

ARTICULO ORIGINAL

PRESENCIA DE UN DOMINIO TIPO MUCINA EN UNA FAMILIA DE GLICOPROTEINAS INMUNODOMINANTES DE FILARIAS QUE SON HOMOLOGAS AL INHIBIDOR DE ASPARTIL-PROTEINASAS DE *ASCARIS SUUM*.

*John Santiago Mejía * Xiquian Hong ** Clotilde K. S. Carlow ***.*

RESUMEN

El análisis de la secuencia primaria de un antígeno inmunodominante de *Dirofilaria immitis* (DiT33) permitió identificar un dominio tipo mucina en el segmento carboxilo-terminal de la proteína. Los residuos de serina y treonina en este segmento permite el anclaje por puentes del tipo O de varios glicanos (T-fil) similares al antígeno T (Thomsen-Friedenreich) que se expresa en adenocarcinomas. El glicano T-fil se expresa ampliamente en diversos estadios de diferenciación de *D. immitis* y posiblemente representa el principal glicano usado por las filarias para formar mucinas.

PALABRAS CLAVES: Pirofilaria, antígeno T, mucins, DiT 33.

ABSTRACT

The amino acid sequence of the immunodominant *Dirofilaria immitis* antigen DiT33, reveals a mucin-type domain in the carboxyterminal segment of the protein. The serine and threonine residues in this segment allow the linkage of several O-type glycans (T-fil) that are similar to the adenocarcinoma associated T antigen (Thomsen-Friedenreich). T-fil is expressed in different larval stages of *D. immitis* and may represent the main glycan used by the parasite to prepare mucins.

KEY WORDS: Pirofilaria, T antigen, mucins, DiT 33.

INTRODUCCION.

Uno de los antígenos inmunodominantes de *Dirofilaria immitis*, DiT33, pertenece a una familia de glicoproteínas de filarias homólogas al inhibidor de proteasas de *Ascaris suum* (1). La respuesta inmune contra este antígeno es altamente específica y sensible, por lo que es la base del mejor método disponible para el serodiagnóstico de la dirofilariasis (1, 2).

La secuencia de amino-ácidos del gene de DiT 33 (234 residuos) solo alcanza para explicar 26.4 kDa de los 31-33 kDa de la proteína nativa, el resto se debe a modificaciones post-traduccionales. En la secuencia peptídica de DiT33 no se identificó ningún sitio potencial de glicosilación del tipo N ni de anclaje para puentes de glicosilfosfatidilinositol (1), por lo que las glicosilaciones de esta proteína deben ocurrir por puentes del tipo O. De hecho, estudios con lectinas revelaron que la proteína nativa expresa un sacárido similar (T-fil) al antígeno T (Thomsen-Friedenreich) que está anclado por puentes del tipo O a las mucinas de varios tipos de adenocarcinomas (2,3).

Para explicar una discrepancia de aproximadamente 5 a 7 kDa entre el peso molecular de la proteína nativa y la recombinante, basada en glicosilación con el sacárido

T-fil, se requeriría la presencia de un dominio tipo mucina con varios sitios de anclaje para estos glicanos. El análisis de la secuencia de amino ácidos de DiT33 y de los otros miembros de la familia, permite postular que dicho dominio existe y que se encuentra en el segmento carboxilo-terminal de las glicoproteínas.

METODOLOGIA

El gene que codifica DiT33 fue clonado a partir de una librería de expresión de *D. immitis* usando anticuerpos contra la proteína homóloga de *Onchocerca volvulus* OvD5B. El fragmento clonado de 785 pares de bases fué secuenciado siguiendo el método de Sanger de terminación de cadena por dideoxinucleótidos. Las secuencias de DNA fueron analizadas con el software GCG. El patrón de hidrofobicidad-hidrofilicidad de las secuencias proteicas se obtuvo con el programa DNA Strider usando el algoritmo de Kite-Dootlittle. El alineamiento de los residuos se realizó usando el programa PILEUP y se complementó con el programa SeqVu.

RESULTADOS

En la secuencia del fragmento clonado se detectó un marco de lectura abierto que codifica para una proteína de 234 amino ácidos en el que se reconoce un péptido

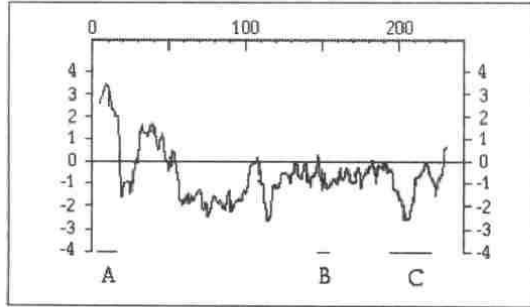
* Centro de Investigación Básica del CES.

** New England Biolabs, Beverly, MA.

*** New England Biolabs, Beverly, MA.

señal potencial de 17 residuos (Figura 1) y una secuencia (YVRDLT) que se ha postulado como el sitio activo del inhibidor de pepsina de *A. suum* (4).

Figura 1. Representación del índice de hidrofobicidad-hidrofilicidad (Kyte-Doolittle) de las secuencias de amino ácidos de DiT33. Se indica la posición del péptido señal, del hipotético sitio inhibidor de proteasas y del dominio tipo mucina.



A= Péptido señal
 B= Sitio inhibitorio
 C= Dominio tipo mucina

El porcentaje de identidad de la secuencia de DiT33 con la proteína correspondiente de *Onchocerca volvulus* (Ov33) y *Brugia malayi* (Bm33), es de 83 y 76% respectivamente. La homología entre estas 3 proteínas es particularmente alto entre los residuos 113 y 152 que es donde se encuentra el segmento YVRDLT (Figura 2). También se puede observar en la figura 2 que mientras el porcentaje de residuos serina + treonina (S+T) del segmento aminoterminal comprendido entre los residuos 18 y 196 de DiT 33 es de 7.45, el porcentaje (S+T) sube a 57.1 en el segmento comprendido entre los residuos 197 y 217. En las 3 proteínas de filarias se detecta un alto porcentaje (S+T) en este segmento a diferencia de los observado con el segmento correspondiente del inhibidor de pepsina de *A. suum* (Figura 3).

DISCUSION

Estudios con lectinas permitieron definir que el sacárido asociado al antígeno DiT33 es reconocido por jacalina y no por otras 12 lectinas con especificidad por otros tipos de sacáridos (2). Jacalina es una lectina con especificidad por el antígeno Thomsen-Friedenreich o antígeno T, un disacárido (Galb1-3GalNAc) anclado por uniones ester a los residuos de serina o treonina de las proteínas (5). Sin embargo, debido a que otra lectina específica para el antígeno T, PNA, no reconoce el sacárido asociado a

Figura 2. Comparación de la secuencia primaria de los genes DiT33 (de *D. immitis*), Ov33 (de *O. volvulus*) y Bm33 (de *B. malayi*). Residuos idénticos son representados por un guión. Espaciamientos en las secuencias son indicados por un punto. Los asteriscos indican los residuos de cisteina que están conservados. Las flechas indican la secuencia de amino ácidos que hace parte del sitio activo del inhibidor de aspartil-proteinasas de *A. suum*. La secuencia incluida en el cuadro corresponde al dominio tipo mucina.

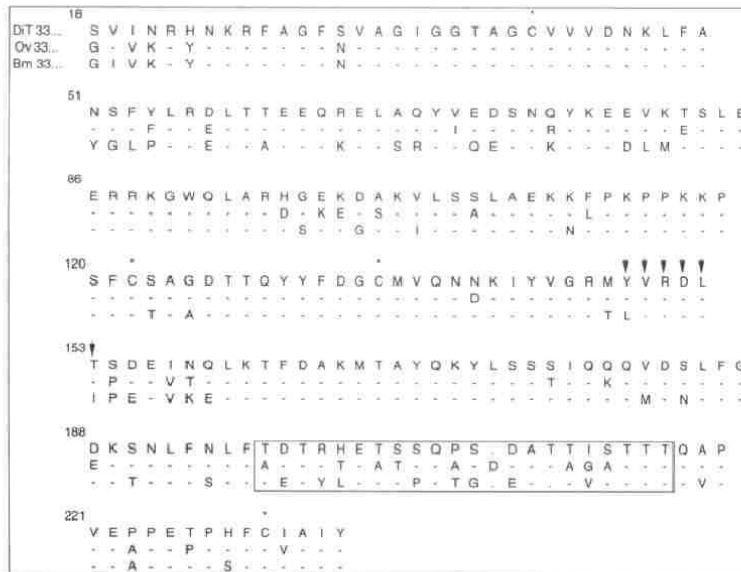


Figura 3. Comparación de la secuencia del fragmento carboxiloterminal (residuos 197-217) de DiT33 con la región correspondiente de Ov33, Bm33 y Aspi3. El porcentaje en residuos de serinas + treoninas (ST) en cada uno de los fragmentos es indicado.

	...197																								217...	S+T(%)
DiT 33	T	D	T	R	H	E	T	S	S	Q	P	S	.	D	A	T	T	I	S	T	T	T	T	(57.1)		
Ov 33	A	-	-	-	T	-	A	T	-	-	A	-	D	-	-	-	A	G	A	-	-	-	-	(40.0)		
Bm 33	-	E	-	Y	L	-	-	-	P	-	T	G	,	E	-	-	-	V	-	-	-	-	-	(50.0)		
Aspi 3	Q	Q	E	N	-	-	P	S	S	G	M	P	H	G	A	V	P	.	(11.7)		

DiT33, concluimos que el sacárido de filarias es similar, mas no idéntico al antígeno T y le llamamos antígeno T-fil.

T-fil se encuentra ampliamente expresado en los diferentes estadios de diferenciación de *D. immitis* (3), y también de otras filarias (*O. volvulus*, *B. malayi*) y otros nemátodos (*C. elegans*) (datos no publicados). La identificación de un dominio tipo mucinas que acarrea el glicano T-fil plantea la posibilidad de que T-fil sea el principal componente de las mucinas de filarias.

Debido a la homología entre T-fil y el antígeno T y que los dos glicanos se pueden ensamblar en dominios altamente glicosilados (6), es posible el desarrollo de reacciones inmunes cruzadas. Dependiendo de la clase de anticuerpos inducidos por estos glicanos, es posible que aumenten la inmunidad bloqueadora característica de las filariasis y del cáncer, o que induzca una inmunidad protectora que permite plantear la posibilidad de usar filarias en la inmunoterapia del cáncer.

BIBLIOGRAFIA

1. Hong X.Q., Mejía J.S., Kumar S., Perler F.B. & Carlow C.K.S. 1996. Cloning and expression of DiT33 from *Dirofilaria immitis*: a specific and early marker of heartworm infection. *Parasitology* 112,331-338.
2. Mejía J.S., Nknefou C., Southworth M.W., Perler F.B. & Carlow C.K.S. 1994 a. Expression of an *Onchocerca volvulus* Ov33 homolog in *Dirofilaria immitis*: potential in immunodiagnosis of heartworm infection. *Parasite Immunology* 16,297-303.
3. Mejía J.S. & Carlow C.K.S. 1994b. An analysis of the humoral immune response of dogs following vaccination with irradiated infective larvae of *Dirofilaria immitis*. *Parasite Immunology* 16,157-164.
4. Willenbacher J., Hoffe W & Lucius R. 1993 The filarial antigens Av33/Ov33-3 show striking similarities to the major pepsin inhibitor from *Ascaris suum*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 57,349-351.
5. Sastry K.M.V., Banarjee P., Patanjali S.R. 1986 Analysis of saccharide binding of *Artocarpus integrifolia* lectin reveals specific recognition of T-antigen (b-D-Gal(1-3 GalNAc). *Journal of Biological Chemistry* 261,11726-11733.
6. Bhavanandan V.P. 1991 Cancer-associated mucins and mucin-type glycoproteins. *Glycobiology* 1,493-503.