1981).

Obtención de la secuencia de aminoácidos de MrL de langostino adulto por MALDI-TOF

Después de la electroforesis en SDS-PAGE de MrL-adulta, la banda con 200 pM de proteína se cortó e incubó con 0.5 µg de tripsina en 500 µl de bicarbonato de amonio pH 8.0 a 37°C por 24 h. La actividad enzimática se abolió almacenando la mezcla a 2°C por 4 h. El material digerido presente en el sobrenadante se secó por evaporación empleando un Gyrovap (Howe, Londres) y se reconstituyó en 200 µl de agua. Las muestras (conteniendo 50 pM /1 µl de agua destilada) se mezclaron directamente con 1 µl de la matriz 2,5- ácido dihidroxibenzoico (12 mg/ml en CH₀ 70:30 v/v), permitiendo a la mezcla cristalizar a temperatura ambiente. Los iones positivos de los péptidos se midieron en un espectrómetro de masas de tiempo de vuelo MALDI-TOF, Vision 2000 (Finnigan MAT, Bremen,

Alemania) equipado con un láser UV de 337 nm . El espectro de masas se adquirió en modo reflectrón con un voltaje de aceleración de 8 keV y detección positiva. Los ensayos control se realizaron empleando solamente tripsina para identificar péptidos auto-digeridos y como estándar angiotensina I (Mr 1296.7) (Hellman *et al.*, 1995). La masa de los iones [M + H] de los péptidos se compararon con la base de datos NCBIInr (10/04/99).

Dicroísmo circular y predicción de estructura secundaria de MrL de langostino adulto

El porcentaje de estructura secundaria de MrL de langostino adulto se determinó por su espectro de dicroísmo circular (CD). El cual se obtuvo a 21°C en un espectropolarímetro JASCO J-700 calibrado previamente con ácido 10-(+)-camforsulfónico. La línea basal se desarrolló con un amortiguador de fosfatos 0.01 M, pH 8.5, posteriormente se incorporó una solución de 0.25 mg/ml de MrL en el mismo amortiguador, todo se realizó con una celda de 1mm, y se analizó en la región ultravioleta (UV) lejano de 183 a 260 nm. La elipticidad por residuo (θ) se calculó utilizando una masa de 110 gmol⁻¹ por residuo. La descomposición y análisis de los espectros se realizó con el programa K2D (Andrade *et al.*, 1993). La predicción de estructura secundaria a partir de la secuencia de aminoácidos se realizó empleando el algoritmo de redes neurales, en un servidor de correo electrónico y de acuerdo al protocolo descrito por los autores (Rost *et al.*, 1993).

Determinación de la actividad aglutinante y especificidad sacarídica de MrL de langostino juvenil y adulto

Las actividades aglutinantes de MrL de langostino adulto y juvenil se determinaron en placas de microtitulación U (NUNC, Denmark) por el procedimiento de doble dilución seriada (Vázquez *et al.*, 1993). Las actividades aglutinantes se evaluaron empleando una suspensión de eritrocitos al 2% en TBS. Se evaluaron eritrocitos humanos tipo A, B, y O (obtenidos de donadores sanos del banco central de sangre del IMSS, México), así como eritrocitos de rata, ratón, conejo, oveja, caballo y gallina, proporcionados por el bioterio de la Facultad de Medicina Veterinaria, de la UNAM. La actividad hemaglutinante se reportó como actividad

específica, ésta corresponde al resultado de dividir la unidad hemaglutinante (UHA, número de pozos que aglutina la lectina en la placa de aglutinación) entre la concentración en miligramos de lectina empleada. Con la finalidad de evaluar la importancia del ácido siálico en la capacidad de MrL para aglutinar eritrocitos, algunos ensayos se realizaron en presencia de eritrocitos desialilados, al tratarse con la neuraminidasa de *Vibrio cholerae* (Sigma) (0.1 U de enzima por 500 μ l de eritrocitos a 37°C por 30 min).

Preparación de glicanos y asialoglicoproteínas de fetuina, y evaluación de su especificidad para MrL de langostino juvenil y adulto

Para evaluar las especificidades de MrL de langostino adulto y juvenil por N y O glicopeptidos de fetuina, estos se obtuvieron a partir de la incubación de 10 mg de fetuina con 1mg de la enzima pronasa de *Streptomyces griseus* (Sigma), por 48 h a 37°C. Los N- y O- glicopéptidos se fraccionaron por filtración en gel en una columna (1.6 X 100 cm) conteniendo BioGel P4, previamente equilibrada con acetato de piridina 0.05 M a pH 4.5 (Vázquez *et al.*, 1996). El exceso de sales de cada N y O glicopéptido se eliminó por cromatografía de filtración en una columna conteniendo Biogel P2 (2 X 60 cm), previamente equilibrada con ácido acético 0.5 M en agua destilada. Los glicopéptidos se liofilizaron y mantuvieron a 4°C hasta su uso. Se desialilaron 3 mg de glicoproteínas y 0.5 mg de N y O- glicopéptidos de fetuina por incubación con una solución de ácido sulfúrico 0.002 N a 100°C, durante 1 h y posteriormente se desalaron en una columna de Biogel P2 (2 X 60 cm), previamente equilibrada con ácido acético 0.5 M en agua destilada, de acuerdo al protocolo de Spiro y Bhoyroo (1974). La composición de carbohidratos de cada glicopéptido de fetuina y de las formas desialiladas se reconfirmó por cromatografía de gases.

Especificidad sacarídica de MrL de langostino juvenil y adulto

La especificidad sacarídica de MrL del langostino juvenil y adulto se obtuvo evaluando la capacidad de varias concentraciones de azúcares, glicoproteínas, glicopéptidos, y sus derivados desialilados para inhibir 4 unidades hemaglutinantes. Se colocaron en los pozos de

una placa de microtitulación tipo U (Nunc) 25 μ l de amortiguador TBS con 4 UHA de MrL, posteriormente se incorporaron por separado y en triplicado 25 μ l de 6 diferentes concentraciones de azúcares, glicoproteínas y glicopéptidos y se incubaron a temperatura ambiente por 1 h, finalmente se adicionaron 25 μ l de una solución de eritrocitos de rata al 2% en TBS (p:v). Los resultados se expresan como la mínima concentración de azúcares, glicoproteínas y glicopéptidos necesaria para inhibir las 4 unidades hemaglutinantes de MrL (Vázquez *et al.*, 1996).

VI.- RESULTADOS

Purificación y caracterización de MrL del langostino juvenil y adulto

Las lectinas de langostino adulto y juvenil se purificaron por cromatografía de afinidad, en una columna de Sephadex G-25, conteniendo estroma de eritrocitos de rata tratados con glutaraldehído (Figura 1).

La purificación por cromatografía de afinidad nos permitió obtener un incremento de 209 veces en el estadio juvenil y de 612 veces en el estadio adulto de la actividad específica de MrL, en relación con la actividad de la hemolinfa, (Tabla 2a y b). Nuestros resultados nos permiten identificar además que la concentración de lectina del langostino adulto es 30% menor que la del juvenil. Sin embargo, al compararse las actividades específicas se observó un aumento de 3.6 órdenes de magnitud (Tabla 2 a y b).

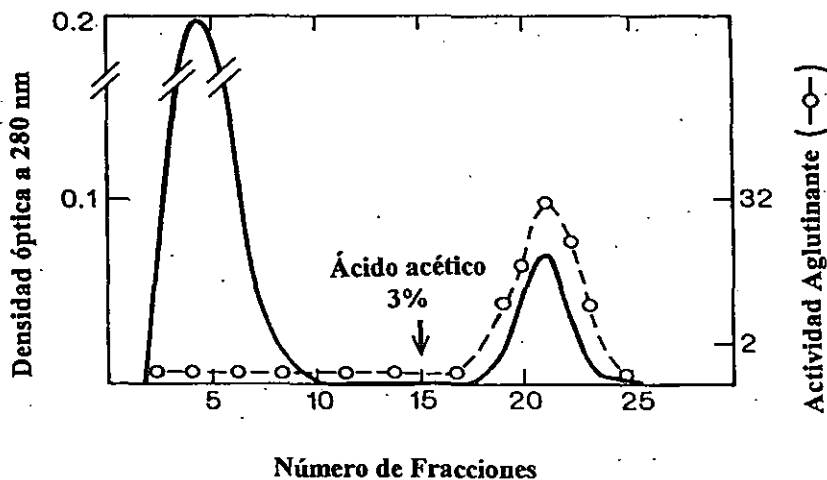


Figura 1.- Perfil de elución de hemolinfa de langostino adulto (100 μ l) y purificación de MrL, por cromatografía de afinidad en estroma de eritrocitos de rata. A cada fracción colectada se le ajustó el pH a 7.5 con NaOH 1 M, su DO a 280nm (—) y su actividad hemaglutinante para eritrocitos de rata (o-o-o).

Purificación de MrL de langostino adulto por cromatografía de intercambio iónico

La lectina obtenida del langostino adulto se purificó por cromatografía de intercambio iónico, y se identificaron tres picos (Figura 2). Sin embargo, la fracción más abundante es decir, la fracción I eluida con NaCl 0.18 M, fué la única que poseía actividad hemaglutinante y correspondió al 60% de la proteína que se aplicó (Tabla 2b).

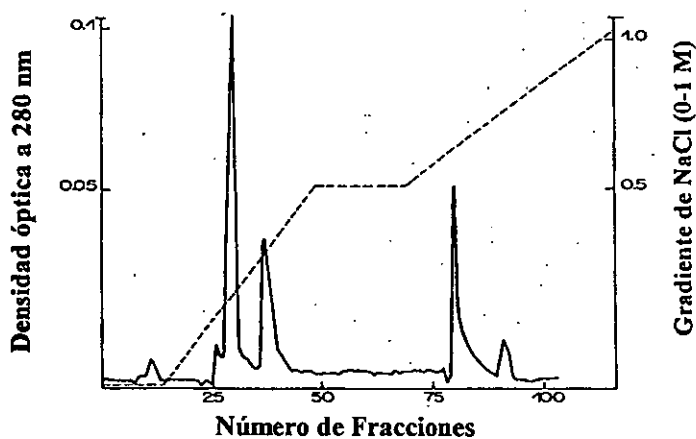


Figura 2.- Purificación de MrL de langostino adulto por cromatografía de intercambio iónico, en una columna mono P (forma aniónica) en sistema FPLC. Se aplicó un gradiente discontinuo de NaCl 1 M (---). A cada fracción de 1 ml se le evaluó su DO a 280nm (—). El pico I fue el único que presentó actividad aglutinante (Tabla 2b).

Tabla 2a.- Proceso de purificación de la lectina del langostino juvenil de *M. rosenbergii**

Fracción	Proteína (mg)	HAU	Actividad Especifica
Hemolinfa	166	1024	6.1
<i>Cromatografía de afinidad</i>			
Fracción no retenida	120	SA	SA
Lectina	0.4	512	1280

Tabla 2b.- Proceso de purificación de la lectina del langostino adulto de *M. rosenbergii**

Fracción	Proteína (mg)	HAU	Actividad Especifica
Hemolinfa	266	2048	7.6
<i>Cromatografía de afinidad</i>			
Fracción no retenida	198	SA	SA
Lectina	0.22	1024	4654
<i>Cromatografía de intercambio iónico.</i>			
F. I	0.13	800	6153
F. II	0.02	SA	SA
F III	0.04	SA	SA

*A partir de 1.5 ml de hemolinfa.

*HAU= unidades hemaglutinantes.

^b Actividad específica = HAU / concentración de MrL en mg.

SA= Sin Actividad.

Electroforesis SDS-PAGE de MrL de langostino juvenil y adulto.

La electroforesis SDS-PAGE de las lectinas del langostino juvenil y adulto indican que son homogéneas y están constituidas por unidades monoméricas con un peso molecular de 9.6 kDa (Figura 3).

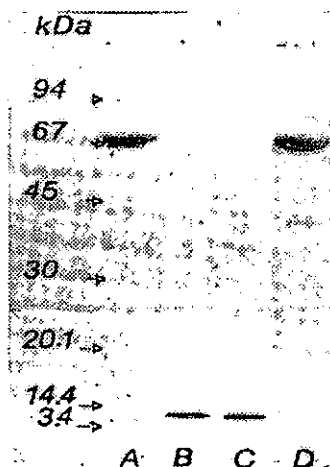


Figura 3.- Electroforesis SDS-PAGE de MrL del langostino adulto y juvenil. Carril A hemolinfa (35 μ g) y carril B lectina purificada de langostino adulto (5 μ g). Carril C lectina purificada (5 μ g) y carril D hemolinfa de langostino juvenil (35 μ g). Marcadores de peso molecular: fosforilasa b (94 kDa), albúmina sérica bovina (67 kDa), ovoalbúmina (45 kDa), anhidrasa carbónica (30 kDa), inhibor de tripsina de soya (20.1 kDa), lactoalbúmina (14.4 kDa) y cadena β de insulina bovina (3.4 kDa).

Composición de aminoácidos de MrL del langostino adulto y juvenil

La composición de aminoácidos de MrL del langostino adulto y juvenil sugiere identidad (Tabla 3). En ambas lectinas predominan aminoácidos de tipo ácido y se observaron como los más abundantes a glicina, serina, lisina, valina, leucina y en menor proporción, cisteína y tirosina. En la lectina del langostino juvenil se observaron cantidades menores de aminoácidos como isoleucina, fenilalanina, arginina y treonina.

Tabla 3. Composición de aminoácidos (residuos/mol) de la lectina de langostino adulto y juvenil de *M. rosenbergii**.

Residuo	Juvenil	Adulto
Asx	8.1	7.9
Glx	8.6	8.2
Ser	6.1	6.2
Gly	6.6	6.7
His	2.1	2.2
Arg	2.9	3.3
Thr	3.7	4.2
Ala	5.6	5.7
Pro	3.6	3.7
Tyr	1.2	1.1
Val	4.8	4.8
Met	1.3	1.4
Cys	0.5	0.5
Ile	3.5	4.2
Leu	6.0	6.6
Phe	4.1	4.5
Lys	5.8	6.0
Total	74.5	77.2

*Considerando un peso molecular de 9.6 kDa

Determinación del punto isoeléctrico de MrL de langostino juvenil y adulto

El cromatoenfoco de MrL del langostino adulto está constituido por un grupo homogéneo de proteínas (AI) debido a que el 90% de la actividad aglutinante se observó en un sólo pico eluido a un pI de 4.2 (Figura 4a). El cromatoenfoco de MrL de langostino juvenil permitió

identificar cuatro isolectinas denominadas: JI, JII, JIII y JIV (Figura 4b), las cuales se recromatografiaron y se confirmó un pI de: 5.6, 5.1, 4.6 y 4.2 respectivamente. La determinación de la especificidad y capacidad hemaglutinante mostró que todas las isolectinas poseen la misma especificidad para eritrocitos de rata. La isoforma J-I, con pI 5.6 posee un 11% de la actividad total de la lectina juvenil, J-II y J-III con pI 5.1 y 4.6, contienen el 18 y 20% de la actividad y finalmente JIV con pI de 4.2, contiene el 51% de la actividad. Es importante mencionar que J-IV podría corresponder a la forma del langostino adulto AI, ya que ambas poseen un pI similar (4.2) y el mayor porcentaje de la actividad aglutinante.

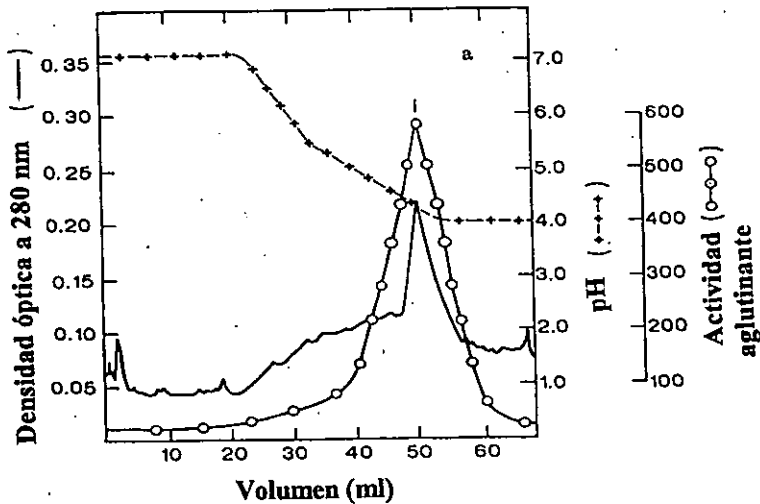


Figura 4a: Cromatoenfoco de MrL de langostino adulto: 500 μ g de lectina se aplicaron a una columna mono P en un sistema FPLC, y se eluyó con un poli-amortiguador de 7 a 4 (+-+-+). A cada fracción de 1.5 ml se le determinó su DO a 280 nm (—) y su actividad aglutinante para eritrocitos de rata al 2% en TBS (-o-o-o-).

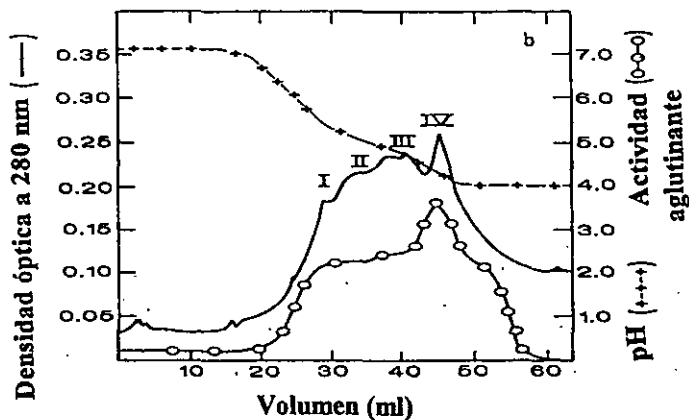


Figura 4b: Cromatoenfoco de MrL de langostino juvenil, 500 μ g de lectina se aplicaron a una columna mono P en un sistema FPLC, y se eluyo con un poli-amortiguador con un rango de pH de 7 a 4, (+-+-). A cada fracción de 1.5 ml se determinó su DO a 280 nm (—) y su actividad hemaglutinante para eritrocitos de rata al 2% en TBS (-o-o-o-).

Composición de carbohidratos de las isolectinas de lectina del langostino juvenil y adulto

La composición de carbohidratos de las porciones sacarídicas de las isolectinas del langostino juvenil y adulto, mostraron diferencias cuantitativas y cualitativas. En términos generales las isolectinas del langostino juvenil están más glicosiladas, ya que poseen de un 15 a un 14%, mientras que en la lectina del langostino adulto sólo se observó un 11% (Tabla 4).

La tabla 4 muestra que las isolectinas de langostino juvenil II y III contienen residuos de galactosa (Gal), manosa (Man), N-acetil-glucosamina (GlcNAc), en menor proporción N-acetil galactosamina (GalNac) y carecen, con excepción de J-IV (0.5%), de ácido siálico. Un punto a considerar es que la composición de esta isoforma es similar a la composición de MrL del langostino adulto la cual contiene una menor cantidad de carbohidratos (11%), pero una mayor concentración de ácido siálico.

Tabla 4. Composición de carbohidratos (Residuos/Mol*) en las isolectinas de langostino juvenil y lectina de adulto.

Carbohidrato	Isoforma				
	Juvenil				Adulto
	JI	JII	JIII	JIV	AI
Manosa	2.9	2.9	2.4	2.1	1.4
Galactosa	2.4	2.7	2.2	2.4	1.3
N-acetilgalactosamina	0.8	0.8	0.8	0.7	0.3
N-acetilglucosamina	1.5	0.9	0.9	1.1	0.8
Ácido sialico	0.0	0.0	0.2	0.5	0.9
Contenido de azúcares (%)**	15.2	15.0	14.5	14.5	11.0

* Residuos/mol, considerando un peso molecular de 9.6 kDa por subunidad.

**El porcentaje representa la relación entre concentración de proteína y de carbohidratos

Caracterización de la porción sacarídica de MrL de langostino adulto.

La porción sacarídica de MrL adulta comprendió un 11% del peso total de la lectina y está constituida por ácido siálico (NeuAc), galactosa (Gal), manosa (Man), N-acetilglucosamina (GlcNac) y N-acetilgalactosamina (GalNac), en una relación molar de 0.6:4:3:2:1, respectivamente. Los glicopéptidos de MrL se purificaron por cromatografía de afinidad en columnas conteniendo las lectinas concanavalina A (ConA) y lenteja (LCA), inmobilizadas en Sepharosa-4BCL. Del total de los glicopéptidos colocados en cada columna (200 µg), el 57% se retuvo en la columna de ConA y el 24% con la columna de LCA (Tabla 5). La composición de carbohidratos de los glicopéptidos retenidos en ConA (MrL-gpConA) muestra a Man y GlcNac en una relación molar 3:2.1 y los glicopéptidos retenidos en LCA (MrL-gpLCA) contienen Man, GlcNac y Gal en una relación molar 3:2.8:1.3, mientras que los glicopéptidos no retenidos por ninguna columna (MrL-gp) contienen Man, GlcNac, Gal y en menor concentración GalNac y NeuAc (Tabla 5).

Tabla 5. Composición de carbohidratos de glicopéptidos MrL adulta, purificados por cromatografía de afinidad en columnas de lectina ConA y LCA.

Azúcar	Porcentaje molar ^a		
	MrL-gpConA*	MrL gpLCA**	MrL gp***
Manosa	3.0	3.0	3.0
Galactosa	0.1	1.3	2.7
GlcNAc	2.1	2.8	3.7
GalNAc	0.0	0.0	0.4
NeuAc	0.0	0.0	0.2

^a En relación a tres residuos de Manosa. *MrL gp ConA, glicopéptidos retenidos en columna de ConA, **MrLgpLCA-glicopéptidos retenidos en columna de LCA, ***MrLgp-glicopéptidos no retenidos en ninguna columna.

Secuencia de aminoácidos de MrL de langostino adulto obtenida por MALDI-TOF.

Al compararse la secuencia de aminoácidos de MrL del langostino adulto obtenida por MALDI-TOF con varias bases de datos de secuencias de proteínas (SWISS-PROT y EMBL), ésta secuencia no compartió similitud con ninguna lectina de invertebrado, sin embargo, sí se observó una identidad del 54% con la hormona hiperglicémica del langostino *M. rosenbergii* (CHH), y además 22% con una cadena κ región V-II, así como un 27% con una cadena ligera λ de inmunoglobulina humana (Tabla 6).

Tabla 6. Péptidos y secuencia de la lectina de *M. rosenbergii*.

[M+H]	Posición de aminoácido	Secuencia del péptido	Proteína relacionada
1036.99	1-11	(-)SAFASLGSTVK	Igλ
1791.9	12-26	LDRVCDDCYNLYR	CHH
2721.9	27-50	QCIQDLQLMDQLDEYANAVQIVGKR	CHH
2734.4	51-77	VEAEDVGVYYCMZALQAPITFGQGTRL	Igκ

Dicroísmo circular y predicción de estructura secundaria de MrL de langostino adulto.

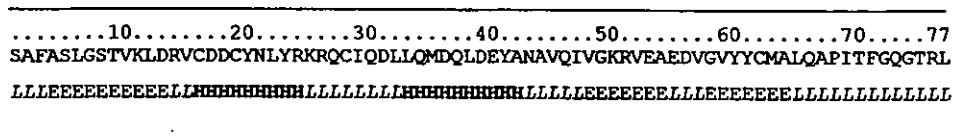
El análisis de dicroísmo circular mostró que MrL adulta contiene un 51% de aminoácidos en estructura no repetitiva, 28% en hebra beta y 21% en hélice alfa, valores cercanos a los porcentajes obtenidos en la predicción de estructura secundaria, en donde el 47% de los aminoácidos se ubicaron en estructuras no repetitivas, 31% en hebra beta y 22% en hélice alfa (Tabla 7).

Tabla 7. Porcentajes de estructura secundaria para MrL .

	Dicroísmo circular	Predicción estructura secundaria
No repetitiva	51	47
Hebra beta	28	31
Alfa hélice	21	22

Estos porcentajes se distribuyeron en la secuencia mostrando un patrón de 3 hebras beta, alternadas por 3 asas y 2 alfa hélices interrumpidas por una asa (Figura 5).

Figura 5: Organización de la estructura secundaria de MrL: L- no repetitiva, E- hebra beta, H -alfa hélice .



Determinación de la actividad aglutinante y especificidad sacarídica de MrL del langostino adulto e isolectinas juveniles

Las lectinas MrL del langostino adulta y las isolectinas del estado juvenil aglutinan eritrocitos de ratas, conejo y gallina, pero no de otras especies animales, como humano (A, B y O), caballo, cerdo y oveja. La eliminación del ácido siálico en los eritrocitos, por tratamiento con la neuraminidasa de *V. cholerae*, eliminó la capacidad de ambas lectinas para aglutinar eritrocitos. Los ensayos de inhibición de la hemaglutinación con los diversos azúcares, glicoproteínas y glicopéptidos (Tabla 8) mostraron que la actividad de la lectina de langostino adulto y juvenil disminuyó con azúcares N-acetilo, tales como: ácido siálico 5N-acetilo (Neu5Ac) y 5-9N-acetil (Neu5,9Ac), N-acetilglucosamina (GlcNac), N-acetilgalactosamina (GalNac) y en menor proporción, glicoli-neuraminico (NeuGc), y α - o β -metil glicósidos de ácido siálico. Sin embargo, la cantidad de azúcares requeridos para inhibir la actividad hemaglutinante de las isolectinas II, III y IIII fué cuatro veces mayor que la requerida para inhibir la actividad de JIV y AI (Tabla 8). Por otro lado las glicoproteínas que poseen ácido siálico tales como fetuina, mucina submandibular bovina y ovina, fueron los inhibidores más potentes de la actividad aglutinante para la lectina del langostino adulto y las isolectinas juveniles. Al igual que con los azúcares se necesitó una mayor cantidad de glicoproteínas para inhibir la capacidad aglutinante de las isolectinas juveniles II-III y una cantidad menor para JIV y la forma adulta AI (Tabla 8). Las glicoproteínas ovoalbúmina, transferrina Humana, IgG, α_1 -glicoproteína, así como fetuina, mucina ovina y bovina desializadas, no mostraron en ningún caso capacidad inhibitoria.

Los N-glicopéptidos de fetuina no mostraron capacidad inhibitoria, mientras que los O-glicopéptidos sí inhibieron la actividad hemaglutinante de todas las isolectinas juveniles y la forma adulta. Es de hacer mención que la capacidad inhibitoria de los O-glicosilpéptidos fue menor que la inhibición generada por la glicoproteína nativa, lo que indica que la organización tridimensional de la fetuina, es importante para su interacción con MrL.

Tabla 8. Concentración de azúcares y glicoproteínas (mM) necesarios para inhibir 4 unidades hemaglutinantes de MrL de langostino adulto e isolectinas juveniles*.

Azúcar y glicoproteínas	Isolectinas juveniles				Forma adulta
	J-I	J-II	J-III	JIV	AI
Neu5Gc	200	200	200	200	100
GalNAc	200	200	100	100	50
GlcNAc	200	200	200	100	50
Neu5Ac	50	50	25	25	25
Neu5,9Ac	25	25	25	25	12.5
Neu5Ac α -metilglicósido	25	12.5	7.5	7.5	7.5
Neu5Ac β -metilglicósido	25	12.5	12.5	7.5	7.5
Neu5Ac (α 2,3)	25	25	12.5	12.5	12.5
Neu5Ac(α 2,6)	25	25	12.5	12.5	12.5
Acido colominico (Neu5Ac α 2,8)**	25	25	15	10	10
Fetaina	0.006	0.003	0.003	0.001	0.001
O-glicosilpéptidos de Fetaina	0.1	0.1	0.05	0.05	0.05
Mucina submandibular bovina	0.01	0.01	0.005	0.005	0.005
Mucina submandibular ovina	0.1	0.1	0.05	0.05	0.05

* concentración para 4 HAU de MrL juvenil (7 μ g/ml) y adulta (2 μ g/ml).

** Valores en mg/ml ya que el peso molecular se desconoce.

Otros azúcares sin actividad inhibitoria: fucosa, manosa, glucosa, galactosa, galactosamina, manosamina, melobiosa, rafinosa, ovoalbumina, transferrina humana, IgG, α ₁-glicoproteína ácida, fetaina desializada. N-glicopéptidos y O-asialoglicopéptidos de fetaina y asialoglicoproteínas no mostraron inhibición.

VII- DISCUSIÓN

Debido a que las lectinas en los decápodos circulan en la hemolinfa, o están asociadas a membranas de células fagocíticas (Vasta, 1992), y además participan en procesos de reconocimiento de determinantes sacarídicos localizados en la superficie de microorganismos y células dañadas, se considera que estas proteínas participan de manera importante en los mecanismos de reconocimiento y defensa inmune (Vazquez *et al.*, 1998; Freire-Marquez y Barraco 2000). Sin embargo, hasta el momento no se han logrado establecer y entender los mecanismos de interacción entre las lectinas de decápodos, sus ligandos y la regulación de su actividad conforme ocurre el desarrollo biológico del organismo.

El estadio adulto del langostino de agua dulce *M. rosenbergii* es de fácil adaptabilidad a cultivos intensivos y semi-intensivos, por lo cual ha sido incluido en diversos programas de acuicultura. Sin embargo, su estadio juvenil tiene una alta tendencia a sufrir procesos infecciosos mortales (Cheng y Chen, 1998; Bacherie *et al.*, 2000) y muestra una gran concentración de lectina con pobre capacidad aglutinante. En el langostino adulto esta concentración disminuye, pero se incrementa su capacidad aglutinante (Agundis *et al.*, 2000). Estos antecedentes permiten suponer que la expresión y funcionabilidad de MrL podría estar regulada de alguna manera por la maduración del langostino, lo que convierte a este organismo en un excelente modelo para realizar un análisis cuantitativo y cualitativo de la lectina presente en la hemolinfa de ambos niveles de desarrollo del langostino. Es por lo anterior que en este trabajo se analizaron las principales características bioquímicas de las lectinas aisladas del estadio juvenil y adulto de *M. rosenbergii*.

Isolectinas de MrL de langostino juvenil y adulto.

La lectina del langostino juvenil y adulto se purificó por cromatografía de afinidad, utilizando como soporte el estroma de eritrocitos de rata. Los análisis electroforéticos indican que ambas lectinas están formadas por subunidades de 9.6 kDa. Estudios previos realizados por centrifugación en gradiente de densidad en sacarosa y electroforesis en SDS-PAGE

(Vázquez *et al.*, 1993), indican que la lectina de langostino adulto en su forma activa tiene un peso de 20 kDa y dos dímeros de 9.5 kDa, por lo que es posible que la lectina del langostino juvenil esté organizada de manera semejante. Al realizar la composición de aminoácidos, se identificó que la MrL del langostino adulto y juvenil es similar, pero por cromatoenfoque se determinó que MrL-juvenil posee 4 isolectinas con pI de 5.6, 5.1, 4.6 y 4.2, denominadas respectivamente JI, JII, JIII y JIV. En el estadio adulto se observó que la lectina purificada es más homogénea, ya que sólo existe una forma con un pI de 4.2, denominada AI. La única diferencia significativa entre las lectinas purificadas de organismos adultos y juveniles está en relación con el porcentaje y composición de azúcares (Tabla 4 y 9). Es aquí en donde se puede apreciar que la concentración de carbohidratos disminuye en relación directa al desarrollo del langostino, ya que tenemos desde un 15.2% en JI hasta un 11% en AI y, en específico, se puede apreciar un incremento en la presencia de ácido siálico conforme madura el langostino de 0% en JI, hasta cerca del 1% en AI (Tabla 4 y 9).

Tabla 9. Comparación del porcentaje de glicosilación de las isolectinas de MrL del langostino juvenil y adulto.

	Juvenil				Adulta
	JI	JII	JIII	JIV	AI
pI	5.6	5.1	4.6	4.2	4.2
% de glicosilación.	15.2	15.0	14.5	14.5	11
% de ácido siálico	0.0	0.0	0.2	0.5	0.9

La existencia de isoformas o isolectinas, con la misma o diferente especificidad y afinidad por un azúcar, se explica como parte de la respuesta primitiva a la ausencia de los mecanismos de diversidad combinatoria que se presentan en anticuerpos, y que les permite a las lectinas incrementar su capacidad para reconocer un rango mayor de oligosacáridos, por lo que en decápodos es frecuente observar la descripción de isoformas o isolectinas con cierto grado de micro-heterogeneidad así como diferencias en sus puntos isoelectrónicos y composiciones de aminoácidos (Iwanaga y Kawabata, 1998; Freire-Marquéz y Barraco, 2000). Sin embargo,

está es la primera ocasión en la que se reportan isolectinas para el langostino *M. rosenbergii*. Nuestros resultados muestran que en el estadio juvenil del langostino se encuentran 4 isolectinas de MrL con diferentes concentraciones y capacidades aglutinantes, lo cual podría explicar la alta concentración de lectina en la hemolinfa del langostino juvenil (Agundis *et al.*, 2000). Estas isolectinas poseen un mayor nivel de glicosilación y sólo JIV presenta ácido siálico y una composición similar a AI (Tablas 4 y 9).

La principal diferencia entre las isolectinas juveniles y la lectina del langostino adulto se encuentra en el porcentaje de glicosilación y el incremento en la sialilación (Tabla 4), por lo que la glicosilación podría ser la principal responsable de las diferentes capacidades aglutinantes (Tabla 8). Esta glicosilación podría influir en MrL, posiblemente modificando su microambiente (ionización), o bien, disminuyendo el nivel de agregación o la rigidez y flexibilidad, todo lo anterior podría repercutir directamente en la organización estructural y el sitio activo de la lectina y en consecuencia en su interacción con el ligando, generando así las diferentes afinidades (Tabla 5). En este sentido varios reportes demuestran cómo la glicosilación influye en la actividad biológica de glicoproteínas de invertebrados. Tal es el caso de la hormona esterasa, cuya glicosilación permite el inicio de la metamorfosis de la larva del lepidóptero *Trichoplusia ni* (Wozniak y Jones, 1990). El incremento en la glicosilación de la proteína dermonecrótica de la araña *Loxocles spp.* influye directamente en su capacidad de dañar tejidos (Veiga *et al.*, 1999) y, quizá el único ejemplo de una lectina de invertebrado es la hemolina, proteína responsable del reconocimiento y activación de mecanismos inmunes en insectos y cuya glicosilación influye en su capacidad por reconocer sus ligandos (Bettencourt *et al.*, 1999).

A partir de los antecedentes y nuestros resultados se propone la siguiente teoría que pretende explicar el papel que podrían tener las isolectinas juveniles en la biología del langostino. Las isolectinas JI, JII y JIII podrían estar relacionadas más con el transporte de carbohidratos, como GlcNAc precursor de la quitina, constituyente principal del exoesqueleto, y únicamente la isolectina JVI, la más parecida a AI, podría ser la encargada del reconocimiento de oligosacáridos o glicoconjugados en elementos no propios, es decir en el reconocimiento inmune. Este comportamiento de isolectinas con diferentes funciones se ha reportado en otras especies de invertebrados como en el quelicerado *Limulus polyphemus* (Cohen, 1968),

así como en varias especies de insectos, en donde se han observado oscilaciones en la concentración de isolectinas específicas para GlcNAc durante el desarrollo del organismo, y una mayor concentración de éstas durante el proceso de muda (Mauchamp, 1982).

Con la finalidad de comprobar esta teoría se pretenden realizar experimentos en donde se elimine la porción sacarídica de las isolectinas del langostino juvenil y MrL adulto de una manera selectiva mediante el empleo de glicosidasas, y posteriormente evaluar el impacto en su capacidad aglutinante. Por otra parte se pretende realizar en langostino juvenil cultivado, retos subletales con bacterias patógenas, y se evaluaría la inducibilidad, concentración, composición de carbohidratos y capacidad aglutinante de las isolectinas y su comportamiento conforme la progresión de la infección. Finalmente se pretende identificar el o los genes para MrL, lo que permitiría confirmar si la expresión de cada isoforma es el resultado de diferentes formas alelomórficas, o si es sólo un gene cuyo producto se encuentra glicosilado por diferentes enzimas, las cuales a su vez se encuentran reguladas por la maduración del langostino.

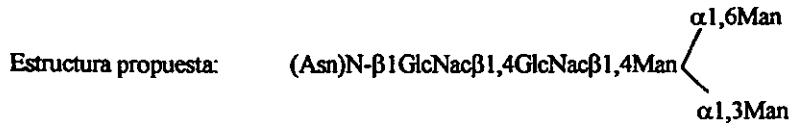
De confirmarse esta teoría se daría a MrL un papel dual, de transporte y de defensa en la biología del langostino, y se ratificaría la importancia del nivel de glicosilación en generar isolectinas con diferentes capacidades aglutinantes. Así mismo se explicaría la alta susceptibilidad del langostino juvenil a sufrir infecciones recurrentes, las cuales disminuyen conforme se desarrolla el langostino y aparece una forma "madura" de MrL.

Porción sacarídica de MrL de langostino adulto

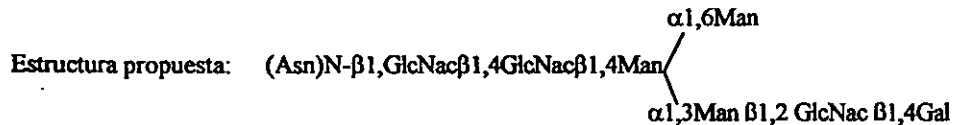
En este trabajo se evaluó también la organización estructural de las porciones proteica y sacarídica de MrL de langostino adulto. La composición de la porción sacarídica se obtuvo por cromatografía de gases a partir de glicopéptidos de MrL, separados por cromatografía de afinidad, empleando diferentes columnas de sefrosa acopladas con las lectinas concanavalina A (ConA) y lenteja (LCA). Los resultados muestran 3 glicopéptidos, 2 conteniendo la composición característica de oligosacáridos de tipo N y 1 de tipo O (Tabla 6). Esta composición de carbohidratos, al correlacionarse con los oligosacáridos reconocidos más frecuentemente por ConA y LCA (Debray 1998), nos permite proponer con excepción del oligosacárido 3, la siguiente organización estructural (Tabla 10).

Tabla 10: Posible organización estructural de la porción sacarídica de MrL.

1) Columna de Lectina ConA: N-glicano, $\text{Man}_3\text{GlcNac}_{2,1}$ (57%). PM: 982.4 Da



2) Columna de Lectina LCA: N-glicano, $\text{Gal}_{1,3}\text{Man}_3\text{GlcNac}_{2,8}$ (24%). PM: 1383 Da



3) No retenido en ninguna columna:

O-glicano, $\text{Gal}_3\text{Man}_3\text{GlcNac}_3\text{GalNac}_{0,4}\text{NeuAc}_{0,2}$ (19%). PM: 2273 Da.

Es frecuente observar en la literatura la descripción de carbohidratos unidos covalentemente a lectinas de decápodos (Baldo *et al.*, 1978; Vasta, 1992; Freire-Marquéz y Barraco, 2000). Sin embargo, éste es el primer reporte donde se describe, cuantifica y determina la posible organización estructural de la porción sacarídica de una lectina de este grupo, así como la presencia de una glicosilación de tipo O. La glicosilación de tipo O es un elemento que apoya la teoría sobre la influencia de la porción sacarídica en la generación de isolectinas con diferentes capacidades, ya que se ha demostrado que este tipo de glicosilación influye en la organización y rigidez estructural, así como en la agregación de varias glicoproteínas (Van den Steen *et al.*, 1998).

Será interesante determinar la organización de los N-oligosacáridos y el O-oligosacárido por resonancia magnética nuclear y confrontarlo con la propuesta aquí establecida para los N-oligosacáridos.

A partir de la secuencia de aminoácidos para MrL de langostino adulto (Figura 5) se identificaron 2 aminoácidos potenciales de N-glicosilación N21, N43 y 5 aminoácidos potenciales de O-glicosilación (Hansen *et al.*, 1998), 3 de los cuales, S-5, S-8 y T-9, se

localizan en el extremo amino y 2 en el extremo carboxilo T-70 y T75. Esto es, los aminoácidos donde pudiera llevarse a cabo una O-glicosilación, se localizan preferentemente en los extremos de la proteína. El identificar estos residuos permitirá desarrollar sobre ellos modificaciones por métodos químicos o por mutaciones puntuales, con la finalidad de evitar su glicosilación y posteriormente evaluar su impacto en la organización estructural y en la función de MrL.

MrL pesa 20 kDa (Vázquez *et al.*, 1993) y el 11% del peso son carbohidratos, es decir 2.2 kDa pertenecen a la porción sacarídica. Los pesos moleculares de los oligosacáridos analizados (Tabla 10) permiten especular sobre la existencia de tres glicoisolectinas de MrL adulta, no distinguibles por cromatoenfoco, y dadas por la combinación de los tres oligosacáridos. La tabla 11 muestra las combinaciones de estos oligosacáridos y las posibles glicoisolectinas.

Tabla 11: Combinaciones de oligosacárido y glicoisolectinas.

oligosacárido/monómero	glicoisiforma	peso molecular kDa	% del total
1-1, N-glicanos	I	1.962	9.8
1-2, N-glicanos	II	2.365	11.5
0-3, O-glicano	III	2.273	11.3

Será interesante comprobar la existencia de estas glicoisolectinas por isoelectroenfoco o electroforesis en doble dimensión y evaluar su afinidad por diversos carbohidratos.

Porción proteica de MrL de langostino adulto

La determinación de la secuencia de aminoácidos de MrL mediante espectrometría de masas MALDI-TOF generó una secuencia con un 54 % de identidad con la hormona hiperglucémica del langostino *M. rosenbergii* (CHH) (Lin *et al.*, 1999) y con las cadenas ligeras κ (22%) y χ (27%) de inmunoglobulina humana (Tabla 6). Esta es la primera evidencia experimental que

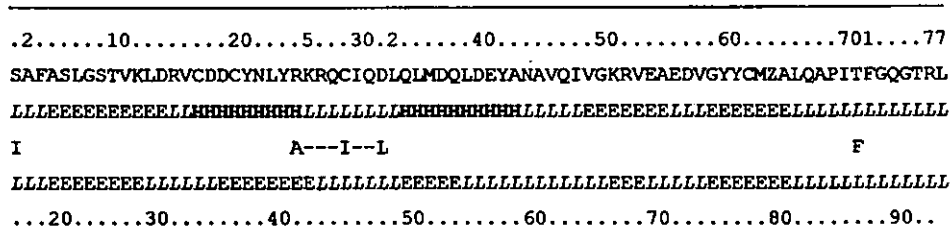
describe la secuencia de aminoácidos de una lectina de un decápodo. No muestra similitud con ninguna otra lectina de invertebrado, lo cual sugiere que esta lectina podría poseer una organización estructural sin caracterización previa en otra lectina. La predicción de la estructura secundaria (Tabla 7) (Rost *et al.*, 1993) muestra que MrL posee un arreglo de estructura secundaria similar al plegamiento de la superfamilia de las inmunoglobulinas (SFIGS) (Figura 5), plegamiento que se ha localizado en infinidad de organismos en diferentes escalas evolutivas. Son varios los ejemplos de lectinas de vertebrados (mamíferos) que poseen este plegamiento (CD4, CD8 y las moléculas de adhesión NCAM, ICAM LFA, VCAM) y el más reciente lo constituye una clase de lectinas de mamíferos específicas para ácido siálico denominada Siglecs (sialic acid-binding Ig superfamily lectins). Estas proteínas son transmembranales, con un dominio N-terminal de tipo IgV el cual está implicado en el reconocimiento de ácido siálico, seguido por un número variable de dominios IgC2, un dominio transmembranal y un tallo citoplasmático (Angata, 2000). En invertebrados existen varias lectinas que pertenecen a la superfamilia de las inmunoglobulinas, con homología predominante por el dominio IgC2. La mayoría de estas lectinas se encuentran asociadas a membranas celulares de insectos y se relacionan con la organización de fibras musculares y procesos de reconocimiento y adhesión celular (Lanz y Feye, 1999). Sin embargo existen otras lectinas que contienen este plegamiento y están más relacionadas con procesos inmunes, tales como la hemolina, lectina soluble de insectos cuyo papel está relacionado con el reconocimiento inmune y muestra un arreglo de 4 dominios de inmunoglobulina unidos entre sí, formando una especie de herradura (Su *et al.*, 1998). Otro ejemplo es la $\alpha 2$ -macroglobulina la cual modula una vía de lisis celular dependiente de lectinas en varios artrópodos (Armstrong y Quigley, 1999). Y el ejemplo más cercano a los decápodos se observa en el quelicerado *Limulus polyphemus* el cual posee varias lectinas que contienen este arreglo (Pistole *et al.*, 1982)

Un análisis más detallado de la similitud entre la lectina de MrL con los anticuerpos, permitió identificar en MrL residuos implicados con los mecanismos de reconocimiento en los anticuerpos. Tal es el caso de la estructura canónica L1(κ)2^a (Lazikani *et al.*, 1997, Morea *et al.*, 2000) ya que 3 de los 5 residuos claves que conforman esta canónica y que participan activamente en la interacción con el antígeno 29-I, 33-L, 71-F se conservan en MrL; en otro se mantiene la misma propiedad de una cadena lateral no polar (2A/I); y sólo un residuo no

comparte ninguna propiedad (25K/A); una similitud adicional se observó en la estructura en la cual se encuentra la canónica ya que en el anticuerpo se localiza en una asa de 7 residuos (Morea *et al.*, 2000), mientras que en MrL se trata de una asa de 8 residuos, confinada en ambos extremos por las dos únicas alfa hélices (Figura 6).

Al compararse la estructura secundaria de MrL de langostino adulto con la estructura secundaria consenso de las cadenas ligeras de 10 moléculas de anticuerpos resueltas cristalográficamente (1AE6, 1IBG, 12E8, 1EMT, 1CLO, 1F4W, 1A6V, 1REI, 1A6W, 1A6), se puede observar, con excepción de las dos alfa hélices, un buen empalme de las estructuras secundarias (figura 6).

Figura 6: Ubicación de la estructura canónica LI(κ)2^a en MrL y comparación con la estructura secundaria consenso de 11 moléculas de anticuerpo: L-Asa, E-Hebra beta, H-alfa hélice .



La información que poseemos actualmente no nos permite relacionar de manera concluyente a la estructura canónica localizada en MrL con una función de reconocimiento. Sin embargo, éste es el primer reporte de una aparente estructura canónica en una molécula que no es un anticuerpo y en un organismo tan primitivo como el langostino *M. rosenbergii*. El primer ejemplo de estas estructuras canónicas se encuentra en los dominios variables de las cadenas pesadas y ligeras κ de los anticuerpos de los peces cartilaginosos, los cuales divergieron hace 450 millones de años de la especie humana y fueron los primeros en desarrollar un sistema inmune. Esto implica que las estructuras canónicas se originaron muy temprano en los inicios del desarrollo del sistema inmune (Barre *et al.*, 1994), y plantea la pregunta sobre la ubicación de un antecesor evolutivo (Marchalonis y Schuller, 1998).

Como perspectivas de este punto, la deducción de la secuencia de aminoácidos o la

determinación de la organización de la estructura terciaria por difracción de rayos X por cristales de MrL, permitirá confirmar su similitud con las moléculas de anticuerpos, su inclusión a la superfamilia de las inmunoglobulinas y la presencia de esta canónica. Así mismo se podría profundizar en el origen evolutivo del plegamiento de la SFIG y replantear la relación evolutiva entre los anticuerpos y las lectinas.

Especificidad sacarídica de MrL de langostino juvenil y adulto

A partir de la estructura tridimensional de varias lectinas con sus ligandos monosacarídicos, se han podido entender sus interacciones desde un nivel de resolución atómico. Estas interacciones se encuentran dadas por cationes divalentes y la combinación de puentes de hidrógeno, puentes coordinados y enlaces Van der Waals dados por los grupos hidroxilo de las moléculas de agua y el carbohidrato respectivamente, en contra de las cadenas laterales de los aminoácidos del sitio activo de la lectina, todo lo anterior provoca que los sitios de unión de las lectinas tiendan a ser relativamente de baja afinidad. Sin embargo los ligandos naturales para la mayoría de las lectinas son oligosacáridos que conforman una red que coopera con el sitio de unión en la lectina, y genera uniones de alta aivez, compensando así la baja afinidad (Sears y Wong, 1996). La especificidad de una lectina se define entonces, por el carbohidrato para el cual muestran la mayor afinidad. Esto significa que la mayoría de las lectinas pueden unir carbohidratos estructuralmente relacionados pero con menor afinidad (Varki *et al*, 2000).

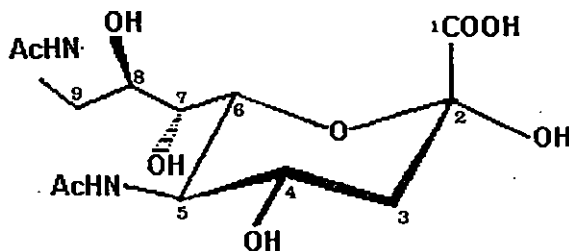
MrL del langostino juvenil y adulto mostró actividad aglutinante específica para eritrocitos de gallina, conejo y rata, pero no para eritrocitos de humano, oveja, cerdo y caballo. Un análisis detallado muestra que en la superficie de los eritrocitos de humano y oveja se encuentra con muy baja concentración ácido siálico N-acetilado en el carbono 5 (Neu5Ac). En los eritrocitos de caballo la N-acetilación se observa en los carbonos 4 y 5, mientras que en los eritrocitos de cerdo dicha acetilación se presenta en el carbono 5, conteniendo además un grupo glicolil (Neu5 Gc). Los eritrocitos de rata, conejo y gallina muestran diferentes porcentajes de ácido siálico N-acetilado en los carbonos 5 y 9, por lo que se deduce la importancia de estas sustituciones en estos carbonos para MrL (Figura 7). La eliminación en los eritrocitos de este carbohidrato por tratamiento enzimático con la neuraminidasa de *Vibrio cholerae*, evidenció una drástica

disminución de la actividad aglutinante, lo que refuerza el papel relevante de este azúcar y su interacción con MrL. Mediante ensayos de inhibición de la hemaglutinación con carbohidratos y glicoproteínas, se observó que MrL de ambos estadios es capaz de reconocer carbohidratos N-acetilados, tales como Neu5Ac, Neu5,9Ac, GlcNAc, GalNAc (Tabla 8). La posición del carbono anomérico del ácido siálico no posee una función importante, debido a que α y β metil glicósidos de ácido siálico, así como trisacáridos N-acetilados α 2-3 y α 2-6 sialil-lactosa (NeuAc α 2-3 y α 2-6Gal β 1,4GlcNAc), inhiben indistintamente la actividad de la lectina (Tabla 8).

A partir de la capacidad de glicoproteínas y glicopéptidos de fetuina para inhibir la hemaglutinación de MrL, se pudo apreciar que MrL reconoce preferentemente estructuras de tipo O-glicosídica (Gal β 1,3GalNAc) y con ácido siálico N-acetilado tales como la fetuina y la mucina submaxilar ovina y bovina. El efecto inhibitorio de estas glicoproteínas se perdió por la eliminación enzimática del ácido siálico, lo cual confirma nuevamente la relevancia del ácido siálico en la interacción con la lectina (Tabla 8).

Desde el punto de vista molecular, las diferencias en las afinidades observadas entre las isolectinas juveniles y la lectina de langostino adulta podrían explicarse por el incremento en las interacciones dadas por los mono, di, tri y oligosacáridos y el sitio activo de la lectina. Esto explicaría por qué los oligosacáridos y sialilglicoconjugados poseen una mayor fuerza inhibitoria de la hemaglutinación que los mono, di y trisacáridos. En resumen, las diferencias en las afinidades para los mono, di, trisacáridos, glicoconjugados y las isolectinas de MrL, son un punto más que apoya la teoría anteriormente expuesta sobre un papel de transporte de carbohidratos en las isolectinas juveniles y de defensa en la forma adulta.

Figura 7: Ácido siálico y sustituyentes acetilo en los carbonos 5 y 9, reconocidos por MrL.



Finalmente, es importante considerar que esta especificidad para derivados N-acetilo de ácido siálico y de otros azúcares es compartida por algunos arácnidos, moluscos y por la mayoría de las lectinas de hemolinfa descritos en el grupo decápoda (Tabla 12 y Tabla 1 de Introducción). Esto hace pensar en la existencia dentro del grupo decápoda un dominio de reconocimiento general, sumamente conservado, preservado evolutivamente, y tal vez con modificaciones pequeñas que permitan incrementar la afinidad para diversos substituyentes y responder así a las particularidades de cada especie.

Tabla 12: Lectina de Invertebrados específicas para ácido siálico y derivados N y O acetilo.

Decápodos (nombre común)	Especificidad	Autor
Cangrejos		
<i>Callinectes apichus</i> (cangrejo azul)	ácido siálico, GalNac, GlcNac	Cassels <i>et al.</i> , 1986.
<i>Cancer antennarius</i> (cangrejo marino)	ácido siálico, GlcNac	Ravindranath, 1987.
<i>Birgus latro</i> (cangrejo coco)	ácido siálico, GlcNac	Vasta y Cohen, 1984.
Langosta		
<i>Homarus americanus</i> (langosta)	ácido siálico, GalNac, GlcNac	Abel <i>et al.</i> , 1984.
Langostino		
<i>Macrobrachium rosenbergii</i> (langostino)	ácido siálico, GalNac, GlcNac	Vázquez <i>et al.</i> , 1993.
Arácnidos: Xiphosura		
<i>Carcinoscorpius rotunda</i> (cangrejo herradura India)	ácido siálico, GalNac, GlcNac	Mohan <i>et al.</i> , 1982.
<i>Limulus polyphemus</i> (cangrejo herradura)	ácido siálico, GalNac, GlcNac	Tsuboi <i>et al.</i> , 1993.
Escorpiones		
<i>Heterometrus granulomanus</i> (escorpión)	ácido siálico	Ahmed <i>et al.</i> , 1986.
Moluscos		
<i>Modiolus modiolus</i> (Mejillón)	ácido siálico	Tunkijjanukij <i>et al.</i> , 1997.
<i>Achatina fulica</i> (Caracol)	ácido siálico	Sen <i>et al.</i> , 1992.

En resumen, la especificidad de MrL la coloca como una herramienta importante para caracterizar glicoconjugados conteniendo ácido siálico con modificaciones acetilo en los carbonos 5 y 9. Estos derivados revisten un especial interés, debido que se ha demostrado que

participan activamente como señales de desarrollo y madurez de distintos grupos celulares y como marcadores de inicio y progresión de ciertos tipos de tumores (Varki, 1992; Fischer, 1995) y de patologías neurodegenerativas como el Alzheimer (Guevara *et al.*, 1999, Espinosa *et al.*, 2001).

VIII. CONCLUSIONES.

1. MrL de langostino juvenil posee cuatro isolectinas, mientras que el adulto sólo una. Las únicas diferencias entre ellas se encuentran en el porcentaje y composición de los azúcares de la porción sacarídica y en sus capacidades aglutinantes. Se propone una función dual de MrL en la biología del langostino, como una proteína de transporte de carbohidratos y de reconocimiento inmune.

2. MrL de langostino adulto posee dos N-glicanos y un O-glicano, sus proporciones mantienen un 11% del peso y ocurre un oligosacárido por monómero. Se propone una posible organización estructural.

3. La secuencia de aminoácidos de MrL del langostino adulto muestra similitud con la hormona hiperglucémica de *M. rosenbergii* y con las cadenas ligeras κ y χ de inmunoglobulina humana, y la organización de la estructura secundaria es similar al plegamiento de la superfamilia de las inmunoglobulinas, por lo que MrL podría ser un nuevo miembro.

4. La especificidad de MrL de langostino adulto y juvenil perfila a esta lectina como una herramienta útil para identificar y caracterizar glicoconjugados que funcionen como marcadores de inicio y progresión de diversas patologías.

IX.- REFERENCIAS.

- Abel C.A., Campbell P.A., VanderWall J., Hartman A.L. 1984. Studies on the structure and carbohydrate binding properties of lobster agglutinin I (LAg1), a sialic acid-binding lectin. *Prog. Clin. Biol. Res.* 157:103-14.
- Agundis C., Pereyra A., Zenteno E., Brassart C., Sierra C., Vázquez L., Zenteno E. 2000. Quantification of lectin in freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Comp. Biochem. Physiol.* 127B:165-172.
- Ahmed H., Chatterjee B.P., Kelm S., Schauer R. 1986. Purification of a sialic acid-specific lectin from the Indian scorpion *Heterometrus granulomanus*. *Biol. Chem. Hoppe. Seyler* 367:501-506.
- Amirante G.A., Basso V. 1984. Analytical study of lectin in squilla mantis *Leucophaea maderae*. (Crustacea:Stomatopoda) using monoclonal antibodies. *Dev. Comp. Immunol.* 8:721-726.
- Andrade M.A., Chacón P., Merelo J.J., Morán. F.1993. Evaluation of secondary structure of proteins from UV circular dichroism using an unsupervised learning neural network. *Prot. Eng.* 6, 383-390
- Angata T., Varki A. 2000. Cloning, characterization, and phylogenetic analysis of Siglec-9, a new member of the CD33-related group of siglecs. *J. Biol. Chem.* 275:22127-22135.
- Arason G.D. 1996. Lectins as defense molecules in vertebrates and invertebrates. *Fish Shellfish Immunology* 6:277-289.
- Armstrong P.B., Quigley J.P. 1999. Alpha2-macroglobulin: an evolutionary conserved arm of the innate immune system. *Dev. Comp. Immunol.* 23:375-390.
- Barre S., Greenberg A.S., Flajnik M.F., Chothia C. 1994. Structural conservation of hypervariable regions in immunoglobulins evolution. *Nat. Struct. Biol.* 12:915-20.
- Bacherie E. 2000. Shrimp immunity and disease control. *Aquaculture* 191:3-11.
- Baldo B.A., Sawywer W.H., Stick R.V., Uhlenbruck G. 1978. Purification and characterization of a galactan-reactive agglutinin from the clam *Tridacna maxima* (Roding) and a study of its combining domain. *Biochem. J.* 17:467-478.
- Bettencourt R., Gunne H., Gastinel L., Steiner H., Faye I. 1999. Implications of hemolin glycosylation and Ca⁺²-binding on homophilic and cellular interactions. *Eur. J. Biochem.* 266:964-976.
- Bidlingmeyer B.A., Cohen S.A., Tarvin T.L.1984. Rapid analysis of amino acids using pre-column derivatization. *J. Chromato.* 33:93-104.
- Bradford M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of protein utilizing the principles of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.
- Brown R.C., Bass H., Coombs J.P. 1975. Carbohydrate binding proteins involved in phagocytosis by *Acanthamoeba*. *Nature* 254:434-36.
- Camus M.L. 1899. Recherches experimentales sur une agglutinine produite par la glande de albumen chez l'*Helix pomatia*. *CR Hebd Seances Acad Sci.* 129:233-239.
- Cassels F.J., Marchalonis J.J., Vasta G.R. 1986. Heterogeneous humoral and hemocyte-associated lectins with N-acylaminosugar specificities from the blue crab, *Callinectes sapidus* Rathbun. *Comp. Biochem. Physiol.* 8:23-30.
- Cavalli R.O., Berghe E.V., Lavens P., Thuy N.T., Wille M., Sorgeloos P. 2000. Amonia

- toxicity as a criteria for the evaluation of larval quality in the prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Comp. Biochem. Physiol.* 25:333-343.
- Cheng T.C., Sanders B.G. 1962. Internal defense mechanism in molluscs and electrophoretic analysis of a natural hemagglutinin in *Viviparus malleatus*. *Revé. Proc. Penn. Acas. Sci.* 36:72-79.
- Cheng W., Chen J.C. 1998. Enterococcus like infections in *Macrobrachium rosenbergii* are exacerbated by high pH and temperature but reduced by low salinity. *Disease of Aquatic Organisms* 34:103-108.
- Cheng W., Chen J.C. 2000. Effects of pH, temperature and salinity on immune parameters of freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Fish and Shellfish Immunobiology* 10:387-391.
- Cohan S., Dorai D.T., Srimal S., Bachhawat B.K., Das M.K. 1984. Circular dichroism studies on carnoscorpin, the sialic acid binding lectin of horseshoe crab *Carcinoscorpius rotunda*. *Indian. J. Bioch. Biophys.* 21:151-155.
- Cohen E. 1968. Immunological observations of the agglutinins on the hemolymph of *Limulus polyphemus* and *Birgus tatro*. *Trans. NY. Acad. Sci.* 30:427-32.
- Debray H. 1998. Use of lectins. In *Methods on glycoconjugates*. Ed. Andre Verbet, Harword Academic Publishers. Switzerland.
- Destoumieux D., Bulet P., Loew D., Van Dorsselaer A., Rodriguez J., Bachere E. 1997. Panetidins: a new family of antimicrobial peptides in the shrimp *Penaeus vannamei* (Decapoda). *J. Biol. Chem.* 272:28398-28406.
- Drickamer K. 1991. Clearing up glycoprotein hormones. *Cell* 67:1079-82.
- Duvic B., Soderhall K. 1992. Purification of a β -1,3-glucan binding protein membrane receptor from blood cells of the crayfish *Parcifastacus leniusculus*. *Eur. J. Biochem.* 207:223-228.
- Espinosa B., Zenteno R., Mena R., Robitaille Y., Zenteno E., Guevara J. 2001. O-glycosilation in sprouting neurons in Alzheimer's disease, indicating reactive plasticity. Aceptado para su publicación en: *J. Neuropatol. Exp. Neurol.*
- Fermi B., Nathan R.D. 1991. Removal of sialic acid alters both T and L-type calcium currents in cardiac myocytes. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 260:735-38.
- Freire-Márquez M.R., Barracco M.A. 2000. Lectins, as non-self recognition factors, in crustaceans. *Aquaculture* 191:23-44.
- Fischer E., Brossmer R. 1995. Sialic acid-binding lectins: submolecular specificity and interaction with sialoglycoproteins and tumour cells. *Glycoconj. J.* 12:707-13.
- Guevara J., Espinosa B., Zenteno E., Vázquez L., Luna J., Perry G., Mena R. 1998. Altered glycosilation pattern of proteins in Alzheimer disease. *J. Neuropatol Exp. Neurol.* 57:905-914.
- Glick G.D., Toogood P.L., Wiley D.C., Skehel J.J., Knowles J.R. 1991. Ligand recognition by influenza virus. The binding of bivalent sialosides. *J. Biol. Chem.* 266:23660-66.
- Hansen J.E., Lund O., Tolstrup N., Gooley A.A., Williams K.L., Brunk S. 1998. NetOglyc. Prediction of mucine type O-glycosilation sites based on sequence context and surface accessibility. *Glyco. J.* 15:115-130.
- Hall J.L., Rowlands D.T. 1974. Heterogeneity of lobster agglutinins: II Specificity of agglutinin-erythrocyte binding. *Biochemistry* 13:828-832.
- Hellman U., Wernstedt C., Gonez J., Heldin C.H. 1995. Improvement of an "In-Gel"

- digestion procedure for the micro preparation of internal protein fragments for amino acid sequencing. *Anal. Biochem.* 224:451-455.
- Imai T., Goto R., Kittarka J., Kamiya H. 1994. Lectins in the rock lobster *Jasus novaehollandiae* hemolymph. *Crustaceana* 284:1313-1318.
- Iwanaga S., Kawabata S.I. 1998. Evolution and phylogeny of defense molecules associated with innate immunity in horseshoe crab. *Front. Biosci.* 3:973-984.
- Johnson H.M. 1964. Human blood group A-specific agglutinins of the butter clam *Saxidomus giganteus*. *Science* 146:548-50.
- Kawabata S., Nagayama R., Hirata M., Shigenaga T., Takagi T.S., Iwanaga S. 1996. Tachycitin a smaller granular component in horseshoe crab haemocytes, is an antimicrobial protein with chitin-binding activity. *J. Biochem.* 120:1253-1260.
- Komano H., Natori S. 1985. Participation of *Sarchophaga peregrina* lectin in the lyses of sheep red blood cells injected into the abdominal cavity of larvae. *Dev. Comp. Immunol.* 9:31-36.
- Kongtawelert P. 1998. Isolation and characterization of a lectin from the Thaima crab (*Scylla serrata*), with binding specificity to sialoglycoconjugates and its application. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* 7:280-286.
- Kondo M., Itami T., Takahashi Y. 1998. Preliminary characterization of lectins in the hemolymph of kuruma prawn. *Fish Pathol.* 33:429-435.
- Kopacek P., Grubhoffer L., Soderhall K. 1993. Isolation and characterization of a hemagglutinin with affinity for lipopolysaccharides from plasma of the crayfish *Pacifastacus leniusculus*. *Dev. Comp. Immunol.* 17:407-418.
- Laemmli U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-683.
- Lanz H., Feya I. 1999. Aspects of the immunoglobulin superfamily in invertebrates. *Dev. Comp. Immunol.* 23:359-374.
- Lazikani-Al B., Lesk A.M., Chothia C. 1997. Standard conformations for the canonical structures of Immunoglobulins. *J. Mol. Biol.* 273:927-948.
- Lee Y.F., Shih T.W., Chang C.F. 1997. Isolation and characterization of the female-specific protein (vitellogenin) in mature female hemolymph of the freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* comparison with ovarian vitellin. *Gen. Comp. Endocrinol.* 108:406-15.
- Lin C.Y., Chen S.H., Kou G.H., Kuo C.M. 1999. Identification and characterization of a hyperglycemic hormone from the freshwater giant prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Comp. Biochem. Physiol.* 121:315-321.
- Lis H., Sharon N. 1999. Lectins: Carbohydrate specific proteins that mediate cellular recognition. *Chem. Rev.* 98:637-674.
- Marchalonis J.J., Shulter S.F. 1998. A stochastic model for the rapid emergence of specific vertebrate immunity incorporating horizontal transfer of systems enabling duplication and combinatorial diversification. *J. Theor. Biol.* 193:429-444.
- Mauchamp B. 1982. Purification of a N-acetyl-D-glucosamine specific lectin (P.B.A.) from epidermal cell membrane of *Pieris brassicae*. *L' Biochimie* 64:1001-1012.
- Middleton D., Holdich D.M., Ratcliffe N.A. 1996. Haemagglutinins in six species of freshwater crayfish. *Comp. Biochem. Physiol.* 114:143-152.
- Mohan S., Thambi D., Srimal S., Bachhawat B.K. 1982. Binding studies of a sialic acid-

- specific lectin from the horseshoe crab *Carcinoscorpius rotunda* cauda with various sialoglycoproteins. *Biochem. J.* 203:253-61
- Muller W.E.G., Maidhof A., Zahn R.K., Conrad J., Rose T., Stefanovich P., Muller I., Friese U., Uhlenbruck G. 1984. Biochemical basis for the symbiotic relationship of *Didemnum prochloron* (Prochlorophyta). *Biol. Cell* 5:381-389.
- Morea V., Lesk A.M., Tramontano A. 2000. Antibody modeling: Implications for engineering and design. *Methods* 20: 267-269.
- Muramoto K., Ogata K., Kamyia H. 1985. Comparison of the multiple agglutinins of the acorns barnacle *Megabalanus rosa*. *Agric. Biol. Chem.* 49:85-93.
- Muta T., Iwanaga S. 1996. The role of hemolymph coagulation in innate immunity. *Curr. Opin. Immunol.* 8:41-47.
- Nalini M., Mullainadhan P., Arumugam M. 1994. Characterization of a natural hemagglutinin in the serum of a fresh-water crab *Parathelphusa hydrodromus*. *Arch. Int. Physiol. Biochem. Biophys.* 102:259-264.
- New M.B. 1995. Status of freshwater prawn farming: a review. *Aquacul. Res.* 26:1-54.
- Ni Y., Tizard I. 1996. Lectin-carbohydrate interaction in the immune system. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 55:205-223.
- Noguchi H. 1903. On the multiplicity of the serum agglutinins of cold-blooded animals. *Mentralbt Bakteriol I Abt Orig.* 34:286-297.
- Oheda M., Hasegawa M., Hattori K., Kuboniwa H., Kojima T., Orita T., Tumonou K., Yamazaki T., Ochi N. 1990. O-linked sugar chain of human granulocyte colony – stimulating factor protects it against polymerization and denaturing allowing to retain its biological activity. *J. Biol. Chem.* 265:11432-38.
- Pistole T.G. 1982. Limulus lectins: analogues of vertebrate immunoglobulins. *Prog. Clin. Biol. Res.* 81:283-288.
- Peebles J.B. 1977. A rapid technique for molt staging in live *Macrobrachium rosenbergii*. *Aquaculture* 12:173-180.
- Persson M., Vey A., Soderhall K. 1987. Encapsulation of foreign particles in vitro by separated blood cells from crayfish, *Astacus ledptodactylus*. *Cell Tissue Res.* 247:409-303.
- Prokop O., Racwitz A., and Schlesinger D. 1965. A new human blood group receptor A_{bel} tested with saline extracts from *Helix hortensis* (garden snail). *J. Forensic. Med.* 12:108-112.
- Ravindranath M.H., Paulson J.C. 1987. O-acetyl sialic acid-specific lectin from the crab *Cancer antennarius*. *Methods Enzymol.* 138:520-527.
- Rost B., Sander C. 1993. Prediction of protein structure at better than 70% accuracy. *J Mol. Biol.* 232:584-599.
- Sears P., Wong C.H. 1996. Intervention of carbohydrate recognition by proteins and nucleic acids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93:12086-12093.
- Sen G., Mandal C., Chowdhury M. 1992. Albumen gland of the snail *Achatina fulica* is the site for synthesis of *Achatinin h*, a sialic acid binding lectin. *Mol. Cell. Biochem.* 117:133-8.
- Shishikura F., Sekiguchi K. 1984. Studies on the perivitelline fluid of horseshoe crab embryo. Purification of agglutinin-binding substance from the perivitelline fluid of *Tachypleus gigas* embryo. *J. Biochem.* 96:629-632.
- Sierra C., Perez A., Agundis C., Zenteno E., Vázquez L. 1999. Subcellular localization of a

- seric lectin in haemocytes from *Macrobrachium rosenbergii* (Decapoda, Nanantia) and its role in phagocytosis. Proc. 4th. Int. Crust. Congr. I:961-970.
- Smith V.J. Soderhall K. 1983. Induction of degranulation and lyses of haemocytes in the freshwater crayfish, *Astracus astacus* by components of the prophenoloxidase activating system in vitro. Cell Tiss. Res. 233:295-303.
- Soderhall K., Cerenius L. 1998. Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity. Curr. Op. Immunol. 10:23-28.
- Spiro R.G., Bhoyroo V.D. 1974. Structure of the O-glycosidically linked carbohydrate unit of fetuin. J. Biol. Chem. 249:5704-17.
- Sreerama N., Woody R.W. 1994. Protein secondary structure from circular dichroism spectroscopy combining variable selection principle and cluster analysis with neural network, ridge regression and self-consistent methods. J. Mol. Biol. 242:497-507.
- St Jhon T., Meyer J., Idzerda R., Gallatin W.M. 1990. Expression of CD4 confers a new adhesive phenotype on transfected cells. Cell 60:45-54.
- Su X.D., Gastinel L.N., Faye I., Poon P., Bjorkman P.J. 1998. Crystal structure of hemolin, a horseshoe shape with implications for homophilic adhesion. Science 281:991-995.
- Sung H.H., Chang H.J., Her C.H., Chang J.C., Song Y.L. 1998. Phenoloxidase activity of hemocytes derived from *Penaeus monod* and *Macrobrachium rosenbergii*. J. Inv. Pathol. 71:26-23.
- Sung H.H., Sun R. 1999. Intrahemocytic activity of lysosomal enzymes in *Penaeus monod* and *Macrobrachium rosenbergii*. Fish and Shellfish Immunol. 9:505-508.
- Thornqvist P.O., Johanson M.W., Soderhall K. 1994. Opsonic activity of cell adhesion proteins and β -1,3-glucan binding proteins from two crustacean. Dev. Comp. Immunol. 18:3-12.
- Toda M., Jimbo M., Muramoto K., Sakai R., Kamiya H. 1998. Isolation and characterization of a D-galactose binding lectin from the acorn barnacle *Balanus rostratus*. Fish Sci. 64:638-642.
- Trip M.R. 1960. Mechanisms of removal of injected microorganisms from the American oyster, *Crassostrea virginica*. Gemelin Biol. Bull. 119:273-286.
- Tsuboi I., Matsukawa M., Sato N. 1993. Isolation and characterization of a sialic acid-specific lectin from hemolymph of the Southeast Asian horseshoe crab *Tachypleus gigas*. Biosci. Biotechnol. Biochem. 57:1237-42.
- Tsuboi I., Matsukawa M., Sato N., Kimura S. 1993b. Isolation and characterization of a sialic acid-specific binding lectin from the hemolymph of Asian horseshoe crab, *Tachypleus tridentatus*. Biochem. Biophys. Acta 1156:255-262.
- Tunkijjanukij S., Mikkelsen H.V., Olafsen J.A. 1997. A heterogeneous sialic acid-binding lectin with affinity for bacterial LPS from horse mussel (*Modiolus modiolus*) hemolymph. Comp. Biochem. Physiol. 117:273-79.
- Tyson C.J., Jenkin C.R. 1974. Phagocytosis of bacteria in vitro by haemocytes from the crayfish (*Parachaeeraps bicarinatus*). AJEBAK. 52:341-348.
- Umetsu K., Yamashita K., Susuki T. 1991. Purification and carbohydrate binding specificity of a blood-type B binding lectin from hemolymph of a crab (*Charibdis japonica*). J. Biochem. 109:718-721.
- Vacquier V.D., Moll G.W. 1977. Isolation of bindin: The protein responsible for adhesion of sperm to sea urchin eggs. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 74:2456.

- Van den Steen P., Ruud M.P., Dwek A.R., Opdenaker G. 1998. Concepts and principles of O-glycosylation. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 33:151-208.
- Vargas-Albore F. 1995. The defense system of brown shrimp (*Penaeus californiensis*): humoral recognition and cellular responses. *J. Mar. Biothecnol.* 3:153-156.
- Varki A., 1992. Diversity in the sialic acids. *Glycobiology* 2:25-40.
- Varki A., 1993. Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct. *Glycobiology* 3:97-127.
- Varki A., Cummings R., Esko J., Freeze H., Hart G., Marth J. 2000. *Essentials of Glycobiology*. Ed. Kaaren Jansen. Cold Spring Harbor Lab. EU.
- Vasta G.R., Cohen E. 1984. Carbohydrate specificities of *Birgus latro* (coconut crab) serum lectins. *Dev. Comp. Immunol.* 8:197-202.
- Vasta G.R. 1992. Invertebrate lectins: distribution, synthesis, molecular biology, and function. En *Glycoconjugates*. Eds. Allen H.J., Kisalius E., C. Marcel Dekker, New York, USA.
- Vázquez L., Massó F., Rosas P., Montaña L.F., Zenteno E. 1993. Purification and characterization of a lectin from *Macrobrachium rosenbergii* (Crustacean, Decapoda) hemolymph. *Comp. Biochem. Physiol.* 105:617-623.
- Vázquez L., Lanz H., Montaña L.F., Zenteno E. 1994. Biological activity of the lectin from *Macrobrachium rosenbergii* hemolymph, in VanDriessche E, Bog Hansen TC (eds). *Lectins: Biol. Biochem. Clin. Chem. Textop* Hellerup, Denmark 10:261-5.
- Vázquez L., Jaramillo L., Lascrain R., Cooper E.L., Rosas P., Zenteno E. 1996. Bacterial agglutination by sialic acid specific serum lectin from *Macrobrachium rosenbergii*. *Comp. Biochem. Physiol.* 113:355-359.
- Vázquez L., Maldonado G., Agundis C., Cooper E., Zenteno E. 1997. Participation of sialic acid specific lectin from freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* hemocytes in the recognition of non-self cells. *J. Exp. Zool.* 279:265-272.
- Vázquez L., Sierra C., Agundis C., Juárez S., Zavala A., Zenteno E. 1998. Mecanismos de defensa en crustáceos. *Interciencia* 23: 344-348.
- Veiga S.S., Grenski W., dos Santos V.L., Feitosa L., Nader H.B., Dietrich C.P., Brentani R.R. 1999. Oligosaccharide residues of *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom proteins: dependence on glycosylation for dermonecrotic activity. *Toxicon* 37:587-607.
- Vijayram K., Geraldine P. 1996. Are the heavy metals cadmium and zinc regulated in freshwater prawns?. *Ecotoxicology and environment safety* 34:180-183.
- Wetzler L.M., Barry K., Gotschlich E.C. 1992. Gonococcal lipopolisaccharide sialylation prevents complement-dependent killing by immune sera. *Infect. Immunol.* 60:39-43.
- Wickins J.F., Beard T.W. 1974. Observations on the breeding and growth of the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* (de Man) in the laboratory. *Aquaculture* 3: 159-174.
- Wozniak M., Jones G. 1990. Glycosylation and isoform variation of juvenile hormone esterase in the fat body and hemolymph during metamorphosis of *Trichoplusia ni* (Lepidoptera). *Mol. Cell. Endocrinol.* 70:255-62
- Yeaton R.W. 1981. Invertebrate lectins: I. Occurrence. *Dev. Comp. Immunol.* 5:391-412.
- Zanneta J.P., Timmerman T., Leroy Y. 1999. Gas liquid chromatography of the heptafluorobutirate derivatives of the O-methyl glycosides on capillary columns a method for quantitative determination of the monosaccharide composition of

- glycoproteins and glycolipids. *Glycobiology* 9:255-66.
- Zenteno E., Qin Z., Ortega M., Montreuil J., Debray H. 1994. Fast purification of *Phaseolus vulagris* isolectins. *Prep. Biochem.* 24: 175-83.
- Zenteno R., Hernández J., Espinosa B., Reyez-Leyva J.R., Zenteno E. 1998a. Prediction of the secondary structure of the Hemagglutinin-Neuraminidase from the porcine paramyxovirus LPM. *Arch. Virol.* 143:1-20.
- Zenteno R., Perez A., Juarez S., Agundis C., Zenteno E., Vázquez L. 1998b. Characterization of haemocytes of the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* by lectin histochemistry. *Crustaceans and the Biodiversity crisis. 4th International crustacean congress* I:971-979.



Identification of lectin isoforms in juvenile freshwater prawns *Macrobrachium rosenbergii* (DeMan, 1879)

Roberto Zenteno^{1*}, Lorena Vázquez², Salvador Martínez-Cairo³, Stephane Bouquelet⁴,
Concepción Agundis⁵ and Edgar Zenteno⁵

¹Departamento de Bioquímica, Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, Calzada de Tlalpan 4502, 01040 México, ²Laboratorio de Lectinas, CIQ, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Cuernavaca Morelos, 62210 México, ³Unidad de Investigación, Centro Médico Nacional, IMSS, 10300 México, ⁴Laboratoire de Chimie Biologique de la Université des Sciences et Technologies de Lille, UMR du CNRS n° 8576, Villeneuve d'Ascq, 59655 France, ⁵Laboratorio de Inmunología, Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM, P.O. Box 79158, 04510 México

From the serum of juvenile freshwater prawns, we isolated by affinity chromatography on glutaraldehyde-fixed rat erythrocytes stroma, immobilized in Sephadex G-25, a sialic acid specific lectin of 9.6kDa per subunit. Comparative analysis against adult organisms purified lectin, by chromatofocusing, showed that the lectin from juvenile specimens is composed by four main isoforms with a pI of 4.2, 4.6, 5.1, and 5.6, whereas the lectin from adults is eluted at pH 4.2. The amino acid composition of the lectin obtained from adult and juvenile stages suggest identity, but the compositions are not identical since a higher content of carbohydrates was found in the lectin from younger organisms. The freshwater prawn lectin showed specificity toward N-acetylated amino sugar residues such as GlcNAc, GalNAc, Neu5Ac and Neu5,9Ac; but in juvenile organisms the lectin showed three times less hemagglutinating activity than the lectin from adults. Both lectins agglutinated rat, rabbit and chicken erythrocytes, indicating that Neu5,9Ac in specific O-glycosidically linked glycans seems to be relevant for the interaction of *M. rosenbergii* lectins with their specific cellular receptor. Our results suggest that the physicochemical characteristics of the lectin from the freshwater prawn are regulated through maturation.

Keywords: *Macrobrachium rosenbergii*, sialic acid specific lectin, crustacean lectin

Introduction

Lectins seem to be ubiquitous proteins in the hemolymph of several invertebrates. They are apparently synthesized by hemocytes [1,2] and can, as occurs in many species, bind to the surface of these cells or circulate in a soluble form in the hemolymph [1–3]. Due to their specificity for sugar residues, in defined sequences or in complex glycoconjugates, it has been assumed that lectins participate as mediators in foreign-substance recognition and ulterior elimination by hemocytes with phagocytic activity [2,3]. Some reports indicate that besides their participation in defense mechanisms, lectins in invertebrates have relevant roles in nutrition, development, symbiosis, tissue reorganization, and cell adhesion [1,2].

The occurrence of lectins in a wide variety of organisms with conserved domains and related functional features

supports their important biological roles [2,4]; in recent times, considerable attention has been focused on lectins with capacity to bind specifically sialoglycoconjugates because of their biological relevance and diagnostic value [5–7]. Sialic acid specific lectins have been identified in Arthropoda, Mollusca and Urochordata among other invertebrates [1,2]. In a previous work, we purified and partially characterized a sialic acid-binding lectin from the hemolymph of *Macrobrachium rosenbergii* freshwater prawns [8]. This lectin, which seems to be synthesized by granular hemocytes [9], reacts with sialoglycoconjugates and agglutinates some bacteria through specific interaction with N- and O-acetylated sugar residues present in the bacterial cell wall [10], suggesting its active participation in defense mechanisms of adult organisms.

The freshwater prawn *M. rosenbergii* is a crustacean species of worldwide interest but in contrast to the high farming capacity of this specie in the adult stage, the survival rate of larvae is highly variable from facility to facility [11], suggesting that some defense mechanisms could be modified

*To whom correspondence should be addressed: E. Zenteno, Fax: 52(5)61624-19; E-mail: ezenteno@servidor.unam.mx

throughout maturation. In this paper we report the isolation and the chemical characterization of the lectin present in the hemolymph of juvenile specimens and compare its physico-chemical and biological properties with the lectin obtained from adult organisms, our aim being a better understanding of the biological role and regulation of the activity of these proteins through maturation.

Materials and methods

Lectin extraction and purification

Freshwater *Macrobrachium rosenbergii* prawns were obtained in Jojutla, Morelos, Mexico. Maturation stages were based upon weight and body characteristics, as suggested by Wickins and Beard [12]. Freshwater prawns were separated in two main groups according to their maturation stage: adults in intermolt and postlarvae or juvenile. Hemolymph was extracted from the pericardial sinus, and the serum obtained after centrifugation at $16\,000 \times g$ at 4°C for 30 min was dialyzed against tris-buffered saline (TBS: 50 mM Tris-HCl, 0.15 M NaCl, 3 mM CaCl_2 , pH 7.4). The lectin present in the hemolymph of each animal group, was purified by affinity chromatography on a column (1.5×25 cm) containing glutaraldehyde fixed rat erythrocytes stroma entrapped in Sephadex G-25, the column was equilibrated with TBS at 10 ml/h flow rate, 1.5 ml hemolymph (containing 266 mg protein) was deposited onto the column. The unretained fraction was eluted with TBS and the lectin was eluted by addition of 3% acetic acid in water [13]. Fractions of 1.5 ml were collected, dialyzed with Bis-Tris buffer (25 mM Bis-Tris, 25 mM iminodiacetic acid, pH 7.2), before determining the optical density (at A_{280}) of each fraction and the hemagglutinating activity in the presence of rat erythrocytes.

Chromatofocusing of MrL

The affinity-purified lectin (500 μg) from adult and juvenile organisms was applied into a mono P pre-packed HR column 5/5 mm (Pharmacia, Uppsala, Sweden). The column was equilibrated with Bis-Tris buffer, at a flow rate of 1 ml/min with a maximal pressure of 40 bars using an FPLC system (Pharmacia, Uppsala, Sweden). The lectin isoforms were eluted from the column with a continuous pH gradient, in a 60-min program, using the Pharmalyte pH 7 to 4 polybuffer (Pharmacia) [14]. Fractions of 1 ml were collected and the hemagglutinating activity was determined in the presence of a 2% rat erythrocytes suspension in TBS. For each fraction, the pH and optical density (at A_{280}) were monitored. Each eluted peak was dialyzed against distilled water before lyophilization for further analysis.

Separation of MrL isoforms

The MrL isoforms from juvenile organisms obtained after chromatofocusing were applied into a mono P prepacked HR

column 5/5 mm, in anionic form, equilibrated previously with 50 mM Bis-Tris buffer, pH 7.5, at a flow rate of 1 ml/min with a maximal pressure of 40 bars, in a 60 min program using an FPLC system. The MrL isoforms were eluted from the column with a 0-1 M NaCl stepwise gradient in Bis-Tris buffer. Fractions of 1 ml were collected and optical density was monitored at A_{280} . Each eluted peak was dialyzed against distilled water before lyophilization for further analysis. The main fractions separated by ion-exchange chromatography were dialyzed against Bis-Tris buffer, pH 7.5 and re-chromatofocused on the Mono-P column to confirm their pI, in the conditions previously indicated.

Analytical methods

Protein concentration was determined by the method of Bradford [15] using bovine serum albumin as standard. Amino acid composition of 100 μg of purified lectin was determined after hydrolysis for 24 h under vacuum with 2 ml of 6 N HCl at 110°C in sealed containers, in a Beckman 119-CL amino acid analyzer [16]. Carbohydrate content and composition of the lectin, its isoforms, and all glycoproteins used in this study, was determined with the heptafluorobutyrate derivatives of O-methyl-glycosides, obtained after hydrolysis with 0.5 N methanol-HCl for 24 h at 100°C , by gas-chromatography with a capillary column (25×0.32 mm) of 5% Silicone OV 210, (Applied Science Lab, Buffalo, NY), in a Varian 2100 gas chromatograph (Orsay, France); the carrier gas was helium at a pressure of 0.6 bar, and the oven temperature programmed from 100 to 240°C at 2°C per min [17]. L-lysine (Sigma Chem., St Louis, MO) was used as internal standard. Identification of each sugar residue was confirmed by mass spectrometry using the Finnigan Automass II mass spectrometer, the HFB derivatives of the O-methyl glucosides of monosaccharides presented relatively high mass: 978 for hexoses, 977 for hexosamines and 1275 for sialic acid [17].

Polyacrylamide gel electrophoresis

The molecular mass and the homogeneity of the purified lectin and its isoforms were evaluated in 10% polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) in the presence of 0.1% sodium dodecyl sulfate (SDS), using the Laemmli buffer system [18], gels were stained with 0.1% Coomassie brilliant blue.

Hemagglutinating activity

Human erythrocytes type A, B, and O from healthy donors were obtained from the Central Blood Bank IMSS, Mexico. Rat, mice, rabbit, sheep, horse, pig and chicken red cells were obtained from the animal facilities at Facultad de Medicina Veterinaria, UNAM, Mexico. The hemagglutinating activity of the *M. rosenbergii* purified lectin and its isoforms was assayed in microtiter U plates (NUNC, Denmark) according to a two-fold serial dilution procedure [8]. The agglutinating activity

was tested with 2% erythrocyte suspension in TBS. Hemagglutinating activity of each purified lectin isoform is reported as the specific activity, which corresponds to the hemagglutinating units/mg lectin. Hemagglutination assays were also performed in the presence of erythrocytes previously treated with *Vibrium cholerae* (Sigma) neuraminidase (0.1 U per 500 μ l of packed erythrocytes at 37°C for 30 min).

Preparation of glycans and asialoglycoproteins

Fetuin glycosylpeptides were obtained by *Streptomyces griseus* pronase treatment (1 mg of enzyme per 10 mg of glycoprotein incubated for 48 h at 37°C). The O- and N-glycosylpeptides were fractionated by gel filtration on a column (1.6 \times 100 cm) containing Bio-Gel P4 equilibrated with 0.05 M pyridine acetate, pH 4.5 [19]. Each O- and N-glycosylpeptide was desalted by filtration on a column (2 \times 60 cm) containing Bio-Gel P2, equilibrated with 0.5 M acetic acid in distilled water, lyophilized, and kept at 4°C until use. Glycoproteins and O-glycosylpeptides from fetuin were desialylated by incubation at 100°C for 1 h in the presence of 0.02 N sulfuric acid, as described by Spiro and Bhoyroo [20], and desalted on a Biogel P-2 column (2 \times 60 cm) equilibrated with 0.5 M acetic acid. The carbohydrate composition of each glycoprotein and glycosylpeptide was determined by gas-liquid chromatography.

Sugar specificity

The lectin's sugar specificity was confirmed by comparing the inhibitory activity of various sugars, glycoproteins, glycosylpeptides and their desialylated derivatives, on the hemagglutination induced by these lectins against rat erythrocytes as follows: the lectin was diluted in TBS to four hemagglutinating units (HAU, titer = 4), 25 μ l of this lectin dilution was placed in microtiter U plates and incubated 1 h at room temperature with 25 μ l of different concentrations of sugars, glycoproteins and glycosylpeptides, then 25 μ l of a 2% rat erythrocytes suspension in TBS was added. Results are expressed as the minimal concentration required to inhibit four hemagglutinating units [10]. The molar concentration of glycoproteins and glycopeptides was calculated on the basis of their oligosaccharide content as determined by gas chromatography.

Results

Purification of the lectin from adult and juvenile organisms

The maturation stage of freshwater prawns was determined based mainly on weight and some morphological characteristics. The organisms considered juvenile or postlarval were specimens with an average weight of 2.33 \pm 0.5 g (n = 25), translucent body and undeveloped chelae. Adults were specimens with an average weight of 13.2 \pm 1.5 g (n = 35), developed chelae tips, and a hard exoskeleton. From the hemolymph of juvenile and adult freshwater prawns, we

purified a lectin by affinity chromatography using glutaraldehyde-treated stroma from rat erythrocytes. In both cases, the lectin was eluted from the affinity chromatography column by decreasing the pH of the chromatography medium to 2.8 by addition of 3% acetic acid. The protein yield in the purification process indicated that the purified lectin represents 1.4 and 0.7% of the protein content of the hemolymph of juvenile and adult organisms, respectively.

Chromatofocusing of the lectin from adult and juvenile organisms

As indicated in Figure 1, the chromatofocusing analysis revealed that the lectin from adult freshwater prawns is constituted by a homogeneous group of proteins (termed A-I), since 90% of the hemagglutinating activity is eluted at pH 4.2 in a single peak (Figure 1a), whereas the elution profile of the lectin purified from juvenile organisms is constituted by four main isoforms (termed as J-I to IV, Figure 1b). Further purification of the lectin isoforms from juvenile organisms was performed by ion exchange chromatography. Figure 2, shows the purification profile for isolectins J-I and J-IV; the elution of J-II and J-III lectin isoforms was similar to the profile observed with J-IV isoform. The main fractions obtained in such chromatographic procedure were rechromatofocused on the Mono-P column, and our results indicated that the isoforms eluted at pH 5.6, 5.1, 4.6 and 4.2, corresponded to isoforms J-I to J-IV, respectively. The J-IV isoform, with a pI of 4.2, contained 51% of the hemagglutinating activity loaded on the column. Isoforms J-II and J-III eluted at pH 5.1 and 4.6, contained 18 and 20% of the initial hemagglutinating activity, respectively. The lowest hemagglutinating activity was observed in the J-I isoform, which contained 11% of the hemagglutinating activity loaded onto the column. The J-IV isoform seems to correspond to the AI lectin of adult organisms, since it is eluted at the same pH from the column (pH 4.2) and showed the highest hemagglutinating activity (Figure 1a, b).

Chemical characterization

The purified lectin from adult or juvenile organisms, as well as its purified isoforms, is a homogeneous glycoprotein of 9.6 kDa as determined by SDS-PAGE analysis (Figure 3). The amino acid composition of both, juvenile and adult purified lectins suggest identity, but the compositions are not identical (Table 1). Both lectins are constituted mainly by glycine, serine, glutamic and aspartic acid residues and, in minor proportion, by cysteine and tryptophan residues but lower amounts of amino acids such as isoleucine, phenylalanine, arginine, and threonine were observed in the lectin from juvenile organisms than in the lectin from adults (Table 1). The saccharidic part of both lectins showed quantitative and qualitative differences, the lectin obtained from juvenile organisms is more glycosylated than the lectin from adults, it contained 15% of sugars per weight as

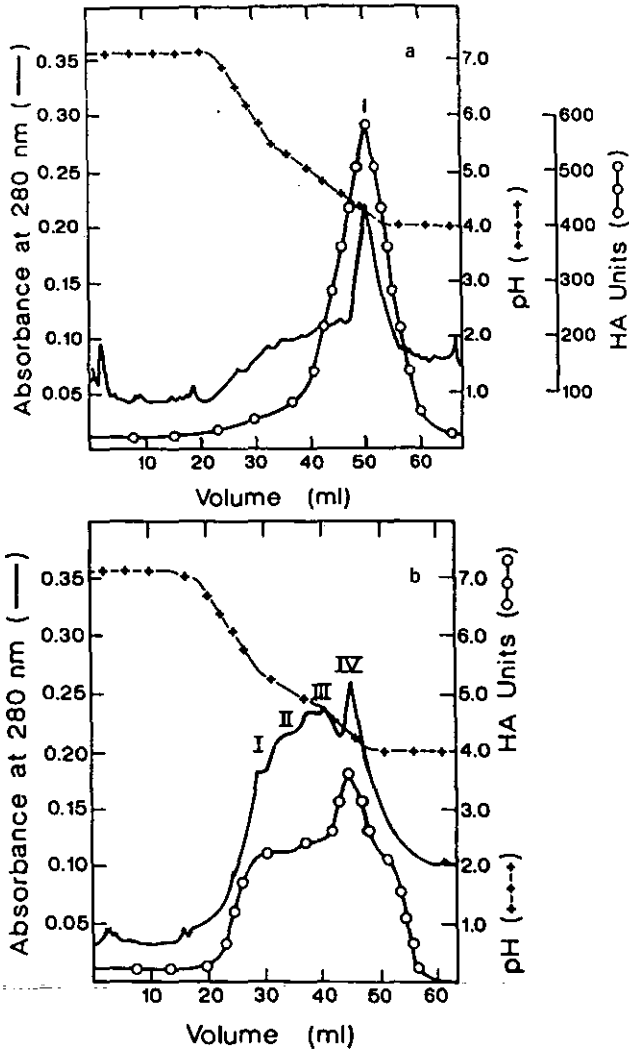


Figure 1. Isolation of the isoforms of the lectin from adult (a) and juvenile (b) *Macrobrachium rosenbergii* freshwater prawns by chromatofocusing. Each lectin (500 μ g) was applied into a Mono P column in an FPLC system. The protein was eluted using a pH gradient with a pH 7.2 to 4 polybuffer (+ + +). Detection of the optical density of each 1.5 ml fraction was at A_{280} (continuous line). Hemagglutinating activity was determined in the presence of rat erythrocytes (O-O), results represent the total hemagglutinating units (HAU) in each collected fraction.

opposed to 11% in adult organisms (Table 2) as determined by gas-chromatography. As shown in Table 2, juvenile isolectins contained Gal, Man, and GlcNAc residues and, in minor proportion, GalNAc; juvenile J-IV isoform also

contained N-acetyl-neuraminic acid. A similar composition of carbohydrates was observed in the lectin from adult organisms. These results indicate that proportionally the adult lectin is more sialylated.

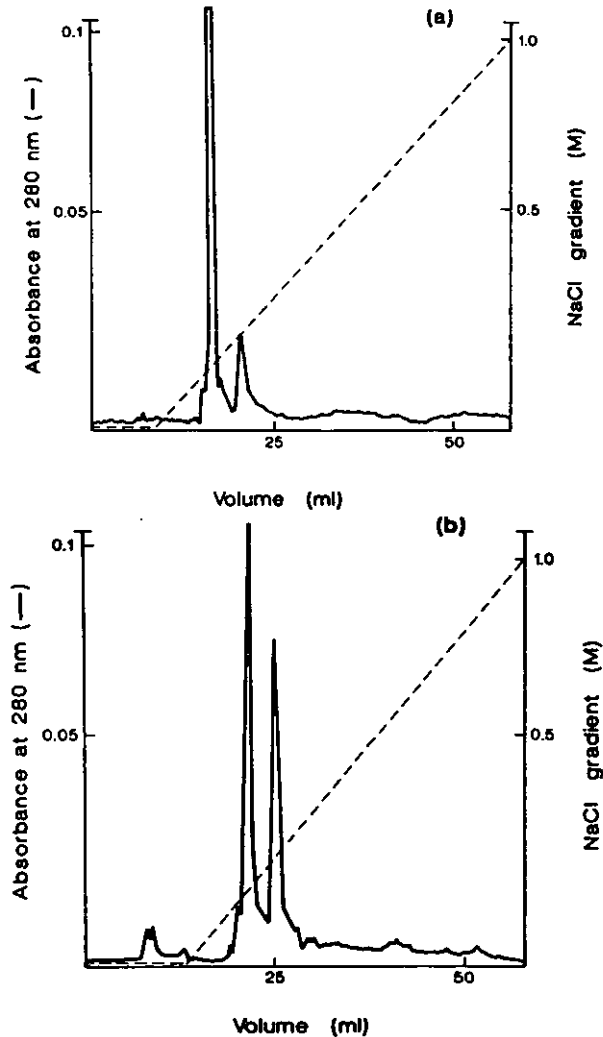


Figure 2. Purification of *M. rosenbergii* lectin-isoforms from juvenile organisms by ion exchange chromatography on a mono P column (anionic form) in an FPLC system. The lectin fractions previously obtained by chromatofocusing (500 μ g) were applied to the column equilibrated previously with 25 mM Bis-Tris/iminodiacetic acid buffer, pH 7.2. Isoforms were eluted by a stepwise NaCl gradient (dotted line). Detection of the optical density of each 1 ml fraction was at A_{280} (continuous line). Representative experiments for fractions: J-I (a) and J-IV (b) MrL isoforms is presented (See Figure 1 for nomenclature).

Hemagglutinating activity and sugar specificity

The lectin from adult and juvenile organisms as well as its purified isoforms showed the same specificity for erythrocytes and sugar residues. Although the lectin purified from juvenile

organisms showed three times less hemagglutinating activity than the lectin from adults, both lectins recognized only rat, rabbit, and chicken erythrocytes, and failed to agglutinate erythrocytes from other animal species such as human (A, B, and O), horse, pig, or sheep. Removing sialic acid from



Figure 3. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of the lectin purified from the hemolymph of juvenile and adult *Macrobrachium rosenbergii* freshwater prawns by affinity chromatography A) Hemolymph (35 µg) and B) purified lectin (5 µg) from adult organisms, C) purified lectin (5 µg) and D) hemolymph from juvenile organisms (35 µg). Molecular weight markers are Phosphorylase b (94 kDa), bovine serum albumin (67 kDa), egg albumin (45 kDa), carbonic anhydrase (30 kDa), soybean trypsin inhibitor (20.1 kDa), lactalbumin (14.4 kDa) and bovine insulin chain B (3.4 kDa).

erythrocytes, by treatment with *V. cholerae* neuraminidase, abolished the capacity of both lectins to agglutinate the erythrocytes from rat, rabbit, and chicken. The hemagglutinating activity of juvenile and adult lectins was inhibited only by N-acetylated amino sugars such as Neu5Ac, Neu5,9Ac, GlcNAc, GalNAc and, in minor proportion, Neu5Gc, α - or β -methyl glycosides from sialic acid and Neu5Ac (α 2,3 and α 2,6) N-acetylactosamine showed an eight- to sixteen-fold higher capacity to inhibit the hemagglutinating activity of the lectin obtained in both maturation stages, than the N-acetylated amino sugars. The amount of N-acetylated amino sugars required to inhibit the hemagglutinating activity of the juvenile lectin isoforms J-I to J-III was fourfold higher than the amount of sugars required to inhibit the hemagglutinating activity of the isoform J-IV or the adult lectin Sialylated glycoproteins,

Table 1. Amino acid composition (Res/Mol*) of the lectin purified from juvenile and adult *Macrobrachium rosenbergii* freshwater prawns.

Residue	Juvenile	Adult
Asx	8.1	7.9
Glx	8.6	8.2
Ser	6.1	6.2
Gly	6.6	6.7
His	2.1	2.2
Arg	2.9	3.3
Thr	3.7	4.2
Ala	5.6	5.7
Pro	3.6	3.7
Tyr	1.2	1.1
Val	4.8	4.8
Met	1.3	1.4
Cys	0.5	0.5
Ile	3.5	4.2
Leu	6.0	6.6
Phe	4.1	4.5
Lys	5.8	6.0
Total	74.5	77.2

*Residues/mol, considering a molecular weight of 9.6 kDa per subunit and a 15 and 11% sugar per weight content in juvenile and adult lectin, respectively.

such as fetuin, and bovine and ovine submandibular gland mucin were more powerful inhibitors of adult and juvenile lectins than simple sugars. Hen ovalbumin, human transferrin, IgG, α -glycoprotein acid, desialylated fetuin, and desialylated ovine and bovine mucins failed to inhibit the hemagglutinating activity of the lectins (Table 3). Fetuin O-glycosylpeptides isolated after pronase digestion and gel-filtration chromatography inhibited the hemagglutinating activity of all the freshwater lectin isoforms; whereas, N-glycosylpeptides or asialo-O-glycosylpeptides were not able to inhibit the lectins activity (Table 3).

Table 2. Carbohydrate composition (Res/Mol*) of the purified isolectins from *Macrobrachium rosenbergii* juvenile and adult freshwater prawns.

Carbohydrate	Juvenile				Adult
	J-I	J-II	J-III	J-IV	A-I
Mannose	2.9	2.9	2.4	2.1	1.4
Galactose	2.4	2.7	2.2	2.4	1.3
N-acetyl-D-galactosamine	0.8	0.8	0.8	0.7	0.3
N-acetyl-D-glucosamine	1.5	0.9	0.9	1.1	0.8
N-acetyl-neuraminic acid	0.0	0.0	0.2	0.5	0.9
Sugar content (%)**	15.2	15.0	14.5	14.5	11.0

*Residues/mol, considering a molecular weight of 9.6 kDa per subunit. The carbohydrate content and composition was determined with the heptafluorobutyrate derivatives of O-methyl-glycosides of each lectin and its isoforms by gas chromatography.

**The reported percentage represents the relation between protein and carbohydrate concentration in the freeze-dried lectin.

Table 3. Effect of sugars and glycoproteins (mM) on the hemagglutinating activity of the lectins from *Macrobrachium rosenbergii* juvenile and adult freshwater prawns.

Compound	Juvenile isoforms				Adult
	J-I	J-II	J-III	J-IV	
Neu5Gc	200	200	200	200	100
GalNAc	200	200	100	100	50
GlcNAc	200	200	200	100	50
Neu5Ac	50	50	25	25	25
Neu5,9Ac	25	25	25	25	12.5
Neu5Ac α -methylglycoside	25	12.5	7.5	7.5	7.5
Neu5Ac β -methylglycoside	25	12.5	12.5	7.5	7.5
Neu5Ac (α 2,3) N-acetyllactosamine	25	25	12.5	12.5	12.5
Neu5Ac (α 2,6) N-acetyllactosamine	25	25	12.5	12.5	12.5
Colominic acid (Neu5Ac α 2,8)**	25	25	15	10	10
Fetuin	0.006	0.003	0.003	0.001	0.001
Fetuin O-glycosylpeptides***	0.1	0.1	0.05	0.05	0.05
Bovine submandibular mucin	0.01	0.01	0.005	0.005	0.005
Ovine submandibular mucin	0.1	0.1	0.05	0.05	0.05

*Minimal concentration needed to inhibit 4 HAU (Titer = 4) of lectin from juvenile (7 μ g/ml) and adult (2 μ g/ml) specimens. Sugars without inhibitory activity at 200 mM were L- and D-fructose, D-mannose, D-glucose, D-galactose, D-galactosamine, D-glucosamine, D-mannosamine, melezitose, lactose, and raffinose. Hen ovalbumin, human transferrin, IgG, α ₁-glycoprotein acid, desialylated fetuin, ovine and bovine glycoproteins, as well as fetuin N-glycosylpeptides and asialo-O-glycosylpeptides were not inhibitory at a 10 mM concentration.

**Values are presented in mg/ml since the molecular weight is not known.

***Glycosylpeptides obtained from fetuin after pronase digestion and gel filtration. The molar concentration of glycoproteins and glycosylpeptides was calculated on the basis of their oligosaccharide content as determined by gas chromatography.

Discussion

In invertebrates, the most likely candidates for recognizing foreign material, due to their high specificity for carbohydrates, are the lectins [1–3,21]. These proteins have been shown to play important roles also in the innate immunity of mammals [2]. Previous work indicate that the innate immune system of the freshwater prawn may recognize several bacteria species through the specific interaction of the lectin, present in the hemolymph, with the acetyl groups of reducing sugars exposed on the bacterial cell wall [10].

We purified the lectins present in the hemolymph of adult of juvenile freshwater prawns, and compared their physicochemical characteristics and specificity for sugars and erythrocytes. The lectin isolated from adult organisms had stronger hemagglutinating activity than the lectin from juvenile organisms; however, both lectins and their purified isoforms agglutinated rat, rabbit, and chicken erythrocytes. The hemagglutinating activity of both types of lectins was inhibited by N-acetylated amino sugar residues such as Neu5Ac, Neu5,9Ac, GlcNAc, and GalNAc; α or β -methyl glycosides from sialic acid, but α 2,3- or 2,6-linked sialic acid were better inhibitors than simple sugars. This result suggests that the anomeric position of C2 from Neu5Ac acid does not seem to be relevant for *M. rosenbergii* lectin recognition. Sialylated glycoproteins, such as fetuin, and ovine and bovine submandibular mucin, which contain O-glycosidically, linked glycans [22,23] were more powerful inhibitors of the hemagglutinating activity of the

lectin on both maturation stages, than monosaccharides. The specificity of both lectins for sialylated O-glycosidically linked glycans, was confirmed by the fact that the isolated O-glycosidically linked glycans from fetuin inhibited the lectins activity [20]. Sialylated N-glycosidically linked peptides from fetuin, or glycoproteins containing N-glycosidically linked glycans such as hen ovalbumin, human transferrin, IgG, or α ₁-glycoprotein acid, lacked capacity to inhibit the lectins hemagglutinating activity. The relevance of the sialic acid for the interaction of *M. rosenbergii* lectin with these glycoproteins and glycopeptides as well as with cellular receptors, was confirmed when we eliminated the sialic acid from those glycoproteins and found that their inhibitory capacity was abolished.

While Neu5Ac is the major type of sialic acid found in human and sheep erythrocytes, and Neu4,5Ac or Neu5Gc is the most predominant sialic acid derivative present in horse and pig erythrocytes, respectively [24,25], the erythrocytes from rat, rabbit and chicken possess great amounts of Neu5,9Ac, accounting for 25, 29 and 30% of total sialic acid respectively [23–25]. These data suggest that Neu5,9Ac linked to specific glycan structures, is a receptor determinant for the *M. rosenbergii* lectin in both studied maturation stages.

The lectin from adult or juvenile freshwater prawns is a dimeric glycoprotein of 20 kDa conformed by 9.6 kDa subunits [8,13]. The lectin from juvenile organisms contained four isoforms with different pI (5.6 to 4.2), in contrast to the lectin from adults which contained only one isoform at pI 4.2.

suggesting that the subunits conforming the lectin in juvenile prawns have different physicochemical properties. The lectins constituted by subunits at pl 5.6 showed lower hemagglutinating activity, which explains, in part, why the lectin from juvenile prawns showed the lower hemagglutinating activity than the lectin from adults. The lectin purified from either adults or juvenile organisms showed identical molecular weight, and similar amino acid composition, however, they showed quantitative and qualitative differences in their sugar content and in the amount of Neu5Ac residues, the lectin from adults is less glycosylated than the juvenile, and showed higher concentrations of sialic acid. It is not known how this influence the three-dimensional conformation of the lectin, its functional properties or its biological role.

Research is in progress to define whether the expression of each lectin isoform could be the result of allelomorphous forms of the same protein [26], or if their glycosylation pattern, is regulated throughout maturation by environmental [27], neuroendocrine [28], or hormonal factors such as ecdysteroids [29,30]. It is highly probable that the maturation process which might modulate the lectin isoforms induces a diminution in the defense mechanisms and therefore increases the lability of juvenile organisms to infective diseases.

Acknowledgements

We thank Prof. R. Schauer, from University of Kiel, Germany, for kindly providing Neu5,9Ac. This work was supported in part by CONACyT (26068-N), DGAPA (PAPIIT-IN224598) UNAM, and by Program ECOS, Mexico-France.

This work is dedicated in loving memory of Prof. André Verbert from laboratoire de Chimie Biologique de la Université des Sciences et Technologies de Lille, France.

References

- Vasta GR, Ahmed H, Fink NE, Elola MT, Marsh AG, Snowden A, Odom EW, Animals lectins as self/non-self recognition molecules. Biochemical and genetic approaches to understanding their biological roles and evolution, *Proc Ann NY Acad Sci* 712, 55-73 (1994).
- Olafsen JA, Lectins: models of natural and induced molecules in invertebrates. In *Advances in Comparative and Environmental Physiology*, Vol 24, (Springer Verlag, Berlin Heidelberg, 1996) pp. 49-76.
- Vazquez L, Sierra C, Agundis C, Juarez S, Zavala A, Zenteno E, Mecanismos de defensa en crustáceos, *InterCiencia* 23, 344-8 (1998).
- Kawabata S, Iwanaga S, Role of lectins in the innate immunity of horseshoe crab, *Dev Comp Immunol* 23, 391-400 (1999).
- Slifkin M, Doyle RJ, Lectins and their application to clinical microbiology, *Clin Microbiol Rev* 3, 197-218 (1990).
- Alvarez G, Lascurain R, Perez A, Martínez S, Montaña L, Degand P, Zenteno E, Relevance of sialoglycoconjugates in murine thymocytes during maturation and selection in the thymus, *Immunol Invest* 24, 9-18 (1999).
- Guevara J, Espinosa B, Zenteno E, Vazquez L, Luna J, Perry G, Mena R, Altered glycosylation pattern of proteins in alzheimer's disease, *J Neuropathol Exp Neurol* 57, 905-14 (1998).
- Vazquez L, Maso F, Rosas P, Mantaño L, Zenteno E, Purification and characterization of a lectin from *Macrobrachium rosenbergii*, *Comp Biochem Physiol* 105B, 617-23 (1993).
- Sierra C, Perez A, Agundis C, Zenteno E, Vazquez L, Subcellular organization of the seric lectin in haemocytes from the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* (Decapoda, Nanantia). In *Crustaceans and the Biodiversity Crises*, edited by Schram FR, von Vaupel Klein JC, (Brill, Leiden Boston Köln, 1999), Vol 1, pp. 961-70.
- Vazquez L, Jaramillo L, Rosas P, Lascurain R, Cooper EL, Zenteno E, Bacterial agglutination by the sialic acid specific lectin from the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*, *Comp Biochem Physiol* 113B, 355-9 (1996).
- Limpananai D, Tansakul R, Culture of giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) in a small reservoir, *Aquaculture* 20, 257-60 (1980).
- Wickins JF, Beard TW, Observations on the breeding and growth of the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* De Man in the laboratory, *Aquaculture* 3, 159-64 (1974).
- Vazquez L, Lanz H, Montaña LF, Zenteno E, Biological activity of the lectin from *Macrobrachium rosenbergii* hemolymph. In *Lectins: Biol Biochem Clin Chem*, edited by Van Driessche E, Bog Hansen TC, (Textop Hellerup, Dinamarca 1994), Vol. 10, pp. 261-5.
- Zenteno E, Qin Z, Ortega M, Montreuil J, Debray H, Fast purification of *Phaseolus vulgaris* isolectins, *Prep Biochem* 24, 175-83 (1994).
- Bradford M, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal Biochem* 72, 248-254 (1976).
- Bidlingmeyer DA, Cohen SA, Tarvin TL, Rapid analysis of amino acids using pre-column derivatization, *J Chromatogr* 33, 93-104 (1984).
- Zanetta JP, Timmerman T, Leroy Y, Determination of constituents of sulfated proteoglycans using a methanolysis procedure and gas chromatography/mass spectrometry of heptafluorobutyrate derivatives, *Glycobiology* 9, 255-66 (1999).
- Laemmli UK, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227, 680-683 (1970).
- Zenteno E, Lascurain R, Vazquez L, Montaña L, Debray H, Montreuil J, The sugar specificity of *Amaranthus leucocarpus* lectin, *Glycocon J* 9, 204-08 (1992).
- Spiro RG, Bhoyroo VD, Structure of the O-glycosidically linked carbohydrate units of fetuin, *J Biol Chem* 249, 704-11 (1974).
- Vazquez L, Maldonado G, Agundis C, Perez A, Cooper EL, Zenteno E, Morphology of hemocytes from fresh water prawn *Macrobrachium rosenbergii*, *Exp Zoology* 279, 265-72 (1997).
- Schauer R, Chemistry, metabolism, and biological functions of sialic acids, *Adv Carb Chem Biochem* 40, 131-235 (1982).
- Schauer R, Casalsst J, Corfield AP, Veh RW, Subcellular site of the biosynthesis of O-acetylated sialic acids in bovine submandibular gland, *Glycocon J* 5, 257-70 (1988).
- Sarris AH, Palade GE, The sialoglycoproteins of murine erythrocyte ghosts. A modified periodic acid-Schiff stain procedure staining nonsubstituted and O-acetylated sialyl residues on glycopeptides, *J Biol Chem* 254, 6724-31 (1979).

- 25 Herrler G, Reuter G, Rott R, Klent HD, Schauer R, N-acetyl-9-O-acetylneuraminic acid, the receptor determinant for influenza C virus, is a differentiation marker on chicken erythrocytes, *Biol Chem Hoppe Seyler* 368, 451-4 (1987).
- 26 Theopold U, Rissler M, Fabbri M, Schmidt O, Natori S, Insect glycobiology: a lectin multigene family in *Drosophila melanogaster*, *Biochem Biophys Res Commun* 261, 923-7 (1999).
- 27 Bucke D, Aquatic pollution: effects on the health of fish and shellfish, *Parasitology* 106, S25-S37 (1993).
- 28 Wilder MN, Okumura T, Aida K, Hanyu I, Ecdysteroid fluctuations during embryogenesis in the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*, *Gen Comp Endocrinol* 80, 93-100 (1990).
- 29 Freire CA, McNamara JC, Rosa JC, Greene LJ, Neuroendocrine control of osmotic regulation in the freshwater shrimp *Macrobrachium olfersii* (Wiegmann) (Crustacea, decapoda): free amino acid concentrations in the hemolymph, *Gen Comp Endocrinol* 100, 83-91 (1995).
- 30 Chan SM, Rankin SM, Kelley LL, Characterization of the molt stages in *Penaeus vannamei*: setogenesis and hemolymph levels of total protein, ecdysteroids and glucose, *Biol Bull* 175, 185-92 (1988).

Received 9 May 2000, revised 24 July 2000, accepted 7 August 2000



ELSEVIER

Comparative Biochemistry and Physiology Part B 127 (2000) 243–250

CBP

www.elsevier.com/locate/cbpb

Chemical characterization of the lectin from the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* (De Man) by MALDI-TOF

Roberto Zenteno ^{a,*}, Lorena Vazquez ^b, Claudia Sierra ^b, Ali Pereyra ^a,
Marie Christine Slomianny ^c, Stephane Bouquetlet ^c, Edgar Zenteno ^d

^a Departamento de Bioquímica, Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, Calzada de Tlalpan 4502, 01040 Mexico

^b Laboratorio de Lectinas, CIQ, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Cuernavaca Morelos, 62210 Mexico

^c Laboratoire de Chimie Biologique, Université des Sciences et Technologies de Lille, UMR du CNRS n° 8576, Villeneuve d'Ascq, 59655 Cedex, France

^d Departamento de Bioquímica, Laboratorio de Inmunología, Facultad de Medicina, UNAM, P.O. Box 70159, 04510 Mexico City, Mexico

Received 24 March 2000; received in revised form 25 June 2000; accepted 26 June 2000

Abstract

The serum of the freshwater prawn contains a sialic acid specific lectin (MrL) that agglutinates erythrocytes from rat and rabbit, as well as some Gram negative and positive bacterial strains. In this work, we performed the chemical characterization of the MrL purified by affinity chromatography on stroma from rat erythrocytes and by ion exchange chromatography. In its active form, MRL is a dimeric glycoprotein with 9.5 kDa per subunit. The amino acid sequence of the lectin was deduced from peptides obtained after trypsin treatment by matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry-time of flight analysis (MALDI-TOF). The predicted amino acid sequence of the lectin showed 54% homology with the hyperglycemic hormone from *Macrobrachium rosenbergii*. It also showed homology with the variable region of the human immunoglobulin κ (22%) and λ (27%) light chains. The lectin is a glycoprotein with 11% (w/w) carbohydrate content and is constituted by Gal, Man, GlcNAc, GalNAc and NeuAc in a molar ratio of 4:3:2:1:0.6. The primary structure of the carbohydrate chains of the lectin from the freshwater prawn was determined by affinity chromatography of MrL-glycopeptides on Con A and LCA lectin columns, which indicated that the main carbohydrate chains conforming the lectin are *N*-glycosidically linked. $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_{2,1}$ oligosaccharides were the most abundant structures with 57% followed by $\text{Gal}_1\text{Man}_3\text{GlcNAc}_{2,8}$ with 24%. Our results suggest that the freshwater prawn possess a lectin in the hemolymph plasma, related to those from the immunoglobulin superfamily. © 2000 Elsevier Science Inc. All rights reserved.

Keywords: Sialic acid specific lectin; Glycoprotein; MALDI-TOF; Animal lectin; Crustacean; *Macrobrachium rosenbergii*; Hyperglycemic hormone; Immunoglobulin superfamily proteins

1. Introduction

Invertebrate animals lack adaptive immune systems, but they have developed various defense systems that recognize antigens on the surface of

* Corresponding author. Tel.: +52-5-6232169; fax: +52-5-6162419.

E-mail address: ezenteno@servidor.unam.mx (R. Zenteno).

potential pathogens (Vasta et al., 1994; Olafsen, 1996). These systems include hemolymph coagulation, melanization, cell agglutination, antimicrobial action, active oxygen formation and phagocytic activity (Cooper et al., 1992; Vazquez et al., 1998). Among them, hemolymph coagulation and phenoloxidase-mediated melanization, in addition to cell agglutination, are directly induced by foreign substances, resulting in engulfment of invading microbes. The immobilized invaders are finally killed by antimicrobial substances released from many kinds of hemocytes (Olafsen, 1996; Kawabata and Iwanaga, 1999). Lectins in invertebrates play a relevant role in defense mechanisms, such as recognizing foreign invaders, damaging self cells and mediating the biological activity of cells (Vasta et al., 1994).

The lectin isolated from the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* (MrL) is specific for *N*-acetylated carbohydrates such as GlcNAc, GalNAc, although sialic acid and sialic acid containing determinants seem to be the main structures recognized by this lectin (Vazquez et al., 1993, 1996). The MrL capacity to agglutinate erythrocytes specifically from rat and rabbit erythrocytes depends on the presence of Ca^{2+} (Vazquez et al., 1994). This lectin interacts with Gram negative bacterial strains such as *Aeromonas* sp, *Bacillus cereus*, *Pasteurella haemolytica* (Serotype A12) and Gram positive bacteria such as *Staphylococcus arizona* (Vazquez et al., 1996). The lectin seems to be synthesized by circulating hemocytes. Immunohistochemical analysis, using monoclonal antibodies against the serum lectin, revealed that the rough endoplasmic reticulum is positively stained by these antibodies (Sierra et al., 1999). Furthermore, it has been demonstrated that the lectin could be either stored in the granules or as an integral protein of circulating hemocytes (Vazquez et al., 1997a). The specific role of the lectin in defense mechanisms has not been clarified yet, but MrL has been shown to be a useful tool as a marker for neuro-degenerative diseases, such as Alzheimer disease (Guevara et al., 1998). In this work, we performed the chemical characterization of the lectin from the freshwater prawn *M. rosenbergii*, aimed at elucidating the specific role of the lectin in this organism. Evolution and phylogeny of crustacean defense molecules, at a molecular level, as compared to those present in vertebrate species are discussed.

2. Material and methods

2.1. Lectin extraction and purification

Adult freshwater *M. rosenbergii* prawns in intermolt stage (Peebles, 1977) were obtained in Jojutla, Morelos, Mexico. Hemolymph was obtained from the pericardial sinus and the serum was cleared by centrifugation at $16\,000 \times g$ at 4°C for 30 min. The supernatant was dialyzed against Tris-buffered saline (TBS): 50 mM Tris-HCl, 0.15 M NaCl, 3 mM CaCl_2 , pH 7.4, with several changes and stored at -70°C until use. The lectin was purified by affinity chromatography on a column containing glutaraldehyde-*r*at erythrocytes stroma physically entrapped in Sephadex G-25, equilibrated with TBS as described previously (Vazquez et al., 1993). Further purification of the *M. rosenbergii* lectin was performed by ion exchange chromatography as follows: 500 μg of the purified lectin, previously dialyzed against bis-Tris (Sigma, St. Louis, MO) buffer (25 mM bis-Tris, 25 mM iminodiacetic acid, pH 7.2), was applied onto a prepackaged mono P 5/5 mm HR column (Pharmacia, Uppsala, Sweden). This column was previously equilibrated with bis-Tris buffer, at a flow rate of 1 ml/min with a maximal pressure of 40 bars, in a 60-min program using the FPLC system (Pharmacia). The protein was then eluted with a 0–1 M NaCl stepwise gradient in bis-Tris buffer; 1-ml fractions were collected, the optical density was monitored at 280 nm and hemagglutinating activity was determined by the 2-fold dilution procedure in the presence of a 2% solution of rat erythrocytes in TBS. Each eluted peak was exhaustively dialyzed against distilled water and freeze-dried for further analysis.

2.2. Analytical methods

Protein concentration was determined by the method of Bradford (1976) with Coomassie blue R-250, using bovine serum albumin as standard. Carbohydrate composition of the lectin was determined with the heptafluorobutyrate derivatives of *O*-methyl-glycosides from the lectin and its glycopeptides. Lysine was used as internal standard (Sigma) and analyzed by gas-chromatography, using a capillary column (25×0.32 mm) of 5% Silicone OV 210, (Applied Science Lab., Buffalo, NY), in a Varian 2100 gas chromatograph (Orsay, France) equipped with a flame detector and a

glass solid injector; the carrier gas was helium at a pressure of 0.6 bar and the oven temperature was programmed from 100 to 240°C at 2°C per min, as described by Zanetta et al. (1999).

2.3. Polyacrylamide gel electrophoresis

The molecular mass and the homogeneity of the purified lectin and its isoforms were evaluated in 10% polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) in the presence of 0.1% sodium dodecyl sulfate (SDS), with the Laemmli buffer system (Laemmli, 1970); gels were stained with 0.1% Coomassie brilliant blue.

2.4. Amino acid sequencing

Amino acid sequencing of MrL was determined by MALDI-TOF on peptide fragments obtained by trypsin digestion of the purified MrL. After electrophoresis on SDS-PAGE gels of MrL, the bands with 200 pM of protein were digested with 0.5 µg trypsin in 500 µl ammonium bicarbonate, pH 8.0 at 37°C for 24 h. The effect of trypsin was inhibited by storing the mixture at 2°C for 4 h. The enzyme digest was dried by evaporation using a Gyrovap (Howe, London) and re-evaporated with water (2 × 100 µl). Samples were prepared by mixing directly onto the target 1 µl of reaction products (containing 50 pM) and 1 µl of a 2,5-dihydroxybenzoic acid matrix (12 mg/ml in CH₂O, 70:30, v/v), allowing the mixture to crystallize at room temperature. Positive ions of the peptides were measured by MALDI-TOF on a Vision 2000 time-of-flight mass spectrometer (Finnigan MAT, Bremen, Germany) equipped with a 337 nm UV laser. Mass spectra were acquired in reflectron mode under 8 keV acceleration voltage and positive detection. Control assays were performed using trypsin alone to identify self-digested peptide mass and angiotensin I as standard (Mr 1296.7) (Hellman et al., 1995). The mass of [M + H] ions from peptides produced by tryptic digestion was compared with those obtained from NCBItr (Swiss-Prot 10/04/99) database.

2.5. Preparation of glycopeptides from MrL

MrL glycopeptides (MrL-gp) were prepared by incubating 2 mg of the lectin in 0.5 ml of 150 mM Tris-acetate, pH 8, and 15 mM CaCl₂ with 1 mg of pronase (from *Streptomyces griseus*, Sigma) for

48 h at 36°C. Then the mixture was boiled for 5 min to stop the enzymatic reaction and the glycopeptides were filtered in a column containing Bio-Gel P2 (100 × 1.2 cm I.D.) equilibrated with distilled water. Glycopeptides were lyophilized until use. Purification of MrL glycopeptides was performed by affinity chromatography on a Concanavalin A (Con A)-Sepharose column (Sigma), containing 10 mg of the lectin; 200 µg of MrL glycopeptides in acetate buffer (5 mM sodium acetate, 0.14 M NaCl and 5 mM CaCl₂, pH 5.2) were deposited onto the column. The unretained fraction was eluted with the acetate buffer and the retained fraction was eluted by adding 200 mM of α-methyl-mannoside. Besides, 200 µg of MrL-gp was applied to a *Lens culinaris* (LCA)-Sepharose 4B coupled column with 10 mg of the lectin. Acetate buffer was used to equilibrate the column and to elute the unretained material; the retained glycopeptides were eluted with 200 mM α-methyl-mannoside (Debray et al., 1981). Retained and unretained fractions were collected and desalted in a Biogel P-2 column, previously equilibrated with distilled water and lyophilized for further analysis.

2.6. Hemagglutinating activity and sugar specificity

Rat and rabbit erythrocytes were obtained from the animal facilities at Facultad de Medicina, UNAM, Mexico. The hemagglutinating activity of MrL was assayed in microtiter U plates (NUNC, Denmark) according to a 2-fold serial dilution procedure. The agglutinating activity was tested with either 2% untreated erythrocyte suspension in PBS or with neuraminidase-treated (0.1 U of *Vibrio cholerae* neuraminidase per 0.5 ml of packed erythrocytes at 37°C for 30 min). The lectin's sugar specificity was confirmed by comparing the inhibitory activity of various sugars or glycoproteins on the hemagglutination induced by the lectin. Results are expressed as the minimal concentration required to inhibit completely four hemagglutinating doses (Vazquez et al., 1997a).

3. Results

3.1. Lectin purification

The lectin from adult freshwater prawns was

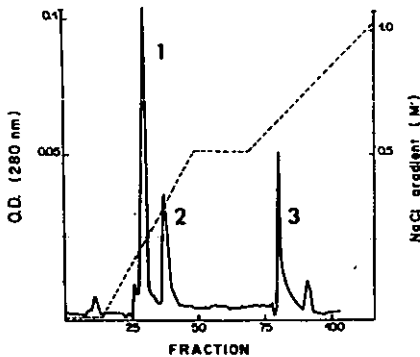


Fig. 1. Purification of the lectin from *Macrobrachium rosenbergii* by ion exchange chromatography on a mono P column (anionic form) in an FPLC system. The affinity purified *M. rosenbergii* lectin (500 μ g) was applied to the column equilibrated previously with 25 mM bis-Tris buffer (25 mM bis-Tris, 25 mM iminodiacetic acid) pH 7.2. The lectin was eluted by a stepwise NaCl gradient (dotted line). Detection of the optical density of each 1-ml fraction was at A_{280} (continuous line).

purified by affinity chromatography with a column containing glutaraldehyde treated stroma from rat erythrocytes and by ionic exchange chromatography on a mono P (in anionic form) column. The lectin was eluted from this column by a salt gradient and the main fraction, containing the purified lectin (Fraction I), was eluted by adding 0.18 M NaCl (Fig. 1); this

Table 1
Purification process of *M. rosenbergii* lectin^a

Fraction	Protein (mg)	HAU ^b	Specific activity ^c
Hemolymph	100	1280	12.8
<i>Affinity chromatography</i>			
Unretained fraction	52	NA ^d	NA
Lectin	0.14	640	4571
<i>Ion exchange chromatography</i>			
Fraction I	0.08	616	7700
Fraction II	0.01	NA	NA
Fraction III	0.02	NA	NA

^a From 400 μ l of serum.

^b HAU, hemagglutinating units tested in the presence of rat erythrocytes.

^c HAU/protein concentration.

^d NA, non-hemagglutinating activity.

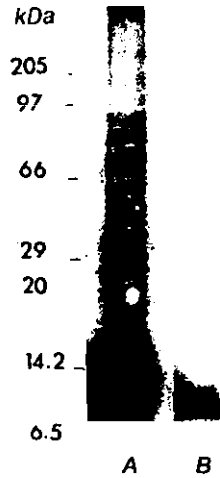


Fig. 2. SDS-PAGE of the purified *Macrobrachium rosenbergii* lectin. Lane A, 50 μ g of freshwater prawn hemolymph. Lane B, 10 μ g of the lectin purified by affinity chromatography and further by ion exchange chromatography. Molecular weight markers are: myosine from rabbit muscle (205), phosphorylase B from rabbit muscle (97 kDa), bovine serum albumin (66 kDa), carbonic anhydrase (29 kDa), soybean trypsin inhibitor (20 kDa), lactalbumin (14.2 kDa) and bovine lung aprotinin (6.5 kDa).

procedure increased 601 times the specific activity of the lectin, as compared with total hemolymph (Table 1). SDS-PAGE indicated that the purified lectin corresponded to a glycoprotein of 9.6 kDa (Fig. 2).

3.2. Amino acid sequencing

Amino acid sequencing was determined by MALDI-TOF on peptide fragments obtained after trypsin digestion of electrophoresed MrL. The results indicated that the lectin showed homology with the crustacean hyperglycemic hormone (CHH). The matched peptides of the MrL subunit covered 54% of the protein and 22% matched the human immunoglobulin κ chain V-II region. The peptides matched 25 of the 113 of this immunoglobulin chain. With the variable region of human immunoglobulin λ light chain, 27% covered the protein sequence (Table 2).

Table 2
Predicted tryptic peptides of the lectin from *Macrobrachium rosenbergii*

[M+H] ⁺	Amino acid position	Peptide sequence	Related protein
1066.39	1–11	(–)SAFASLGVSTV(K)	Igλ
1791.9	19–31	(K)LDLVCCDDCYNLYR(K)	CHH
2721.9	51–74	(R)QCIQDLQLMDQLDEYANAVQIVGK	CHH
2734.4	83–108	(R)VEAEDVGVVYCMZALQAPITFGQGR(L)	Igκ

* Monoisotopic mass. The mass of [M+H] ions from peptides produced by tryptic digestion was compared with those obtained from NCBIInr (Swiss-Prot 10/04/99) database. CHH, *M. rosenbergii* crustacean hyperglycemic hormone; Igκ, human Igκ chain V-II region; and Igλ, corresponds to human Igλ chain variable region.

3.3. Analysis of glycopeptides

The glycosidic portion of the lectin comprises 11% of the lectin's weight and is constituted by sialic acid (NeuAc), galactose (Gal), mannose (Man), *N*-acetyl-D-glucosamine (GlcNAc) and *N*-acetyl-D-galactosamine (GalNAc) in a molar ratio of 0.6:4:3:2:1, respectively. The glycopeptides obtained from the purified lectin after pronase digestion were purified by affinity chromatography on immobilized Con A and LCA lectin columns (Fig. 3). From the amount of the glycopeptides deposited onto each column, 57% were retained by the Con A-Sepharose column and 24% by the LCA column. The carbohydrate composition of each fraction indicated that the Con A retained fraction is mainly composed by Man and GlcNAc in a 3:2.1 molar ratio; the fraction retained by the LCA-Sepharose column contained Man, GlcNAc and Gal, in a 3:2.8:1.3 molar ratio; the fraction unretained by both columns possesses Man, GlcNAc, Gal and in lower concentrations, GalNAc and NeuAc (Table 3).

4. Discussion

All animals and plants have immune systems that protect them from diverse pathogens that would otherwise threaten their survival. The different components of the immune system may inactivate the pathogens themselves or promote the inactivation and clearance of toxic products brought about by the pathogens. Lectins seem to be part of the immune system in invertebrates, since they facilitate immobilization of pathogens and inhibit their destructive growth in the host organism. Although one of the main difficulties in considering lectins as specific mediators of the immune response in invertebrates is that they lack

mechanisms to induce their secretion and/or their specific synthesis (Olafsen, 1996).

The lectin from the freshwater prawn *M. rosenbergii* is a glycoprotein rich in glycine, serine, glutamic and aspartic residues and poor in cysteine, methionine and histidine residues (Vazquez et al., 1993). It is a 20-kDa protein, conformed by two monomeric subunits of 9.6 kDa, each linked by a disulphide bridge (Vazquez et al., 1993). The analysis of tryptic peptides obtained from the purified MrL by MALDI-TOF showed no homology with other lectins from invertebrates; however, it showed partial homology with the crustacean hyperglycemic hormone (CHH) from

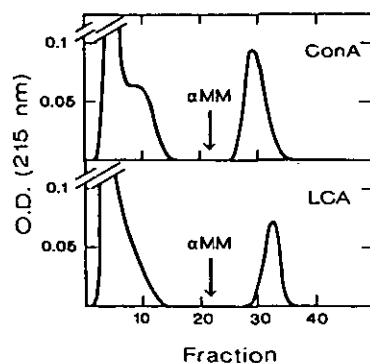


Fig. 3. Purification of glycopeptides from the lectin *Macrobrachium rosenbergii* by affinity chromatography on Con A and LCA immobilized lectin columns. MrL glycopeptides (200 μg) obtained after pronase digestion were suspended in acetate buffer (5 mM sodium acetate, 0.14 M NaCl and 5 mM CaCl₂, pH 5.2) and deposited onto the column containing 4 ml of Sepharose-Con A or LCA lectins. The unretained fraction was eluted with the acetate buffer and the retained fraction was eluted by adding 200 mM of α-methyl-mannoside. Detection of the optical density of each 1 ml fraction was at A₂₁₅.

Table 3
Carbohydrate composition of *M. rosenbergii* lectin glycopeptides purified by affinity chromatography on Con A- and LCA-Sepharose 4B columns

Sugar residue	Molar ratio ^a		
	MrL-gpConA	MrL-gpLCA	MrL gp ^b
Fucose	0.0	0.0	0.0
Mannose	3.0	3.0	3.0
Galactose	0.1	1.3	2.7
GlcNAc	2.1	2.8	3.7
GalNAc	0.0	0.0	0.4
NeuAc	0.0	0.0	0.2

^a Molar ratio is related to three Man residues.

^b MrLgp corresponds to the fraction unretained on the Con A- and LCA-Sepharose columns.

the freshwater prawn *M. rosenbergii*. Crustacean CHH is a protein of 8.7 kDa, with a pI of 4.88. It is a physiologically important neuro-hormone that regulates primarily carbohydrate metabolism and also plays a significant role in reproduction, molting and other physiological processes (Lin et al., 1998; Sithigorngul et al., 1999).

The MrL's amino acid sequence also shows some homologous regions to those present in the immunoglobulin superfamily proteins, 22% homology with the human Igk chain (region V-II) (de Wildt et al., 1999) and 27% homology with the variable region of the light chain λ (Mageded et al., 1997). These results, together with the fact that MrL is a protein able to interact with specific ligands, suggest that variable gene segments for the light chains from immunoglobulins (κ or λ) have been developmentally preserved through the evolution of V gene families (Glas et al., 1997).

Different proteins present in the serum of several different invertebrates have been considered as analogues or precursors of proteins implicated in defense mechanisms in vertebrates, such as the lectins identified in *Limulus* (Pistole, 1982), and the α 2-macroglobulin, which binds peptide growth factors and modulates the activity of a lectin-dependent cytolytic pathway in arthropods (Armstrong and Quigley, 1999). The TLs-5 is a lectin present in the hemolymph plasma from the horseshoe crab *Tachypleus tridentatus*, which contains a short N-terminal Cys-containing segment. It also contains a C-terminal fibrinogen-like domain with the highest sequence identity to that of mammalian ficolins, indicating that the horseshoe crab is equipped with a homologue of vertebrate

fibrinogen (Fischer et al., 1994; Gokudan et al., 1999). Hemolin, an insect immunoglobulin superfamily member, is a lipopolysaccharide-binding protein that actively participates in the regulation of insect immune responses during bacterial infection and mediates homophilic adhesion as well (Su et al., 1998; Mendoza and Faye, 1999).

The structure of the carbohydrate chains of the lectin from the freshwater prawn was determined by affinity chromatography of MrL-glycopeptides on Con A and LCA lectin columns. Con A possesses high affinity for structures constituted by the trimannosidic core containing man α (1,6) [man α (1,3)] man, substituted by two GlcNAc residues and LCA possesses affinity for structures containing the trimannosidic core substituted by *N*-acetylglucosaminic residues (Debray et al., 1981), indicating that the main carbohydrate chains conforming the *M. rosenbergii* lectin are *N*-glycosidically linked; Man₃GlcNAc_{2,1} oligosaccharides are the most abundant structures with 57% followed by Gal_{1,3}Man₃GlcNAc_{2,8} with 24%. Our results suggest that MrL possesses at least one carbohydrate chain attached to each protein subunit as described for other glycoproteins in invertebrates, such as the lectin from the acorn barnacle *Megabalanus rosa* (Muramoto and Kamiya, 1990) or the hemocyanin from the crayfish, *Astacus leptodactylus* (Tseneklidou-Stoeter et al., 1996).

Rabbit and rat red cells were agglutinated by MrL, as described previously (Vazquez et al., 1993). These erythrocytes contain great amounts of 9-*O*-acetyl-sialic acid; elimination of sialic acid residues from them by treatment with *V. cholerae* neuraminidase abolished the hemagglutination activity of the lectin. However, previous reports indicated that treatment of rabbit or rat erythrocytes with *Clostridium perfringens* neuraminidase diminishes partially the hemagglutinating capacity of MrL (Vazquez et al., 1993, 1994); the difference could be due to the ability of *V. cholerae* to cleave two times more 9-*O*-acetylsialic acid from glycoproteins than *C. perfringens* neuraminidase (Bouquelet, 1993). The specificity of the purified *M. rosenbergii* lectin was confirmed by hemagglutination inhibition assays, using sugars and glycoproteins. Our results indicate that the purified MrL interacts specifically with sialic acid analogues, *N*-acetylhexosamines and sialylated glycoproteins (Vazquez et al., 1993, 1997b). The most powerful glycoprotein inhibitors were fetuin,

ovine and bovine submaxillary mucin, all being O-glycosidically linked glycans. The glycoproteins containing exclusively N-glycosidically linked glycan chains, such as IgG, IgM, ovalbumin, and α_1 -acid glycoprotein were inactive. Similar to other crustacean lectins, such as the TLs-5 from *T. tridentatus*, MrL specifically recognizes acetyl group-containing substances (Fischer et al., 1994). This suggests that the carbohydrate recognition domain in invertebrate lectins are well preserved through evolution, since lectins from several invertebrate phyla possess similar specificity for carbohydrate determinants (Vasta et al., 1994; Olafsen, 1996).

In summary, our results strongly suggest that the freshwater prawn *M. rosenbergii* has a lectin that is homologous to the immunoglobulin superfamily proteins (Sun et al., 1990; Iwanaga and Kawabata, 1998; Su et al., 1998).

Acknowledgements

This work was supported in part by CONACyT (27609-M and 26068-N), DGAPA (PAPIIT-IN224598) UNAM and Program ECOS Mexico-France (M97B05).

References

- Armstrong, P.B., Quigley, J.P., 1999. Alpha2-macroglobulin: an evolutionarily conserved arm of the innate immune system. *Dev. Comp. Immunol.* 23, 375–390.
- Bradford, M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of protein utilizing the principles of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- Bouquet, S., 1993. Use of exoglycosidases. In: Verbert, A. (Ed.), *Methods on Glycoconjugates*, A Laboratory Manual. Hartwood, Switzerland, pp. 159–164.
- Cooper, E.L., Rinkevich, B., Uhlenbruck, G., Valenbois, P., 1992. Invertebrate immunity: another viewpoint. *Scand. J. Immunol.* 35, 247–266.
- Debray, H., Decout, D., Strecker, G., Spik, G., Montreuil, J., 1981. Specificity of twelve lectins towards oligosaccharides and glycopeptides related to N-glycosylproteins. *Eur. J. Biochem.* 117, 41–55.
- de Wildt, R.M., Hoet, R.M.A., van Venrooij, W.J., Tomlinson, I.M., Winter, G., 1999. Analysis of heavy and light chain pairings indicates that receptor editing shapes the human antibody repertoire. *J. Mol. Biol.* 285, 895–901.
- Fischer, E., Khang, N.Q., Letendre, G., Brossmer, R.A., 1994. Lectin from the Asian horseshoe crab *Tachypleus tridentatus*: purification, specificity and interaction with tumor cells. *Glycoconj. J.* 11, 51–58.
- Glas, A.M., Nottenburg, C., Milner, E.C., 1997. Analysis of rearranged immunoglobulin heavy chain variable region genes obtained from a bone marrow transplant (BMT) recipient. *Clin. Exp. Immunol.* 107, 372–380.
- Gokudan, S., Muta, T., Tsuda, R., Koori, K., Kawahara, T., Seki, N., Mizunoe, Y., Wai, S.N., Iwanaga, S., Kawabata, S., 1999. Horseshoe crab acetyl group-recognizing lectins involved in innate immunity are structurally related to fibrinogen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 10086–10091.
- Guevara, J., Espinosa, B., Zenteno, E., Vazquez, L., Luna, J., Perry, G., Mena, R., 1998. Altered glycosylation pattern of proteins in Alzheimer's disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 57, 905–914.
- Hellman, U., Wernstedt, C., Gonez, J., Heldin, C.H., 1995. Improvement of an 'In-Gel' digestion procedure for the micro preparation of internal protein fragments for amino acid sequencing. *Anal. Biochem.* 224, 451–455.
- Iwanaga, S., Kawabata, S., 1998. Evolution and phylogeny of defense molecules associated with innate immunity in horseshoe crab. *Front. Biosci.* 3D, 973–984.
- Kawabata, S., Iwanaga, S., 1999. Role of lectins in the innate immunity of horseshoe crab. *Dev. Comp. Immunol.* 23, 391–400.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–683.
- Lin, C.Y., Chen, S.H., Kou, G.H., Kuo, C.M., 1998. Identification and characterization of a hyperglycemic hormone from freshwater giant prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Comp. Biochem. Physiol. Mol. Integr. Physiol.* 121A, 315–321.
- Mageed, R.A., Moyes, S.P., Vencovsky, J., Maini, R.N., 1997. Somatic mutation and CDR3 length of immunoglobulin lambda variable region genes in the synovium of patients with rheumatoid arthritis. *N.Y. Acad. Sci.* 815, 319–323.
- Mendoza, H.L., Faye, I., 1999. Physiological aspects of the immunoglobulin superfamily in invertebrates. *Dev. Comp. Immunol.* 23, 359–374.
- Muramoto, K., Kamiya, H., 1990. The amino-acid sequence of multiple lectins of the acorn barnacle *Megabalanus rosa* and its homology with animal lectins. *Biochim. Biophys. Acta* 1039, 42–51.
- Olafsen, J.A., 1996. Lectins: models of natural and induced molecules in invertebrates. In: *Advances in Comparative and Environmental Physiology*, vol. 24. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, pp. 49–76.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

- Peebles, J.B., 1977. A rapid technique for moult staging in live *Macrobrachium rosenbergii*. *Aquaculture* 12, 173–180.
- Pistole, T.G., 1982. Limulus lectins: analogues of vertebrate immunoglobulins. *Prog. Clin. Biol. Res.* 81, 283–288.
- Sierra, C., Perez, A., Agundis, C., Zenteno, E., Vazquez, L., 1999. Subcellular organization of the seric lectin in haemocytes from the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* (Decapoda, Nanantia). In: Schram, F.R., von Vaupel Klein, J.C. (Eds.), *Crustaceans and the Biodiversity Crisis*, vol. 1. Brill, Leiden Boston Köln, pp. 961–970.
- Sithigorngul, W., Jaideechoey, S., Sarathongkum, W., Longyant, S., Sithigorngul, P., 1999. Purification and characterization of an isoform of crustacean hyperglycemic hormone from the eyestalk of *Macrobrachium rosenbergii*. *J. Exp. Zool.* 284, 217–224.
- Su, X.D., Gastinel, L.N., Vaughn, D.E., Faye, I., Poon, P., Bjorkman, P.J., 1998. Crystal structure of hemolin: a horseshoe shape with implications for homophilic adhesion. *Science* 281, 991–995.
- Sun, S.C., Lindstrom, I., Boman, H.G., Faye, I., Schmidt, O., 1990. Hemolin: an insect-immune protein belonging to the immunoglobulin superfamily. *Science* 250, 1729–1732.
- Tseneklidou-Stoeter, D., Gerwig, G.J., Kamerling, J.P., Spindler, K.D., 1996. Characterization of N-linked carbohydrate chains of the crayfish, *Astacus leptodactylus* hemocyanin. *Biol. Chem. Hoppe Seyler* 376, 531–537.
- Vasta, G.R., Ahmed, H., Fink, N.E., Elola, M.T., Marsh, A.G., Snowden, A., Odum, E.W., 1994. Animal lectins as self/non-self recognition molecules. Biochemical and genetic approaches to understanding their biological roles and evolution. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 15 (712), 55–73.
- Vazquez, L., Masso, F., Rosas, P., Montaño, L., Zenteno, E., 1993. Purification and characterization of a lectin from *Macrobrachium rosenbergii*. *Comp. Biochem. Physiol.* 105B, 617–623.
- Vazquez, L., Lanz, H., Montaño, L.F., Zenteno, E., 1994. Biological activity of the lectin from *Macrobrachium rosenbergii* hemolymph. In: Van Driessche, E., Bog Hansen, T.C. (Eds.), *Lectins: Biology Biochemistry Clinical Chemistry*, vol. 10. Textop, Hellerup, Denmark, pp. 261–265.
- Vazquez, L., Jaramillo, L., Rosas, P., Lascrain, R., Cooper, E.L., Zenteno, E., 1996. Bacterial agglutination by the sialic acid specific lectin from the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Comp. Biochem. Physiol.* 113B, 355–359.
- Vazquez, L., Maldonado, G., Agundis, C., Pérez, A., Cooper, E.L., Zenteno, E., 1997a. Participation of a sialic acid specific lectin from freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* hemocytes in the recognition of non-self cells. *Exp. Zool.* 279, 265–272.
- Vazquez, L., Perez, A., Millan, D., Agundis, C., Martin, G., Cooper, E.L., Lascrain, R., Zenteno, E., 1997b. Morphology of hemocytes from the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *J. Morphol.* 234, 147–153.
- Vazquez, L., Sierra, C., Agundis, C., Juarez, S., Zavala, A., Zenteno, E., 1998. Mecanismos de defensa en crustaceos. *InterCiencia* 2, 344–348.
- Zanetta, J.P., Timmerman, P., Leroy, Y., 1999. Gas-liquid chromatography of the heptafluorobutyrate derivatives of the *O*-methyl-glycosides on capillary columns: a method for the quantitative determination of the monosaccharide composition of glycoproteins and glycolipids. *Glycobiology* 9, 255–266.

XIII.- GLOSARIO DE TÉRMINOS

ACIDO SIÁLICO: Carbohidrato de 9 carbonos, cuyas modificaciones forman una familia con cerca de 40 miembros; se encuentran en el extremo distal de N y O-glicanos y posee varias funciones biológicas, que van desde comunicación celular, hasta ser las moléculas por la cual los patógenos reconocen sus células blanco.

CD4: Proteína transmembranal, co-receptor de linfocitos T; posee un dominio de tipo Ig mediante el cual reconoce el carbohidrato del complejo mayor de clase-II y promueve una respuesta con expresión de anticuerpos.

CD8: Proteína transmembranal co-receptor de linfocitos T; posee un dominio de tipo Ig mediante el cual reconoce el carbohidrato del complejo mayor de histocompatibilidad clase-I, y promueve una respuesta de tipo citotóxica.

DECÁPODO: Orden de crustácea que incluye a los camarones langostas, cagrejos y langostinos, Tienen un caparazón que cubre y unifica a los somites de la cabeza y torax y engloba una cámara branquial en cada lado. Usualmente tienen 5 (raramente 6) pares de patas. Están divididos en 3 grupos principales: Branchyura, Macrura y Anomura.

DOMINIO IgV: Dominio proteico de 100 aminoácidos implicado en el reconocimiento del antígeno y que se encuentra en moléculas de anticuerpo y muchas otras proteínas que forman la superfamilia de las inmunoglobulinas.

DOMINIO IgC: Dominio proteico de 100 aminoácidos que se encuentra en moléculas de anticuerpo y muchas otras proteínas que forman la superfamilia de las inmunoglobulinas.

GLICANO: Término generico para un azúcar o ensamble de azúcares, en forma libre o unida a otra molécula.

GLICOCONJUGADO: Molécula en la cual uno o más unidades glicánicas están unidas covalentemente a una entidad que no es un carbohidrato.

GLICOSILTRANSFERASA: Enzima que cataliza la transferencia de un nucleótido-azúcar donador a un sustrato.

ISOFORMAS: Múltiples formas de la misma proteína que difieren en su secuencia de aminoácidos. Pueden producirse por diferentes genes o por

empalmes alternativos de transcritos de RNA a partir del mismo gene.

LECTINA: Proteína que une carbohidratos y no posee actividad catalítica.

N-GLICANOS: Glicano covalentemente unido a un residuo de asparagina de una cadena polipeptídica en la secuencia consenso Asn-X-Ser/Thr.

N-GLICOPEPTIDO: Segmento de cadena polipeptídica que posee un N-glicano.

NEURAMINDASA: Enzima que posee la habilidad de hidrolizar el enlace que mantiene unido a un ácido siálico con el carbohidrato adyacente y lo elimina del glicoconjugado.

O-GLICANOS: Un glicano unido glicosidicamente al grupo hidroxilo de los aminoácidos serina, treonina o hidroxilisina.

O-GLICOPEPTIDO: Segmento de cadena polipeptídica que posee un O-glicano.

Superfamilia de las inmunoglobulinas (SFIGS): Grupo de proteínas que poseen un arreglo en emparejado de dos hojas de hebras beta, una de ellas contiene 3 hebras y la otra 4, este dominio es de amplia distribución taxonómica y está implicado en procesos de reconocimiento.

SISTEMA PROPO: Serie de reacciones enzimáticas, en donde se convierte a la tirosina en DOPA y posteriormente en DOPA-quinona, precursor de la melanina, pigmento pardo-negro con diversas propiedades biológicas como inhibición de actividades enzimáticas, bacterianas y fúngicas.