

Programa de Estudios de Posgrado

**AISLAMIENTO, CLONACIÓN Y SECUENCIACIÓN
DE SECUENCIAS QUE CODIFICAN PARA
INHIBIDORES KAZAL EN EL CAMARÓN BLANCO
(*Penaeus vannamei*).**

T E S I S

Que para obtener el grado de

Maestro en Ciencias

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales
(Orientación en Biotecnología)

p r e s e n t a

Julio Antonio Hernández González

La Paz, B. C .S., Septiembre del 2003.

ACTA DE REVISION DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 11:30 horas del día 30 del Mes de Septiembre de 2003, se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por la Dirección de Estudios de Posgrado del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., para revisar la Tesis de Grado titulada:

" AISLAMIENTO, CLONACIÓN Y SECUENCIACIÓN DE SECUENCIAS CODIFICANTES PARA INHIBIDORES KAZAL EN EL CAMARÓN BLANCO (*Penaeus vannamei*)"

Presentada por el alumno:

Julio Antonio Hernández González

Aspirante al Grado de MAESTRO EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACION DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACION EN **Biotecnología**

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron su **APROBACION DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISION REVISORA

Dra. Patricia Hernández Cortés
DIRECTOR DE TESIS

Dra. Norma Hernández Saavedra
CO-TUTOR

Dr. Francisco Vargas Albores
CO-TUTOR

DRA. THELMA ROSA CASTELLANOS CERVANTES,
DIRECTORA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

RESUMEN

Los inhibidores Kazal se distinguen por sus relaciones topográficas entre los enlaces disulfuro, la localización del sitio reactivo y que pueden ser de uno o más dominios. Esta familia de inhibidores controla la acción de enzimas serin proteinasas y está involucrada en diversas funciones como la digestión, defensa y acción anticoagulante. El objetivo general de este trabajo fue obtener secuencias que codificaran para inhibidores Kazal en hepatopáncreas de *Penaeus vannamei*. Se realizó RT-PCR con oligonucleótidos diseñados en base a la secuencia de un inhibidor multidominio de *P. monodon* y usando como templado el RNA del hepatopáncreas de *P. vannamei*. Para obtener los extremos se amplificó usando como templado una librería unidireccional de ADNc de hepatopáncreas. El RT-PCR derivó en un fragmento de 223 pb (fragmento A), mientras que las amplificaciones a partir de la librería resultó en tres fragmentos de 256, 222 y 129 pb (fragmento B, C y D). El fragmento A traduce 74 aminoácidos que corresponden a dos dominios parciales de un inhibidor Kazal. El primer dominio posee de la tercera cisteína a la sexta y el segundo dominio de la primera cisteína a la quinta. Se identificó el sitio reactivo a alanina, por lo cual indica especificidad a elastasa. En el fragmento B, 174 pb no son traducibles y contienen codón de terminación, una señal de poliadenilación 12 pb río arriba de la poli (A) que consta 15 pb. El fragmento C codifica desde una parte no traducible que incluye el codón de inicio; el fragmento C y B empalman dando la secuencia completa de un inhibidor con un solo dominio, el cual contiene glicina en el sitio reactivo pudiendo tener una especificidad hacia la enzima elastasa. La mayor homología de la secuencia deducida de los fragmentos C y B fueron con un inhibidor Kazal de anémona que tiene especificidad sobre elastasa. El fragmento D de 129 pb empalma con los fragmentos B y C sin embargo, presenta un salto de 93 pb. El análisis de su secuencia deducida corresponde a una proteína diferente a los inhibidores, que si bien tiene similitudes porque la distribución de las cisteínas es similar a los inhibidores tipo Kazal, no presenta todas las características que la podrían definir como tal. La capacidad de inhibir de los inhibidores encontrados deberá ser confirmada con el aislamiento de la proteína y estudios de cinéticas, ya que no todos los dominios son funcionales. Por otra parte, los inhibidores encontrados son no clásicos, distinguiéndose dentro del mismo grupo por el número de aminoácidos en la parte expuesta hacia la enzima objetivo. Por tanto, es necesario contar con el arreglo tridimensional para establecer relaciones estructura-función además de determinar si desempeña un papel en la actividad en la fisiología de los camarones.

ABSTRACT

Kazal inhibitors are characterized by topographic relationships between their disulfide bonds, the reactive side location, and their mono- or multi-domain. This inhibitor family controls the enzyme action of serine proteinases and is involved in functions, such as digestion, defense, and coagulation. The objective of this work was to obtain the sequences that codified Kazal inhibitors in the *Penaeus vannamei* midgut gland. An RT-PCR was run with oligonucleotides designed from a multi-domain Kazal inhibitor from *P. monodon* and midgut gland RNA as template. To obtain both end extremes, a template from a digestive gland cDNA library was used. A 223-bp fragment (A) was obtained from the RT-PCR, and three fragments (B, C, D,) of 256, 222, and 129 bp were obtained from the library. Fragment A translates to 74 amino acids that correlate with two partial domains of a Kazal inhibitor. The first domain is located from the third to sixth cysteine, and the second domain, from the first to the fifth cysteine. The reactive site was alanine, which indicates specificity for elastase. In fragment B, 174 bp was not translated, the fragment is characterized by a terminal codon, a signal sequence twelve bp upstream from poly A. Fragment C contains an initial codon and matches fragment B. Both fragments are considered a full sequence corresponding to a mono-domain with glycine at the reactive side, indicating that this Kazal inhibitor has elastase as their target enzyme. The best similarity was found with an anemone Kazal inhibitor that is specific to elastase. Fragment D, matched the B and C fragments, but a gap of 93 bp was present. The deduced sequence shows that this is a different protein. The inhibition capability has to be confirmed with protein isolation and kinetics studies because not all domains are functional. The shrimp inhibitors belong to a non-classic group, but are particular because the amino acid number exposed to the enzyme is different. Therefore, it is necessary to obtain the three dimensional configuration to establish the structure-function relation and determine their physiological role.

DEDICATORIA

A mis padres Hila y Pepe.

A Myriam y a Ernesto.

A mis Hermanos.

AGRADECIMIENTOS

Al CIBNOR por permitirme el uso de sus instalaciones para la realización de este trabajo.

A la Dra. Patricia Hernández por su dirección en el desarrollo de esta tesis.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico (163704).

A la dirección de posgrado del CIBNOR por su labor.

Al personal del centro de información y biblioteca del CIBNOR, a Ana María Talamantes, Esther Ojeda y Antonio Díaz.

A mi comité revisor Dra. Patricia Hernández Cortés, Dra. Norma Hernández Saavedra y Dr. Francisco Vargas Albores.

A posgrado por el apoyo económico otorgado para continuar el trabajo.

A la Dra. Bertha Arredondo Vega por permitirme equipo de laboratorio.

Al grupo de bioquímica por aportar su granote de arena para la realización de este trabajo.

Dr. Fernando García, Dr. Julio Córdova, a la técnico Ángeles Navarrete, a mis compañeros Adriana, Arturo, Cristiane, Mariana y Laura.

A Juan Carlos por las asesorías de la vida.

A mis compañeros de maestría. Tania, Claudia, Meliza, Evelyn, Alfonso M, Alfonso A, Alberto y Cristian.

A mis padres y hermanos por contar siempre con ellos.

A Myriam y Ernesto por ser catalizadores para seguir adelante.

A la Familia de Myriam.

A mis Amigos Dante y Adriana.

CONTENIDO

CONTENIDO	Página
Resumen	i
Abstract	ii
Dedicatoria	iii
Agradecimientos	iv
Contenido	v
Índice de Figuras	vii
Índice de Tablas	viii
Abreviaturas	ix
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Biología del camarón blanco	1
1.2 Serin proteinasas	2
1.2.1 Serin proteinasas en peneidos	3
1.3 Inhibidores de serin proteinasas	3
1.4 Inhibidores de la familia Kazal	5
1.4.1 Mecanismo de inhibición	7
1.4.2 Inhibidores de la familia Kazal en vertebrados	9
1.4.3 Inhibidores de la familia Kazal en invertebrados	10
2. ANTECEDENTES	11
3. JUSTIFICACIÓN	14
4. HIPÓTESIS	15
5. OBJETIVOS	15
5.1 Objetivo general	15
5.2 Objetivos particulares	15
6. MATERIAL Y MÉTODOS	16
6.1 Detección de inhibidores Kazal	16
6.1.1 Muestras biológicas	16
6.1.1.1 Extracción de ADN genómico	16
6.1.1.2 Evaluación cuantitativa y cualitativa de ADN	17
6.1.1.3 Aislamiento de ARN total (ARNt)	18
6.1.1.4 Evaluación cuantitativa y cualitativa de ARNt	19
6.1.2 Preparación de la sonda	20
6.1.2.1 Extracción de ADNp	21
6.1.2.2 Incorporación de dioxigenina	22
6.1.3 Southern blot	24
6.1.3.1 Digestión de ADN genómico	24
6.1.3.2 Transferencia a membrana	24
6.1.3.3 Hibridación	25
6.1.3.4 Inmunodetección	26
6.2 RT-PCR	27
6.2.1 Síntesis de la primera cadena de ADN complementario (ADNc)	27
6.2.2 Reacción de la polimerasa en cadena (PCR)	28

6.3 PCR a partir de la librería de ADNc	28
6.4 Clonación y secuenciación	29
6.4.1 Ligación de los productos de PCR	29
6.4.2 Preparación y transformación de células de competentes	29
6.4.3 Secuenciación	30
7. RESULTADOS	32
7.1 Preparación de la sonda	32
7.2 Detección de inhibidores	33
7.3 RT-PCR	33
7.4 PCR usando como templado la librería de ADNc	34
7.5 Clonación y secuenciación	35
7.6 Análisis de secuencias	37
8. DISCUSIÓN	42
9. CONCLUSIONES	51
10. BIBLIOGRAFÍA	52
11. APÉNDICE	60
11.1 APÉNDICE I. Diseño de oligonucleótidos	60
11.2 APÉNDICE II. Medios de cultivo.	62

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representación topográfica de seis inhibidores de serin proteinasas.	5
Figura 2. Dominio Kazal.	6
Figura 3. Inhibidores multidominio Kazal.	7
Figura 4. Representación del arreglo de los enlaces disulfuro.	8
Figura 5. ADNp.	32
Figura 6. PCR a partir de ADNp.	32
Figura 7. PCR para incorporar dioxigenina.	32
Figura 8. Determinación de la concentración de la sonda.	32
Figura 9. Southern blot.	33
Figura 10. Electroforesis de ARN total.	34
Figura 11. RT-PCR.	34
Figura 12. PCR para obtener el extremo 3'.	35
Figura 13. PCR para obtener el extremo 5'.	35
Figura 14. Secuencias de nucleótidos y deducida de aminoácidos.	36
Figura 15. Análisis del alineamiento de los fragmentos 2, 3 y 4.	39
Figura 16. Representación gráfica de solapamiento de los fragmentos 2, 3 y 4.	40
Figura 17. Estructura topográfica hipotética del PVK2.	41
Figura 18. Alineamiento de PVK1 y PVK2 contra invertebrados por dominios.	60
Figura 19. Diseño de los oligos pPMF, pPMF2 y pPMR.	61
Figura 20. Diseño del oligonucleótido pPVR	62

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I. Número de residuos entre las cisteínas, en varios inhibidores Kazal.	10
Tabla II. Características de los inhibidores Kazal de invertebrados.	12
Tabla III. Condiciones empleadas en el PCR de incorporación de dioxigenina.	23
Tabla IV. Condiciones utilizadas en las digestiones.	24
Tabla V. Condiciones para la ligación.	25
Tabla VI. Análisis de identidad de PVK1, PVK2 y PVp.	41

ABREVIATURAS

aa	Aminoácido
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
ADNg	Ácido desoxirribonucleico genómico
ADNp	Ácido desoxirribonucleico plasmídico
AEI	Inhibidor de elastasa de anémona
ARN	Ácido ribonucleico
ARNasa	Ribonucleasa
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
Dig	Dioxigenina
dUTP	Deoxiuridina trifosfato
dNTP	Deoxinucleótido trifosfato
PAPI	Inhibidor de proteinasas de <i>Pacifastacus leniusculus</i>
pb	Pares de bases
PMPI1	Inhibidor de proteinasas de <i>Penaeus monodon</i> 1
PMPI2	Inhibidor de proteinasas de <i>Penaeus monodon</i> 2
PMPI3	Inhibidor de proteinasas de <i>Penaeus monodon</i> 3
pPMF	Oligonucleótido de <i>Penaeus monodon</i> sentido
pPMF2	Oligonucleótido de <i>Penaeus monodon</i> sentido 2
pPMR	Oligonucleótido de <i>Penaeus monodon</i> antisentido
pPVR	Oligonucleótido de <i>Penaeus vannamei</i> antisentido

1. INTRODUCCIÓN

Quizá los biopolímeros mejor estudiados son las proteínas y sus funciones abarcan la catálisis (enzimas), el almacenamiento (lipoproteínas), la defensa y el envío de señales (hormonas), entre otras. Desde hace algunos años en el esfuerzo por investigar estas moléculas ha propiciado el estudio en invertebrados ya que, por su fisiología y nivel evolutivo, éstos presentan características particulares. Las enzimas catalizan reacciones de vital importancia a velocidades útiles en condiciones fisiológicas, la eficiencia de su acción debe poderse controlar de manera que se module la producción de distintas sustancias en respuesta a las necesidades de las células. Los inhibidores son biomoléculas, importantes, por el papel en la regulación enzimática. Las proteinasas participan en diversos procesos, como coagulación, hipertensión e infecciones por VIH, por decir algunos, de ahí que sea tan importante el estudio de sus inhibidores (Scharpe et al., 1991). En *Penaeus vannamei* se desconocen los inhibidores de proteinasas sitio reactivo específico. Para comprender las particularidades de los inhibidores en camarón daremos información que nos llevará a entender su importancia y función en la fisiología de éstos organismos.

1.1 BIOLOGÍA DEL CAMARÓN BLANCO.

Penaeus vannamei, conocido como camarón blanco del Pacífico, es una especie nativa de la costa oeste del Océano Pacífico y se distribuye desde Sonora en el Golfo de California (México), hasta las costas del Perú (Martínez-Córdova,1993). Ocupa diversos hábitat, además de sufrir cambios morfológicos, fisiológicos y de conducta durante su

desarrollo ontogénico y crecimiento. La alimentación de los camarones juveniles y adultos es omnívora, consumiendo en estado silvestre principalmente pequeños invertebrados (Dall, 1992). Para esto posee un sistema digestivo constituido por boca, esófago, estómago, hepatopáncreas, intestino y ano. Entre las funciones del hepatopáncreas se encuentran síntesis y secreción de enzimas digestivas, absorción de los productos de la digestión, reserva de minerales y producción de sustancias orgánicas, metabolismo de lípidos y de carbohidratos, distribución de reservas almacenadas para el ciclo de muda y catabolismo de compuestos orgánicos (Ceccaldi, 1989).

1.2 SERIN PROTEINASAS.

Las serin proteinasas (EC 3.4.21.X) son las enzimas que catalizan la hidrólisis de enlaces peptídicos en la parte interior de la proteína. Algunas proteinasas están involucradas en la digestión de la proteína intra y extracelular, pero la mayoría tienen funciones mucho más especializadas tales como activación de zimógenos, liberación de precursores de hormonas, liberación de péptidos activos, etc. (García-Carreño, 1992; Neurath., 1984). El sitio activo de este grupo de enzimas está constituido de tres residuos: Ser, His y Asp conocidos como tríada catalítica, y una secuencia (pocket) ubicada cerca de la serina del lugar activo, la cual otorga a cada serin proteinasa su especificidad (Mathews y van Holde, 1999). Como resultado de la secuencia de aminoácidos (aa), específicamente de la posición de los residuos que forman la tríada catalítica y de la conformación tridimensional, las serin proteinasas se dividen en dos familias. La familia de las serin proteinasas I está integrada por quimotripsina, tripsina, elastasa y trombina; presentando en

el sitio activo los residuos His⁵⁷, Asp¹⁰² y Ser¹⁹⁵; mientras que la familia de las serin proteinasas II solamente tienen a la subtilisina, con un orden diferente en los aminoácidos del sitio activo Asp³², His⁶⁴ y Ser²²¹ (Neurath, 1984). Cada proteinasa tiene especificidad hacia un grupo de aminoácidos: la tripsina corta del lado carboxilo de los aminoácidos básicos Arg y Lys; la quimotripsina corta enlaces peptídicos de aminoácidos no polares como Tyr, Phe y Leu; y la elastasa es específica para Ala, Val y Gly.

1.2.1 Serin proteinasas en peneidos.

Los peneidos cuentan con grupo de enzimas digestivas muy completo dentro de las que se incluyen proteasas, lipasas, amilasas y carbohidrasas. Dado que la desnaturalización ácida no existe en estos organismos, las proteasas son el único mecanismo de digestión de proteína. En el hepatopáncreas de camarón se han detectado serin proteinasas como: tripsina (Tsai et al., 1986) y quimotripsina (van Wormhoudt et al., 1992), de las cuales la tripsina contribuye con el 60% de la actividad total por proteasas (Cruz-Suárez, 1996). En *P. vannamei* se han reportado cinco isoformas de tripsina (Klein et al., 1996) y solo una de quimotripsina (Sellos y van Wormhoudt, 1992).

1.3 INHIBIDORES DE SERIN PROTEINASAS.

Para evitar daño a las proteínas componentes de células y tejidos por enzimas, la actividad proteolítica debe ser controlada. Este control generalmente se realiza por regulación de la expresión, secreción y/o activación de pro-proteinasas, por degradación

específica de enzimas maduras y por inhibición (Bode y Huber, 2000). Las serin proteinasas pueden ser inhibidas por dos grupos de proteínas. Uno de éstos lo constituyen proteínas de alto peso molecular ($>350,000$ Da) llamadas α_2 -macroglobulinas, y el otro son los inhibidores de sitio reactivo específico, los cuales cumplen tres enunciados: 1) en los complejos enzima-inhibidor la actividad enzimática hacia cualquier sustrato se encuentra abolida, 2) la inhibición es competitiva y 3) especificidad a una clase de proteinasa (Laskowsky & Kato, 1980). El mecanismo de inhibición de los inhibidores de sitio reactivo específico consiste en presentar en su superficie molecular un sitio similar al del sustrato de la proteinasa y permite la formación del complejo enzima-inhibidor. De esta forma, la nomenclatura para identificar a los aminoácidos del sustrato y el inhibidor es la misma. Los residuos alrededor del sitio reactivo son $P_1, P_2, \dots P_n$ (Schechter y Berger, 1967) hacia el extremo amino y $P_1', P_2', \dots P_n'$ hacia el extremo carboxilo. El residuo (P_1) corresponde a la especificidad de la enzima por el sustrato o por el inhibidor. De tal forma que inhibidores cuyo P_1 sea Lys o Arg inhiben tripsina, los que tienen Tyr, Phe, Leu o Met inhiben quimotripsina, y aquellos con P_1 Ala o Ser inhiben elastasa (Laskowsky & Kato, 1980). La especificidad inhibitoria puede ser clasificada en dos tipos: la interenzima, la cual reconoce entre proteinasas (tripsina, trombina, quimotripsina, etc.) y la intraenzima que diferencia entre proteinasas del mismo tipo pero de diferente origen. La primera forma depende de la naturaleza de P_1 y la segunda de la naturaleza de todos los otros residuos (Asao et al., 1998).

Se han caracterizado diversos inhibidores de serin proteinasas, donde el sitio reactivo ha sido determinado y es evidente que cumplen el mecanismo estándar. Los inhibidores de serin proteinasas se han clasificado en familias, basándose en la similitud

estructural entre sus miembros. La característica más fácil de apreciar son las relaciones topográficas entre los enlaces disulfuro altamente conservados y la localización del sitio reactivo, como se muestra en la Fig. 1 (Laskowsky y Kato, 1980). Actualmente se han identificado por lo menos 18 familias (Laskowski y Qasim, 2000).

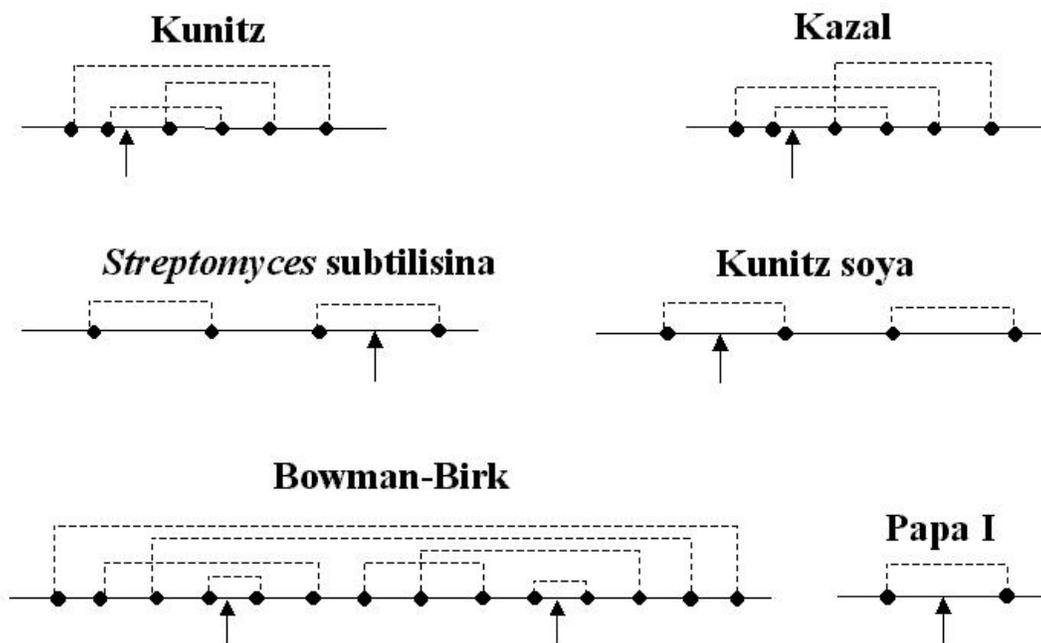
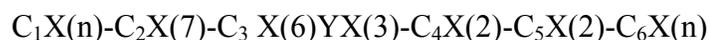


Figura 1. Representación topográfica de seis inhibidores de serin proteinasas. Las cisteínas son representadas por círculos negros y el enlace disulfuro esta representado por guiones, el sitio reactivo esta denotado por una flecha (tomada de Laskowski y Kato 1980).

1.4 INHIBIDORES DE LA FAMILIA KAZAL.

Los inhibidores de la familia Kazal tienen tres enlaces disulfuros que se encuentran conectados de la siguiente forma: C₁-C₅, C₂-C₄, C₃-C₆. El número de residuos entre algunas cisteínas esta conservado, teniendo la fórmula general:



Formándose tres bucles, bucle A de la C₁-C₃, bucle B de la C₂-C₄ y bucle C de la C₃-C₆ (Fig. 2). Existe una tirosina conservada entre la Cys 3 y 4, otra característica es la posición del sitio reactivo o P₁, el cual es el segundo residuo después de la cisteína dos (Cys 2-X-P₁) (Fig. 2). La estructura secundaria de los inhibidores Kazal consiste en varias cadenas extendidas, una α -hélice central y tres β -hojas anti-paralelas (Stubbs et al., 1997).

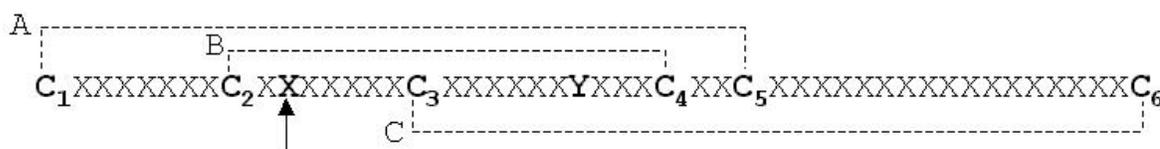


Figura 2. Dominio Kazal. En esta imagen se presentan los aminoácidos por su código de una letra, las X corresponden a cualquier aminoácido, los enlaces disulfuro están representados por las líneas punteadas, el residuo P₁ está indicado por una flecha, los bucles están marcados con una letra, también se puede observar la tirosina siempre conservada en esta familia de inhibidores .

Una característica notable de los inhibidores Kazal es que pueden poseer varios sitios reactivos homólogos o “multidomios” en la misma cadena polipeptídica, donde cada dominio tiene un sitio reactivo (Laskowski y Kato, 1980). Por lo que algunos inhibidores son multifuncionales debido a que tienen dos o más dominios que inhiben diferentes enzimas (Laskowski y Kato, 1980). Los multidominios (Fig. 3) se producen comúnmente por duplicación del gene que resulta de elongación del mismo o por modificaciones postraduccionales (Laskowski y Kato 1980; García y Hernández, 2000).

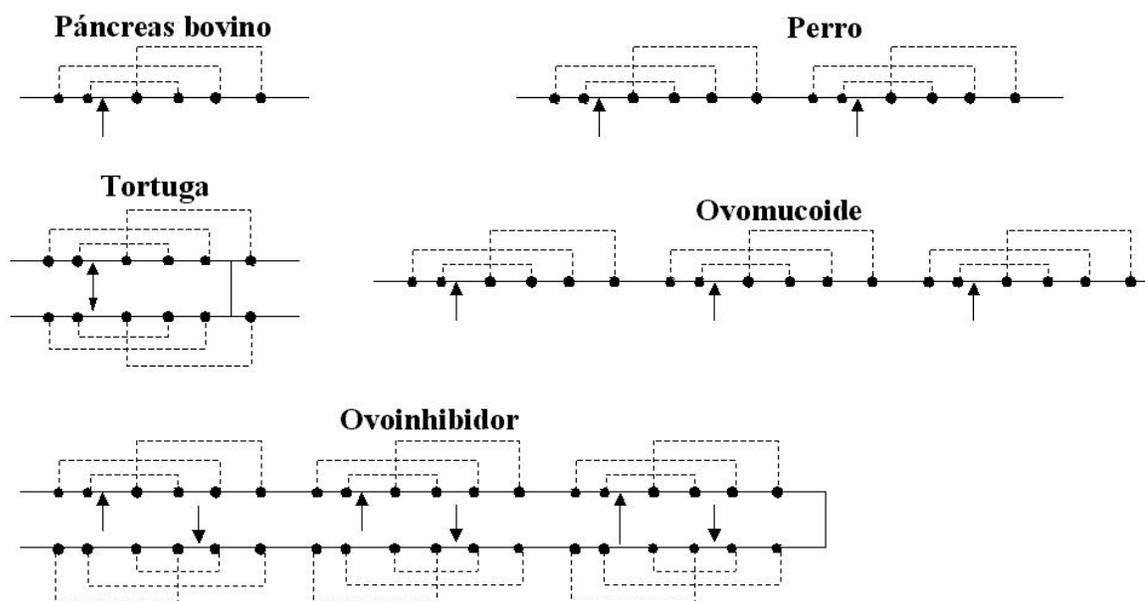
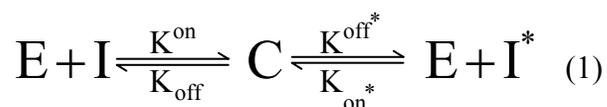


Figura 3. Inhibidores multidominio Kazal. En esta figura se muestran cinco inhibidores Kazal, con diferente número de dominios (Modificado de Laskowski y Kato, 1980).

1.4.1 Mecanismo de inhibición.

Los inhibidores Kazal obedecen el mecanismo estándar, en el que el inhibidor intacto y el inhibidor modificado se encuentran en equilibrio dando la ecuación:



donde E es la enzima, I es el inhibidor intacto, I* es el inhibidor modificado con el enlace peptídico del sitio reactivo hidrolizado y C es el complejo estable de la enzima-inhibidor (Lu et al., 2001). Durante el complejo se forma como intermediario la enzima acilada y el átomo de C trigonal del residuo P1 y el átomo de O^γ de la Ser¹⁹⁵ en la familia de la quimotripsina y de la Ser²²¹ en la familia de la subtilisina se encuentran más cerca que

debido a fuerzas de van der Waals', de tal forma que se crea un enlace covalente parcial (Laskowski y Qasim, 2000). Además de la participación del residuo P1, el bucle que se forma alrededor de este mismo residuo se encuentra ampliamente expuesto participando como una de las dos cadenas de una distorsionada hoja β antiparalela, en complejo con enzimas de la familia de la quimotripsina, la segunda cadena es contribuida por la enzima. La interacción con el clan de la subtilisina esta dada por dos cadenas de la enzima y el resultado es una hoja β distorsionada de triple cadena (Laskowski y Qasim, 2000). Durante la formación de este complejo, de 10 a 17 residuos del inhibidor y de 17 a 29 residuos de la enzima, construyen interacciones van der Waals y puentes de hidrógeno, siendo la principal área de contacto del residuo P3 al P3' (Fig. 4) (Grzesiak et al., 2000).

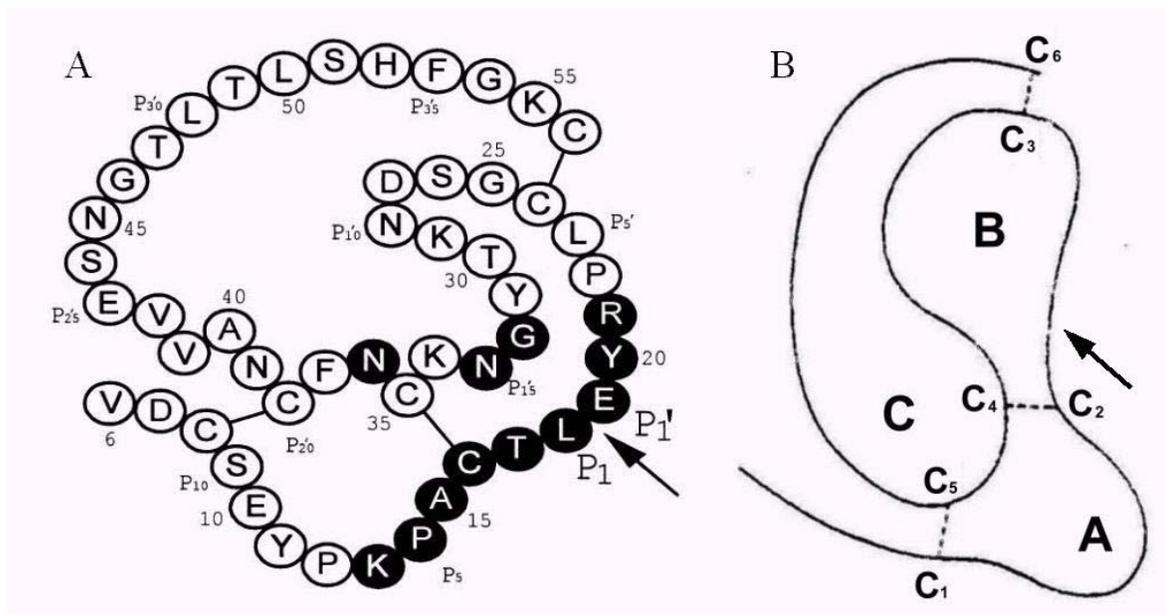


Figura 4 Representación del arreglo de los enlaces disulfuro. Las barras que unen a las cisteínas indican los enlaces disulfuros y la flecha el sitio reactivo. Los 12 residuos oscuros son los residuos que tienen contacto con la enzima. Imagen tomada de Lu et al., 2001.

Existen proteínas con secuencias Kazal pero sin la propiedad de inhibir, por ejemplo la proteína BM-40 (osteonectin) que es un anti-adhesivo. Esta proteína tiene un dominio FS (elongado) similar a un inhibidor Kazal, pero con cinco enlaces disulfuro, de los cuales C₅ C₉, C₆ C₈ y C₇ C₁₀ son los característicos de inhibidores Kazal. Es de hacerse notar la falta del residuo Tyr (P'₁₃), y las inserciones dentro del bucle B, que hacen que la molécula pierda su capacidad inhibitoria (Hohenester et al., 1997).

1.4.2 Inhibidores de la familia Kazal en vertebrados.

Los inhibidores de esta familia han sido reportados en todos los vertebrados estudiados y se encuentran almacenados en los gránulos de zimógenos, los cuales son secretados en el jugo pancreático (Kikuchi et al., 1985; Fukuoka et al., 1986; Horii et al., 1989; Kido et al., 1990). También se han descubierto inhibidores de acrosin, una enzima similar a tripsina, en esperma, plasma seminal y vesículas seminales de varios mamíferos (Winnica et al., 2000), estos inhibidores son de un solo dominio Kazal y de bajo peso molecular. En mamíferos la mayoría de los inhibidores de la familia Kazal son de un solo dominio, aunque también se pueden encontrar inhibidores de dos dominios en la glándula submandibular (Hochstrasser et al., 1993)., por ejemplo, en perro el inhibidor hallado en la glándula submandibular tiene una arginina en el primer dominio correspondiente a P1, mientras que en el segundo dominio posee una metionina. Por otro lado, el huevo de aves contiene dos glicoproteínas inhibitoras Kazal: ovomucoides y ovoinhibidores. Los ovomucoides pueden ser de uno, dos o tres dominios, mientras que los ovoinhibidores tienen seis dominios Kazal. Zhao et al., (1996) purificó un inhibidor de secreciones

pancreáticas (PSTI) de páncreas de avestruz; otro inhibidor multidominio Kazal se encontró en caimán, este posee cuatro dominios, inhibiendo quimotripsina y tripsina (Araujo et al., 1999).

1.4.3 Inhibidores de la familia Kazal en invertebrados.

Los inhibidores Kazal no están limitados a vertebrados, también se han encontrado en invertebrados ejemplos los encontramos en anémona (Tschesche et al., 1987), en los insectos hematófagos *Rhodnius prolixus* (Friedrich et al., 1993) y *Dipetalogaster maximus* (Mende et al., 1999), en sanguijuela (Stubbs et al., 1997) y en el langostino *Pacifastacus leniusculus* (Johansson et al., 1994). Los inhibidores Kazal de invertebrados difieren en secuencia y estructura respecto a los inhibidores Kazal de vertebrados, teniendo los de invertebrados un número mayor de residuos entre la C₄ y la C₅, y menor entre la C₅ y C₆, pudiendo afectar en el número de residuos del bucle C (Tabla I), por esta diferencia Tschesche et al (1987) denominó inhibidores Kazal clásicos a los que conservaban el número de residuos y no clásicos a los que no.

Tabla I. Número de residuos entre las cisteínas, en varios inhibidores Kazal.

	Clásico Codorniz Japonesa	No clásicos				
		Anémona	<i>Rhodnius prolixus</i>	<i>Dipetalogaster maximus</i>	Sanguijuela	Langostino
C ₁ -C ₂	7	3	1	1	1	3
C ₂ -C ₃	7	7	7	7	7	7
C ₃ -C ₄	10	10	10	10	10	10
C ₄ -C ₅	2	6	3	3	3	6
C ₅ -C ₆	17	13	16	16	10	12
Bucle A (C ₁ - C ₃)	17	13	11	11	11	13
Bucle B (C ₂ - C ₄)	20	20	20	20	20	20
Bucle C (C ₃ - C ₆)	33	33	33	33	27	32

2. ANTECEDENTES

Actualmente se ha descrito la presencia de varias serin proteinasas en crustáceos, conociendo poco sobre la regulación de la mismas después de su traducción, ya sea por zimógenos o por inhibidores. En 1987 se descubrió el primer inhibidor Kazal en invertebrados en *Anemonia sulcata* (Tschesche et al., 1987). En 1993 Friedrich et al., purificaron y secuenciaron el extremo amino de la proteína, clonaron el ADNc y secuenciaron un inhibidor Kazal no clásico de dos dominios en *Rhodnius prolixus* (Tabla II). Además demostraron su especificidad hacia trombina, por lo que posiblemente funcione como anticoagulante mientras el insecto se alimenta de la sangre del hospedero. En 1997, Stubbs et al. determinaron la estructura tridimensional del inhibidor recombinante Kazal de tripsina derivado de sanguijuela. Mende et al. (1999) secuenciaron el ADNc de un inhibidor de trombina de tres dominios, tipo dipetalogastin, donde cada dominio mostró una estructura de doble cabeza con una secuencia interna homóloga a la secuencia de *Rhodnius prolixus*; el primer dominio tipo dipetalogastin corresponde a una proteína de dos dominios Kazal obtenida anteriormente del mismo organismo. Pszeny et al. (2000) reportaron la secuencia de un inhibidor Kazal de cuatro dominios en el parásito intestinal *Toxoplasma gondii*, sugiriendo como posible función del inhibidor la protección contra las tripsinas del hospedero o las serin proteinasas propias, las cuales son importantes para la invasión. El primer inhibidor Kazal descubierto en un crustáceo se obtuvo de hemocitos del langostino *Pacifastacus leniusculus*, siendo de cuatro dominios, y determinando con la proteína que inhibe a la quimotripsina y la subtilisina en una relación 1:1. Por lo anterior se sugiere que su función biológica esta relacionada con el sistema inmune (Johansson et al., 1994).

Tabla II. Características de los inhibidores Kazal de invertebrados.

Organismo	Dominios Kazal	P ₁	Proteinasa que inhibe	Comentario
Anémona <i>A. sulcata</i>	1	M	Elastasa	
Chinche besucona <i>R. prolixus</i>	2	H G	Trombina	El bucle de unión del segundo dominio no es funcional debido a la inserción de un aminoácido entre la Cys II y la Cys III.
Insecto <i>D. maximus</i>	6	R N R D K R	El dominio 2 dipetalogastin inhibe trombina	Esta proteína es modificada post-traduccionalmente para formar 3 inhibidores cada uno con un dominio dipetalogastin. Cada dominio dipetalogastin consta de dos dominios Kazal.
Sanguijuela <i>H. medicinalis</i>	1	K	Triptasa	
Langostino <i>P. leniusculus</i>	4	L L L Q	Quimotripsina o subtilisina	El cuarto dominio no tiene actividad inhibitoria. La Leu en los tres primeros dominios sugieren actividad hacia Quimotripsina.
Camarón tigre <i>P. monodon</i>	4	E G A	El primer dominio debe de inhibir subtilisina, el segundo y el tercer dominio elastasa	Secuencia obtenida del hepatopáncreas.
Camarón tigre <i>P. monodon</i>	6	D T D D E G	El primero, el tercero, el cuarto y el quinto dominio inhibe subtilisina, mientras que el sexto inhibe elastasa.	Secuencia obtenida del hepatopáncreas.
Camarón tigre <i>Penaeus monodon</i>	5	T A E K E	Inhibiendo el segundo dominio elastasa, el tercero y el quinto subtilisina; y el cuarto tripsina	Secuencia obtenida de hemocitos.
Parásito <i>T. gondii</i>	4	R R L L	Indicando que pueden inhibir tripsina y quimotripsina,	

En 1998 García et al. descubrieron proteínas de bajo peso molecular con actividad inhibitoria para tripsina en *Penaeus vannamei*, sugiriendo que la cascada de activación de

proteinasas digestivas es similar a la de otros organismos. En el camarón tigre, *Penaeus monodon*, se obtuvieron 1 secuencia parcial y 2 secuencias completas de nucleótidos que codifican para inhibidores multidominio Kazal: PMPI1, PMPI2 y PMPI3, de 4, 6 y 5 dominios respectivamente siendo los dos primeros de hepatopáncreas y el tercero de hemocitos (Hernández et al., 2000).

3. JUSTIFICACIÓN

Las proteinasas están involucradas en diversas funciones fisiológicas tales como la digestión, activación de zimógenos en cascadas como el mecanismo de coagulación de la sangre, la liberación de hormonas y la liberación de péptidos fisiológicamente activos. Estas enzimas son un riesgo potencial hacia el ambiente proteico, por lo que su actividad debe ser cuidadosamente regulada. El estudio de los inhibidores ha ayudado a entender la regulación de las proteinasas tanto endógenas como exógenas.

En *Panaeus sp.* se han identificado serin proteinasas tipo tripsina y quimotripsina en el hepatopáncreas, que es el órgano encargado de su síntesis y secreción, sin embargo poco se conoce sobre la regulación post-traducciona ya sea por zimógenos o por inhibidores. Dado lo anterior, conocer las características de estos inhibidores y su participación a detalle se vuelve un objetivo primordial para entender la función de las proteinasas.

4. HIPÓTESIS

El hepatopáncreas del camarón blanco expresa por lo menos un inhibidor Kazal. A través de la secuencia se puede teorizar la capacidad de inhibir y su especificidad.

5. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL

Obtener secuencias codificantes de inhibidores Kazal en hepatopáncreas de *Penaeus vannamei*.

5.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- Obtener una sonda para genes que codifican para inhibidores Kazal.
- Obtención de secuencias Kazal amplificadas a partir de ADNc de hepatopáncreas de *P. vannamei*.
- Obtención de los extremos 3' y 5' de secuencias Kazal amplificadas usando como templado una librería de ADNc.
- En base a su secuencia de aminoácidos, proponer su especificidad (tipo de inhibidor) y compararla con las reportadas.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 DETECCIÓN DE INHIBIDORES KAZAL.

6.1.1 MUESTRAS BIOLÓGICAS.

Los camarones *Penaeus vannamei*, se obtuvieron del CIBNOR y se mantuvieron en acuario de 120 L, con aireación constante, a 28°C y salinidad de 34 partes por millón (ppm). Los organismos se sacrificaron por decapitación, el hepatopáncreas y músculo abdominal se removieron por disección e inmediatamente se aisló ARN total y ADN genómico respectivamente. Todos los reactivos empleados fueron de grado biología molecular.

6.1.1.1 Extracción de ADN genómico.

Un fragmento del músculo abdominal se transfirió a un tubo de 1.7 mL, donde se cortó finamente con tijeras estériles. De acuerdo a Sambrock et al. (1989), al tubo que contenía el tejido se le agregó 1 mL de buffer de extracción (10 mM Tris-HCl, pH 8.0; 100 mM EDTA, pH 8.0; 20 µg de ARNasa pancreática; 0.5% SDS) y se incubó a 37°C por una hora. A continuación se agregaron 20 µL de una solución de proteinasa K (100 µg/mL) y se incubó a 50°C por 3 horas con agitación periódica. A la mitad del tiempo de incubación se agregaron otros 20 µL de proteinasa K y al final del periodo, la suspensión se dividió en dos partes iguales transfiriendo una de ellas a otro tubo Eppendor de 1.7 mL. A cada tubo se le agregó 1 volumen de la mezcla de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1), se

agitaron, para posteriormente mantenerse en reposo a temperatura ambiente por 10 minutos. Las muestras se centrifugaron a 5000 g a 4°C por 15 minutos, se recuperó la fase acuosa y se transfirió posteriormente a otro tubo Eppendor, este paso de purificación se repitió un par de veces más. A continuación se recuperó la fase acuosa y se transfirió a otro tubo al cual se le adicionaron 0.2 volúmenes de acetato de sodio 3M y 2 volúmenes de etanol absoluto preenfriado (-20 °C). Las muestras se mantuvieron a -80°C por 15 minutos y posteriormente se centrifugaron a 15000 g a 4°C por 15 minutos, se desechó cuidadosamente el sobrenadante. El paquete de ADN se lavó nuevamente con etanol absoluto preenfriado y se repitió la centrifugación. En esta ocasión, el precipitado tuvo una consistencia más sólida. El pellet se secó al aire por 15 minutos, posteriormente se disolvió en 200 µL de agua libre de nucleasas. Se procedió a la cuantificación de la muestra espectrofotométricamente y se comprobó su pureza por electroforesis en gel de agarosa al 0.8% en buffer TBE .

6.1.1.2 Evaluación cuantitativa y cualitativa de ADN.

La pureza y concentración del ADN se determinó en celdas de cuarzo de 1 mL empleando un espectrofotómetro Lambda Bio 20 (Perkin-Elmer) a 260 y 280 nm (Warburg-Cristian, 1942). Para determinar la calidad de la muestra se corrió una electroforesis en geles de agarosa al 0.8% en buffer TAE a 80 volts por 30 minutos. Las muestras para electroforesis se prepararon mezclando 2 µg de ADN, 2 µl de LB_{ADN} y se llevó a un total de 15 µl con agua destilada estéril. Al término de la electroforesis, el gel se

incubó en una solución de bromuro de etidio 1.2 μ M durante 15 minutos y finalmente se fotodocumentó en un transluminador UV.

6.1.1.3 Aislamiento de ARN total.

El ARN se extrajo utilizando el reactivo TRIZOL LS (Life Technologies), que tiene su fundamento en la metodología descrita por Chomczynsky y Sacchi (1987). Se adicionó 0.75 mL de reactivo TRIZOL LS por cada 100 mg de tejido, enseguida se realizó el homogenizado con Polytron(o Tekmar's Tissumizer o equivalente). Las muestras se incubaron a temperatura ambiente por 5 minutos para permitir la disociación completa de complejos de nucleoproteínas. Después, a cada muestra se adicionó 0.2 mL de cloroformo, se agitaron vigorosamente por 15 segundos y se incubaron a temperatura ambiente por 15 minutos. Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 10,000 g a 4°C por 15 minutos y la fase acuosa superior se transfirió a un tubo de 1.7 mL y enseguida se adicionó 0.5 mL de alcohol isopropílico. Las muestras se incubaron a 4°C por 10 minutos y se centrifugaron a 10,000 g a 4°C por 15 minutos. Posteriormente, se removió el sobrenadante y se lavó el precipitado de ARN con 1 mL de etanol al 75% en agua con dietilpírocarbonato al 0.1% (DEPC). La muestra se mezcló con vortex y se centrifugó a 7,500 g a 4°C por 5 minutos. El sobrenadante se desechó y el pellet de ARN se secó al aire por 5-10 minutos. Finalmente el ARN se disolvió en 0.2 mL de agua libre de ARNasa (DEPC), se incubó a 60°C por 10 minutos y se almacenó a -80°C.

6.1.1.4 Evaluación cuantitativa y cualitativa de ARN.

La concentración fue determinada por el método Warburg-Christian (1942). Se leyó la muestra en espectrofotómetro a 260 y 280 nm por triplicado. Se hicieron diluciones 1:500 en agua destilada estéril y las muestras se leyeron en celdas de cuarzo de 1 mL empleando un espectrofotómetro Lambda Bio 20 (Perkin-Elmer). Con la finalidad de comprobar la calidad del ARN se corrió una electroforesis en un gel de agarosa al 1.1% bajo condiciones desnaturalizantes, la cual consistió en tres procesos: elaboración del gel, preparación de las muestras y corrimiento de la electroforesis. En la elaboración del gel se disolvió la agarosa en 38.5 mL de agua DEPC. Enseguida se adicionaron 10 mL de buffer RB 5X y se enfrió mediante agitación suave, posteriormente se agregaron 1.5 mL de formaldehído y se vació en el molde al cual previamente se le colocó el peine. Para la preparación de las muestras se mezclaron 30 µg de ARN, 2 µl de buffer de corrimiento 5X, 3.5 µl de formaldehído, 4 µl de buffer de carga y 10 µl de formamida. Enseguida las muestras se calentaron a 65°C por 15 minutos y se enfriaron en hielo. Posteriormente, se le adicionó 1 µl de bromuro de etidio 1 mM a cada muestra. Enseguida se centrifugó 5 segundos a máxima velocidad. Posteriormente, se colocó el gel dentro la cámara asegurándose de que quedara completamente cubierto por el buffer de corrimiento 1X y los pozos del gel sin burbujas. Se recorrió el gel 10 minutos a 100 V, después se cargó el gel con las muestras. Por ultimo el gel se corrió a 80 V hasta que el azul de bromofenol del buffer de carga alcanzó la mitad del gel. Se fotodocumentó con un transluminador. Las soluciones que tuvieron contacto con el ARN fueron preparadas con agua tratada con

DEPC. El material de plástico y soluciones se esterilizaron en autoclave a 120°C por 20 minutos, el material de vidrio y acero se esterilizó en horno a 150°C por 5 horas.

6.1.2. PREPARACIÓN DE LA SONDA.

La preparación de la sonda consistió en incorporar dioxigenina-11-UTP (Boehringer Mannheim) por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La clona KHPA tiene insertado en el sitio múltiple de clonación del vector pBluescript II SK la secuencia del inhibidor multidominio Kazal de *P. monodon* (Hernández et al., 2000). El ADNp de la clona se extrajo por el método alcalino-SDS el cual se describe posteriormente, la calidad y cantidad se observó por espectrofotómetro y comprobó por medio de electroforesis de agarosa al 1.0%. La sonda se elaboro empleando el ADNp como templado y los oligos pPMF/pPMR, sentido y antisentido respectivamente, diseñados en base a la secuencia de la misma clona (ver apéndice 1) y sintetizados por SIGMA GENOSYS. Se empleó el kit de marcado de Boehringer Manheim, el cual tiene uracil trifosfato marcado con dioxigenina. Como control se rutilizó la misma mezcla pero sin nucleótidos marcados así como el control del kit. El producto de PCR se observó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.2% y se estimó el producto de ADN al que se le introdujo dioxigenina al compararlo con ADN del plasmído pBR328 marcado con dioxigenina.

6.1.2.1. Extracción de ADNp

Se realizó por el método de lisis alcalina (Sambrook et al., 1989). Se inoculó 5 mL de caldo LB conteniendo el antibiótico ampicilina (100 μ g) con la colonia KHPA, consecutivamente se incubó a 37°C con agitación (250 rpm) durante 18 horas. De ahí se transfirieron 1.5 mL del cultivo a un tubo de 1.7 mL y se centrifugó a 12,000 g a temperatura ambiente por 5 minutos. Enseguida se removió el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 250 μ L de solución I (glucosa 50 mM, Tris-HCl 25 mM, pH 8.0, EDTA 10 mM) mezclándose con vortex. A continuación se agregaron 250 μ l de la solución II (SDS 1%, NaOH 0.2 N) y se incubó a temperatura ambiente por 10 minutos. Después, se agregaron 250 μ L de la solución III (CH₃COONa 3 M, pH 5.2) fría (colocada en hielo) y se incubó en hielo 15 minutos. Posteriormente, se centrifugó a 12,000 g a temperatura ambiente por 10 minutos y el sobrenadante se transfirió a un tubo de 1.7 mL, al cual se le agregaron 700 μ L de isopropanol a temperatura ambiente. El tubo fue centrifugado a 12,000 g a temperatura ambiente por 30 minutos y el precipitado se lavó con 300 μ L de etanol al 70%. Enseguida se centrifugó a 12,000 g a temperatura ambiente por 2 minutos y el etanol se removió por decantación. Se repitió el lavado con etanol al 70% y el precipitado se secó al aire. Por último, el pellet se resuspendió en 50 μ L de agua conteniendo ARNasa (10 mg/mL). Se procedió a la cuantificación de la muestra espectrofotométricamente y se comprobó la calidad por electroforesis en gel de agarosa al 1.2% en buffer TBE, como previamente se describió. El ADN se almacenó a -20°C.

6.1.2.2. Incorporación de dioxigenina.

Incorporación de dioxigenina por PCR, se realizaron 3 reacciones: la reacción problema, un control del kit de dioxigenina y un control de la reacción de PCR. Entre las reacciones lo que vario fue la cantidad y la fuente del templado, los oligonucleótidos y los deoxinucleótidos (dNTP) marcados con dioxigenina o sin marcar. En la tabla III se muestran los detalles de las tres reacciones. Las reacciones se mezclaron por pipeteo, se colectaron por centrifugación, y posteriormente se transfirieron a un termociclador (GeneAmp® PCR System) con un programa que consiste en un ciclo de desnaturalización a 94°C 2 minutos; 10 ciclos a 95°C 10 segundo, 50°C 30 segundo y 72°C 2 minutos; 20 ciclos de 95°C 30 segundo, 50°C 1 minuto y 72°C 2 minutos; finalmente un paso de extensión 72°C por 10 minutos; y se deja a 4°C. Al producto de PCR se le estimó la cantidad de dioxigenina incorporada. Para esto se preparó una dilución del ADN marcado con dioxigenina control (solución stock 5 µg/mL del plásmido pBR328 linearizado con Bam HI) mezclando 5 µL con 20 µL de agua (concentración final 1 ng/µL). De esta solución se prepararon 5 diluciones seriales 1:10 (100 pg/µl, 10 pg/µl, 1 pg/µl, 0.1 pg/µl y 0.01 pg/µL). De la misma forma que se realizaron las diluciones del control se prepararon las diluciones de la muestra. En una membrana de nylon (Boehringer Mannheim) marcada positivamente se inmovilizó 1 µl de cada muestra control (10, 1, 0.1 y 0.01 pg/µl). En una hilera paralela se inmovilizaron diluciones similares de la sonda marcada del inhibidor de *P. monodon*. Los ácidos nucleicos se fijaron a la membrana por entrecruzamiento con luz UV. Posteriormente la membrana se lavó brevemente con buffer de lavado (100 mM ácido

málico, 150 mM NaCl; pH 7.5; 0.3% Tween 20) y se incubó en solución bloqueadora (Boehringer Mannheim) por 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, la membrana se incubó en la solución de anticuerpos (alcalinfosfatasa-anti-DIG 1:5000) por 30 minutos a temperatura ambiente. A continuación, la membrana se incubó en buffer de detección por 2 minutos. Mientras tanto, a 10 mL de buffer de detección se le mezclaron 200 μ L de la solución NBT/BCIP. Transcurrido este tiempo, se retiró el buffer de detección y se agregó la solución anterior. La membrana se transfirió a oscuridad por una hora para permitir el revelado. Una vez que las marcas aparecieron con suficiente intensidad, la reacción se detuvo lavando la membrana con agua destilada estéril por 5 minutos. Finalmente la membrana se fotografió con un escáner DUOSCAN T1200 (AGFA).

Tabla III. Condiciones empleadas para el PCR de incorporación de dioxigenina.

	Rx Problema	Control Kit	Control PCR	Final concentración
Agua destilada estéril.	34.25	29.25	34.25	
Buffer de PCR con MgCl ₂ 15 mM, 10X	5	5	5	1.0 X [1.5 mM MgCl ₂]
PCR DIG Labeling mix	5	5	-----	Ver nota.
DNTP solución stock 10 mM	-----	-----	5	0.2 mM c/u.
PPMF	2	-----	2	40 pmol
PPMR	2	-----	2	40 pmol
Primer sentido y antisentido	-----	5	-----	5 pmol c/u.
Mezcla enzima 3.5 U/ μ l	0.75	0.75	0.75	2.6 U
Templado ADNp KHPA	1	-----	1	50 ng
Templado control del kit	-----	5	-----	100 pg
Vol. Total	50	50	50	

Nota: La mezcla para marcar PCR-DIG contiene dATP, dCTP, dGTP (2mM cada uno); 1.3 mM dTTP y 0.7 mM DIG-11-dUTP.

6.1.3 SOUTHERN BLOT.

6.1.3.1 Digestión de ADN genómico

Se digirió 4.5 µg de ADN genómico o ADNp de la clona KHPA con las enzimas de restricción Xho I, Hind III, EcoR I, Nco I y Dra I (Las tres primeras de Boehringer Mannheim y las dos restantes de Promega). A cada enzima se le adicionó el buffer recomendado para obtener el óptimo de actividad. Los componentes de la mezcla se adicionaron en el orden en que se presentan en la tabla IV. Terminada de realizar la mezcla se incubó a 37°C durante 1 hora; el producto se analizó en gel de agarosa-TAE al 1.2% y se transfirió a una membrana de Nylon.

Tabla IV. Condiciones utilizadas en las digestiones.

	Control	Xho I	Hind III	Eco RI	Nco I	Dra I	KHPA
Agua milli-Q (µl)	18	17	17	17	17.5	17.5	13
Buffer 10X (µl)	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
Enzim5 U (µl)	0	1	1	1	0.5	0.5	0.5
ADN a digerir (µl)	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	9
Volumen final (µl)	25	25	25	25	25	25	25

6.1.3.2 Transferencia a membrana.

El gel se Pre-trato del gel con solución de desnaturalización (NaOH 0.5 N, NaCl 1.5 M) 2 veces cada una durante 15 minutos a temperatura ambiente y se enjuagó con agua DEPC. Enseguida el gel se sumergió en solución de neutralización 2 veces por 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se colocó en un recipiente una esponja de área ligeramente más grande que el gel y de 5 cm de altura. Al recipiente se le adicionó

solución 20X SSC hasta dejar la mitad de la esponja sumergida en solución. A continuación se cortaron 3 piezas de papel Whatman 3MM del mismo tamaño de la esponja, se colocaron sobre la esponja y se humedecieron con 20X SSC. Sobre los papeles filtro se colocó el gel. Arriba del gel se puso una pieza de membrana de nylon del mismo tamaño del gel, previamente hidratado con agua destilada durante 5 minutos. De ahí se humedeció la superficie de la membrana con 20X SSC y sobre esta se colocó 5 hojas de papel Whatman 3MM del mismo tamaño que la membrana. Posteriormente se colocaron toallas de papel del mismo tamaño que la membrana hasta obtener una altura de toallas de aproximadamente 4 cm. Sobre las toallas se colocó una placa de vidrio sobre la que se colocó un peso de 0.4 Kg. Se dejó 18 horas a temperatura ambiente. Pasadas las 18 horas se desarmó la torre y se enjuagó la membrana en 6X SSC. Por último la membrana se secó entre 2 hojas de papel 3MM a temperatura ambiente por 30 minutos. El ADN se fijó a la membrana por entrecruzamiento con luz UV (UV crosslinker, Stratagene). Cada membrana se colocó en una bolsa de hibridación conteniendo 15 mL de solución de prehibridación (5X SSC, 0.1% SDS, 0.02% N-Lauril-sarcosina, 1% reactivo de bloqueo, ROCHE). La bolsa se selló y se procedió con la prehibridación a 50 °C por 3 horas.

6.1.3.3. Hibridación

La sonda se desnaturalizó por ebullición por 10 minutos, e inmediatamente se diluyó en la solución de prehibridación a una concentración final de 200 ng/mL. A continuación se retiró la solución de prehibridación de la bolsa y se agregaron 15 mL de la solución de hibridación conteniendo la sonda marcada con DIG. La hibridación se llevó a

cabo por 15 horas a 50°C. Posteriormente se retiró la solución de hibridación de la bolsa y se almacenó a -20°C en tubos Falcon. La membrana se lavó un par de veces, cada vez fue de 15 minutos, en 30 mL de solución de lavado 2X (2X SSC, 0.1% SDS) a temperatura ambiente. Posteriormente se realizaron un par de lavados más, cada uno de 15 minutos, con 30 mL de solución de lavado 0.5X (0.5X SSC, 0.1% SDS) a 68°C.

6.1.3.4 Inmunodetección.

La detección se llevó a cabo por colorimetría. Una vez realizada la hibridación y los lavados la membrana se equilibró en buffer de lavado (100 mM ácido málico, 150 mM NaCl; pH 7.5; 0.3% Tween 20) por 1 minutos. La membrana se bloqueó por 30 minutos con solución de bloqueo (Boehringer Mannheim) en agitación constante. Mientras tanto se preparó la solución con anticuerpos (Alcalin-fosfatasa-anti-DIG), diluyéndolos en buffer de bloqueo para obtener una concentración de 150 mU/mL. Una vez transcurrido el periodo de bloqueo se retiró la solución anterior y la membrana se incubó en 30 mL de la solución con los anticuerpos durante 30 minutos en agitación suave. Posteriormente se retiró la solución con anticuerpos, y se lavó la membrana un par de veces, 15 minutos en cada ocasión, con 30 mL de buffer de lavado. Por otro lado, se mezclaron 200 µL de solución 50X de NBT/BCIP (18.75 mg/mL de cloruro de nitroazul tetrazolio y 9.4 mg/mL de 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato en 67% dimetil formamida) con 10 mL de buffer de detección (100 mM Tris-HCl, 10 mM NaCl; pH 9.5). Para equilibrar la membrana en un volumen de 20 mL por 2 minutos. Transcurrido este tiempo se retiró la solución anterior y se agregaron 20 mL de la solución con el sustrato, la membrana se incubó en oscuridad a temperatura

ambiente durante 3 horas. Una vez que se observó la marca deseada, se lavó la membrana con agua destilada estéril para detener la reacción. Finalmente, las membranas se secaron y fotodocumentaron con un escanner DUOSCAN T1200 (AGFA).

6.2 RT-PCR

6.2.1 SÍNTESIS DE LA PRIMERA CADENA DE ADNc

La primera cadena de ADNc se obtuvo empleando el kit SUPERSRIPT™ de Invitrogen. Se prepararon mezclas con 17 µg de ARN total del hepatopáncreas, 1.5 µl de dNTP 10 mM, 0.75 µg de Oligo(dT)₁₂₋₁₈ y se ajustó a 15 µl con agua DEPC. A su vez se preparó una control positivo de la reacción con 50 ng de ARN del kit (cloramfenicol acetiltransferasa transcrito *in vitro* que contiene poli(A) en el extremo 3'), 1 µl de dNTP 10 mM, 0.5 µg de oligo(dT)₁₂₋₁₈ ajustando el volumen a 10 µl con agua DEPC. A continuación se incubaron las mezclas a 65°C por 5 minutos y enseguida se colocó en hielo durante 1 minuto. Entretanto, se preparó una mezcla de reacción adicionando 3 µl de buffer RT 10X, 6 µl de MgCl₂ 25mM, 2 µl de DTT 0.1 M y 1.5 µl de inhibidor de ARNasa para cada una de las reacciones tomando en cuenta el control de la transcriptasa reversa, y el control negativo. Después del minuto de incubación en hielo a la mezcla del ARN se le adicionó 12.5 µl de la mezcla de reacción, se mezcló gentilmente y se recuperó por breve centrifugación. Posteriormente se incubó a 42°C por 2 minutos y después se adicionaron 50 U de SuperScript II RT a cada tubo y se incubó a 42°C por 50 minutos. Sucesivamente se incubaron las reacciones a 70°C por 15 minutos. Al termino de la incubación se enfriaron

con hielo, y las reacciones se colectaron por breve centrifugación y se adicionó 1 μ L de ARNasa H a cada tubo e incubando a 37°C por 20 minutos.

6.2.2 REACCIÓN DE LA POLIMERASA EN CADENA

El producto de la primera cadena de ADNc de *P. vannamei* se utilizó como templado en las reacciones de PCR, empleando las combinaciones de oligonucleótidos pPMF pPMR, y pPMF2 pPMR (apéndice 1), como control se usó el producto de la primera cadena de ADNc de cloranfenicol acetiltransferasa utilizando los oligonucleótidos A y B del kit. El programa utilizado en el termociclador fue Anton2: desnaturalización a 94°C 3 minutos; y 35 ciclos a 94°C 45 segundos, 46°C 1 minuto y 72°C 2 minutos, con un paso de extensión final de 72°C por 10 minutos. Los productos obtenidos se conservaron a 4 °C.

6.3 PCR A PARTIR DE LA LIBRERÍA DE ADNc

La librería unidireccional de ADNc de hepatopáncreas de *P. vannamei* fue proporcionada por el Dr. Francisco Vargas Albores. Esta se elaboró usando el Kit λ ZAP express[®] que emplea el vector ZAP express (vector lambda). Para obtener los extremos se amplificó usando la librería como templado y los oligonucleótidos pPMF vs T7 (del vector) para obtener el extremo 3'. Para obtener el extremo 5' los oligonucleótidos pPVR vs T3, el primero diseñado en base a la secuencia obtenida del extremo 3'. Se utilizó el programa

Anton2, variando la temperatura de alineamiento a 50°C para el extremo 3' y 52 °C para el extremo 5'; los productos se clonaron y se secuenciaron.

6.4 CLONACIÓN Y SECUENCIACIÓN

6.4.1 LIGACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE PCR.

Los productos de PCR se extrajeron del gel al 1.5% de agarosa de bajo punto fundición con el Kit QIAEX II (QIAGEN). El producto de PCR obtenido a partir de ADNc se ligo en el vector pGemT-easy, mientras que los obtenidos a partir de la librería se ligaron al el vector pGem (ambos de promega), con una proporción de inserto:vector de 3:1 y con la enzima ligasa del fago T4 (Tabla V). Las ligaciones se incubaron 16 horas a 4°C.

Tabla V. Condiciones para la ligación.

	Reacción estándar	Control positivo	Control background
Buffer de ligación rápida 2X	5 µl	5 µl	5 µl
Vector pGEM [®] o pGEM [®] -T Easy 50 ng/µl	1 µl	1 µl	1 µl
Producto PCR	2-3µl	-	-
Control del inserto de ADN	-	2µl	-
Ligasa de ADN T4	1 µl	1 µl	1 µl
H ₂ O	Completar a 10 µl	1 µl	3 µl
TOTAL	10 µl	10 µl	10 µl

6.4.2 PREPARACIÓN Y TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES

Los productos de ligación se utilizaron para transformar células competentes de *E. coli* cepa DH5α por el método de shock térmico (Sambrook et al., 1989). Se inocularon 5 mL de caldo de cultivo SOB conteniendo 20 mM de MgCl₂ con una colonia de *E. coli*

proveniente de una placa, incubando a 37°C con agitación orbital constante a 225 rpm durante 20 horas. A partir de 500 µl de estos cultivos se inocularon 50 mL de SOB. El cultivo se incubó a 37°C con agitación orbital constante a 225 rpm de 2.5 a 3.5 horas. Asépticamente las células se transfirieron a tubos estériles mantenidos en hielo por 10 minutos. Las células se recuperaron por centrifugación a 1000 g por 12 minutos a 4°C. El sobrenadante se removió decantándolo y se resuspendieron las células en 10 mL de CaCl₂ 0.1 M frío y se incubaron en hielo por 15 minutos. La recuperación celular se repitió, esta vez las células fueron resuspendidas en 2 mL de CaCl₂ 0.1 M y se mantuvieron en hielo. Se transfirieron 200 µl de células competentes a microtubos, y a cada uno de ellos se les agregaron 5 µl del producto de las ligaciones y se mantuvieron en hielo por 30 minutos. Posteriormente se realizó el shock térmico a 42°C por 90 segundos. Enseguida las transformaciones se colocaron en hielo durante 2 minutos. Posteriormente se agregaron 250 µl de medio SOC a cada tubo y se incubaron a 37°C con agitación orbital constante a 225 rpm durante 1 hora. Por ultimo, se sembraron 50 y 150 µl de cada transformación en placas de LB-ampicilina agar (50 mg/mL) con 40 µl de X-Gal (20 mg/mL en dimetilformamida) y 4 µl de IPTG (200 mg/mL), que se incubaron a 37°C durante 18 horas.

6.4.3 SECUENCIACIÓN

Las clonas positivas se seleccionaron por el método α -complementación, donde las clonas positivas son blancas y las negativas azules. Se picaron las clonas positivas con palillos de dientes, que se agitaron en tubos con agua destilada para reacciones de PCR (con los

mismos oligonucleótidos con que se obtuvieron). Por ultimo, se utilizó el palillo para picar una placa nueva con LB-ampicilina. De las clonas positivas se envió a secuenciar por lo menos una muestra de cada uno de los productos clonados. Para la secuenciación se aisló ADNp con el kit QIAprep (QIAGEN). La secuenciación se realizó en un equipo de tipo capilar ABI PRISM (Perkin Elmer[®]) en el laboratorio de Biología Molecular del Centro de Investigaciones Biológicas de Noroeste y en el Instituto de Biotecnología de la UNAM.

7. RESULTADOS

7.1 PREPARACIÓN DE SONDA.

Se aisló ADNp de la clona KHPA por el método alcalino-SDS, se determinó la cantidad de éste por espectrofotometría ($0.75 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) y se comprobó su calidad por medio de electroforesis de agarosa (Fig. 5), donde se pueden observar tres isoformas de ADNp. A partir del ADNp aislado y de las combinaciones de oligonucleótidos sentido pPMF ó pPMF2 vs. antisentido pPMR, se obtuvieron tres productos por amplificación: el primero de 222 pb se obtuvo de la primera combinación (pPMF/pPMR), y otros dos de 340 pb y de 490 pb con la segunda combinación (pPMF2/pPMR) siendo la de 340 mas robusta y clara (Fig. 6). Para elaborar la sonda por PCR se utilizaron los oligos pPMF/pPMR, esperando encontrar un fragmento de 222 pb. Sin embargo debido a la incorporación de DIG-dUTP durante la reacción de PCR el peso molecular se incremento significativamente. Por ello la sonda fue detectada como una banda de aproximadamente 300 pb. Como controles se realizó la misma mezcla pero sin nucleótidos marcados y el control del kit de 442 pb al cual también se le incorporo dioxigenina y cuyo incremento en el peso molecular se hizo evidente (Fig. 7).



Figura 5. ADNp de la clona KHPA.

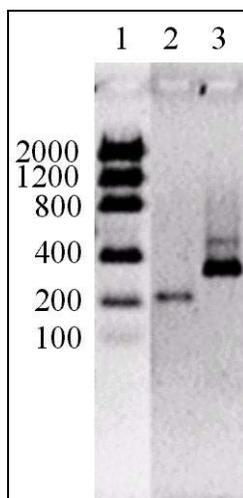


Figura 6. PCR a partir de ADNp de la clona KHPA. 1, marcador, 2, producto de 222 pb usando los oligonucleótidos pPMF vs pPMR y 3 producto de 340 pb usando los oligonucleótidos pPMF2 vs pPMR.

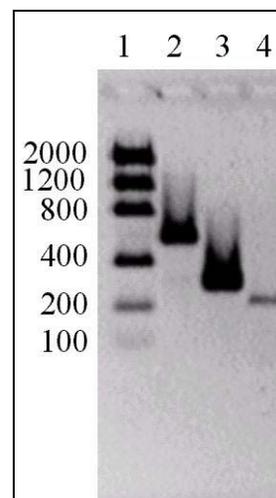


Figura 7. PCR para incorporar dioxigenina. 1, marcador, 2, control del kit con dioxigenina de 442 pb, 3, amplificado de 222 pb con dioxigenina, 4, producto de 222 pb sin dioxigenina

Para el empleo de la sonda se determinó la concentración de la misma por medio de diluciones del plásmido pBR328 marcado con dioxigenina y de concentración conocida (Fig. 8), determinando una concentración de 1 ng/ μ l.

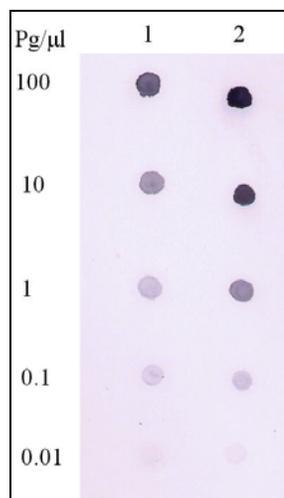


Figura 8. Determinación de la concentración de la sonda. En la columna 1 se muestran las diluciones del control (plásmido pBR328) y en la columna 2 se encuentra las diluciones de la sonda elaborada.

7.2 Detección de inhibidores.

Para demostrar la utilidad de la sonda se probó contra ADNg y ADNp de la clona KHPA. Las muestras se digirieron con las enzimas Xho I, Hind III, Eco RI, Nco I y Dra I. Se utilizó ADNp digerido y producto de PCR similar al que se hizo la sonda como controles positivos y ADNg sin digerir como control negativo. Los controles positivos fueron perfectamente detectados. Las digestiones con Eco RI y Dra I, fueron las de mejor reconocimiento de las digestiones (Fig. 9).

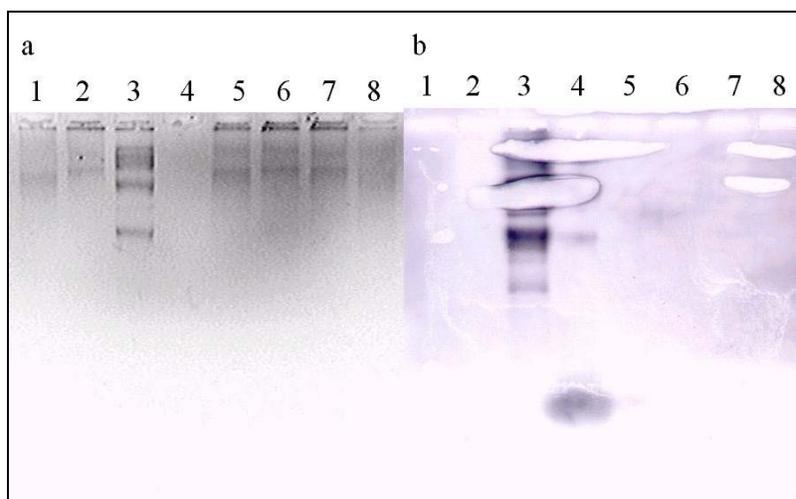


Figura 9. Southern blot. Electroforesis (a) y membrana de nylon (b). (a), Carril 1, 5, 6, 7, y 8 ADNg digerido con la enzima Xho I, Hind III, Eco RI, Nco I y Dra I, respectivamente, 2, ADNg sin digerir, 3, plásmido digerido el cual tiene insertado el inhibidor del que se hizo la sonda, 4, fragmento amplificado por PCR sin marcar (el mismo que la sonda). (b) Los controles positivos carril 3 y 4 son perfectamente detectados por la sonda, las digestiones del ADNg son reconocidas por la sonda produciéndose un barrido y en algunas 6 y 8 se observan mejor reconocimiento.

7.3 RT-PCR

La primera cadena de ADNc se obtuvo a partir de ARN total de hepatopáncreas de *P. vannamei* (Fig. 10), empleándose como templado para PCR usando los oligos pPMF y

pPMR y una temperatura de alineamiento de 46°C. Se obtuvo un producto de 220 pb el cual es similar que el amplificado usando como templado la clona KHPA (Fig. 11). De igual modo al amplificar con los oligos pPMF2 y pPMR, a una temperatura de alineamiento de 40°C se obtuvieron como resultado dos bandas de 490 y 340 pb, similar a la clona.

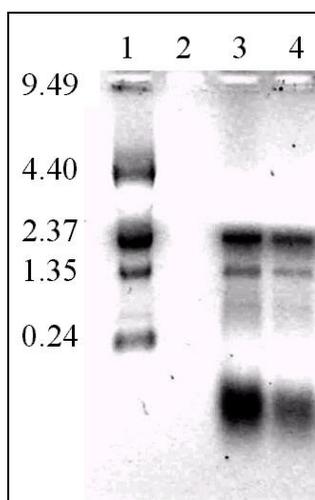


Figura 10. Electroforesis de ARN total. En esta electroforesis se puede observar la subunidades mayor y menor ribosomales, el barrido corresponde a ARNt y ARNm.

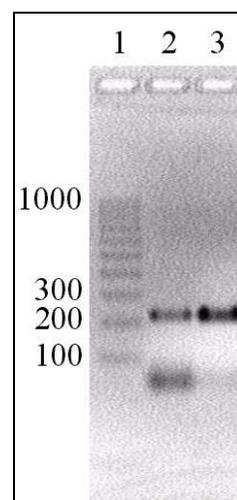


Figura 11. RT-PCR usando los oligos pPMF/pPMR. 1, marcador; 2, amplificado de ADNc y 3, amplificado de ADNp de la clona KHPA

7.4 PCR USANDO LA LIBRERÍA COMO TEMPLADO.

Para extender la secuencia se utilizó la librería de hepatopáncreas, aprovechando las secuencias que flanquean el sitio múltiple de clonación del vector. Ya que la librería es unidireccional se usó el oligo sentido (pPMF) y el T7 (secuencia del vector), para obtener el extremo 3', obteniendo un producto de 350 pb (Fig. 12). Del mismo modo para extender hacia el 5' se usó T3 y el oligo antisentido (pPVR), produciendo tres bandas de diferente tamaño de 230 pb, 320 pb y 550 pb (Fig. 13).

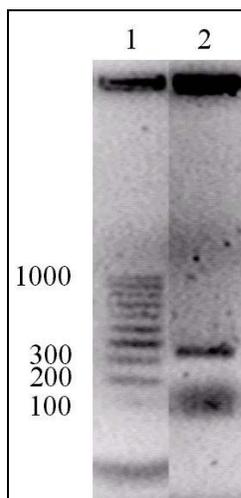


Figura 12. Amplificación de la librería. 1, marcador, 2, amplificado de la librería utilizando los oligos pPMF/T7 del vector lambda.

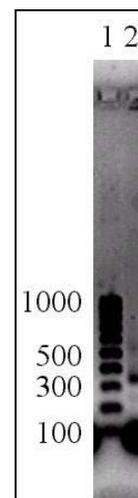


Figura 13. Amplificación de la librería. 1, marcador y 2, amplificado de la librería utilizando los oligos pPVR/T3 del vector lambda.

7.5 CLONACIÓN Y SECUENCIACIÓN.

El producto del RT-PCR de y los cuatro amplificados obtenidos usando como templado la librería se clonaron. Se seleccionaron las clonas positivas, resultando cuatro clonas positivas del producto de RT-PCR, tres clonas del producto para obtener el extremo 3', dos clonas de dos de los productos para obtener el extremo 5' de 230 pb y 320 pb y tres clonas del producto de 550 pb. Se envió a secuenciar por lo menos una muestra de cada uno de los productos clonados, del producto de 550 pb no se ha obtenido la secuencia. Se obtuvieron secuencias de cuatro fragmentos (Fig. 14); El fragmento 1 de 223 pb fue el obtenido por RT-PCR. Los fragmentos 2, 3 y 4 fueron obtenidos del amplificado de la librería. El fragmento 2 resultó de 256 pb, el fragmento 3 de 222 pb y el fragmento 4 de 129 pb.

Fragmento 1	
GTGACCTACTCTAACCTATGTCAACTTGAGATTGCCAATTGCCTTAATGGAGGAGGT	57
V T Y S N L C Q L E I A N C L N G G G	
ATTAGCCTGGCGTACCCGGGAGAATGCGAGGCGACGGACGGTTCCTGCGACATCGTT	114
I S L A Y P G E C E A T D G S C D I V	
TGCACTGCCAACTATGACCCCGTGTGCGGTTCTGATGGCAACACGTATGGCAACGCG	171
C T A N Y D P V C G S D G N T Y G N A	
TGTGAGCTTGAAGTTGCAGATTGCATGAGTGATGAGGATATTATCTCGTGGC	223
C E L E V A D C M S D E D I I S W	
Fragmento 2	
CGTGACCTACTCTAACCTATGTCAACTTGAGATCGCCAGTTGCCTCGGGGGAGATGT	57
V T Y S N L C Q L E I A S C L G G D V	
TAGCCTGGCGCACGAGGGACCCTGCTGAACCGGCCGCGGCGACACCACGTCTGGAACC	114
S L A H E G P C *	
CCCTTCCTCTCTTAAAATTTTTTTTTTCATTACACTCTTTTCTTTTTTTAAGAATTTG	171
TTTTGAAGAATCCATATCCTTGAATGTCCGACTGTTGTGTTAGAAATTCGA <u>AATAA</u>	228
<u>AGTGGATCATTGGA</u> AAAAAAAAAAAAAAAA	256
Fragmento 3	
ATTGGCACGAGGCCTCGTGCCGAATTCGGCACGAGGGAGCGAGCGAGCTGCCTCAGC	57
GAAGAGGACATCGCGATGGCTCACCCGGGCGAGTGCAGCTCCTGTGACCTTGGCTGC	114
M A H P G E C S S C D L G C	
AGCGGCCTGTGGGACCCCGTGTGTGGCACGGACGGCGTGACCTACTCTAACCTGTGT	171
S G L W D P V C G T D G V T Y S N L C	
CAACTTGAGATCGCCAGTTGCCTCGGGGGAGATGTTAGCCTGGCGCACGAG	222
Q L E I A S C L G G D V S L A H E	
Fragmento 4	
ATCGGCACGAGGCCTCGTGCCGAATTCGGCACGAGGCCCGTGTGTGGCACGGACGGC	57
I G T R P R A E F G T R P V C G T D G	
GTGACCTACTCTAACCTGTGTCAACTTGAGATCGCCAGTTGCCTCGGGGGAGATGTT	114
V T Y S N L C Q L E I A S C L G G D V	
AGCCTGGCGCACGAG	129
S L A H E	

Figura 14. Secuencias de nucleótidos y deducida de aminoácidos de los fragmentos clonados. El fragmento 1 es el obtenido por RT-PCR y los fragmentos 2, 3 y 4 son los obtenidos amplificando usando la librería como templado. En el fragmento 2 el codón de terminación, la señal de poliadenilación y la poli (A) esta en negritas, además el primero esta marcado con un asterisco y el segundo subrayado. En el fragmento 3 el codón de inicio esta en negritas. En el fragmento 4 no se observa codón de inicio o fin.

7.6 ANÁLISIS DE SECUENCIAS.

El fragmento 1 (223 pb) codifica para 74 aa, mismos que conforman la secuencia parcial de un inhibidor Kazal de dos dominios. Del primer dominio se tiene de la tercera a la sexta cisteína y del segundo dominio de la primera a la quinta. El sitio reactivo deducido corresponde a Ala. Del fragmento 2 (256 pb) solo son traducibles 82 pb las cuales codifican 27 aa, esta secuencia también correspondió a un inhibidor Kazal y codifica de la tercera a la sexta cisteína de un dominio. Las 174 pb restantes del fragmento forman la región no traducible del extremo 3', caracterizada por un codón de terminación TGA, una secuencia señal de poliadenilación de 12 pb localizada río arriba de la poli (A) de 15 pb. El fragmento 3 (222 pb), de 150 pb a 50 aa, teniendo un codón de inicio ATG e incluye 6 cisteínas, siendo la segunda el comienzo de un dominio Kazal. Finalmente el fragmento 4 (129 pb) codifica 43 aa, que forman una péptido desconocido, con tres cisteínas similares a los inhibidores Kazal (C₃, C₄ y C₅) pero sin poseer las C₁ y C₂. Esta secuencia mostró mayor similitud (69.2%) con el inhibidor de *Neospora caninum*, siguiéndole, los inhibidores de proteinasas de *Bombix mori*, *P. leniusculos*, *Melithaea caledonica*, la proteína agrin de *Homo sapiens* y el inhibidor de serin proteinasas de *Procambarus clarkii*, con el 65.2%, 60.7%, 53.3%, 53.3% y 51.3% de similitud, respectivamente.

Los cuatro fragmentos se alinearon buscando sobrelapamientos (Fig. 15), el fragmento 1 no se empalmó con ninguno de los tres fragmentos restantes, mientras que el fragmento 2 tiene solo una base de diferencia con respecto a los fragmentos 3 y 4. Entre los fragmentos 3 y 4 se observó diferencia en una sola base, además de la falta de 93 pb en el fragmento 4 con

respecto al fragmento 3, este salto es desde la base 37 hasta la base 129 (Fig. 16). El fragmento 1 se tradujo obteniendo la secuencia parcial de un inhibidor multidominio Kazal (PVK1). La unión de los fragmentos 2 y 3 traduce para una proteína unidominio Kazal (PVK2) (Fig 17), mientras que la unión de los fragmentos 2 y 4 traducen para la secuencia parcial de una proteína (PVp) con un extremo carboxilo con cuatro cisteínas similares a las cuatro ultimas cisteínas en un dominio Kazal, pero sin las cisteínas primeras que forman parte de un inhibidor Kazal.

Fragmento2	-----	0
Fragmento3	ATTGGCACGAGGCCTCGTGCCGAATTCGGCACGAGGGAGCGAGCGA	46
Fragmento4	ATCGGCACGAGGCCTCGTGCCGAATTCGGCACGAGG-----	36
Fragmento2	-----	0
Fragmento3	GCTGCCTCAGCGAAGAGGACATCGCGATGGCTCACCCGGGCGAGTG	92
Fragmento4	-----	36
Fragmento2	-----	0
Fragmento3	CAGCTCCTGTGACCTTGGCTGCAGCGGCCTGTGGGACCCCGTGTGT	138
Fragmento4	-----CCCGTGTGT	45
Fragmento2	-----CGTGACCTACTCTAACCTATGTCAACTTGAGATCG	35
Fragmento3	GGCACGGACGGCGTGACCTACTCTAACCTGTGTCAACTTGAGATCG	184
Fragmento4	GGCACGGACGGCGTGACCTACTCTAACCTGTGTCAACTTGAGATCG	91
Fragmento2	CCAGTTGCCTCGGGGGAGATGTTAGCCTGGCGCACGAGGGACCCTG	81
Fragmento3	CCAGTTGCCTCGGGGGAGATGTTAGCCTGGCGCACGAG-----	222
Fragmento4	CCAGTTGCCTCGGGGGAGATGTTAGCCTGGCGCACGAG-----	129
Fragmento2	CTGACCGGCCGCGGCGACACCACGTCTGGAACCCCTTCCCTCTCTT	127
Fragmento3	-----	
Fragmento4	-----	
Fragmento2	AAAATTTTTTTTTTCATTACACTCTTTTCTTTTTTTAAGAATTTGTT	173
Fragmento3	-----	
Fragmento4	-----	
Fragmento2	TTGAAGAATCCATATCCTTGGAATGTCCGACTGTTGTGTTAGAAAT	219
Fragmento3	-----	
Fragmento4	-----	
Fragmento2	TCGAAATAAAGTGGATCATTGGAAAAAAAAAAAAAAAAA	256
Fragmento3	-----	
Fragmento4	-----	

Figura 15. Análisis del alineamiento de los fragmentos 2, 3 y 4. Las bases diferentes están resaltadas por un rectángulo gris.

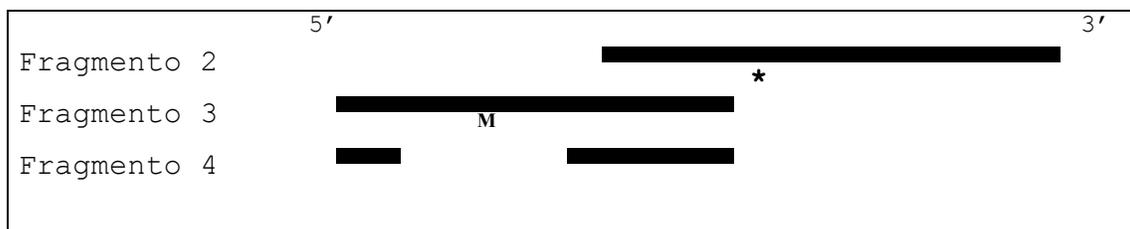


Figura 16. Representación gráfica de solapamiento de los fragmentos 2, 3 y 4. En el fragmento 2 se indica con un asterisco el codón de terminación, en el fragmento 3 se indica con una M el codón de inicio.

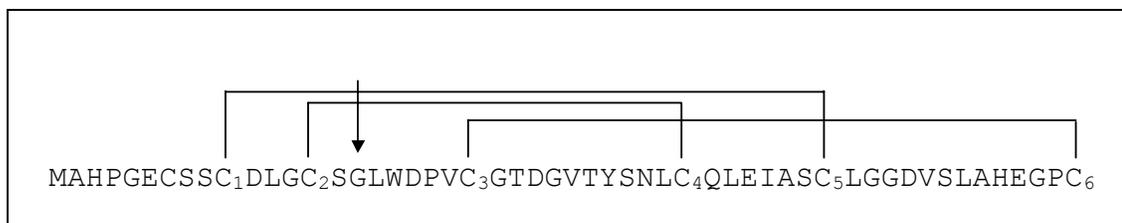


Figura 17. Estructura topográfica hipotética del PVK2. Las líneas representan los enlaces disulfuro, mientras que el sitio reactivo está señalado por una flecha.

Se realizó un análisis de similitud entre PVK1, PVK2 y PVp con proteínas de la base de datos Swall, usando el programa Wu-Blastp (Gish, 1996-2003), resultando que tienen mayor similitud con los inhibidores Kazal no clásicos. El porcentaje de identidad se determinó con el programa Megaling (Lasergene), las alineaciones se realizaron con el método Clustal (Thompson et al., 1994) (Tabla VI).

Tabla VI. Análisis de identidad de PVK1, PVK2 y PVp. El porcentaje de identidad se determinó a partir de las secuencias deducidas de aminoácidos.

	% Porcentaje de identidad		
	PVK1	PVK2	PVp
Inhibidor de proteinasas de <i>Penaeus vannamei</i> 1 PVK1	-----	38.9	38.3
Inhibidor de proteinasas de <i>Penaeus vannamei</i> 2 PVK2	38.9	-----	72.3
Proteína de <i>Penaeus vannamei</i> PVp	38.3	72.3	-----
Inhibidor de proteinasas de <i>Penaeus monodon</i> 1 PMPI1p	95.9	74.1	53.2
Inhibidor de proteinasas de <i>Penaeus monodon</i> 2 PMPI2	60.8	75.9	55.3
Inhibidor de proteinasas de <i>Penaeus monodon</i> 3 PMPI3	40.5	38.9	42.6
Inhibidor de elastasa de Anémona	50.0	39.6	31.9
Inhibidor de proteinasas de langostino PAPI	43.2	38.9	38.3
Inhibidor de proteasas de <i>Melithaea caledonica</i> MCAPI	43.2	37.0	36.2
Agrin de humano	41.9	38.9	36.2
Agrin de rata	41.9	38.9	38.3
Inhibidor de trombin infestin	39.2	37.0	40.4
Inhibidor de trombin de <i>Dipetalogaster maximus</i>	37.8	33.3	38.3
Ovomucoide de codorniz japonesa	33.8	29.6	31.9
Serine protease inhibitor Kazal-type 4 precursor PEC-60	24.3	31.5	29.8

Se alinearon los dominios de PVK1 y PVK2 contra los dominios de inhibidores de la familia Kazal no clásicos, el tercer dominio (PMPI1d3) de *P. monodon* 1, el primer dominio (PAPId1) del langostino y el de un solo dominio de anémona AEI (Fig. 18).

	1	2	3	4	5	6
Mayoría	C---C-----	PVCGSDG-TY-NLC-L-----	C-----	I-----	G-C	
PVK1d1	-----	-----	-----	VTYSNLCQLEIANCLNGGGI	SLAYP	GEC
PVK1d2	CDIVCT	TANYD	PVCGSDGNTYGNACE	LEVAD	CMSDED	IISW
PVK2	CDLGCSGLWD	PVCGTD	VTYSNLCQLEIASCLGGD	-VSLAHE	GPC	
PMPI1d3	CDFGCSGLWD	PVCGSDG	VTYSNLCQLEIANCLNGGGI	SLAYP	GEC	
PAPId1	CP	SICPLNYK	PVCGSDLKTYGN	SCQLNAAICRNP	-SLKKLYD	GPC
AEI	CPLICTM	QYD	PVCGSDGITYGNACMLLGAS	CRSDTPIELVHK	GRC	

Figura 18. Análisis de alineamiento de PVK1 y PVK2 contra dominios Kazal no clásicos. Se alineó solo de la C₁ a la C₆, los aminoácidos conservados en la mayoría están marcados con rectángulos de color gris. Los tres primeros son los dominios Kazal obtenidos de las dos secuencias. PVK1d1 y PVK1d2 son dominio 1 y 2 de PVK1 respectivamente, PVK2, PMPI1d3, es el tercer dominio de *P. monodon* 1, PAPId1 es el primer dominio del langostino, AEI es el dominio de anémona.

8. DISCUSIÓN

Los inhibidores de serin proteinasas de la familia Kazal han sido identificados en vertebrados e invertebrados. La investigación en invertebrados se han centrado en su posible papel como mecanismo de defensa (Johansson et al., 1994; Pszeny et al., 2000; Morris et al., 2002;) o como anticoagulante en los organismos hematófagos (Friedrich et al., 1993; Mende et al., 1999). El presente trabajo demuestra la presencia de inhibidores Kazal en el hepatopáncreas de *P. vannamei*, un organismo marino omnívoro. En la última década, se ha puesto énfasis en el estudio de las enzimas digestivas, donde se ha demostrado que son reguladas durante varios fenómenos como el ayuno (Muhlia-Almaza y García Carreño, 2002), la muda (Muhlia-Almaza y García-Carreño, 2002; van Wormhoudt et al., 1995) y el desarrollo ontogénico (Lemos et al., 1999; Lemos et al., 2002). Sin embargo, poco se conoce sobre los inhibidores, por lo que su descripción ayudara a entender las funciones de las proteinasas.

La obtención de una secuencia de determinada proteína se puede realizar por dos caminos: 1) aislar la proteína o 2) aislar el ARNm. Para el aislamiento de la proteína el elemento fundamental con el que se debe contar es una manera de identificarla ya sean anticuerpos o actividad biológica de la proteína, para comprobar que no se pierda durante el proceso de purificación. Otras características también deben de ser conocidas para su purificación, y son la estructura, la composición, el tamaño, el punto isoelectrico, la afinidad biológica y su hidrofobicidad, etc. Sin olvidar que frecuentemente, la proteína se encuentra en muy baja concentración por lo que se requiere de más de un organismo

(Burden y Whitney, 1995). El análisis del gen a partir de ARNm en lugar de ADN_g, tiene sus ventajas, ya que el ARNm son los genes que se están expresando y no todos los genes se expresan en las células. Además en el ARNm de eucariontes se eliminan los intrones, por lo que produciendo el ADN_c se puede obtener la secuencia deducida de aminoácidos, sin tener que eliminar intrones de ADN genómico (Brown, 1995).

Las estrategias para conocer la secuencia de un gen específico a partir de ARNm son diversas, por ejemplo por RT-PCR o tamizado de una librería, lo primero, es obtener el ADN_c utilizando la transcriptasa reversa. La realización de RT-PCR requiere del diseño de oligonucleótidos, degenerados o no, según sea el conocimiento del que se parta. Se seleccionan específicos si se conoce la secuencias de organismos en cuestión. Serán degenerados si se utiliza la secuencia de aminoácidos y se hace traducción inversa ó si se diseñaron a partir de la secuencia de nucleótidos consenso de varios organismos. La sonda detectara clonas que contengan secuencias similar a esta. Las sonda consistir en la hibridización de oligonucleótidos o fragmentos de ADN los cuales estan marcados. El tamizado de la librería por lo general consiste de la separación del ADN blanco en gel, la transferencia a membrana, la hibridización con la sonda y por ultimo visualización por radioactividad, colorimetría, quimioluminiscencia o fluorescencia.

El ADN_p de la clona KHPA aislado fue de buena calidad, esto se pudo determinar al detectar tres bandas correspondientes a las isoformas: extendido, enrollado y superenrollado. La cantidad de ADN_p fue alta comparándola con la que reporta Sambrook et al. (1989) que es de 3-5 µg de ADN_p/ml de cultivo, para plásmidos con alto número de

copias. La amplificación de la clona por PCR ¡no mostró gran problema, puesto que los oligos diseñados son específicos para la misma, resultando los productos del tamaño esperado. La mayor complicación en esta etapa fue la obtención de parámetros como la T_m , la concentración de los oligonucleótidos y de $MgCl_2$, que rindieran el mejor producto; estas condiciones fueron establecidas en pruebas previas. Se seleccionó el producto de 222 pb por que a mayor longitud de la sonda aumenta la temperatura de hibridación y disminuye el riesgo de que se formen bucles u horquillas entre ella misma y por consecuencia que la sonda no hibride.

Se preparó una sonda no radioactiva, por seguridad con digoxigenina, además por que este tipo de sondas pueden ser usadas y almacenadas hasta por un año. El aumento del tamaño del producto amplificado al incorporar digoxigenina, era el esperado por que en lugar de que el PCR incorpore dTTP, incorpora Dig-11-dUTP en una relación de 2:1. El objetivo del empleo de la sonda era demostrar la presencia de genes que codifican para inhibidores Kazal en *P. vannamei*. La utilización de ADN_g digerido es para hacerlo disponible a la sonda, debido a que la estructura terciaria ADN_g no digerido impide el reconocimiento por la sonda. La detección de la clona KHPA que tiene el inserto del cual se amplificó la sonda, y del producto de amplificación obtenido igual que la sonda pero sin incorporar digoxigenina demuestran que la sonda si hibridiza específicamente. En el Southern blot el ADN_g digerido se detectan en forma de barrido, ésto es porque las moléculas de ADN_g exhiben diversos sitios de corte.

La calidad del ARN total aislado de hepatopáncreas fué excelente, esto se observa al ver en la electroforesis dos bandas bien definidas que corresponden a las subunidades mayor y menor del ARN ribosomal (Lewin, 2000), asegurando así que el ARNm será un excelente templado para la reacción de la transcriptasa reversa. De acuerdo al diseño, con el clon de *P. monodon* se obtuvo un fragmento de 222 pb; En forma similar se obtuvo un fragmento. Sin embargo fue necesario utilizar una temperatura de alineamiento menor.

El fragmento 1, obtenido por RT-PCR corresponde a la parte interna de una proteína inhibidor Kazal de dos dominios. Para obtener los extremos, se trató de amplificar usando como templado la librería de hepatopáncreas y los tres oligonucleótidos específicos (pPMF, pPMR y pPMF2) y los oligonucleótidos que flanquean el sitio múltiple de clonación del vector (T3 y T7). Por esta vía solamente fue posible obtener un producto con los oligos pPMF/T7, que se esperaba que fuera el extremo 3' de la secuencia obtenida por RT-PCR. Las combinaciones de oligos pPMF2/T7 y pPMR/T3, no dieron producto, aunque los oligonucleótidos no se diseñaron pensando en tamizar de esta manera la librería, el análisis de la secuencia mostró que la formación de dímeros entre los oligonucleótidos no eran el problema. La causa de no amplificación con estos oligos posiblemente sea que no se encuentra en la librería este transcrito.

La obtención de la secuencia de una parte interna de un inhibidor multidominio Kazal (producto del RT-PCR) y la secuencia del extremo 3' de un inhibidor también Kazal (amplificado de la librería), nos hizo suponer que la obtención del extremo 5', a partir de un oligo diseñado en base de la secuencia del extremo 3', abarcaría la parte interna que se

tenía, esto porque ambos fueron obtenidos usando el mismo oligonucleótido sentido. La obtención de 3 fragmentos del amplificado usando los oligonucleótidos pPVR/T3, sugería que el oligonucleótido pPVR estaba encontrando secuencias homologas en más de un lugar del mismo transcrito, por lo que sería multidominio ó que eran de diferente transcrito.

Finalmente, se secuenciaron dos fragmentos del extremo 5' (fragmento 3 y 4), estos se trataron de empalmar con el producto del RT-PCR (fragmento 1), y el extremo 3' (fragmento 2). No obstante el fragmento 1 no se empalmó con ninguno de los fragmentos, el fragmento 2 se empalmó con los fragmentos 3 y 4 (Fig. 16), variando en una sola base, originándose esta diferente base en el oligonucleótido pPMF que se empleo para amplificar la secuencia 2. Entre el fragmento 3 y 4 se observó la deferencia de una base, así como la falta de 93 pb internas en el fragmento 4 en comparación con el fragmento 3 (Fig. 15), posiblemente ambos productos de ARNm provengan de un mismo gen el cual se transcribe sufriendo de splicing alternativo. Splicing es el proceso de retención de exones y eliminación de los intrones, splicing alternativo es uno de los varios procesos por el cual un gen codifica para más de una proteína y consiste en que a partir del mismo preARNm se generen más de un ARNm, los cuales tienen combinaciones diferentes de exones (Lewin, 2000). Niimi et al. (1999) descubrió un gen en *Drosophila* que codifica para cinco diferentes polipéptidos mediante splicing alternativo, estos polipéptidos son similares a dominios Kazal, esto es debido a que retiene intrones alternativamente en los transcritos, afectando la estructura de los productos traducidos. Por lo anterior se determinó que el fragmento 1, traduce para una parte de una proteína (PVK1), diferente a los fragmentos restantes, el fragmento 2 es el extremo 3' del fragmento 3 ó 4, codificando para diferentes proteínas PVK2 y PVp respectivamente. Por lo tanto PVK2 es la

secuencia completa de un inhibidor Kazal de un solo dominio (Fig. 17), mientras que PVp es la secuencia de una proteína parcial, con un extremo carboxilo con cuatro cisteínas similares a las cuatro últimas cisteínas en un dominio Kazal.

Las secuencia de PVK1 tiene la mayor similitud con los inhibidores Kazal de *P. monodon* 1 y 2, anémona (95, 60.8 y 50, % respectivamente). PVK2 posee la más alta similitud con los inhibidores de *P. monodon* 1, 2 y 3 (que oscila entre el 70%), mientras que PVp presenta la mayor similitud con *P. monodon* 1 y 2 (53.2 y 55.3 %). Las secuencias presentan una menor similitud (< 50%) con los inhibidores de *Pacifastacus leniusculus*, *Melithae caledonica* y con proteínas que contienen dominios Kazal pero sin ser inhibidores como lo son Agrin de rata y agrin de humano. La baja similitud con la mayoría de los inhibidores Kazal, no afecta en la conclusión de que los que se encontraron también son inhibidores Kazal, ya que no los caracteriza el conservar muchos residuos, si no el número de residuos entre cisteínas, entre otras particularidades.

Los inhibidores encontrados son Kazal no clásicos. Los inhibidores clásicos tales como ovomucoides o los inhibidores de tripsina de secreciones pancreáticas de mamíferos tienen 21 residuos entre C₂ y C₅ y 2 residuos entre C₄ y C₅, mientras que en *P. vannamei* se observa la adición de 4 residuos entre la C₄ y la C₅, resultando 25 residuos entre C₂ y C₅, como en los inhibidores de anémona y langostino (Tschesche et al., 1987). La longitud de la secuencia en especial del bucle del sitio reactivo son críticos para la funcionalidad de estos inhibidores, pero la inhibición específica de una determinada serin proteinasa está dada por el sitio reactivo. El segundo dominio parcial de la secuencia PVK1 tiene Ala en el

sitio reactivo, mientras que en la secuencia PVK2 tiene el residuo Gly, por lo que ambas proteínas son potencialmente inhibidores de elastasa; esto deberá ser comprobado midiendo la actividad inhibitoria *in vitro*.

Las implicaciones, desde el punto de vista de función, que tiene que sea un inhibidor clásico o no clásico es desconocida, teniéndose que determinar para cada inhibidor con su respectiva proteinasa. Trabajos como los de Odum et al. (1999) y Nirmala et al. (2001), ponen de manifiesto que el efecto de las deleciones o inserciones entre las cisteínas no puede predecirse. Odum et al. (1999) encontró un inhibidor de tripsina con 14 residuos entre la C₃ y la C₄ en vez de 10, mientras que Nirmala et al. (2001) descubrió un inhibidor de subtilisina de 36 residuos, con solo cuatro de las seis cisteínas que tienen los dominios Kazal, las cuales se empalman con las C₂, C₃, C₄ y C₆; además, conserva el número de residuos entre la C₂ y C₄ así como la Tyr característica. Los inhibidores PVK1 y PVK2 además de conservar la posición de las cisteínas y la Tyr en P'₁₃ característica, también poseen parte de un núcleo hidrófobo característico que consiste en Leu P'₁₉, Val P'₅, Ile P'₃₀, Leu P'₃₂ y Leu P'₂₀ en anémona y PSTI, PVK1 y PVK2 conservan Leu P'₁₉, Val P'₅ y cambian Leu P'₂₀ por el aminoácido hidrófilo Glu, Ile P'₃₀, es conservado en PVK1, mientras que PVK2 tiene Val que es un poco menos hidrófobo, Leu P'₃₂ es conservada en el primer dominio de PVK1 y en PVK2, el segundo dominio de PVK1 posee en esta posición Ser que es un aminoácido más hidrófilo que Leu.

En *P. vannamei* se han encontrado las secuencias de tripsina y de quimotripsina (Klein et al., 1996; Sellos y van Wourmhoudt, 1992), demostrando su actividad (Hernández

et al., 1997). A la fecha no se ha purificado ni demostrado actividad de elastasa en *P. vannamei*, pero si se a encontrado en otros artrópodos, por ejemplo en 1993 se purifico elastasa del hepatopáncreas del decápodo *Paralithodes camtschatica*, conocido como cangrejo Rey; además, se caracterizó con sustratos e inhibidores específicos (Sakharov et al., 1993), en los artrópodos *Mamestra configurata* y *Blomia tropicalis*, se demostró la presencia de elastasa (Hegedus et al., 2003 y Motealegre et al., 2002) con inhibidores y sustratos específicos. En el primero fue a partir de el intestino medio y en el segundo de extracto del organismo, lo que nos lleva a dos preguntas, ¿estos dos inhibidores son funcionales?, ¿la elastasa a sido adecuadamente buscada en estos organismos?.

La funcionalidad se tendrá que determinar con pruebas *in vitro*, debido a que no todos los dominios de los inhibidores multidominio son funcionales. El segundo dominio de *R. prolixus* no es funcional debido a la inserción de un residuo entre la C₂ y la C₃, mientras que del inhibidor multidomino de *P. leniusculos*, solo un dominio de los cuatro que posee es activo. La presencia de glutamina en el sitio reactivo del ultimo dominio lo hace inactivo, mientras que de los tres primeros solo uno es funcional a pesar de que poseen los tres leucinas en el sitio reactivo. Esta situación también se presenta en ovoinhibidor y ovomucoide de gallina, el primero con siete dominios de los cuales solo cinco son activos, el segundo con tres dominios de los que dos tienen actividad inhibitoria. Además, es poca la información que se tiene sobre inhibidores de elastasa, la mayoría de los inhibidores de elastasa son Kazal clásicos, descubiertos principalmente en la glándula submandibular de organismos carnívoros. Entre sus principales características es que son de dos dominios el primero con lisina o arginina en el sitio reactivo y el segundo con metionina, por lo que el

primer dominio inhibe tripsina y el segundo inhibe elastasa, desconociéndose su papel fisiológico (Hochstrasser et al., 1993). Mistry et al. (1997) purificó un inhibidor de elastasa en pulmón de oveja con homología a los inhibidores de dos dominios de la glándula submandibular, con Met en el sitio reactivo y con la función de controlar la actividad de elastasa durante inflamación pulmonar.

9. CONCLUSIONES

- En el hepatopáncreas del camarón blanco *P. vannamei*, se expresan dos secuencias que codifican para inhibidores Kazal. Una secuencia se obtuvo completa y la otra parcial.
- La secuencia completa es de un solo dominio Kazal y teniendo en el sitio reactivo Gly, mientras que la secuencia que se obtuvo parcial es de dos dominios, ambos parciales y teniendo en el sitio reactivo Ala del segundo dominio. Estos residuos determinan especificidad hacia elastasa.
- Ambos inhibidores Kazal son no clásicos ya que tienen seis residuos entre la Cys4 y Cys 5, similar al encontrado en anémona.

10. BIBLIOGRAFÍA

Araujo MS, Nunes VA, Gozzo AJ, Sampaio MU, Auerswald E, Ura N, Shimamoto K, Sampaio C. 1999. Preliminary characterization of a Kazal-type serine protease inhibitor from *Caiman crocodilus yacare* plasma. *Immunopharmacology* 45:179-183.

Asao T, Takahashi K, Tashiro M. 1998. Interaction of second and third domains of Japanese quail ovomucoid with ten mammalian trypsins. *Biochimica et Biophysica Acta* 1387:415-421.

Bode W, Huber R. 2000. Structural basis of the endoproteinase-protein inhibitor interaction. *Biochimica et Biophysica Acta* 1477:241-252.

Brown TA, 1995. Gene cloning an introduction. Tercera edición. Chapman y Hall. Londres. 334.

Burden DW, Whitney DB. 1995. Biotechnology: proteins to PCR. Birhäuser. Primera edición. Boston.318.

Ceccaldi HJ. 1989. Anatomy and physiology of digestive tract of Crustacean Decapods reared in aquaculture. *Advance in tropical aquaculture. Aquacop ifremer.* Febrero 20-Marzo 4. 243-259.

Chomczynski P, Sacchi N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry* 162:156-159.

Cruz-Suárez LE. 1996 Digestión en camarón y su relación con formulación y fabricación de alimentos balanceados. *Avances en nutrición acuicola III. Memorias del tercer simposium internacional de nutrición acuícola.* UANL, Monterey, Nuevo León, México. 11

al 13 de noviembre.

Dall W. 1992 Feeding, digestion and assimilation in penaeidae. Proceedings of the aquaculture Nutrition Workshop 57-63.

Fukuoka S, Kawajiri H, Fushiki T, Takahashi K, Iwai K. 1986. Localization of pancreatic enzyme secretion-stimulating activity and trypsin inhibitory activity in zymogen granule of the rat pancreas. *Biochimica et Biophysica Acta* 884:18-24.

Friedrich T, Kroger B, Bialojan S, Lemaire HG, Hoffken HW, Reuschenbach P, Otte M, Dodt J. 1993. A Kazal-type inhibitor with thrombin specificity from *Rhodnius prolixus*. *Journal of Biological Chemistry* 268:16216-16222.

García-Carreño FL. 1992. Proteinase inhibition in theory and practice. *Biotechnology education* 3:145-150.

García-Carreño FL, Carrillo O, Navarrete del Toro MA. 1998. Control of digestive functions in shrimp, I. An inhibitor of trypsin activity in the hepatopancreas. Proceedings of the four international crustacean congress. Amsterdam, The Netherlands, Julio 20-24.

García-Carreño FL, Hernández-Cortés MP. 2000. Use of protease inhibitors in seafood products. *Seafood Enzymes edited by Haard NF, Simpson BK.* 531-547.

Gish, W. (1996-2003). <http://blast.wustl.edu>

Grzesiak A, Helland R, Smalas AO, Krowarsch D, Dadlez M, Otlewski J. 2000. Substitutions at the P(1) position in BPTI strongly affect the association energy with serine proteinases. *Journal of Molecular Biology.* 301:205-217.

Hernandez P, Srintunyalucksana K, Soderhall K. 2000. A multigene family of Kazal inhibitors in the tiger shrimp *Penaeus monodon*. International Marine Biotechnology Conference, Townsville, Australia.

Hernández P, Whitaker JR, García-Carreño FL. 1997. Purification and Characterization of chymotrypsin from *Penaeus vannamei* (Crustacea:Decapoda). Journal of Food Biochemistry 21:497-514.

Hegedus D, Baldwin D, O'Grady M, Braun L, Gleddie S, Sharpe A, Lydiate D, Erlandson M. 2003. Midgut proteases from *Mamestra configurata* (Lepidoptera: Nostuidae) Larvae: characterization, cDNA cloning, and expressed sequence tag analysis. Archives of Insect Biochemistry and Physiology 53:30-47.

Hochstrasser K, Wachter E, Reisinger PW, Greim M, Albrecht GJ, Gebhard W. 1993. Amino acid sequences of mammalian Kazal-type proteinase inhibitors from salivary glands. Comparative Biochemistry and Physiology B 106:103-108.

Hohenester E, Maurer P, Timpl R. 1997. Crystal structure of a pair of follistatin-like and EF-hand calcium-binding domains in BM-40. EMBO Journal 16:3778-3786.

Horii A, Tomita N, Yokouchi H, Doi S, Uda K, Ogawa M, Mori T, Matsubara K. 1989. On the cDNA's for two types of rat pancreatic secretory trypsin inhibitor. Biochemical and Biophysical Research Communications 162:151-159.

Johansson M, Keyser P, Söderhäll K. 1994. Purificación and cDNA cloning of a four-domain Kazal proteinase inhibitor from crayfish blood cells. European Journal of Biochemistry 223:389-394.

Keyser P. G. 1999. Characterization of some Crayfish blood proteins, Crustacean immunity. PHD Thesis. Uppsala University, Uppsala, Sweden.

Kido H, Yokogoshi Y, Katunuma N. 1990. A low-molecular-mass Kazal-type protease inhibitor isolated from rat hepatocytes is identical to rat pancreatic secretory trypsin inhibitor II. Purification and amino acid sequence. *European Journal of Biochemistry* 188:501-506.

Kikuchi N, Nagata K, Yoshida N, Tanaka T, Yamamoto M, Saitoh Y. 1985. Purification and complete amino acid sequence of canine pancreatic secretory trypsin inhibitor. *FEBS Letters* 191:269-272.

Klein B, Le Moullac G, Sellos D, van Wourmhoudt A. 1996. Molecular cloning and sequencing of trypsin cDNA from *Penaeus vannamei* (Crustacea, Decapoda): use in assessing gene expression during the moult cycle. *International Journal Of Biochemistry and Cell Biology* 28:551-563.

Laskowski M Jr, Kato I. 1980. Protein inhibitors of proteinases. *Annual Reviews Biochemistry* 49:593-626.

Laskowski M Jr, Qasim MA. 2000. What can the structures of enzyme-inhibitor complexes tell us about the structures of enzyme substrate complexes? *Biochimica et Biophysica Acta* 1477:324-337.

Lemos D, García-Carreño FL, Hernández P, Navarrete del Toro A. 2002. Ontogenetic variation in digestive proteinase activity, RNA and DNA content of larval and postlarval white shrimp *Lipotenaeus schmitti*. *Aquaculture* 214:363-380

Lemos D, Hernández-Cortés MP, Navarrete del Toro A, García-Carreño FL, Phan VN. 1999. Ontogenetic variation in digestive proteinase activity of larvae and postlarvae of pink shrimp *Farfantapenaeus paulensis* (Crustacea: Decapoda: Penaidae). *Marine biology* 135:653-662.

Lewin B. 2000 .Genes VII. Oxford. 1 edición.New York. 990.

Lu SM, Lu W, Qasim MA, Anderson S, Apostol I, Ardelt W, Bigler T, Chiang YW, Cook J, James MN, Kato I, Kelly C, Kohr W, Komiyama T, Lin TY, Ogawa M, Otlewski J, Park SJ, Qasim S, Ranjbar M, Tashiro M, Warne N, Whatley H, Wieczorek A, Wieczorek M, Wilusz T, Wynn R, Zhang W, Laskowski M Jr. 2001. Predicting the reactivity of proteins from their sequence alone: Kazal family of protein inhibitors of serine proteinases. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98:1410-1415.

Martinez-Córdova LR. 1993. Camaronicultura, bases técnicas y científicas para el cultivo de camarones peneidos. CICTUS, a.g.t, Editor, S.A. 1-25.

Mathews CK, van Holde KE. 1998. Bioquímica. segunda edición. McGraw Hill Interamericana de España, S.A.U. España.1283.

Mende K, Petoukhova O, Koulitchkova V, Schaub GA, Lange U, Kaufmann R, Nowak G. 1999. Dipetalogastin, a potent thrombin inhibitor from the blood-sucking insect. *Dipetalogaster maximus* cDNA cloning, expression and characterization. *European Journal of Biochemistry* 266:583-590.

Mistry R, Snashall PD, Totty N, Briskin S, Guz A, Tetley TD. 1997. Purification and characterization of a novel Kazal-type serine proteinase inhibitor of neutrophil elastase from sheep lung. *Biochimica et Biophysica Acta* 1342:51-61.

Montealegre F, Quinones C, Torres N, Goth K. 2002. Detection of serine proteases in extracts of the domestic mite *Blomia tropicalis*. *Experimental and Applied Acarology* 26:87-100.

Morris MT, Coppin A, Tomavo S, Carruthers VB. 2002. Functional analysis of *Toxoplasma gondii* protease inhibitor 1. *Journal of Biological Chemistry* 277:45259-45266.

Muhlia-Almazan A, García-Carreño FL. 2002. Influence of molting and starvation on the synthesis of proteolytic enzymes in the midgut gland of the white shrimp *Penaeus vannamei*. *Comparative Biochemistry and Physiology B* 133:383–394.

Neurath H. 1984. Evolution of proteolytic enzymes. *Science* 224:350-357.

Niimi T, Yokoyama H, Goto A, Beck K, Kitagawa Y. 1999. A *Drosophila* gene encoding multiple splice variants of Kazal-type serine protease inhibitor-like proteins with potential destinations of mitochondria, cytosol and the secretory pathway. *European Journal of Biochemistry* 266:282-292.

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

Odum L, Bundgaard JR, Johnsen AH. 1999. A Kazal-type trypsin inhibitor from the protochordate *Ciona intestinalis*. *European Journal of Biochemistry* 259:872-876.

Pszenny V, Angel SO, Duschak VG, Paulino M, Ledesma B, Yabo MI, Guarnera E, Ruiz AM, Bontempi EJ. 2000. Molecular cloning, sequencing and expression of a serine proteinase inhibitor gene from *Toxoplasma gondii*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 107:241-249.

Sakharov IY, Dzhunkovkaia AV, Artyukov AA, Zakharova NN. 1993. Purification and some properties of Elastase from hepatopancreas of the king crab *Paralithodes camtschatica*. *Comparative biochemistry and physiology B* 106:681-684.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 1989. *Molecular Cloning A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2da ed. USA.

Scharpe S, De Meester I, Hendriks D, Vanhoof G, van Sande M, Vriend G. 1991. Proteases and their inhibitors: today and tomorrow. *Biochimie* 73:121-126.

Schechter I, Berger A. 1967. On the size of the activity site in proteases. I. Papain. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 27:157-162.

Sellos D, y van Wormhoudt A. 1992. Molecular cloning of a cDNA that encodes a serine protease with chymotryptic and collagenolytic activities in the hepatopáncreas of the shrimp *Penaeus vannamei* (Crustacea, Decapoda). *FEBS Letters* 309:214-224.

Stubbs MT, Morenweiser R, Sturzebecher J, Bauer M, Bode W, Huber R, Piechottka GP, Matschiner G, Sommerhoff CP, Fritz H, Auerswald EA. 1997. The three-dimensional structure of recombinant leech-derived tryptase inhibitor in complex with trypsin. Implications for the structure of human mast cell tryptase and its inhibition. *Journal of Biological Chemistry* 272:19931-19937.

Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22:4673-4680.

Tsai LH, Liu HC, Chuang KL. 1986. Properties of two chymotrypsin from the digestive gland of prawn *Penaeus monodon*. In: Federation of European Biochemical Societies. *FEBS Letters* 203:257-261.

Tschesche H, Kolkenbrock H, Bode W. 1987. The covalent structure of the elastase inhibitor from *Anemonia sulcata*--a "non-classical" Kazal-type protein. *Biological Chemistry Hoppe-Seyler* 368:1297-1304.

van Wormhoudt A, Chevalier P, Sellos D. 1992. Purification, biochemical characterization and N-terminal sequence of a serine proteinase with chymotryptic and collagenolytic activities of a tropical shrimp, *Penaeus vannamei* (Crustacea, Decapoda). *Comparative Biochemistry and Physiology B* 103:675-680.

van Wormhoudt A, Sellos D, Donval A, Plaire-Goux S, Le Moullac G. 1995. Chymotrypsin gene expression during the intermolt cycle in the shrimp *Penaeus vannamei* (Crustacea, Decapoda). *Experientia*. 51:159-163.

Warburg O., & Cristian W. 1942. *Biochemistry*. 310, 348.

Winnica DE, Novella ML, Dematteis, Coronel CE. 2000. Trypsin/acrosin inhibitor activity of Rat and Guinea Pig caltrin proteins. Structural and functional Studies. *Biology of Reproduction* 63:42-48.

Zhao M, Naude RJ, Muramoto K, Oelofsen W. 1996. Purification and characterization of ostrich pancreatic secretory trypsin inhibitor. *International Journal of Peptide and Protein Research* 48:174-181.

APÉNDICE I.

Diseño de oligonucleótidos.

Para la elaboración de la sonda se diseñaron 3 oligonucleótidos específicos para la clona KHPA que contiene en el sitio múltiple de clonación el inhibidor de proteinasas de *P. monodon* 1 (Tabla 7). Estos se diseñaron con el programa Primer3 del sitio web <www.genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3.cgi>. Se especificaron los parámetros; tamaño óptimo de 20 nucleótidos, Tm de 50 °C y contenido de GC mínimo 45% y máximo 55% . Se buscó que estos oligonucleótidos fueran de regiones conservadas en los dominios de los inhibidores Kazal de hepatopáncreas de *P. monodon*. Además que entre el producto amplificado se encontrara el sitio reactivo P₁ (Fig. 19).

Tabla VII. Oligonucleótidos diseñados para la realización de la sonda.

# oligo	Gen blanco		Primer	Secuencia (5'--3')
1	KHPA	Sentido	PPMF	CGTGACCTACTCTAACCTAT
2	KHPA	Antisentido	PPMR	GCCAGAGTAATATCCTCATC
3	KHPA	Sentido	PPMF2	AGCTGGAACGAGCCAAT

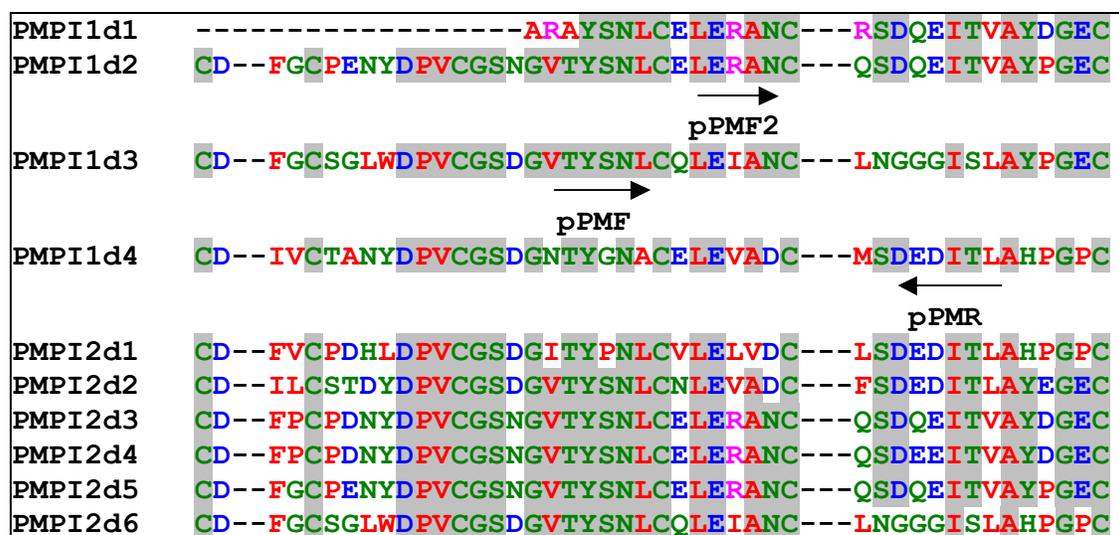


Figura 19. Diseño de los oligos pPMF, pPMF2 y pPMR.

Para obtener el extremo 5' se diseño el oligonucleótido pPVR a partir del fragmento 2. El diseño se hizo con el programa primerselect del software lasergene (), especificando tamaño optimo de 20 nucleótidos, Tm de 50 °C y se revisó que no se formaran dimeros ni bucles.

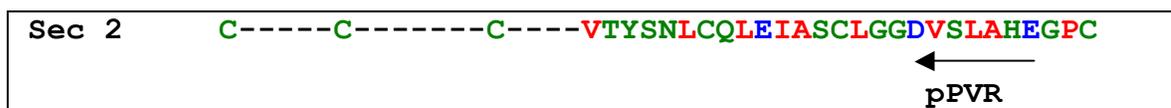


Figura 20. Diseño del oligonucleótido pPVR. Se diseño en base a la secuencia 2 que se muestra deducida en aminoácidos.

APÉNDICE II.**Medios de cultivo.****LB**

Triptona	10 g
Extracto de levadura	5 g
NaCl	10 g
H ₂ O	900 ml

Disolver los componentes y ajustar el pH a 7.0 con NaOH 5 N.

Aforar a 1 lt. Para placas adicionar 15 g de agar por litro de medio.

SOB

Triptona	20 g
Extracto de levadura	5 g
NaCl	0.5 g

Disolver los componentes. Adicionar

KCl 250 mM	10 ml
------------	-------

Ajustar el pH a 7.0 con NaOH 5 N y aforar a 1lt.

SOC

Adicionar al medio SOB 20 mL de una solución estéril de glucosa 1 M por litro de medio.