

00387



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**FACULTAD DE CIENCIAS
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**"ESTUDIO ACERCA DE LOS CAMBIOS EN LA TRANSCRIPCIÓN
DEL GEN DE LA HORMONA CONCENTRADORA DE PIGMENTOS
EN EL ACOCIL *Cherax quadricarinatus*"**

**T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS
P R E S E N T A :
M. en. C. FRANCISCO JOSÉ MARTÍNEZ PÉREZ**



MÉXICO, D.F.,

FEBRERO, 2005

COORDINACIÓN

m 341744



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
COORDINACIÓN

UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

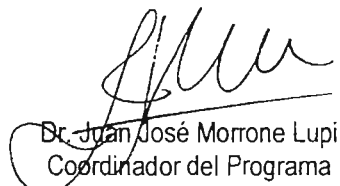
Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Por medio de la presente me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 6 de diciembre del 2004, se acordó poner a su consideración el siguiente jurado para el examen de DOCTOR EN CIENCIAS del alumno MARTÍNEZ PÉREZ FRANCISCO JOSÉ con número de cuenta 500083725, con la tesis titulada: "Estudio acerca de los cambios en la transcripción del gen de la Hormona Concentradora de pigmentos en el acocil *Cherax quadricarinatus*", bajo la dirección del Dr. Samuel Zinker Ruzal .

Presidente:	Dra. María Luisa Fanjul Peña de Moles
Vocal:	Dr. Luis Camilo Ríos Castañeda
Vocal:	Dr. Roberto Coria Ortega
Vocal:	Dr. Luis Yoshio Kameyama Kawabe
Secretario:	Dr. Samuel Zinker Ruzal
Suplente:	Dr. Antonio Eusebio Lazcano-Araujo Reyes
Suplente:	Dr. Leobardo Rodríguez Sosa

Sin otro particular, quedo de usted.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 23 de febrero del 2005.


Dr. Juan José Morrone Lupi
Coordinador del Programa

c.c.p. Expediente del interesado

Esta tesis fue realizada en La Unidad de la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México y en el Departamento de Genética y Biología Molecular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, bajo la tutoría de los Doctores Hugo Aréchiga Urtuzuástegui (q.e.p.d.), Samuel Zinker Ruzal, Jesús Valdés Flores, y la accesoria de los Doctores Maria Luisa Fanjul Moles y Antonio Lazcano Araujo. Con el apoyo económico de los donativos 39691-M (Jesús Valdés Flores); 38645-N (Hugo Aréchiga.) del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología y del donativo de la Universidad Autónoma de México PAPIIT/UNAM/IN200701-3 (Hugo Aréchiga y Leonardo Rodríguez Sosa).

La Biología Molecular es similar a la mujer más hermosa de la historia, es: bella, elegante, inteligente, delicada, exigente, posesiva, difícil de entender y celosa. Pero cuando te besa, es de por vida.

Dr. Hugo Aréchiga Urtuzuástegui.

1940-2003

Dedicatoria:

A mi Padre Jesús y a mi Madre Maria Guadalupe que siempre me han llevado de su mano y que me han protegido con su manto.

A mis Padres Susana y Francisco quienes me ensaaron el respeto, el valor y el amor al prójimo y al trabajo.

A mi Hijo Luis Alberto, aún en la distancia siempre estas y estarás en mi corazón.

A mis Hermanos Marcela, Juan Carlos, Luis Ulloa Pizarro, Gustavo, Hortensia y Karina. Siempre están conmigo.

A mi Tía Lilia y a mi Tío Carlos, siempre están a mi lado.

A mi Tía Lupe, a mi Tío Manuel y mi Tío José, Gracias por su cariño.

A mis sobrinas Debora y Karla, gracias por su alegría.

A Lupita Barrera. Gracias amiga, los Angeles siempre regresan a su lugar de origen.

A Adriana Murillo, Jesús Santa Olalla, Rogelio Cruz Vera, Carlos Vásquez y Luis Kameyama. Gracias por su amistad.

A los Doctores Samuel Zinker, Hugo Aréchiga (q.e.p.d.) y Jesús Valdés. Gracias por confiar en mí en todo momento.

A Irma y Ignacio Gracias por su ayuda y su confianza.

A Maria Teresa, Martha Ligia y Giovanna. Gracias por su amistad y su alegría incondicional en todo momento.

Agradecimientos:

Durante el desarrollo de este trabajo hubieron personas que en todo momento me apoyaron en mi formación personal y académica. Quiero expresar de manera particular mi infinito agradecimiento a:

La Señorita. Rosalba Cruz Domínguez, a los Doctores Jaime García Mena y Luis Felipe Jiménez por la ayuda que me brindaron para el cumplimiento de las Actividades Académicas Complementarias, al Dr. Luis Miguel Salgado por el soporte técnico, a la M. en C. Guadalupe Aguilar González por la excelente producción de los oligonucleótidos y secuenciación de todas las clonas que se obtuvieron en este trabajo, a los pescadores de la Laguna de Mandinga en la obtención de las jaibas *Callinectes sapidus*. De igual manera agradezco a Don Pedro por su ayuda en la obtención de los acociles *Cherax quadricarinatus* y al Dr. Ramón Alvarado por su amistad consejos y observaciones en la escritura de los artículos que emanaron de este trabajo.

A la M. en C. Karina Pastén Hidalgo, al Dr. Arturo Becerra y al Dr. Antonio Lazcano por todo su apoyo en la escritura y observaciones que hicieron posible el desarrollo del modelo del origen de la Hormona Concentradora de Pigmentos.

Por último, al Dr. Leonardo Rodríguez Sosa, al Ing. José Francisco Vázquez, al M. en C. Julio Prieto Sagredo por su ayuda en el análisis estadístico de los ritmos descritos en esta tesis, así como al Dr. Luis Kameyama por sus observaciones al artículo del ritmo circadiano de la Hormona Concentradora de Pigmentos y a las señoritas Teresa Pacheco, Renata Izazola , María Luisa Arauz y Lupita Barrera (q.e.p.d.) por su excelente asistencia secretarial.

INDICE

Resumen	1
1 Introducción	3
1.1 Miembros de la familia Hormona Adipocinética /Hormona Concentradora de pigmentos (HAC/HCP).	8
1.2 Relación entre la posición y la función de los aminoácidos que conforman a la familia HAC/HCP.	11
1.3 Precursores de la familia HAC/HCP.	15
1.4 Genes de la familia HAC/HCP.	18
1.5 Ritmos circadianos.	20
1.6 Análisis de los ritmos biológicos.	22
1.7 Ritmo circadiano del movimiento de los pigmentos en los crustáceos.	25
2. Justificación y Planteamiento del problema.	28
3. Hipótesis y Objetivos.	30
4. Metodología.	
4.1 Extracción de los ácidos nucleicos del músculo, del hepatopáncreas, de las branquias y de los tallos oculares de los acociles <i>C. quadricarinatus</i> .	31
4.2 Clonación de los DNAs complementarios de la HCP, de la beta-actina y de la gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (G3PDH).	35
4.3 Expresión del RNAm de la HCP, de la beta-actina y de la G3PDH en diferentes tejidos del acocil.	47
4.4 Determinación y cuantificación de los RNAm de la de la HCP, de la beta-actina y de la G3PDH en ciclos circadianos por RT-PCR semi-cuantitativa.	48
4.5 Análisis evolutivo del RNAm de la de la HCP.	51
5. Resultados.	
5.1 Obtención de ácidos nucleicos.	53
5.2 Clonación y caracterización del cDNA del la HCP, de la beta-actina y de la G3PDH.	55
5.3 Expresión de los RNAm del precursor de la HCP, de la beta-actina y de la G3PDH.	67
5.4 Cuantificación del RNAm del precursor de la HCP, de la beta-actina, de la G3PDH y del RNAr 18S en el pedúnculo ocular en un periodo de 24 h.	68
5.5 Modelo del posible origen de la familia HAC/HCP.	75
5.6 Aplicación del modelo del posible origen de la familia HAC/HCP a la secuencia del RNAm de la HCP del acocil <i>C. quadricarinatus</i> .	87
6. Discusión.	90
7. Conclusiones.	98
8. Perspectivas.	99
9. Bibliografía.	101
10. Apéndices.	108

Índice de figuras y tablas

Figuras

Figura 1.- Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de los precursores de la familia HAC/HCP.	16
Figura 2.- Representación gráfica de un ritmo circadiano.	23
Figura 3.- Ritmo circadiano del movimiento de pigmentos en la retina de los crustáceos.	25
Figura 4.- Ritmo circadiano de la concentración de la HCP en el pedúnculo ocular del acocil en ciclos de luz-oscuridad, de oscuridad y de luz constante.	26
Figura 5.- Identificación del DNA, genómico y de los productos de RT-PCR del RNAr 18S del acocil <i>C. quadricarinatus</i> .	54
Figura 6.- Productos de las reacciones de PCR y RT-PCR para la clonación del cDNA de la beta-Actina.	56
Figura 7.- Secuencia del cDNA y de los aminoácidos de la beta-Actina.	57
Figura 8.- Filograma de la beta-Actina de invertebrados.	58
Figura 9.- Productos de las reacciones de PCR y RT-PCR para la clonación de la gliceraldehído-3-Fosfato deshidrogenasa.	59
Figura 10.- Secuencia del cDNA y de los aminoácidos de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa.	61
Figura 11.- Filograma de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa en eucariontes.	62
Figura 12.- Productos de las reacciones de PCR y RT-PCR para la clonación de la hormona concentradora de pigmentos.	63
Figura 13.- Secuencia del cDNA y de los aminoácidos de la Hormona Concentradora de Pigmentos.	65
Figura 14.- Comparación de la secuencia de aminoácidos de la Hormona Concentradora de Pigmentos del acocil <i>C. quadricarinatus</i> con los miembros de la familia HAC/HCP.	66
Figura 15.- Amplificación del marco abierto de lectura del precursor de la HCP, de la beta-Actina y de la G3PDH en el pedúnculo ocular, en el hepatopáncreas, en las branquias y en el músculo.	67
Figura 16.- Concentración del RNA total en el pedúnculo ocular del acocil en ciclos de 12 h de luz-oscuridad y cuatro meses de oscuridad constante.	68
Figura 17.- Productos de la reacción de RT-PCR semi-cuantitativa del precursor de la HCP, de la beta-Actina, de la G3PDH y del RNAr 18S.	71
Figura 18.- Concentración del RNAm de la G3PDH (A y B) y del RNAr 18S en el pedúnculo ocular del acocil en ciclos de 12 h de luz-oscuridad y de la G3PDH por cuatro meses de oscuridad constante.	72
Figura 19.- Concentración relativa del RNAm de la beta-Actina y de la HCP en el pedúnculo ocular del acocil en ciclos de 24 h de luz-oscuridad (12:12 h) y cuatro meses de oscuridad constante.	74
Figura 20.- Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de los precursores de las familias HAC/HCP y APGWamida.	76

Figura 21.- Alineamiento de la posible estructura secundaria protéica de los precursores de las familias HAC/HCP y APGWamida.	77
Figura 22.- Alineamiento de la secuencia de ácidos nucléicos de los precursores de las familias HAC/HCP y APGWamida.	81
Figura 23.- Alineamiento de la secuencia de la HCP y HAC con la secuencia del precursor de la APGWamida.	83
Figura 24.- Filogramas de las familias Hormona Adipocínética (HAC), Hormona Concentradora de Pigmentos (HCP) y APGWamida.	86
Figura 25.- Alineamiento parcial de la secuencia de ácidos nucléicos de los precursores de las familias HAC/HCP y APGWamida.	88
Figura 26.- Identificación de los sitios potenciales para el procesamiento del preRNAm del precursor de la HCP.	89

Tablas

Tabla 1.- Miembros de la familia Hormona Adipocínética / Hormona Concentradora de pigmentos y APGWamida.	9
Tabla 2.- Secuencia de aminoácidos consenso de la familia Hormona Concentradora de Pigmentos / Hormona Adipocínética.	12
Tabla 3.- Valores del análisis de Cosinor de la concentración del RNA total, del RNAm, de la G3PDH, de la beta-Actina, de la HCP y del RNAr 18S en el tallo ocular de los acociles acondicionados a ciclos de luz-oscuridad (12:12 h) y 4 meses de oscuridad constante.	69

Resumen

Desde el punto de vista molecular, la hormona concentradora de pigmentos (HCP), pertenece a la familia hormona adipocinética/hormona concentradora de pigmentos (HAC/HCP) de la cual no se conocen sus relaciones evolutivas.

En el acocil la concentración protéica del precursor de la HCP presenta un ritmo circadiano en periodos de luz-oscuridad y en oscuridad constante. No se ha determinado si estos cambios ocurren también en su RNAm. Por ello, mediante la técnica de RACE fueron clonados los cDNAs de la HCP, de la beta actina y de la G3PDH del pedúnculo ocular del acocil *Cherax quadricarinatus*. Por RT-PCR semicuantitativa se determinó que la concentración del RNAm de la HCP en ciclos de luz-oscuridad fué unimodal con un máximo a las 14.00 h. El ritmo de expresión cambió a bimodal a lo largo de cuatro meses de oscuridad constante; el segundo pico de expresión fué a las 20.00 h del día. La concentración del RNAm de la G3PDH y del RNA total fué multimodal en ciclos de luz-oscuridad y unimodal en oscuridad constante para G3PDH mientras que el RNA total presentó un desfase de 3 H con respecto al ciclo de luz-oscuridad. La concentración del RNAr 18S fué unimodal en ciclos de luz-oscuridad.

La posible relación evolutiva entre los genes HCP y HAC se estableció mediante un modelo de pérdida de nucleótidos en diferentes regiones del precursor de la APGWamida de los moluscos. Se demostró que el gen de la APGWamida pudo originar al gen de la HCP.

Abstract

The red pigment concentrating hormone (PCH) is a member of the adipokinetic/pigment concentrating hormone (AKH/PCH). Its evolutionary relationships are not known.

In the crayfish, the protein concentration of the PCH precursor is present in circadian rhythms on light-dark schedules and constant darkness. However, it has not been determined if these changes occur also in the PCH mRNA. To this end, the cDNAs of PCH, beta-actin and G3PDH of the eyestalk of the red claw crayfish *Cherax quadricarinatus* were cloned by means of RACE. Semiquantitative RT-PCR showed that the rhythm of PCH mRNA concentration in light-dark periods were unimodal with a maximum concentration at 14.00 h. The rhythm changed to bimodal in periods of four months of constant darkness.

The G3PDH mRNA and total RNA concentration had multimodal rhythms in light-dark schedules. In constant darkness the G3PDH rhythm was unimodal, while the total RNA rhythm continued to be multimodal with a phase difference of 3 h when compared to the light-dark cycle. rRNA 18S was unimodal in light-dark cycles.

A possible evolutionary relationship among the PCH and AKH genes was established with a model of nucleotide losses in several regions of the APGWamide precursor of the mollusk. It was demonstrated that the APGWamide gene could have originated from the PCH gene.

Introducción.

La Hormona Concentradora de Pigmentos (HCP) es un neuropéptido de los crustáceos que controla; la agregación del pigmento distal en la retina y la concentración de los pigmentos en los cromatóforos (Fernlund y Josefson, 1972). Esta formada por 8 aminoácidos cuya secuencia es pGlu-Leu-Asp-Fen-Ser-Pro-Gli-Tri-NH₂. La HCP presenta identidad en las posiciones 1, 4, 7 y 8, además de una alta homología en el resto de las posiciones con un neuropéptido de insectos constituido por ocho a once aminoácidos llamado Hormona Adipocinética (HAC) encargada de regular la oxidación de los lípidos y de los carbohidratos (Gade, 1997).

Estudios fisiológicos de la HCP y de la HAC han demostrado que al inyectar a la HAC a los crustáceos, ocurre la concentración de los pigmentos en los cromatóforos. Así mismo, la HCP puede producir hipoglucemia cuando se aplica de la misma forma a los insectos (Dallman *et al.*, 1991; Van Norstrand *et al.*, 1980; Mordue y Stone, 1977; Mordue y Stone, 1976). Lo anterior ha sugerido que los receptores a estos péptidos reconocen una estructura muy similar que pudiese explicar esta respuesta fisiológica cruzada. Por lo anterior se postuló que la HCP y la HAC pudiesen tener el mismo origen evolutivo mientras que los receptores de su órgano blanco presentaron una evolución independiente (Mordue y Stone 1976, Martínez-Pérez *et al.*, 2002).

Actualmente, en base a la homología que tienen las secuencias de ácidos nucleicos y de los aminoácidos de la HCP y de las HAC, por sus propiedades bioquímicas y moleculares; así como por los efectos fisiológicos inter especies que presentan, se les agrupado en una sola familia de neuropéptidos de invertebrados que forma coloquial es denominada: “Familia Hormona Adipocinética / Hormona Concentradora de Pigmentos” (HAC/HCP). De la cual la HCP es exclusiva de crustáceos y concomitantemente la HAC únicamente se ha encontrado en los insectos (Martínez-Pérez *et al.*, 2002; Gade *et al.*, 1997; Dallman *et al.*, 1991; Mordue y Stone 1976).

En los insectos, la biosíntesis de la HAC ocurre en el cuerpo cardiaco (CC) (Gade, 1997; O'Shea y Rayne, 1992) y la HCP se da principalmente en las neuronas neuroendócrinas que forman al complejo órgano X glándula sinusal (COXGS) de los crustáceos (Rodríguez-Sosa *et al.*, 1994). Al igual que otros neuropéptidos, la HAC y la HCP se sintetizan a partir de la transcripción de los genes correspondientes. El RNAm se traduce en un precursor protéico llamado prepropéptido el cual presenta en el extremo amino terminal la señal que dirige su traducción vía retículo endoplásmico rugoso. Posteriormente el propéptido se modifica en las cisternas del aparato de Golgi y es transportado al axón por medio de vesículas que contienen a las enzimas que realizan la proteólisis y las que modifican los extremos amino y carboxilo terminales. Por último, en la terminal axónica, el neuropéptido activo se libera al espacio extracelular (Kriger *et al.*, 1983).

El estudio molecular de la HCP y de la HAC es interesante por diferentes razones. Primero, la homología que tienen los péptidos de esta familia brinda una excelente oportunidad para investigar la evolución de neuropéptidos. Segundo, actualmente se cuenta con un modelo que permite tener en cultivo neuronas del COXGS del acocil, lo que permite estudiar la posible biosíntesis de esta hormona y de que manera ocurre su liberación al espacio extracelular (Alvarado-Alvarez *et al.*, 1999). Por último, se han determinado diferentes procesos fisiológicos que son regulados por la HCP; por ejemplo, la liberación de la HCP regula la actividad de otras neuronas (Dickinson *et al.*, 1993) así como la de las células cardiacas, del intestino y del músculo esquelético (Sherff *et al.*, 1995; Nusbaum *et al.*, 1988). Se ha demostrado en los crustáceos la participación de la HCP en la pigmentación de los eritróforos y del pigmento distal de la retina (Aréchiga *et al.*, 1993). Al respecto, diversos estudios han sugerido que el movimiento de pigmentos producido por la HCP está regulado por un ritmo circadiano (García y Aréchiga, 1998; Rodríguez-Sosa *et al.*, 1994), pero aún no se ha determinado cuales son los elementos moleculares necesarios para producir la oscilación.

Se han propuesto cinco criterios para considerar que una molécula esté controlada por un ritmo circadiano en el núcleo supraquiasmático de los mamíferos, a saber: A) debe ser secretada; B) su producción y/o liberación debe ser controlada por los genes reloj que codifican para las proteínas que componen al reloj biológico; C) la producción y/o liberación de la molécula de salida debe responder a un entrenamiento por luz; D) el receptor de la molécula de salida puede estar en el núcleo supraquiasmático o en otras áreas del organismo; E) la administración de la molécula de salida pudiera dar como resultado cambios en el ritmo circadiano (Cheng *et al.*, 2002). Si tomamos los criterios anteriores como una directriz para clasificar a la HCP como una molécula que forma parte de un sistema circadiano en los crustáceos, encontraremos que se han realizado estudios que pudieran cumplir con algunos de estos criterios anteriores: A) por inmunohistoquímica se han identificado que algunas las neuronas del COXGS que presentan HCP (Rodríguez-Sosa *et al.*, 1994; Alvarado-Alvarez *et al.*, 1999; Aréchiga *et al.*, 1993); B) se ha demostrado que el contenido de la HCP en el tallo ocular, su liberación y su actividad eléctrica en las neuronas del COXGS presentan un comportamiento de ritmo circadiano (Uribe *et al.*, 1998; Rodríguez-Sosa *et al.*, 1994); C) se ha propuesto que la HCP tenga la función de neurotransmisor o de neuromodulador, ya que se ha encontrado actividad fisiológica en otros tejidos del acocil (Dickinson *et al.*, 1993; Sherff *et al.*, 1991; Nusbaum *et al.*, 1988). Por lo anterior y para demostrar que la HCP es una molécula que participa en un ritmo circadiano se necesita completar los criterios antes mencionados, que incluye: A) la cuantificación de la cantidad del RNAm de la HCP en ciclos circadianos de luz-oscuridad; B) la determinación de que el promotor del gen que transcribe para el precursor de la HCP tiene los elementos necesarios presentes en los genes reloj y genes regulados por genes reloj para un ritmo circadiano (Muñoz y Baler 2003; Panda *et al.*, 2002); C) la localización de las neuronas del COXGS que expresan al RNAm de la HCP.

Para cumplir los objetivos anteriores es necesario disponer de una herramienta molecular que permita detectar y cuantificar al RNAm del precursor de la HCP en el acocil. Por lo que se requiere

conocer la secuencia de ácidos nucleicos, y concomitantemente de aminoácidos, del precursor de la HCP ya sea en forma genómica o en forma de cDNA.

En el acocil se desconoce la secuencia de nucleótidos del precursor de la HCP. Las principales limitantes para su clonación son: A) no se ha determinado la secuencia de aminoácidos del péptido activo de la HCP en el acocil. Únicamente se ha clonado el precursor de la HCP en los cangrejos *Carcinus maenas* y *Callinectes sapidus* (Linck *et al.*, 1993; Klein *et al.*, 1995); B) por la degeneración que presentan los codones que codifican para cada aminoácido de la HCP de los cangrejos, se tiene 1.2×10^8 posibilidades para obtener la secuencia de los codones que traducen para la HCP; C) se ha determinado, por inmunohistoquímica, que la HCP se localiza en un grupo de 10 a 14 neuronas del tallo ocular (Linck *et al.*, 1993; Alvarado-Alvarez *et al.*, 1999; Rodríguez-Sosa *et al.*, 1994), por lo que se requiere gran cantidad de tejido para hacer un banco de cDNA; D) no se ha desarrollado una metodología eficiente de extracción para los ácidos nucleicos del tallo ocular del acocil; E) se desconoce si la transcripción del RNAm precursor de la HCP es constitutiva o no; F) a pesar de que la HCP está evolutivamente relacionada a la familia de la Hormona Adipocinética de insectos, de la cual se han clonado 10 cDNAs para los precursores protéicos de 5 especies, entre los genes de los miembros de esa familia se sabe que existe un movimiento de intrones (Martínez-Pérez *et al.*, 2002), por lo que se ha propuesto que la estructura del gen de la HCP en el acocil pudiera ser diferente a la del cangrejo o de los insectos (Martínez-Pérez *et al.*, 2002).

En este trabajo se presenta la clonación y la caracterización del cDNA de la HCP en el tallo ocular del acocil *Cherax quadricarinatus*. Se logró por primera vez determinar que el cDNA de la HCP se expresa en el pedúnculo ocular y no en otros tejidos. Además se demuestra que la HCP tiene cambios rítmicos en la concentración de su cDNA en ciclos de 12 h de luz-oscuridad y de oscuridad constante. También se incluye la caracterización y cuantificación de los cDNAs de los genes constitutivos de la beta Actina y de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa y del cDNA del RNA ribosomal 18S, los

cuales sirvieron como controles internos para comparar los cambios en la concentración de cDNA de la HCP.

Por ultimo para tratar de establecer el posible origen de la familia de la hormona concentradora de pigmentos de crustáceos y de la hormona adipocinética de insectos, se desarrollo, junto con la secuencia del precursor de la HCP del acocil, un modelo evolutivo de origen de genes por pérdida y ganancia de DNA. Según este modelo, el precursor del nueropéptido APGWamida de los moluscos, o de un posible gen ancestral, la HCP y la HAC pudieron originarse por perdida de DNA en el gen original.

Miembros de la familia Hormona Adipocinética/Hormona Concentradora de Pigmentos (HAC/HCP).

La secuencia de aminoácidos determinada, del primer miembro de la familia HAC/HCP fue la de la HCP del langostino *Leander adpersus* (Fernlund y Josefson, 1972) y cuatro años después se caracterizó la HAC de la langosta *Locusta sp.* (Stone *et al.*, 1976). Actualmente, la familia está compuesta por péptidos de 8 a 11 aminoácidos con los extremos amino y carboxilo terminales modificados (Tabla 1).

Se ha propuesto que la familia HAC/HCP pudiese estar presente en otros invertebrados, ya que se ha demostrado la presencia de un péptido, no secuenciado, estructuralmente relacionado a la familia HAC/HCP en el nemátodo *Panagrellus redivivus* (Davenport *et al.*, 1991). Adicionalmente en los moluscos existe el tetrapéptido APGWamida cuyos últimos tres aminoácidos y el extremo carboxilo terminal es idéntico a los tres últimos residuos de la HCP, de la Taa-HAC y de la Psi-HAC de los ordenes *Decapoda*, *Diptera* y *Odonata* respectivamente, y a las posiciones 6-9 de la Lem-HrTH del orden *Blattaria* (Tabla 1).

Actualmente se conoce la secuencia de aminoácidos de 32 miembros de la familia HAC/HCP distribuidos en 77 especies. De ellas, La HCP se encuentra en la clase *Malacostraca* y recientemente en el insecto *Nezara viridula* en el cual se desconoce su función (Gade *et al.*, 2003). En la clase *Insecta* 31 HACs pueden ser octa, nona, deca y undecapéptidos. Su distribución con respecto al número de aminoácidos, es muy variada ya que una especie puede presentar una HAC, mientras que en otras se puede tener combinaciones de: 8-8, 8-10, 9-10, 10-10 y 8-8-10 aminoácidos. (Tabla 1).

Los órdenes *Mantodea*, *Isoptera*, *Odonata* y *Phasmatodea* presentan dos HAC, una en forma de octapéptido y la otra de decapeptido. Solamente en el orden *Lepidoptera* se encuentran especies que

Miembros de la familia Hormona Adipocinética / Hormona Concentradora de pigmentos y APGWamida.

*Péptido	Organismo	Orden	Secuencia	Tamaño	Referencia	
APGWamid	<i>Mytilus edulis</i>	<i>Mytiloidea</i>	<u>Ala-Pro-Gli-Tri-NH₂</u>	4	Fabrel <i>et al.</i> , 1996	
	<i>Aplysia californica</i>	<i>Anaspidea</i>	<u>Ala-Pro-Gli-Tri-NH₂</u>	4	Fan <i>et al.</i> , 1997	
	<i>Lymnaea stagnalis</i>	<i>Basommatophera</i>	<u>Ala-Pro-Gli-Tri-NH₂</u>	4	Smith <i>et al.</i> , 1992	
	<i>Fusinus ferrugineus</i>	<i>Neogastropoda</i>	<u>Ala-Pro-Gli-Tri-NH₂</u>	4	Kuroki <i>et al.</i> , 1990	
RPCH	<i>Leander adpersus</i>	<i>Decapoda</i>	pGlu-Leu-Asp-Fen-Ser- <u>Pro-Gli-Tri-NH₂</u>	8	Carlsen <i>et al.</i> , 1976	
	<i>Pandalus borealis</i>	<i>Decapoda</i>	pGlu-Leu-Asp-Fen-Ser- <u>Pro-Gli-Tri-NH₂</u>	8	Fernlund y Josefsson 1972	
	<i>Carcinus maenas</i>	<i>Decapoda</i>	pGlu-Leu-Asp-Fen-Ser- <u>Pro-Gli-Tri-NH₂</u>	8	Link <i>et al.</i> , 1992	
	<i>Callinectes sapidus</i>	<i>Decapoda</i>	pGlu-Leu-Asp-Fen-Ser- <u>Pro-Gli-Tri-NH₂</u>	8	Klein <i>et al.</i> , 1995	
	<i>Penaeus japonicus</i>	<i>Decapoda</i>	pGlu-Leu-Asp-Fen-Ser- <u>Pro-Gli-Tri-NH₂</u>	8	Yang <i>et al.</i> , 1999	
	<i>Cancer magister</i>	<i>Decapoda</i>	pGlu-Leu-Asp-Fen-Ser- <u>Pro-Gli-Tri-NH₂</u>	8	Gaus <i>et al.</i> , 1990	
Psi-AKH	<i>Orconectes limosus</i>	<i>Decapoda</i>	pGlu-Leu-Asp-Fen-Ser- <u>Pro-Gli-Tri-NH₂</u>	8	Gaus <i>et al.</i> , 1990	
	<i>Nezara viridula</i>	<i>Hemiptera</i>	pGlu-Leu-Asp-Fen-Ser- <u>Pro-Gli-Tri-NH₂</u>	8	Gade <i>et al.</i> , 2003	
Lia-AKH	<i>Aeshna subpupillata</i>	<i>Odonata</i>	pGlu-Val-Asp-Fen-Tre- <u>Pro-Gli-Tri-NH₂</u>	8	Gade <i>et al.</i> , 1997	
	<i>Pseudagrion inconspicuum</i>	<i>Odonata</i>	pGlu-Val-Asp-Fen-Tre- <u>Pro-Gli-Tri-NH₂</u>	8	Gade <i>et al.</i> , 1997	
Ani-AKH	<i>Ischnura senegalensis</i>	<i>Odonata</i>	pGlu-Val-Asp-Fen-Tre- <u>Pro-Gli-Tri-NH₂</u>	8	Gade <i>et al.</i> , 1997	
	<i>Libellula auripennis</i>	<i>Odonata</i>	pGlu-Val-Asp-Fen-Tre-Pro-Ser-Tri-NH ₂	8	Gade <i>et al.</i> , 1997	
Lem-HrTH	<i>Ceratogomphus pictus</i>	<i>Odonata</i>	pGlu-Val-Asp-Fen-Tre-Pro-Ser-Tri-NH ₂	8	Gade <i>et al.</i> , 1997	
	<i>Pantala flavescens</i>	<i>Odonata</i>	pGlu-Val-Asp-Fen-Tre-Pro-Ser-Tri-NH ₂	8	Gade <i>et al.</i> , 1997	
Lom-AKH-I	<i>Anotogaster sieboldii</i>	<i>Odonata</i>	pGlu-Val-Asp-Fen-Ser-Pro-Ser-Tri-NH ₂	8	Gade <i>et al.</i> , 1997	
	<i>Anax imperator</i>	<i>Odonata</i>	pGlu-Val-Asp-Fen-Ser-Pro-Ser-Tri-NH ₂	8	Gade <i>et al.</i> , 1997	
Pya-AKH	<i>Nauphoeta cinera</i>	<i>Balattaria</i>	pGlu-Val-Asp-Fen-Ser- <u>Pro-Gli-Tri-Gli-Tre-NH₂</u>	10	Gade <i>et al.</i> , 1997	
	<i>Leucophaea maderae</i>	<i>Balattaria</i>	pGlu-Val-Asp-Fen-Ser- <u>Pro-Gli-Tri-Gli-Tre-NH₂</u>	10	Gade <i>et al.</i> , 1997	
	<i>Gromphadorhina portentosa</i>	<i>Balattaria</i>	pGlu-Val-Asp-Fen-Ser- <u>Pro-Gli-Tri-Gli-Tre-NH₂</u>	10	Gade <i>et al.</i> , 1997	
	<i>Blattella germanica</i>	<i>Balattaria</i>	pGlu-Val-Asp-Fen-Ser- <u>Pro-Gli-Tri-Gli-Tre-NH₂</u>	10	Gade <i>et al.</i> , 1997	
	* <i>Blaberus discoidalis</i>	<i>Balattaria</i>	pGlu-Val-Asp-Fen-Ser- <u>Pro-Gli-Tri-Gli-Tre-NH₂</u>	10	Gade <i>et al.</i> , 1997	
	* <i>Blaberus discoidalis</i>	<i>Balattaria</i>	pGlu-Leu-Asp-Fen-Tre-Pro-Asp-Tri-Gli-Tre-NH ₂	10	Gade <i>et al.</i> , 1997	
	* <i>Polyphaga aegyptiaca</i>	<i>Blattaria</i>	pGlu-Ile-Tre-Fen-Tre-Pro-Asp-Tri-NH ₂	8	Gade <i>et al.</i> , 1997	
	* <i>Polyphaga aegyptiaca</i>	<i>Blattaria</i>	pGlu-Leu-Asp-Fen-Ser-Pro-Asp-Tri-NH ₂	8	Gade <i>et al.</i> , 1997	
	* <i>Periplaneta americana</i>	<i>Blattaria</i>	pGlu-Val-Asp-Fen-Ser-Pro-Asp-Tri-NH ₂	8	Gade <i>et al.</i> , 1997	
	* <i>Periplaneta americana</i>	<i>Blattaria</i>	pGlu-Val-Asp-Fen-Tre-Pro-Asp-Tri-NH ₂	8	Gade <i>et al.</i> , 1997	
	* <i>Blatta orientalis</i>	<i>Balattaria</i>	pGlu-Val-Asp-Fen-Ser-Pro-Asp-Tri-NH ₂	8	Gade <i>et al.</i> , 1997	
	* <i>Blatta orientalis</i>	<i>Balattaria</i>	pGlu-Leu-Tre-Fen-Tre-Pro-Asp-Tri-NH ₂	8	Gade <i>et al.</i> , 1997	
	Mesp-AKH	<i>Pyrrhocoris apterus</i>	<i>Hemiptera</i>	pGlu-Leu-Asp-Fen-Tre-Pro-Asp-Tri-NH ₂	8	Kodrik <i>et al.</i> , 2000
		<i>Magicicada sp.</i>	<i>Hemiptera</i>	pGlu-Leu-Asp-Fen-Tre-Pro-Asp-Tri-NH ₂	8	Gade <i>et al.</i> , 1997
		<i>Diceroprocta semicincta</i>	<i>Hemiptera</i>	pGlu-Leu-Asp-Fen-Tre-Pro-Asp-Tri-NH ₂	8	Gade <i>et al.</i> , 1997
		<i>Cacama valavata</i>	<i>Hemiptera</i>	pGlu-Val-Asp-Fen-Ser-Pro-Ser-Tri-Gli-Asp-NH ₂	10	Gade <i>et al.</i> , 1997
<i>Platypleura capensis</i>		<i>Hemiptera</i>	pGlu-Val-Asp-Fen-Ser-Pro-Ser-Tri-Gli-Asp-NH ₂	10	Gade <i>et al.</i> , 1997	
Bom-AKH	<i>Munza trimeni</i>	<i>Hemiptera</i>	pGlu-Val-Asp-Fen-Ser-Pro-Ser-Tri-Gli-Asp-NH ₂	10	Gade <i>et al.</i> , 1997	
	<i>Bombyx mori</i>	<i>Lepidoptera</i>	pGlu-Leu-Tre-Fen-Tre-Ser-Ser-Tri-NH ₂	8	Gade <i>et al.</i> , 1997	
Emp-AKH	<i>Empusa pennata</i>	<i>Lepidoptera</i>	pGlu-Val-Asp-Fen-Tre-Pro-Asp-Tri-NH ₂	8	Gade <i>et al.</i> , 1997	
	<i>Manduca sexta</i>	<i>Lepidoptera</i>	pGlu-Leu-Tre-Fen-Tre-Ser-Ser-Tri-NH ₂	8	Gade <i>et al.</i> , 1997	
Hez-HrTH	<i>Heliothis zea</i>	<i>Lepidoptera</i>	pGlu-Leu-Tre-Fen-Ser-Ser-Gli-Tri-Gli-Asp-NH ₂	10	Gade <i>et al.</i> , 1997	
	<i>Vanessa cardui</i>	<i>Lepidoptera</i>	pGlu-Leu-Tre-Fen-Tre-Ser-Ser-Tri-Gli-Gli-Lys-NH ₂	11	Kollisch <i>et al.</i> , 2000	
Emp-AKH	<i>Sphodromantis sp.</i>	<i>Mantodea</i>	pGlu-Val-Asp-Fen-Tre-Pro-Asp-Tri-NH ₂	8	Gade <i>et al.</i> , 1997	
Cum-HrTH-I	<i>Carausius morosus</i>	<i>Phasmatodea</i>	pGlu-Leu-Tre-Fen-Tre-Pro-Asp-Tri-Gli-Tre-NH ₂	10	Gade <i>et al.</i> , 1997	
	<i>Sipyloidea sipyulus</i>	<i>Phasmatodea</i>	pGlu-Leu-Tre-Fen-Tre-Pro-Asp-Tri-Gli-Tre-NH ₂	10	Gade <i>et al.</i> , 1997	
	<i>Extatosoma tiaratum</i>	<i>Phasmatodea</i>	pGlu-Leu-Tre-Fen-Tre-Pro-Asp-Tri-Gli-Tre-NH ₂	10	Gade <i>et al.</i> , 1997	
Pea-CAH-I	<i>Mastotermes darwiniensis</i>	<i>Isoptera</i>	pGlu-Val-Asp-Fen-Ser-Pro-Asp-Tri-NH ₂	8	Gade <i>et al.</i> , 1997	
	<i>Trinervitermes trimervoides</i>	<i>Isoptera</i>	pGlu-Val-Asp-Fen-Ser-Pro-Asp-Tri-NH ₂	8	Gade <i>et al.</i> , 1997	
Miv-CC	<i>Microhodotermes viator</i>	<i>Isoptera</i>	pGlu-Ile-Asp-Fen-Tre-Pro-Asp-Tri-NH ₂	8	Liebrich <i>et al.</i> , 1995	
Taa-AKH	* <i>Tabanus atratus</i>	<i>Diptera</i>	pGlu-Leu-Tre-Fen-Tre-Pro-Gli-Tri-NH ₂	8	Gade <i>et al.</i> , 1997	
	* <i>Tabanus atratus</i>	<i>Diptera</i>	pGlu-Leu-Tre-Fen-Tre-Pro-Gli-Tri-Gli-Tri-NH ₂	10	Gade <i>et al.</i> , 1997	
Pht-HrTH	<i>Protophormia terraenovae</i>	<i>Diptera</i>	pGlu-Leu-Tre-Fen-Ser-Pro-Asp-Tri-NH ₂	8	Gade <i>et al.</i> , 1997	
	<i>Drosophila melanogaster</i>	<i>Diptera</i>	pGlu-Leu-Tre-Fen-Ser-Pro-Asp-Tri-NH ₂	8	Gade <i>et al.</i> , 1997	
Grb-AKH	<i>Gryllus bimaculatus</i>	<i>Orthoptera</i>	pGlu-Val-Asp-Fen-Ser-Tre-Gli-Tri-NH ₂	8	Gade <i>et al.</i> , 1997	
	<i>Acheta domestica</i>	<i>Orthoptera</i>	pGlu-Val-Asp-Fen-Ser-Tre-Gli-Tri-NH ₂	8	Gade <i>et al.</i> , 1997	
	<i>Grylodes sigillatus</i>	<i>Orthoptera</i>	pGlu-Val-Asp-Fen-Ser-Tre-Gli-Tri-NH ₂	8	Gade <i>et al.</i> , 1997	
Scg-AKH-II	<i>Libaniasidus vittatus</i>	<i>Orthoptera</i>	pGlu-Leu-Asp-Fen-Ser-Tre-Gli-Tri-NH ₂	8	Gade <i>et al.</i> , 1997	

Shg-AKH-II	<i>Heterodes namaqua</i>	<i>Orthoptera</i>	pGlu-Leu-Asp-Fen-Ser-Tre-Gli-Tri-NH ₂	8	Gade <i>et al.</i> , 1997
Shg-AKH-II	<i>Acanthoproctus cervinus</i>	<i>Orthoptera</i>	pGlu-Leu-Asp-Fen-Ser-Tre-Gli-Tri-NH ₂	8	Gade <i>et al.</i> , 1997
Shg-AKH-II	<i>Anabrus simplex</i>	<i>Orthoptera</i>	pGlu-Leu-Asp-Fen-Ser-Tre-Gli-Tri-NH ₂	8	Gade <i>et al.</i> , 1997
Lom-AKH-I	<i>Melanopus sanguinipes</i>	<i>Orthoptera</i>	pGlu-Leu-Asp-Fen-Tre-Pro-Asp-Tri-Gli-Tre-NH ₂	10	Taub-Montemayor <i>et al.</i> , 1997
Grb-AKH	* <i>Romalea microptera</i>	<i>Orthoptera</i>	pGlu-Val-Asp-Fen-Ser-Tre-Gli-Tri-NH ₂	8	Gade <i>et al.</i> , 1997
Rom-CC-I	* <i>Romalea microptera</i>	<i>Orthoptera</i>	pGlu-Val-Asp-Fen-Tre-Pro-Asp-Tri-Gli-Tre-NH ₂	10	Gade <i>et al.</i> , 1997
Shg-AKH-II	* <i>Schistocerca gregaria</i>	<i>Orthoptera</i>	pGlu-Leu-Asp-Fen-Ser-Tre-Gli-Tri-NH ₂	8	Gade <i>et al.</i> , 1997
Lom-AKH-I	* <i>Schistocerca gregaria</i>	<i>Orthoptera</i>	pGlu-Leu-Asp-Fen-Tre-Pro-Asp-Tri-Gli-Tre-NH ₂	10	Gade <i>et al.</i> , 1997
Shg-AKH-II	* <i>Schistocerca nitans</i>	<i>Orthoptera</i>	pGlu-Leu-Asp-Fen-Ser-Tre-Gli-Tri-NH ₂	8	Gade <i>et al.</i> , 1997
Lom-AKH-I	* <i>Schistocerca nitans</i>	<i>Orthoptera</i>	pGlu-Leu-Asp-Fen-Tre-Pro-Asp-Tri-Gli-Tre-NH ₂	10	Gade <i>et al.</i> , 1997
Shg-AKH-II	* <i>Phymatteus leprosus</i>	<i>Orthoptera</i>	pGlu-Leu-Asp-Fen-Ser-Tre-Gli-Tri-NH ₂	8	Gade <i>et al.</i> , 1997
Phi-AKH	* <i>Phymatteus leprosus</i>	<i>Orthoptera</i>	pGlu-Leu-Tre-Fen-Tre-Pro-Asp-Tri-Gli-Ser-NH ₂	10	Gade <i>et al.</i> , 1997
Shg-AKH-II	* <i>Phymatteus morbillosus</i>	<i>Orthoptera</i>	pGlu-Leu-Asp-Fen-Ser-Tre-Gli-Tri-NH ₂	8	Gade <i>et al.</i> , 1997
Pmo-AKH	* <i>Phymatteus morbillosus</i>	<i>Orthoptera</i>	pGlu-Leu-Asp-Fen-Tre-Pro-Asp-Tri-Gli-Ser-NH ₂	10	Gade <i>et al.</i> , 1997
Lom-AKH-II	** <i>Locusta migratoria</i>	<i>Orthoptera</i>	pGlu-Leu-Asp-Fen-Ser-Ala-Gli-Tri-NH ₂	8	Gade <i>et al.</i> , 1997
Lom-AKH-III	** <i>Locusta migratoria</i>	<i>Orthoptera</i>	pGlu-Leu-Asp-Fen-Tre-Pro-Tri-Tri-NH ₂	8	Gade <i>et al.</i> , 1997
Lom-AKH-I	** <i>Locusta migratoria</i>	<i>Orthoptera</i>	pGlu-Leu-Asp-Fen-Tre-Pro-Asp-Tri-Gli-Tre-NH ₂	8	Gade <i>et al.</i> , 1997
Pea-CAH-I	* <i>Leptinotarsa decemlineata</i>	<i>Coleoptera</i>	pGlu-Val-Asp-Fen-Ser-Pro-Asp-Tri-NH ₂	8	Gade <i>et al.</i> , 1997
Pea-CAH-II	* <i>Leptinotarsa decemlineata</i>	<i>Coleoptera</i>	pGlu-Leu-Tre-Fen-Tre-Pro-Asp-Tri-NH ₂	8	Gade <i>et al.</i> , 1997
Tem-HrTH	* <i>Decapotoma lunata</i>	<i>Coleoptera</i>	pGlu-Leu-Asp-Fen-Ser-Pro-Asp-Tri-NH ₂	8	Gade <i>et al.</i> , 1997
Del-CC	* <i>Decapotoma lunata</i>	<i>Coleoptera</i>	pGlu-Val-Asp-Fen-Ser-Pro-Asp-Tri-Gli-Asp-NH ₂	10	Gade <i>et al.</i> , 1997
Scd-CC-I	* <i>Scarabaeus deldunus</i>	<i>Coleoptera</i>	pGlu-Fen-Asp-Tir-Ser-Pro-Asp-Tri-NH ₂	8	Gade <i>et al.</i> , 1997
Scd-CC-II	* <i>Scarabaeus deldunus</i>	<i>Coleoptera</i>	pGlu-Fen-Asp-Tir-Ser-Pro-Val-Tri-NH ₂	8	Gade <i>et al.</i> , 1997
Scd-CC-I	* <i>Gareta nitens</i>	<i>Coleoptera</i>	pGlu-Fen-Asp-Tir-Ser-Pro-Asp-Tri-NH ₂	8	Gade <i>et al.</i> , 1997
Scd-CC-II	* <i>Gareta nitens</i>	<i>Coleoptera</i>	pGlu-Fen-Asp-Tir-Ser-Pro-Val-Tri-NH ₂	8	Gade <i>et al.</i> , 1997
Scd-CC-I	* <i>Onitis aygulus</i>	<i>Coleoptera</i>	pGlu-Fen-Asp-Tir-Ser-Pro-Asp-Tri-NH ₂	8	Gade <i>et al.</i> , 1997
Ona-CC	* <i>Onitis aygulus</i>	<i>Coleoptera</i>	pGlu-Tir-Asp-Fen-Ser-Tre-Gli-Tri-NH ₂	8	Gade <i>et al.</i> , 1997
Scd-CC-I	* <i>Onitis pecuarius</i>	<i>Coleoptera</i>	pGlu-Fen-Asp-Tir-Ser-Pro-Asp-Tri-NH ₂	8	Gade <i>et al.</i> , 1997
Ona-CC	* <i>Onitis precarius</i>	<i>Coleoptera</i>	pGlu-Tir-Asp-Fen-Ser-Tre-Gli-Tri-NH ₂	8	Gade <i>et al.</i> , 1997
Tem-HrTH	<i>Tenebrio molitor</i>	<i>Coleoptera</i>	pGlu-Leu-Asp-Fen-Ser-Pro-Asp-Tri-NH ₂	8	Gade <i>et al.</i> , 1997
Tem-HrTH	<i>Zophobas rugipes</i>	<i>Coleoptera</i>	pGlu-Leu-Asp-Fen-Ser-Pro-Asp-Tri-NH ₂	8	Gade <i>et al.</i> , 1997
Tem-HrTH	<i>Onymacris plana</i>	<i>Coleoptera</i>	pGlu-Leu-Asp-Fen-Ser-Pro-Asp-Tri-NH ₂	8	Gade <i>et al.</i> , 1997
Tem-HrTH	<i>Onymacris rugatipennis</i>	<i>Coleoptera</i>	pGlu-Leu-Asp-Fen-Ser-Pro-Asp-Tri-NH ₂	8	Gade <i>et al.</i> , 1997
Tem-HrTH	<i>Physadesmia globosa</i>	<i>Coleoptera</i>	pGlu-Leu-Asp-Fen-Ser-Pro-Asp-Tri-NH ₂	8	Gade <i>et al.</i> , 1997
Mem-CC	<i>Melolontha melolontha</i>	<i>Coleoptera</i>	pGlu-Leu-Asp-Fen-Ser-Pro-Asp-Tri-NH ₂	8	Gade <i>et al.</i> , 1997
Mem-CC	<i>Geotrupes stercorosus</i>	<i>Coleoptera</i>	pGlu-Leu-Asp-Fen-Ser-Pro-Asp-Tri-NH ₂	8	Gade <i>et al.</i> , 1997
Mem-CC	<i>Pachmoda marginata</i>	<i>Coleoptera</i>	pGlu-Leu-Asp-Fen-Ser-Pro-Asp-Tri-NH ₂	8	Gade <i>et al.</i> , 1997
Mem-CC	<i>Pachmoda sinuata</i>	<i>Coleoptera</i>	pGlu-Leu-Asp-Tir-Ser-Pro-Asp-Tri-NH ₂	8	Gade <i>et al.</i> , 1997
Mem-CC	<i>Pachmoda aemulae</i>	<i>Coleoptera</i>	pGlu-Leu-Asp-Tir-Ser-Pro-Asp-Tri-NH ₂	8	Gade <i>et al.</i> , 1997
Mem-CC	<i>Trichostetha fascicularis</i>	<i>Coleoptera</i>	pGlu-Leu-Asp-Tir-Ser-Pro-Asp-Tri-NH ₂	8	Gade <i>et al.</i> , 1997
Mem-CC	<i>Trichostetha albopicta</i>	<i>Coleoptera</i>	pGlu-Leu-Asp-Tir-Ser-Pro-Asp-Tri-NH ₂	8	Gade <i>et al.</i> , 1997

Tabla 1.- Secuencia de aminoácidos de los miembros de la Familias Hormona Concentradora de Pigmentos/Hormona Adipocinética y Hormona APGWamida. La primera columna corresponde a la nomenclatura para cada una de las hormonas propuesta por Gade (1997). Los péptidos HCP y HAC que presentan la secuencia de aminoácidos Ala-Pro-Gli-Trp-NH₂ de los moluscos están en negritas y subrayados. Las especies de la clase que tienen más de una HAC se indican con un asterisco.

tienen HAC pueden ser de 8, 9 y 11 aminoácidos. Las especies que presentan dos HAC con el mismo número de aminoácidos, están en los órdenes *Coleoptera* y *Balattaria*, en donde el primero tiene ocho especies con un par de octapéptidos y el segundo tiene dos decapéptidos respectivamente. Cinco especies del orden *Orthoptera* presentan HAC de un octapéptido y un decapéptido y solo una especie en los órdenes *Coleoptera* y *Diptera*. Por último, la única especie de insectos que tiene tres HAC, dos octapéptidos y un decapeptido, es *Locusta migratoria* que pertenece al orden *Orthoptera* (Tabla 1).

En la clase *Malacostraca* el panorama es diferente al de la clase *Insecta*, ya que todas las HCP se son octapéptidos con la misma secuencia de aminoácidos (Keller, 1992). Se conoce la secuencia de aminoácidos de la HCP en los camarones *Pandalus borealis* (Fernlund y Josefsson, 1972) y *Peneus japonicus* (Yang *et al.*, 1999), en los cangrejos *Carcinus maenas* (Gaus *et al.*, 1990) *Callinectes sapidus*, (Klein *et al.*, 1995) y *Cancer magister* y en el acocil *Orconectes limosus* (Gaus *et al.*, 1990) (Tabla 1). Mientras que solamente se ha determinado la composición de aminoácidos de la HCP en los cangrejos *Cardisoma* y *Liocarcinus puber* (Gaus *et al.*, 1990), en las langostas *Nephrops norvegicus* y *Homarus americanus* (Gaus *et al.*, 1990; Jaffe *et al.*, 1984), en los acociles *Pacifastacus leniusculus* (Gaus *et al.*, 1990), *Leander adspersus* (Carlsen *et al.*, 1976) y en el langostino *Palaeamontes pugio*. Debido a la inmunoreactividad del COXGS ante la HCP del acocil *Procambarus clarkii* se ha propuesto que tiene la misma secuencia de aminoácidos de los demás miembros de la HCP (Rodríguez-Sosa *et al.*, 1994; Preciado *et al.*, 1994).

Relación: Posición-función de los aminoácidos que conforman a la familia HAC/HCP.

Con las secuencias de aminoácidos conocidas de las distintas HACs y HCPs se ha propuesto la secuencia consenso, para la familia mostrada en la Tabla 2. Se han realizados diversos estudios para determinar el papel que desempeña cada aminoácido en la estructura secundaria de la HAC y de la HCP. La piroglutamina en la HAC I es necesaria para que el péptido no sea degradado por las aminopeptidasas (Goldsworthy *et al.*, 1997; Ziegler *et al.*, 1997; Lee *et al.*, 1997). Este residuo se conserva en todas las HAC y HCP; sin embargo, se ha demostrado que no es absolutamente esencial para la actividad. Cuando el piroglutamil de la HAC I se elimina o se sustituye por Gli, Ala o Pro se pierde la actividad, pero cuando se bloquea el grupo amino de estos aminoácidos con un acetilo se restablece la actividad biológica.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
32 pGlu	18 Leu 9 Val 2 Ile 2 Fen 1 Tir	22 Asp 10 Tre	29 Fen 3 Tir	16 Ser 16 Tre	25 Pro 3 Tre 3 Ser 1 Ala	15 Asp 10 Gli 5 Ser 1 Val 1 Trp	32 Trp	32 Gli	4 Tre 2 Asp 2 Ser 1 Tir 1 Gli	9 Gli 1 Lys	1 Gli
pGlu	No polar	polar	Fen	Polar	Polar No polar	Variable	Trp	Gli	Polar	Gli	Gli

Tabla 2.- Secuencia de aminoácidos consenso de la familia Hormona Concentradora de Pigmentos / Hormona Adipocinética. El número a la izquierda de cada aminoácido corresponde al número de veces que está en las secuencias.

Lo anterior indica que el grupo amino del aminoácido que ocupe la posición 1 debe estar protegido, como ocurre en la pGlu de la familia HAC/HCP. Se ha sugerido la participación de la piroglutamina en la formación del agrupamiento hidrofóbico de la estructura secundaria ya que cuando se inserta una o dos Gli antes de la Leu² en la HAC I se pierde la actividad (Goldsworthy *et al.*, 1990; Ziegler *et al.*, 1997; Lee *et al.*, 1997).

La posición 2 ha sido relacionada con el establecimiento del núcleo hidrofóbico. En esta posición se encuentran aminoácidos no polares de cadena lateral alifática, principalmente Leu o Val, y con menos frecuencia residuos con cadena lateral aromática como Fen. El carácter no polar de esta posición es necesario para la interacción con los residuos Fen⁴ y Trp⁸. Las posiciones 1, 4 y 8 son las más conservadas. Están ocupadas por aminoácidos que presentan propiedades aromáticas como Fen⁴, Tir⁴ y Trp⁸ respectivamente. Se ha demostrado un aumento en la actividad de concentrar pigmentos mediante la sustitución de la Fen⁴ de la HCP por Tir (Christensen *et al.*, 1978; 1979). Al sustituir la misma posición en la HAC por Ala se produce una pérdida dramática de la actividad la cual comienza a restablece cuando es sustituida con un aminoácido de carácter aromático (Trp). Lo anterior indica que en la posición 4 se requiere una cadena lateral aromática (Valentza *et al.*, 2000; Christensen *et al.*, 1978).

Otro residuo relacionado con la estabilidad de la estructura secundaria es el de la posición 5. La ocupan Ser o Tre, aminoácidos con grupos hidroxilo alifáticos capaces de establecer puentes de hidrógeno. En la HAC I la sustitución de Tre⁵ por Ala y Tre (But) produce una baja considerable de la

actividad biológica lo que ha sugerido que el grupo hidroxilo debe de estar disponible para establecer un puente de hidrógeno intramolecular con el receptor y/o con la señal de transducción (Valentza *et al.*, 2000). Además, se ha propuesto que la baja actividad puede ser debida a que la Ala⁵ no favorece el giro- β en la región 5-8. Esto ha indicado que este giro podría ser un prerequisite para que la HAC-I conserve su actividad biológica (Ziegler *et al.*, 1997; Lee *et al.*, 1996; Valentza *et al.*, 2000).

El aminoácido postulado como mejor candidato para establecer el giro- β tipo 1 es la Pro⁶. Este aminoácido alifático con cadena lateral cíclica, interrumpe la organización habitual de la cadena peptídica y hace que la dirección de la cadena cambie bruscamente. Cuando la posición 6 es ocupada por Ala⁶ en la HAC-I no se permite la formación del giro beta, pero sorpresivamente la pérdida de la actividad es muy baja; hasta ahora se desconoce si el giro beta es un requisito absoluto para la actividad de la HAC (Lee *et al.*, 1996; Christensen *et al.*, 1978).

La posición 7 es hipervariable; puede estar ocupada por aminoácidos polares, no polares y con menos frecuencia, un residuo con carga negativa. Estudios en los cuales se sustituye el residuo de Asp⁷ de la HAC-I por Asp (OBzl) indican que el grupo β -carboxamida del residuo Asp⁷ no es un participante esencial en la formación de un puente de hidrógeno o en la interacción de la HAC-I con el receptor (Lee *et al.*, 1996; Valentza *et al.*, 2000). La carga negativa en la posición 7 de los péptidos modificados los hace totalmente inactivos. Sin embargo se ha encontrado Asp⁷ en las HACs PhT-HrTH de Dípteros y Mem-CC, Scd-CC-I, Scd-CC-I en Coleópteros, lo que sugiere que el receptor para estas HAC es diferente al de las otras HAC (Tabla 2).

Todos los neuropéptidos HAC/HCP descritos hasta ahora presentan triptofano en la posición 8. Se ha demostrado que este residuo es invariable y es esencial para la actividad de estas hormonas. Cuando este es eliminado el péptido es totalmente inactivo y al sustituirlo por otro residuo que difiera notablemente en estructura, y por lo tanto en sus propiedades químicas, genera una pérdida drástica en la

actividad. Por ejemplo cuando el Trp⁸ es sustituido por Ala (Lee *et al.*, 1996; Ziegler *et al.*, 1997; Christensen *et al.*, 1978).

Debido a que la eliminación de Fen⁴ y Trp⁸, o su cambio por aminoácidos con cadena lateral alifática (Ala), producen inactivación o un cambio drástico en la potencia de la HAC/HCP respectivamente, se ha sugerido que en la posición 4 se requiere el anillo fenólico y en la posición 8 el anillo indol. Probablemente la función de estos residuos en la cadena de las hormonas sea la de estabilizar la conformación del giro- β agrupando al grupo hidrofóbico que se forma por la interacción de estos residuos apolares con la Leu² (Valentza *et al.*, 2000).

Se han realizado otros estudios modificando el tamaño y el residuo pGlu de la HCP. Christensen y colaboradores (1979) mostraron que los dipéptidos sintéticos pGlu-Trp-NH₂ y Gli-Trp NH₂ tienen baja actividad para concentrar los pigmentos en el camarón *Leander adspersus*. Cuando emplearon el tetrapéptido pGlu-Pro-Gli-Trp-NH₂ se comenzó a restablecer la actividad biológica. Un aspecto a resaltar en este tipo de estudios es el hecho de que las construcciones empleadas presentan similitud con la secuencia del tetrapéptido APGWamida de los moluscos (Smith *et al.*, 1992; Favrel y Mathieu, 1996; Fan *et al.*, 1997), en donde el cambio está en el primer aminoácido del extremo carboxilo. La actividad de concentrar los pigmentos por los tetrapéptidos utilizados en vez de la HCP sugiere que los péptidos de la familia APGWamida pudieran estar relacionados evolutivamente con los miembros de la familia HAC/HCP.

Por último todos los neuropéptidos de la familia HAC/HCP tienen en el extremo carboxilo una glicina amidada. La eliminación de este residuo tanto en la HCP y en la HAC produce una pérdida drástica de la actividad, demostrando que este residuo es invariable en ambos neuropéptidos (Lee *et al.*, 1996; Ziegler *et al.*, 1997; Christensen *et al.*, 1978).

Precusores de la familia HAC/HCP.

Aún cuando el número de miembros de la familia HAC/HCP es muy alto solamente se conocen los precursores protéicos de dos HCP, la de los cangrejos *Carcinus maenas* (Link *et al.*, 1993) y *Callinectes sapidus* (Klein *et al.*, 1995). En insectos se ha demostrado que hay polimorfismo para la HAC, ya que en los grillos *Shistocerca gregaria* y *Shistocerca nitans* se presentan dos cDNAs del precursor para la HAC I y II (Schulz-Allen *et al.*, 1989; Fisher-Lougheed *et al.*, 1993; Noyes y Schaffer, 1990), mientras que en la langosta *Locusta Migratoria* hay 3 cDNAs (Bogerd *et al.*, 1995). En la cucaracha *Blaberus discoidalis* (Lewis *et al.*, 1997), en la palomilla *Manduca sexta* (Bradfield y Keeley, 1989) y en la mosca *Drosophila melanogaster* (Noyes *et al.*, 1995) solo hay un cDNA para la prohormona.

Por hibridación *in situ* se ha demostrado que en el tallo ocular de *Carcinus maenas* la síntesis del RNAm de la HCP la llevan a cabo dos grupos celulares, uno de veinte células en la medula terminal del órgano X, y otro de tres células en la parte proximal de la medula terminal (Link *et al.*, 1993). Trabajos similares se han realizado para determinar los grupos neuronales que realizan la síntesis de la HAC. Se ha demostrado que en *L. migratoria* los tres RNAm colocalizan en los cuerpos celulares del cuerpo cardíaco (Bogred *et al.*, 1995), y que las tres prohormonas HAC I, HAC II y HAC III están en la misma vesícula (Harthonn *et al.*, 1999).

Todos los precursores de la familia HAC/HCP se traducen a partir de RNAm independientes. En los insectos el cDNA del precursor de la HAC tiene un tamaño promedio de 350 pb, mientras que en los crustáceos el cDNA es de 650 pb en promedio. El marco abierto de lectura (ORF) de la HAC está constituido de 183 a 247 pb, dependiendo de la especie, mientras que en los crustáceos es de 330 pb (Fig. 1). Los ensayos de traducción *in vitro* en el grillo *Shistocerca gregaria* han demostrado que el RNAm de la HAC I produce un prepropéptido de 6.8 kDa. Sin embargo, cuando se bloquea la traducción del RNAm de la HAC II con oligodesoxinucleótidos específicos se obtiene una proteína de

5.7 kDa. Se ha propuesto que la diferencia en el peso molecular se deba a la presencia de un segundo codón de inicio de la traducción, el cual está a 27 pb del sitio de unión al ribosoma. Aún cuando este codón se encuentra en la misma posición en la HAC II de *S. gregaria* (Fig. 1), no se ha demostrado, *in vivo*, que este sitio de inicio de la traducción se utilice (Fischer-Lougheed *et al.*, 1992).

Todas las prohormonas de la familia HAC/HCP tienen una organización idéntica. En el extremo amino del pre-pro-HAC o pre-pro-HCP se encuentra el péptido señal de 19 a 25 aminoácidos hidrofóbicos, el cual dirige la síntesis del prepro péptido al retículo endoplásmico rugoso, a semejanza de

		*	20	*	40	*	60			
HAC2	<i>S. gregaria</i>	:	<i>MRQSC</i>	---	<i>ALTLMLVVAVCAALSAAQ</i>	<i>QLNFSTGWG</i>	-----	<i>RRYADPNA</i>	: 39	
HAC2	<i>S. nitans</i>	:	<i>MRQGC</i>	---	<i>ALTLMLLVVVCAALSAAQ</i>	<i>QLNFSTGWG</i>	-----	<i>RRYADPNA</i>	: 39	
HAC2	<i>L. migratoria</i>	:	<i>MTQSC</i>	---	<i>TLTLVLVVAVLAAALATAQ</i>	<i>LNFSAGWG</i>	-----	<i>RRYADPNA</i>	: 39	
HAC	<i>S. gregaria</i>	:	<i>MVQRC</i>	---	<i>LVVALLVVVVAAALCSA</i>	<i>QLNFTPNWGT</i>	-----	<i>GKRDAADFG</i>	: 41	
HAC	<i>S. nitans</i>	:	<i>MVQRC</i>	---	<i>LVVALLVVVVAAALCSA</i>	<i>QLNFTPNWGT</i>	-----	<i>GKRDAADYG</i>	: 41	
HAC	<i>L. migratoria</i>	:	<i>MVQRC</i>	---	<i>ALVLLVVAVAAALCSA</i>	<i>QLNFTPNWGT</i>	-----	<i>GKRDAADFA</i>	: 41	
HAC	<i>B. discoidalis</i>	:	<i>MNHLV</i>	---	<i>KVLIVVVAIALVLC</i>	<i>EAQVNFSPGWG</i>	-----	<i>TGKRSAVQNSPCKGSA</i>	: 46	
HAC	<i>D. melanogaster</i>	:	<i>MNPKS</i>	---	<i>EVLIAAVLFMLLACVQC</i>	<i>QLTFSPDWG</i>	<i>KRSVGGAGPGTFFETQQGNCKTSN</i>	---	: 55	
HAC3	<i>L. migratoria</i>	:	<i>MQVRA</i>	---	<i>VLVLAVVALVAVATSR</i>	<i>QLNFTPWWG</i>	-----	<i>KRALGAPAAGDCVSASP</i>	: 48	
HCP	<i>C. maenans</i>	:	<i>MVRR</i>	<i>TGVTLLVVALLVVVALVSSVSA</i>	<i>QLNFSPGWG</i>	<i>KRAAGSGSSG</i>	<i>GVGEAVSALHHSVG</i>	---	: 59	
HCP	<i>C. sapidus</i>	:	<i>MVRR</i>	<i>SGVTLLVVALLVVTLMSVSA</i>	<i>QLNFSPGWG</i>	<i>KRAAGSGSNG</i>	<i>GVGEAVSGLHPSVG</i>	---	: 59	
HAC	<i>M. sexta</i>	:	<i>MYK</i>	-----	<i>LTVFLMFIAFVIIAEA</i>	<i>QLTFTSSWG</i>	<i>GKRAMTN</i>	-----	<i>SISCRND</i>	: 42
			M		aQlnF	WG				
				*	80	*	100	*		
HAC2	<i>S. gregaria</i>	:	-----	-----	<i>DPMAFLYKLIQIEARKLSG</i>	<i>C</i> <i>SN</i>	-----	-----	: 61	
HAC2	<i>S. nitans</i>	:	-----	-----	<i>DPMAFLYKLIQIEARKLAG</i>	<i>C</i> <i>SN</i>	-----	-----	: 61	
HAC2	<i>L. migratoria</i>	:	-----	-----	<i>DPMAFLYRLIQIEARKLAG</i>	<i>C</i> <i>SD</i>	-----	-----	: 61	
HAC	<i>S. gregaria</i>	:	-----	-----	<i>DPYSFLYRLIQAEARKMSG</i>	<i>C</i> <i>SN</i>	-----	-----	: 63	
HAC	<i>S. nitans</i>	:	-----	-----	<i>DPYSFLYRLIQAEARKMSG</i>	<i>C</i> <i>SN</i>	-----	-----	: 63	
HAC	<i>L. migratoria</i>	:	-----	-----	<i>DPYSFLYRLIQAEARKMSG</i>	<i>C</i> <i>SN</i>	-----	-----	: 63	
HAC	<i>B. discoidalis</i>	:	-----	-----	<i>ESLMYIYKLVQNEAQKILE</i>	<i>C</i> <i>CEKFSSN</i>	---	---	: 72	
HAC	<i>D. melanogaster</i>	:	-----	-----	<i>EMLLEIFRFVQSQAQLFLD</i>	<i>C</i> <i>CKHRE</i>	---	---	: 79	
HAC3	<i>L. migratoria</i>	:	-----	-----	<i>QALLSILNAAQAEVQKLI</i>	<i>C</i> <i>SRFTSEANS</i>	---	---	: 77	
HCP	<i>C. maenans</i>	:	<i>GAPGGVPPGSSSSSGDSCGPI</i>	<i>PVS</i>	<i>SVMHIYRLIRNEAVRLVQC</i>	<i>C</i> <i>QDEEYLG</i>	---	---	: 110	
HCP	<i>C. sapidus</i>	:	<i>GAPGGVPPGSSSP</i>	<i>GDSCGPI</i>	<i>PVS</i>	<i>SVMHIYRLIRSEAVRLVQC</i>	<i>C</i> <i>QDEEYLG</i>	---	: 109	
HAC	<i>M. sexta</i>	:	-----	-----	<i>EAIAAIYKAIQNEAERFIM</i>	<i>C</i> <i>QKN</i>	-----	-----	: 65	
					q	a	<i>C</i>			

Figura 1.- Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de los precursores de la familia HAC/HCP. La secuencia de direccionamiento al lumen del retículo endoplásmico rugoso se indica en *itálicas* (aa 1-28). La secuencia de la HAC y HCP se indica en **negritas**. Los aminoácidos básicos para el corte por endopeptidasas se muestran **subrayados**. El péptido relacionado a la HAC o de la HCP está en letra normal. Las cisteína involucrada en la dimerización del propéptido está en **negritas** y **subrayada** (aa 107), mientras que las cisteínas intramoleculares están en **negritas** e **itálicas**. En mayúsculas se indica cuando no hay cambio en la posición y en minúsculas cuando solo se presenta el cambio de un o dos aminoácidos en esa posición.

lo reportado para otros precursores de neuropéptidos (Kriger *et al.*, 1983). Inmediatamente después del péptido señal se encuentra la secuencia de la HCP o de la HAC, seguida por un par de aminoácidos básicos que son el sitio de reconocimiento para endopeptidasas. Para los precursores de la HCP, de las HAC I y III, la secuencia del corte es Lis-Arg. Para los precursores de la HAC II de *S. gregaria*, *S. nitans* y *L. migratoria* se encuentran dos sitios de corte, el primero está después de la HAC II con la secuencia Arg-Arg y el segundo se encuentra antes de la Cis⁵⁹ del péptido relacionado a la HAC, con la secuencia Arg-Lis. Sin embargo, no se ha determinado si esta secuencia está sujeta a un proceso proteolítico (Fig. 1).

La reconstrucción *in vitro* del procesamiento del precursor de la HAC I ha mostrado que el corte del propéptido se realiza por una enzima con actividad similar a la carboxipeptidasa H. Además, un requisito para el procesamiento del precursor de la HAC I, es la formación de una orquilla tipo omega entre la Tre⁶ de la HAC y la Arg del sitio de corte dibásico. Por lo que la señal para el procesamiento del precursor es la estructura secundaria que forma la secuencia de la HAC con los aminoácidos básicos del sitio de corte. La gran similitud que presentan los precursores de la familia HAC/HCP sugiere que el procesamiento del precursor de la HCP tendrá un comportamiento como el propuesto (Rayne y O'shea 1993; 1994).

Con la escisión del propéptido de la HAC o de la HCP, se obtienen dos productos protéicos: 1) la hormona que es modificada en la Gli del extremo carboxilo por una enzima que presenta actividad de peptidilglicina-alpha-monooxigenasa amidante (Rayne y O'shea, 1994); 2) un péptido de 72 aminoácidos en los crustáceos y de 32 aminoácidos en los insectos que se ha denominado péptido relacionado a la HAC (RP-HAC) o a la HCP (RP-HCP). Se han propuesto diferentes funciones para el RP-HAC en el metabolismo de los insectos, como son la hiperlipemia o la hipertrehalosemia, entre otras. Sin embargo, se demostró que estas atribuciones son falsas (Hatle y Spring, 1999) y aún se desconoce si el RP-HAC o PR-HCP tienen alguna función extracelular.

Existen diferencias en el tamaño y en la composición de aminoácidos entre el RP-HAC y el RP-HCP. Sin embargo se encuentran regiones conservadas al final del extremo carboxilo: todos los precursores tienen una cisteína antes de los últimos 3 o 9 aminoácidos. Esta Cis es necesaria para el procesamiento de las HAC I y II, debido a que el precursor debe estar en forma de dímero formado por puentes disulfuro en el extremo carboxilo. (Fischer-Lougheed *et al.*, 1992). Además esta Cis pudiese formar un puente disulfuro intramolecular con otra cisteína localizada en otra parte del péptido relacionado a la HAC, o en algunos casos en el péptido señal, pero estos enlaces intramoleculares no se han demostrado (Fig. 1).

Genes de la familia HAC/HCP.

Los estudios concernientes a los genes que codifican para los precursores de la HAC y HCP son escasos. Sólo se han clonado las HAC en la palomilla *Manduca sexta* (Bradfield y Keeley, 1989), en la mosca *Drosophila melanogaster* (Noyes *et al.*, 1995) y en el grillo *Shistocerca nitans* (Noyes y Schaffer, 1993). Para la HCP solamente se conoce en la jaiba *Callinectes sapidus* (Martínez-Pérez *et al.*, 2002). La estructura del gen, al nivel de exones e intrones, varía de acuerdo a la especie. En el caso de *M. sexta* el gen carece de intrones y el precursor se encuentra en un sólo exón. Para *Drosophila melanogaster* el gen tiene un intrón de 68 pb entre los dos primeros codones de la HAC (Noyes *et al.*, 1995).

Shistocerca nitans tiene duplicado al gen que codifica para el precursor de la HAC. La estructura del precursor de la HAC I tiene tres pequeños exones separados por dos intrones de 3.8 y 2.1 kb. El primer intrón está en la región no traducida del extremo 5' y el segundo en la parte final de péptido relacionado a la HAC. El gen para la HAC II presenta la misma estructura que el gen de la HAC I pero los tamaños de los intrones son de 3.3 kb y de 15 kb (Noyes y Schaffer, 1993). La estructura del marco abierto de lectura del gen de la HCP en la jaiba *Callinectes sapidus* tiene un intrón de 275 pb, localizado, al igual que en las HAC de *S. nitans*, en la parte final del péptido relacionado a la HCP. Las

diferencias entre el tamaño y la posición de los intrones sugiere la participación de diferentes elementos intrónicos y exónicos que participan en el procesamiento del pre-RNA_m del precursor de cada neuropéptido (Martínez-Pérez *et al.*, 2002).

Los intrones de la familia HAC/HCP presentan todos los elementos en *cis* y están en fase cero (Pathy, 1996) ya que están localizados entre el último codón del primer exón y el primer codón del segundo exón. Además los intrones de la familia HAC/HCP están en la categoría de los intrones clásicos, ya que los sitios aceptor, donador y de ramificación, están conservados en todas las especies. Existen dos diferencias discretas en la estructura de los intrones de los genes de la familia HAC/HCP. El segmento de polipirimidinas no está tan definido en *C. sapidus* como en *D. melanogaster* y *S. nitans*. Concomitantemente en *C. sapidus*, la secuencia entre el sitio de ramificación y el segmento de polipirimidinas tiene menos nucleótidos y el contenido de guaninas y citosinas es del 50%, mientras que los genes HAC son mayores y son más ricos en adenina y timina como ocurre en los intrones tipo III (Rogers, 1990).

La región promotora de los genes de la familia HAC/HCP solo se ha caracterizado en los cuatro genes HAC y para la HCP no se ha caracterizado ninguna. Todos los promotores HAC presentan cajas TATA flanqueadas por regiones ricas en GC y en el caso de los genes de *S. nitans* también se han encontrado cajas CAAT. Además se han determinado distintos elementos de regulación entre los genes HAC I y HAC II. Por ejemplo la secuencia TCCCTTCGA está presente en el gen HAC I de *S. nitans* y *D. melanogaster* pero no en el gen HAC II. Una situación similar ocurre con un elemento homólogo que flanquea las regiones 5' de los genes de gastrina y colecistoquinina. Se ha encontrado una secuencia similar a los potenciadores de la transcripción en el gen de la insulina de *S. nitans* y *D. melanogaster* (Noyes *et al.*, 1995).

Hasta la fecha no se ha determinado la actividad de las posibles regiones promotoras de los genes HAC y por lo tanto se conoce muy poco acerca de los mecanismos que intervienen en su regulación.

Ritmos circadianos.

En nuestro planeta existen cambios geofísicos que se repiten a intervalos constantes de tiempo denominados ciclos geológicos como por ejemplo los cambios de luz y oscuridad y la translación de la tierra alrededor del sol (Shweiki, 2001; Brown, 1976). Esta repetición de eventos periódicos se refleja también en los seres vivos en los que se les conoce como ritmos biológicos. Pueden ser propios del organismo (ritmo endógeno), o estar regulados por algún ritmo geológico (Brown, 1976; Stupfel y Pavely, 1990).

Los ritmos biológicos se clasifican de acuerdo a su duración. Los ritmos de aproximadamente una hora se denominan circahoral, los menores a 20 horas ultradianos, los cercanos a 24 horas circadianos y los mayores a un día infradianos (Stupfel y Pavely, 1990). Los ritmos circadianos (del latín *circa*= cerca y *dies*= día) son oscilaciones en las funciones bioquímicas, fisiológicas y de comportamiento en un organismo durante un período de aproximadamente 24 horas, por lo que son considerados una adaptación al ciclo de luz-oscuridad producido por la rotación de la tierra (Pya *et al.*, 2002; Loros y Dunlap, 2001; Dunlap, 1999).

Todos los sistemas circadianos tienen diferentes propiedades básicas, a saber: A) pueden ser sincronizados por ciclos geológicos y por estímulos ambientales, también llamados sincronizadores (zeitgebers), como son: la luz, la temperatura, la humedad, las condiciones meteorológicas, la presión barométrica, las condiciones meteorológicas, la disponibilidad de alimento y posiblemente el magnetismo (Aréchiga, 1996; Sancar, 2000; Williams y Sehgal, 2001); B) persisten bajo condiciones ambientales constantes, al estar en ausencia del sincronizador la longitud del ciclo completo (período)

usualmente es menor a 24 horas. En esta condición se dice que el ritmo circadiano está en corrimiento espontáneo (Aréchiga, 1996; Williams y Sehgal, 2001) y fue la demostración de que los organismos tienen un mecanismo endógeno que mide el tiempo (Aréchiga, 1996; Williams y Sehgal, 2001); C) el periodo del ritmo circadiano es compensado por la temperatura y éste no cambia en un amplio rango de (Aréchiga, 1996; Williams y Sehgal, 2001); D) están bajo control genético ya que una mutación en alguno de los genes que codifican para los elementos positivos y/o negativos afecta el periodo del ritmo circadiano (Dunlap, 1999).

Los ritmos circadianos se generan en diferentes estructuras celulares dependiendo de la especie. Por ejemplo, en el núcleo supraquiasmático del hipotálamo de los mamíferos, en la glándula pineal en las aves, en el ojo en los gasterópodos, en el tallo ocular de los crustáceos y en diversas estructuras en los insectos (Aréchiga, 1996). Inclusive en procariontes existen especies que generan ritmos circadianos como las cianobacterias que tienen las proteínas kai A, B y C, que participan en la generación del ritmo circadiano (Johnson y Golden, 1999). Pero no todos los organismos unicelulares presentan algún ritmo circadiano como es el caso de las arqueobacterias y muchas eubacterias (Loros y Dunlap, 2001; Dunlap JC, 1999; Johnson y Golden, 1999). La conservación de los ritmos circadianos durante la evolución sugiere una ventaja selectiva para los organismos, ya que permiten que el individuo organice su fisiología y su comportamiento en horas determinadas del día, por lo que estará adaptado previamente a situaciones ambientales establecidas por el ritmo geológico (Panda *et al.*, 2002).

Los ritmos circadianos están formados por tres elementos: A) una o varias rutas de entrada que transmiten la información ambiental al reloj biológico para su sincronización; B) un reloj biológico o marcapasos circadiano que genera la oscilación y C) una o varias rutas de salida, mediante las cuales la información del marcapasos genera cambios rítmicos en una actividad o en algún proceso fisiológico (Takahashi, 1995; Williams y Sehgal, 2001; Panda *et al.*, 2002).

Análisis de los Ritmos Biológicos.

Otro aspecto para el estudio de los ritmos biológicos, es la capacidad de estimar y cuantificar satisfactoriamente las anomalías o perturbaciones que puede tener un ritmo. Todos difieren de forma, de amplitud y de su valor en el tiempo, por lo que, la descripción de un ritmo circadiano requiere de la obtención de datos de una variable rítmica en un lapso de tiempo (Dunlap, 1999; Friesen y Block, 1984; Vega, 1993; Minors y Waterhouse, 1988). Como se muestra en la figura 3 con los datos obtenidos de una serie de eventos, dentro de un periodo de tiempo, la variable rítmica se puede analizar mediante una función cosenoidal, en donde los parámetros fundamentales de la función son: a) el período, el cual es el intervalo entre dos puntos de referencia idénticos sobre la onda; b) el mesor definido como el valor medio de la variable en estudio calculado a lo largo de un período completo; c) la amplitud que es la diferencia entre el mesor y el valor máximo alcanzado por la variable durante el periodo; d) la fase, que es el valor instantáneo de una variable biológica en un momento dado (Golombek, 1997).

La representación gráfica de las fases permite observar el comportamiento del ritmo circadiano en el tiempo, por lo cual se han empleado diferentes métodos estadísticos, por ejemplo, la forma más sencilla es mediante una gráfica de variable dependiente–independiente (XY) (Fig.2). Otro método para representar la actividad es el actograma consiste en el ordenamiento consecutivo de gráficas de ocurrencia de eventos (Friesen y Block, 1984; Vega, 1993; Dunlap, 1996; Minors y Waterhouse, 1988). Uno de los datos más importantes para el análisis de los ritmos circadianos es el período ya que indica la duración del ritmo circadiano; se puede obtener de varias formas, ya sea bien con la estimación gráfica del periodo y de la fase (Fig. 2), o con análisis matemáticos como son: el cosinor que es un método de ajuste por mínimos cuadrados; el periodograma que permite estimar el período de los componentes responsables del ritmo circadiano; la demodulación compleja, que es análoga a los mínimos cuadrados pero utiliza la suma de funciones trigonométricas (Vega, 1993). Se han diseñado diversos modelos matemáticos para representar el periodo de ritmos circadianos con la opción de ser utilizados para medir

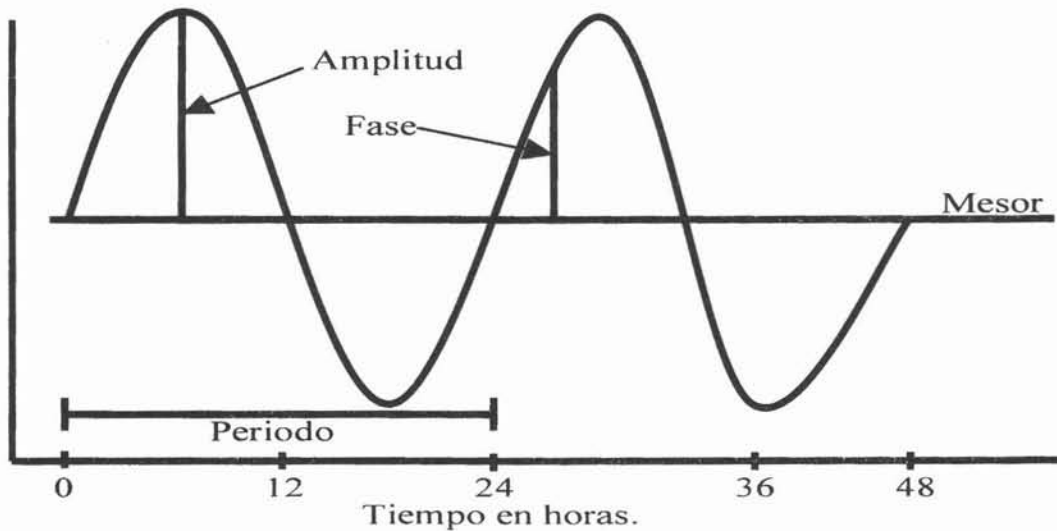


Figura 2.- Representación gráfica de un ritmo circadiano. El período es el tiempo desde el comienzo al final del ciclo circadiano. El mesor es la media entre el valor máximo y mínimo. La amplitud es la distancia entre el mesor y el punto máximo. La fase es un valor que se le asigna a un evento en un momento determinado.

otros ritmos circadianos. Por ejemplo, el urinario de humanos (Minors y Waterhouse, 1990) y los niveles de RNAm y de la proteína de per y de tim en *Neurospora crassa* y en *Drosophila melanogaster* (Smolen *et al.*, 2001; Leloup y Goldbeter, 1998). Cuando usamos al método de Cosinor éste asume que los datos son normalmente distribuidos alrededor de cada uno de los tiempos de muestreo. Además una de las principales ventajas del cosinor es que permite tener una prueba objetiva de la hipótesis es decir el ritmo es valido para un periodo considerado. Usualmente la evidencia para la decisión de aceptación del ritmo es cuando la probabilidad ($p \leq 0.05$) de que A sea cero. Otra ventaja del método de cosinor con respecto a otros es que, los de la serie de tiempo no necesitan estar igualmente espaciados y tolera bastante bien el caso de los datos perdidos o faltantes (Vega, 1993; Minors y Waterhouse, 1988). El análisis de Cosinor parte de la fórmula $Y = M + A \cos(\omega t_i + \phi)$ en donde: t_i es el tiempo de los puntos; M es el valor medio (mesor); A corresponde a la amplitud de la curva; ω es la frecuencia angular de la curva y ϕ es el ángulo de fase del valor máximo de la curva (acrofase) (Vega, 1993).

Ritmo del movimiento de los pigmentos en los crustáceos.

Diferentes estudios han demostrado que en los crustáceos hay un ritmo diario en el cambio de color de los cromatóforos (células epiteliales distribuidas en todo el organismo), y en los pigmentos de la retina (Porras *et al.*, 2001; Ranga, 1985; Ranga y Fingerman, 1983). En los primeros estudios para determinar si este movimiento intracelular de pigmentos era propio de las células mencionadas, o si era regulado por otro factor extracelular, se eliminó el pedúnculo ocular, con lo que se perdió el ritmo en los cromatóforos. Posteriormente se demostró que los neuropéptidos Hormona Concentradora de Pigmentos (HCP) y Hormona Dispersora de Pigmentos (HDP), que se sintetizan en el complejo órgano-X-glándula sinusal (COXGS) en el pedúnculo ocular, eran las principales hormonas involucradas en la migración de los pigmentos en los cromatóforos y en la retina (Aréchiga *et al.*, 1993, 1997; Gárfias *et al.*, 1995; Fingerman y Fingerman, 1977).

El ritmo de la retina consiste en el movimiento de tres de tipos pigmentos accesorios (Aréchiga *et al.*, 1993, 1997; Gárfias *et al.*, 1995 Frixione, 1983). El primero es periférico y se denomina pigmento distal; se encuentra en gránulos oscuros que están localizados en las células alargadas que se extienden a lo largo del eje mayor del omatidio de la córnea hasta la membrana basal (Fig. 3). El segundo tipo de gránulos pigmentarios es el proximal, que se ubica dentro de los fotorreceptores de la retina (Fig. 3). El tercer tipo de pigmentos accesorios se llama pigmento reflejante, el cual tiene la función de reflejar la luz. En la oscuridad el pigmento distal se dirige hacia el final de la córnea, mientras que el pigmento proximal se mueve en dirección opuesta a lo largo de los axones de las células retinulares. Como se muestra en la figura 4 la consecuencia de ambos eventos es que la zona y el área que rodea al rabdomo queda totalmente expuesta a la luz (Aréchiga *et al.*, 1993; 1997). Bajo iluminación ambos pigmentos se expanden, dependiendo de la intensidad de la luz, y por lo tanto, ocupan la mayor parte de la extensión de las células. Esta dispersión pigmentaria tiene la función de proteger de la luz tangencial (Fig. 3) (Aréchiga *et al.*, 1997).

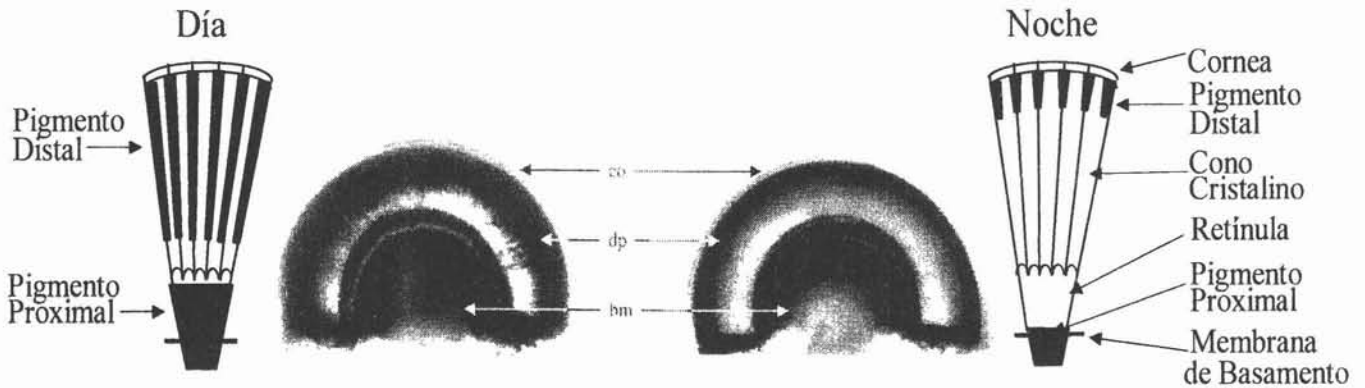


Figura 3.- Ritmo circadiano del movimiento de pigmentos en la retina de los crustáceos. En el día el pigmento distal y el pigmento proximal se distribuyen en toda la retina por acción de la Hormona Dispersora de Pigmentos. Por la noche la Hormona Concentradora de Pigmentos estimula la entrada de calcio, y el pigmento distal migra hacia la cornea. Cornea co, pigmento distal dp, membrana de basamento bm.

Existen diferencias entre los estímulos que producen el movimiento de los pigmentos proximal y distal. En el pigmento proximal la migración responde directamente al estímulo de los fotorreceptores de luz-oscuridad. Mientras que las células que tienen al pigmento distal no responden a la luz directamente, ya que su regulación es por fotorreceptores extraretinianos y por neurohormonas liberadas por el tallo ocular en respuesta a la luz - oscuridad (Aréchiga *et al.*, 1997; Gárfias *et al.*, 1995; de Kleijn *et al.*, 1993).

El ritmo circadiano del movimiento de pigmentos en la retina consiste en que los pigmentos están dispersos durante el día, mientras que en la noche existe una agregación de los mismos. El ritmo persiste aún bajo condiciones constantes de oscuridad (Aréchiga *et al.*, 1993; 1997).

La HCP promueve la agregación del pigmento distal, según se demostró al interferir el ciclo circadiano impidiendo la actividad de la HCP por medio de un anticuerpo específico contra ésta (Gárfias *et al.*, 1995). En resumen: a) el cambio en la posición del pigmento distal en la retina por luz-oscuridad es producto de la unión de la HCP con su receptor, y de la elevación ulterior de la concentración del

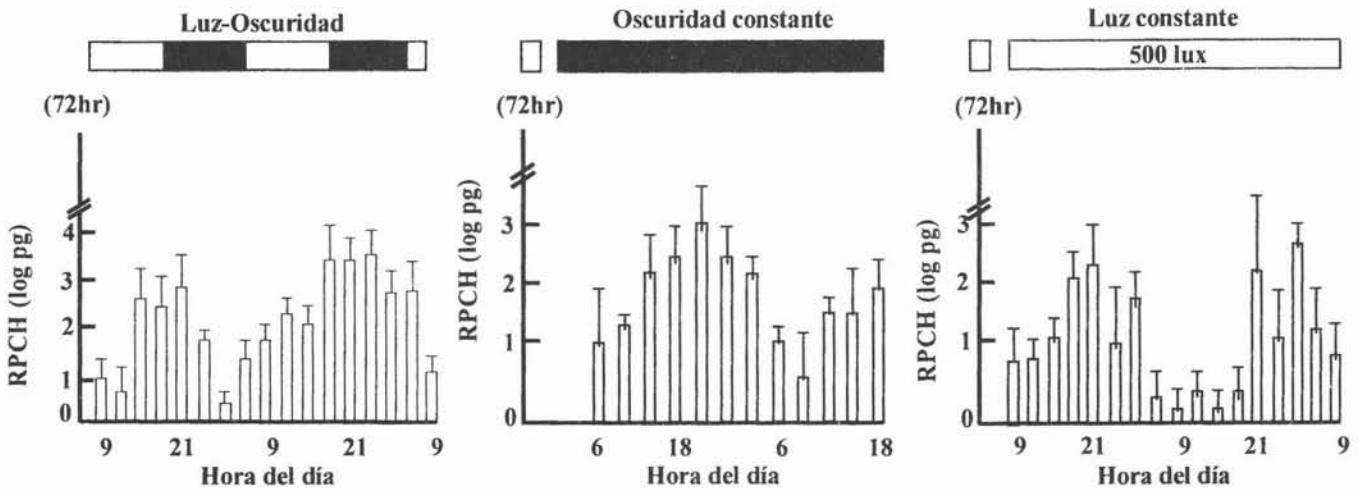


Figura 4.- Ritmo circadiano de la concentración de la HCP en el pedúnculo ocular del acocil en ciclos: de luz-oscuridad, de oscuridad y de luz constante. En ciclos de luz oscuridad la concentración de HCP es a la 12.00 h del día y por la noche comienza a disminuir para regresar a sus niveles matutinos. En ausencia o presencia de la luz existe un desajuste del ciclo circadiano pero continua con su origen endógeno (Tomado de Rodríguez-Sosa *et al*, 1994).

calcio intracelular; b) los cambios en la posición del pigmento distal, modifican la cantidad de fotones que pudieran participar en la regulación del o de los relojes biológicos que producen los ritmos circadianos del tallo ocular de crustáceos.

La participación de la HCP en el ritmo circadiano del movimiento de pigmentos en los cromatóforos es a diferentes niveles. Por ejemplo, en los cocultivos de neuronas del pedúnculo ocular del acocil, que realizan la biosíntesis de la HCP, con cromatóforos la neurona aledaña al cromatóforo tiene la capacidad de concentrar los pigmentos de éste cuando se estimula con corrientes eléctricas cuyo voltaje depende de la concentración del calcio, o con HCP sintética. Más aún, cuando se retira el medio de cultivo, los cromatóforos comienzan a dispersar los pigmentos (Alvarado-Alvarez *et al.*, 1999).

Los estudios concernientes a las neuronas que realizan la biosíntesis de la HCP, y su relación con los ritmos circadianos del movimiento de pigmentos en la retina y en los cromatóforos, han sido de diversos tipos. Se ha demostrado que el contenido de la HCP de las neuronas que la producen oscila en

forma circadiana (Aréchiga *et al.*, 1993; Rodríguez-Sosa *et al.*, 1994; Uribe *et al.*, 1998). La concentración mínima se detecta en las primeras horas del día; alcanza su máxima concentración 12 horas después de iniciada la exposición a la luz, para después descender durante la noche (Rodríguez-Sosa *et al.*, 1994). El contenido de la HCP continúa presentando el mismo patrón de comportamiento rítmico aún en oscuridad o en luz constante, indicando la naturaleza endógena del ritmo (Fig. 4). Además, las neuronas productoras de HCP también presentan un ritmo circadiano en la actividad eléctrica, el cual tiene un patrón similar al ritmo del contenido de la HCP (Uribe *et al.*, 1998). En otros estudios, el contenido de la HCP presenta un patrón específico a lo largo del año, en donde en primavera comienza el aumento, para tener su punto máximo en el verano, comienza a descender en el otoño y en invierno es el punto mínimo (Rodríguez-Sosa *et al.*, 1997).

Aún cuando se ha demostrado la participación directa de la HCP en el ritmo de movimiento de pigmentos de los cromatóforos y del pigmento distal de la retina, no se han determinado ni los mecanismos moleculares de la biosíntesis del precursor de la HCP y si éstos también presentan un ritmo circadiano, ni la presencia de los elementos característicos de genes regulados por genes reloj en su promotor para ser considerada como una molécula de salida del reloj biológico.

Justificación y Planteamiento del problema.

Se ha propuesto que el movimiento de los pigmentos en las células epiteliales y en las células de la retina de los crustáceos está regulado por un ritmo circadiano producto de la acción de la Hormona Concentradora de Pigmentos y de la Hormona Dispersora de Pigmentos. Los elementos moleculares y tisulares que regulan la biosíntesis, el procesamiento y la liberación de ambos neuropéptidos se desconocen a la fecha. Es necesario conocerlos para aceptar o rechazar que la HCP y la HDP sean parte del grupo de genes que participan en los ritmos circadianos.

Hay que resaltar de la Hormona Concentradora de Pigmentos que aun cuando se la ha agrupado con la Hormona Adipocinética de los insectos, en función de la sustitución de la actividad fisiológica, su secuencia de aminoácidos y por las características moleculares de sus precursores, no se ha propuesto ningún modelo evolutivo que explique si ambos neuropéptidos tuvieron un origen común o si provienen de genes independientes.

De lo anterior se plantean tres preguntas que pudieran responderse a nivel molecular de la HCP:

¿La expresión del RNAm de la HCP se efectúa en el pedúnculo ocular?

¿El RNAm de la HCP tendrá el mismo patrón rítmico de comportamiento que el de su precursor protéico en el pedúnculo ocular del acocil en ciclos de luz oscuridad?

¿La HCP de los crustáceos y la HAC de los insectos, en base a la similitud molecular que presentan, podrían provenir de un gen ancestral común o provienen de genes independientes?

Para poder contestar estas preguntas es indispensable solucionar distintos aspectos, a saber: 1) determinar la secuencia del cDNA de la HCP en el acocil donde ya se conocen algunos aspectos fisiológicos de su participación en el ritmo circadiano de pigmentos (Aréchiga *et al.*, 1998; Aréchiga 1996; Garfías *et al.*, 1995) y la presencia de proteínas del reloj biológico (Fanjul-Moles *et al.*, 2004; Fanjul-Moles y Prieto-Sagredo 2003; Arechiga y Rodríguez-Sosa 1998). 2) desarrollar una metodología que permita obtener el RNA total de pedúnculo ocular del acocil *C. quadricarinatus* libre de pigmentos

de pigmentos y de compuestos fenólicos, debido a que este tipo de moléculas interfieren en la cuantificación de los ácidos nucleicos y en algunas reacciones enzimáticas como la de RT-PCR (Manning 1991). 3) Establecer si existen cambios en la concentración del RNAm de la HCP en ciclos de luz-oscuridad o por acción de los ritmos endógenos; 4) establecer los controles necesarios para poder comparar los cambios en la concentración del RNAm de la HCP. En este sentido es condición indispensable determinar la expresión de genes constitutivos en el pedúnculo ocular. Para el acocil *C. quadricarinatus* se desconoce la secuencia de los cDNAs de los genes constitutivos mas empleados como controles en los estudios de cuantificación del RNAm, a saber, el de la beta actina y el de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (Bustin, 2000), por lo que también se requiere caracterizarlos y clonarlos y después cuantificarlos. 5) la secuencia del cDNA del precursor de la HCP del acocil se podrá comparar y analizar evolutivamente a la de los cDNA de los precursores de HCP y de la HAC de los cangrejos y de los insectos. Este tipo de análisis se podrá realizar con neuropéptidos de otro *phylum*, como el de los moluscos, en los cuales se ha demostrado la presencia de hormonas que presentan secuencias de aminoácidos homólogas a la HCP y HAC como es el caso de la APGWamida. 6) con la secuencia del cDNA de la HCP del acocil se facilitara el modelaje entre las secuencias que conforman a los miembros de la familia HAC/HCP y ayudará ha tener un panorama mas amplio de los procesos evolutivos que influyeron en los genes que codifican para la HCP y la HAC.

Para resolver los aspectos antes mencionados, en este trabajo se plantearon las siguientes hipótesis y objetivos que se indican a continuación.

Hipótesis.

1.- El cDNA de la Hormona Concentradora de Pigmentos, en el acocil *Cherax quadricarinatus*, oscila en periodos circadianos en el pedúnculo ocular.

2.- La similitud que presentan los miembros de la familia HAC/HCP sugiere que éstos pudieran tener un gen ancestral común, el cual se formó por eventos de recombinación de DNA.

Objetivo General.

Estudiar la transcripción del gen de la Hormona Concentradora de Pigmentos (HCP) en el pedúnculo ocular del acocil *Cherax quadricarinatus*.

Objetivos Particulares.

A) Clonar y secuenciar al gen y al cDNA de la Hormona Concentradora de Pigmentos del acocil *Cherax quadricarinatus*.

B) Cuantificar los cambios en el nivel del cDNA de la HCP en el tallo ocular a lo largo de ciclos de luz oscuridad y como a la actividad de ritmos endógenos.

C) Establecer algunas relaciones evolutivas entre la secuencia del precursor de la HCP del acocil *Cherax quadricarinatus* y los miembros de la familia HCP/HAC.

Metodología.

Extracción de los ácidos nucleicos del músculo, del hepatopáncreas, de las branquias y de los tallos oculares del acocil *C. quadricarinatus*.

Un aspecto básico en las metodologías de la Biología Molecular es la pureza de los ácidos nucleicos para realizar reacciones enzimáticas. La mayoría de los protocolos reportados en la bibliografía, o por las casas comerciales, están diseñados para las plantas, los mamíferos y, en el caso de los insectos, para *Drosophila melanogaster*. Por lo anterior fue necesario implementar una nueva metodología para la obtención de ácidos nucleicos diseñada para los crustáceos decápodos. Previo a cada extracción, y para causar el menor dolor a los acociles, se aletargaron colocándolos en hielo durante 5 min. Este simple tratamiento ayudó a mantener la integridad del tejido y facilitó el manejo del animal.

Extracción del DNA.

Para extraer el DNA del músculo del acocil, se diseñó un nuevo protocolo adaptado para los crustáceos, con el cual se eliminan las proteínas y las moléculas orgánicas e inorgánicas del DNA cromosomal. El protocolo consta de tres etapas. La primera etapa consiste en romper las células que componen al tejido celular y en degradar una parte de las proteínas y al RNA por acción enzimática (Wu *et al.*, 1995). La segunda etapa, termina por separar las proteínas asociadas al DNA, mediante un método químico con el reactivo DNAsol (Invitrogene). La tercera etapa separa al DNA de los restos orgánicos e inorgánicos mediante un gradiente continuo de Cloruro de Cesio (Ausebel *et al.*, 1985).

El músculo se maceró después de congelado en nitrógeno líquido. Por cada 0.1 g de tejido se adicionó 2 ml de amortiguador de lisis (100 mM Tris HCl pH 8.5; EDTA 5 mM pH 8; SDS 0.2 %; NaCl 400 mM). A la reacción se le añadió 500 µg/ml de Proteinasa K y 20 µg/ml de RNasa A. Se

incubó por 4 h a 37°C. El DNA se precipitó con 1 volumen de isopropanól y se resuspendió en 4 ml de amortiguador TE (Tris-HCl 100 mM pH 8.5, EDTA 1 mM pH 8).

Al DNA se le agregó 6 volúmenes de DNAsol (Invitrogene) y se precipitó con 4 volúmenes de etanol absoluto. El DNA se retiró de la solución y se lavó 2 veces con 4 ml de etanol al 95 %. Se resuspendió nuevamente en 4 ml de amortiguador TE. Posteriormente, para la formación del gradiente continuo, se agregó el Cloruro de Cesio (1 g/ml) más 0.320 ml de bromuro de etidió (10 µg/ml en agua). El DNA fue colocado en tubos para el rotor Ti70.1 (Beckman) y se centrifugó a 60,000 rpm por 6 h a 20 °C. El DNA cromosomal, localizado en la parte superior del gradiente, se recuperó con una jeringa (a veces se observó una línea de color visible a la luz ultravioleta). Para retirar el bromuro de etidió se agregó un volumen de alcohol isoamílico y se mezcló suavemente. En este paso se forman dos fases; la fase orgánica (inferior) es de color rosa. Se centrifugó a 14,000 rpm por 1 min a temperatura ambiente y se retiró la fase orgánica. El procedimiento anterior se repitió cinco veces hasta que se eliminó el color rosa de las dos fases. Para eliminar el Cloruro de Cesio, el DNA se diluyó con 3 volúmenes de agua y se precipitó con 2 volúmenes de etanol absoluto a 4°C por 15 min. Por último, la solución se decantó y el DNA se lavó con 2 ml de etanol al 70%. Se dejó secar a temperatura ambiente y se resuspendió en 2 ml de agua estéril.

Extracción del RNA.

La extracción del RNA total de los tejidos del acocil se realizó con algunas modificaciones al método propuesto por Chomczynski y Sacchi (1985) con dos pasos adicionales para disminuir la cantidad de DNA genómico contaminante, y para eliminar la coprecipitación del RNA con los carbohidratos, con los pigmentos y con los compuestos fenólicos (Sewall y McRae, 1998). Lo anterior se logró agregando perlas de vidrio, para unir al DNA y la precipitación del RNA en presencia de un amortiguador de alta sal que mantuvo en solución a los carbohidratos y a los compuestos fenólicos. El

método se puede utilizar para cualquier órgano o tejido; las únicas diferencias que presenta son: A) la forma de obtención del tejido y B) la manera en que se realizó la lisis la cuál esta en función del peso del tejido. Los tejidos con un peso mayor a 300 mg se maceraron en nitrógeno líquido, y con un peso menor a 200 mg por ruptura mecánica con perlas de vidrio que previamente se incluyeron en la solución de lisis.

Para la extracción del RNA total del músculo, del hepatopáncreas y de las branquias, los tejidos se maceraron en nitrógeno líquido y se les adicionó 2 ml de solución de lisis por cada 0.1 g de tejido, en tanto que a 10 tallos oculares se les retiro la retina y el exo-esqueleto del pedúnculo ocular y se colocaron directamente en 4 ml de la misma solución.

La solución de lisis esta formada por 1 volumen de solución D (4 M de Tiocianato de guanidina para desnaturalizar proteínas; 0.5 % p/v de detergente sarcosil para favorecer la desnaturalización de complejos proteicos; 0.15 M de β -mercaptoetanol que es un agente reductor de puentes de di-sulfuro que son indispensable en la actividad de las RNasas; 25 mM de citrato de sodio pH 7.0 como amortiguador); 0.1 volumen de acetato de sodio 2M pH 4.0 ajustado con ácido acético, el cual mantiene el pH ácido para estabilizar al RNA e hidrolizar al DNA; 1 volumen de fenol saturado en agua, para extraer poli-péptidos; 1 g/ml de perlas de vidrio, para romper las membranas y facilitar la extracción del DNA.

Se aplicaron 5 pulsos de 1 min de agitación al máximo en el vortex y 10 minutos de incubación en agua hielo para después adicionar 0.4 volúmenes de cloroformo, alcohol-isoamílico (48:2).

Los restos celulares de la fase acuosa se centrifugaron a 15,000 rpm por 50 min a 4°C en el rotor JA-20 (Beckman) para separar al DNA. A la fase acuosa se le adicionó un volumen igual de isopropanol mas 0.1 volúmenes del amortiguador de alta sal (NaCl 1.2 M y citrato de sodio 0.8 M) para precipitar al RNA. La mezcla se incubó a -20°C durante 1 h y se centrifugó a 14,000 rpm a 4°C por 20 min. El RNA se resuspendió en 2.1 ml de solución PCNS y se dividió en alícuotas de 700 μ l cada una; se precipito

nuevamente con 1 volumen de isopropanol a -20°C durante 1 hora. El RNA se recuperó por centrifugación a 14,000 rpm por 20 min a 4°C . La pastilla se lavó con etanol al 75 % y se centrifugó nuevamente bajo las condiciones anteriores. Por último, el RNA se secó a temperatura ambiente y se almacenó a -70°C hasta su empleo. Para resuspenderlo se le agregó 200 μl de agua esterilizada al autoclave y filtrada a través de membranas de 0.22 μm de diámetro.

Calidad y cuantificación del DNA y del RNA.

La calidad del DNA y del RNA se valoró por espectrofotometría a densidades ópticas de 260 y 280 nanómetros. Cuando el cociente de ambas lecturas es entre 1.8 y 2.0 la pureza del DNA y del RNA es buena. En el caso de que el cociente esté cercano a 1.5 la calidad de los ácidos nucleicos es mala por presentar alto contenido protéico, y si es mayor de 2 el DNA y el RNA tienen restos fenólicos (Ausebel *et al.*, 1985).

Para determinar la concentración de los ácidos nucleicos se emplearon las relaciones propuestas por Sambrook *et al.*, (1985) donde 1 OD a 260 nm = 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ para el DNA y 1 OD a 260 nm = 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ para el RNA. La concentración e integridad de los ácidos nucleicos fueron verificadas por electroforesis en gel de agarosa.

Para el DNA la electroforesis se efectuó en un gel de agarosa al 1% disuelta en amortiguador TAE 1X (50X 242 g de Tris-Base, 57.1 ml de ácido acético, 100 ml de 0.5 M de EDTA) y bromuro de etidión 1X (0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$). La muestra se disolvió en el amortiguador indicado (sacarosa al 40%, xilencianol al 0.25 %, azul de bromofenol al 0.25%, 0.001 M de EDTA) a una relación 1:5 del volumen final. La muestra se corrió a 100 volts. La concentración del DNA se verificó con marcadores moleculares de concentración conocida (High Mass Ladder Stratagen; DNA del bacteriófago λ cortado con la enzima *Hind III*).

La electroforesis para el RNA se realizó en un gel desnaturizante de agarosa al 1.5 %, para lo cual la agarosa fue disuelta en formaldehído 2.2 M y amortiguador MOPS 1X (0.2 M de MOPS pH 7.0, 0.05 M de acetato de sodio, 0.005 M de EDTA pH 8.0). Las muestras de RNA se calentaron a 90°C por 2 min e inmediatamente se colocaron en hielo. Se adicionó el amortiguador de precorrida (glicerol 50%, formaldehído 3.5 %, formamida 10 %, EDTA 1 mM pH 8). Por ultimo se agregó el colorante de corrida (glicerol al 50 %, xylene-cyanol al 0.25 %, azul de bromofenol al 0.25%, 0.001 M de EDTA pH 8.0). Antes de colocar las muestras, el gel se precorrió a 100 volts por 15 min.

Clonación de los DNAs complementarios de la HCP, de la beta-Actina y de la gliceraldehido 3 fosfato deshidrogenasa.

Para la clonación de los DNA complementarios (cDNA) de la HCP, de la beta-Actina y de la G3PDH se utilizó la misma estrategia. El primer paso consistió en la amplificación y secuenciación de un segmento del gen por medio de la reacción de polimerización en cadena (PCR). Para determinar la secuencia de los extremos de cada cDNA, se diseñaron oligodesoxinucleótidos específicos para cada gen. Para amplificar los extremos 5' y 3' del cDNA se empleó el protocolo de amplificación rápida de transcritos raros también llamada RACE (Shaefer, 1995).

Clonación parcial de los genes de la HCP, de la beta-Actina y de la G3PDH.

Para la reacción de PCR con DNA genómico de *C. quadricarinatus* se diseñaron diferentes juegos de oligodesoxinucleótidos con los siguientes criterios:

- 1.- El uso preferencial de codones.
- 2.- La región mas conservada en la escala filogenética.
- 3.- La cercanía con especies del mismo *Phylum*.
- 4.- La posible posición de los intrónes.

La temperatura media del punto de fusión (T_m) de cada oligodesoxinucleótido y su estructura secundaria se determinó con el programa computacional OLIGO. A continuación se indican las características de los oligodesoxinucleótidos empleados en la clonación por medio de ensayos tipo PCR y RACE 3' y 5'. Además se especifican las condiciones de amplificación para cada cDNA.

Oligodesoxinucleótidos para la HCP.

Para la clonación parcial del gen de la HCP los oligodesoxinucleótidos se diseñaron con base a la secuencia del cDNA y del gen de la jaiba *C. sapidus* (Klein *et al.*, 1995; Martínez-Pérez *et al.*, 2001). Los oligodesoxinucleótidos en dirección sentido fueron: la región del sitio de inicio de la transcripción (UJ); los desoxinucleótidos que contienen a los codones que codifican para los tres últimos aminoácidos del péptido señal y los cuatro primeros aminoácidos de la HCP (NJ). De esta misma región se empleó un oligodesoxinucleótido degenerado que contenía todas las posibles combinaciones para la HCP (DJ). Los oligodesoxinucleótidos antisentido fueron para los desoxinucleótidos que contienen a los codones de la región de la unión exón-exón (IJ) y la región del codón de paro de la traducción (LJ). Estas secuencias se describen en la Tabla 1A (ver apéndices).

Se realizaron diferentes combinaciones con los cuatro oligodesoxinucleótidos; Para amplificar todo el marco abierto de lectura se utilizaron los oligodesoxinucleótidos UJ-LJ; para la región entre el péptido activo y el codón de paro, los oligodesoxinucleótidos NJ-LJ y DJ-LJ. Para determinar la fidelidad de los productos obtenidos se realizó una reacción de PCR anidada utilizando a los oligodesoxinucleótidos NJ-IJ (Tabla 1A apéndices).

Oligodesoxinucleótidos para la beta-Actina.

Para la clonación del gen de la beta-Actina la secuencia de los oligodesoxinucleótidos fue con base al cDNA de la Actina del acocil *Procambarus clarkii* (Kang y Naya, 1993); Se empleó a los desoxinucleótidos mas conservados de la molécula (Tabla 1A). El oligodesoxinucleótido en dirección

sentido fue (UACT) y en dirección antisentido (LACT). Las condiciones de amplificación se encuentran en la Tabla A2 (Apéndices).

Oligodesoxinucleótidos para gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa.

Para la clonación parcial del gen de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa se utilizaron cuatro diferentes juegos de oligodesoxinucleótidos. Dos pares consistieron en oligodesoxinucleótidos degenerados que contienen todas las opciones para los desoxinucleótidos que codifican a los aminoácidos más conservados de la región del sitio activo UDEG3PDH- LDEG3PDH (Markos *et al.*, 1993). Así mismo, se consideró la posición de los intrones en diferentes especies (Kersanach *et al.*, 1994), en especial los genes de *Drosophila hydei* y *D. melanogaster* (Wojtas *et al.*, 1992, Tso *et al.*, 1985). El nombre de estos oligodesoxinucleótidos es UDEG3PDH2-LDEG3PDH2 (Tabla A1 Apéndices). El tercer juego de oligodesoxinucleótidos contienen a la misma región pero con la secuencia de los codones para la G3PDH de *Drosophila melanogaster* (UG3Dme-LG3Dme; Tabla 3A). Por último, cuatro oligodesoxinucleótidos tienen diferentes regiones del cDNA de la G3PDH de *Daphnia pulex* (GeneBank AJ289783); el primero tiene como oligodesoxinucleótidos sentido los que comprenden a los 15 aminoácidos adelante del sitio del inicio de la traducción (U1G3Dpu); el segundo está dentro de la región del sitio activo de la enzima (U2G3Dpu); los oligodesoxinucleótidos antisentido fueron: uno, contra la parte final del sitio activo de la enzima (L1G3Dpu), y el otro, dirigido a los codones previos al codón de paro (L2G3Dpu). Se realizaron diferentes combinaciones: para la amplificación completa del marco abierto de lectura (ORF) U1G3Dpu-L2G3Dpu, del inicio del ORF al sitio activo de la enzima U1G3Dpu-L1G3Dpu, del inicio del sitio activo hasta la parte final del ORF U2G3Dpu-L2G3Dpu, y por último, únicamente el sitio activo de la enzima U2G3Dpu-L1G3Dpu (Tabla A1; Apéndices).

Reacción de PCR

Los componentes en todas las reacciones de PCR de este trabajo fueron 100 ng de DNA cromosomal de *C. quadricarinatus* en 20mM de Tris-HCl (pH 9.4), 50 mM de KCl, 1.5 mM de MgCl₂, 0.2 mM de los dNTPs, 5 U de *Taq* platinum DNA polymerasa (Invitrogene) y 100 pmol de cada oligonucleótido. Las condiciones de cada reacción se muestran en la Tabla A2 (Apéndices).

Los productos de las reacciones de PCR fueron separados por electroforesis en un gel de agarosa al 1.5 % en amortiguador TAE 1X. El DNA fue visualizado al teñir el gel con bromuro de elidió. La imagen se digitalizó en un transiluminador (Eagleye Stratagene).

Clonación y análisis de las secuencia de los productos de PCR.

Para la clonación, la secuenciación y el análisis de la secuencia de los productos de PCR se realizaron 6 pasos: A) los productos de la reacción de PCR fueron purificados por columnas acopladas a silica gel; B) la ligación del producto de PCR a un plásmido por medio de la enzima topoisomerasa I del virus *Vaccinia*; C) la transformación de las bacterias competentes de *Escherichia coli* y la selección de las clonas positivas; D) la purificación de los plásmidos; E) la secuenciación de los plásmidos positivos. F) el análisis de las secuencias.

A) Purificación de los productos de PCR.

Los productos de PCR fueron purificados por columnas acopladas a silica gel. La propiedad funcional de este tipo de columnas es que, en presencia de sales caotrópicas unen al DNA de doble cadena o de cadena sencilla (Quiagene PCR). Lo anterior permite la separación de los componentes empleados en las reacciones de PCR, RT-PCR, en la síntesis del cDNA y los productos de enzimas de restricción. Debido a que el protocolo se encuentra patentado (QUIAGENE) no se indica la composición de los amortiguadores.

Se agregó a la reacción 5 volúmenes del amortiguador de unión y se colocó en la columna. Se centrifugó a 14,000 rpm por 1 min. La columna se lavó con 700 μ l de la solución de lavado por 5 min,

para nuevamente centrifugar como se indico anteriormente. Para secar la columna se realizó una última centrifugación. El producto de PCR se eluyó de la columna por centrifugación bajo las condiciones iniciales en un volumen final de 45 µl de agua.

B) Ligación del producto de PCR al plásmido pCR4-TOPO.

Una vez purificado el producto de PCR se realizó la ligación al plásmido pCR4-TOPO por medio de la enzima topoisomerasa I del virus *Vaccinia*. 10% del producto purificado de PCR se resuspendió en el amortiguador de ligación (10mM de Tris-HCl a pH 8.3; 50mM de KCl; 2.5 mM de MgCl₂, gelatina al 0.01%) se le agregó 1 ml de solución de alta sal (1.2M de NaCl y 0.06 M de MgCl₂) mas 1 µl del vector TOPO en un volumen final de 6 µl. La reacción se efectuó a temperatura ambiente por 10 min.

C) Transformación de las bacterias competentes de Escherichia coli DH5α.

Previo al paso de transformación se prepararon bacterias competentes de *E. coli* cepa DH5α con el siguiente protocolo: se inocularon 500 µl de bacterias a 50 ml de medio de cultivo SOB (20% de Bactotripton; 5% de extracto de levadura, 0.5% de NaCl a pH 7.5 con KOH) complementado con 10 mM de MgSO₄. El cultivo se creció a 37°C hasta obtener una densidad óptica de 0.5 a 550 nm. Las bacterias se mantuvieron en hielo durante 10 min para después colectarlas por centrifugación a 2,500 rpm por 10 min a 4°C. El medio de cultivo se decantó y las bacterias se resuspendieron en 16 ml de amortiguador 1 (30 mM de KOH; 100 mM de KCl; 10 mM de CaCl₂; 10 mM de MnCl₂; glicerol al 15 %; la solución se ajustó a pH 5.8 con KOH). Se mantuvieron durante 15 min en hielo.

Las bacterias se colectaron nuevamente mediante centrifugación como se indicó anteriormente. El medio se decantó y las bacterias se resuspendieron en 4 ml del amortiguador 2 (10 mM de MOPS; 75 mM de CaCl₂; 10 mM de KCl; glicerol al 15 %; la solución se ajustó a pH 6.5 con KOH) y nuevamente se mantuvieron en hielo durante 15 min. Por último, se hicieron alícuotas de 300 µl cada una y se almacenaron a -70°C. Para la transformación, 3 µl de la reacción de ligación se mezcló con 100 µl de las bacterias competentes durante 20 min en hielo. Posteriormente se le aplicó un pulso a 42°C durante 5

min para inmediatamente colocarlas nuevamente en hielo por 5 min: Se les adicionó 1 ml de medio Luria para incubarlas a 37°C durante 35 min. Para seleccionar a las bacterias transformadas, se crecieron en cajas de medio Luria ampicilina (100 mg/ml). Además, para seleccionar a las bacterias que tenían plásmido con el producto de PCR se seleccionó por α -complementación para lo cual, a cada caja de cultivo se le colocó un césped de 30 μ g/ml de X-Gal con 3 mg/ml de IPTG como inductor del gen de la β -galactosidasa (Ausbel *et al.*, 1994). Por último se seccionaron las colonias que presentaron coloración blanca lo que indicó que estas colonias tenían una mutación o que tenían al inserto, en tanto que las colonias de color azul estaban sin inserto.

D) Purificación de los plásmidos.

Las colonias blancas de *E. coli* se expandieron en cajas de medio Luria ampicilina (100 mg/ml) dejándolas crecer durante 12 horas. Se tomó un poco de la colonia expandida para resuspenderla en 200 μ l de amortiguador de lisis (10 mM de Tris-HCl a pH 8.5, 5 mM de EDTA a pH 8, 100 mM de NaCl), mas 1 vol de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1). Las bacterias se rompieron mediante agitación en el vórtex durante 3 min. La fase acuosa se obtuvo, se centrifugó a 14,000 rpm por 15 min a temperatura ambiente y se le agregó 100 ng de RNasa A a temperatura ambiente durante 5 min. El plásmido se recuperó por precipitación con 10 % de acetato de sodio 3 M y 2.5 volúmenes de etanol al 95 %. Se mantuvo a 4°C durante 15 min para después centrifugarlo a 14,000 rpm durante 15 min a 4 °C. La pastilla se lavó con 500 μ l de etanol al 70 % y se volvió a centrifugar durante 5 min. El plásmido se dejó secar a temperatura ambiente durante 10 min y se resuspendió en 200 μ l de agua esterilizada en autoclave y filtrada a través de filtros de poro de 0.22 μ m.

Para identificar a los plásmidos que insertaron al producto de PCR se realizaron 2 métodos, en función del número de pares de bases del inserto. Para insertos menores a 500 pb se amplificó por PCR la región del polilinker con los oligodesoxinucleótidos que contiene las secuencias M13 y T7 presentes en el plásmido (Tabla 1; apéndice). Se colocó 2 μ l del plásmido en los mismos componentes que el de

las reacciones de PCR genómico. Las condiciones de la amplificación fueron 25 ciclos de: 96 °C durante 10 seg; 55 °C durante 10 seg y 72 °C durante 25 seg.

Para fragmentos mayores a 600 pb se liberó el inserto del plásmido por medio de enzimas de restricción se utilizó la enzima *Eco* RI. A 18 µl del plásmido se le agregó 2 µl del amortiguador 10X y 2 U de la enzima. La reacción se mantuvo a 37 °C durante 30 min.

Los productos de las reacciones de PCR y de la restricción del plásmido fueron separados por electroforesis en gel de agarosa al 2 % en amortiguador TAE 1X. El DNA fue visualizado después de teñir el gel con bromuro de etidíolo y la imagen se digitalizó en un transiluminador (Eagleye, Stratagene).

E) Secuencia de los plásmidos y de los productos de PCR.

Las clonas se secuenciaron con el kit Applied Biosystem Prism Dye deoxy Sequencing en un secuenciador automático Mod. ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Para la reacción se usaron 10 ng de producto de PCR o 400 ng para el caso de los plásmidos junto con 8 pmol de oligonucleótido M13, para la cadena sentido, y M7 para la cadena antisentido y 8 µl de la mezcla de terminación. El volumen de la reacción fue de 20 µl. Las condiciones de incubación fueron 25 ciclos a 96 °C durante 10 seg; 50 °C durante 10 seg y 60 °C durante 4 min.

Los productos de la reacción se purificaron por precipitación. La reacción se llevó a un volumen final de 40 µl y se le adicionó 60 µl de isopropanol al 100%. Se mantuvo a temperatura ambiente y en oscuridad durante 30 min. Los productos se recuperaron mediante centrifugación durante 30 min a 14,000 rpm y temperatura ambiente. La pastilla se lavó con 250 µl de isopropanol al 75% y se volvió a centrifugar por 10 min. Por último se dejó secar a temperatura ambiente antes de ser secuenciada.

F) Análisis de las secuencias de los ácidos nucleicos.

Las secuencias de los ácidos nucleicos de las clonas se compararon con las de otros genes reportados en el GeneBank, con los programas BLAST y FASTA. Para la traducción conceptual, se utilizó el programa Translate de la base de datos del EMBL.

RACE 3' para los RNAm de la HCP, de la beta-Actina y de la G3PDH.

El ensayo se dividió en tres pasos: A) la síntesis del cDNA, B) la purificación del cDNA y C) la amplificación del cDNA por RT-PCR. Para la síntesis del cDNA de la beta-Actina y de la G3PDH se utilizó RNA total del músculo y para el cDNA de la HCP, se empleó RNA total de los tallos oculares.

Síntesis del cDNA

Para la reacción de síntesis del cDNA se empleó como iniciador al oligodesoxinucleótido POLTCUTRACE3, cuya secuencia es de 21 timinas y la secuencia de oligodesoxinucleótidos que reconocen las enzimas de restricción: *Not* I, *Sph* I, *Pis* I, *Vsp* I y *Ase* I (5' GCG GCC GCA TGC TTA TAA TTA ATC TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT 3'). Se emplearon 5 µg del RNA total de músculo y de los tallos oculares de las muestras de un ciclo de 24 horas, en donde cada 3 horas se tomo una muestra. Al RNA total se le adicionó 500 ng de oligodesoxinucleótido POLTCUTRACE3, y 4 µl de 10 mM de dNTPs. La mezcla se desnaturalizó a 95°C durante 1 min, en seguida se incubó a 75°C durante 5 min e inmediatamente se colocó en hielo. Se agregó el amortiguador de la enzima a una concentración final 50 mM de Tris-HCl a pH 8.3; 75 mM de KCL; 3 mM de MgCl₂ mas, 0.01 M de DTT y 300 U de la enzima SuperScript II. La reacción se llevó a cabo a 42 °C durante 50 min y se finalizó calentándola a 85°C durante 5 min.

Para eliminar al RNA de la reacción, el cDNA fué tratado con una mezcla de RNasas a 37 °C durante 20 min. La mezcla estuvo formada por 1U de RNasa H para el híbrido RNA-DNA; 5U de RNasa T1, 10 U de RNasa T2 y 2 ng de RNasa A las cuales hidrolizan preferentemente al RNA de cadena sencilla, que en el extremo 3' presenten residuos de guanina y adenina, respectivamente.

Purificación del cDNA

Por último el cDNA se purificó por columnas acopladas a sílica gel (ver purificación de productos de PCR) para retirar al oligodesoxinucleótido POLTCUTRACE3, a los restos del RNA, a las sales de los nucleótidos no incorporados y a todas las enzimas.

Reacción de RT-PCR

La reacción de RT-PCR del cDNA de la HCP se llevó a cabo con el oligodesoxinucleótido RA3HCECqu que contiene los codones de la secuencia de los aminoácidos de la HCP (secuencia obtenida en este trabajo; Tabla 2A; Apéndice). Para la beta-Actina y la G3PDH se utilizaron los oligodesoxinucleótidos UACT y U2G3Dpu, respectivamente. En todas las reacciones se empleó, como oligodesoxinucleótido antisentido, la secuencia de los sitios de restricción del POLCOTRACE3' (CUTRACE3'; Tabla 4A; Apéndice). La composición del amortiguador, la concentración de los oligodesoxinucleótidos y del MgCl₂, fueron las empleadas para las reacciones de RT-PCR del RNA ribosomal. En estas reacciones de RT-PCR se incluyó una variante en la composición de las DNA polimerizas ya que para amplificar fragmentos mayores a 1,000 pb se utilizó 2.5 U de *Taq* polimerasa y 1.5 U de *Depp Vent*. Las condiciones de incubación fueron 32 ciclos a 96 °C durante 15 seg; 62 °C durante 15 seg y 72 °C durante 90 seg.

Los productos obtenidos se clonaron, se secuenciaron, y se analizaron con el mismo protocolo empleado para los productos de las reacciones de PCR genómico.

RACE 5' para el RNAm de la HCE, de la beta-Actina y de la G3PDH.

El ensayo de RACE 5' puede realizarse por dos procedimientos, el primero consiste en formar una región de adeninas en el extremo 3' de un cDNA con la enzima polinucleótido transferasa terminal; esta nueva región en el cDNA permite formar la cadena complementaria al cDNA con un oligodesoxinucleótido para RACE 3' (Frohman *et al.*, 1998). La segunda manera de hacer el RACE 5' consiste en unir un riboligonucleótido al extremo 5' del RNA mensajero, para lo cual, el grupo metilo

del CAP de los RNAs mensajeros se elimina con la enzima pirofosfatasa ácida del tabaco. Posteriormente se une el oligoribonucleótido a los RNAm con la enzima RNA ligasa. Al realizar la síntesis de cDNA se copia el oligoribonucleótido que está unido al RNA y ahora funciona como oligodesoxinucleótido sentido en una reacción de RT-PCR (Schaefer, 1995). La diferencia principal entre ambos protocolos radica en que la adición de adeninas en el cDNA produce un alto número de productos inespecíficos por lo que la clonación de cDNA de bajo número de copias es más difícil. Pero con el método de ligación de ribonucleótido de RNA se anula la cantidad de falsos positivos y permite obtener los cDNAs a partir de RNAm activos en traducción ya que únicamente se amplifican por RT-PCR las moléculas completas (Schaefer, 1995).

Se ha demostrado por inmunohistoquímica que la HCP está en un grupo de 8 a 10 neuronas del pedúnculo ocular del acocil (Rodríguez-Sosa *et al.*, 1994; Alvarado-Alvarez *et al.*, 1999) por lo que, para asegurar la presencia e integridad del RNAm de la HCP, de la beta-Actina y de la G3PDH, para caracterizar el extremo 5' de cada cDNA se empleó el método de ligación de oligoribonucleótido al RNAm. La reacción consistió de 5 pasos: A) la desfosforilación del RNA ribosomales, RNAs pequeños y de transferencia; B) la eliminación del grupo metilo del CAP del RNAm; C) la ligación del oligoribonucleótido al extremo 5' de los RNA mensajeros; D) la síntesis del cDNA; E) la amplificación del cDNA por RT-PCR.

A) Desfosforilación del RNA de los tallos oculares.

La desfosforilación del RNA resulta en la eliminación dirigida del fosfato del extremo 5' de los RNA mensajeros truncados y de las moléculas que no sean RNA mensajeros, por lo que, al unir el oligoribonucleótido con los RNAm, a los cuales se les eliminó el CAP, sólo se amplificaron por RT-PCR los cDNAs producto de los RNAm maduros y activos en la traducción. Se desfosforilaron 5 µg de RNA total de un ciclo de 24 horas (ver RACE 3'), con la enzima fosfatasa intestinal de carnero

(Invitrogen). El RNA se colocó en 0.05 mM de Tris HCl a pH 8.5; 0.01 mM de EDTA; 40 unidades de RNasaOut y 10 unidades de fosfatasa intestinal de carnero. La reacción se incubó a 50 °C durante 1 h.

Para precipitar al RNA, se adicionó 1 volumen de una mezcla de fenol, cloroformo, alcohol isoamílico (50:48:2) y se agitó en el vortex durante 30 seg. Para separar la fase acuosa, se centrifugó a 14000 rpm durante 5 min. El RNA se precipitó agregándole 20 µg de glucógeno, 10% de 3 M de acetato de sodio a pH 5.2 y 2.5 volúmenes de etanol al 95%. La reacción se mantuvo durante 10 min en hielo seco o a -70 °C por el mismo tiempo. Para recuperar al RNA se centrifugó a 14,000 rpm durante 25 min; la pastilla fue lavada con 500 µl de etanol al 70% agitándola al vortex. Por último, la pastilla se centrifugó a 14 rpm durante 5 min. El etanol se decantó para dejar secar la pastilla del RNA a temperatura ambiente durante 20 min.

B) Eliminación de la 7-metil- guanosina (CAP) del RNA mensajero.

El RNA mensajero desfosforilado se resuspendió en 10 µl de amortiguador (0.05 M de acetato de sodio a pH 6.0; 0.1 mM de EDTA; 0.1 % de beta-mercaptoetanol; 0.01% de Triton X-100) y se le adicionó 40 unidades de RNasaOut y 0.5 unidades de pirofosfatasa ácida de tabaco. La reacción se incubó a 37 °C durante 1 h. El RNA se recuperó como se indicó en la reacción de desfosforilación.

C) Ligación del oligoribonucleótido al RNAm sin CAP.

El RNA del paso anterior se resuspendió en 8 µl del amortiguador de ligación (0.0330 mM de Tris-acetato a pH 7.8; 0.660 mM de acetato de potasio; 0.100 mM de acetato de magnesio; 0.5 mM de DTT). El RNA se mezcló con 1 µl de 10 mM de ATP, 40 unidades de RNasaOut, 5 unidades de T4 RNA ligasa y 0.25 ng del oligoribonucleótido liofilizado GeneRacer (5' CGA CUG GAG CAC GAG GAC ACU GAC AUG GAC UGA AGG AGU AGA AA 3'). La reacción se incubó a 37°C durante 1 h. El RNA fue recuperó como se indicó en la reacción de desfosforilación.

D) Síntesis del cDNA.

El RNA del paso anterior se resuspendió en 40 µl de agua filtrada por una membrana de 0.22 µm de poro y esterilizada por autoclave. Para aumentar la especificidad de la reacción y evitar la formación de estructuras secundarias del RNA la síntesis de cada cDNA fue con oligodesoxinucleótidos específicos para cada RNAm; Todas las temperaturas de las reacciones fueron a 60 °C. Para la HCP se empleo el oligodesoxinucleótido antisentido LOWHCPCqu que tiene la secuencia de la parte final del extremo 3' UTR. Para la beta-Actina se utilizó el oligodesoxinucleótido LPACCqu, localizado en la parte final del producto genómico. Por último para la G3PDH se utilizó el oligodesoxinucleótido antisentido LG3Pcqu, que esta en la parte final del ORF (Tabla A3 Apéndices). Todas las reacciones fueron con la enzima Termo SuperScript (Stratagene) la cual tiene actividad a 65 °C. Se mezclaron 20% de la reacción de ligación, 500 ng del oligodesoxinucleótido para cada RNA mensajero y 3 µl de dNTPs a una concentración de 10 mM. El RNA se desnaturalizó durante 2 min a 95 °C y después a 75 °C. Por último se incubó inmediatamente en hielo y se agregó la mezcla del amortiguador (50 mM de Tris-acetato a pH 8.4; 75 mM de acetato de potasio y 8 mM de acetato de magnesio), 10 mM de DTT, 40U de RNasaOUT y 15 U de Termo SuperScript (Invitrogene). La reacción se incubó a 60 °C durante 55 min. La purificación de los cDNAs fue con el mismo método que se indica en los ensayos de RACE 3'.

E) Amplificación de los extremos 5' del cDNA por RT-PCR.

Se realizó la reacción de RT-PCR para amplificar el extremo 5' de cada cDNA. Se utilizó el oligodesoxinucleótido sentido GENERACE 5' para los tres cDNAs. El oligodesoxinucleótido antisentido para la HCP fue RA5HCPCqu que corresponde a los desoxinucleótido que contiene a los codones del péptido activo. Para la beta-Actina fué el oligodesoxinucleótido RA5ACCqu, que está en la parte inicial del producto de RACE 3'. Para la G3PDH el mismo oligodesoxinucleótido LG3Pcqu que corresponde a la parte final del marco abierto de lectura (Tabla A3; apéndice).

Los componentes de cada reacción fueron: 20% del cDNA, 100 pmol de cada oligodesoxinucleótido con 20 mM de Tris-HCl a pH 9.4, 50 mM de KCl, 1.5 mM de MgCl₂, 0.2 mM de cada uno de los dNTP y 5 U de *Taq* platinum DNA polimerasa (Invitrogene). Las condiciones de incubación de las tres reacciones fueron 35 ciclos a 96 °C durante 30 seg, 55 °C durante 20 segundos y 72 °C durante 1 min. Los productos obtenidos se clonaron, se secuenciaron y se analizaron con el mismo protocolo empleado para los productos de las reacciones de PCR genómico.

Expresión del RNAm de la HCP, de la beta-Actina y de la G3PDH en diferentes tejidos del acocil.

Para verificar la expresión del producto genómico, de RACE 5' y 3' de cada molécula de este estudio, se realizó el empalme de los productos obtenidos para obtener el posible marco abierto de lectura. Los sitios de empalme y el tamaño del ORF se comprobaron con la amplificación, por RT-PCR, de todo el marco abierto de lectura del cDNA utilizando diferentes tejidos del acocil. Para cada RNAm se diseñaron un juego de oligodesoxinucleótidos que incluyeron desde el sitio de inicio de la traducción en dirección sentido, al codón de paro en dirección antisentido. La obtención del RNA total se realizó con la sumatoria del RNA total de un ciclo de 24 horas tomando muestras durante intervalos de 3 horas del tallo ocular, del hepatopáncreas, de las branquias y del músculo. Se empleó el mismo método de extracción para el RNA empleado en los ensayos de clonación.

Las condiciones de síntesis del cDNA fueron las mismas para todos los tejidos. Se empleó 500 ng de un oligodesoxinucleótido de 24 timinas (poliT), 5 µg de RNA total y 4 µl de 10 mM de dNTPs. La mezcla se desnaturalizó a 95 °C durante 1 min, posteriormente a 75°C durante 5 min e inmediatamente se colocó en hielo. Se agregó el amortiguador (50 mM de Tris-HCl a pH 8.3; 75 mM de KCL; 3 mM de MgCl₂) mas 0.01 M de DTT y 300 U de la enzima SuperScript II. La reacción se incubó a 42 °C durante 50 min y se finalizó calentándola a 85 °C por 5 min. Como control de la integridad del RNA de cada

tejido se amplificó el cDNA del ribosomal 18S del acocil *C. quadricarinatus* (Crandall *et al.*, 2000). Las únicas diferencias con la reacción anterior fueron: A) el oligodesoxinucleótido empleado para la síntesis de cDNA correspondió a la parte final del RNAr 18S (LPRNAr18; apéndice); B) la temperatura de la reacción fue a 52 °C; C) se utilizó 1 mg de RNA total para la síntesis del cDNA. La purificación de todos los cDNAs de todos los tejidos fue con el mismo método que se indica en los ensayos de PCR.

Para asegurar la amplificación de los productos obtenidos se empleó una mezcla de las DNA polimerasas *Taq* y *Deep Vent*. Los oligodesoxinucleótidos utilizados para la HCP fueron UORFHCPcqu1-LORFHCPcqu1; para la beta-Actina fueron UORFACCqu-LORFACCqu; para la G3PDH fueron UORFG3Cqu-LORFG3Cqu y para el RNAr 18S fueron URNAr18-LRNAr18. Los componentes de la reacción fueron los mismos que los que se emplearon en la amplificación por RT-PCR mediante RACE3'. Las secuencia de cada oligodesoxinucleótido y condiciones de amplificación, se encuentran en el las Tablas A4 y A5, respectivamente (ver apéndices). Los productos de cada reacción se separaron por electroforesis en gel de agarosa al 0.9% en amortiguador TAE 1 X y las bandas se visualizaron con bromuro de etidíolo. Por último se comparó las secuencias de ácidos nucleicos y de aminoácidos de cada cDNA con las secuencias reportadas en el GeneBank mediante los programas BLAST y FASTA los cuales dan un porcentaje de homología y de identidad con las secuencias de las bases de datos.

Determinación y cuantificación de los cDNAs de la HCP, de la beta-Actina y de la G3PDH en ciclos luz-oscuridad por reacciones semicuantitativas tipo RT-PCR.

Para las reacciones de RT-PCR semicuantitativas del RNAm de la beta-Actina, de la HCP, de la G3PDH y del RNA ribosomal 18S de los tallos oculares de *C. quadricarinatus* acondicionados a ciclos de luz-oscuridad y en oscuridad constante, se realizaron 3 pasos: A) el acondicionamiento de los acociles a ciclos de luz-oscuridad y oscuridad constante; B) la determinación del punto medio de la fase

logarítmica de la reacción de RT-PCR para cada RNAm; C) la cuantificación de cada uno de los cDNAs y el análisis estadístico de los productos de RT-PCR.

A) Acondicionamiento de los acociles.

Los acociles juveniles *Cherax quadricarinatus* en estadio de intermuda de un tamaño promedio de 12 cm fueron obtenidos del Centro Piscícola El Higuierón, localizado en el municipio de El Higuierón en el Estado de Morelos, México. Los acociles se dividieron en lotes de 15 a 20 animales por tina. Se acondicionaron durante 3 semanas a ciclos de luz-oscuridad de 24 h cada uno (luz 12 – oscuridad 12; la luz se prendía a las 8.00 de la mañana y se apagaba las 8.00 de la noche). Otro lote de animales estuvo en oscuridad constante por periodos de 3 semanas a 4 meses. Los acociles fueron alimentados *ad libitum* con alimento comercial (Cameronina, Purina). La temperatura del agua fue constante durante todo el periodo de aclimatación.

Cada punto de un ciclo de 24 h consistió de 10 tallos oculares que fueron recolectados a intervalos de 3 horas durante los ciclos de luz-oscuridad u oscuridad constante por 36 y 48 h. Consideramos como punto cero al momento en que se prendió la luz (8.00 de la mañana del día normal). La extracción del RNA total, así como la concentración en cada muestra fueron obtenidas y determinadas por los métodos indicados anteriormente.

B) Determinación del punto medio de la fase logarítmica del ensayo del RT-PCR.

El primer paso para determinar el punto medio de la fase exponencial de la reacción de RT-PCR de la HCP; de la beta-Actina; de la G3PDH y del RNAr 18S fue la síntesis del cDNA a partir de concentraciones de 0.75, 2 y 3 μg de RNA total, mientras que para el RNAr 18S, fué a partir de 0.05, 0.1 y 0.5 μg de RNA total. En todos los casos el RNA utilizado fue el de la sumatoria de las muestras del ciclo de luz-oscuridad de 24 h.

Para la síntesis de cDNA, se utilizó 200 U de la enzima Superscript, en su respectivo amortiguador, con 10 mM de dNTPs y 0.01 mM de DTT. Para la copia del RNAm se utilizó el

oligodesoxinucleótido poly T con una temperatura de polimerización de 42°C; mientras que, para el RNA ribosomal 18S se utilizó al oligodesoxinucleótido LPRNAr18; en este caso la polimerización fue a 50 °C. Por ultimo el cDNA fue tratado con la mezcla de RNAsas.

Para la reacción de RT-PCR de la HCP se amplificó desde la posición 124 (UCHCPCq) hasta la posición 365 (UCHCPCq). Para la beta-Actina se amplifico desde la posición 597 (UACcq) a la posición 1,112 (LACcq). Para la G3PDH la amplificación fué de la posición 537 (UCG3Cqu) hasta la posición 922 (LCG3Cqu) (Tabla A6; apéndice). Para todas las reacciones se empleó una mezcla de 2 U de la enzima *Taq* polimerasa, 10% de la reacción del cDNA y el amortiguador como se indicó anteriormente. Las condiciones de incubación de ambas reacciones fueron 35 ciclos de 30 seg a 96 °C, 20 seg a 60 °C y 25 seg a 72 °C. Para el RNAr 18S (Crandall *et al.*, 2000) se amplificó desde la posición 59 hasta la posición 1791 (UPRNAr18-LPRNAr18 Tabla A6; apéndice). En este caso se empleó 2 U de *Taq* polimerasa y 0.25 U de *Deep Vent* en el amortiguador de la *Taq* DNA polimerasa, como se indicó previamente. Las condiciones de la incubación de la reacción fueron 25 ciclos de 30 seg a 96 °C, 20 seg a 62 °C y 2 min a 72 °C.

Para determinar la fase exponencial de la reacción de RT-PCR, de cada uno de los cDNA, se comenzó a monitorear el producto esperado recolectando las muestras cada 5 ciclos. Establecido el inicio y la parte final de la fase exponencial, se tomaron muestras después de cada ciclo para establecer en que ciclo de la curva estaba el punto medio de la fase exponencial, independientemente de la concentración del RNA empleado en la síntesis del cDNA. Por ultimo, para verificar la fidelidad de la amplificación, los productos de la reacciones de RT-PCR los productos se secuenciaron como se indicó previamente.

C) Cuantificación y análisis de los productos de RT-PCR.

Los productos de cada reacción fueron separados por electroforesis en gel de agarosa al 2 % en amortiguador TAE 1X. La cuantificación de cada producto fue en función del número de píxeles digitalizados en la computadora (Eagle Eye Stratagene).

Para determinar la concentración del cDNA de la HCP, de la beta-Actina, de la G3PDH y del RNAr 18S de los diferentes grupos de acociles, los valores digitalizados de cada reacción de RT-PCR fueron normalizados y el valor máximo en el ciclo de 24 horas fue considerado como el 100 %. Las variaciones obtenidas para cada muestra fueron ajustadas a este valor. Se utilizó la función de COSINOR por el método de mínimos cuadrados; Este análisis, ajusta los datos a una función cosenoidal y provee una prueba objetiva de la amplitud de un ritmo que es diferente a cero. La función de coseno utilizada fue: $y = M + A \cos(x + \phi)$. En donde: y es la media de la variable; M corresponde al valor medio del perfil del ritmo; A es la amplitud del ritmo, la cual es la diferencia entre el punto mayor y el punto menor; x es el tiempo del día expresado en radianes. El coeficiente de determinación r^2 para la función no lineal, fue utilizado como un índice de la ritmicidad. Cuando el valor de r^2 es menor a 0.4 los valores de la curva no son estadísticamente significativos y se considera que los cambios entre los datos, en un periodo de 24 h, son constantes (Vega, 1993). En caso de que el valor de r^2 sea de 0.5 se considera que existe la posibilidad de un ritmo. Si el valor de la r^2 es mayor a 0.6 se considera que los valores de la curva se ajustan a una función cosenoidal por lo que estadísticamente son rítmicos. Todos los análisis estadísticos se realizaron con los programas computacionales del paquete ORIGIN.

Análisis evolutivo y relaciones filogenéticas del precursor de la HCP.

Para determinar la relación filogenética del cDNA del precursor de la HCP del acocil *C. quadricarinatus* se realizaron análisis comparativos entre los genes y los cDNAs de crustáceos con otras familias de neuropéptidos.

La secuencia de ácidos nucleicos y de aminoácidos de la HCP fue alineada con otros precursores neuropeptídicos que presentan homología e identidad en su composición de aminoácidos. Principalmente con los cDNAs de los precursores de la hormona adipocinética (HAC), la cual, regula el metabolismo de lípidos y azúcares durante el vuelo de los insectos. Además se incluyó al cDNA del precursor para la APGW amida, que regula la espermatogénesis en los moluscos. Las secuencias de los cDNAs de los precursores de la HCP fueron de los cangrejos *Carcinus maenas* (Link *et al.*, 1993) y *Callinectes sapidus* (Klein *et al.*, 1994). Las secuencias de los cDNAs de los precursores de la HAC fueron de las HAC I, II y III de los grillos *Locusta migratoria* (Bogerd *et al.*, 1995), la HAC II de *Shistocerca gregaria* (Fischer-Lougheed *et al.*, 1993), las HAC I y II de *Schistocerca nitans* (Noyes y Schaffer, 1990), la HTH de la cucaracha *Blaberus discoidalis* (Lewis *et al.*, 1997). Los cDNAs de las APGWamidas de la babosa marina *Aplysia californica* (Fan *et al.*, 1997), del mejillón azul *Mytilus edulis* (Favrel y Mathieu, 1996) y del caracol *Lymnaea stagnalis* (Smit *et al.*, 1992). Los genes utilizados fueron, el gen de la HCP de la jaiba *Callinectes sapidus* (Martínez-Pérez *et al.*, 2000) y los genes HAC de la palomilla *Manduca sexta* (Bradfield y Keeley, 1989), de la mosca *Drosophila melanogaster* (Noyes *et al.*, 1995) y del grillo *Shistocerca nitans* (Noyes y Schaffer, 1993).

Los alineamientos de los precursores se hicieron con el programa ClustalW. Los resultados de los alineamientos fueron editados y analizados con el programa GeneDco (Nicholas *et al.*, 1997). Los árboles filogenéticos se obtuvieron con el método del promedio en distancia en los árboles filogenéticos, para después ser editados con el programa Component, v. 2.0 (Slowinski, 1993). La determinación de la estructura secundaria fue por los métodos propuestos por Gibralt *et al.*, (1984) y Geourjon, y Deléage (1994).

Resultados

Obtención de ácidos nucleicos.

La pureza de los ácidos nucleicos en Biología Molecular es básica para poder realizar cualquier experimento. Para el caso del acocil *Cherax quadricarinatus* no existía una metodología que permitiera obtener el DNA y el RNA total del pedúnculo ocular, libre de los pigmentos, de los compuestos fenólicos y de los carbohidratos, que coprecipitan con los métodos desarrollados a la fecha (Chomczynski y Sacchi, 1985; Sewall y McRae, 1998). Además, el protocolo debía de tener una alta eficiencia en la obtención del RNA; facilitar el manejo de un alto número de muestras en poco tiempo.

Con las modificaciones efectuadas al protocolo de obtención selectiva del DNA del músculo del acocil, se obtuvo un cociente promedio de absorción de la luz U.V. de 1.9 en la relación 260/280 nm y una concentración de 500 µg/g de tejido lo que indicó que el DNA no tuvo contaminantes protéicos. El criterio para determinar la integridad del DNA fue el tamaño de los fragmentos, mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%. Se demostró que todos los fragmentos migraron por arriba del marcador de 23.1 kb del DNA del fago λ cortado con la enzima *Hind* III. Por otra parte no se detectó RNA en las muestras (Fig. 5A). En cuanto al RNA total, con las modificaciones realizadas al método propuesto por Chomzynski y Sacchi (1987), y el uso de las perlas de vidrio y la precipitación con alta sal, se logró reducir hasta un 99% la cantidad de los pigmentos que coprecipitan con el RNA de los pedúnculos oculares, del músculo, de las branquias y del hepatopáncreas.

Como criterio de pureza del RNA, se calculó el cociente promedio de absorción a la luz U.V., que fué de 1.9 en la relación 260/280 nm para todos los tejidos, en los que no se observó degradación molecular a juzgar por la integridad del tamaño de los RNA ribosomales después de la electroforesis en gel desnaturizante de agarosa al 1.5% en formaldehído 2.2 M. Otro control para corroborar la integridad del RNA obtenido por este nuevo método, fué la amplificación por RT-PCR del RNA ribosomal 18S de los pedúnculos oculares, del músculo, de las branquias y del hepatopáncreas,

utilizando las *Taq* y *Deep Vent* DNA polimerasas en el mismo tubo de reacción. En todos los casos se obtuvieron los productos esperados de 1732 pb, lo que comprobó que el RNA obtenido por el método desarrollado en este trabajo, es el adecuado para amplificar productos de cDNA de más de las 2,000 pb (Fig. 5B).

Para determinar la tasa de mutación de la mezcla de polimerasa se secuenció el producto de RT-PCR. La secuencia de los cDNAs del RNAr 18S en los pedúnculos oculares (Fig. 5, carril2), fué idéntica a la secuencia reportada en el GENE BANK (AF235966). Este resultado demostró la fidelidad de ambas enzimas al copiar las cadenas complementarias en la reacción de RT-PCR, lo cual era una condición necesaria en la clonación y caracterización de la secuencia de los cDNA.

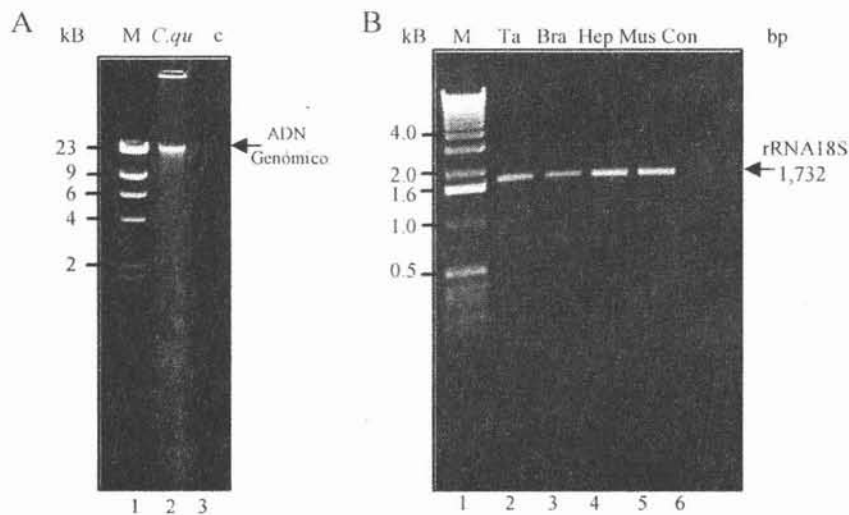


Figura 5.- Identificación del DNA, genómico y de los productos de RT-PCR del RNAr 18S del acocil *C. quadricarinatus* (*C.qu*). A) El DNA genómico del músculo, obtenido por el método propuesto en este trabajo, se separó por electroforesis en gel de agarosa al 0.8 % (flecha). B) El producto de 1,732 pb de la reacción de RT-PCR, que corresponde al RNAr 18S de los pedúnculos oculares (Ta), de las branquias (Bra), del hepatopáncreas (Hep) y del músculo (Mus), se indica con una flecha. Las reacciones se separaron por electroforesis en gel de agarosa al 1%. Los marcadores de pesos moleculares (M) fueron: DNA del bacteriófago λ cortado con la enzima *Hind* III (A) y escalera de DNA de 1 kb (Invitrogene) (B).

Clonación y caracterización del cDNA del precursor de la HCP, de la beta-Actina y de la G3PDH.

Para poder realizar la cuantificación del RNAm de la HCP era necesario tener los elementos moleculares para determinar los cambios en su concentración por ciclos de luz-oscuridad y en oscuridad constante. Además era necesario determinar la concentración de genes constitutivos en el tallo ocular. Debido a que en el acocil *C. quadricarinatus* se desconocía la secuencias del cDNA de la beta actina y de la G3PDH en el acocil *C. quadricarinatus* que serian utilizados como control en los experimentos de ritmo circadiano fue necesaria también su clonación. La secuencia del cDNA también fue utilizada en los análisis evolutivos con los cDNAs de los miembros de la familia HCP/HAC.

La clonación de los tres cDNAs consistió de 2 pasos: primero se clono una región conservada de cada gen y son la secuencia obtenida se realizo ensayos de RACE para conocer la secuencia de cada RNAm.

Clonación del cDNA de la beta-Actina.

Para clonar el cDNA de la beta-Actina se utilizó la reacción de PCR con los oligodesoxinucleótidos UACT-LACT. Se obtuvo el producto genómico de 160 pb aproximadamente (Fig. 6A carril 2) cuya secuencia mostró un 92% de identidad con la secuencia de *P. clarkii*. Al utilizar los oligodesoxinucleótidos race5ACcq y UACT en los ensayos de RACE 5' y 3' respectivamente, con RNA total de pedúnculos oculares, se obtuvieron productos de 650 y 300 pb aproximadamente para el extremo 5' y de 800 pb aproximadamente para el extremo 3' (Fig. 6B y C carril 2 respectivamente). Al empalmar las secuencias del producto genómico y del RACE 5' y 3' se obtiene un cDNA de 1,193 pb. Los 13 primeros nucleótidos forman parte del extremo 5' UTR. El ORF está formado por 378 codones. En el extremo 3' UTR hay dos posibles sitios de poliadenilación en las posiciones 1150-1165 y 1172-1177 (GeneBank AY430093; Fig. 7).

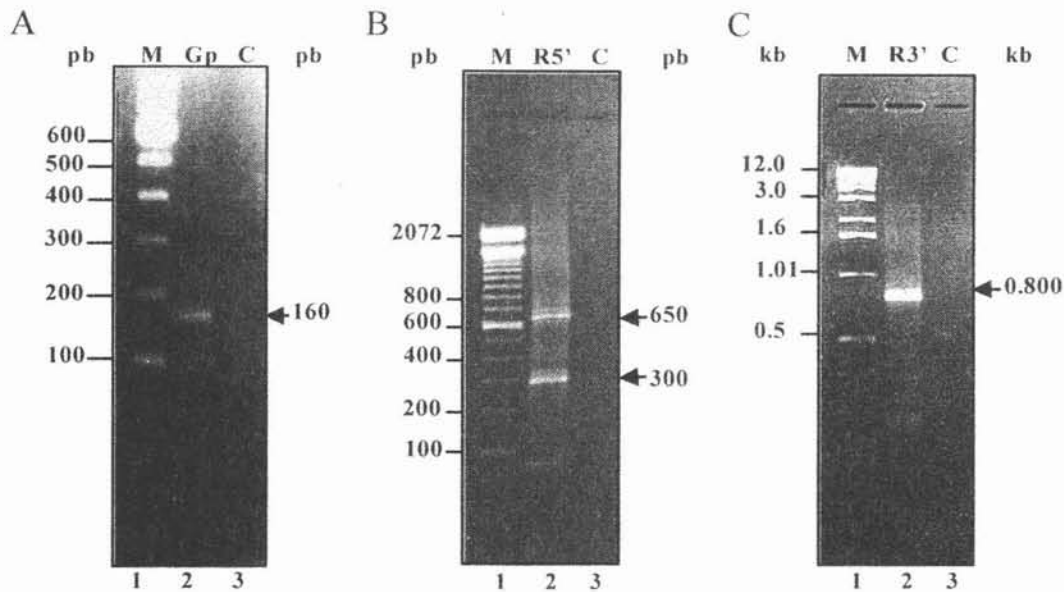


Figura 6.- Productos de las reacciones de PCR y RT-PCR para la clonación del cDNA de la beta-Actina. A) producto de la reacción de PCR con DNA genómico del acocil *C. quadricarinatus* con los oligodesoxinucleótidos uACpc-lACpc específicos de la beta-Actina del acocil *P. clarkii* (Gp carril 2). B) Producto de RACE 5' (R5') a partir de RNA total de los pedúnculos oculares; la amplificación se realizó con el oligodesoxinucleótido antisentido lACRACE5 (Apéndice 1A) diseñado a partir de la secuencia del producto genómico (Fig. A carril 2). C) Producto de la reacción de RACE 3' (R3'). Los productos que corresponden a la secuencia de la beta-Actina y el producto secundario de aproximadamente 300 pb se indican con una flecha negra. Todas las reacciones se separaron por electroforesis en gel de agarosa al 1.8 %. Los marcadores de pesos moleculares (M) fueron: escalera de DNA de 100 pb y de 1 kb (A, C y B respectivamente; Invitrogene).

Al empalmar las secuencias del producto genómico y del RACE 5' y 3' se obtiene un cDNA de 1,193 pb. Los 13 primeros nucleótidos forman parte del extremo 5' UTR. El ORF está formado por 378 codones. En el extremo 3' UTR hay dos posibles sitios de poliadenilación en las posiciones 1150-1165 y 1172-1177 (GeneBank AY430093; Fig. 7).

La traducción conceptual del RNAm de la beta-Actina codifica para una proteína de 377 aminoácidos y un peso molecular teórico de 41,925.99 daltones, en donde las firmas protéicas universales de Actina (Pollard, 1990) Actina 1 ((FY)-(LIV)-G-(DE)-E-A-Q-x-(RKQ)(2)-G), proteínas

-12		Met	Cys	Asp	Glu	Glu	Glu	Leu	Thr	Ala	Leu	Val	Val	Asp	Asn	Gly	Ser	Gly	17	
cgaactaccatc	ATG	TGT	GAC	GAA	GAG	GAG	CTG	ACT	GCC	CTT	GTG	GTC	GAC	AAT	GGC	TCC	GGC	51		
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	
Leu	Cys	Lys	Ala	Gly	Phe	Ala	Gly	Asp	Asp	Ala	Pro	Arg	Ser	Val	Phe	Pro	Ser	Ile	Val	37
CTT	TGC	AAG	GCC	GGC	TTC	GCC	GGA	GAC	GAC	GCT	CCC	CGT	TCT	GTC	TTC	CCC	TCC	ATC	GTC	111
Gly	Arg	Ala	Arg	His	Gln	Gly	Val	Met	Val	Gly	Met	Gly	Gln	Lys	Asp	Ala	Tyr	Val	Gly	57
GGC	CGC	GCC	CGT	CAC	CAG	GGT	GTG	ATG	GTC	GGT	ATG	GGT	CAG	AAG	GAC	GCC	TAT	GTT	GGC	171
Asp	Glu	Ala	Gln	Ser	Lys	Arg	Gly	Ile	Leu	Thr	Leu	Asn	Tyr	Pro	Ile	Glu	His	Gly	Ile	77
GAT	GAG	GCC	CAG	AGC	AAG	CGT	GGT	ATC	CTC	ACC	CTC	AAC	TAC	CCC	ATT	GAA	CAC	GGT	ATC	231
Ile	Thr	Asn	Trp	Asp	Asp	Met	Glu	Lys	Ile	Trp	Tyr	His	Thr	Phe	Tyr	Asn	Glu	Leu	Arg	97
ATC	ACC	AAC	TGG	GAT	GAC	ATG	GAG	AAG	ATC	TGG	TAC	CAT	ACT	TTC	TAC	AAT	GAG	CTC	CGT	291
8	9	100	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	1	2	3	4	5	6	7	
Val	Ala	Pro	Glu	Glu	Ser	Pro	Thr	Leu	Leu	Thr	Glu	Ala	Pro	Leu	Asn	Pro	Lys	Ala	Asn	117
GTT	GCC	CCC	GAG	GAG	TCC	CCC	ACA	CTT	CTC	ACT	GAG	GCT	CCC	CTC	AAC	CCC	AAG	GCC	AAC	351
8																				
Arg	Glu	Lys	Met	Thr	Gln	Ile	Met	Phe	Glu	S	Phe	Asn	Val	Pro	Ala	Thr	Tyr	Ile	Thr	137
CGT	GAG	AAG	ATG	ACT	CAG	ATC	ATG	TTC	GAG	TCC	TTC	AAT	GTA	CCT	GCC	ACT	TAC	ATT	ACC	411
Ile	Gln	Ala	Val	Leu	Ser	Leu	Tyr	Ala	Ser	Gly	Arg	Thr	Thr	Val	Leu	Val	Cys	Asp	Ser	157
ATC	CAG	GCT	GTG	CTC	TCC	CTC	TAC	GCC	TCT	GGT	CGT	ACC	ACT	GTT	CTG	GTG	TGC	GAC	TCT	471
Gly	Asp	Gly	Val	Thr	His	Met	Val	Pro	Val	Tyr	Glu	Gly	Phe	Ala	Leu	Pro	His	Ala	Ile	177
GGT	GAT	GGT	GTC	ACT	CAC	ATG	GTC	CCC	GTG	TAT	GAA	GGT	TTC	GCC	CTT	CCT	CAT	GCC	ATC	531
Leu	Arg	Leu	Asp	Leu	Ala	Gly	Arg	Asp	Leu	Thr	Gln	Tyr	Leu	Met	Lys	Ile	Met	Thr	Glu	197
CTT	CGT	CTT	GAC	CTT	GCT	GGT	CGT	GAC	CTG	ACC	CAG	TAT	CTC	ATG	AAG	ATC	ATG	ACT	GAG	591
Arg	Gly	Tyr	Ser	Phe	Thr	Thr	Thr	Ala	Glu	Arg	Glu	Ile	Val	Arg	Asp	Ile	Lys	Glu	Lys	217
CGT	GGC	TAC	TCC	TTC	ACC	ACC	ACA	GCT	GAG	CGT	GAG	ATT	GTC	CGT	GAC	ATC	AAG	GAG	AAG	651
Leu	Cys	tyr	Ile	Ala	Leu	Asp	Phe	Glu	Asn	Glu	Met	Asn	Val	Ser	Ala	Ala	Ser	Ser	Ser	237
CTT	TGC	TAC	ATT	GCC	CTT	GAC	TTC	GAG	AAT	GAG	ATG	AAT	GTA	TCT	GCA	GCT	TCT	TCG	TCT	711
Ile	Asp	Lys	Ser	Tyr	Glu	Leu	Pro	Asp	Gly	Gln	Val	Ile	Thr	Ile	Gly	Asn	Glu	Arg	Phe	257
ATT	GAC	AAG	TCC	TAC	GAG	CTT	CCC	GAC	GGT	CAG	GTC	ATC	ACC	ATT	GGT	AAT	GAA	CGC	TTC	771
Arg	Cys	Pro	Glu	Ala	Leu	Phe	Gln	Pro	Ser	Phe	Leu	Gly	Met	Glu	Ser	Ala	Gly	Val	His	277
CGT	TGC	CCC	GAG	GCT	CTG	TTC	CAG	CCT	TCC	TTC	CTT	GGT	ATG	GAA	TCT	GCT	GGT	GTT	CAT	831
Glu	Thr	Val	His	Ser	Ser	Ile	Met	Arg	Cys	Asp	Ile	Asp	Ile	Arg	Lys	Asp	Leu	Phe	Ala	297
GAA	ACC	GTC	CAC	AGC	TCC	ATC	ATG	AGG	TGC	GAC	ATT	GAC	ATC	AGG	AAG	GAC	CTG	TTC	GCC	891
Asn	Ile	Val	Met	Ser	Gly	Gly	Thr	Thr	Met	Tyr	Pro	Gly	Ile	Ala	Asp	Arg	Met	Gln	Lys	317
AAC	ATT	GTC	ATG	TCT	GGT	GGT	ACC	ACC	ATG	TAC	CCT	GGT	ATT	GCT	GAC	CGC	ATG	CAG	AAG	951
Glu	Ile	Thr	Ala	Leu	Ala	Pro	Ala	Thr	Ile	Lys	Ile	Lys	Ile	Ile	Ala	Pro	Pro	Glu	Arg	337
GAA	ATC	ACT	GCT	CTG	GCT	CCT	GCT	ACC	ATC	AAG	ATC	AAG	ATC	ATT	GCT	CCT	CCC	GAG	CGT	1011
Lys	Tyr	Ser	Val	Trp	Ile	Gly	Gly	Ser	Ile	Leu	Ala	Ser	Leu	Ser	Thr	Phe	Gln	Thr	Met	357
AAG	TAC	TCC	GTC	TGG	ATC	GGT	GGT	TCC	ATC	CTG	GCC	TCT	CTG	TCC	ACC	TTC	CAG	ACC	ATG	1071
358	9	360	1	2	3	4	5	6												
Trp	Ile	Thr	Lys	Glu	Glu	Tyr	Asp	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Ile	Val	His	Arg	Lys	Cys	Phe	377
TGG	ATC	ACC	AAG	GAG	GAG	TAC	GAC	GAG	TCC	GGC	CCA	GGC	ATC	GTC	CAC	CGC	AAG	TGC	TTC	1131
*																				378
TAA	atactcgatc	ggaataa	aatg	tttta	ataa	actg	ttttc	gaata	cga											1180

Figura 7.- Secuencia del cDNA y de los aminoácidos de la beta-Actina. Los extremos 5' y 3' no traducidos se indican con minúsculas (nc -1-12; 1147-1192, respectivamente). Los posibles sitios de poliadenilación se encuentran subrayados, en itálicas y negritas (nc 1146-1151 y 1158-1163). Los codones del ORF se muestran con mayúsculas (aa 13-1146). Las firmas universales de Actina1 (55-65); proteínas relacionadas a Actina (aa 106-118) y Actina2 (aa 358-366) se muestran subrayadas y en negritas. Los oligodesoxinucleótidos utilizados para la cuantificación del cDNA se indican subrayados.

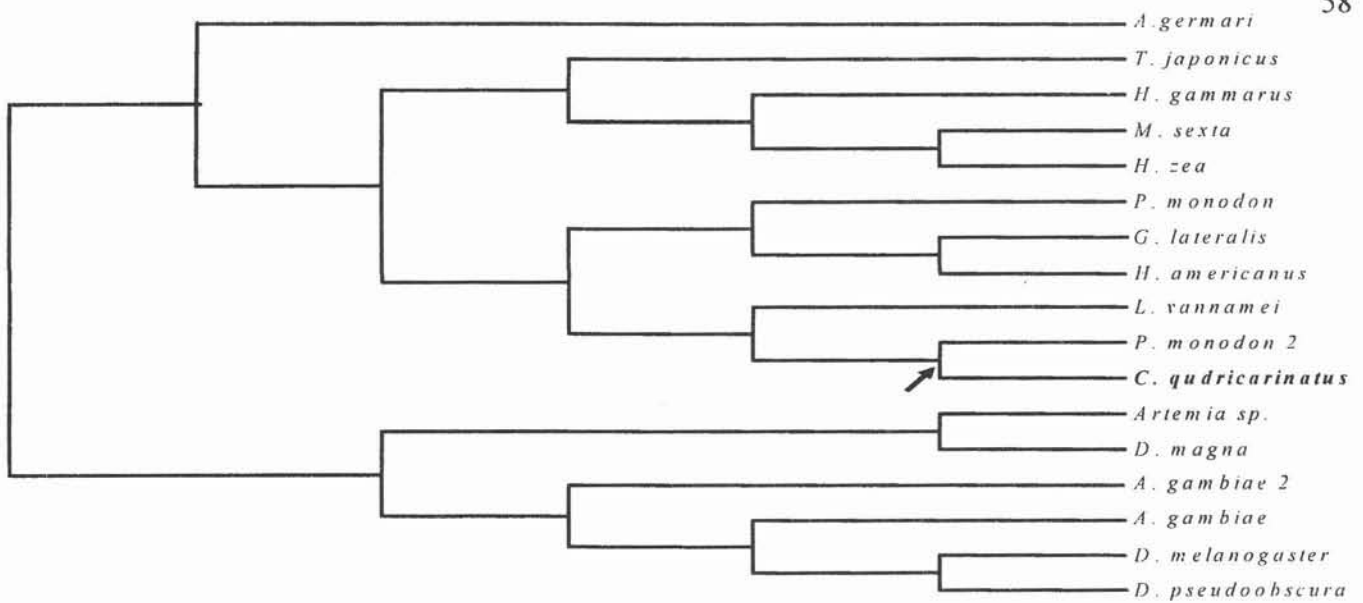


Figura 8.- Filograma de la beta-Actina de invertebrados. La secuencia de aminoácidos de la beta-Actina del acocil *C. quadricarinatus* (en negritas) se encuentra en el mismo nodo (flecha) que en el camarón *P. monodon 2*.

relacionadas a Actina ((LM)-(LIVM)-T-E-(GAPQ)-x-(LIVMFYWHQ)-N-(PSTAQ)-x(2)-N-(KR)) y Actina2 (W-(IV)-(STA)-(RK)-x-(DE)-Y-(DNE)-(DE)), están en las posiciones: 55-65, 106-118 y 358-366 respectivamente (Fig. 7). La beta-Actina del acocil mostró una identidad del 94, 88, y 87 % con el camarón *Peneus monodon*, con la langosta *Homarus americanus* y con la pulga de agua *Daphnia magna* respectivamente (Fig. 8).

Clonación del cDNA de la Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa.

Para la clonación del RNAm de la G3PDH se decidió utilizar la misma estrategia de clonación que para el gen de la beta-Actina, empleando la secuencia de nucleótidos de una especie más cercana, filogenéticamente, al acocil como *Daphnia pulex* (GeneBank AJ289783). Los oligodesoxinucleótidos fueron diseñados con base a los codones más cercanos al sitio de inicio y terminación de la traducción (24-48 U1G3DPU y 924-948 L2G3DPU). Además se incluyó un juego de oligodesoxinucleótidos internos que reconocen el sitio activo de la enzima (447-471 U2G3DPU y 626-652 L1G3DPU). Al emplear la combinación de oligodesoxinucleótidos que reconocen adelante del sitio de inicio de la traducción, con el oligodesoxinucleótido de la parte final del sitio activo de la enzima, se obtuvo un

producto de 600 pb aproximadamente. Con el oligodesoxinucleótido que reconoce la parte final del ORF, no se obtuvo algún producto de amplificación. La situación anterior también se presentó al emplear como iniciador al oligodesoxinucleótido que reconoce el principio del sitio activo de la enzima y con el oligodesoxinucleótido específico para la parte final de la misma región con lo que se obtuvo un producto de 200 pb aproximadamente, mientras que con el oligodesoxinucleótido dirigido hacia el final del ORF no hay amplificación (Fig. 9A). Para verificar que el producto de 600 pb correspondía a la parte del gen de la G3PDH se realizó una reacción de PCR anidada, empleando los oligodesoxinucleótidos

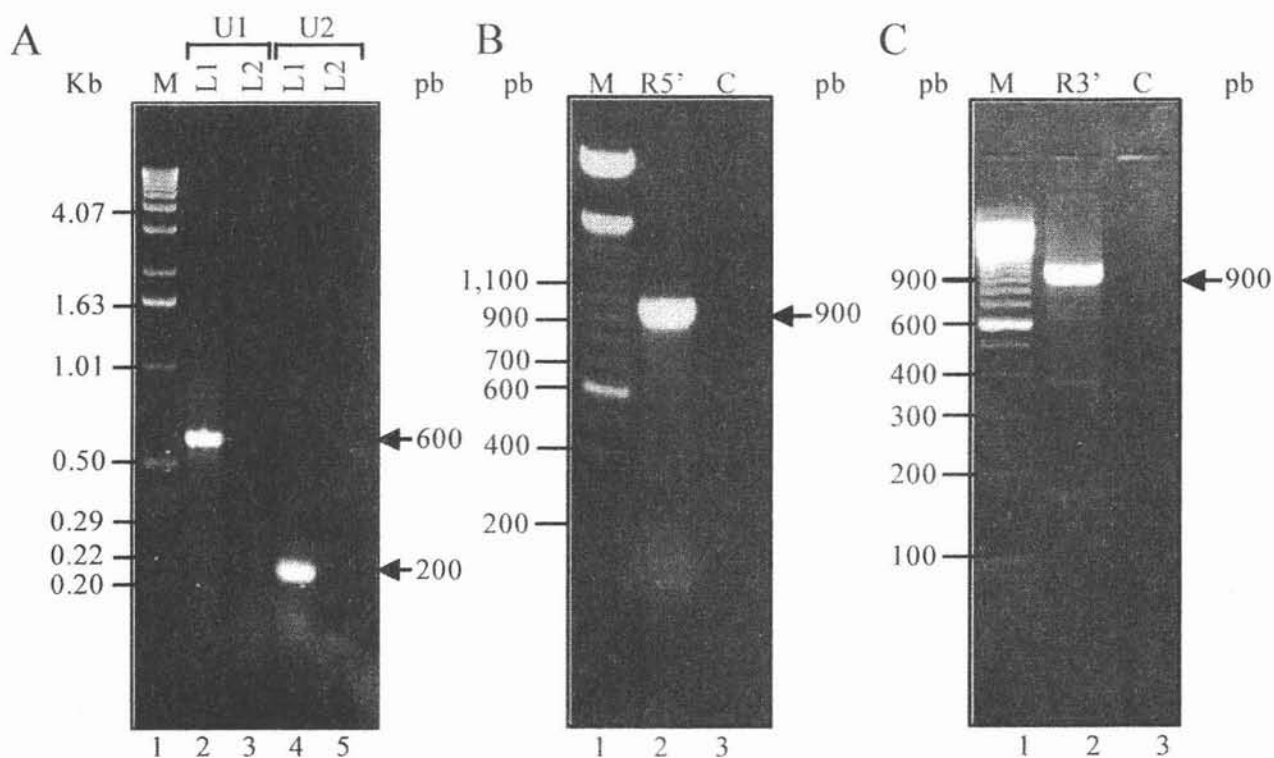


Figura 9.- Productos de las reacciones de PCR y RT-PCR para la clonación de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa. A) Producto de la reacción de PCR con DNA genómico del acocil *C. quadricarinatus* con los oligodesoxinucleótidos específicos para el cDNA de la G3PDH de *D. pulex* (U1-L1 y U2-L1, carriles 2 y 4 respectivamente; apéndice 1A). B) Producto de RACE 5' (R5'). La amplificación del extremo 5' del cDNA se realizó a partir de RNA total de los pedúnculos oculares con el oligodesoxinucleótido antisentido IG3race5, cuyo diseño fue a partir de la secuencia de desoxinucleótidos del producto genómico (apéndice 1A, carriles 2 y 4). C) Producto de la reacción de RACE 3' (R3'). Los productos que corresponden a la secuencia de la G3PDH se indican con una flecha negra. Todas las reacciones se separaron por electroforesis en gel de agarosa al 1.5 %. Los marcadores de pesos moleculares (M) fueron de escalera de DNA de 1 kb y de 100 pb (A; B y C respectivamente; Invitrogene).

que reconocen el sitio activo de la enzima, obteniendo un producto 200 pb aproximadamente. La secuencia de este producto mostró un 77.9 y 77.4 % de identidad con el cDNA de *Drosophila hydei* y *Daphnia pulex* respectivamente. Al comparar el producto de la traducción conceptual, se obtuvo un 100% de identidad con el cDNA de las langostas marinas *Palinurus versicolor* y *Homarus americanus*. La secuencia de nucleótidos del producto de 600 pb presentó un 73 % de identidad con la G3PDH de *Drosophila hydei* mientras que en *D. pulex* fue del 70.9%. Aún cuando la identidad en ácidos nucleicos es baja; la traducción conceptual presentó una identidad del 95.6 % y 94 % con la G3PDH de las langostas *Palinurus versicolor* y *Homarus americanus* respectivamente.

A partir del fragmento genómico de la G3PDH obtenido se diseñaron los oligodesoxinucleótidos para la clonación de los extremos 5' y 3' del RNAm por medio de la técnica de RACE 5' y 3'. Se obtuvieron productos de 900 pb aproximadamente en ambos casos (Fig. 9B y C). Al empalmar las secuencias de los extremos 5' y 3' con el producto genómico, se observa que el cDNA de la G3PDH está formado por 1081 pb, en donde el extremo 5' UTR tiene 41 pb, el ORF está formado por 335 codones incluyendo al codón de paro. Por último en el extremo 3' no traducido, la posible señal de poliadenilación (AATAAA) está en los nucleótidos 1096 a 1102 (GeneBank AY430092; Fig. 10).

La traducción conceptual del ORF del RNAm de la G3PDH de *C. quadricarinatus*, da una proteína de 334 aminoácidos con un peso molecular teórico de 35,681.84 Da. Contiene los dos dominios funcionales para G3PDH, el dominio de unión a NAD^+ , de la posición 5 a la posición 33, y el dominio universal, que contiene la cisteína del sitio catalítico (ASCTTNCL) de la posición 147 a la 154. Además contiene los residuos Fen, His, Tre y Asp que son necesarios para la actividad enzimática de la G3PDH (Huang *et al.*, 1989), que se encuentran en las posiciones 99, 176, 179 y 192 respectivamente (Fig.10). Por último, la secuencia de aminoácidos de la G3PDH tiene un 92 % de identidad con la del acocil *Procambarus clarkii* y del 88 % con la de las langostas *Palinurus versicolor* y *Homarus americanus* (Fig. 11).

-41	Met Ser Lys Ile Gly Ile Ans Gly Phe	9
gaatcctctctgaacacctcgccaccatcactaccaccata	ATG TCG AAG ATT GGT ATT AAT GGA TTC	27
Gly Arg Ile Gly Arg Leu Val Leu Arg Ala Ala Leu Gln Ans Gly Ala Glu Val Val Ala		29
GGC CGC ATC GGT CGC CTT GTT CTG CGT GCC GCT CTT CAA AAT GGC GCA GAG GTG GTG GCA		87
Val Ans Asp Pro Phe Ile Ala Leu Asp tyr Met Val Tyr Met Phe Lys Tyr Asp Ser Thr		49
GTG AAT GAC CCC TTC ATT GCT CTT GAC TAC ATG GTG TAC ATG TTC AAG TAC GAC TCT ACC		147
His Gly Arg Phe Lys Gly Glu Val Lys Glu Glu Asp Gly Ala Leu Val Val Asn Gly His		69
CAT GGC CGC TTC AAG GGG GAG GTG AAG GAA GAG GAT GGA GCT CTG GTG GTC AAT GGG CAC		207
Ans Ile Gln Val Phe Asn Glu Met Lys Pro Glu Ans Ile Pro Trp Ser Lys Ala Gly Ala		89
AAC ATT CAG GTC TTC AAT GAG ATG AAA CCA GAA AAC ATT CCA TGG AGC AAG GCT GGT GCA		267
Glu Tyr Ile Val Lys Ser Thr Gly Val Phe Thr Thr Ile Asp Lys Ala Gln Ala His Ile		109
GAA TAC ATT GTC AAG TCC ACT GGT GTG TTC ACC ACT ATT GAC AAG GCC CAG GCT CAC ATT		327
Asp Gly Gly Ala Lys Lys Val Ile Ile Ser Ala Pro Ser Ala Asp Ala Pro Met Phe Val		129
GAT GGA GGA GCC AAG AAA GTT ATC ATC TCT GCC CCA TCT GCT GAT GCC CCC ATG TTT GTT		387
Val Gly Val Ans Leu Glu Ala Tyr Asp Pro Ser Met Lys Ile Val Ser Ans Ala Ser Cys		149
GTT GGA GTC AAC CTT GAA GCA TAT GAT CCA TCC ATG AAG ATT GTT TCC AAT GCT TCT TGC		447
Thr Thr Ans Cys Leu Ala Pro Leu Ala Lys Val Ile Ans Asp Ans Leu Glu Ile Val Glu		169
ACC ACC AAC TGC CTG GCT CCT CTG GCT AAA GTC ATC AAT GAC AAC CTT GAA ATT GTT GAG		548
Gly Leu Met Thr Thr Val His Ala Val Thr Ala Thr Gln Lys Thr Val Asp Gly Pro Ser		189
GGC TTG ATG ACC ACA GTA CAT GCT GTT ACT GCT ACC CAG AAG ACT GTA GAT GGT CCC TCT		507
Ala Lys Asp Trp Arg Gly Gly Arg Gly Ala Ala Gln Ans Ile Ile Pro Ser Ser Thr Gly		209
GCC AAG GAT TGG CGT GGT GGC CGT GGT GCT GCC CAA AAC ATC ATC CCA TCA TCC ACT GGT		567
Ala Ala Lys Ala Val Gly Lys Val Ile Pro Glu Leu Ans Gly Lys Leu Thr Gly Met Ala		229
GCT GCT AAG GCT GTT GGC AAG GTC ATT CCA GAA CTC AAT GGA AAA TTG ACA GGC ATG GCC		627
Phe Arg Val Pro Thr Pro Asp Val Ser Val Val Asp Leu Thr Val Arg Leu Gly Ans Gln		249
TTC CGT GTA CCC ACT CCA GAC GTC TCT GTT GTA GAT CTG ACA GTC CGG CTT GGT AAC CAA		687
Cys Ser Tyr Asp Asp Ile Lys Ala Ala Met Lys Ala Ala Ser Gln Gly Pro Leu Lys Gly		269
TGT TCT TAT GAT GAC ATT AAG GCA GCG ATG AAG GCT GCT TCA CAG GGA CCC CTC AAG GGT		747
Val Leu Gly Tyr Thr Glu Asp Asp Val Val Ser Thr Asp Phe Thr Gly Asp Val Arg Ser		289
GTC CTG GGT TAC ACC GAG GAT GAC GTT GTA TCC ACT GAC TTC ACT GGT GAT GTA CGA TCC		807
Ser Ile Phe Asp Ala Lys Ala Gly Ile Gln Leu Ser Lys Thr Phe Val Lys Val Val Ser		309
TCT ATC TTT GAT GCA AAA GCT GGT ATC CAG CTG AGC AAG ACC TTC GTA AAG GTA GTC TCT		867
Trp Tyr Asp Ans Glu Phe Gly Tyr Ser Thr Arg Val Ile Asp Leu Leu Lys His Met Gln		329
TGG TAT GAT AAC GAG TTT GGC TAT TCT ACC CGT GTA ATA GAT CTC CTC AAG CAC ATG CAG		927
Lys Val Asp Gly Ala *		335
AAG GTG GAT GGT GCC TAA	tatgtctggattggtccagctgaaagtacgtgaaggcactggtggatg aatgaa	1005
agatgggtaaaaaaaaaa		1024

Figura 10.- Secuencia del cDNA y de los aminoácidos de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa. Los extremos 5' y 3' no traducidos se indican con minúsculas. El posible sitio de poliadenilación se encuentra subrayado, en itálicas y negritas (nc 1000-1006). Los codones del ORF se muestran con mayúsculas. El dominio de unión a NAD⁺ (aa 5-33), el sitio activo de la enzima (aa 147-154), el dominio de dimerización similar a la Gtsp1 de *S. cerevisiae* (aa 235-255) y los aminoácidos Fen, His, Tre, Asp necesarios para la actividad de la enzima se muestran subrayadas y en negritas (aa 99, 176, 179 y 192). Los oligodesoxinucleótidos utilizados para la cuantificación del cDNA se indican subrayados.

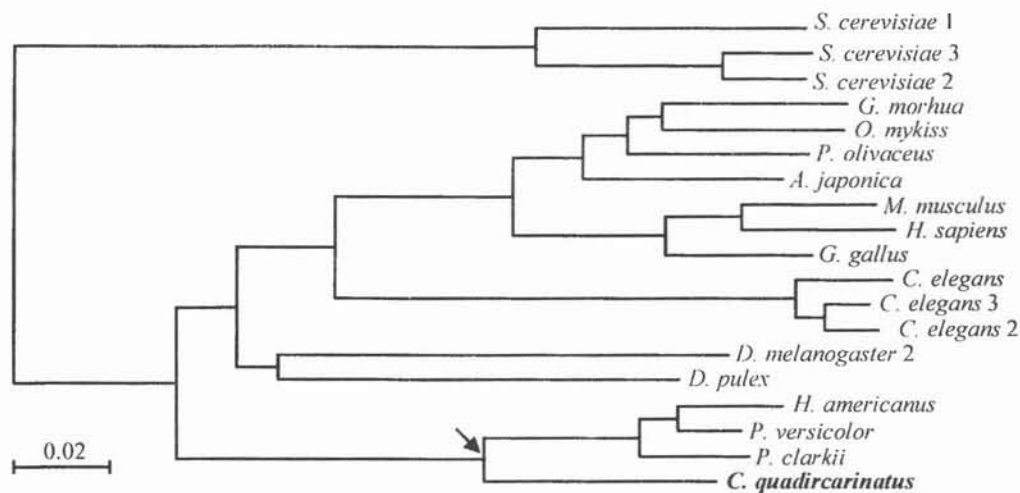


Figura 11.- Filograma de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa en eucariontes. La secuencia de aminoácidos de la G3PDH del acocil *C. quadricarinatus* (en negritas) se encuentra en el mismo nodo (flecha) del acocil *P. clarkii* y de las langostas *H. americanus* y *P. versicolor*.

Clonación del cDNA del precursor de la HCP.

De la misma manera que se clonó el cDNA de la beta-Actina y de la G3PDH, como primer paso para la clonación del cDNA del precursor de la HCP se amplificó por PCR parte del gen de la HCP con diferentes combinaciones de los oligodesoxinucleótidos cuya secuencia correspondió a los codones del precursor de la HCP de la jaiba *Callinectes sapidus* (Apéndice A). Con los oligodesoxinucleótidos que amplifican todo el marco abierto de lectura o con el oligodesoxinucleótido degenerado para la secuencia de la HCP (UJ-LJ; DP-LJ; Apéndice) no se obtuvo algún producto de amplificación. Sin embargo con la combinación del oligodesoxinucleótido formado por los 4 primeros codones de la HCP hasta el codón de término (NJ-LJ, apéndice 1A) se obtuvieron productos de 100 a 1500 pb aproximadamente (datos no mostrados).

Para poder discernir cual de los productos obtenidos era el específico para el precursor de la HCP, se realizó una PCR anidada empleando los oligodesoxinucleótidos que reconocen la HCP y el sitio de la unión de los exones en el RNAm del precursor de *C. sapidus* (NJ-IJ, apéndice 1A). Como control

de la integridad del DNA y de los oligodesoxinucleótidos, se amplificó parte del gen de la beta-Actina de *C. quadricarinatus* y del gen de la HCP de la jaiba *C. sapidus*. En esta reacción se obtuvieron dos productos de 150 y de 650 pb aproximadamente para la HCP del acocil, mientras que en la jaiba únicamente se obtuvo el producto de 150 pb aproximadamente (Fig. 12A). La secuencia de ácidos nucleicos del producto de 177 pb mostró una identidad del 98 % con los codones que codifican para la HCP y parte del péptido relacionado con la HCP (RP-HCP) de la jaiba *Callinectes sapidus* y *Carcinus*

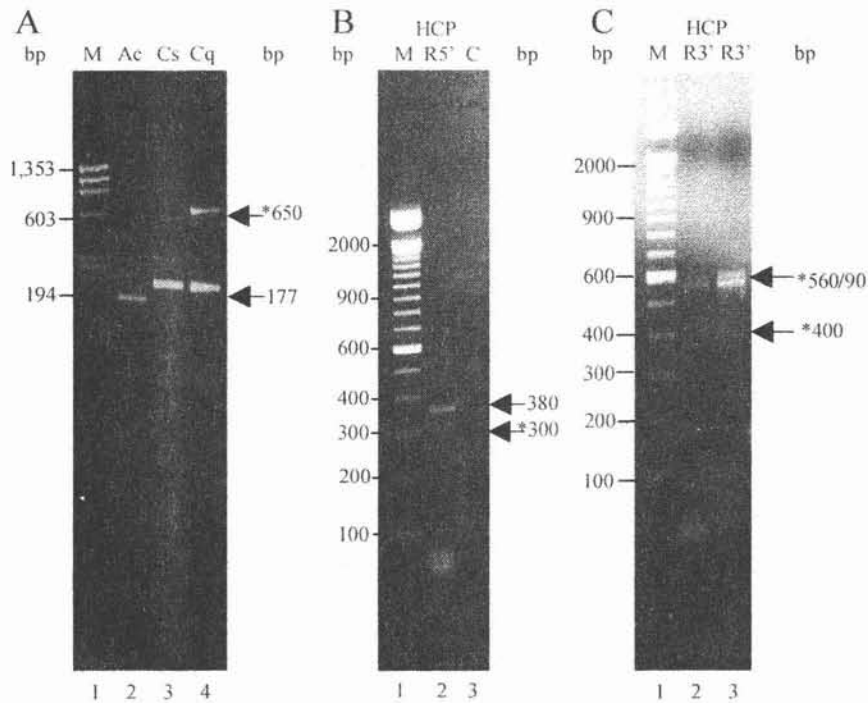


Figura 12.- Productos de las reacciones de PCR y RT-PCR para la clonación de la hormona concentradora de pigmentos. A) PCR anidada con DNA genómico del acocil *C. quadricarinatus* (carril 3) utilizando los oligodesoxinucleótidos específicos para el cDNA de la HCP de la jaiba *C. sapidus* (carril 4). Control de la integridad del DNA de una parte del gen de la beta-Actina (A carriles 2). B) RACE 5' (R5'). La amplificación se realizó a partir de, RNA total de los pedúnculos oculares con el oligodesoxinucleótidos antisentido race5RPCHeq. C) RACE 3' (R3'). Los productos que corresponden a la secuencia de la HCP se indican con una flecha negra y los falsos positivos con un asterisco. Todas las reacciones se separaron por electroforesis en gel de agarosa al 1.5 %. Los marcadores de pesos moleculares (M): DNA del ϕ X174RF cortado con la enzima *Hae* I (A; carril 1) y escalera de DNA de 100 pb (B y C; carril 1).

maenans respectivamente. El producto de 650 pb fué inespecífico. Al conocer una parte de la secuencia del gen de la HCP se pudieron diseñar los oligodesoxinucleótidos para la caracterización de los extremos 5' y 3' del RNAm de la HCP (Apéndice Tabla 1). Con el oligodesoxinucleótido race5RPCHcq se obtienen dos productos de 300 y 380 pb aproximadamente (Fig. 12B). Este último presentó un 92% de identidad con la secuencia de direccionamiento al retículo endoplásmico rugoso del precursor de la HCP de los cangrejos *C. sapidus* y *C. maenans*.

El ensayo de RACE3' con el oligodesoxinucleótido race3RPCHcq dió 3 productos de 400 pb, 560 pb y 590 pb aproximadamente (Fig. 12C). El producto de 400 pb tiene una identidad del 98 % con la proteína ribosomal L-23 de *H. sapiens* (Banckit 633162). La secuencia de nucleótidos del producto de 560 pb presentó una homología del 60 % al 57.3 % con el precursor de la hormona dispersora de pigmentos de los camarones *M. japonicus* (GeneBank: AB073369.1) y *P. vanamei* (GeneBank: Y11723.1). Sin embargo la traducción conceptual generó una proteína que tiene una identidad del 50 % con el precursor de la Hormona Hipertrealosémica de la cucaracha *B. Discoidalis* (GeneBank: AAA79691). Este resultado sugiere que el cDNA del producto de 560 pb es un nuevo miembro de la familia HAC-/HCP (Banckit 633102). Finalmente el producto de 590 pares de bases es 88% idéntico al péptido activo y al péptido relacionado al precursor de la HCP de *C. sapidus* y *C. maenans* (Fig. 12C). Al empalmar la secuencia del producto geonómico y del RACE 5' y 3' se observa que el cDNA de la HCP está formado por 646 pb, en donde los primeros 87 pb corresponden al extremo 5' UTR; los siguientes 273 pb son el ORF y los últimos 286 pb son el extremo 3' UTR. La traducción conceptual del ORF da un pre-péptido de 90 aminoácidos. Los primeros 21 aminoácidos son la señal de direccionamiento al lumen del retículo endoplásmico rugoso; inmediatamente después están los 8 aminoácidos de la HCP seguidos por el sitio de corte para la endopeptidasa KR. Los últimos 60 aminoácidos son el péptido relacionado a la HCP.

Expresión de los RNAm del precursor de la HCP, de la beta-Actina y de la G3PDH.

Para determinar la expresión del RNAm del precursor de la HCP, de la beta-Actina y de la G3PDH se amplificó por RT-PCR todo el ORF de cada uno de los RNAm extraídos del pedúnculo ocular, del hepatopáncreas, de las branquias y del músculo. Por razones desconocidas, no se logró la amplificación de todo el ORF del precursor del cDNA de la HCP; sin embargo, al amplificar desde el codón 13, que corresponde a la parte final de la secuencia de direccionamiento al retículo endoplásmico rugoso, al codón de paro (Fig. 13), se obtiene un producto de 242 pb y un segundo producto de 100 pb, únicamente en el pedúnculo ocular, mientras que en el hepatopáncreas, en las branquias y en el músculo no se obtuvo producto alguno aún, en ensayos de RT-PCR de 35 ciclos (Fig. 15A).

El producto de 1,135 pb de la beta-Actina se obtuvo en todos los tejidos, pero en el hepatopáncreas se obtuvo un segundo producto de 800 pb (Fig. 15B carril 4). Por último para la G3PDH todos los tejidos presentaron el producto de 1086 pb (Fig. 15C). Todos los productos obtenidos fueron secuenciados, confirmando los empalmes del producto de PCR y de RACE5' y 3' para cada cDNA.

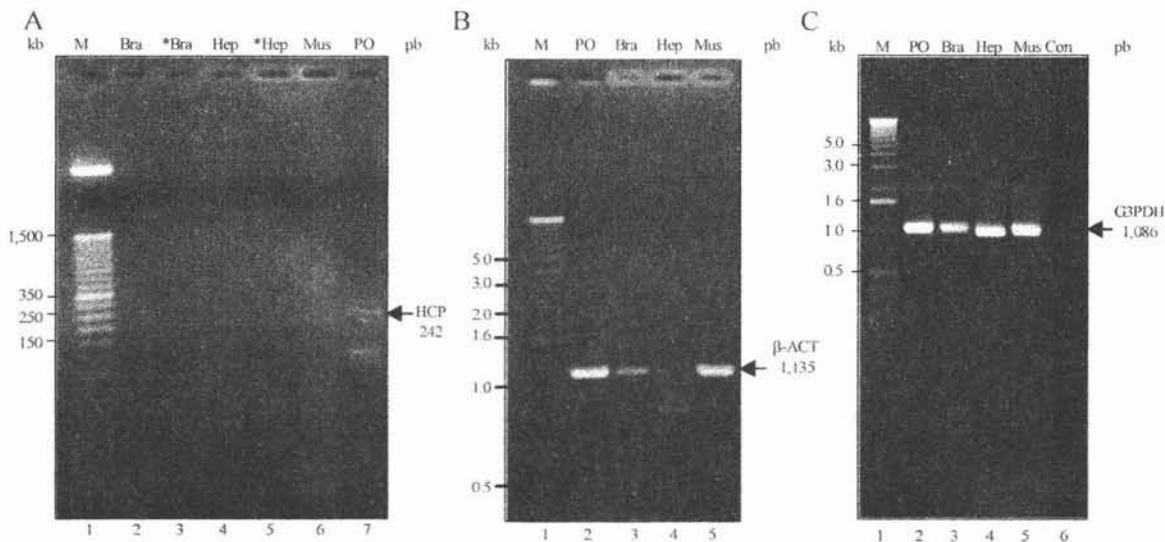


Figura 15.- Amplificación del marco abierto de lectura del precursor de la HCP (A), de la beta-Actina (B) y de la G3PDH (C) en el pedúnculo ocular (PO), en el hepatopáncreas (Hep), en las branquias (Bra) y en el músculo (Mus). Los productos que corresponden al ORF se indican con una flecha y con * las reacciones de 35 ciclóstomas las reacciones se separaron por electroforesis en gel de agarosa al 1.5 %. Los marcadores de pesos moleculares (M) fueron escalera de DNA de 50 pb y de 1 kb (A, B y C).

Cuantificación del cDNA del precursor de la HCP, de la beta-Actina, de la G3PDH, y del RNAr 18S RNA en el pedúnculo ocular en un periodo de 24 h.

Para colocar la misma cantidad de RNA para la síntesis de cDNA de cada punto del ciclo se midió la cantidad del RNA total del pedúnculo ocular en muestras de cada tres horas en periodos de 24 h. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 16. La cantidad del RNA total siempre presentó un comportamiento trimodal en el ciclo de luz-oscuridad, es decir, se observaron tres puntos máximos a las 5, 9 y 15 h de comenzado el ciclo de 24 h (5.00 h, 11.00 h y 20 h del tiempo real).

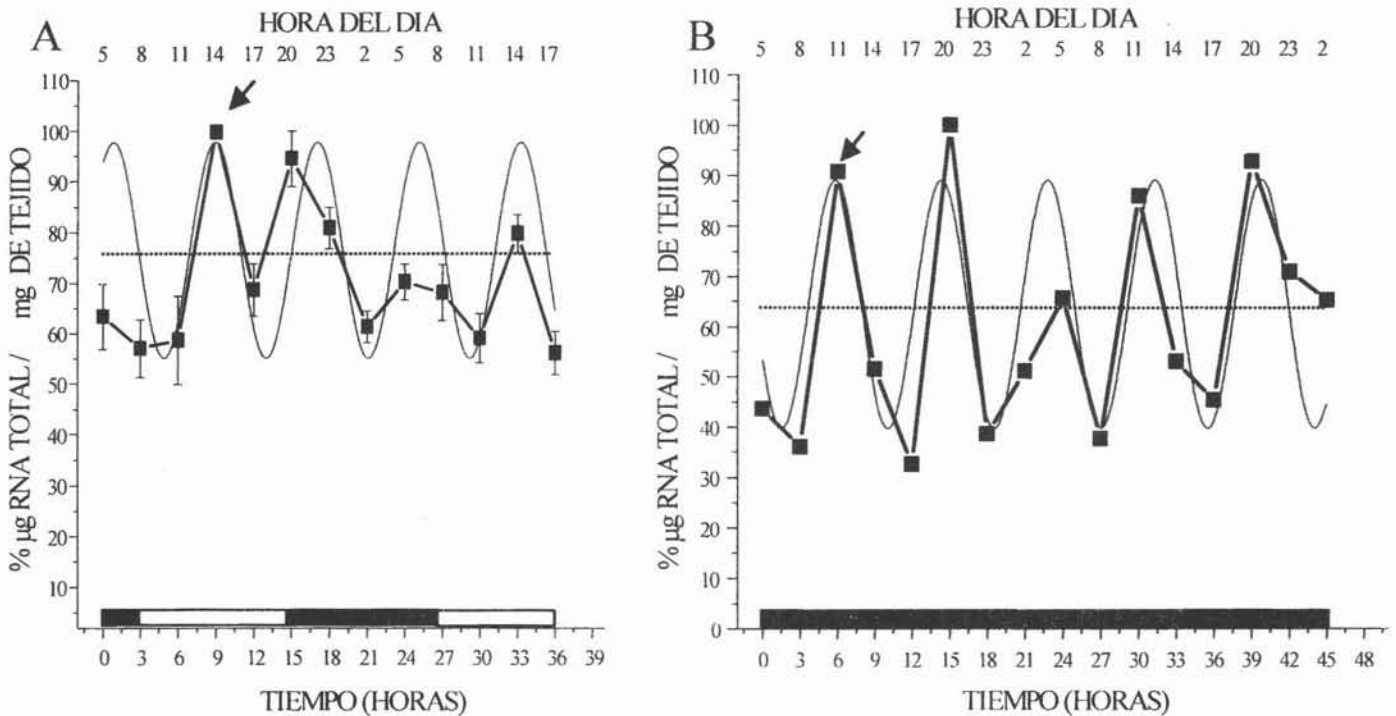


Figura 16.- Concentración del RNA total en el pedúnculo ocular del acicil en ciclos de 12 h de luz-oscuridad (A) y cuatro meses de oscuridad constante (B). El desplazamiento de la acrofase entre el ciclo de luz-oscuridad y oscuridad constante se indica con flechas. En las abscisas, está el tiempo en horas reales (superior), a partir del tiempo cero experimental (inferior). Los rectángulos vacíos representan a los periodos de luz y los negros a los de oscuridad. Los cuadrados en cada grafica son el cociente del valor de la concentración del RNA total y peso del tejido unido por una línea gruesa. La línea delgada corresponde a la resultante del análisis de Cosinor y la punteada al mesor.

Este comportamiento también se presentó en los acociles acondicionados a 4 meses de oscuridad constante. El análisis de cosinor mostró que en los ciclos de luz-oscuridad el periodo del RNA total es de 8.1 h, con una amplitud de 24.61, la acrofase fue a las 9.08 h de comenzado el ciclo, el mesor fue de 74.13 y la r^2 fue de un valor de 0.74. Lo anterior indica que, estadísticamente, la concentración del RNA en el pedúnculo ocular presenta un comportamiento trimodal, en donde la mayor cantidad de RNA en el pedúnculo ocular es a las 14.00 h, la segunda a las 20.00 hrs y la tercera que es la menor a las 5.00 h (Fig. 16A; Tabla 3).

En los acociles acondicionados a 4 meses de oscuridad constante el periodo fué mas largo por 0.4 h (8.5 h), con un mesor de 64.29. La acrofase se recorrió al segundo punto a las 14.28 h de iniciado el ciclo (20.00 h del tiempo real), mientras que el punto de las 14.00 h se movió tres horas antes, es decir, a

RNA	Condición	r^2	Mesor	Amplitud	Acrofase (horas)	Periodo (horas)
RNA Total	Luz-oscuridad	0.74	74.13	24.61	9.08	8.1
RNA Total	Oscuridad constante	0.67	64.29	26.05	14.28	8.5
G3PDH	Luz-oscuridad	0.24	65.08	10.27	14.98	8.8
G3PDH	Oscuridad constante	0.59	69.95	14.07	29.59	21.5
RNAr 18S	Luz-oscuridad	0.65	71.41	24.76	18.45	24
β -Actina	Luz-oscuridad	0.08	94.14	-1.01	14.28	---
β -Actina	Oscuridad constante	0.048	82.65	2.85	0	---
HCP	Luz-oscuridad	0.49	82.24	11.75	9.57	23.68
HCP	Oscuridad constante	0.59	63.30	28.83	15.9	7.26

Tabla 3.- Valores del análisis de Cosinor de la concentración del RNA total, del cDNA, de la G3PDH, de la beta-Actina, de la HCP y del RNAr 18S en el tallo ocular de los acociles acondicionados a ciclos de luz-oscuridad (12:12 h) y 4 meses de oscuridad constante. r^2 coeficiente de determinación. La acrofase es en horas.

las 6 h de comenzado el ciclo (11.00 h del tiempo real). Por ultimo el punto de las 5.00 h del tiempo real fue mas evidente (Fig. 16B). La r^2 tuvo un valor de 0.67. Por todo lo anterior se concluye, que en el pedúnculo ocular del acocil existe un cambio rítmico en la cantidad del RNA total y un desfaseamiento en ausencia de luz (Fig.16; Tabla 3). Los cambios en el RNA total sugirieron fuertemente que los RNAs constitutivos pudieran tener algún tipo de ritmo, por lo que, antes de establecer el patrón de la concentración en el RNAm de la HCP fue necesario determinar si existía o no algún cambio en los RNAs de la beta-Actina, de la G3PDH y del RNAr 18S. Se juntaron muestras de cada uno de los puntos de un ciclo de 24 h para determinar el número de ciclos necesarios para alcanzar la mitad de la fase exponencial en las reacciones de RT-PCR semicuantitativa. Para los cDNAs de la beta-Actina y del RNA 18S se emplearon diluciones de cDNA 1:100 mientras que para el de la HCP y de la G3PDH se empleó la concentración original.

Las curvas de RT-PCR semicuantitativas mostraron que la fase exponencial para el RNAr 18S, la beta-Actina, la G3PDH y la HCP fué a los: 16, 20, 24 y 27 ciclos respectivamente. En todos los casos se obtuvo, únicamente, a los productos esperados de 242 pb para el precursor de la HCP, de 515 pb para la beta-Actina, de 386 pb para la G3PDH y de 1.732 pb para el RNAr 18S. Estos experimentos demostraron que no existieron productos secundarios para la beta-Actina, para la G3PDH y para el RNAr 18S, y solo con el ORF de la HCP so obtuvo un producto de aproximadamente de 100 pb (Figura 17). Los cronogramas de las reacciones de RT-PCR semi-cuantitativa mostraron que existen cambios en la concentración relativa del cDNA del precursor de la HCP, de la beta-Actina, de la G3PDH y del RNAr 18S en el pedúnculo ocular en un periodo de 24 horas de luz-oscuridad (12:12) y en los 4 meses de oscuridad constante (Figs. 18, y 19). El cDNA de la G3PDH presentó un comportamiento bimodal, en ciclos de luz-oscuridad (12:12) con el primer pico a las 9 h, el segundo pico, con mayor concentración relativa de cDNA, a las 15 h de comenzado el ciclo. El análisis de cosinor indicó que el

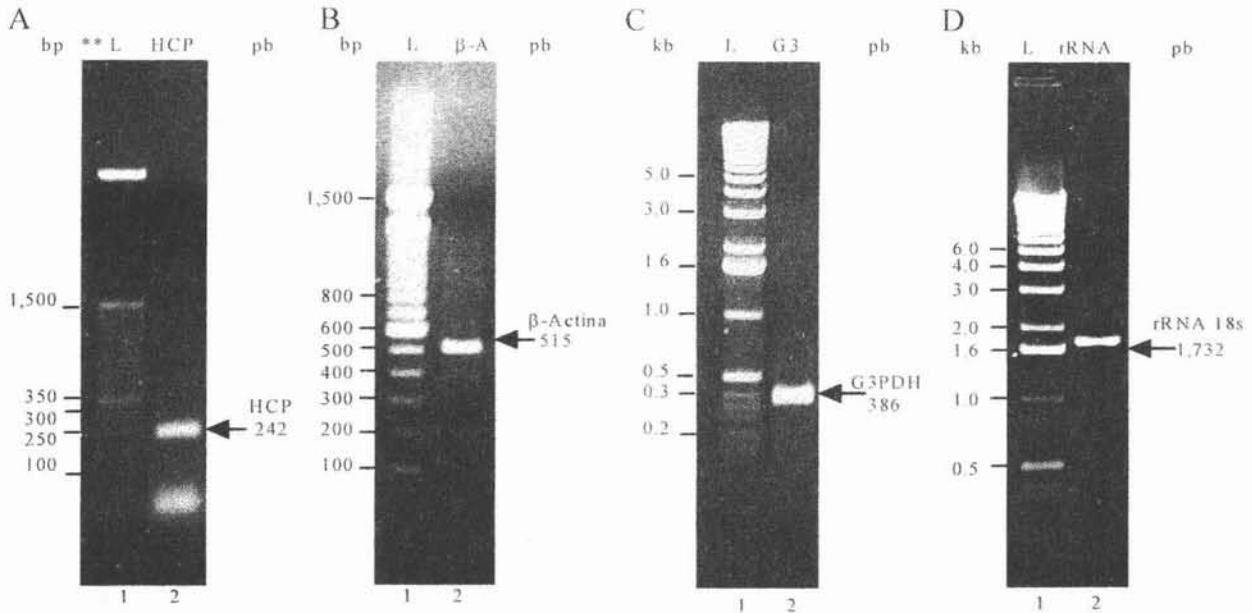


Figura 17.- Productos de la reacción de RT-PCR semi-cuantitativa del precursor de la HCP (A), de la beta-Actina (B), de la G3PDH (C) y del RNAr 18S (D). Todos los productos esperados se señalan con una flecha. La HCP, la beta-Actina y la G3PDH se separaron por electroforesis en gel de agarosa al 1.8 % y el RNAr 18S al 0.9%. Los marcadores de pesos moleculares (M) fueron escalera de DNA de 50 (A), de 100 pb (B), y de 1 kb (C y D).

periodo es de 8.8 h, la amplitud de 10.27, el mesor fue de 65.08, y la acrofase es a las 14.98 h (aproximadamente a las 20.00 tiempo real). La r^2 presentó un valor de 0.24 (Fig. 18A Tabla3). Con los acociles acondicionados a cuatro meses de oscuridad constante, el ritmo del cDNA de la G3PDH deja de tener una forma bimodal, en donde, el primer pico se encuentra a las 6 h del inicio, es decir, se atrasa 3 h y el pico a las 15 h tiende a desaparecer con respecto al ciclo de luz-oscuridad (Fig. 18B). El análisis de cosinor comprobó los datos anteriores ya que la r^2 tiene un valor de 0.59, con un periodo de 21.5 h y el punto máximo es a las 11.00 h del tiempo real (29.59 h del ciclo). Además, se observa un incremento en el cDNA de la G3PDH con respecto al ciclo de luz-oscuridad, con una amplitud de 14.7 y un mesor de 69.95 (Fig. 18B; Tab. 3). Sorprendentemente, el RNAr 18S tiene un comportamiento rítmico en periodos de luz-oscuridad (12:12) con una r^2 de 0.65, la acrofase es a las 18.45 h aproximadamente (11.00 de la noche tiempo real), la amplitud y el mesor tuvieron valores de 24.76 y 71.41 respectivamente (Fig. 18C; Tabla 3).

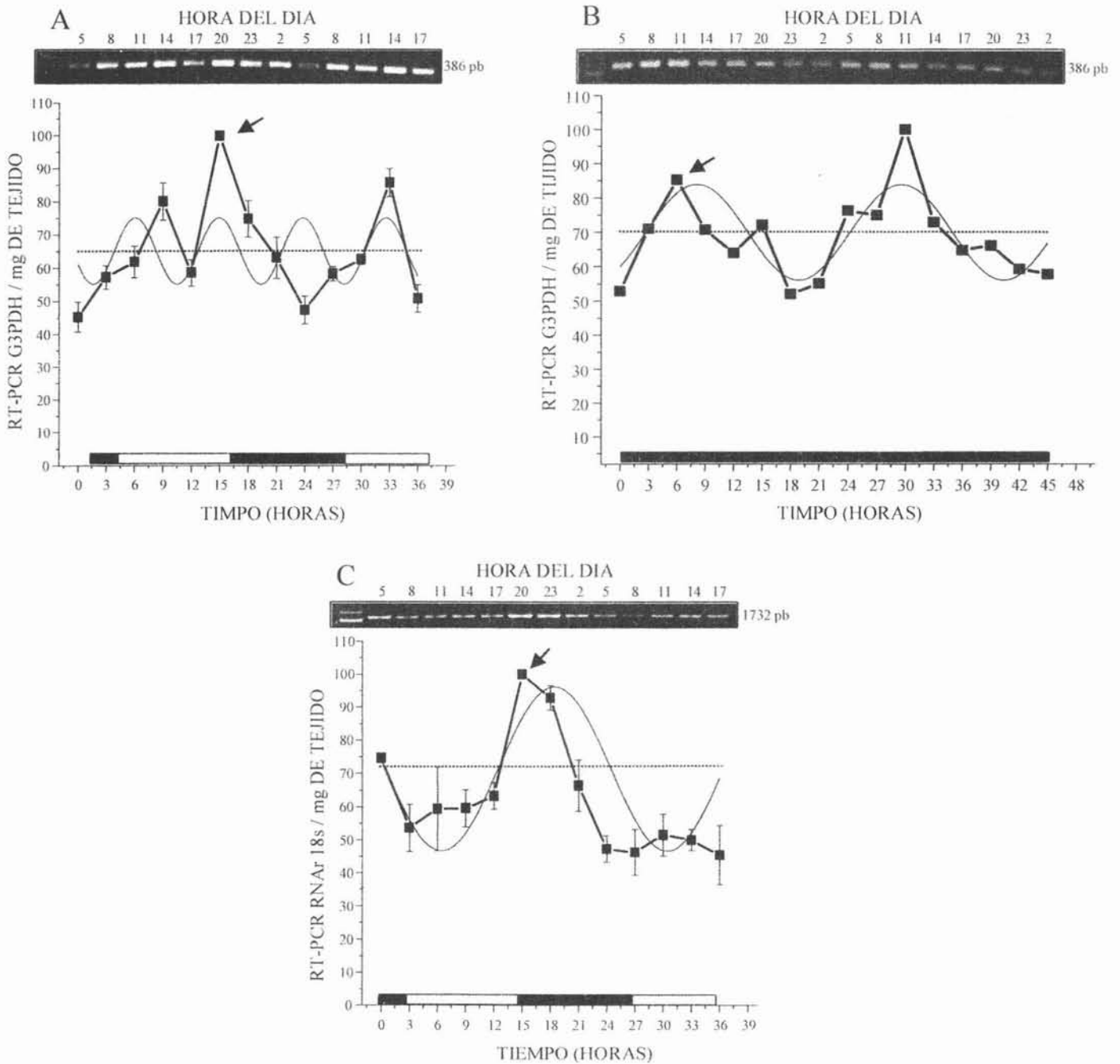


Figura 18.- Concentración del cDNA de la G3PDH (A y B) y del RNAr 18S (C) en el pedúnculo ocular del acocil en ciclos de 12 h de luz-oscuridad (A y C) y de la G3PDH por cuatro meses de oscuridad constante (B). El desplazamiento de la acrofase entre el ciclo de luz-oscuridad y oscuridad constante del cDNA de la G3PDH se indica con una flecha (A y B). En las abscisas está el tiempo en horas de la duración del ciclo y en la parte superior se indica la hora del día. Los rectángulos vacíos representan a los periodos de luz y los negros a los de oscuridad. Los cuadros negros en las gráficas corresponden al cociente del producto de RT-PCR de la G3PDH y del RNAr 18S entre el peso del tejido unidos por la línea gruesa. La línea delgada y la punteada corresponden a la resultante del análisis de Cosinor y al mesor. La parte superior de las gráficas muestra el patrón de bandas de las reacciones de RT-PCR separadas por gel de agarosa al 2% para la G3PDH (A y B) y al 1% para el RNAr 18S.

El análisis por Cosinor de los valores del cDNA de la beta-Actina en periodos de luz-oscuridad mostró que la r^2 es de 0.08. Tiene un periodo de 24 h, un mesor de 94.14, una amplitud de -1.01 y la acrofase es a las 14.28 h. Este comportamiento también ocurre en acociles acondicionados a 4 meses de oscuridad constante en donde la r^2 es de 0.048, mesor es de 82.65, la amplitud es de 2.85 y la acrofase es cero en un periodo de 24 h. (Fig. 19 A y B, Tabla 3).

Los valores de los productos de las reacciones de RT-PCR del precursor de la HCP muestran un ritmo en el periodo de luz oscuridad (12:12), con una r^2 de 0.49, una amplitud es de 11.75 y un mesor de 82.24, en un periodo de 23.68 h; la acrofase es a las 9.57 h. (14.00 h del tiempo real) (Fig. 19C; Tabla3). Sin embargo, en los acociles acondicionados a la oscuridad constante la concentración del precursor tiene una forma bimodal, el primer pico es a las 9 h mientras que el segundo pico, (muy discreto en el ciclo de luz-oscuridad), es evidente a las 15 h de comenzado el ciclo (Fig. 19D; Tabla 3). El análisis de cosinor da una r^2 de 0.59; el periodo es corto de 7.26 h. En este caso la acrofase está en el segundo pico a las 15.9 h (20.00 h del tiempo real; Fig. 19D). Claramente se observa que en los acociles acondicionados a la oscuridad constante existe un incremento de 2.1 veces en el periodo, ya que el valor obtenido es de 42.24 y concomitantemente el valor del mesor cambió a 62.24 (Fig. 19C y D; Tabla3).

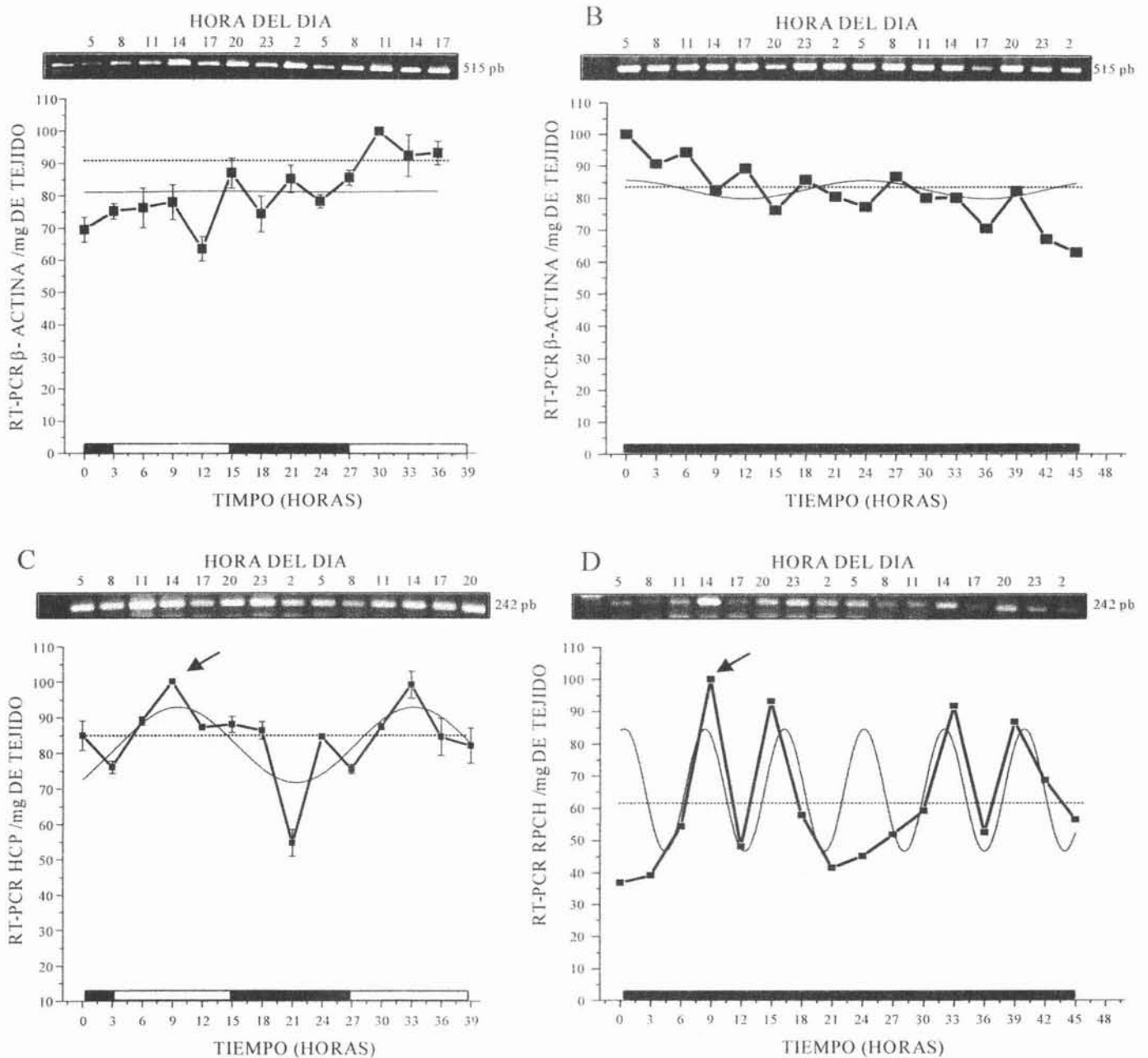


Figura 19.- Concentración del cDNA de la beta-Actina y de la HCP en el pedúnculo ocular del acocil en ciclos de 24 h de luz-oscuridad (12:12 h) (A y C) y cuatro meses de oscuridad constante (B y D). El aumento de la acrofase entre el ciclo de luz-oscuridad y oscuridad constante del cDNA de la HCP se indica con una flecha (C y D). En las abscisas, está el tiempo en horas de la duración del ciclo y en la parte superior se indica la hora del día. Los rectángulos vacíos representan a los periodos de luz y los negros a los de oscuridad. Los cuadros negros en las gráficas corresponden al cociente del producto de RT-PCR de la HCP y entre el peso del tejido unidos por la línea gruesa. La línea delgada y la punteada corresponden a la resultante del análisis de Cosinor y al mesor. La parte superior de las gráficas muestra el patrón de bandas de las reacciones de RT-PCR separadas por gel de agarosa al 2 %.

Modelo del posible origen de la Familia HAC/HCP.

Desarrollo del modelo.

Una de las formas de explorar el posible origen de la familia HAC/HCP fué comparándola con el precursor de la familia del neuropéptido APGWamida de los moluscos. Las razones para utilizar a esta familia son: A) el hecho de que los tres últimos residuos de aminoácidos son idénticos a la secuencia Pro⁶-Gli⁷-Tri⁸-NH₂ de la HCP y de las HACs Taa-HAC, Psi-HAC y *Blattaria* de los ordenes *Diptera*, *Odonata* y Lem-HrTH respectivamente (Tabla 1) y B) que esos tres últimos aminoácidos, por si solos, tienen actividad de HCE (Christensen *et al.* , 1978; 1979; Lee *et al.*,1996; Velenetza *et al.*, 2000).

El alineamiento de los precursores de la familia HAC/HCP y APGWamida mostró que existen cuatro regiones de homología. La región 1 corresponde al péptido señal aminoácidos (AA 1-85); en los moluscos esta región es de un tamaño mayor de 43 a 57 aminoácidos que la de los insectos y a la de los crustáceos e incluye la primera copia de la APGWamida (Fig. 20). La región 2 está formada por la secuencia que codifica para el péptido activo de la HAC y de la HCP y para la segunda copia de la APGWamida (AA 86-94), seguida por los aminoácidos básicos que son el sitio de corte para el procesamiento de la prohormona (AA 94-96 y 109-110). Además, contiene la mitad del péptido relacionado de la HAC y los primeros 22 aminoácidos del péptido relacionado de la HCP. Esta región es la que presenta más variación en tamaño entre los precursores de la HAC: en insectos, en general es de 10 a 23 aminoácidos, y específicamente en *Drosophila melanogaster* es de 31 aminoácidos. En los crustáceos y en los moluscos el tamaño es similar: entre 31 a 35 aminoácidos (AA 86-120; Fig. 20). La región 3 corresponde a las copias de la hormona APGWamida. En los crustáceos esta región es de 20 aminoácidos que corresponden al péptido relacionado de la HCP. En los precursores de la HAC, todo este dominio está ausente (AA 121-205; Fig. 20).

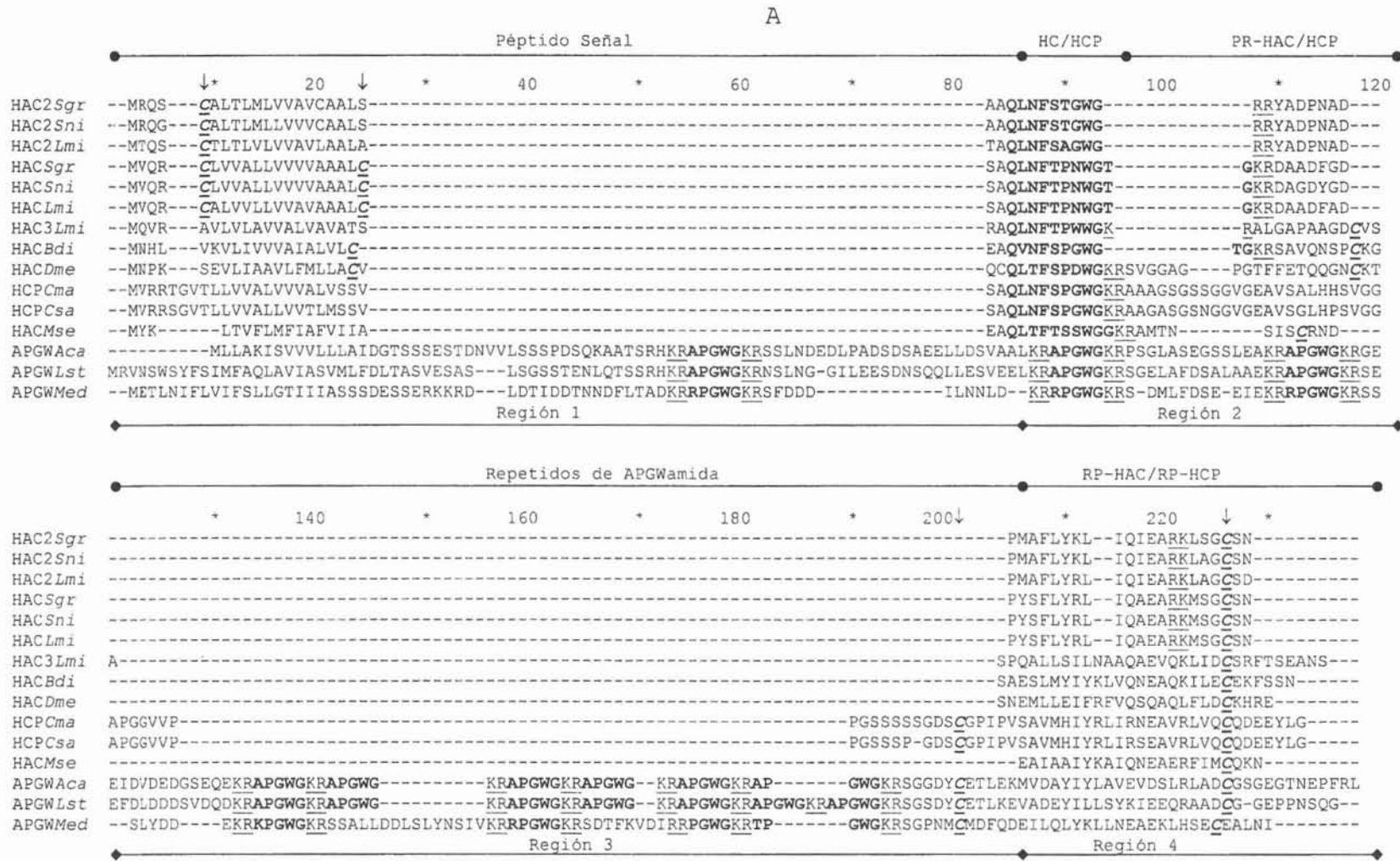


Figura 20.- Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de los precursores de las familias HAC/HCP y APGWamida. En los puntos unidos por las líneas se indica los diferentes motivos que forman a cada precursor (parte superior). Las cuatro regiones son indicadas por una línea unida por diamantes (parte inferior). Los asteriscos y los números de 10 en 10 indican el número de aminoácidos. La secuencia del péptido activo se indica con negritas. Los aminoácidos básicos para el corte de las endopeptidasas se encuentran subrayados. La cisteína para la dimerización del péptido y las intramoleculares se indican en negritas, itálicas, subrayada y con una flecha en la parte superior. HAC: *S. gregaria* (*Sgr*), *S. nitans* (*Sin*), *L. migratoria* (*Lmi*), *B. discoidalis* (*Bdi*), *D. melanogaster* (*Dme*) y *M. sexta* (*Mse*). HCP: *C. maenans* (*Cma*) y *C. sapidus* (*Csa*). APGWamida: *A. californica* (*Aca*), *L. stagnalis* (*Lst*) y *M. edulis* (*Med*).

La región 4 contiene los últimos 20 aminoácidos del péptido relacionado de la HAC y HCP; este dominio también está presente en la APGWamida. Todos los precursores contienen conservada la cisteína (AA 226) que se requiere para la formación de los dímeros HAC-HAC, que es un requerimiento previo al procesamiento del pro-HAC de *Locusta migratoria* (Fisher–Lougheed *et al.*, 1993). Además, esta cisteína pudiese formar puentes de disulfuro intramoleculares con una cisteína del dominio 3 en los crustáceos, en los moluscos (AA 201) y en las HACs de: *Manduca sexta*, *Drosophila melanogaster*, *Blabellus discordalis* y en la HAC III de *Locusta migratoria* (AA 113 y 118). La formación de enlaces disulfuro intramoleculares pudiera ocurrir, aparentemente, con la región 1 de las HAC del género *Shistocerca* y en las HAC I y II de *Locusta migratoria* pero estas cisteínas se encuentran en el péptido señal, región que se elimina en el proceso de internalización de la prohormona al lumen del retículo endoplasmático rugoso (Fig. 20).

Se analizó la posible estructura secundaria que tienen los precursores de la familia HAC/HCP por dos métodos (Gibrat *et al.*, 1987; Geourjon y Deléage, 1994). Se encontró, con ambos métodos, que la estructura de todos los precursores es la misma, independientemente de la especie (Fig. 18). La región 1 tiene una alfa hélice, sin embargo en los moluscos la alfa hélice se interrumpe por estructuras del tipo “random coil” (AA 20-44 y 54-74 en *A. californica*, AA 31-77 en *L. stagnalis* y AA 15-28 en *M. edulis*). La región 2 está formada por un “random coil” en todas las especies salvo en los moluscos que se interrumpe por una alfa hélice (AA 99-111). La estructura “random coil” se mantiene en la región 3 de los crustáceos, pero en los moluscos se encuentra una alfa hélice al principio del dominio (AA 121-134 en *A. californica* y *L. stagnalis* y aminoácidos 141-154 en *M. edulis*). Por último, la región 4 presenta una alfa hélice y termina con una estructura “random coil” (Fig. 21).

Alineamientos de los precursores a nivel de los ácidos nucleicos.

Los alineamientos de los precursores de las tres familias con los ácidos nucleicos mostraron, que los codones que codifican para el péptido señal están en tres regiones (nucleótidos (nc) 1-223); inmediatamente después, se encuentran los codones que codifican para el último codón del péptido

señal y los dos primeros aminoácidos de la HAC y de la HCP (nc 224-232; Fig. 22). Esta región también está presente en el precursor de las tres especies de moluscos (Motivo 1) y su secuencia consenso es CAGBTB (B = sin adenina; Fig.22). Los codones que codifican para los aminoácidos 3, 4 y el primer nucleótido del codón 5 en la HAC y en la HCP (nc 274-280) están separados por 45 nucleótidos de los precursores de *Aplysia* y *Mytilus edulis*. En esta región, el consenso en el precursor de los moluscos, de los insectos y de los crustáceos es AACTTCW (W= A/T; Motivo 2; Fig.22). Por último, los codones que codifican para las posiciones 6 a 8 (nc 375-387), están separados por 94 nucleótidos en los precursores de *Aplysia* y *L. stagnalis*. Esta región tiene los dos nucleótidos de la posición 6, los codones 7 y 8 y los dos primeros nucleótidos del codón 9 de la HAC y HCP (Motivo 3). La secuencia consenso de todo el motivo es CVCCBDRNTGGGGN (R = A/T, N = cualquiera B, D, V, no A, C, y T) e incluye la tercera y la primera copia de la APGWamida de *Aplasia* y de *Mytilus edulis* (Fig. 22). Después del motivo 3 se encuentran dos regiones homólogas que codifican para los PR-HAC/HCP y la mayoría de los repetidos de la APGWamida (nc 429-455 y 621-662). La última región es la que presenta mayor homología entre todas las especies; corresponde a la parte final de los codones del extremo 3' de los precursores. Está formada por las regiones 6, 7 y 8 (nt 680-689, 701-719 y 737-776). La región 6 contiene al intrón de la HCP en *C. sapidus* y las HAC I y II de *Shistocerca nitans*, así como el codón que codifica para la cisteína que participa en la dimerización del péptido (nc 730; Fig. 22).

Nuestros análisis sugieren fuertemente que los péptidos de la familia HAC-HCP pudieron originarse por arreglo de los nucleótidos del gen del precursor APGWamida de los moluscos. En donde, el origen del la HAC de los insectos y de la HCP en los crustáceos es por la unión de

Codón de inicio

Péptido señal

	20	40	60	80	100	120	140	160	180
HAC2Sgr	-----GACAGAAACAGG-----	ATGA -----	GGCAAAAGCTGTCGGCTAACTCT	GATGCTGGTGGTGGCG	-----	-----	GTGTG CCAGAGCC GTGCTGC	-----	-----
HAC2Sn1	-----AACCAAGACAGG-----	ATGA -----	GGCAAGGCTGTCGGCTAACTCT	GATGCTGCTGGTGGTG	-----	-----	GTGTG CCAGAGCC GTGCTGC	-----	-----
HAC2Lmi	-----ACCACAACAGG-----	ATGA -----	GGCAAAAGTTGCACGCTGACGCT	GGTGTGGTGGTGGCG	-----	-----	GTGTT GCAGCAC GTGGCCAC	-----	-----
HAC3Sgr	-----GGCCAACAGG-----	ATGG -----	TGCAGCGGTGCTGGTGGTAGC	-----CTTGTGGTGGTGGTG	-----	-----	GTGCGG TCGCCATGCTC	-----	-----
HAC3Sn1	-----CCAGCGAACAGG-----	ATGG -----	TGCAGCGGTGCTGGTGGTAGT	-----CTTGTGGTGGTGGTG	-----	-----	GTGG CCAGTGC CTATGTCTC	-----	-----
HAC3Lmi	-----CCAGAGAACAGG-----	ATGG -----	TGCAGCGTTCGCCCTGGTGGT	CCGC -----TGGTGGTGGCG	-----	-----	GTGG CCAGCGG CTGTGCTC	-----	-----
HCP Csa	-----AACACGGAAGGC-----	ATGG -----	TCCGAGATCTGGAGTGCAGCT	-----TTTGGTGGTGGCGCTGTG	-----	-----	GTGGT CCAGCTC ATGTCCCTCGT	-----	-----
HCP Cma	-----AACACGGAAGGC-----	ATGG -----	TCCGTAGAACCGAGTGCAGCT	-----TTTGGTGGTGGCGCTGGTG	-----	-----	GTGGT CCAGCTC GTGTCCCTCGT	-----	-----
APGWaca	-----CTGTTTATC-----CGCTCCT-----	GTGAT -----	GTGGTGGCCAAAT-CTCCGTTGGTCTTACTCCCTTGCATCGATGGCACTTC	-----TCTTCTGAAT CCA	-----	-----	CAGACAAGTGTGCTT CTCTCCCTC ACCCTGA	-----	-----CAGCCAGAAAGCAGCTACA
APGWLst	ACTCGATAGACAAC ATG CGT-----	GTGA -----	ACAGTGGTGGTACTTCTCTATAATGTTTGTCTCAACTTGTCTTATCGCCCTCAGTCATGTTATTTGACCT CA	-----	-----	-----	CCGCCCTGGAGTGGGCTCGTTATCAGGA ACTTCC ACC	-----	-----GAAACCT ACAG
HACBdi	-----ARGAATTTTACA-----	ATGA -----	ATCACCT AGTGAAGT	CTTG ATAGTTTCTCGTGGCC	-----	-----	ATAGCCCTGGTGGTGTGTA	-----	-----
HACDme	-----ATAGAACTCAGA-----	ATGA -----	ATCCC AGAGCGAAGT	CCGC ATTGCAGCCGTGCTCTT	-----	-----	CATGCTGCTGGC-CTGCTCCA	-----	-----
HACMse	-----TCATCAATCAAG-----	ATG -----	TACAAGCTCACAG CTCTT	CCGC ATGTTGATCGCTTT	-----	-----	CGTCATCATGGCTGA	-----	-----
APGWNed	-----TTTCAGGAAACGGGAACT ATG GAAACTTAAATATTTTCTGTTATTTTTCATTTAGGAAACAATAATAAGCTTTCATCTTCAGATGAGTCGAGTGAAGAAAGAAACAGAGATTAGATACAATAGATG	-----	-----	-----	-----	-----	ACACG AACAATGACTTTTTTAA	-----	-----

Región de procesamiento



	200	220	240	260	300	320	340	360
HAC2Sgr	-----GGCC CACTTC	-----	-----	-----	AACTTCT	-----	-----	-----
HAC2Sn1	-----GGCA CACTTC	-----	-----	-----	AACTTCT	-----	-----	-----
HAC2Lmi	-----GGCC CACTTC	-----	-----	-----	AACTTCT	-----	-----	-----
HAC3Sgr	-----GGCC CACTTC	-----	-----	-----	AACTTCA	-----	-----	-----
HAC3Sn1	-----GGCC CACTTC	-----	-----	-----	AACTTCA	-----	-----	-----
HAC3Lmi	-----CGCC CACTTC	-----	-----	-----	AACTTCA	-----	-----	-----
HCP Csa	-----CTCGCT CACTTC	-----	-----	-----	AACTTCT	-----	-----	-----
HCP Cma	-----ATCGCT CACTTC	-----	-----	-----	AACTTCT	-----	-----	-----
APGWaca	-----AGCAGCATAAAACGG CTCCGCTTGGGG AAAGCGAAG CACTTC GAACGACGAAGATCTTTTCGGGACTCAGACAGTGC	-----	-----	-----	AACTTCT	-----	-----	-----
APGWLst	GTCCAGCAGACACAAAG AGCCCGGCTTGGGG AAAGAGAA CACTTC AAACGA-GGAGATCTTT-GAAAGATCTGTA	-----	-----	-----	AACTTCT	-----	-----	-----
HACBdi	-----GGCT CACTTC	-----	-----	-----	AACTTCT	-----	-----	-----
HACDme	-----GTGT CACTTC	-----	-----	-----	AACTTCT	-----	-----	-----
HACMse	-----GGCC CACTTC	-----	-----	-----	AACTTCA	-----	-----	-----
APGWNed	-----CTGCTGACAAAGACGACC GGTTCGGGAA	-----	-----	-----	AACTTCT	-----	-----	-----



erProδlyTrpδly PR-HAC/HCP PR-HCP, Repetidos de APGWamida

	380	400	420	440	460	480	500	520	540
HAC2Sgr	CAACC GGT TGGGG	-----	-----	TCGGC	-----GCTACGCAGATCC	-----	-----	-----	-----CAA
HAC2Sn1	CAACC GGT TGGGG	-----	-----	TCGGC	-----GCTACGCAGATCC	-----	-----	-----	-----CAA
HAC2Lmi	CGAC GGG TGGGG	-----	-----	CGGGC	-----GCTACGCAGACCC	-----	-----	-----	-----CAA
HAC3Sgr	CCCC CAACT TGGGG CA	-----	-----	-----	-----CCGGCAAACGGGACGCTCGGGA	-----	-----	-----	-----CTT
HAC3Sn1	CCCC CAACT TGGGG CA	-----	-----	-----	-----CCGGCAAACGGGACGCGGGAGA	-----	-----	-----	-----CTA
HAC3Lmi	CCCC CAACT TGGGG GA	-----	-----	-----	-----CTGGCAAGCGAGACGCGCCGA	-----	-----	-----	-----CTT
HCP Csa	CGCC CGGT TGGGG CAAGAGGGC	-----	-----	-----	-----CTCTGGCCGGCCCGCCGGCGGA	-----	-----	-----	-----CTG
HCP Cma	CCCC CGGCT TGGGG TAAAGAGGGCGCTGGAGCC	-----	-----	-----	-----AGTGGCAGCAATGGTGGCTGGGAGAGGCGAGTGTCTGGTCTCCACCCCTCCGTTGGGGGCGCCCGGAGGCGTGGTACCCCTTGA	-----	-----	-----	----- CTC CCC
APGWaca	CCCT TGGCT TGGGG TAAAGAGGGCGCTGCAGGG	-----	-----	-----	-----AGCGGCAGCAGCGGTGGCTGGGAGAGGCGAGTGTGAGCTCTCCACCTTCTGTTGGGAGGCGCCCTGGAGCGTGTGCTCCAGGA	-----	-----	-----	----- CTC CTC
APGWLst	AACGC CGCC TGGAT TGGGG AAAGAGGGCCAGGAGATT	-----	-----	-----	-----GACTGGACRAGACGGCTCAGAGCAGGAAAGAGA	-----	-----	-----	-----
HACBdi	AGCG CGCC CGGAT TGGGG AAAGAGAGTGGAGATT	-----	-----	-----	-----GATCTGGACRAGACGGCTGGTCAAGCAAGCGT	-----	-----	-----	-----
HACDme	CACT TGGCT TGGGG TA	-----	-----	-----	-----CTGGCAAGCGATCTCGATTCAA	-----	-----	-----	-----
HACMse	CGCC CGAT TGGGG CAAGCGTTCG	-----	-----	-----	-----GTGGCCGGAGCTGGTCTTGGAAAC	-----	-----	-----	-----TTTTT
APGWNed	CCT CGAGCT TGGGG	-----	-----	-----	-----AGGGAAAGGGCCATGACCAA	-----	-----	-----	-----CTC
APGWNed	AACGC CGAC TGGCT TGGGG AAAAGAGTGGATGTTGTTGCTGATCCGAAAGAAATGAAAACGTT CAAC CGCT TGGGG AAAAGTCCAGTTCATTATATGATGATGAAAACGAA AACT TGGT TGGGG AAAAGAGCTC	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----AGCTCTT



nucleótidos que están entre la primera y segunda copia de la APGWamida que a su vez, se fusionaron con la tercer copia del mismo precursor. Una segunda posibilidad es que existió un gen similar a la APGWamida y otro similar a la HAC/HCP los cuales recombinaron para formar a la HCP de los crustáceos y de los insectos.

Estas hipótesis se pusieron a prueba uniendo los tres motivos que se obtienen en los alineamientos de los cDNAs de las diferentes HAC, HCP y APGWamida. La traducción conceptual de la unión de las posiciones 378-383, 425-431 y 524-536 del precursor APGWamida de *Aplysia* y las posiciones 277-282; 321-327 y 354-366 en *Lymnaea stagnalis* origina la secuencia de la HAC y de la HCP. La única diferencia está en la posición 2 que puede estar ocupada por Fen en *Aplysia* o por Val o Leu en *Lymnaea stagnalis*, y en los crustáceos y los insectos (Fig. 23). En *Mytilus edulis* el panorama es similar; al unir las posiciones 176-181, 191-197 y 232-244 del precursor se obtiene la secuencia de *Lymnaea stagnalis* pero el ORF es interrumpido en la posición 5 por un codón de paro. En *Aplysia* y *Lymnaea stagnalis* esta posición es ocupada por el codón TCG que codifica para Ser; pero si hay una mutación en la segunda posición del codón por guanina se obtiene el codón de paro TGA que está en *Mytilus edulis* (Fig. 23).

La segunda evidencia de que la familia HAC-HCP posiblemente proviene de arreglos génicos del precursor de la APGWamida, es la posición que ocupan los intrones en el gen de la HAC. En *Drosophila melanogaster* el gen tiene un intrón entre el primero y el segundo codones del péptido activo. Mientras que en *Shistocerca nitans* el intrón en el gene de la HAC I está entre los codones 20 y 21; de igual manera, para la HAC II está entre el codón 52-53, que codifica para el PR-HAC. Por último el gen de la HAC de *Manduca sexta* carece de intrones. En el caso del gen de la HCP de *C. sapidus* el intrón está entre los codones 92 y 93 del PR-HAC (Fig. 22).

Al respecto se han propuesto dos hipótesis del mecanismo de inserción de intrones. Una es por procesamiento reverso de un intrón escindido dentro de un pre-mRNA no homólogo, seguido por

		Motivo 1	Motivo 2		Motivo 3		Región de corte							
		↓	↓ ↓	↓ ↓		↓ ↓		↓ ↓						
HAC2	<i>S.gregaria</i>	CAG	CTC	AAC	TTC	TCA	ACC	GGT	TGG	GGT	CGG	CGC		
HAC2	<i>S.nitans</i>	CAG	CTC	AAC	TTC	TCA	ACC	GGT	TGG	GGT	CGG	CGC		
HAC2	<i>L.migratoria</i>	CAG	CTC	AAC	TTC	TCG	GCG	GGG	TGG	GGG	CGG	CGC		
HAC	<i>S.gregaria</i>	CAG	CTC	AAC	TTC	ACC	CCC	AAC	TGG	GGC	ACC	GGC	AAA	CGG
HAC	<i>S.nitans</i>	CAG	CTC	AAC	TTC	ACC	CCC	AAC	TGG	GGC	ACC	GGC	AAA	CGG
HAC	<i>L.migratoria</i>	CAG	CTC	AAC	TTC	ACC	CCC	AAC	TGG	GGG	ACT	GGC	AAG	CGA
HAC3	<i>L.migratoria</i>	CAG	CTC	AAC	TTC	ACG	CCG	TGG	TGG	GGC	AAG	AGG		
HCP	<i>C.sapidus</i>	CAG	CTT	AAC	TTC	TCC	CCC	GGC	TGG	GGT	AAG	AGG		
HCP	<i>C.maenans</i>	CAG	CTT	AAC	TTC	TCC	CCT	GGC	TGG	GGT	AAG	AGG		
APGW	<i>A.californica</i>	CAG	TCT	AAC	TTC	TCG	CCT	GGA	TGG	GGC	AAG	AGA		
APGW	<i>L.stagnalis</i>	CAG	TTT	AAC	TTT	TCG	CCC	GGA	TGG	GGC	AAG	AGA		
HAC	<i>B.discoidalis</i>	CAG	GTG	AAC	TTC	TCA	CCT	GGC	TGG	GGT	ACT	GGC	AAG	CGA
HAC	<i>D.melanogaster</i>	CAA	TTG	ACC	TTC	TCG	CCG	GAT	TGG	GGC	AAG	CGT		
HAC	<i>M.sexta</i>	CAG	CTG	ACC	TTC	ACC	TCG	AGC	TGG	GGA	GGG	AAG	AGG	
APGW	<i>M.edulis</i>	GGG	TTG	AAG	TTT	TGA	CCT	GGC	TGG	GGC	AAA	AGA		
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
		Motivo 1	Motivo 2		Motivo 3		Región de corte							
		↓	↓ ↓	↓ ↓		↓ ↓		↓ ↓						
HAC2	<i>S.gregaria</i>	Gln	Leu	Asn	Phe	Ser	Thr	Gly	Trp	Gly	Arg	Arg		
HAC2	<i>S.nitans</i>	Gln	Leu	Asn	Phe	Ser	Thr	Gly	Trp	Gly	Arg	Arg		
HAC2	<i>L.migratoria</i>	Gln	Leu	Asn	Phe	Ser	Ala	Gly	Trp	Gly	Arg	Arg		
HAC	<i>S.gregaria</i>	Gln	Leu	Asn	Phe	Thr	Pro	Asn	Trp	Gly	Thr	Gly	Lys	Arg
HAC	<i>S.nitans</i>	Gln	Leu	Asn	Phe	Thr	Pro	Asn	Trp	Gly	Thr	Gly	Lys	Arg
HAC	<i>L.migratoria</i>	Gln	Leu	Asn	Phe	Thr	Pro	Asn	Trp	Gly	Thr	Gly	Lys	Arg
HAC3	<i>L.migratoria</i>	Gln	Leu	Asn	Phe	Thr	Pro	Trp	Trp	Gly	Lys	Arg		
HCP	<i>C.sapidus</i>	Gln	Leu	Asn	Phe	Ser	Pro	Gly	Trp	Gly	Lys	Arg		
HCP	<i>C.maenans</i>	Gln	Leu	Asn	Phe	Ser	Pro	Gly	Trp	Gly	Lys	Arg		
APGW	<i>A.californica</i>	Gln	Phe	Asn	Phe	Ser	Pro	Gly	Trp	Gly	Lys	Arg		
APGW	<i>L.stagnalis</i>	Gln	Val	Asn	Phe	Ser	Pro	Gly	Trp	Gly	Lys	Arg		
HAC	<i>B.discoidalis</i>	Gln	Val	Asn	Phe	Ser	Pro	Gly	Trp	Gly	Thr	Gly	Lys	Arg
HAC	<i>D.melanogaster</i>	Gln	Leu	Thr	Phe	Ser	Pro	Asp	Trp	Gly	Lys	Arg		
HAC	<i>M.sexta</i>	Gln	Leu	Thr	Phe	Thr	Ser	Ser	Trp	Gly	Gly	Lys	Arg	
APGW	<i>M.edulis</i>	Gly	Val	Lys	Phe	***	Pro	Gly	Trp	Gly	Lys	Arg		
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13

Figura 23.- Alineamiento de la secuencia de la HCP y HAC con la secuencia del precursor de la APGWamida. Al unir los tres motivos de ácidos nucleicos de las tres familias (indicados con flechas), en moluscos se obtienen los codones de la HCP (en negritas). La traducción conceptual de la APGWamida de *A. californica* y *L. stagnalis* muestran un 91% de identidad con las HAC y HCP. La única diferencia es en codón 2. En *M. edulis* se presenta un codón de paro en el codón 5 (en *).

transcripción reversa y recombinación homóloga. El otro posible mecanismo involucra la invasión de intrones tipo II (de organelos) al genoma nuclear seguido por una mutación, la cual transforma al intrón II a intrón nucleosomal. En este sentido solo se requiere una mutación en la secuencia que flanquea a los intrones tipo II ((U/C) A...GU) para obtener la secuencia canónica de los intrones nucleares (Rzhetsk *et al.*, 1997).

Un aspecto sobresaliente de los alineamientos con ácidos nucleicos es que las regiones en donde se encuentran los intrones de los genes HAC de *D. melanogaster*, *S. nitans* y de la HCP de *C.*

sapidus comparten identidad con el motivo IBS2 (nc 225-231, 681-689 y 276-281, respectivamente en la Fig. 22) el cual a sido demostrado que es una región de inserción o eliminación de intrones tipo II (Mörl y Schmelzer 1990, Yang *et al.*, 1996). Al utilizar como directriz la hipótesis de que, estas regiones son sitios de inserción o eliminación de intrones tipo II y que mutaciones en esta región los convierte a intrones nucleares, nos permite explicar que, aún cuando el sitio de unión exón-exón no presenta un 100% de identidad con el motivo IBS2 las pocas regiones que lo comparten se pueden considera como ecos de la eliminación o inserción de ambos intrones en los precursores APGWamida HAC y HCP.

La hipótesis anterior sugiere que en los exones de los genes HAC, que actualmente carecen de alguno o de ambos intrones, y en el gen de la HCP deben de existir sitios potenciadores del procesamiento del pre-RNAm (PP-RNA) y/o dominios de unión para factores auxiliares del procesamiento del pre-RNAm, los cuales participaron en el procesamiento del pre-mRNA de la molécula ancestral. Aún cuando estos motivos ya no son activos en algún proceso del procesamiento de pre-RNAm, por la carencia del intrón, su presencia es una evidencia indirecta de su función en el procesamiento del intrón que fue eliminado.

En este sentido todos los posibles exones tienen los consensos propuestos por Schaal y Maniatis (1999) y Liu *et al.*, (1998). En el primer exón de *Drosophila melanogaster* se encuentra la secuencia AGAGC (nc 56-60) que es similar al motivo de unión para proteínas SRp-40 (secuencia consenso ACDGS, donde S = G/C y D sin T) y un motivo F clase II (65-76) característicos de los potenciadores ricos en pirimidinas (TCCTC). Este motivo también esta en la misma posición de la HAC de *Locusta migratoria*, mientras que *Manduca sexta* presenta un motivo E clase II (TCTTC) en la misma posición aunque el gen carece de exones (regiones 1 y 2 en la Fig. 19). Cerca de la parte final del extremo 3' del primer exón del precursor de la HAC de *Drosophila melanogaster* (región 3), el gen de *S. nitans*, que no tiene intrón, presenta un motivo SRSASGA (nc 142-148) similar para el sitio de unión a proteínas SF2/AFS. Este motivo se encuentra en la misma región de los precursores de:

Shistocerca gregaria, *Locusta migratoria* y *Carcinus maenas*. En esta misma región los precursores de *Callinectes sapidus*, *Lymnaea stagnalis*, *Mytilus edulis* y la HAC III de *L. migratoria* tienen motivos para proteínas SRp40. En los moluscos los únicos precursores que presentan secuencias de potenciadores para el procesamiento del pre RNAm son *Aplysia* y *Mytilus edulis*, que tienen un motivo E clase II (Fig. 22).

En el segundo exón de las HAC y de la HCP ocurre una situación similar a la del primer exón ya que en el extremo 3' de las HAC I y II de *S. nitans* (nc 683-684) hay un motivo F clase II (nc 629-656) antes del intrón. Este motivo también está presente en los cDNA de las HAC I y II de *S. gregaria* y *L. migratoria* (Fig. 22). En la región 5 está un motivo de unión de SRp40 y un motivo D clase II (TCTCC) en el precursor de *M. sexta* y *D. melanogaster* respectivamente. Pero en estas especies el gen carece de intrón en esta posición. La región 5 también presenta una alta homología con los precursores de la HAC de *B. discoidealis*, con la HAC III de *L. migratoria*, con la HCP de *C. sapidus* y *C. maenans* y con las APGWamida de *A. californica* y *L. stagnalis*, en donde el motivo SRp40 también está presente. Por último posibles motivos A clase I (GGGGA) y motivo F clase II se encuentran en *M. edulis*, en la HAC I y II de *S. gregaria* y *L. migratoria* respectivamente (Fig. 22).

Los resultados anteriores se corroboraron con el árbol filogenético obtenido de la secuencia de aminoácidos de los precursores de las familias APGWamida y HAC/HCP, el cual está de acuerdo con trabajos previos (Gade *et al.*, 1997; Bogred *et al.*, 1995). El árbol filogenético muestra claramente, que el precursor de APGWamida de los moluscos es más antiguo que la HCP de los crustáceos y de los insectos (Fig. 24A).

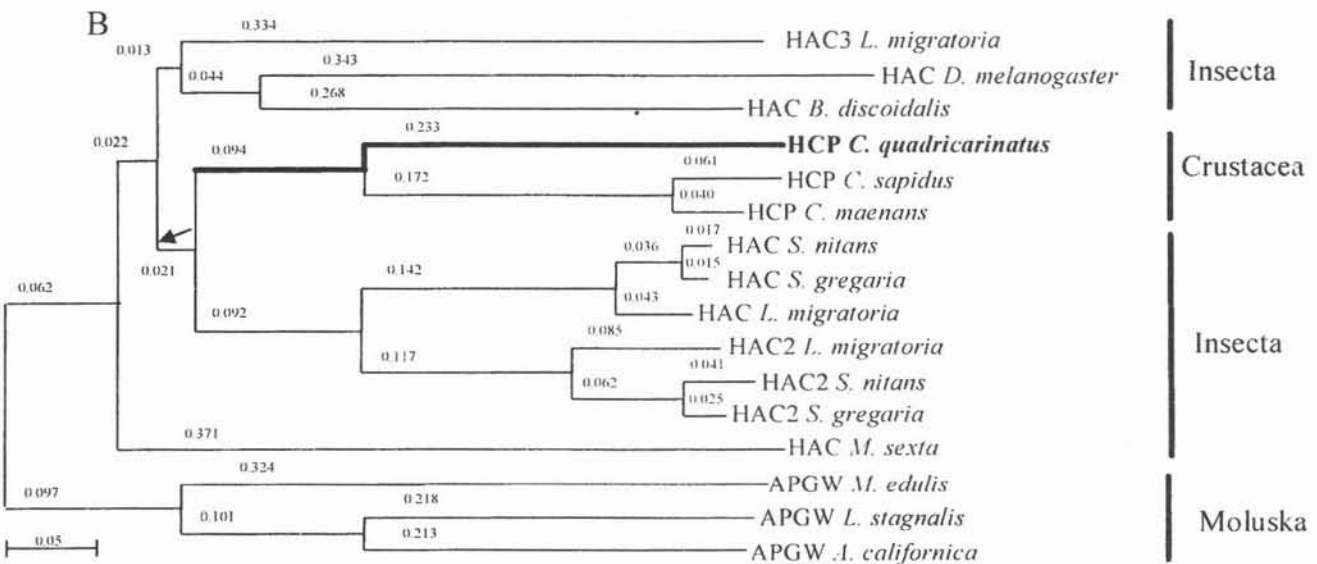
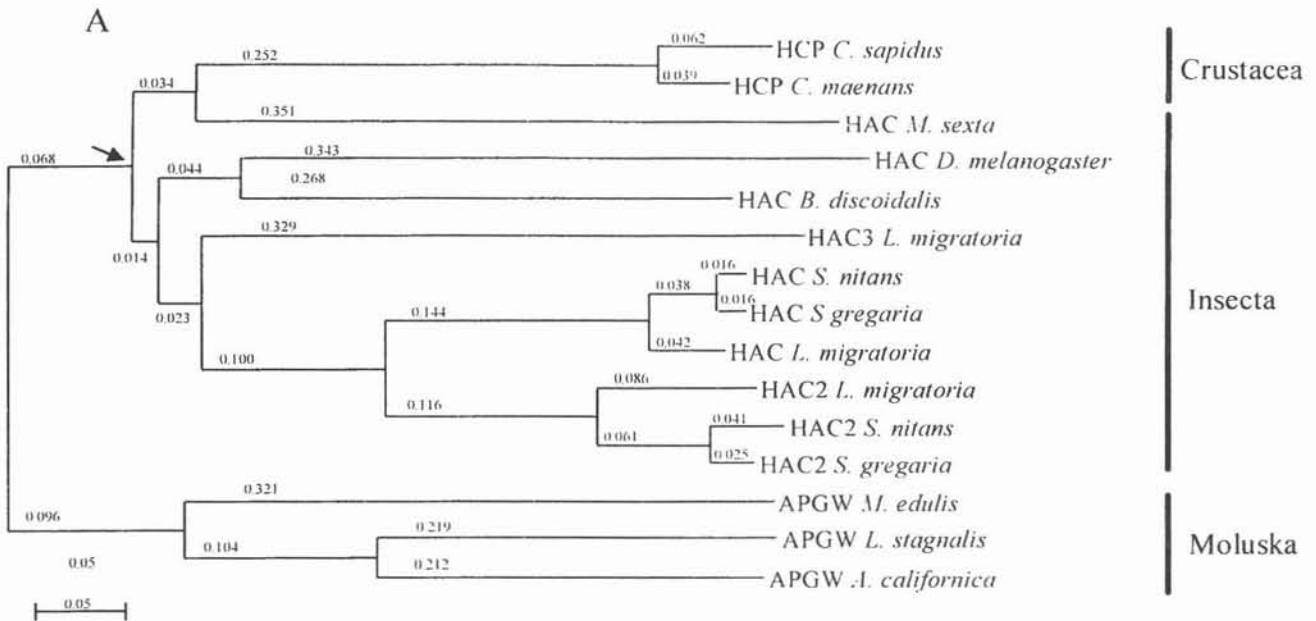


Figura 24.- Filogramas de las familias Hormona Adipocinética (HAC), Hormona Concentradora de Pigmentos (HCP) y APGWamida. A) la flecha indica el nodo de ramificación entre la HAC y la HCP. B) al incluir en el modelo la secuencia de la HCP del acocil *C. quadricarinatus* se presenta un nuevo arreglo entre los miembros de la familia HAC/HCP sin que se rompa la relación con la familia APGWamida. El origen del nodo entre los miembros de la HAC y la HCP se indica con una flecha y las ramas de la HCP del acocil se indican con una línea gruesa.

Aplicación del modelo del posible origen de la familia HAC/HCP a la secuencia del mRNA de la HCP del acocil C. quadricarinatus.

El modelo propuesto para el posible origen de la familia HAC/HCP propone que la HCP proviene de arreglos en los nucleótidos del precursor de la APGWamida. Lo anterior, sugiere que otros RNAm que se postulen que sean de estas familias deberán de presentar:

- 1.- Homología dentro del mismo grupo taxonómico.
- 2.- El pre-propéptido debe tener una organización similar a las familias HAC/HCP y APGWamida.
- 3.- Su secuencia de RNAm presentará los motivos para el procesamiento de su pre-RNAm en posiciones similares a los miembros de las dos familias.
- 4.- Los posibles sitios de inserción de intrones deben de estar en una ubicación similar a los miembros de las familias.

Al incluir la secuencia del cDNA del precursor de la HCP del acocil *C. quadricarinatus* se observa claramente que se localiza dentro del mismo nodo de las HCP, además de que, aparentemente, es mas antigua que la de los cangrejos. Otro aspecto a resaltar es que los miembros de la familia HAC/HCP presentan un nuevo arreglo en comparación con el modelo propuesto (Fig. 24A), en donde la HCP se origina en el mismo nodo de las HAC de *S. nitans*, *S. gregaria* y *L. migratoria* I y II. A su vez las HAC de *M. sexta*, *D. melanogaster*, *B. discoidalis* y *L. migratoria* I, se encuentran en nodos anteriores al de la HCP, los cuales se originan de un nodo común (Fig. 24B). Este nuevo arreglo no afecta el modelo original ya que se mantiene el origen entre los miembros de la familia HAC/HCP de los insectos y crustáceos a partir de la familia APGWamida de los moluscos.

Este nuevo arreglo entre los miembros de la familia HAC/HCP no afectó la composición de los tres motivos que posiblemente dieron origen a la familia HAC/HCP a partir del precursor de la APGWamida de los moluscos. Mas aún las secuencias consenso IBS1 y IBS2 de inserción de intrones no cambian de posición, por lo que se continúa validando el modelo (Fig. 25).

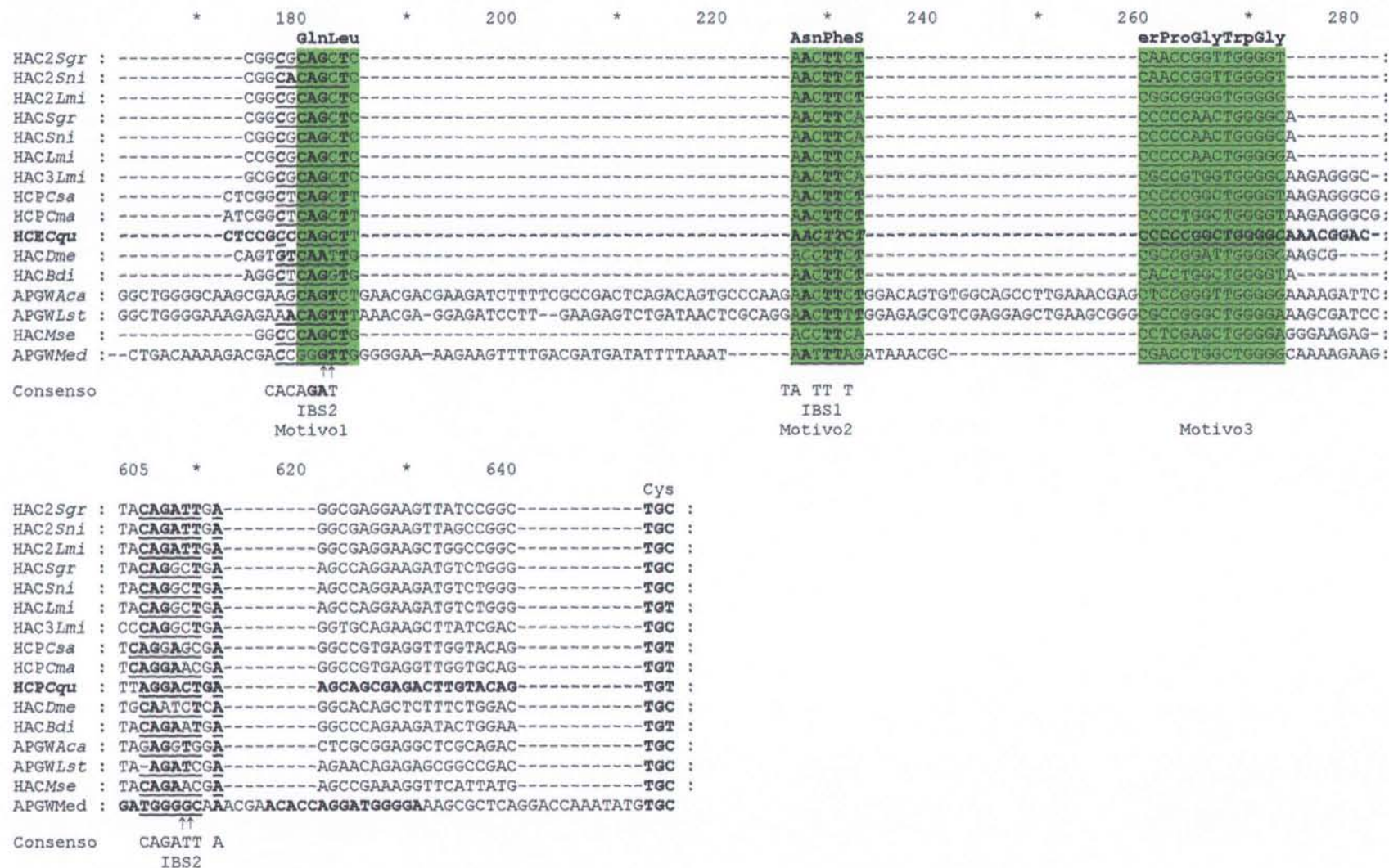


Figura 25.- Alineamiento parcial de la secuencia de ácidos nucleicos de los precursores de las familias HAC/HCP y APGWamida. La secuencia de la HCP del acocil se indica en negritas. Note que los codones de los tres motivos no se modifican al incluir la secuencia del acocil (en cajas verdes). Los sitios de inserción de los intrones y la posición de los mismos en los genes de la HAC y HCP se indican con flechas. Los nucleótidos consenso IBS1 y 2 se muestran con negritas y subrayados. La cisteína para la dimerización del precursor se indica en negritas.

Discusión

Se ha propuesto que el pedúnculo ocular de los crustáceos es una de las principales estructuras en donde ocurre la generación de los ritmos circadianos (Moreno-Sáenz *et al.*, 1989), dentro de los cuales se encuentra el movimiento de los pigmentos en la retina y en los cromatóforos tegumentarios. Uno de los componentes de este ritmo son las hormonas dispersora y concentradora de pigmentos (Aréchiga *et al.*, 1997). En este sentido se ha determinado que la concentración de la HCP en el pedúnculo ocular presenta ritmos circadianos endógenos y anuales (Aréchiga *et al.*, 1997; Gárfias *et al.*, 1995; de Kleijn *et al.*, 1993; Rodríguez-Sosa *et al.*, 1997). Además se presenta una correlación entre la actividad eléctrica de las neuronas del pedúnculo ocular, que producen a la HCP con su concentración en ciclos circadianos (Uribe *et al.*, 1998). Sin embargo, se desconocía si los eventos celulares antes mencionados tienen su origen desde la transcripción del gen de la HCP en las células del pedúnculo ocular. Por lo que, un objetivo fundamental para concluir la participación de la HCP en el ritmo circadiano en la migración del pigmento distal en la retina y en los pigmentos de los cromatóforos, era la cuantificación de la concentración de su RNAm en periodos de luz oscuridad y la sincronización en la actividad del reloj biológico bajo condiciones de oscuridad constante en el pedúnculo ocular.

La principal limitante para alcanzar el objetivo anterior en el acocil era la falta de una metodología que permitiera obtener el DNA y el RNA total del pedúnculo ocular, libre de los pigmentos, de los compuestos fenólicos y de los carbohidratos que coprecipitan con los métodos desarrollados a la fecha (Chomczynski y Sacchi, 1985; Sewall y McRae, 1998). El protocolo debía de tener una alta eficiencia en la obtención del RNA y de facilitar el manejo de un alto número de muestras en poco tiempo. Se ha demostrado, por inmunohistoquímica, que la HCP esta en un grupo de 10 a 14 neuronas en el tallo ocular (Rodríguez-Sosa *et al.*, 1998; Preciado *et al.*, 1998; Alvarado-Alvarez *et al.*, 1999). De estas células había que purificar, secuenciar y cuantificar a los RNAm de la HCP y la de un gen cuya expresión fuera constitutiva para después amplificarlo por ensayos de RT-

PCR semi-cuantitativa, ya que, por otros métodos hubiera sido imposible la cuantificación. Así mismo, se desconocía el patrón de la expresión de los genes constitutivos como el de la beta-Actina, el de la G3PDH y el del rRNA 18S en el pedúnculo ocular del acocil *C. quadricarinatus*, que son utilizados como control de la integridad y del patrón de expresión en los estudios de cuantificación (Bustin, 2000).

Los métodos de extracción de los ácidos nucleicos del pedúnculo ocular del acocil que en este trabajo se desarrollaron, cumplieron con todos los requerimientos necesarios para la obtención del DNA y del RNA, libres de compuestos que interfieren en las reacciones enzimáticas (Sewall y McRae, 1998). Lo anterior fue un factor determinante para conocer por primera vez la secuencia de los ácidos nucleicos de la HCP y de la G3PDH en el acocil, ya que únicamente se conocían en los cangrejos *C. sapidus* y *C. maenans* (Link *et al.*, 1993; Klein *et al.*, 1995) así como en *Daphnia pulex* y en las langostas *Palinurus versicolor* y *Homarus americanus* respectivamente (Genebank; Lin *et al.*, 1993; Moras *et al.*, 1975). Además se completó la secuencia del cDNA de la beta-Actina en el acocil ya que no se conocía el extremo 5' UTR incluyendo a la región del codón de inicio de la traducción (Kang y Naya, 1993).

Debido a que la caracterización de cada cDNA fue por segmentos empleando métodos diferentes para cada segmento fue necesario corroborar la unión de cada cDNA. Los marcos abiertos de lectura de los RNAm de la beta-Actina, de la G3PDH y del RNAr 18S pudieron ser amplificados en su totalidad, siempre y cuando se empleara una mezcla de DNA polimerizas como para las amplificaciones de mas de 1000 pb (Barnes, 1994; Cheng *et al.*, 1994; Wang *et al.*, 1989), (Figs. 5 y 15). Sin embargo para la HCP no se logró la amplificación de todo el ORF por RT-PCR, lo cual puede ser en parte, por la estabilidad de las posibles estructuras secundarias que adquiere su RNAm en solución, tal como ocurre en los genomas ricos en guanina y en citosina, por lo que la actividad de la transcriptasa reversa a 42 grados centígrados produce productos incompletos con este tipo de RNAs (Ausebel *et al.*, 1994).

El cDNA de la HCP del acocil tuvo todos los elementos de los precursores de la familia HAC/HCP, a saber: la secuencia para la internalización al lumen del retículo endoplásmico rugoso, el péptido activo, los aminoácidos de corte y el péptido relacionado a la HCP (Figs. 13 y 14). La expresión de su RNAm fue únicamente en el pedúnculo ocular, tal como había sido determinado (Rodríguez-Sosa *et al.*, 1994; Alvarado-Alvarez *et al.*, 1999; Aréchiga *et al.*, 1993). Sin embargo no se descarta la posibilidad de que pudieran existir otros grupos neuronales en el acocil que realizan la biosíntesis de la HCP, ya que se ha encontrado actividad de neurotransmisor o neuro modulator en otros órganos nerviosos (Dickinson *et al.*, 1993; Sherff *et al.*, 1991; Nusbaum *et al.*, 1988; Sarojini *et al.*, 1995).

Un aspecto a resaltar en la clonación del precursor de la HCP es el hecho de que en los ensayos de RACE 3' se encontrara la secuencia de codones de un neuropéptido con secuencia similar al precursor de la HCP, sugiriendo fuertemente que pudiera existir un nuevo gen relacionado con la HCP, tal como ocurre en los miembros de la HAC (Fig. 1 y Tabla 1). Además, esta nueva secuencia se encuentra dentro del cromosoma 1 del genoma humano, pero se desconoce si es un nuevo neuropéptido así como su posible función (GeneBank 15131847).

La clonación y caracterización del cDNA de la beta-Actina y de la G3PDH, indicaron que ambas proteínas tenían los dominios universales necesarios para su actividad (Figs. 7 y 10). Además se expresaron como cualquier gen constitutivo en el pedúnculo ocular, en las branquias en el hepatopáncreas y en el músculo, tal como ocurre con el RNAr 18S (Fig. 15).

Desde un principio, al determinar la concentración del RNA total del pedúnculo ocular a diferentes horas del día, se observó que siempre hay un ritmo trimodal, en un periodo de 24 h, en donde los puntos máximos son a las 5.00, a las 14.00 y a las 20.00 h del día. Considerando que del conjunto de RNA total únicamente el 2 % es RNAm (Ausebel *et al.*; 1994) el ritmo indicaba que posiblemente la mayoría del RNAm también podría estar presentando algún ritmo lo cual fue verificado con la cuantificación del RNAm de la HCP, del RNAr 18S y de la G3PDH que presentaron

tanto ritmos unimodales y bimodales respectivamente (Figs. 16, 18 y 19). Al igual que para el RNA total, para el cDNA de la G3PDH las horas de mayor concentración son a las 14.00 y 20.00 h, mientras que para el ritmo del cDNA de la HCP el punto máximo es a las 14.00 h y para el cDNA del RNAr 18S es a las 20.00 h. Este patrón de comportamiento en los RNAs y que se reportan como constitutivos, se ha demostrado que no necesariamente es igual en todos los organismos ya que en el hongo *Neurospora crassa* la G3PDH presenta un ritmo unimodal (Iwasaki *et al.*, 2004; Fagan *et al.*, 1999; Shinohara *et al.*, 1998) así como el patrón de la actividad de las RNA polimerasas de eucariotes también presenta ritmos (Onai *et al.*, 1998; Millington *et al.*, 1986; Gabú, 1976). Solamente el cDNA de la beta-Actina en todos los ensayos realizados no presento un patrón rítmico.

Con los valores de la concentración del cDNA de la HCP se demostró, por primera vez, que *C. quadricarinatus* presenta un ritmo en el pedúnculo ocular, con un periodo de 23.68 h, cuyo punto máximo es a las 9.57 h después del comienzo del ciclo (aproximadamente 14.00 h del día). El aumento en la amplitud de la concentración del cDNA de la HCP, de 11.00 de la mañana a las 14.00 h, pudiera ser un reflejo de la actividad de los genes reloj sobre el promotor del gen *HCP* (Fig. 19C; Tabla 3), tal como ocurre en *D. Melanogaster* (Dunlap, 1999; Mellow y Roenneberg, 2001; Stanewsky, 2002; Williams y Sehgal, 2001; Wang y Sehgal, 2002; Panda *et al.*, 2002).

En este sentido una condición fundamental para demostrar que un gen forma parte de un ritmo circadiano es que por la ausencia de algún sincronizador (*Zeitgeber*) se provocan cambios en la oscilación, además de tender a desaparecer y/o a desintegrarse para pasar a ser un ciclo ultradiano (Stupfel y Pavely 1990; Panda *et al.*, 2002). Este comportamiento circadiano de la HCP ya había sido determinado para la concentración del precursor de la HCP del acocil *P. Clarkii* que tiene un periodo de 25 h (Rodríguez-Sosa *et al.*, 1994) y para la actividad en el ciclo del movimiento distal y de las ínter neuronas visuales de los acociles *P. clarkii*, *P. bouvieri* y del cangrejo *C. maenans* con un periodo de 22.5 h en oscuridad constante (Aréchiga *et al.*, 1993). En los acociles acondicionados a 4 meses de oscuridad la concentración del cDNA de la HCP cambia de una forma unimodal a una

bimodal, con una amplitud de 2.45 veces con respecto al ciclo de luz-día (Tabla 3). Este resultado podría considerarse una evidencia indirecta de la acción de los genes reloj sobre el promotor de la HCP, sugiriendo que la biosíntesis comienza por la mañana con un punto máximo al medio día, procesándose el precursor a lo largo del axón y estar listo para su liberación en la tarde-noche. Otra explicación posibles es que a tiempos largos el cambio de un ritmo unimodal a bimodal pudiera deberse a un desacoplamiento del reloj biológico del acocil tal como se ha propuesto para estos organismos (Fanjul-Moles y Prieto-Sagredo 2003). Faltaría determinar el patrón de la concentración de la HCP en periodos de 5 días de oscuridad constante como se ha descrito en la literatura (Fanjul-Moles y Prieto-Sagredo 2003), para optar por un modelo.

Por ultimo faltaría por demostrar cual es la naturaleza de la molécula que participa en mantener el ritmo de la concentración del precursor de la HCP en forma unimodal en condiciones naturales y como es el efecto de los genes reloj sobre el promotor del gen *HCP*. La clonación, la caracterización de los genes reloj, y la interacción entre ellos ayudarán a responder cómo es la regulación de los genes regulados por genes reloj en crustáceos decápodos. En este sentido se ha demostrado la existencia de elementos inmunopositivos similares a PER en los fotorreceptores del tallo ocular y en la lamina del pedúnculo ocular del acocil *P. clarkii* (Aréchiga y Rodríguez-Sosa 1998), y el criptocromo esta presente en el protocerebro (Fanjul-Moles *et al.*, 2004), como indicación de la presencia del reloj biológico. En otro sentido se ha demostrado la presencia del precursor de la HCP en alguna de las neuronas del COXGS, así como de otros grupos de neuronas del tallo ocular de crustáceos. Nuestros resultados muestran que la expresión rítmica del RNAm del precursor de la HCP en su forma de cDNA se lleva a cabo en el tallo ocular y no en otros tejidos, probablemente como efecto de la actividad de los genes reloj.

Faltaría por demostrar los grupos celulares que generan la oscilación del reloj biológico en el tallo ocular y si estas células realizan también la biosíntesis del precursor de la HCP, tal como ocurre para el factor dispersor de pigmentos en *D. Melanogaster* (Lin *et al.*, 2004).

Otro objetivo planteado para este trabajo fue desarrollar un posible modelo para el posible origen de la familia de la hormona Adipocinética/Hormona Concentradora de pigmentos, debido a la similitud que presentan tanto a nivel de ácidos nucleicos como de aminoácidos entre los precursores de las familias.

Se ha sugerido que los neuropéptidos HAC/HCP y APGWamida pudieran tener un origen común (Klein *et al.*, 1995; Fan *et al.*, 1997; Smit *et al.*, 1996; Favrel y Mathieu, 1996). En este sentido, los genes ortólogos son definidos como secuencias de ácidos nucleicos que se originan de un ancestro común, pero cuyo producto protéico no conserva la función original (Fitch, 1970). Claramente podemos observar que los precursores de los neuropéptidos HAC, HCP, y APGWamida se encuentran dentro de esta clasificación, ya que la función de la APGWamida es la de modular el movimiento de varios músculos así como la de regular la producción de espermatozoides (Fan *et al.*, 1997; Smit *et al.*, 1996; Favrel y Mathieu, 1996), la de la HCP es regular el movimiento de pigmentos, tanto en la retina como en los eritroforos de crustáceos (Fernlund y Josefsson, 1972), mientras que la de la HAC es la de regular el metabolismo de lípidos y de los azúcares en el vuelo de los insectos (Stone *et al.*, 1976).

Nuestros análisis muestran que los péptidos de la familia HAC-HCP pudieran provenir del precursor APGWamide de los moluscos, en donde el origen de la familia en los crustáceos e insectos sería por la pérdida de regiones del precursor APGWamida y no por eventos de arreglo de exones como ha sido demostrado para otros genes que codifican para otras hormonas como el factor hormonal de crecimiento tipo 1 y el factor de crecimiento similar a la insulina, entre otros (Theill *et al.*, 1992; Hwa *et al.*, 1999; Patthy, 1996).

Esta hipótesis se confirmó al unir los tres motivos que se obtienen de los alineamientos de los cDNAs de las diferentes APGWamidas y cuya traducción conceptual da como resultado una secuencia similar a la HCP (Fig. 23). También se confirmó al analizar los sitios de inserción de intrones IBS1 y 2 que están en los genes HAC y HCP, así como las secuencias potenciadoras del procesamiento del pre

mRNA en los exones de las dos familias (Figs. 22 y 25). Por último se ha reportado que al inyectar los últimos cuatro aminoácidos que son comunes entre la APGWamida, la HCP y la HAC (Tabla 1) al camarón, se produce la concentración de los pigmentos (Christensen *et al.*, 1978; 1979). Experimentos similares se han realizado al inyectar HAC de *L. migratoria* a diferentes crustáceos ya que se produce la respuesta fisiológica de concentrar los pigmentos; mientras que la HCP produce la movilización de lípidos en *L. migratoria*, y en la mariposa *Danaus plexippus* (Mordue y Stone 1976, Mordue 1977; Dallmann *et al.*, 1981). Estos resultados sugieren que los receptores de los tres neuropéptidos reconocen a los aminoácidos que son necesarios para la actividad de cada hormona, como ha sido demostrado para la HAC (Lee *et al.* 1994; Valentza *et al.*, 2000)

Con las evidencias anteriores se propone que el origen de la familia HAC/HCP fue por eventos de pérdida y ganancia de DNA en los exones del gen ancestral, el cual estaba constituido por tres exones y dos intrones: la pérdida de dominios del primer exón formó lo que ahora conocemos como el péptido señal y el primer codón que codifica para el Glu de la HCP. En el segundo exón, la pérdida de dominios en el gen, ocasionó la unión de los nucleótidos que forman las posiciones 2 a 5 con la siguiente copia de APGWamida con lo que se obtuvieron los aminoácidos que forman la HCP. El tercer exón fue el que tuvo menos variación y existió una presión selectiva para mantener el dominio protéico que ahora conocemos. Lo anterior es congruente con el hecho de que la cisteína que es necesaria para formar los dímeros HAC, que es un requisito previo para el procesamiento de la prohormona (Fischer-Lougheed *et al.*, 1993), está conservada en todas las moléculas de este estudio. Una vez formado el precursor de la HCP el gen se pudo heredar al orden *insecta* en donde algunas especies perdieron alguno de los exones (*D melanogaster* o *S nitans*) mientras que otras eliminaron a ambos (*M. sexta*) para formar a la HAC.

Con la clonación de los genes HCP y APGWamida en más especies de invertebrados se podrá conocer más acerca del movimiento de intrones que componen a la familia HAC/HCP. Un aspecto importante en la caracterización de los genes HAC, HCP y APGWamida es encontrar

experimentalmente al gen ancestral. Esto puede intentarse clonando otros órdenes de moluscos como *Polyplacophora* y determinar si es que hay genes similares en otros órdenes de invertebrados. Estudios realizados en el nemátodo *Panagrellus redivivus* (Devenport *et al.*, 1991) han confirmado la presencia de un péptido con actividad similar a los miembros de la familia HAC/HCP. Sin embargo, no se conoce su secuencia de aminoácidos o el gen que lo codifica.

Conclusiones

- 1.- La expresión del RNAm precursor de la HCP tiene lugar únicamente en los tallos oculares, en tanto que el RNAm de la beta-Actina y de la G3PDH tiene lugar en el tallo ocular, en el hepatopáncreas, en las branquias y en el músculo.
- 2.- En ciclos de luz-oscuridad (12:12) la concentración del RNA total en el tallo ocular presenta un ritmo unimodal con un periodo de 24 horas. En oscuridad constante el ritmo cambia su amplitud, su periodo y su mesor a una forma bimodal.
- 3.- El cDNA del RNAr 18S del tallos oculares presenta un ritmo en periodos de 12:12 h de luz-oscuridad.
- 4.- El cDNA de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa tiene un ritmo bimodal en el tallo ocular, el cual pasa a ritmo unimodal en periodos de 4 meses de oscuridad.
- 5.- En el acocil *C. quadricarinatus* el cDNA de la beta-Actina presenta cambios discretos en su concentración en periodos de 12 h de luz-oscuridad y oscuridad constante. Por lo que se sugiere que su expresión es constitutiva.
- 6.- El cDNA de la Hormona Concentradora de Pigmentos presenta un ritmo unimodal en periodos de 12: h de luz-oscuridad, el cual, pasa a ser bimodal en periodos de 4 meses de oscuridad constante.
- 7.- El cDNA de la Hormona Concentradora de Pigmentos en el acocil *C. quadricarinatus* tiene todos los elementos que forman a los precursores de la familia de neuropéptidos HAC/HCP, pero tiene menos aminoácidos que en los cangrejos *C. sapidus* y *C. maenans*.
- 8.- El RNAm de la APGWamida de los moluscos presenta secuencias de ácidos nucleicos que al unirse producen un RNAm cuya traducción conceptual origina a la HCP.
- 9.- Los genes de las familias HAC/HCP y APGWamida pudieron originarse por procesos de ganancia y pérdida de DNA en un gen ancestral, formado por dos intrónes y tres exones.

Perspectivas

La siguiente parte del proyecto a mediano plazo es caracterizar y determinar la actividad de las regiones promotoras de los genes de la *HCP* y de la *G3PDH*, e identificar a las secuencias regulatorias. En el caso de la HCP aquellas que identifican directa o indirectamente a las de los genes reloj y en el caso de G3PDH aquellas que posiblemente le confieren propiedades regulatorias. Lo anterior ampliara el conocimiento de la participación de las proteínas reloj sobre genes neuroendocrinos. Así mismo es necesario medir la vida media de cada uno de los RNAs descritos en este trabajo para establecer que mecanismos moleculares están influyendo en los cambios de un ciclo unimodal a bimodal en ausencia de luz a tiempos prolongados. En este sentido es importante conocer que tipo de ribonucleasas están participando en el procesamiento del RNAm de la HCP y si éstas también se pueden considerar como moléculas de salida en el ritmo circadiano. Como objetivo a largo plazo es caracterizar que mecanismos están participando en la regulación del RNA ribosomal, pues difiere de los mecanismos de regulación que se han descrito para otras células eucarionticas, para que tenga el comportamiento circadiano que se observe en el pedúnculo ocular del acocil.

Otro objetivo a largo plazo es la clonación, caracterización del gen y RNAm de la hormona dispersora de pigmentos (HDP) lo cual ayudara a comprender cual es mecanismo de regulación de genes antagonistas. En este sentido es necesario determinar si las neuronas productoras de HCP son las mismas que las de la HDP y en caso de que no sea así es necesario el determinar cuales son los mecanismos moleculares fisiológicos y bioquímicos que están involucrados en la sincronización de neuronas neuroendocrinas.

Otro aspecto que se tiene que considerar es determinar los grupos celulares implicados en la biosíntesis del precursor de la HCP esto ayudara a determinar cuales estructuras celulares del

pedúnculo ocular podrían contener al reloj biológico. Sin embargo es condición indispensable que las células implicadas en la biosíntesis de la HCP expresen los genes reloj para poder concluir lo anterior.

Se ha determinado que la HCP también actúa como neurotransmisor y/o neuromodulador, por lo que requiere establecer si existen otros grupos neuronales implicados en la biosíntesis de la HCP, por ejemplo el protocerebro o la cadena abdominal. Por último se tiene que determinar si existen otros órganos blanco para la acción de la HCP en este sentido es necesario conocer si únicamente su sitio de acción es a nivel de los cromatóforos o hay otros órganos en el acocíl que respondan a la HCP.

Con respecto a el modelo propuesto para el posible origen de la familia HAC/HCP el modelo propuesto de pérdida de regiones del cDNA de la APGWamida de los moluscos solo contempla a la región del péptido activo es necesario corroborar el modelo con todo el precursor para determinar desde que momento en la escala evolutiva. Así mismo es necesario establecer la estructura del gen de la *APGWamida* en los moluscos utilizados en este trabajo así como de otros más primitivos. Lo anterior ayudara a establecer el posible origen de los genes neuroendócrinos.

Bibliografía

- Alvarado-Alvarez R, Becerra E, García U. (1999). A high-resolution in vitro bioassay to identify neurons containing red pigment concentrating hormone. *J Exp Biol* **202**: 1777-1784.
- Allada R, Emery P, Takahashi JS, Rosbash M. (2001). Stopping time: the genetics of fly and mouse circadian clocks. *Annu Rev Neurosci* **24**: 1091-1119.
- Arechiga H, Fernandez-Quiroz F, Fernandez de Miguel F, Rodriguez-Sosa L. (1993). The circadian system of crustaceans. *Chronobiol Int* **10** (1): 1-19.
- Aréchiga H. (1983). Mecanismos de integración de ritmos biológicos. *Ciencia* **34**: 141-152.
- Aréchiga H. (1996). Neuronal mechanisms of biological rhythms. In: Pastor M.A, Artieda J. Time internal clocks and movement. Elsevier Science B.A.
- Arechiga H, Rodriguez-Sosa L. (1998). Circadian clock function in isolated eyestalk tissue of crayfish. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* **265** (1408): 1819-23.
- Arechiga H, Rodríguez-Sosa L. (1997). Coupling of environmental and endogenous factors in the control of rhythmic in decapod crustacean. *J Mar Ass U K* **77**: 17-29.
- Ausebel FM, Brent R, Kingdon RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K. (1994). Current protocols in molecular Biology. Publicado por Current Protocols, Green publishing associates: Inc. and John Willey & Sons, Inc Canada.
- Barnes WM. (1994). PCR amplification of up to 35-kb DNA with high fidelity and high yield from lambda bacteriophage templates. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91** (6): 2216-2220.
- Borgerd J, Kooiman FP, Pijnenburg MAP, Hekking LHP, Oudejans RCHM. y Van der Horst DJ. (1995). Molecular cloning of the three distinct cDNAs, each encoding a different adipokinetic hormone precursor, of the migratory locust, *Locusta migratoria*. *J Biol Chem* **270** (39) pp: 23038 - 23043.
- Bradfield JY, Keeley LL. (1989). Adipokinetic hormone gene sequence from *Manduca sexta*. *J Biol Chem* **264** (22): 12791-12793.
- Brown FA Jr. (1976). Biological clocks: endogenous cycles synchronized by subtle geophysical rhythms. *Biosystems* **8** (2): 67-81.
- Bustin SA. (2000). Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol* **25** (2): 169-193.
- Carlsen J, Christensen M. Josefsson L. (1976). Purification and chemical structure of the red pigment concentrating hormone of the prawn *Leander adspersus*. *Gen Com. Endocrinol* **30**: 327-331.
- Cheng MY, Bullock CM, Li C, Lee AG, Bermak JC, Belluzzi J, Weaver DR, Leslie FM, Zhou QY. (2002). Prokineticin 2 transmits the behavioural circadian rhythm of the suprachiasmatic nucleus. *Nature* **417** (6887): 405-410.
- Cheng S, Fockler C, Barnes WM, Higuchi R. (1994). Effective amplification of long targets from cloned inserts and human genomic DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91** (12): 5695-5699.
- Chomczynski P, Sacchi N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* **162** (1): 156-159.
- Christensen M, Carlsen J, Josefsson L. (1978). Structure-function studies on red pigment-concentrating hormone: the significance of the terminal residues. *Biol Chem Hoppe Seyler* **359**: 813-818.
- Christensen M, Carlsen J, Josefsson L. (1979). Structure-function studies on red pigment -concentrating hormone, II [1] the significance of the C-terminal tryptophan amide. *Biol Chem Hoppe Seyler* **360**: 1051-1060.

- Crandall KA, Harris DJ, Fetzner JW Jr. (2000). The monophyletic origin of freshwater crayfish estimated from nuclear and mitochondrial DNA sequences. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* **267** (1453): 1679-1686.
- Dallmann SH, Herman WS, Carlsen J, Josefsson L. (1991). Adipokinetic activity of shrimp and locust peptide hormones in butterflies. *Gen Comp Endocrinol* **43**: 256-258.
- Davenport TRB, Isaac RE, Lee DL. (1991). The presence of peptides to the adipokinetic hormone/red pigment-concentrating hormone family in the nematode, *Panagrellus redivivus*. *Gen Comp Endocrinol* **81**: 419-425.
- de Kleijn DP, Linck B, Klein JM, Weidemann WM, Keller R, van Herp F. (1993). Structure and localization of mRNA encoding a pigment dispersing hormone (PDH) in the eyestalk of the crayfish *Orconectes limosus*. *FEBS Lett* **321** (2-3): 251-255.
- Devlin PF, Kay SA. (2001). Circadian photoperception. *Annu Rev Physiol* **63**: 677-694.
- Dickinson PS, Meccas C, Hetling J, Terio K. (1993). The neuropeptide red pigment concentrating hormone affects rhythmic alternation generation at multiple sites. *J Neurophysiol* **69** (5): 1475-1483.
- Dunlap JC. (1996). Genetics and molecular analysis of circadian rhythms. *Annu Rev Genet* **30**: 579-601
- Dunlap JC. (1999). Molecular bases for circadian clocks. *Cell* **96**: 271-290.
- Fan X, Croll R, Wu B, Fang L, Shen Q, Painter S, Nagle G. (1997). Molecular cloning of a cDNA encoding the neuropeptides APGWamide and cerebral peptide 1: localization of APGWamide-like immunoreactivity in the central nervous system and male reproductive organs of *Aplysia*. *J Comp Neurol* **387**: 53-62.
- Fanjul-Moles ML, Escamilla-Chimal EG, Gloria-Osorio A, Hernandez-Herrera G. (2004). The crayfish *Procambarus clarkii* CRY shows daily and circadian variation. *J Exp Biol* **207** (Pt 9): 1453-60.
- Fanjul-Moles ML, Prieto-Sagredo J. (2003). The circadian system of crayfish: a developmental approach. *Microsc Res Tech* **60** (3): 291-301.
- Fagan T, Morse D, Hastings JW. (1999). Circadian synthesis of a nuclear-encoded chloroplast glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in the dinoflagellate *Gonyaulax polyedra* is translationally controlled. *Biochemistry* **38** (24): 7689-7695.
- Favrel P, Mathieu M. (1996). Molecular cloning of a cDNA encoding the precursor of Ala-Pro-Gly-Trp amide-related neuropeptides from the bivalve mollusc *Mytilus edulis*. *Neuroscience Lett* **205**: 210-214.
- Fernlund P, Josefsson L. (1972). Crustacean color change hormone: amino acid sequence and chemical synthesis. *Science* **177**: 175.
- Fingerman SW, Fingerman M. (1977). Circadian variation in the levels of red pigment-dispersing hormone and 5-hydroxytryptamine in the eyestalks of the fiddler crab, *Uca pugilator*. *Comp Biochem Physiol C* **56** (1): 5-8.
- Fischer-Lougheed J, O'Shea M, Cornish I, Losberger C, Roluet E, Schulz-Aellen MF. (1993). AKH biosynthesis: transcriptional and translational control of two co-localised prohormones *J Exp Biol* **177**: 223-241.
- Fitch WM. (1970). Distinguishing homologous from analogous proteins. *Syst Zool* **19**: 99-113.
- Friesen WO, Block GD. (1984). What is a biological oscillator? *Am J Physiol* **246** (6 Pt 2): R847-53.
- Frixione E. (1983). Firm structural Associations between migratory pigments granules and microtubules in crayfish retinula cells. *J Cell Biol* **96**: 1258-1265.
- Frohman MA, Dush MK, Martin GR. (1998). Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85** (23): 8998-9002.
- Gaub J. (1976). Diurnal variations in endogenous RNA polymerase activity and amounts of nuclear non-histone protein, DNA and cytoplasmic protein in rat liver. *Histochemistry* **49** (2): 113-21.

- Gade G. (1997). Hyperprolinaemia caused by novel members of the adipokinetic hormone / red pigment-concentrating hormone family of peptides isolated from corpora cardiaca of onitine beetles. *Biochem J* **321**: 201-206.
- Gade G. (1997). Distinct sequences of AKH/RPCH family members in beetle (*Scarabaeus-species*) corpus cardiacum contain three aromatic amino acids residues. *Biochem Biophys Res Commun* **230**: 16-21.
- Gade G, Hoffmann KH, Spring J. (1997). Hormonal regulation in insects: facts, gaps, and future directions. *Physiological Reviews* **77**: 963-1032.
- Gade G, Aurswald L, Simek P, Marco HG, Kodrik D. (2003). Red pigment-concentrating hormone is not limited to crustaceans. *Biochem Biophys Res Commun* **309** (4): 967-973.
- Garcia U, Aréchiga H. (1998). Regulation of crustacean neurosecretory cell activity. *Cell Mol Neurobiol* **18** (1): 81-99.
- Garfias A, Rodríguez-Sosa L, Aréchiga H. (1995). Modulation of crayfish retinal function by red pigment concentrating hormone *J Exp Biol* **198** (Pt 7): 1447-1454.
- Gaus G, Kleinholz LH, Kegel G, Keller R. (1990). Isolation and characterization of red-pigment concentrating hormone (RPCH) from six crustacean species. *J Comp Physiol B* **160**: 373-379.
- Geourjon C, Deléage G. (1994). SOPM: a self-optimised method for protein secondary structure prediction. *Protein Engineering* **7**: 157-164.
- Gibrat J F, Garnier J. et Robson, B. (1987). Further developments of protein secondary structure prediction using information theory. *J Mol Biol.* **198**: 425-443.
- Goldsworthy GJ, Lee MJ, Luswata R, Drake AF, Hyde D. (1997). Structures, assays and receptors for locust adipokinetic hormones. *Comp Biochem Physiol* **117B**: 486-496.
- Golombek DA. (1997). Cronobiología: en busca del tiempo perdido. Fisiología de los ritmos biológicos. En: *Memorias del Segundo curso latinoamericano de cronobiología*. Amoxocalli, Ciudad Universitaria, México D.F. México.
- Harthoorn LF, Diederer JH, Oudejans RC, Van der Horst DJ. (1999). Differential location of peptide hormones in the secretory pathway of insect adipokinetic cells. *Cell Tissue Res* **298** (2): 361-369.
- Huang XY, Barrios LA, Vonkhorporn P, Honda S, Albertson DG, Hecht RM. (1989). Genomic organization of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene family of *Caenorhabditis elegans*. *J Mol Biol* **206** (3): 411-424.
- Hwa et al 1999 V, Oh Y, Rosenfeld RG. (1999). The insulin-like growth factor-binding protein (IGFBP) superfamily. *Endocr Rev* **20** (6): 761-87.
- Iwasaki T, Nakahama K, Nagano M, Fujioka A, Ohyanagi H, Shigeyoshi Y. (2004). A partial hepatectomy results in altered expression of clock-related and cyclic glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) genes. *Life Sci* **74** (25): 3093-3102.
- Jin X. (1999). A molecular mechanism regulation rhythmic output from the suprachiasmatic circadian clock. *Cell* **96**: 57-68.
- Johnson CH, Golden SS. (1999). Circadian programs in cyanobacteria: adaptiveness and mechanism. *Annu Rev Microbiol* **53**: 389-409.
- Kang WK, Naya Y. (1993). Sequence of the cDNA encoding an actin homolog in the crayfish *Procambarus clarkii*. *Gene* **133** (2): 303-304.
- Kruger D, Brownstein M, Martin J. (1983). *Brain Peptides*. Wiley Interscience Publications Inc. New York.: 83-90.
- Keller R. (1992). Crustacean neuropeptides: Structures, functions and comparative aspects. *Experientia* **48**: 439-448.

- Klein J, Mohrherr C, Sleutels F, Jaenecke N, Riehm J, Ranga Rao K. (1995). A highly conserved red pigment concentrating hormone precursor in the blue crab *Callinectes sapidus*. *Biochem Biophys Res Commun* **212** (1): 151-158.
- Kodrik D, Socchaa R, Simek P, Semek R, Goldsworthy GJ. (2000). A new member of the AKH/RPCH family that stimulates locomotory activity in the firebug, *Pyrrhocoris apterus* (Heteroptera). *Insect Biochem Mol Biol* **30**: 489-98.
- Kollisch GV, Lorenz MW, Kellner R, Verhaert PD, Hoffmann KH. (2000). Structure elucidation and activity of an unusual adipokinetic hormone from corpora cardiaca of the butterfly, *Vanessa cardui*. *Euro J Biochem* **267**: 5502-8.
- Kurien BT, Scofield RH. (2002). Extraction of nucleic acid fragments from gels. *Anal Biochem* **302** (1): 1-9.
- Kuroki Y, Kanada T, Kubota I, Fujisawa Y, Ikeda T, Miura A, Minamitake Y, Muneoka Y. (1990). A molluscan neuropeptide related to the crustacean hormone, RPCH. *Biochem Biophys Res Commun* **167**: 273-279.
- Lee MJ, Goldsworthy GJ, Poulus P, Velentza A. (1996). Synthesis and biological activity of adipokinetic hormone analogues modified at the C-terminus. *Peptides* **17**:1285-1290.
- Lee MJ, Cusinato O, Luswata R, Wheeler CH, Goldsworthy GJ. (1997). N-terminal modifications to AKH-I from *Locusta migratoria*: assessment of biological potencies in vivo and in vitro; **69**: 69-76.
- Leloup JC, Goldbeter A. (1998). A model for circadian rhythms in *Drosophila* incorporating the formation of a complex between the PER and TIM proteins. *J Biol Rhythms* 1998 Feb;13(1):70-87.
- Lewis D.K., Jezierski M.K., Keeley L.L. y Bradfield J.Y. (1997). Hypertrehalosemic hormone in a cockroach: molecular cloning and expression. *Mol Cell Endocrinol* **130**: 101-108.
- Linck B, Kelin JM, Manggerich S, Keller R, Weideman WM. (1993). Molecular cloning of crustacean of red pigment concentrating hormone precursor. *Biochem Biophys Res Commun* **195** (2): 807-813.
- Lin Y, Stormo GD, Taghert PH. (2004). The neuropeptide pigment-dispersing factor coordinates pacemaker interactions in the *Drosophila* circadian system. *J Neurosci* **24** (36): 7951-7957.
- Lin ZJ, Li J, Zhang FM, Song SY, YangJ, Liang SJ, Tso CL. (1993). Structure of D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Palinurus versicolor* carrying the fluorescent NAD derivatives at 2.7 Å resolution. *Arch Biochem Biophys* **302** (1): 161-166.
- Liu H-X, Zhang M, Krainer A. (1998). Identification of functional exonic splicing enhancer motifs recognized by individual SR proteins. *Genes and Develop* **12**: 1998-2012.
- Loros JJ, Dunlap JC. (2001). Genetic and molecular analysis of circadian rhythms in *Neurospora*. *Annu Rev Physiol* **63**:757-765
- Manning K. (1991). Isolation of nucleic acids from plants by differential solvent precipitation. *Anal Biochem.* **195** (1):45-50.
- Markos A, Miretsky A, Muller M. (1993). A glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase with eubacterial features in the amitochondriate eukaryote, *Trichomonas vaginalis*. *J Mol Evol* **37** (6): 631-643.
- Martinez-Perez F, Becerra A, Valdes J, Zinker S, Arechiga H. (2002). A possible molecular ancestor for mollusk APGWamide, insect adipokinetic hormone, and crustacean red pigment concentrating hormone. *J Mol Evol.* **54** (6):703-14.
- Martinez-Perez F, Valdes J, Zinker S, Arechiga H. (2002). The genomic organization of the open reading frame of the red pigment concentrating hormone gene in the blue crab *Callinectes sapidus*. *Peptides* **23** (4): 781-786.
- Merritt J, Sulkowski T. (1970). Rhythmicity of RNA polymerase activity and RNA levels innuclei of rat cerebral cortex. *J Neurochem* **17** 1327-1328.
- Merrow M, Roenneberg T. (2001). Circadian clocks: running on redox. *Cell* **106**(2):141-143.

- Millington WR, Blum M, Knight R, Mueller GP, Roberts JL, O'Donohue TL. (1986). A diurnal rhythm in proopiomelanocortin messenger ribonucleic acid that varies concomitantly with the content and secretion of beta-endorphin in the intermediate lobe of the rat pituitary. *Endocrinology* **118** (2): 829-834.
- Minors DS, Waterhouse JM. (1988). Mathematical and statistical analysis of circadian rhythms. *Psychoneuroendocrinology* **13** (6): 443-464.
- Minors DS, Waterhouse JM. (1990). Removing masking factors from urinary rhythm data in humans. *Chronobiol Int* **7** (5-6): 425-432.
- Moras D, Olsen KW, Sabesan MN, Buehner M, Ford GC, Rossmann MG. (1975). Studies of asymmetry in the three-dimensional structure of lobster D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *J Biol Chem* **250** (23): 9137-9162.
- Mordue W, Stone JV. (1977). Relative potencies of locust adipokinetic hormone and prawn red pigment-concentrating hormone in insect and crustacean systems. *Gen Comp Endocrinol* **33** (1): 103-108.
- Mordue W, Stone JV. (1976). Comparison of the biological activities of an insect and crustacean neurohormone that are structurally similar. *Nature* **264**: 287-289.
- Moreno-Sáenz E, Hernández-Falcon J, Fuentes-Prado B. (1989). Role of the sinus gland in the crayfish circadian rhythmicity-II ERG circadian rhythm. *Comp Biochem Physiol* **87A** (1): 119-125.
- Mörl M, Schmelzer C. (1990). Integration of Group II intrón b11 into a foreign RNA by reversal of the self-splicing reaction in vitro. *Nucleic Acids Res* **60**:629-636.
- Munoz E, Baler R. (2003). The circadian E-box: when perfect is not good enough. *Chronobiol Int.* **20** (3): 371-88.
- Nicholas KB, Nicholas HB Jr, Deerfield DW II. (1997). GeneDoc: Analysis and Visualization of Genetic Variation, *EMBNEW.NEWS* **4**:14.
- Noyes BE, Schaffer MH. (1990). The structurally similar neuropeptides adipokinetic hormone I and II are derived from similar, very small mRNAs. *J Biol Chem* **265** (1): 483-489.
- Noyes BE, Schaffer MH. (1993). The closely related neuropeptide genes encoding adipokinetic hormones I and II have very different 5'-flanking regions. *DNA Cell Biol* **12**: 509-516
- Noyes BE, Katz FN, Schaffer MH. (1995). Identification and expression of the *Drosophila* adipokinetic hormone gene. *Mol and Cell Endocrinol* **109**: 133 -141.
- Nusbaum MP, Marder E. (1988). A neuronal rol for a crustacean red pigment concentrating hormone-like peptide: neuromodulation of the pyloric rhythm in the crab *Cancer borealis*. *J Exp Biol* **135**: 165-181.
- Okamura H, Yamaguchi S, Yagita K. (2002). Molecular machinery of the circadian clock in mammals. *Cell Tissue Res* **309** (1): 47-56.
- Onai K, Katagiri S, Akiyama M, Nakashima H. (1998). Mutation of the gene for the second-largest subunit of RNA polymerase I prolongs the period length of the circadian conidiation rhythm in *Neurospora crassa*. *Mol Gen Genet* **259** (3): 264-271.
- O'Shea M, Rayne RC. (1992). Adipokinetic hormones: cell and molecular biology. *Experientia* **48**: 430-438.
- Panda S, Hogenesch JB, Kay SA. (2002). Circadian rhythms from flies to human. *Nature* **417** (6886):329-335.
- Patthy L. (1996). Exon shuffling and other ways of module exchange. *Matrix Biology* **15**: 301-310.
- Porras MG, Lopez-Colome AM, Arechiga H. (2001). Red pigment-concentrating hormone induces a calcium-mediated retraction of distal retinal pigments in the crayfish. *J Comp Physiol [A]* **187**(5):349-357.

- Preciado M, Tsutsumi V, Aréchiga H. (1994). Ultrastructural features of neurosecretory cells in the medulla externa of the crayfish eyestalk. *Gene Comp Endocrin* **95**: 432-442.
- Ranga R. (1985). Pigmentary Effectors. in De Bliss (editor) *The Biology of Crustacea Vol. 9* Academic Press, New York.: 407 - 429.
- Ranga RK, Fingerman M. (1983). Regulation of release and mode of action of crustacean chromatophorotropins. *Amer Zool* **23**: 517-527.
- Renn SC, Rosbash M, Hall JC, Taghert PH. (1999). A pdf neuropeptide gene mutation and ablation of PDF neurons each cause severe abnormalities of behavioral circadian rhythms in *Drosophila*. *Cell* **99**: 791-802.
- Refinetti R. (1993). Laboratory instrumentation and computing: comparison of six methods for the determination of the period of circadian rhythms. *Physiol Behav* **54** (5): 869-875.
- Rodríguez-Sosa L, De la Vega MT, Aréchiga H. (1994). Circadian rhythm of content of red pigment-concentrating hormone in the crayfish eyestalk. *Comp Biochem Physiol* **109C** (1): 101-108.
- Rodríguez-Sosa L, Calderón J, Becerra E, Aréchiga H. (1994). Regional distribution and immunocytochemical localization of red pigment concentrating hormone in the crayfish eyestalk. *Gen and Comp Endocrinol* **95**: 443 -456.
- Rodríguez-Sosa L, De la Vega MT, Vergara P, Aréchiga H. (1997). Seasonal rhythm of red pigment concentrating hormone in the crayfish. *Chronobiol Int* **14** (6): 639-645.
- Rogers JH. (1990). The role of introns in evolution. *FEBS Lett* **268**: 339-343.
- Rzhetsky A, Ayala FJ, Hsu LC, Chang C, Yoshida A. (1997). Exon/intron structure of aldehyde dehydrogenase gene supports the introns-late theory. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 6820-6825.
- Sancar A. (2000). Cryptochrome: the second photoactive pigment in the eye and its role in circadian photoreception. *Annu Rev Biochem* **69**: 31-67.
- Sarojini R, Nagabhushanam R, Fingerman M. (1995). A neurotransmitter role for red-pigment-concentrating hormone in ovarian maturation in the red swamp crayfish *Procambarus clarkii*. *J Exp Biol* **198** (Pt 6): 1253-7.
- Sarov-Blat L, So WV, Liu L, Rosbash M. (2000). The *Drosophila* takeout gene is a novel molecular link between circadian rhythm and feeding behaviour. *Cell* **101**: 647-656.
- Schaal TM, Maniatis T. (1999). Selection and characterization of pre-mRNA splicing enhancers: identification of a novel SR protein-specific enhancer sequence. *Mol Cell Biol* **19**: 1705-1719.
- Sewall A, McRae S. (1998) RNA isolation with TRIzol reagent. *Focus* **20**: 36.
- Shaefer BC. (1995). Revolutions in rapid amplification of cDNA ends: New strategies for polymerase chain reaction cloning of full-length cDNA ends. *Anal Biochem* **227**: 255-273.
- Sherff CM, Mulloney B. (1991). Red pigment concentrating hormone is a modulator of the crayfish swimmeret system. *J Exp Biol* **155**: 21-35.
- Shinohara ML, Loros JJ, Dunlap JC. (1998). Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is regulated on a daily basis by the circadian clock. *J Biol Chem* **273** (1): 446-452.
- Shulz-Allen M. F., Roulet E, Fisher-Lougheed J, y O'Shea M. (1989). Synthesis of a homodimer neurohormone precursor of locust adipokinetic hormone studied by in vitro translation and cDNA cloning. *Neuron* **2**: 1369-1373.
- Shweiki D. (2001). Earth - moon evolution: implications for the mechanism of the biological clock? *Med Hypotheses* **56** (4): 547 - 51.
- Slowinski, JB (1993). Review of Component, v. 2.0. *Cladistics* **9**: 351-353.

- Smith, A., Jiménez, C., Dirks, R., Croll, R. and Geraerts, P. (1992). Characterization of a cDNA clone encoding multiple copies of the neuropeptide APGWamide in the mollusk *Lymnaea stagnalis*. *J Neurosci* **12**: 1709-1715.
- Smolen P, Baxter DA, Byrne JH. (2001). Modeling circadian oscillations with interlocking positive and negative feedback loops. *J Neurosci* **21**(17):6644-6656.
- Stone JV, Mordue W, Batley KE, Morris HR. (1976). Structure of locust adipokinetic hormone, a neurohormone that regulates lipid utilisation during flight. *Nature* **263**: 207-11.
- Stanewsky R. (2002). Clock mechanisms in *Drosophila*. *Cell Tissue Res* **309** (1): 11-26.
- Stupfel M, Pavely A. (1990). Ultradian, circalunar and circadian structures in endothermic vertebrates and humans. *Comp Biochem Physiol A* **96** (1):1-11.
- Takahashi JS. (1995). Molecular neurobiology and genetics of circadian rhythms in mammals. *Annu Rev Neurosci* **18**: 531-553.
- Taub-Montemayor TE, Linse KD, Rankin MA. (1997). Isolation and characterization of *Melanoplus sanguinipes* adipokinetic hormone: a new member of the AKH/RPCH family. *Biochem Biophys Res Commun* **239**: 763-8.
- Terrel J, Schmeltz. (1968). Circadian Rhythmicity in amino acid incorporation in *Euglena gracilis*. *Science* **160**: 1454-1456.
- Theill LE, Hattori K, Lazzaro D, Castrillo JL, Karin M. (1992). Differential splicing of the GHF1 primary transcript gives rise to two functionally distinct homeodomain proteins. *EMBO J* **11** (6): 2261-2269.
- Tso JY, Sun XH, Wu R. (1985). Structure of two unlinked *Drosophila melanogaster* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase genes. *J Biol Chem* **260** (13): 8220-8228.
- Uribe I, Rodríguez-Sosa L, Aréchiga H. (1998). Diurnal patterns of electrical activity in the crayfish neurosecretory cells. *Biol Rhythm Res* **29** (5): 453-463.
- Van Norstrand MD, Carlsen JB, Josefsson L, Herman WS. (1980). Studies on a peptide with red pigment-concentrating and hyperglycemic activity from the cephalic endocrine system of the honeybee, *Apis mellifera*. *Gen Comp Endocrinol*. **42**(4):526-33.
- Velentza A, Spiliou S, Poulus CP, Goldsworthy. (2000). Synthesis and biological activity of adipokinetic hormone analogues with modifications in the 4-8 region. *Peptides* **21**: 631-637.
- Vega A. (1993). Análisis estadístico en cronobiología. *Psiquis* **2** (6):139-149.
- Wang AM Doyle MV Mark DF (1989). Quantitation of mRNA by the polymerase chain reaction. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86** (24): 9717-9721.
- Wang GK, Ousley A, Darlington TK, Chen D, Chen Y, Fu W, Hickman LJ, Kay SA, Sehgal A. (2001). Regulation of the cycling of timeless (tim) RNA. *J Neurobiol* **47**(3):161-175.
- Wang GK, Sehgal A. (2002). Signaling components that drive circadian rhythms. *Curr Opin Neurobiol* **12** (3): 331-338.
- Wang AM, Doyle MV, Mark DF. (1989). Quantitation of mRNA by the polymerase chain reaction. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **86** (24): 9717-9721.
- Williams JA, Sehgal A. (2001). Molecular components of the circadian system in *Drosophila*. *Annu Rev Physiol* **63**: 725-755.
- Wojtas KM, von Kalm L, Weaver JR, Sullivan DT. (1992). The evolution of duplicate glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase genes in *Drosophila*. *Genetics* **132** (3): 789-797.
- Wu Q, Chen M, Buchwald M, Phillips RA. (1995). A simple, rapid method for isolation of high quality genomic DNA from animal tissues. *Nucleic Acids Res*. **23** (24):5087-5088

Yang WJ, Aida K, Nagasawa H. (1999). Characterization of chromotrophotropic neuropeptides from the kuruma prawn *Penaeus japonicus*. *Gen. Comp Endocrinol* **144** (3):415-424.

Yang W, Mason WS, Summers J. (1996). Covalently closed circular viral DNA formed from two types of linear DNA in woodchuck hepatitis virus-infected liver. *J Virol* **70** (7): 4567-4575.

Ziegler R, Cushing AS, Walpole PP, Jasensky RD, Morimoto H. (1997) Analogs of *Manduca* adipokinetic hormone tested in a bioassay and in a receptor-binding assay. *Peptides* **19**:481-536.

Apéndices

Tabla 1. Clonación de los genes: de la HCP, de la beta-Actina y de la G3PDH.

Nombre	Secuencia	Posición	Gen	GeneBank
UJ	5' ATG GTT CGC AGA TCT GGA GTG 3'	65-86	HCP	
NJ	5' GTC TCG GCT CAG CTT AAC TTC TC 3'	132-155	HCP	AF031654
DJ				
IJ	5' GGC CTC GCT CCT GAT AAG TCG 3'	332-352	HCP	AF031654
LJ	5' CTC AGC CCA GGT ACT CCT CAT C 3'	374-394	HCP	AF031654
UACT	5' GCT GTG CTG TCC CTC TAC G 3'	261-280	β -Actina	D14612
LACT	5' GAT CTT CAT GAG GTA GTT GG 3'	407-426	β -Actina	D14612
UDEG3PDH	5' SAT YGT NGA RGG NCT NAT G 3'	***	G3PDH	***
LDEG3PDH	5' CCR TTN AGN NCN GGD ATN AC 3'	***	G3PDH	***
UDEG3PDH2	5' YTT YGG NAT YGT NGA RGG NCT NAT G 3'	***	G3PDH	***
LDEG3PDH2	5' CCR TTN ARY TCN GGD ATN ACN ARN C 3'	***	G3PDH	***
UG3Dme	5' CGA GAT CGT CGA GGG TCT GAT G 3'	495-516	G3PDH	
LG3Dme	5' GTT GAG GGC GGG GAT AAC CTT G 3'	645-666	G3PDH	
U1G3Dpu	5' CGG TAT TAA CGG ATY TGG TCG TAT C 3'	24-48	G3PDH	AJ289783
U2G3Dpu	5' CAA TGC TTC TTG CAC CAC CAA CTG C 3'	447-474	G3PDH	AJ289783
L1G3Dpu	5' CGG CCT TGG CAG CAC CAG TAG AG 3'	628-652	G3PDH	AJ289783
L2G3Dpu	5' GTC GTA CCA TGA AAT CAA CTT GAC G 3'	924-948	G3PDH	AJ289783
T7	5' GTA ATA CGG ACT CAC TAT AGG GCG 3'	***	UnivPrim	
M13REVERSE	5' CAG GAA ACA GCT ATG ACC ATG 3'	***	UnivPrim	

Con un asterisco se indican las secuencias diseñadas en este trabajo.

Tabla 2. Combinaciones para la clonación por PCR^a.

Gene	5'-3'	3'-5'	^b Alin-tiempo		^c Extensión	No de ciclos
HCP	UJ	LJ	55	30	45 seg	35
HCP	NJ	LJ	55	30	30 seg	35
HCP	DJ	LJ	55	30	30 seg	35
HCP	NJ	IJ	55	30	20 seg	35
β -Actina	UACT	LACT	55	30	20 seg	27
G3PDH	UDEG3PDH	LDEG3PDH	50	30	90 seg	30
G3PDH	UDEG3PDH2	LDEG3PDH2	50	30	90 seg	30
G3PDH	UG3Dme	LG3Dme	50	30	90 seg	30
G3PDH	U1G3Dpu	L2G3Dpu	55	30	80 seg	35
G3PDH	U1G3Dpu	L1G3Dpu	55	30	60 seg	35
G3PDH	U2G3Dpu	L2G3Dpu	55	30	60 seg	35
G3PDH	U2G3Dpu	LG3Dpu	55	30	30 seg	35

^a Todas las reacciones se incubaron a 95 °C por 1 min.

^b Alin-tiempo = temperatura y tiempo en segundos.

^c 72 °C.

Tabla 3. Reacciones de RACE 5' y 3'.

Nombre	Secuencia	mRNA
RA3HCPCqu	5' CAG CTT AAC TTC TCC CCC GGC TGG GG 3'	HCP
RA5HCPCqu	5' ACC CCT GCC GGG GGA GAA GTT AAG CTG 3'	
LOWHCPCqu	5' ACG AAG GAT GGC ATG AGG AAG GGC 3'	HCP
LPACCqu	5' GAC TCG TCG TAC TCC TCC TTG GTG 3'	β -Actina
RA5ACCqu	5' ACG AAG GAT GGC ATG AGG AAG GGC 3'	β -Actina
LG3PCqu	5' GCA TCA AAG ATA GAG GAT CGT ACA TCA 3'	G3PDH
RACE 3'POLI T	5' GCG GCC GCA TGC TTA TAA TTA ATC (T) 4 3'	
CUTRACE3'	5' GCG GCC GCA TGC TTA TAA TTA ATC 3'	-----
GENERACE 5'	5' CGA CTG GAG CAC GAG GAC ACT GA 3'	INVITROGENE

Tabla 4. Amplificación del marco abierto de lectura por RT-PCR.

Nombre	Secuencia	Posición	mRNA
UORFHCPCqu1	5' CCA AGA ATG GTC CGC GGC AGT 3'	82-102	HCP
UORFHCPCqu2	5' CTG GTG GCC TCC TCC TGC GTC TC 3'	124-146	HCP
LORFHCPCqu	5' CGC ATT TAA CCC ATG TAT TCT TCT TCC 3'	340-365	HCP
UORFACCqu	5' CAT GTG TGA CGA AGA GGA CCT G 3'	13-34	β -Actina
LORFACCqu	5' TTA GAA GCA CTT GCG GTG GAC G 3'	1126-1147	β -Actina
UORFG3Cqu	5' CTA CCA CCA TAA TGT CGA ACA TTG G 3'	36-54	G3PDH
LORFG3Cqu	5' ATC CAG ACA TAT TAG GCA CCA TCC 3'	994-1017	G3PDH
URNA18	5' CGA AAC CGC AAA CTG CTC ATT AAA CC 3'	59-84	rRNA18S
LRNA18	5' CAG GTT TGA ACC AGT AAA TCT CCT TC 3'	1766-1791	rRNA18S
POLIT	5' TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT 3'		

Tabla 5. Combinaciones para la amplificación del marco abierto de lectura por RT-PCR^a.

Gene	5'-3'	3'-5'	^b Alin-tiempo		^c Extensión	No de ciclos
HCP	UORFHCPCqu1	LORFHCPCqu1	62	20	45 seg	35
β -Actina	UORFACCqu	LORFACCqu	60	30	90 seg	2
G3PDH	UORFG3Cqu	LORFG3Cqu	63	30	90 seg	30
RNAr 18S	URNA18	LRNA18	62	30	120 seg	18

^a Todas las reacciones se incubaron a 95 °C por 1 min.

^b Alin-tiempo = temperatura y tiempo en segundos.

^c 72 °C.

Tabla 6. Oligodesoxinucleótidos utilizados para la cuantificación por RT-PCR.

Nombre	Secuencia	Posición	mRNA
UCHCPcq	5' CTG GTG GCC TCC TCC TGC CTC TC 3'	124-365	HCP
LCHCPcq	5' CGC ATT TAA CCC ATG TAT TCT TCT TCC 3'	340-365	HCP
UACcq	5' GAC TGA GCG TGG CTA CTC CTT CAC 3'	597-620	β -Actina
LACcq	5' GAC TCG TCG TAC TCC TCC TTG GTG 3'	1089-1112	β -Actina
UCG3Cqu	5' GAA ATT GTT GAG GGC TTG ATG ACC AC 3'	537-562	G3PDH
LCG3Cqu	5' GCA TCA AAG ATA GAG GAT CGT ACA TCA 3'	896-920	G3PDH
URNA18	5' CGA AAC CGC AAA CTG CTC ATT AAA CC 3'	59-84	rRNA18S
LRNA18	5' CAG GTT TGA ACC AGT AAA TCT CCT TC 3'	1766-1791	rRNA18S

A Possible Molecular Ancestor for Mollusk APGWamide, Insect Adipokinetic Hormone, and Crustacean Red Pigment Concentrating Hormone

Francisco Martínez-Pérez,¹ Arturo Becerra,¹ Jesús Valdés,² Samuel Zinker,³ Hugo Aréchiga⁴

¹ Posgrado en Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F., México

² Departamento de Bioquímica, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, México, D.F., México

³ Departamento de Genética y Biología Molecular, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, México, D.F., México

⁴ División de Estudios de Posgrado e Investigación, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F., México

Received: 9 February 2001 / Accepted: 3 October 2001

Abstract. Precursor structures of various members of the neuropeptide family adipokinetic hormone/red pigment concentrating hormone (AKH/RPCH) of mandibular arthropods and the APGWamide family of mollusks were compared. Amino acid alignments showed a common overall architecture (signal peptide, active peptide, related peptide), with a similar α helix–random coil secondary structure. DNA sequence alignments revealed close similarities between the genes encoding for the peptides of the two families. The APGWamide genes are larger than the AKH/RPCH genes. The sequence environment occupied by introns is similar in AKH/RPCH and APGWamide genes. Such similarities suggest that these peptide families might have been originated by gene rearrangements from a common ancestor having either an AKH/RPCH/APGWamide-like structure or both an AKH/RPCH-like and an APGWamide-like structures. In the former model, DNA fragments could have been gained when the ancestor evolved to mollusks and it could have lost nucleotides when the progression to mandibular arthropods took place. In the second model, AKH/RPCH-like structures could have been fused during evolution toward mandibular arthropods, whereas in mollusks they could have been lost with the possible amplification of the APGWamide-like structure. Loss of domains in exon 1 may have originated the sig-

nal peptide and the first codon of the active RPCH. In exon 2, loss of domains possibly determined the junctions of codons 2 to 5 with the loss of a APGWamide copy; exon 3 underwent fewer variations. The similarity of the mollusk APGWamide precursors is closer to that of the RPCH family than the insect AKH family, indicating an earlier evolutionary departure.

Key words: Adipokinetic hormone — APGWamide — Crustaceans — Peptide evolution — Insects — Mollusks — Neuropeptides — Red pigment concentrating hormone

Introduction

Elucidation of the chemical structure of bioactive peptides disclosed the existence of structurally related families, some members of which are present in a wide variety of zoological groups while other members appear to be unique to a given group. For instance, while peptides such as enkephalins have been identified in many species, from unicellulars to humans (Le Roith et al. 1982; O'Neill et al. 1988), the crustacean hyperglycemic hormone retains this denomination because it has been found only in crustaceans (Lacombe et al. 1999). Characterization of the peptide precursors, and more recently cloning of the genes encoding them, allows us to explore some molecular mechanisms underlying evolutionary trends (Cerff 1995).

A



Fig. 1. Alignments of the amino acid sequences of the precursors of the AKH/RPCH and APGWamide families. **A** The four regions are indicated by lines with diamonds (bottom). The different motifs of each precursor are indicated by lines with circles (top). All active peptides are indicated in boldface. Sequences corresponding to the signal peptide are residues 1–85 in AKH/RPCH and residues 1–54 in APGWamide. The basic amino acids that serve as proteolytic sites are underlined. The Cys participating in precursor dimerization is common to all species (arrow at residue) (226) and may form disulfide bonds with other cysteines in the related peptide

or in the signal peptide (*italic, boldface*) (*underlined*). **B** All precursors show similar possible secondary structures, with an α helix (h) (region 1) followed by a random coil (c) (regions 2–3) up to the end of the related peptide, which shows an α helix followed by a random coil in the carboxyl terminus (region 4) (e, extended strand). *Sgr*, *Schistocerca gregaria*; *Sin*, *Schistocerca nitans*; *Lmi*, *Locusta migratoria*; *Bdi*, *Blaberus discoidalis*; *Dme*, *Drosophila melanogaster*; *Cma*, *Carcinus maenas*; *Csa*, *Callinectes sapidus*; *Mse*, *Manduca sexta*; *Aca*, *Aplysia californica*; *Lst*, *Lymnaea stagnalis*; *Med*, *Mytilus edulis*.

In the present work, we have taken as a model a neuropeptide family to date ascribed only to mandibular arthropods, particularly crustaceans and insects, with some differential features in each group. The crustacean member of the family is the red pigment concentrating hormone (RPCH), an octapeptide with the sequence pGlu-Leu-Asn-Phe-Ser-Pro-Gly-Trp-NH₂ (Fernlund and Josefsson 1972). This structure is common to all crustacean species in which it has been identified (Gauss et al. 1990). The initial physiologic effect it was known to exert, as indicated by its name, is the aggregation of pigment granules in the tegumentary erythrocytes, thus regulating their color intensity. Other physiologic functions for RPCH have been described, such as the aggregation of pigments in retinal cells, thus participating in the control of photon flow to the retinal photoreceptors (Garfias et al. 1995), as well as in direct influences on the excitability of central neurons and the control of motor patterns (Swensen and Marder 2000).

In insects, a very similar peptide has been amply characterized, i.e., adipokinetic hormone (AKH). It has a primary structure varying from 8 to 10 amino acid residues, depending on the species. The most commonly identified physiologic effect of AKH is the control of lipid and carbohydrate metabolism, although it has some other functions (Gäde et al. 1997). The first described structure (AKH I) is pGlu-Leu-Asn-Phe-Thr-Pro-Asn-Trp-Gly-Thr-NH₂ (Stone et al. 1976), thus having the first four and the last amino acids in common with RPCH. Up to two other distinct sequences have been found in a single species, for example, AKH II (pGlu-Leu-Asn-Phe-Ser-Ala-Gly-Trp-NH₂) and AKH III (pGlu-Leu-Asn-Phe-Thr-Pro-Trp-Trp-NH₂) from *Locusta migratoria*. At present, the primary structures of 34 members of the family have been elucidated in 75 species. Thirty-three AKHs of the three varieties have been identified in insects, and only one RPCH structure in crustaceans (Gäde et al. 1997; Lee et al. 2000). Of particular interest is that biological cross-reactivity has been demonstrated between members of these two groups; thus, AKH may induce pigment aggregation in crustaceans and RPCH elicits adipokinetic effects in insects (Mordue and Stone 1977). These structural and functional similarities between RPCH and AKH led to the notion of an RPCH/AKH family (Gäde et al. 1997). Not all members appear to raise blood lipid levels in their native species; others, called hypertrehalosemic hormones (HTHs), stimulate the synthesis of trehalose, the main blood carbohydrate in many insect species. An example from the cockroach is a decapeptide with the following structure: pGlu-Val-Asp-Phe-Ser-Pro-Gly-Trp-Gly-Thr-NH₂ (Hayes et al. 1986). Other varieties have been identified (Gäde et al. 1997).

Study of the primary structure of peptides has proven useful for disclosing structural-functional relationships and phylogenetic analyses of peptide hormones. Among

other spectroscopical techniques, circular dichroism (Paolillo et al. 1992; Brakch et al. 1993; Goldsworthy 1994; Goldsworthy et al. 1997) has been used to determine the amino acid secondary structure exposed to the surface of prohormones, such as β -turn promoting sequences (Rholam et al. 1986, 1990; Paolillo et al. 1992; Brakch et al. 1993) and Ω loops (Leszczynsky and Rose 1986; Bek and Berry 1990; Rayne and O'Shea 1993). Comparisons of peptide hormone secondary structure among distant zoological groups have been used in attempts to disclose similar functional activity (Goldsworthy 1994) or the ultimate localization of signal peptide amino acid sequences in *Escherichia coli* (Sjostrom et al. 1987). Mathematical models have been put forward to predict the relationships between hormone structures and their potencies (Lee et al. 2000). Physiological and biochemical assays include trehalose mobilization (Michalik et al. 1998), activation of glycogen phosphorylase in *Manduca* (Ziegler et al. 1998) lipid mobilization (Gäde 1993), and acetate uptake into fat bodies in locusts (Lee and Goldsworthy 1995). Finally, comparison of peptide hormone primary and secondary structures among distant zoological groups has provided information for constructing phylogenetic trees (Gäde et al. 1994; Bogerd et al. 1995) and on evolutionary trends (Hoyle 1999).

A tetrapeptide has been identified in various molluscan species with the structure APGWamide, that is, with its last three residues in common with those in the C terminus of RPCH (Kuroki et al. 1990; Croll et al. 1991). It appears to play an important role in reproductive behavior. Its precursor has been sequenced (Smit et al. 1992; Favrel and Mathieu 1996; Fan et al. 1997) and bears interesting similarities to those of RPCH and AKH, which are discussed later.

In the search for a possible common ancestor of the AKH/RPCH and APGWamide peptide families, amino acid primary and secondary structures and the DNA sequences of the genes coding for these peptides were compared. Whether the sequence environments occupied by introns in the AKH genes were conserved in the RPCH and in the APGWamide genes was considered as an additional comparative criterion.

The structure of the precursors of these peptides has revealed a common overall architecture, with an initial signal peptide followed by the sequence of the active peptide and ending in the related peptide (see Fig. 1). However, a great diversity of structures was apparent, and between them and the RPCH precursors, thus suggesting a great genetic diversity (Linck et al. 1993). Some of the genes encoding for the precursors of the three AKHs have been cloned, and their architecture is quite similar (Bogerd et al. 1995).

The AKH/RPCH and APGWamide families are therefore a good model system to pose questions such as, Are these genes only present in arthropods or are there any similar genes in other zoological groups? In particular, it

is tempting to search for the possible existence of a common ancestor within earlier phylogenetic groups. This possibility has been suggested (Noyes and Schaffer 1993), as well as the likelihood that the two families have been derived from separate but convergent evolutionary lines (Smit et al. 1992).

In this paper, we present a comparative analysis of the structure of the precursors of the members of these three peptide families and their similarities and propose possible routes for their diversification.

Materials and Methods

For structural analysis comparisons were made for the cDNA sequences of AKH I, II, and III of *Locusta migratoria* (Bogerd et al. 1995), AKH I and II of *Schistocerca gregaria* (Schulz-Allen et al. 1989; Fisher-Lougheed et al. 1993), AKH I and II of *Schistocerca nitans* (Noyes and Schaffer 1990), and HTH from *Blaberus discoidalis* (Lewis et al. 1997). Comparisons were made to the only available cDNA sequence of RPCH precursors, *Carcinus maenas* (Linck et al. 1993) and that of *Callinectes sapidus* (Klein et al. 1995). Sequences containing APGWamide were from *Limnea stagnalis* (Smit et al. 1992), *Mytilus edulis* (Favre and Mathieu 1996), and *Aplysia californica* (Fan et al. 1997). The AKH gene structures considered were those from *Manduca sexta* (Bradfield and Keeley 1989), *Schistocerca nitans* (Noyes and Schaffer 1993), and *Drosophila melanogaster* (Noyes et al. 1995).

The alignments of the precursors were carried out using the program CLUSTAL W (Thompson et al. 1994) with a 0.05 gap station and gap window p 9. Phylogenetic trees were made with the average distances tree, using PID (from CLUSTAL W). The secondary structure was determined following the methods devised by Gibrat et al. (1987) and Geourjon and Deléage (1994).

Results and Discussion

Alignment of the Amino Acid Structures of AKH/RPCH and APGWamide Precursors

As shown in Fig. 1A, the alignment shows the existence of the following four domains: the signal peptide (region 1, residues 1–85), the active peptide (region 2, residues 86–120), the APGWamide repeats (region 3, residues 121–205), and the carboxyl terminus (region 4).

In mollusks, the region of the signal peptide includes the first copy of the APGWamide; it is 43 to 57 residues longer than those of insects and crustaceans, which are more alike in this regard.

The second region contains the sequence coding for the active peptide of AKH and RPCH and the second APGWamide copy (residues 86–94). This is followed by the basic amino acids (residues 95–96 and 109–110), which are the cleavage sites for the processing of the prohormones. In addition, it contains 7–9 residues of the AKH-related peptide and the first 24 residues of the RPCH-related peptide. Among the AKH precursors, this region shows the greatest variations in size. While in *D. melanogaster* it is made up of 31 residues (including the

active peptide), in other insects it contains only 18–23 residues. In this regard, crustaceans are more similar to mollusks, with 31–35 residues.

The third region shows the greatest differences among the three groups. While it contains most of the copies of the APGWamide stretch, only 20 amino acids correspond to the RPCH-related peptide in crustaceans and the whole region is absent in insects.

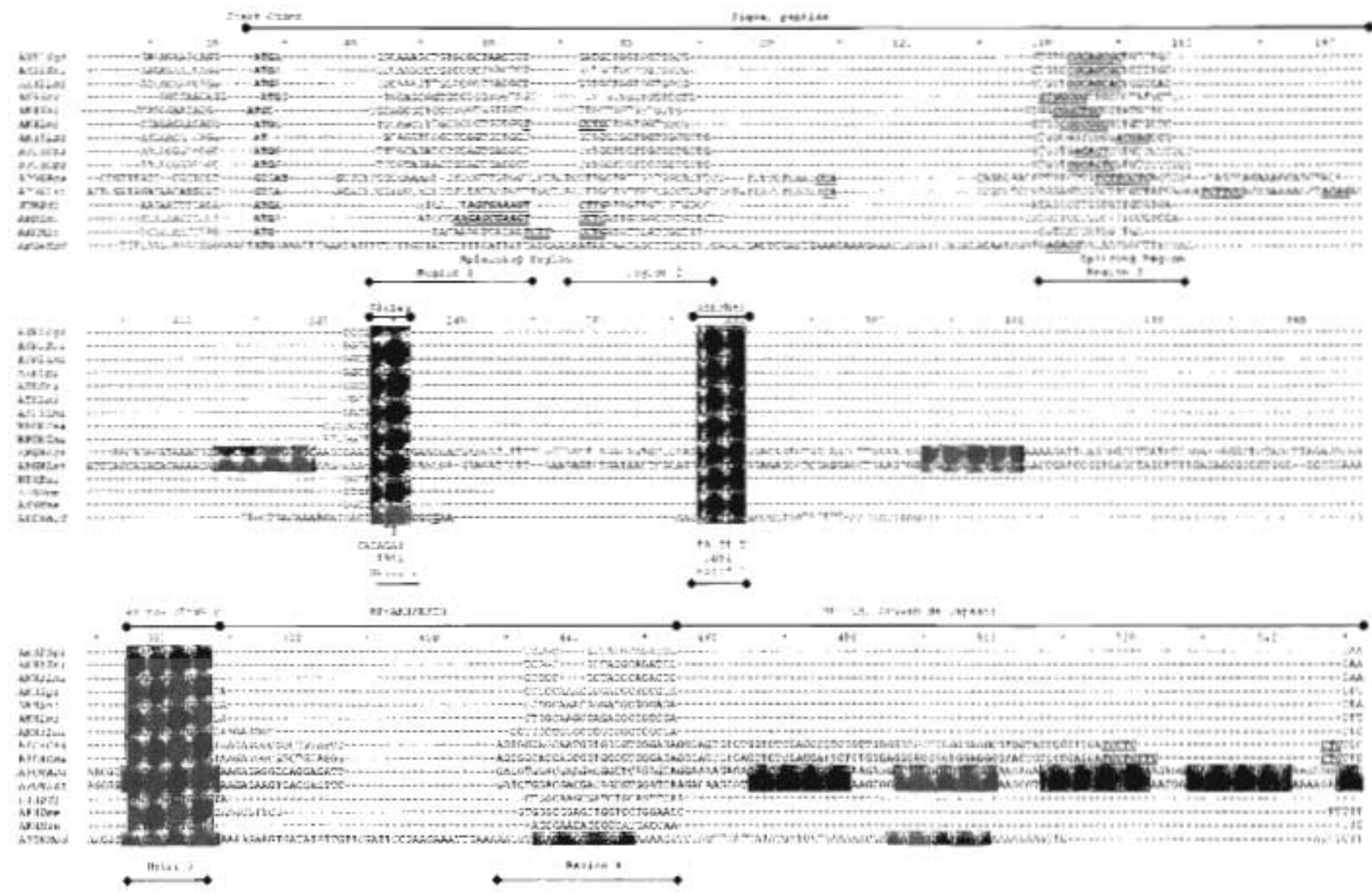
The fourth region contains the last amino acids of the AKH and RPCH-related peptides, and a similar domain is present in APGWamide. It contains the cysteine (residue 226), which has been shown to be necessary for AKH–AKH dimerization, a prerequisite for the processing of the pro-AKH in *L. migratoria* (Fisher-Lougheed et al. 1993). Additionally, Cys 226 may form a disulfide bond with another Cys in the third domain of crustaceans and mollusks (residue 201) and in the AKHs of *M. sexta*, *D. melanogaster*, and *B. discoidalis* and the AKH III of *L. migratoria* (residues 113 and 118, respectively).

To validate the aforementioned domains, an analysis was made of the possible secondary structure of the precursors of the AKH/RPCH family, following the methods devised by Geourjon and Deléage (1994) and Gibrat et al. (1987); both methods yielded the same results. As shown in Fig. 1B, the structure of all precursors is quite similar in all the species analyzed. Actually, the common structure is an α helix comprising region 1; however, the α helix in the mollusk is interrupted by a random coil structure (residues 20–44 and 54–74 in *A. californica*, residues 31–77 in *L. stagnalis*, and residues 15–28 and 44–65 in *M. edulis*). Region 2 forms a random coil in all species but in mollusks the structure is interrupted by an α helix formed by residues 99–111. The random coil structure is maintained in region 3 in crustaceans but at the beginning of the region in mollusks an α helix exists (residues 121–134 in *A. californica* and *L. stagnalis* and residues 141–154 in *M. edulis*). Finally, region 4 presents one α helix and ends with a random coil structure in all precursors.

As reported previously (Kuroki et al. 1990; Croll et al. 1991), both analyses showed good primary and secondary structural conservation of the signal peptide, active peptide, and C-terminus regions. In particular, the last three amino acids of the physiologically active AKH/RPCH peptide are well conserved with the second repeat of the APGWamide peptides in all species studied (Figs. 1A and B). For this reason, it was investigated whether this conservation is maintained at gene level.

DNA Sequence Alignments of the Precursors

Figure 2 shows that the codons for the signal peptide consist of three regions [nucleotides (nt), 1–223]: an immediate one, with those encoding for the last codon of the signal peptide, and the first two amino acids of AKH and RPCH (nt 224–232). This region is also present in



	Motif 1	Motif 2		Motif 3		Cut region							
	↓	↓ ↓	↓ ↓		↓ ↓								
AKH2Sgr	CAG CTC AAC TTC TCA ACC GGT TGG GGT CGG CGC												
AKH2Sni	CAG CTC AAC TTC TCA ACC GGT TGG GGT CGG CGC												
AKH2Lmi	CAG CTC AAC TTC TCG GCG GGG TGG GGG CGG CGC												
AKHSgr	CAG CTC AAC TTC ACC CCC AAC TGG GGC ACC GGC AAA CGG												
AKHSni	CAG CTC AAC TTC ACC CCC AAC TGG GGC ACC GGC AAA CGG												
AKHLmi	CAG CTC AAC TTC ACC CCC AAC TGG GGG ACT GGC AAG CGA												
AKH3Lmi	CAG CTC AAC TTC ACG CCG TGG TGG GGC AAG AGG												
RPCHCsa	CAG CTT AAC TTC TCC CCC GGC TGG GGT AAG AGG												
RPCHCma	CAG CTT AAC TTC TCC CCT GGC TGG GGT AAG AGG												
APGWaca	CAG TCT AAC TTC TCG CCT GGA TGG GGC AAG AGA												
APGWlst	CAG TTT AAC TTT TCG CCC GGA TGG GGC AAG AGA												
HTHBdi	CAG GTG AAC TTC TCA CCT GGC TGG GGT ACT GGC AAG CGA												
AKHDme	CAA TTG ACC TTC TCG CCG GAT TGG GGC AAG CGT												
AKHMse	CAG CTG ACC TTC ACC TCG AGC TGG GGA GGG AAG AGG												
APGWMed	GGG TTC AAC TTT TGA CCT GGC TGG GGC AAA AGA												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13

	Motif 1	Motif 2		Motif 3		Cut region							
	↓	↓ ↓	↓ ↓		↓ ↓								
AKH2Sgr	Gln-Leu-Asn-Phe-Ser-Thr-Gly-Trp-Gly-Arg-Arg												
AKH2Sni	Gln-Leu-Asn-Phe-Ser-Thr-Gly-Trp-Gly-Arg-Arg												
AKH2Lmi	Gln-Leu-Asn-Phe-Ser-Ala-Gly-Trp-Gly-Arg-Arg												
AKHSgr	Gln-Leu-Asn-Phe-Thr-Pro-Asn-Trp-Gly-Thr-Gly-Lys-Arg												
AKHSni	Gln-Leu-Asn-Phe-Thr-Pro-Asn-Trp-Gly-Thr-Gly-Lys-Arg												
AKHLmi	Gln-Leu-Asn-Phe-Thr-Pro-Asn-Trp-Gly-Thr-Gly-Lys-Arg												
AKH3Lmi	Gln-Leu-Asn-Phe-Thr-Pro-Trp-Trp-Gly-Lys-Arg												
RPCHCsa	Gln-Leu-Asn-Phe-Ser-Pro-Gly-Trp-Gly-Lys-Arg												
RPCHCma	Gln-Leu-Asn-Phe-Ser-Pro-Gly-Trp-Gly-Lys-Arg												
APGWaca	Gln-Phe-Asn-Phe-Ser-Pro-Gly-Trp-Gly-Lys-Arg												
APGWlst	Gln-Val-Asn-Phe-Ser-Pro-Gly-Trp-Gly-Lys-Arg												
HTHBdi	Gln-Val-Asn-Phe-Ser-Pro-Gly-Trp-Gly-Thr-Gly-Lys-Arg												
AKHDme	Gln-Leu-Thr-Phe-Ser-Pro-Asp-Trp-Gly-Lys-Arg												
AKHMse	Gln-Leu-Thr-Phe-Thr-Ser-Ser-Trp-Gly-Gly-Lys-Arg												
APGWMed	Gly-Val-Lys-Phe-***-Pro-Gly-Trp-Gly-Lys-Arg												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13

Fig. 3. Sequence alignment of the regions encoding for AKH and RPCH with the precursors of the APGWamide. When linking the three motifs of nucleic acids conserved between the AKH/RPCH family and APGWamide (indicated by arrows), it can be seen that the three mollusk species (*boldface*) contain the sequenced encoding AKH and RPCH. The conceptual translation of the APGWamide of *A. californica* and *L. stagnalis* (in *boldface*) shows 91% identity with RPCH and AKH. The only difference is in codon 2 of *A. californica*, in which a cytosine substitutes for a thymine (see Fig. 2). In the APGWamide precursor of *M. edulis*, the union of the three motifs results in a stop codon TGA (codon 5, labeled ***) Species abbreviations are as indicated in the legend to Fig. 1.

the precursor of the three molluscan species (motif 1) and its consensus is CAGBTB (B = no adenine). The codons for amino acids 3 and 4 and the first nucleotide of codon 5 in AKH and RPCH (nt 274–280) are separated by 45 nt in the precursors of *A. californica* and *M. edulis*. In this region, the consensus in the precursors of mollusks, crustaceans, and insects is AACTTCW (W = A/T) (motif 2). Finally, the codons for amino acids 6–8 (nt 375–387) are separated by 94 nt in *A. californica* and *L. stagnalis*. This region contains the two nucleotides of amino acid 6 and the first two nucleotides coding for amino acid 9 of AKH and RPCH (motif 3). The whole motif has the consensus CVCCBDRNTGGGGN (R = A/T; N = any; B, D, and V = not A, C, and T, respectively) and includes the first copy of APGWamide of *M. edulis* and the third copy of APGWamide of *A. californica* and *L. stagnalis*. After motif 3, there are two homologous regions (nt 429–455 and 621–662) coding for the RP-AKH/RPCH amino acids and most of the repeats of APGWamide. The final portion of the nucleotide sequence of the precursors is a region encoding for the termination site, which show close similarities among all species. Regions 6, 7, and 8 (nt 680–689, 701–719, and 737–776, respectively) show the greatest homology at the 3' end of the precursor, in particular, region 6, which contains the intron of AKH I and II of *S. nitans* and the

codon for the Cys (nt 730) which participates in peptide dimerization.

The analysis we have presented thus far raises the issue of the origin of these genomic structures. At least two possibilities can be considered: (1) a common ancestor that could have had an AKH/RPCH/APGWamide-like structure, which possibly could have gained DNA fragments in the evolution to the molluscan lineage and could have lost nucleotides when the progression to insects and crustaceans occurred; and (2) a common ancestor that possibly had separate APGWamide-like and AKH/RPCH-like structures, which possibly could have fused during the evolutionary steps toward insects and crustaceans, whereas in mollusks the former might have been amplified, losing the majority of the AKH/RPCH-like fragments.

These possibilities are further supported when joining the three motifs obtained from the alignment of the cDNAs of the various AKH, RPCH, and APGWamides (nt 227–232, 274–280, and 374–387 in Fig. 2). Figure 3 shows the conceptual translation of this union, in which the APGWamide precursors in *A. californica* and *L. stagnalis* initiate the AKH/RPCH sequence. Two differences were observed: (1) codon 2 is occupied by Phe in *A. californica*, while in *L. stagnalis*, crustaceans, and insects a Val or Leu is substituted instead; and (2) in *A.*

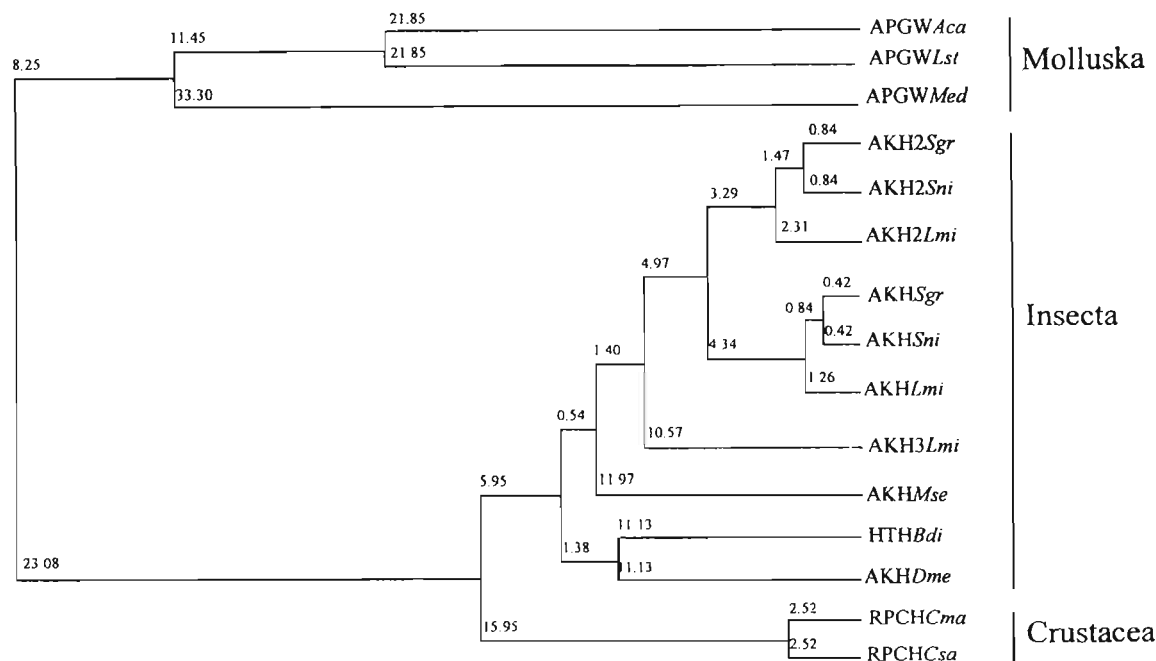


Fig. 4. Phylogenetic tree of the AKH/RPCH and APGWamide families. The amino acid phylogenetic tree shows that molluscan APGWamide precursors are closer to the possible ancestor than crustacean RPCH and insect AKH.

californica and *L. stagnalis*, codon 5 is occupied by the TCG codon for Ser. A similar result can be obtained by repeating the operation for *M. edulis*. The sequence for *L. stagnalis* is obtained, except for codon 1 (Gly) and the interruption of the open reading frame by a TGA stop codon in position 5.

The phylogenetic tree obtained from the amino acid primary sequences of the precursors of the APGWamide and RPCH/AKH families agrees with our results and previous findings (Gäde et al. 1994; Bogerd et al. 1995). The tree shows that the APGWamide precursor of mollusks, although similar, appeared earlier than those of crustacean RPCH and insect AKH precursors (Fig. 4).

A second feature that allows us to think about DNA rearrangements for the AKH/RPCH family and the APGWamide precursors of any possible ancestor is the position of the introns in the AKH gene. In *D. melanogaster*, the gene has an intron between the first and the second codons of the active peptide, while in the AKH genes of *S. nitans*, the intron is between codon 20 and codon 21 (AKH I) and between codon 52 and codon 53 (AKH II) of the AKH-related peptide (Noyes and Schaffer 1993); the AKH gene of *M. sexta* has no introns. Furthermore, AKH and APGWamide precursor alignments showed that the nucleotide environment occupied by introns is preserved in mollusks and crustaceans (Fig. 2).

Intron insertion might have occurred by reverse splicing of an excised intron (within a nonhomologous mRNA) followed by reverse transcription and homologous recombination; in addition, it could have occurred by invasion of self-splicing Group II introns (from or-

ganelles) into the nuclear genome followed by mutation, transforming intron II into a nuclear intron. A single mutation of the sequence flanking Group II introns (U/CA...GU) is required to produce the canonic sequence of nuclear introns (Rzhetsky et al. 1997).

A remarkable feature of the arrangement revealed by the nucleotide alignments is that the regions containing the AKH genes in *D. melanogaster* and *S. nitans* share an identity with the IBS2 motif (nt 225–231 and 681–689 in Fig. 2), which appears to be a region for insertion or elimination of self-splicing Group II introns (Mörl and Schmelzer 1990; Yang et al. 1996). By assuming such a function for these regions, and the fact that they have become nuclear introns, it is possible that even when the exon–exon junction site does not show 100% identity with the IBS2 motif, regions sharing similarities may be considered echoes of the insertion or elimination of both introns in the precursors of APGWamide, AKH, and RPCH.

According to this assumption, the exons of AKH genes lacking one or both introns might have contained sites for splicing enhancers and/or binding domains for splicing auxiliary factors, which may have participated in the processing of the pre-mRNA of the ancestral molecule. Although such motifs no longer participate in a splicing process due to the lack of an intron, their presence could reflect indirect evidence of their role in the processing of the eliminated intron. In this regard, all possible exons have the consensus proposed by Liu et al. (1998) and by Schaal and Maniatis (1999). The sequence AGAGC (nt 56–60) is present in the first exon (nt 9–229) of *D. melanogaster*. This is similar to the binding

motif for SRp40 proteins (sequence consensus ACDGS, where S = G/C and D = not T) and a class II motif F (nt 65–76), characteristic of pyrimidine-rich enhancers (TCCTC). This motif is also in the same position in the AKH of *L. migratoria*, whereas *M. sexta* has a class II motif E (TCTTC) in the same position, but the gene lacks exons (regions 1 and 2 in Fig. 2). Near the 3' end of the first exon in the *D. melanogaster* AKH precursor (region 3), the *S. nitans* gene, which lacks an intron, has the motif SRSASGA (nt 142–148), similar to the binding site for SF2/AFS protein. This motif is also present in region 3 of the precursors of *S. gregaria*, *L. migratoria*, and *C. maenas*. In this region, precursors of *C. sapidus*, *L. stagnalis*, *M. edulis*, and AKH III of *L. migratoria* have motifs similar to those recognized by SRp40 proteins. *A. californica* and *M. edulis* precursors have sequences resembling those of splicing enhancers, that is, class II motif E (Fig. 2).

In a similar fashion, at the 3' end of the second exon of AKH I and II of *S. nitans* (nt 683–684), what could be a class II motif F (nt 629–656) precedes the intron. This motif is also present in AKH I and II of *S. gregaria* and *L. migratoria*.

In region 5, motifs similar to the binding site of SRp40 and class II motif D (TCTCC) are present in the precursors of *M. sexta* and *D. melanogaster*, respectively. Neither species has introns in this position. Region 5 bears homology with the AKH precursors of *B. discoidealis*, AKH III of *L. migratoria*, the RPCH precursors of *C. sapidus* and *C. maenas*, and the APGWamide precursors of *A. californica* and *L. stagnalis*, in which a possible SRp40 motif is also present. Additionally, in *M. edulis* and in AKH I and II of *S. gregaria* and *L. migratoria*, possible class I (GGGGA) and class II A motifs are present, respectively (Fig. 2).

Although no motif mentioned thus far has been tested experimentally, these features might suggest that the ORF in the ancestral gene could possibly have been constituted by three exons separated by two introns. If so, the first exon could have contained part of the 5'UTR end, the start codon, the nucleotides encoding the signal peptide, and the first codon for RPCH. The second exon could have encoded the APGWamide copies. It might have been localized between the nucleotides coding for amino acid residues 2–4 of RPCH, preceding one of the APGWamide copies. Finally, the third exon might have contained the last codons of the related peptide and the 3'UTR.

From our analyses, we propose that the AKH/RPCH family could have originated from rearrangements of one ancestral gene (AKH/RPC/APGWamide-like) or by recombination of two ancestral genes (AKH/RPCH-like and APGWamide-like). In any event, loss of domains in the first exon might have formed what later became the signal peptide and the first codon for the Glu residue in RPCH. In the second exon, this loss of domains could

result in the union of the nucleotides forming amino acid residues 2–5 with the subsequent copy of APGWamide, from which the amino acids forming RPCH are derived. The third exon possibly underwent fewer variations in all molecular species considered in this study. Selection pressure acted to maintain the peptidic domain conserving the required Cys for AKH dimerization and for the processing of the prohormone (Fischer-Lougheed et al. 1993).

Once the RPCH precursor was formed, the gene was inherited in crustaceans and preserved in insects, in which more variations have appeared; in some species, an intron was lost, as is the case for *D. melanogaster* and *S. nitans*, while in others, such as *M. sexta*, both introns were lost to form AKH. Future cloning of RPCH and APGWamide genes will allow a more precise understanding of intron movements in the AKH/RPCH family.

The search for the ancestral gene of AKH/RPCH and APGWamide may be conducted in other mollusks, as well as in other invertebrates. In the nematode *Panagrellus redivivus*, a peptide has been identified with physiological activity similar to that of the AKH/RPCH peptides (Davenport et al. 1991); however, its structure is still unknown. To interpret these physiologic similarities, one must bear in mind that, although orthologous structures or sequences may correspond to homogeneous molecules stemming from a common molecular ancestor, they do not necessarily retain the original function(s) (Fitch 1970; Goldsworthy 1994). The neuropeptides AKH, RPCH, and APGWamide are a good example of this functional diversification, because while APGWamide's main known function appears to be the regulation of reproductive behavior and muscle control (Favrel and Mathieu 1996; Smit et al. 1992; Fan et al. 1997), RPCH regulates pigment position and neuronal activity (Garfias et al. 1995; Swensen and Marder 2000) and AKH controls lipid and carbohydrate metabolism (Stone et al. 1976). This functional diversity suggests an independent evolution of the receptors to these peptides and has been documented (Goldsworthy 1994; Hoyle 1999): the same bioactive molecule carries out entirely different functions in various phyla. The evidence of biological cross-reactivity between these peptides suggests that some molecular similarities may be found among receptors (Mordue and Stone 1976, 1977; Dallman et al. 1981). Some structure–function correlations have been reported for members of the AKH/RPCH family (Lee et al. 2000), but to date sufficient information on receptor structure is still lacking.

Given the fast rate at which information on the genomic structure of various species is being accrued, our scope for future comparisons will widen and more detailed results will be produced.

Acknowledgments. We thank Ma. Teresa Pacheco Reyes for her expert secretarial assistance. This work was supported by Grants 30595-N (to J.V.) and 28089-N from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México.

References

- Bck E, Berry R (1990) Prohormonal cleavage sites are associated with Ω loops. *Biochemistry* 29:178–183
- Bogerd J, Kooiman FP, Pijnenburg MAP, Hekking LHP, Oudejans RCHM, Van der Horst DJ (1995) Molecular cloning of the three distinct cDNAs, each encoding a different adipokinetic hormone precursor of the migratory locust, *Locusta migratoria*. *J Biol Chem* 270:23038–23043
- Bradfield JY, Keeley LL (1989) Adipokinetic hormone gene sequence from *Monduca sexta*. *J Biol Chem* 264:12791–12793
- Brakch N, Rhoïam M, Brussetta H, Cohen P (1993) Role of β -turn in proteolytic processing of peptide hormone precursors at dibasic sites. *Biochemistry* 32:4925–4930
- Cerff R (1995) In: Gö M, Schimmel P (eds) Tracing biological evolution in protein and gene structures. Elsevier, New York, pp 205–227
- Croll RP, Van Minnen J, Smit AB, Kits KS (1991) APGWamide: Molecular, histological and physiological examination of a novel neuropeptide. In: Kitts KS, Boer HH, Joose J (eds). Molluscan neurobiology. North-Holland, Amsterdam, pp 248–254
- Dallmann SH, Herman WS, Carlson J, Josefsson L (1981) Adipokinetic activity of shrimp and locust peptide hormones in butterflies. *Gen Comp Endocrinol* 43:256–258
- Davenport TRB, Isaac RE, Lee DL (1991) The presence of peptides related to the adipokinetic hormone/red pigment-concentrating hormone family in the nematode, *Panurgrellus redivivus*. *Gen Comp Endocrinol* 81:419–425
- Fan X, Croll RP, Wu B, Fang L, Shen Q, Painter SD, Nagle GT (1997) Molecular cloning of a cDNA encoding the neuropeptides APGWamide and cerebral peptide 1: Localization of APGWamide-like immunoreactivity in the central nervous system and male reproductive organs of *Aplysia*. *J Comp Neurol* 387:53–62
- Favrel P, Mathieu M (1996) Molecular cloning of a cDNA encoding the precursor of Ala-Pro-Gly-Trp amide-related neuropeptides from the bivalve mollusk *Mytilus edulis*. *Neurosci Lett* 205:210–214
- Fernlund P, Josefsson L (1972) Crustacean color change hormone: Amino acid sequence and chemical synthesis. *Science* 177:173–175
- Fischer-Lougheed J, O'Shea M, Cornish J, Losberger C, Roluet E, Schulz-Allen MF (1993) AKH biosynthesis: Transcriptional and translational control of two co-localized prohormones. *J Exp Biol* 177:223–241
- Fitch WM (1970) Distinguishing homologous from analogous proteins. *Syst Zool* 19:99–113
- Gåde G (1993) Structure-activity-relationships for the lipid-mobilization action of further bioanalogs of the adipokinetic hormone red pigment-concentrating hormone family of peptides. *J Insect Physiol* 39:375–383
- Gåde G, Reynolds SE, Beeching JR (1994) Molecular evolution of peptides of the AKH/RPCH family. In: Davey KG, Peter RE, Tobe SS (eds). Perspectives in comparative endocrinology. National Research of Canada, Ottawa, pp 486–492
- Gåde G, Hoffmann KH, Spring JH (1997) Hormonal regulation in insects: Facts, gaps, and future directions. *Physiol Rev* 77:963–1032
- Garfias A, Rodríguez-Sosa L, Aréchiga H (1995) Modulation of crayfish retinal function by red pigment concentrating hormone. *J Exp Biol* 198:1447–1454
- Gauss G, Kleinholz LH, Kegel G, Keller R (1990) Isolation and characterization of red pigment-concentrating hormone (RPCH) from six crustacean species. *J Comp Physiol* 160B:373–379
- Geourjon C, Deléage G (1994) SPOM: A self-optimized method for protein secondary structure prediction. *Protein Eng* 7:157–164
- Gibrat JF, Garnier J, Robson B (1987) Further developments of protein secondary structure prediction using information theory. *J Mol Biol* 198:425–443
- Goldsworthy GJ (1994) Adipokinetic hormones of insects: Are they insect glucagons? In: Davey KG, Peter RE, Tobe SS (eds). Perspectives in comparative endocrinology. National Research of Canada, Ottawa, pp 486–492
- Goldsworthy GJ, Lee MJ, Luswata R, Drake AF, Hyde D (1997) Structures, assays and receptors for Locust adipokinetic hormones. *Comp Biochem Physiol* 117:483–496
- Hayes TK, Keeley LL, Knight DW (1986) Insect hyperrehalosemic hormone: Isolation and primary structure from *Blaberus discoidalis* cockroaches. *Biochem Biophys Res Commun* 140:674–678
- Hoyle CH (1999) Neuropeptide families and their receptors: Evolutionary perspectives. *Brain Res* 848:1–25
- Klein JM, Mohrter CJ, Steuets F, Jancke N, Riehm JP, Rao R (1995) A highly conserved red pigment concentrating hormone precursor in the blue crab *Callinectes sapidus*. *Biochem Biophys Res Commun* 212:151–158
- Kuroki Y, Kanda T, Kubota I, Fujisawa Y, Ikeda T, Miura A, Minamitake Y, Muneoka YA (1990) Molluscan neuropeptide related to the crustacean hormone RPCH. *Biochem Biophys Res Commun* 167:273–279
- Lacombe C, Greve P, Martin G (1999) Overview on the sub-grouping to the crustacean hyperglycemic hormone family. *Neuropeptides* 33:71–80
- Lee MJ, Goldsworthy GJ (1995) Acetate uptake assay: The basis for a rapid method for determining potencies of adipokinetic peptides for structure-activity studies. *J Insect Physiol* 41:163–170
- Lee MJ, de Jong S, Gåde G, Poulus C, Goldsworthy GJ (2000) Mathematical modeling of insect neuropeptides potencies: Are quantitatively predictive models possible? *Insect Biochem Mol Biol* 30:899–907
- Le Roith D, Shiloach J, Roth J (1982) Is there an earlier phylogenetic precursor that is common to both the nervous and endocrine systems? *Peptides* 3:211–215
- Leszczynsky JF, Rose GD (1986) Loops in globular proteins: A novel category of secondary structure. *Science* 234:849–855
- Lewis DK, Jezierski MK, Keeley LL, Bradfield JY (1997) Hyperrehalosemic hormone in a cockroach: Molecular cloning and expression. *Mol Cell Endocrinol* 130:101–108
- Linck B, Kellin JM, Mangerich S, Keller R, Weidemann WM (1993) Molecular cloning of crustacean red pigment concentrating hormone precursor. *Biochem Biophys Res Commun* 195:807–813
- Liu HX, Zhang M, Krainer A (1998) Identification of functional exonic splicing enhancer motifs recognized by individual SR proteins. *Genes Dev* 12:1998–2012
- Miehalik J, Szolajska E, Lombarska-Sliwinska D, Rosinski G, Kopinińska D (1998) Hyperrehalosemic insect peptide periplanetin CC-2 and its analogues: Synthesis and biological evaluation. *Eur J Entomol* 95:1–7
- Mordue W, Stone JV (1976) Comparison of the biological activities of an insect and crustacean neurohormone that are structurally similar. *Nature* 264:287–289
- Mordue W, Stone JV (1977) Relative potencies of locust adipokinetic hormone and prawn red pigment-concentrating hormone in insect and crustacean systems. *Gen Comp Endocrinol* 33:103–108
- Mörl M, Schmelzer C (1990) Integration of group II intron III into a foreign RNA by reversal of the self-splicing reaction in vitro. *Cell* 60:629–636
- Noyes BE, Schaffer MH (1990) The structurally similar neuropeptides adipokinetic hormone I and II are derived from similar, very small mRNAs. *J Biol Chem* 265:483–489
- Noyes BE, Schaffer MH (1993) The closely related neuropeptide genes encoding adipokinetic hormones I and II have very different 5'-flanking regions. *DNA Cell Biol* 12:509–516
- Noyes BE, Katz FN, Schaffer MH (1995) Identification and expression of the *Drosophila* adipokinetic hormone gene. *Mol Cell Endocrinol* 109:133–141
- O'Neill JB, Pen CB, Ruff MR, Smith CC, Higgins WJ, Zipser B (1988)

- Identification and characterization of the opiate receptor in the ciliated protozoan, *Tetrahymena*. *Brain Res* 450:303-315
- Paolillo L, Simonetti M, Brakch N, D'Auria G, Saviano M, Deltin M, Rholam M, Scatturin A, Di Bello C, Cohen P (1992) Evidence for the presence of a secondary structure at the dibasic processing site of prohormone: The pro-oxytocin model. *EMBO J* 11:2399-2405
- Rayne RC, O'Shea M (1993) Structural requirements of pro-adipokinetic hormone I. *FEBS Lett* 217:905-911
- Rholam M, Nicolas P, Cohen P (1986) Precursors for peptide hormones share common secondary structures forming features at the proteolytic processing sites. *FEBS Lett* 207:1-6
- Rholam M, Cohen P, Brakch N, Paolillo L, Scatturin A, Di Bello C (1990) Evidence for β -turn structure in model peptides reproducing pro-oxytocin/neurophysin proteolytic processing site. *Biochem Biophys Res Commun* 168:1066-1073
- Rzhetsky A, Ayala FJ, Hsu LC, Chang C, Yoshida A (1997) Exon/intron structure of aldehyde dehydrogenase genes supports the "introns-late" theory. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:6820-6825
- Schaal TM, Maniatis T (1999) Selection and characterization of pre-mRNA splicing enhancers: Identification of novel SR protein-specific enhancers sequences. *Mol Cell Biol* 19:1705-1719
- Schulz-Allen MF, Roulet E, Fischer-Lougheed J, O'Shea M (1989) Synthesis of a homodimer neurohormone precursor of locus adipokinetic hormone studied by in vitro translation and cDNA cloning. *Neuron* 2:1369-1373
- Sjostrom M, Wold S, Wieslander A, Rilfors L (1987) Signal peptide amino acid sequences in *Escherichia coli* contain information related to final protein localization. A multivariate data analysis. *EMBO J* 6:823-831
- Smit AB, Jimenez CR, Dirks RW, Croll RP, Geraerts PM (1992) Characterization of a cDNA clone encoding multiple copies of the neuropeptide APGWamide in the mollusk *Lymnaea stagnalis*. *J Neurosci* 12:1709-1715
- Stone JV, Mordue W, Batley KE, Morris HR (1976) Structure of locust adipokinetic hormone, a neurohormone that regulates lipid utilization during flight. *Nature* 263:207-211
- Swensen A, Marder E (2000) Multiple peptides converge to activate the same voltage-dependent current in a central pattern generating circuit. *J Neurosci* 20:6752-6759
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weighting matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22:4673-4680
- Yung J, Ziminerly S, Perlman PS, Lambowitz AM (1996) Efficient integration of an intron RNA into double-stranded DNA by reverse splicing. *Nature* 381:332-335
- Ziegler R, Cushing AS, Walpole P, Janensky RD, Morimoto H (1998) Analogs of *Manduca* adipokinetic hormone tested in bioassay and in a receptor-binding assay. *Peptides* 19:481-486



Hotmail

Hoy

Correo

Calendario

Contactos

szruzal@hotmail.com

Boletines gratuitos | (

Responder |
 Responder a todos |
 Reenviar |
 Eliminar |
 Bloquear |
 No deseado ▾ |
 Colocar en carpeta ▾

De: <peptides@pbrc.edu>

Bandeja de entrada

Enviado el: Miércoles, 10 de Noviembre de 2004 09:11:59 p.m.

Para: szruzal@hotmail.com

 Asunto: PEP, Editor's decision: revise, zinker, szruzal_20041015/2,
 Circadian oscillatio...

Dear Dr zinker,

On 22-Oct-2004 you submitted a revised paper
 number PEP_szruzal_20041015/2 to Peptides entitled:

'Circadian oscillations of RPCH gene expression in the eyestalk of the crayfish
 Cherax quadricarinatus'

Your paper has been reviewed and requires revision before it can be considered
 further.

Please revise your paper according to the following comments:

I believe that we may eventually be able to publish your manuscript, but not in
 its present form. The comments of our editorial consultants are included below.
 It will be necessary for you to revise your manuscript to incorporate the
 recommendations and criticisms of our referees where appropriate.

If you choose to revise your manuscript, please include a detailed cover letter
 outlining the specific modifications you have made. We look forward to receiving
 your revision in the near future.

Sincerely,

ABBA J. KASTIN, M.D

REFEREE #1:

Thank you for sending us the manuscript "Circadian oscillations of RPCH
 gene expression in the eyestalk of the crayfish *Cherax quadricarinatus*" by
 Francisco Martinez-Perez et al. Hugo Arechiga, to whom this paper is
 dedicated, president of his National Academy of science, was a dear
 friend, and I am certainly in favor of seeing any paper published that
 honors his memory, as I should have done before now, if I could sleep less.
 But I do have a problem which I formulate as the need for methodologic
 clarification and quantification.

The authors may wish to amplify on the beta-actin mRNA cosinor rhythmic
 index which "tend[s] to give a straight line in periods of 48 h" (non
 sequetur). Equally, they should provide numerical values for amplitude
 when "the same index for the mRNA of RPCH gives a sinusoidal function".

The amplitudes, preferably with uncertainties, should be tested for the difference implied. "A cosinor
 method is a procedure providing parameters with their uncertainties."
 There are also parameter tests for comparisons (1). We shall gladly help
 them if they send us numerical data - doubly in Hugo's memory and, of
 course, I wave anonymity, if you want to send them a copy of this letter.
 With very best regards, Franz

Franz Halberg, M.D.
 Dr. h.c. (Montpellier),
 Dr. h.c. (Ferrara),

Dr. h.c. (Tyumen),
 Dr. h.c. (Brno)
 Dr. h.c. (L'Aquila)
 Professor of Laboratory Medicine and Pathology,
 Physiology, Biology, Bioengineering and Oral Medicine
 Director, Halberg Chronobiology Center
 University of Minnesota
 Mayo Mail Code 8609
 Dept of Laboratory Medicine
 Minneapolis Campus
 420 Delaware Street SE
 Minneapolis, MN 55455, USA
 TEL (651) 454-6334 or 484-3160
 (612) 624-6976 or 624-3144 or 245-7930
 FAX (612) 624-9989
 E-MAIL halbe001@tc.umn.edu
 WEB SITE <http://revilla.mac.cie.uva.es/chrono>

1 Bingham C, Arbogast B, Corn^o;lissen Guillaume G, Lee JK, Halberg F.
 Inferential statistical methods for estimating and comparing cosinor
 parameters. Chronobiologia 1982; 9: 397-439.

REFeree #2:

Review: ;@Circadian oscillations of RPCH gene expression in the eyestalk of the
 crayfish *Cherax quadricarinatus*;-. Martinez-Perez et al.

In the manuscript by Martinez-Perez, the authors describe for the first time the
 primary sequences of the cDNA for the neuropeptide hormone RPCH and for ;@actin
 in a species of crayfish (in this case *Cherax quadricarinatus*), and specifically
 compare the RPCH sequences with other crustaceans and insects. Of greatest
 interest, while previous evidence supported the concept that RPCH levels vary
 according to a circadian rhythm and are associated with the regulation of
 movement of retinal pigmentation, the authors provide evidence at the DNA/RNA
 level that RPCH synthesis follows a circadian rhythm when animals are exposed to
 a 12:12 h light/dark cycle and a bimodal ultradian rhythm during constant
 darkness. The manuscript adds significantly to our understanding of the role of
 RPCH in the regulation of important physiological cycles in crustaceans and
 should be of interest to the general readership of Peptides.

- p. 2, line 5: Replace ;@tend; with ;@tends;
 p. 3, line 12: Change ;@immunocitochemistry; with ;@immunocytochemistry;
 p. 3, line 16: Replace ;@The; with ;@Two;, add ;@have been; after
 ;@mechanisms;, and move ;@proposed; to a position between ;@have been; and
 ;@to explain;
 p. 3, line 18: Replace ;@:; with ;@. And ;@the; with ;@The;, and add
 ;@and; after ;@[28,23];. Change ;@[28,23]; to {23,28};
 p. 3, line 20: Change ;@movements; to ;@movement;
 p. 4, line 9: Insert ;@a; between ;@as; and ;@recognition site;
 p. 4, line 12: Replace ;@have; with ;@adopt;.
 p. 4, line 13 and line 15: Replace ;@cistine; with ;@cysteine; and
 ;@cistine; with ;@cystine;
 p. 5, line 4: Replace ;@subjected; with ;@subject;
 p. 5, line 15: Remove ;@,; after ;@hemolymph; and add ;@all; before
 ;@change; as well as ;@according to a; after ;@change;
 p. 5, line 16: Replace ;@circadianly; with ;@circadian rhythm;
 p. 5, line 18: Replace ;@it; with ;@the circadian; and ;@exposition; with
 ;@exposure;
 p. 15, line 12: Replace ;@search; with ;@searched;
 p. 18, line 8: Replace ;@mean; with ;@means;
 p. 18, line 13: Remove ;@an;
 p. 19, line 11: Insert ;@in a; between ;@behaves; and ;@circadian; change
 ;@circadianly with ;@circadian fashion;
 p. 30, line 2: Change ;@cistine; with ;@cysteine;
 p. 30, Fig. 5 caption, line 6 and 7: Replace ;@daytime; with ;@Daytime;
 change ;@Depict; to ;@depicted; and move it after ;@Daytime is; replace
 ;@in; with ;@by; on lines 6 and 7

<http://www.elsevier.com/submit/pep/szruza/20041015/>

Kind regards,

Professor and Endowed Chair
 Pennington Biomedical Research Center
 6400 Perkins Road
 Baton Rouge, LA 70808-4124
 Tel: (225) 763-0266
 Fax: (225) 763-0265

Peptides: E-submission
 For queries about the E-submission website please contact
authorsupport@elsevier.com

For queries specific to this submission please contact: peptides@pbrc.edu



Bandeja de entrada

MSN - Más Útil Cada Día

[Página principal](#) | [Hotmail](#) | [Buscar](#) | [Grupos y Gente](#) | [Compras](#)

© 2004 Microsoft Corporation. Todos los derechos reservados. Microsoft, MSN, Más Útil Cada Día, el logo de MSN y el logo de "Más Útil Cada Día" son marcas registradas de Microsoft Corporation en los Estados Unidos y otros países.

Bergman C, Arboleda S, Corn... Lessing Guillaume G, Lee Jk, Halberg F.

Differential statistical methods for estimating and comparing cosine parameters.

Chronobiología 1982; 9: 397 - 434

Circadian oscillations of RPCH gene expression in the eyestalk of the crayfish

***Cherax quadricarinatus*.**

Francisco Martínez-Pérez^{a, b}, Samuel Zinker^b, Guadalupe Aguilar^b, Jesús Valdés^c and Hugo Aréchiga^{d, 1}.

^{a, b}Posgraduate School of Biological Sciences. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D. F. 04510. México. ^bDepartment of Genetics and Molecular Biology and ^cDepartment of Biochemistry. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional. Apartado Postal 14-740. México, D. F. 07000. México. ^dDivision of Research and Postgraduate Studies. Facultad de Medicina. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D. F. 04510. México.

Corresponding Author:

Dr. Samuel Zinker.

Departamento de Genética y Biología Molecular. CINVESTAV-IPN. Apartado Postal 14-740. México, D. F. 07000. México.

Tel: (55) 5061-3800 ext. 5322.

Fax: (55) 5061-3931.

E-mail address: szruzal@hotmail.com.

1. INTRODUCTION

Migration of crustacean pigment granules in the tegumentary chromatophores and in the retinal cells is modulated by circadian oscillations as a result of the action of classical neurotransmitters like 5-hydroxytryptamine, norepinefrine and dopamine. The former two promote the action of the Pigment Dispersing Hormone (PDH) and the later one promotes the action of the Red Pigment Concentrating Hormone (RPCH) [1-2]. The neuropeptides PDH and RPCH are members of the chromatophorotropic hormones and are synthesized by the X organ-sinus gland system located in the optic peduncle of crustaceans [3-4]. RPCH is also synthesized by neural groups of the medulla interna, the medulla externa and the medulla terminalis of the crustacean eyestalk [4-6]. The concentration of RPCH in the lamina ganglionaris plus the X organ-sinus gland system, as shown by immunocytochemistry measurements, is the highest [5]. RPCH is an octapeptide [7-9] that induces retraction of pigment granules from the pigment tegumentary chromatophores [5-6] and from the distal segment of retinal cells [10]. In contrast, PDH is an octadecapeptide with an opposite functional role since it elicits dispersion of pigment granules in the same target cells [2-3]. The proposed mechanisms to explain granule distribution after RPCH and PDH interaction with their receptors comprise: the intracellular increase of Ca^{+2} concentration [11-12], the regulation of cyclic nucleotide concentration by increased biosynthesis or by degradation and movements along the cytoskeleton microtubules [13]. PDH is released also by a neural reflex, triggered by light acting on extra-retinal photoreceptors [2].

The structure of RPCH is closely related to the neuropeptide family known as Adipokinetic Hormone (AKH). This hormone controls lipid and carbohydrate metabolism in insects [14]. Since AKH induces pigment concentration in crustacean chromatophores, as RPCH does, and RPCH induces hypoglycemia in insects [15], as AKH does, they are considered as a single RPCH/AKH family, probably sharing a common origin [16]. The amino acid alignment of the RPCH/AKH peptides has revealed a common overall architecture. The hormones start at the signal peptide of 19 to 25 amino acid residues [22], followed by the RPCH or AKH active peptide sequence, then the 2 basic amino acids Lys-Arg, serving as recognition site for protease activity [17] and ending at the related peptide, that has 72 amino acid residues in crustaceans and 32 amino acid residues in several insect species. These peptides have similar α -helix and random coil secondary structures [16]. The precursors of the propeptides form disulfide bonds between 2 cysteines: one located in the related peptide and the other one located either in the related peptide, or in a few cases, in the signal peptide. The cistine produced, is essential for dimmer prohormone cleavage at the Lys-Arg peptide bond [18]. In all crustacean species studied, the RPCH primary structure is: pGlu-Leu-Asn-Phe-Ser-Pro-Gly-Trp-NH₂ [8]. It was assumed that RPCH was present exclusively, in crustaceans, but recently a similar peptide, with Ile as the amino residue in position 2, which functions as a lipid-mobilizing hormone, was recently found in the corpora cardiaca of the stinkbug *Nezara viridula* [16].

Numerous members of the RPCH/AKH family are known, but only two cDNAs from crustaceans, those from the crabs *Carcinus maenas* [7] and *Callinectes sapidus* [9] have been reported. In contrast, cDNAs from 10 insect precursor peptides that

belong to *Locusta migratoria* [20], *Schistocerca gregaria* [18, 21], *Schistocerca nitans* [22], *Blaberus discoidalis* [23], *Manduca sexta* [24] and *Drosophila melanogaster* [25] are known.

The movement of retinal pigments is subjected to circadian cycles in the crayfish. The pigments are dispersed during the day and they concentrate during the night, even in animals which were kept in constant darkness [26-27]. In the dark, the movement of the distal pigment is toward the corneal end of the compound eye, whereas the proximal pigment moves in the opposite direction, toward the photoreceptor axons in the proximal part of the retinal cells [10, 26-27]. As a consequence of both events, the rhabdom area is widely exposed to light. Crustacean neurohormones, like RPCH, play a role in altering the output of rhythmic pattern generators. RPCH concentration in the crayfish shows seasonal changes with maximum values in the summer months and minimum values during winter time [28]. The RPCH synthesizing neurons electrical activity of [29], as well as the RPCH release to the hemolymph, and the amount of this peptidic hormone [30], change circadianly. Modulation of retinal pigment distribution in *P. clarkii* related to RPCH has been described also [10, 31]; its minimal concentration is detected early during the daytime and it increases to a maximum after 12 h of light exposition, decreasing afterwards throughout the night. Circadian rhythms of this hormone have been detected by immunological measurements in the same experimental animal [30].

In this work we asked whether the oscillations of RPCH detected by immunochemistry, are reflected or not, at more basic molecular levels, like the transcription of genes, and if they are sensed or not as 24 h rhythmic circadian oscillations. To that end 12:12 h light/dark experiments were carried out to measure

the amount of mRNA for RPCH and for β -actin. The results show relatively constant levels of β -actin mRNA in light/dark or dark/dark schedules and circadian or ultradian oscillations of the mRNA for RPCH in light/dark or dark/dark schedules, respectively.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Experimental animals

The crayfish *Cherax quadricarinatus* was bought from a local fishery supplier. Adult specimens were used, without distinction of sex, in intermolt at the time of the experiment and with food ad libitum. The animals were kept at constant temperature in a 12:12 h light/dark program for at least 2 weeks before the experiment. Light was on from 8.00 to 20.00 h daily. A separate group of animals was kept in darkness from 3 weeks up to 4 months.

2.2 Isolation of DNA and RNA from C. quadricarinatus

Genomic DNA was extracted from muscular tissue [32], then purified, firstly using a DNAzol kit (Stratagene; instructions given by the supplier) and secondly by centrifugation through a CsCl density gradient. DNA was dissolved in buffer TE and kept frozen at -70 °C. RNA was extracted from the eyestalks, the hepatopancreas, the gallnuts and the muscle. Every 3 h the organs were obtained and immediately dropped into liquid nitrogen. For each time point 10 organs were pooled. RNA extraction from the eyestalks was problematic since polysaccharides, phenolic compounds, carotenes and retinal pigments interfere with its obtention. Therefore, we followed the modified method here described. Total RNA was extracted from the medulla after removal of the exoskeleton, the fat, the connective tissue and the dissection of the retina [33-34]. The medulla was immersed in 3 ml of lysis buffer (4 M guanidine thiocyanate, 25 mM sodium citrate, 0.5% sarcosyl, 0.1 M 2-mercaptoethanol, pH 7.0) plus 1 vol of water-saturated phenol and was mechanically disrupted, in the presence of 100 mg/ml of glass-beads (0.5 µ in diameter), by 5

alternate periods of 1 min highest speed vortexing and 1 min cooling in ice-water at 4 °C. The tissue lysate was mixed with 0.4 vol of a chloroform-isoamyl alcohol (24:1) solution and centrifuged at 17 600 g for 45 min at 4 °C. The upper phase layer was saved, mixed with 0.1 vol of high salt solution (1.2 M NaCl, 0.8 M Sodium acetate), 0.9 vol of isopropanol and incubated at -20 °C. The precipitated RNA was centrifuged, dissolved in 700 μ l of lysis buffer, precipitated with 1 vol of isopropanol at -20 °C for 1 h and washed with 75% ethanol. The purified RNA was dissolved in water and its concentration was calculated by absorbance measurements at 260 nm. Total RNA integrity was tested as the absence of rRNA degradation by electrophoresis in 1% agarose gels [35]. Total RNA was kept in water at -70 °C until use.

The RNA extracted from the eyestalks, the hepatopancreas, the gallnuts and the muscle was tested by RT-PCR (Superscript II; Invitrogen) monitoring the 18S rRNA [36] cDNA synthesis from each organ tissue. The primer numbers, their names, their sequences, and the RNA they belong to are given in Table I. 500 ng of primer adaptor #17 were added to 500 ng of total RNA (3:1 ratio of primer to RNA) in a final volume of 20 μ l of RT-reaction mixture and incubated at 52 °C for 55 min. The RNA was hydrolyzed with a mixture of 0.25 U of RNase H, 0.5 U of RNase T₂ and 0.5 ng of RNase A (Invitrogen) for 20 min at 37 °C. The reaction mixture was diluted to 100 μ l with sterile water and stored at -20 °C. The 18S RNA was amplified using 50 ng of cDNA stock, 0.2 mM each of the 4 dNTPs, 0.5 U of DeepVent DNA polymerase (New England Biolabs), 5 U *Taq* DNA polymerase and 100 pM of primers #17 and #18, dissolved in 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂ and 20 mM Tris-HCl (pH 9.4) in 50 μ l of reaction mixture and incubated for 27 cycles at 95 °C for 20 sec, 62 °C for 20 sec and

72 °C for 2 min. The amplified cDNA products were separated by 1% agarose gel electrophoresis and analysed.

2.3 Cloning of the cDNAs for the RPCH precursor and for the β -actin

The cDNAs for RPCH and β -actin were cloned by a two step procedure. Firstly, partial gene sequences were amplified by PCR to choose a consensus internal DNA stretch fragment. Secondly, 5' and 3' RACE were performed to determine the primary sequence of the two ends of the mRNAs.

2.3.1 Design of oligonucleotide primers for RPCH precursor and β -actin clonation

A consensus sequence stretch for RPCH was selected after alignment of the cDNAs for *Callinectes sapidus* [9] and *Carcinus maenas* [7]; the intron gene position for RPCH in *C. sapidus* [37] and other introns for the AKH/RPCH family [16] were taken also into account. The sense primer was #1 containing the last three codons of the signal peptide and the first four codons plus the two first nucleotides of the fifth codon of the active peptide. The two anti-sense primers #2 and #3 were targeted to the exon-exon union of *C. sapidus* and the end of the ORF segment of the two mentioned crabs, respectively. Primers for β -actin cloning were synthesized according to the homologous sequence of the cDNA from *Procambarus clarkii* [38]. The upper primer was #10 and encompassed nucleotides 263-280; the lower primer was #11 and comprised nucleotides 407-426.

2.3.1.2. Polymerase Chain Reaction. Nested PCR

Reaction mixtures in 50 μ l contained 100 ng of *C. quadricarinatus* chromosomal DNA, 0.2 mM each of the 4 dNTPs, 0.5 U of Deep Vent DNA polymerase (New England Biolabs) and 100 pM of sense and anti-sense primers, either for β -actin or for RPCH, dissolved in 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 20 mM Tris-

HCl, pH 9.4. A nested PCR reaction for RPCH was performed, also. The products of the first PCR reaction were purified by silica-gel columns (Quiagen; as recommended by the supplier). Incubation was with 5% of PCR products and primers #1 and #3. Samples were incubated at 95 °C for 20 sec, 50 °C for 20 sec and 72 °C for 30 sec for 25 cycles.

2.3.1.3 DNA cloning and sequence analysis

Amplification products were separated by agarose gel electrophoresis. They were excised and eluted from the agarose gels and they were subcloned in plasmid PCR 3.1 with TOPO isomerase (Invitrogen) as recommended by the supplier. The products were transformed into *E. coli* competent cells. DNA nucleotide sequences were determined by a deoxy sequencing kit (Biosystem Prism Dye) using an ABI PRISM 310 Genetic Analyser (Applied Biosystems) automatic sequencer. Primary sequences were compared to other Gene Bank reported sequences by BLAST program.

2.4 RPCH and β -actin 5' and 3' end mRNA amplification

The 5' RACE reactions were performed with a Gene Racer kit (Invitrogen) as recommended by the supplier. mRNA amplification for cDNA synthesis was performed with the ThermoSuper Script kit (Invitrogene). Primer adaptors were #4 and #14 for RPCH and β -actin, respectively. The cDNA was RNase treated as above and purified by silica gel columns (Quiagen) as recommended by the supplier. The anti-sense primer #4 for the RPCH precursor was complementary to the cDNA codons and the primer for β -actin was #12. Samples were incubated for 35 cycles at 95 °C for 20 sec, 65 °C for 20 sec and 72 °C for 30 sec. The PCR products were subcloned and sequenced as in *2.3.1.3*.

For 3' RACE reactions the anchor primer was #19, an oligonucleotide of 24 thymines with a 5' poly-linker to restriction enzymes *Not*I, *Sph*I, *Pis*I, *Vsp*I, and *Ase*I. For cDNA synthesis Superscript II (Stratagene) was used, as recommended by the supplier, at 42 °C for 55 min. cDNA purification was as described for 5' RACE. The PCR mix reaction was the same as for 18S RT-PCR. Single stranded cDNA was purified using silica-gel columns as suggested by the supplier. The sense primers #6 and #10 were used to amplify RPCH and β -actin, respectively. The anti-sense for both reactions was the poly-linker bound to #20. Amplification was for 35 cycles at 96 °C for 30 sec, 65 °C for 20 sec (RPCH) or 50 °C for 20 sec (β -actin) and 72 °C for 1 min. Analysis of PCR products was as described above.

2.5 Semi-quantitative RT- PCR.

RT-PCR semi-quantitative measurement of RPCH and β -actin were carried out with their amplified cDNA products. For RT-PCR of RPCH and β -actin, 0.75, 2, and 3 μ g of total RNA were added to the reaction mixture. The expected products were monitored every 3 other cycles beginning at cycle 5. They were visualized in 1% agarose gels and their concentration was measured in pixels (Eagle Eye Stratagene). The RPCH segment amplified by RT-PCR was from position 124 (primer #8) to position 365 (primer #9) and that for β -actin was amplified from position 597 (primer #15) to position 1112 (primer #16). In both cases 2 U of *Taq* polymerase was used and cycles were for 30 sec at 96 °C, 20 sec at 60 °C and 25 sec at 72 °C. 18S rRNA amplification was from position 59 (primer #17) to position 1791 (primer #18) [36]. The cDNAs relative concentration was calculated at exponential phase of synthesis using the β -actin curve as reference. The cDNA sequence was confirmed as in 2.3.1.3.

2.6 Phylogenetic analysis of the RPCH precursor and β -actin.

The *C. quadricarinatus* RPCH cDNA primary structure sequence alignment was compared with the cDNA sequences of AKH I, II, and III of *Locusta migratoria* [20], the AKH I and II of *Schistocerca gregaria* [18, 21], the AKH I and II of *Schistocerca nitans* [22] and the HTH from *Blaberus discoidalis* [23], *Manduca sexta* [24], *Drosophila melanogaster* [25] and with the two available cDNA sequences of RPCH precursors from *Carcinus maenas* [7] and *Callinectes sapidus* [9].

The β -actin gene structures considered were those from cDNA primary structure sequence alignment and were compared with the shrimp *Perseus monodon* 1 and 2 "GeneBank accession nos. AAC78682, AAC78681", the lobster *Homarus americanus* "GeneBank accession no. AAK84871", *Artemia sp.* "GeneBank accession no. X52602" and *Daphnia magna* "Gene Bank accession no. CAB99474". The precursor alignments were carried out using the program CLUSTAL W [39] with a 0.05 gap station and gap window p 9.

2.7 Statistical analysis

The calculated cDNAs values in each group were normalized to the highest number of the set. Results were assessed by fitting a single cosine function to the meted least squares; this analysis adjusts the data to a sinusoidal function and provides an objective test of whether the amplitude of the rhythm differs from zero. The cosine function used was: $y = M + A \cos(x + f)$, where y is the variable measured, M is the mesor (mean value of the rhythmic profile), A is the amplitude of the rhythm, x is the time of the day (expressed in radians, where 24 h = π rad) and f is the phase angle. A coefficient of determination (r^2) for nonlinear functions was used as an index of cosinor rhythmicity. Analysis of the data was done using the software ORIGIN.

3. RESULTS

3.1 Product of DNA amplification

The RPCH gene from *C. quadricarinatus* was amplified with primers #1 and #2 (Table 1). The range of sizes covered by the amplification products was between 100 bp to 1500 bp. With these substrates, a nested PCR of RPCH was performed utilizing the primers #1 and #3. This new PCR reaction gave two well defined DNA bands with lengths of 177 bp, for both *C. sapidus* (Fig 1A, lane 3; control) and *C. quadricarinatus* (Fig 1A, lane 4) and 650 bp for the cryfish (Fig 1A, lane 4). The primary sequence of the *C. quadricarinatus* 177 pb RPCH fragment has 98% identity to the *C. sapidus* RPCH DNA "Bankit accession no. AF031654". The 650 bp DNA fragment was non-specific. A sample mixture of total RNA plus primers #4 and #5 was made and an aliquot was used for 5' RACE. The cDNA reaction product has 380 bp in length (Fig 1B), and it is 92% identical to the *C. sapidus* DNA primary sequence for the pre-pro-peptide of the RPCH endoplasmic reticulum signal structure (Fig 2A). For 3' RACE primer #6 was used. Three DNA fragments of 400 bp, 560 bp and 590 bp were obtained (Fig 1C). The first two fragments do not correspond to RPCH; the 400 bp cDNA fragment is 98% identical to ribosomal protein L-23 from *H. sapiens* "Bankit accession no. 633162" and the 560 bp cDNA is 60% and 57.3% identical to the PDH mRNA of the shrimps *M. japonicus* "GeneBank accession no. AB073367" and *P. vannamei* "GeneBank accession no. Y117231", respectively. Surprisingly, the conceptual translation of this fragment is identical to a human DNA sequence located in chromosome 1 "GeneBank accession no. 15131847", and 50% homologous to the Hipertrehalosemic hormone of the cockroach *B. discoidalis*, "GeneBank accession

no. Q17128", suggesting that the 560 bp fragment may represent a new member of the RPCH/AKH family "Bankit accession no. 633102". The third 590 bp fragment is 88% identical to the active peptide and to the last portion of the related peptide cDNAs of the RPCH from *C. sapidus* [9] and *C. maenans* [7] (Fig 2A; Fig 3). Its conceptual translation gives rise to the 8 amino acids of the RPCH, followed by the endopeptidase-sensitive KR dipeptide, the RPCH related peptide and the cysteine in position 83 (Fig 2A) involved in dimerization and common to all precursors of the AKH/RPCH family. When all sequences are joined, an mRNA of 645 bp is obtained, "Bankit accession no. 625501", in which the first 111 bp belong to the 5'-UTR, followed by the 210 bp of the ORF and ending at the 300 bp of the 3'-UTR (Fig 2A). It should be pointed out that for unclear reasons, amplification of the complete ORF of the RPCH was not possible, but amplification from codon 13 to the stop codon, renders the expected 242 bp cDNA product (Fig 4). The conceptual translation of this cDNA fragment corresponds to the amino acid primary sequence of the *C. quadricarinatus* RPCH precursor which is 70% homologous to that of *C. sapidus* [9] and *C. maenas* [7].

The β -actin primers #10 and #11 (Table 1) amplified a DNA segment of 165 bp (Fig 1, lane 2) that is 92% homologous to the *P. clarkii* protein sequence. With the primers for 5' and 3' RACE reactions (#12 and #10, respectively) two PCR products were obtained: the first one of 515 bp for the 5' end, and the second one of 748 bp for the 3' end (results not shown). The primers #13 and #14 were used to amplify the 1135 bp β -actin ORF (Fig 4A). The first 13 nucleotides correspond to the 5'-UTR region, the nucleotides 10-12 are the AUG translation initiation codon and the

conceptual ORF has 378 codons in length (Fig 2B). The ORF conceptual translation reveals a protein of 377 amino acids with the 3 universal actin proteic signs, namely, actin1, the actin-related protein sequence, and actin2, in positions 55-65, 106-118 and 358-366, respectively (Fig 2B). Two possible sites of polyadenilation are detected, in positions 1159 - 1165 and 1171 - 1177 (Fig 2B), "GeneBank accession no. AY430093".

3.2 Changes in RPCH and β -actin mRNA concentration.

The presence of RPCH and β -actin mRNAs was searched for by RT-PCR amplification in different organs like the medulla, the hepatopancreas, the gallnuts and the muscle of *C. quadricarinatus*. It was important to verify our method of RNA extraction by detecting those mRNAs in the 3h RNA samples. Since by chance, in anyone time point, the amount of these mRNAs could be normal, low or absent, we first search for them in a 24 h small pool mixture of the 3h RNA sample collection of each organ. As expected, the results show cDNA fragments of 242 and 1135 bp for RPCH and β -actin, respectively (Figs 4A and 4B). The specificity of the assay is shown in the same figures: the RPCH mRNA is detected, exclusively, in the ocular eyestalk, even after 35 cycles of amplification (Fig 4A), whereas the β -actin mRNA is present in all organs. On the other hand, it was important for the semi-quantitative RT-PCR measurements to determine the number of rounds needed for the quantification curve to reach the midpoint of the exponential phase. They were 27 and 20 for the RPCH and β -actin mRNAs, respectively. The eyestalk chronograms of the amount of mRNA after normalization are shown in Fig 5. For β -actin, the coefficient of determination of non-linear functions (r^2) by Cosinor analysis indicates a non-sigmoidal distribution that has a value of 0.080, in animals exposed to 12:12 h

cycles of light/dark (Table II; Figs 5A and 5B). A similar analysis of β -actin mRNA, for animals kept in continuous darkness, is 0.048. Since it is considered that Cosinor values below 0.05 are not significant, it can be concluded that the β -actin mRNA does not have significant cyclic modifications throughout the light/dark schedules or in continuous darkness. On the other hand, Cosinor analysis of the experimental mRNA data for RPCH gives an r^2 of 0.49, a period value of 23.68 h, amplitude of 11.75 an acrophase length of 9.57 h and its minimal point was at 21 h (Table II). These numbers are consistent with the notion of circadian rhythmic cycles of 12:12 light/dark (Table II; Fig 5C). In contrast, when the animals were kept in continuous darkness the mRNA concentration for RPCH was bimodal (Table II; Fig 5D) with an r^2 value of 0.59 and periods every 7.26 h that reach maximum values at 9 h (14.00 h real time) and 15 h (20.00 real time) after the initiation of the cycle. The acrophase and the minimal point were at 15.9 h and 21 h respectively. The amplitude was 28.83 and shows an increment of 2.46 compared to the light/dark cycle (Table II). Therefore in continuous darkness a pattern of ultradian cycles, instead of circadian cycles, is obtained.

4. DISCUSSION

Experimental evidence has been gathered on the association between RPCH and its rhythmical concentration oscillations in the eyestalk peduncle of the crayfish [28, 30], its circadian clock function [31], its regional distribution and immunological localization [4], its content in the sinus gland from which it is released to the hemolymph [30], and its liberation by single XO peptidergic neurons co-cultured with tegumentary erythrocytes [5]. However, little is known on the regulation and biosynthesis of RPCH at the DNA/RNA level, mainly, because primary sequences of these nucleic acids in the crayfish are largely unknown. In fact, the β -actin and RPCH cDNA sequences described in this paper are the first ones, as far as we know, to be reported for the crayfish *C. quadricarinatus* and many other crustacean species. The nucleic acid similitude between *C. quadricarinatus* and other crustaceans and insects can be established after comparison of the RPCH and β -actin cDNA sequences to those of the AKH/RPCH family. So, primary cDNA sequence comparison of the β -actin of *C. quadricarinatus* to the same molecule of the shrimp *Penaeus monodon* "GeneBank accession no. AAC78682.1", the lobster *Homarus americanus* "GeneBank accession no. AAK84871.1", *Daphnia magna* "GeneBank accession no. CAB99474.1" and *Artemia sp.* "GeneBank accession no. S11450" gave identities of 94%, 87%, 88%, 86%, respectively (Fig 3). In the same context, the estimated identity of the *C. quadricarinatus* RPCH precursor to that of the AKH I and II of the crickets *S. gregaria* and *S. nitans*, the AKH I of *L. migratoria* and the AKH III of *L. migratoria* and *D. melanogaster*, is about 61.7 %, 48 %, 41% and 36 % respectively (Fig 3). Interestingly, the predicted peptide of the *C. quadricarinatus* 590

bp cDNA RPCH fragment (Fig 3D) has 50% homology to the Hypertrehalosemic hormone of the cockroach *B. discoidalis*, "Banckit accession no. 633102". In contrast, the RPCH translatable product of the 242 bp cDNA fragment from *C. quadricarinatus*, shows low homology to the crab RPCH from *C. sapidus* and *C. maenas*, which can be explained by the fact that the former has 20 amino acids less, 7 in the signal peptide and 17 in the related peptide (Figs 2A and 3).

Altogether, the release of RPCH from the sinus gland to the hemolymph [30], the activity of this neurohormone, tested by bioassay, as a mean to identify RPCH secreting neurons responsible for inducing retraction of erithrophores [5] and the oscillations of the RPCH mRNA (Fig 5C and 5D), indicate RPCH secretion. Although we have no experimental evidence on the influence of E boxes in the transcription/translation RPCH mRNA control mechanisms, as evidence for neuropeptide regulation by means of the main clock genes, an indirect evidence of this influence is the expression of the RPCH mRNA molecule that changes from light/dark circadian cycles to bimodal dark ultradian cycles (Fig 5C and 5D). Therefore, RPCH is entrained by light since the cells have not been exposed to another Zeitgeber. The electroretinogram response is dose-dependent in RPCH injected *P. clarkii* crayfish, where the threshold dose of the neurohormone is 5 times higher than that for light adapted animals [10]. Accordingly, the results of this work show that the amplitude of this change in *C. quadricarinatus* is 2.45 greater in the dark than in the light (Fig 5C and 5D), similar to the response of *P. clarkii* whose period length is also larger in the dark [30]. At the molecular level, the RPCH content is around 2 times higher in animals kept in constant darkness than in animals exposed to light/dark cycles (Fig 5A and B), similar to previous findings of this

laboratory [30-31]. In summary, the role so far demonstrated for RPCH in the circadian cycle is of an output molecule [40].

In the basal membrane of the ocular peduncle of the crayfish *P. clarkii*, immunopositive molecules similar to PER have been recently reported [31]. Although the PER protein itself must be demonstrated, it is very likely that the main pacemakers of the circadian clock are present not only in *P. clarkii* but also in *C. quadricarinatus* and in all crustacean decapods.

The timing schedule for tissue sample collection is important. We found that 4 h schedules for tissue sampling, instead of every 3 h, results in patterns of circadian cycles, both in light/dark schedules and in total dark schedules (results not shown). The RPCH mRNA is not the only one that behaves circadianly in *C. quadricarinatus*. Modulation of 18S rRNA and G3PDH mRNA, which change from ultradian to circadian cycles, has been recently detected in our laboratory (Martinez-Perez et al. manuscript in preparation). It will be interesting to correlate which neurons generate the circadian oscillation and if they are the same ones that control RPCH biosynthesis.

5. AKNOWLEDGMENTS

The authors thank Dr. Ramón Alvarado-Alvarez for critical reading of this manuscript and to Ch. I. José Francisco-Vázquez and M. S. Julio Prieto Sagredo for their advice in statistic analysis. Part of this work was supported by Grants 39691-M (to J. V.) and 38645-N (to H. A.) from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (México) and PAPIIT/UNAM/IN200701-3 (to H. A.)

6. REFERENCES

- [1] Hanumante M, Fingerman M. Roles of 5-hydroxytryptamine and dopamine as neurotransmitters eliciting release of erythropotrophic hormones in the filder crab, *Uca pugilator*. Life Sci 1982;31:2667-72.
- [2] Rao RK, Fingerman M. Regulation of release and mode of action of crustacean chromatophorotropins. Amer Zool 1983;23:517-27.
- [3] de Kleijn DP, Linck B, Klein JM, Weidemann WM, Keller R, van Herp F. Structure and localization of mRNA encoding a pigment dispersing hormone (PDH) in the eyestalk of the crayfish *Orconectes limosus*. FEBS Lett 1993;321:251-5.
- [4] Rodriguez-Sosa L, Calderon J, Becerra E, Arechiga H. Regional distribution and immunocytological localization of red pigment concentrating hormone in the crayfish eyestalk. Gen Comp Endocrinol 1994;95:443-56.
- [5] Alvarado-Alvarez R, Becerra E, Garcia U. A high-resolution in vitro bioassay to identify neurons containing red pigment concentrating hormone. J Expt Biol 1999;202:1777-84.
- [6] Preciado M, Tsutsumi V, Arechiga H. Ultrastructural features of neurosecretory cells in the medulla externa of the crayfish eyestalk. Gen Comp Endocrinol 1994;95:432-42.
- [7] Link B, Klein J, Mangerich S, Keller R, Weidemann WM. Molecular cloning of crustacean red pigment concentrating hormone precursor. Biochim Biophys Res Comm 1993;195:807-13.
- [8] Fernlund P, Josefsson L. Crustacean color change hormone: amino acid sequence and chemical synthesis. Science 1972;177:173-5.

- [9] Klein J, Mohrherr C, Sleutels F, Jaenecke N, Richm J, Rao RK. A highly conserved red pigment concentrating hormone precursor in the blue crab *Callinectes sapidus*. *Biochem Biophys Res Commun* 1995;212:151-8.
- [10] Garfias A, Rodriguez-Sosa L, Arechiga H. Modulation of crayfish retinal function by red pigment concentrating hormone. *J Exp Biol* 1995;198:1447-54.
- [11] Porras MG, Lopez-Colome AM, Arechiga H. Red pigment-concentrating hormone induces a calcium-mediated retraction of distal retinal pigments in the crayfish. *J Comp Physiol* 2001;187:349-57.
- [12] McNamara JC, Ribeiro MR. The calcium dependence of pigment translocation in freshwater in shrimp ovarian chromatophores. *Biol Bull* 2000;198:357-66.
- [13] Frixione E. Firm structural associations between migratory pigment granules and microtubules in crayfish retinula cells. *J Cell Biol* 1983;96:1258-65.
- [14] O'Shea M, Rayne RC. Adipokinetic hormones: cell and molecular biology. *Experientia* 1992;48:430-8.
- [15] Mordue W, Stone JV. Comparison of the biological activities of an insect and crustacean neurohormone that are structurally similar. *Nature* 1976;264:287-9.
- [16] Martinez-Perez F, Becerra A, Valdes J, Zinker S, Arechiga H. A possible molecular ancestor for Mollusc APGWamide, Insect Adipokinetic Hormone, and crustacean Red Pigment Concentrating Hormone. *J Mol Evol* 2002;54:701-14.
- [17] Rayne RC, O'Shea M. Reconstitution of adipokinetic hormone biosynthesis in vitro indicate steps in pheromone processing. *Eur J Biochem* 1994;219:781-9.
- [18] Fischer-Lougheed J., O'Shea M, Cornish I, Losberger C, Roluet E, Schulz-Aellen MF. AKH biosynthesis: transcriptional and translation control of two co-localised prohormones. *J Exp Biol* 1993;177:223-41.

- [19] Gade G, Aurswald L, Simek P, Marco HG, Kodrik D. Red pigment-concentrating hormone is not limited to crustaceans. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;309:967-73.
- [20] Bojerd J, Kooiman FP, Pijneburg MAP, Hekking LHP, Oudejans RCHM, Van der Horst DJ. Molecular cloning of the three distinct cDNAs, each encoding a different adipokinetic hormone precursor of the migratory locus *Locusta migratoria*. *J Biol Chem* 1995;270:23038-43.
- [21] Schulz-Allen MF, Roulet E, Fisher Loughheed J, O'Shea M. Synthesis of a homodimer neurohormone precursor of locus adipokinetic hormone studies by in vitro translation and cDNA cloning. *Neuron* 1989;2:1369-73.
- [22] Noyes BE, Schaffer MH. The structurally similar neuropeptides adipokinetic hormones I and II are derived from similar, very small mRNAs *J Biol Chem* 1990;265:483-9.
- [23] Lewis DK, Jezierski MK, Keeley LL, Bradfield JY. Hypertrehalosemic hormone in a cockroach: molecular cloning and expression. *Mol Cell Endocrinol* 1997;130:101-8.
- [24] Bradfield JY, Keeley LL. Adipokinetic hormone gene sequence from *Manduca sexta*. *J Biol Chem* 1989;264:12791-93.
- [25] Noyes BE, Katz FN, Schaffer MH. Identification and expression of the *Drosophila* adipokinetic hormone gene. *Mol Cell Endocrinol* 1995;109:133-41.
- [26] Arechiga H, Fernandez-Quiroz F, Fernandez de Miguel F, Rodriguez-Sosa L. The circadian system of crustaceans. *Chronobiol Int* 1993;10:101-8.
- [27] Arechiga H, Rodriguez-Sosa L. Coupling of environmental and endogenous factors in the control of rhythms in decapod crustacean. *J Mar Ass (UK)* 1997;77:17-29.

- [28] Rodriguez-Sosa L, de la Vega MT, Vergara P, Arechiga H. Seasonal rhythm of red pigment concentrating hormone in the crayfish. *Cronobiol Int* 1997;14:639-45.
- [29] Uribe I, Rodriguez-Sosa L, Arechiga H. Diurnal patterns of electrical activity in the crayfish neurosecretory cells. *Biol Rhythm Res* 1998;29:453-63.
- [30] Rodriguez-Sosa L, de la Vega T, Arechiga H. Circadian rhythm of content of red pigment concentrating hormone in the crayfish eyestalk. *Comp Biochem Physiol* 1994;109:1-9.
- [31] Arechiga H, Rodriguez-Sosa L. Circadian clock function in isolated eyestalk tissue of crayfish. *Proc Soc Lond Biol Sci* 1998;265:1819-23.
- [32] Wu Q, Chen M, Buchwald M, Phillips RA. A simple, rapid method for isolation of high quality genomic DNA from animal tissues. *Nucleic Acids Res* 1995;23:5087-8.
- [33] Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987;162:156-9.
- [34] Sewall A, McRae S. RNA isolation with TRIzol reagent. *Focus* 1998;20:36.
- [35] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning a Laboratory Manual*. Second edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989;vols1-2.
- [36] Crandall KA, Harris DJ, Fetzner JW Jr. The monophyletic origin of freshwater crayfish estimated from nuclear and mitochondrial DNA sequences. *Proc R Soc Lond Biol Sci* 2000;22:1679-86.
- [37] Martinez-Perez F, Valdes J, Zinker S, Arechiga H. The genomic organization of the open reading frame of the red pigment concentrating hormone gene in the blue crab *Calinectes sapidus* 2002;23(4):781-6.

- [38] Kang, WK, Naya, Y. Sequence of the cDNA encoding an actin homolog in the crayfish *Procambarus clarkii*. *Gene* 1993;133:303-4.
- [39] Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence weithing, position specific gap penalties and weighting matrix choise. *Nucleic Acid Res* 1994;22:4673-80.
- [40] Cheng MY, Bullock CM, Li C, Lee AG, Bermak JC, Belluzzi J, Weaver DR, Leslie FM, Zhou QY. Prokineticin 2 transmits the behavioural circadian rhythm of the suprachiasmatic nucleus. *Nature* 2002;417:405-10.

¹This work is dedicated to the memory of Dr. Hugo Aréchiga.

SUMMARY

The cDNAs of the RPCH and β -actin from the crayfish *Cherax quadricarinatus* were amplified, cloned and sequenced. The primary structure sequences of the cDNAs were compared to other members of the AKH/RPCH family. Fluctuations in the amount of each one of the messengers were quantified by RT-PCR. The cosinor rhythms index of the β -actin mRNA tend to give a straight line in periods of 48 h. In contrast, the same index for the mRNA of RPCH gives a sinusoidal function indicating circadian rhythmical cycles of 12:12 h light/dark and ultradian cycles in constant darkness.

KEYWORDS

Crayfish; crustacean; *Cherax quadricarinatus*; RPCH gene; β -actin gene; neurohormone; neuropeptide; circadian rhythm; ultradian rhythm.

LEGENDS TO FIGURES

Fig. 1. Agarose gel electrophoresis of DNA products. A. Control of genomic DNA amplification for β -actin (lane 2) and RPCH from *Callinectes sapidus* (lane 3) and nested DNA stretch for *Cherax quadricarinatus* (lane 4). B. 5' RACE (lane 2) and C 3' RACE (lane 2) reactions of the 177 bp RPCH product. Numbers at left are lambda *Hind*III (A) and DNA ladder length markers (B and C) and at right are DNA base pairs (bp). m = marker; β A = β -actin; c = control.

Fig. 2. A. RPCH *C. quadricarinatus* cDNA primary structure. The first 87 nucleotides correspond to the 5' UTR sequence. Signal peptide, (nucleotides 88-150), active peptide (nucleotides 151-177) and related peptide (nucleotides 184-357). The underlined letters indicate the upper #8 and lower #9 primers. The italic underlined letters denote the polyadenylation signal. The conceptual translation amino acids are indicated and the neuropeptide hormone is in bold italic letters. B. β -actin. The first 12 nucleotides are the 5' UTR sequence. Nucleotides in capital letters show the ATG initiation codon followed by the rest of the primary sequence up to the stop codon in nucleotide 1144. The 3' non-translated region (nucleotide 1145 and thereafter) is in small letters. The two possible sites of polyadenylation (nucleotides 1159-1164 and 1171-1176) are shown in underlined-italic small letters. The upper #15 and lower #16 primers are in capital letters and underlined. The universal actin proteic signs of the conceptual translation polypeptide: actin1 (amino acids 55-65), actine-related protein sequence (amino acids 96-119) and actin2 (amino acids 357-365), are in bold-underlined letters.

Fig. 3. The *C. quadricarinatus* RPCH-precursor amino acid composition (in bold letters) and other known AKH/RPCH family members are compared. The cysteine needed for dimmer formation is in italics and underlined. * stands for conserved amino acids.

Fig. 4. Agarose gel electrophoresis of the ORF region for the RPCH-precursor and β -actin. A. *C. quadricarinatus* RT-PCR amplification of the eyestalk (E), the gallnuts (G), the hepatopancreas (H) and the muscle (M) substrates for 27 (lanes 2, 4, 7) or 35 cycles (lanes 3, 5, 6) (primers #8 and #9). B. RT-PCR amplification for 27 cycles (primers #13 and #14). Left side numbers are DNA ladder markers (m) and at the right side are base pairs (bp).

Fig. 5. β -actin (A, B) and RPCH precursor (C, D) cDNA relative concentration. *C. quadricarinatus* exposed to 12:12 h cycles of light/dark for 2 days (A and C) or to absolute darkness for 3 (B) and 16 (D) weeks. The intensity and length size (bp) of each one of the experimental cDNA bands in the gel is shown above each graph. Numbers above the gel photograph stand for real time and numbers in the abscissa stand for time after the experiment began. Depict daytime is in clear rectangles and absolute darkness in black rectangles. Lines between squares are experimental data. Continuous lines are the calculated cosinor values.

Table I

Primer	Name	Sequence	mRNA	GeneBank
1	upRPCHcs	5' GTC TCG GCT CAG CTT AAC TTC TC 3'	RPCH	AF031654
2	lpRPCHcs	5' GGC CTC GCT CCT GAT AAG TCG 3'	RPCH	AF031654
3	lpipRPCHcs	5' CTC AGC CCA GGT ACT CCT CAT C 3'	RPCH	AF031654
4	lprace5RPCHeq	5' ACG AAG GAT GGC ATG AGG AAG GGC 3'	RPCH	This work
5	lp5RPCHeq	5' ACC CCT GCC GGG GGA GAA GTT AAG CTG 3'	RPCH	This work
6	uprace3RPCHeq	5' CAG CTT AAC TTC TCC CCC GGC TGG GG 3'	RPCH	This work
7	uporfRPCHeq1	5' CCA AGA ATG GTC CGC GGC AGT 3'	RPCH	This work
8	uporfRPCHeq2	5' CTG GTG GCC TCC TCC TGC GTC TC 3'	RPCH	This work
9	lporfRPCHeq	5' CGC ATT TAA CCC ATG TAT TCT TCT TCC 3'	RPCH	This work
10	upACpc	5' GCT GTG CTG TCC CTG TAC G 3'	β -Actin	D14612
11	lpACpc	5' GAT CTT CAT GAG GTA GTT GG 3'	β -Actin	D14612
12	uprace5ACcq	5' ACG AAG GAT GGC ATG AGG AAG GGC 3'	β -Actin	This work
13	uporfACcq	5' CAT GTG TGA CGA AGA GGA GCT G 3'	β -Actin	This work
14	lporfACcq	5' TTA GAA GCA CTT GCG GTG GAC G 3'	β -Actin	This work
15	upACcq	5' GAC TGA GCG TGG CTA CTC CTT CAC 3'	β -Actin	This work
16	lpACcq	5' GAC TCG TCG TAC TCC TCC TTG GTG 3'	β -Actin	This work
17	uprRNA18	5' CGA AAC CGC AAA CTG CTC ATT AAA CC 3'	rRNA 18S	AF235966
18	lprRNA18	5' CTT CCT CTA AAT GAC CAA GTT TGG AC 3'	rRNA 18S	AF235966
19	lprace3polit	5' GCG GCC GCA TGC TTA TAA TTA ATC (T) ₂₄ 3'	-----	This work
20	lpoltcutrace3	5' GCG GCC GCA TGC TTA TAA TTA ATC 3'	-----	This work

Table II

RNA	CONDITION	r^2	MESOR	AMPLITUDE	ACROPHASE	PERIOD
RPCH	LIGHT/DARK	0.49	82.24	11.75	9.57	23.68
RPCH	DARK	0.59	63.30	28.83	15.9	7.26
β -ACTIN	LIGHT/DARK	0.08	94.14	-1.01	14.28	---
β -ACTIN	DARK	0.048	82.65	2.85	0	---

A

```

ctctgcaggcagcatccagcgtggtccagcaacaggcagcatcgactgcactcccttcggttaccacacactc      72
      Met Val Arg Gly Ser Val Ala Leu Leu Leu Val Val Leu Val      14
accagagtgccaaga ATG GTC CGC GGC AGT GTA GCC CTC CTG CTG GTG GTA CTG GTG      129

Ala Ser Ser Cys Val Ser Ala Gln Leu Ans Phe Sex Pro Gly Trp Gly Lys Arg      32
GCC TCC TCC TGC GTC TCC GCC CAG CTT AAC TTC TCC CCC GGC TGG GGC AAA CGG      183

Thr Gly Thr Ala Ala Gly Gly Pro Asp Gln Thr Ile Leu His Ser Ser Ser Pro      50
ACC GGT ACC GCG GCT GGG GGA CCT GAC CAG ACC ATC CTC CAC TCA TCC TCT CCC      237

Ala Ala Val Ala Ser Asp Asn Cys Gly Thr Ile Pro Val Ser Ala Val Met His      68
GCA GCC GTA GCC AGC GAC AAC TGC GGC ACA ATC CCC GTC TCA GCC GTC ATG CAC      291

Ile Tyr Arg Leu Ile Arg Thr Gle Ala Ala Arg Leu Val Gln Cys Gln Glu Glu      86
ATC TAC AGG CTT ATT AGG ACT GAA GCA GCG AGA CTT GTA CAG TGT CAG GAA GAA      345

Glu Tyr Met Gly *
GAA TAC ATG GGT TAA atgcgacacccccaccactaccactaccagcaaccaccatcaccaccacta      91
ccactaccagcaaccactctcgtcttagctaccagctgtgacagtcacactgctgtggttagttccccaggtc      411
ttccccctgaacacaagagatgtctcccatcgtcttctctctcccttctggcccagtggtgggctggggtta      483
gcctctcctggaattcatatatttttctcgtctttcggaaactcgtggggtggacaactggaatcagaagtg      555
ttggaatgatgaataacat      627
6

```

Figure 2A.

TOP ↑

Francisco Martinez-Perez et al.

B

Met Cys Asp Glu Glu Glu Leu Thr Ala Leu Val Val Asp Asn Gly Ser Gly	17
cgaactaccatc ATG TGT GAC GAA GAG GAG CTG ACT GCC CTT GTG GTC GAC AAT GGC TCC GGC	63
Leu Cys Lys Ala Gly Phe Ala Gly Asp Asp Ala Pro Arg Ser Val Phe Pro Ser Ile Val	37
CTT TGC AAG GCC GGC TTC GCC GGA GAC GAC GCT CCC CGT TCT GTC TTC CCC TCC ATC GTC	123
Gly Arg Ala Arg His Gln Gly Val Met Val Gly Met Gly Gln Lys Asp Ala <u>Tyr Val Gly</u>	57
GGC CGC GCC CGT CAC CAG GGT GTG ATG GTC GGT ATG GGT CAG AAG GAC GCC TAT GTT GGC	183
<u>Asp Glu Ala Gln Ser Lys Arg Gly</u> Ile Leu Thr Leu Asn Tyr Pro Ile Glu His Gly Ile	77
GAT GAG GCC CAG AGC AAG CGT GGT ATC CTC ACC CTC AAC TAC CCC ATT GAA CAC GGT ATC	243
Ile Thr Asn Trp Asp Asp Met Glu Lys Ile Trp Tyr His Thr Phe Tyr Asn Glu Leu Arg	97
ATC ACC AAC TGG GAT GAC ATG GAG AAG ATC TGG TAC CAT ACT TTC TAC AAT GAG CTC CGT	303
Val Ala Pro Glu Glu Ser Pro Thr <u>Leu Leu Thr Glu Ala Pro Leu Asn Pro Lys Ala Asn</u>	117
GTT GCC CCC GAG GAG TCC CCC ACA CTT CTC ACT GAG GCT CCC CTC AAC CCC AAG GCC AAC	363
<u>Arg</u> Glu Lys Met Thr Gln Ile Met Phe Glu S Phe Asn Val Pro Ala Thr Tyr Ile Thr	137
CGT GAG AAG ATG ACT CAG ATC ATG TTC GAG TCC TTC AAT GTA CCT GCC ACT TAC ATT ACC	423
Ile Gln Ala Val Leu Ser Leu Tyr Ala Ser Gly Arg Thr Thr Val Leu Val Cys Asp Ser	157
ATC CAG GCT GTG CTC TCC CTC TAC GCC TCT GGT CGT ACC ACT GTT CTG GTG TGC GAC TCT	483
Gly Asp Gly Val Thr His Met Val Pro Val Tyr Glu Gly Phe Ala Leu Pro His Ala Ile	177
GGT GAT GGT GTC ACT CAC ATG GTC CCC GTG TAT GAA GGT TTC GCC CTT CCT CAT GCC ATC	543
Leu Arg Leu Asp Leu Ala Gly Arg Asp Leu Thr Gln Tyr Leu Met Lys Ile Met Thr Glu	197
CTT CGT CTT GAC CTT GCT GGT CGT GAC CTG ACC CAG TAT CTC ATG AAG ATC ATG ACT GAG	603
Arg Gly Tyr Ser Phe Thr Thr Thr Ala Glu Arg Glu Ile Val Arg Asp Ile Lys Glu Lys	217
CGT GGC TAC TCC TTC ACC ACC ACA GCT GAG CGT GAG ATT GTC CGT GAC ATC AAG GAG AAG	663
Leu Cys tyr Ile Ala Leu Asp Phe Glu Asn Glu Met Asn Val Ser Ala Ala Ser Ser Ser	237
CTT TGC TAC ATT GCC CTT GAC TTC GAG AAT GAG ATG AAT GTA TCT GCA GCT TCT TCG TCT	723
Ile Asp Lys Ser Tyr Glu Leu Pro Asp Gly Gln Val Ile Thr Ile Gly Asn Glu Arg Phe	257
ATT GAC AAG TCC TAC GAG CTT CCC GAC GGT CAG GTC ATC ACC ATT GGT AAT GAA CGC TTC	783
Arg Cys Pro Glu Ala Leu Phe Gln Pro Ser Phe Leu Gly Met Glu Ser Ala Gly Val His	277
CGT TGC CCC GAG GCT CTG TTC CAG CCT TCC TTC CTT GGT ATG GAA TCT GCT GGT GTT CAT	843
Glu Thr Val His Ser Ser Ile Met Arg Cys Asp Ile Asp Ile Arg Lys Asp Leu Phe Ala	297
GAA ACC GTC CAC AGC TCC ATC ATG AGG TGC GAC ATT GAC ATC AGG AAG GAC CTG TTC GCC	903
Asn Ile Val Met Ser Gly Gly Thr Thr Met Tyr Pro Gly Ile Ala Asp Arg Met Gln Lys	317
AAC ATT GTC ATG TCT GGT GGT ACC ACC ATG TAC CCT GGT ATT GCT GAC CGC ATG CAG AAG	963
Glu Ile Thr Ala Leu Ala Pro Ala Thr Ile Lys Ile Lys Ile Ile Ala Pro Pro Glu Arg	337
GAA ATC ACT GCT CTG GCT CCT GCT ACC ATC AAG ATC AAG ATC ATT GCT CCT CCC GAG CGT	1023
Lys Tyr Ser Val Trp Ile Gly Gly Ser Ile Leu Ala Ser Leu Ser Thr Phe Gln Thr Met	357
AAG TAC TCC GTC TGG ATC GGT GGT TCC ATC CTG GCC TCT CTG TCC ACC TTC CAG ACC ATG	1083
<u>Trp Ile Thr Lys Glu Glu Tyr Asp Glu</u> Ser Gly Pro Gly Ile Val His Arg Lys Cys Phe	377
TGG ATC ACC AAG GAG GAG TAC GAC GAG TCC GGC CCA GGC ATC GTC CAC CGC AAG TGC TTC	1143
*	378
TAA atactcgatcgg <u>aataaat</u> ggtttt <u>aataaac</u> tgttttcgaatacga	1192

Figure 2B . TOP ↑ Francisco Martinez-Perez et al.

```

AKH2 S.gre MRQSCALTLMLVVAVCA---ALSAAQLNFSTGWG-----RRYADPNA----- 39
AKH2 S.nit MRQGCALTLMLLVVCA---ALSAAQLNFSTGWG-----RRYADPNA----- 39
AKH2 L.mig MTQSCTLTLLVAVLA---ALATAQLNFSAGWG-----RRYADPNA----- 39
AKH  S.gre MVQRCLVVALLVVVAA---ALCSAQLNFTPNWGT-----GKRDAADFG----- 41
AKH  S.nit MVQRCLVVALLVVVAA---ALCSAQLNFTPNWGT-----GKRDAADFG----- 41
AKH  L.mig MVQRCLVVALLVVVAA---ALCSAQLNFTPNWGT-----GKRDAADFA----- 41
RPCH C.mae MVRRTGVTLLVVALVVVALVSSVSAQLNFSPGWG-----KRAAAGSGSSGGVGEA 50
RPCH C.sap MVRRTGVTLLVVALVVVTLMSVSAQLNFSPGWG-----KRAAAGSGSNGGVGEA 50
RPCH C.qua MVRGS-VALLVVLVAS---SCVSAQLNFSPGWG-----KRTGTAAG-----GPD 41
AKH  M.sex MYKLT-VFLMFIAFVII----AEAQLTFTSSWG-----GKRAMTNS----- 36
AKH3 L.mig MQVRAVLVLAVVALVAV---ATSRAQLNFTPWGK-----RALGAPAAG----- 41
AKH  B.dis MNHLVKVLI VVVAIALVLC----EAQVNFSPGWG-----TGKRSAVQNS----- 40
AKH  D.mel MNPKSEVLIAAVLFMLLACV---QCQLTFSPDWGKR SVGGAGPGTFFETQQG----- 49
      *                               * * **

AKH2 S.gre -----DPMFLYKLIQIEARKLSGCSN----- 61
AKH2 S.nit -----DPMFLYKLIQIEARKLAGCSN----- 61
AKH2 L.mig -----DPMFLYRLIQIEARKLAGCSD----- 61
AKH  S.gre -----DPYSFLYRLIQAEARKMSGCSN----- 63
AKH  S.nit -----DPYSFLYRLIQAEARKMSGCSN----- 63
AKH  L.mig -----DPYSFLYRLIQAEARKMSGCSN----- 63
RPCH C.mae VSALHHSVGGAPGGVVPPGSSSSGDCGPIPVSAVMHIYRLIRNEAVRLVQCQDEEYLG- 110
RPCH C.sap VSGLHPSVGGAPGGVVPPGSSSP-GDCGPIPVSAVMHIYRLIRSEAVRLVQCQDEEYLG- 109
RPCH C.qua QTILHSSS-----PAAVAS---DNCGTIPVSAVMHIYRLIRTEAARLVQCQEEYMG--- 90
AKH  M.sex -----ISCRND--EAI AAIYKAIQNEAERFIMCQKN----- 65
AKH3 L.mig -----DCVSASPQALLSILNAAQAEVQKLDCSRFTSEANS 75
AKH  B.dis -----PCKGS-AESLMYIYKLVQNEAQKILECEKFSSN--- 72
AKH  D.mel -----NCKTS-NEMLLEIFRFVQSQAQLFLDCCKHRE----- 79
                                     *

```

Figure 3

TOP ↑

Francisco Martinez-Perez et al.

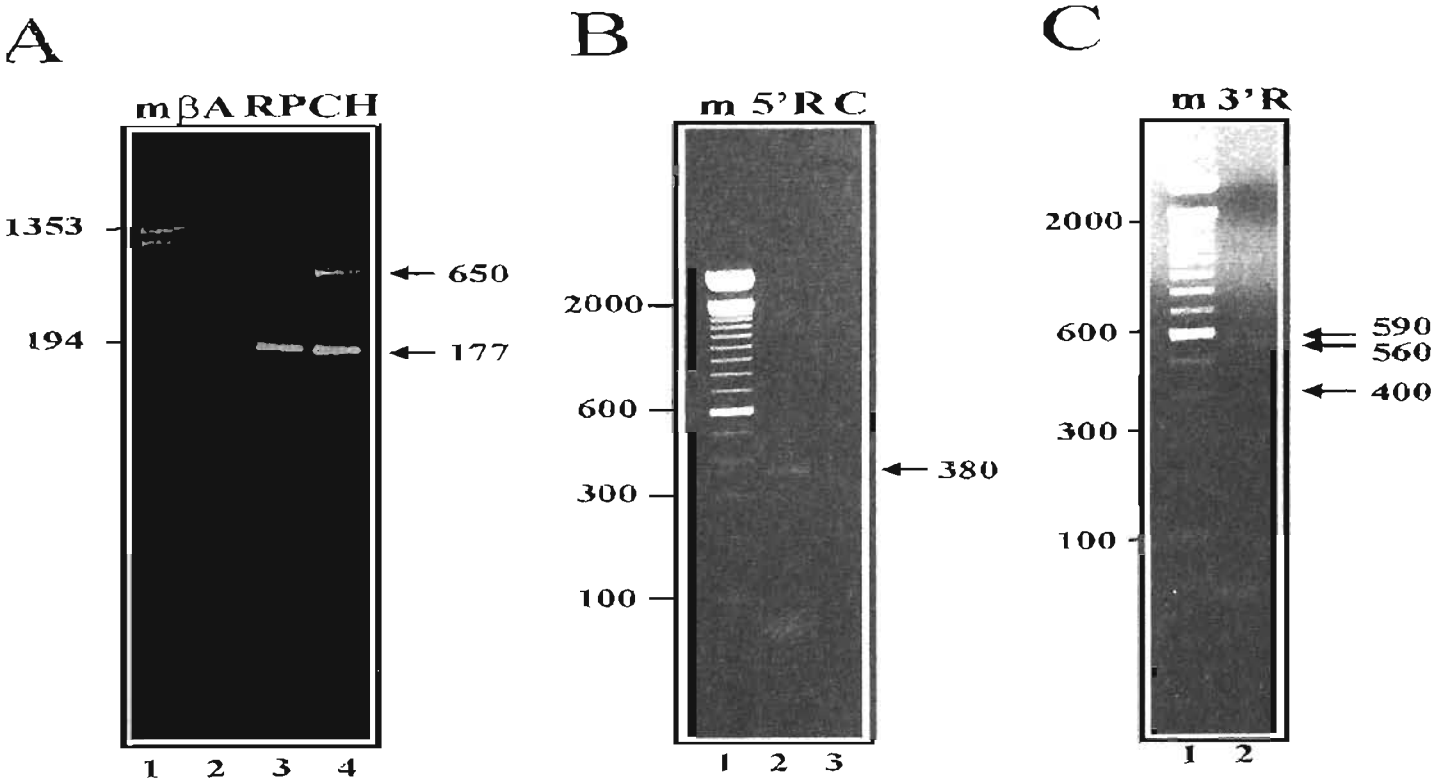


Fig 1

TOP ↑

Francisco Martinez-Perez et al

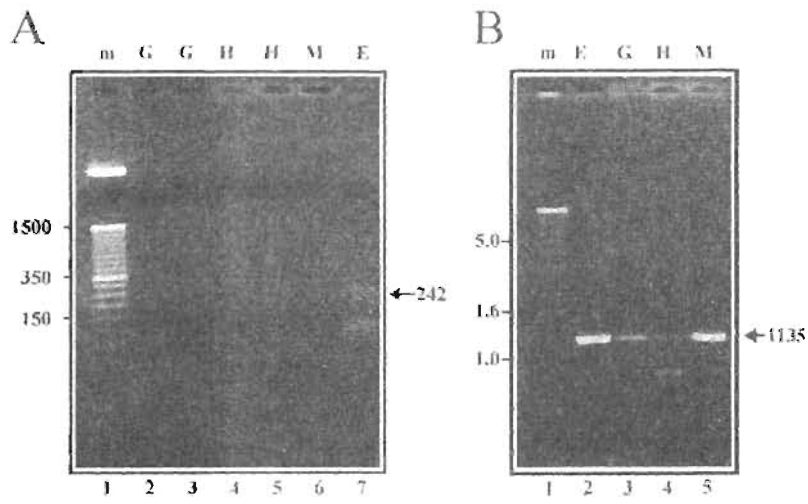


Fig 4

TOP ↑

Francisco Martínez-Perez et al.

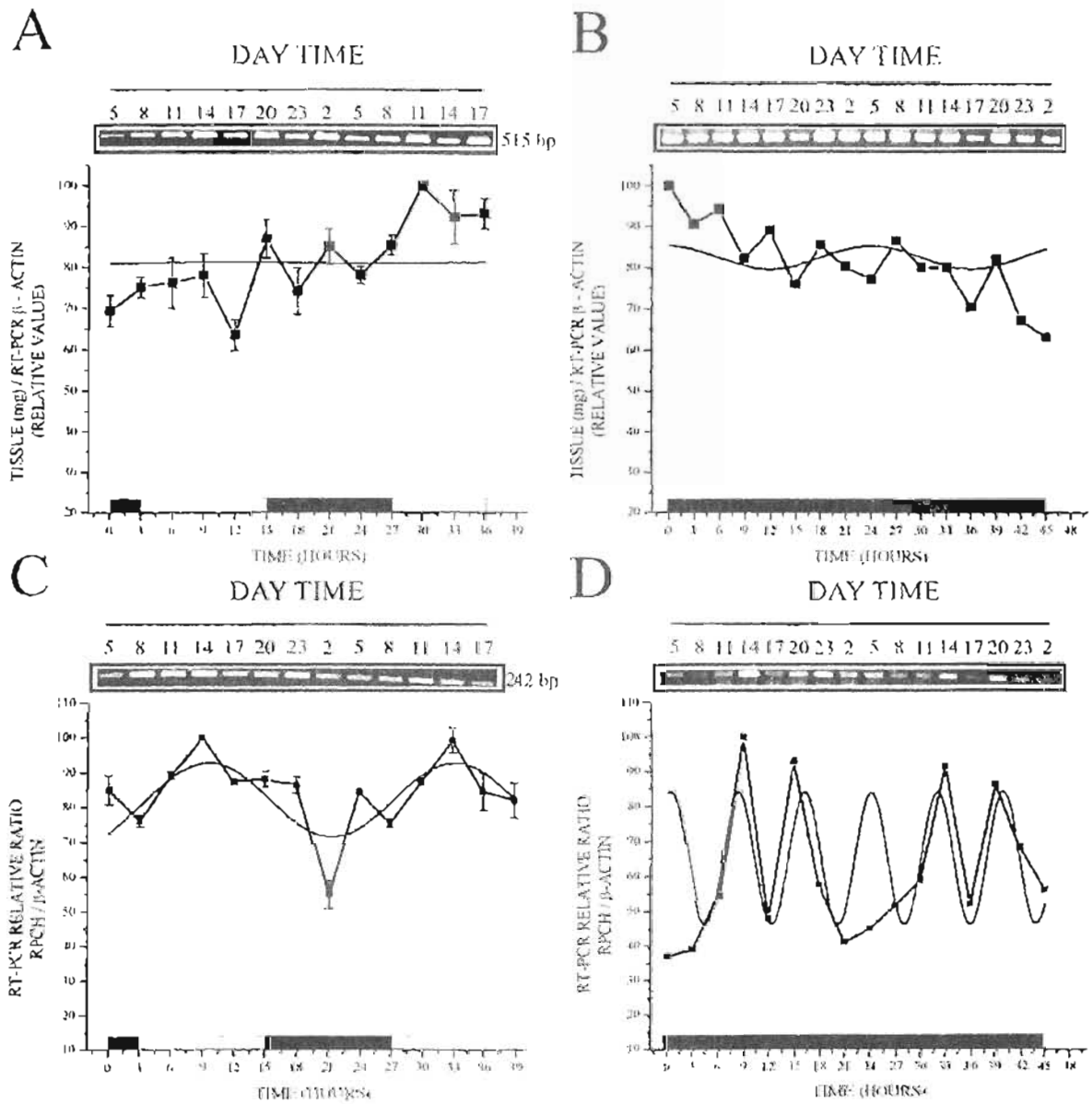


Fig 5

TOP ↑

Francisco Martinez-Perez et al.

LOCUS AY430093 1192 bp mRNA linear INV 01-JUN-2004
 DEFINITION Cherax quadricarinatus beta actin mRNA, complete cds.
 ACCESSION AY430093
 VERSION AY430093.1 GI:40887062
 KEYWORDS .
 SOURCE Cherax quadricarinatus

ORGANISM Cherax quadricarinatus
 Eukaryota; Metazoa; Arthropoda; Crustacea; Malacostraca;
 Eumalacostraca; Eucarida; Decapoda; Pleocyemata; Astacidea;
 Parastacoidea; Parastacidae; Cherax.

REFERENCE 1 (bases 1 to 1192)
 AUTHORS Martinez-Perez, F., Zinker, S., Aguilar, G., Valdes, J. and Arechiga, H.
 TITLE Diurnal changes of gene expression in eyestalk neurons of the
 crayfish Cherax quadricarinatus

JOURNAL Unpublished
 REFERENCE 2 (bases 1 to 1192)
 AUTHORS Martinez-Perez, F., Zinker, S., Aguilar, G., Valdes, J. and Arechiga, H.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (08-OCT-2003) Genetics and Molecular Biology, Centro de
 Investigacion y de Estudios Avanzados del I.P.N. Posgrado en
 Ciencias Biologicas Facultad de Ciencias Universidad Autonoma de
 Mexico, Av. Instituto Politecnico Nacional 2508, Mexico City, D.F.
 07360, Mexico

FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..1192
 /organism="Cherax quadricarinatus"
 /mol_type="mRNA"
 /db_xref="taxon:27406"
 5'UTR 1..12
 CDS 13..1146
 /codon_start=1
 /product="beta actin"
 /protein_id="AAR96459.1"
 /db_xref="GI:40887063"
 /translation="MCDFEELTALVVDNGSGLCKAGFAGDDAPRSVFPISVGRARHQG
 VMVGMGQKDAYVGDQAQSKRGIILNLNYPLEHGIITNWDMEKIWIYHTFYNELRVAPEE
 SPTLLTEAPLNPKANREKMTQIMFESFNVPATYITIQAVLSIYASGRITVVLVCDSDG
 VTHMVPVYEGFALPHAILRLDLAGRDLTQYILMKIMTERGYSPTTTAEREIVRDIKEKL
 CYIALDFENEMNVSAASSSIDKSYELPDCQVITIGNERFRCEALFQPSFLGMESAGV
 HETVHSSIMPCDIDIRKDLFANIVMSGGTTMYPGIADRMOKEITALAPATIKIKI IAP
 PERKYSVWIGGSILASLSLTFQTMWITKFEYDESGPGIVHRKCF"
 3'UTR 1147..1192
 polyA signal 1159..1165
 polyA signal 1171..1177

ORIGIN
 1 cgaactacca tcatgtgtga cgaagaggag ctgaactgcc ttgtggtoga caatggetcc
 61 ggccctttgca aggccggcctt cgcgcggagac gacgctcccc gttctgtctt ccctccate
 121 qtcggccqcg cccgtcacca gqgtgtgatg qtcqgtatgg gtcagaagga cgcctatggt
 181 ggcgatgagg cccagagcaa gegtqgtatc ctcaacctca actaccocat tgaacacggg
 241 atcatcacca actgggatga catggagaag atctggfacc atactttcta caatgagctc
 301 cgtggttccc ccgagggatc ccccacactt ctcaactgagg ctcccctcaa ccccaggcc
 361 aaccgtgaga agatgaactc gatcatgttc gaggcttca atgtaectgc cacttacatt
 421 accatccagg ctgtgtcttc cctctacgce tctggtctga ccactgttct ggtgqgegac
 481 tctggtgatg qtgtactca catggttccc gtgtatgaag gtttgcctt tctcatgac
 541 atccttctgc ttgaecttgc tggctcgtgac ctgaaccagt atctcatgaa gatcatgact
 601 gaggcgtgct actcttcaac caccacagct gagggtgaga ttgtccqfga catcaaggag
 661 aagctttgct acattgccc tgaactcag aatgagatga atgtatctgc agcttcttcg
 721 tctattgaca agtccctaca gcttcccagc ggtcaggtea taccatttgg taatgaacgc
 781 ttccggttgc ccgaggetct gttccagcct tcttcccttg gtatggaatc tgcctggtgt
 841 catgaaaccg tccacagctc catcatgagg tgcgacattg acatcaggaa ggacctgttc
 901 gccaacattg tcatgtctgg tggtaaccac atgtaccctg gtatttctga ccgcatgcag
 961 aaggaaatca ctgctctggc tcttctacc atcaagatca agatcattgc tctcccagag
 1021 cgtaagtaact ccgtctggat ccgtgggttc atcttggcct ctctgtccac ctccagacc
 1081 atgtggatca ccaaggagga gtacagcag tccggaccag gcatcgtcca ccgcaagtgc
 1141 ttctaaatac tccatcggaa taatgttct aataaactgt ttctgaatac ga

LOCUS AY430092 1120 bp mRNA linear INV 01-JUN-2004
 DEFINITION Cherax quadricarinatus glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase mRNA, complete cds.
 ACCESSION AY430092
 VERSION AY430092.1 GI:40887060
 KEYWORDS .
 SOURCE Cherax quadricarinatus
 ORGANISM Cherax quadricarinatus
 Eukaryota; Metazoa; Arthropoda; Crustacea; Malacostraca;
 Eumalacostraca; Eucarida; Decapoda; Pleocyemata; Astacidea;
 Parastacoidea; Parastacidae; Cherax.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 1120)
 AUTHORS Martinez-Perez, F., Zinker, S., Aguilar, G., Valdes, J. and Arechiga, H.
 TITLE Diurnal changes of gene expression in eyestalk neurons of the crayfish Cherax quadricarinatus
 JOURNAL Unpublished
 REFERENCE 2 (bases 1 to 1120)
 AUTHORS Martinez-Perez, F., Zinker, S., Aguilar, G., Valdes, J. and Arechiga, H.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (08-OCT-2003) Genetics and Molecular Biology, Centro de Investigacion y de Estudios Avanzados del I.P.N. Posgrado en Ciencias Biologicas Facultad de Ciencias Universidad Autonoma de Mexico, Av. Instituto Politecnico Nacional 2508, Mexico City, D.F. 07360, Mexico

FEATURES
 source Location/Qualifiers
 1..1120
 /organism="Cherax quadricarinatus"
 /mol_type="mRNA"
 /db_xref="taxon:27406"
 5'UTR 1..41
 CDS 42..1046
 /codon_start=1
 /product="glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase"
 /protein_id="AAR96458.1"
 /db_xref="GI:40887061"
 /translation="MSKIGINGFGRIGRLVLRALQNGAEVVAVNDPFIALDYMVYMPKYDSTIHGRFKGEVKEEDGALVVVNGHNIQVFNEMKPENI PWSKAGA EYIVKSTGVVETI DKAQAHTDGGAKKVI LSAPSADAPMFVVGVNLEAYDPSMKIVSNASCTTNCLAPLAKVINDNLEIVEGLMPTVHAVTATQKTVDGPSAKDWRGGRGAAQNI I PSSTGA AKAVGKVI PELNGKLTGMAFRVPTPDVSVVDLTVRLGNQCSYDDI KAAMKAASQGGLKGV LGYTFEDDVSSTDFDGVKSSIFDAKAGIQLSKTFVKVVSQWYDNEFGYSTRVIDLLKHMQRKVDGA"
 3'UTR 1047..1120
 polyA signal 1096..1102

ORIGIN
 1 gaatcctctc tgaacaacct gccaccatca ctaccaccat aatgtcgaag attggtatta
 61 atggattcgg ccgcatacgt ccgcttcttc tgggtgcgcg tcttcaaaat ggcgcagagg
 121 tgggtggcagt gaatgacccc ttcatttctc ttgactacat ggtgtacatg ttcaagtaag
 181 actctaccca tggccgcttc aagggggagg tgaaggaaqa ggalggagct ctggtggtca
 241 atgggcacaa caticaggtc ttcaatgaga tgaaccaga aaacattcca tggagcaagg
 301 ctggtgcaga atacattgtc aagtccactg gtgtgttcc cactattgac aaggcccagg
 361 ctacacattga tggaggagcc aagaaagtia tcatctctgc cccatctgct gatgcccca
 421 tgtttgttgt tggagtcacc ctggaagcat atgataccat catgaagatt gtttccaatg
 481 cttcttgca cccaactgc ctggctcttc tggctaaagt catcaatgac aacctgaaa
 541 ttgttgaggg ctgtatgacc acagtaaatg ctgttactgc taccacagaag actgtagatg
 601 gtccctctgc caaggattgy cglgggtggc gtgtgtctgc ccaaaacatc alcccatcat
 661 ccactggctg tcttaagcti gttggcaagg tcatccaga cctcaatgga aaattgacag
 721 gcatggcctt ccgtgtaacc actccagagc tctctgtgt agatctgaca gtcyggcttg
 781 gtaaccaatg ttcttatgat gacattwagg cagcgatgaa ggctgcttca cagggacccc
 841 tcaagggtgt cctgggttac accgaggatg acggtgtatc cactgacttc actggtgatg
 901 taccgactct tctctttgat gcaaaagctg gtatccagct gagcaagacc ttcgtaaagg
 961 tagtctcttg glatgataac gagtttggct attctacccg tglaatagat ctctcagc
 1021 acatgcagaa ggtggatggt gactaatatg tctggattgg ttccagctga aagtacgtga
 1081 aggcactggt ggatgaatga aagatgggta aaaaaaaaaa

Dear GenBank Submitter:

Thank you for your direct submission of sequence data to GenBank. We have provided GenBank accession numbers for your nucleotide sequences:

bankit625501	AY642684
bankit633102	AY642685
bankit633162	AY642686

We strongly recommend that these GenBank accession numbers appear in any publication that reports or discusses these data, as they give the community unique labels with which they may retrieve your data from our on-line servers.

We are now processing your submissions and will mail you copies for your review prior to their release to the public database.

You have requested that your data are to be held confidential until:

Jun 1, 2005

They will not be released to the public database until this date, or until the data or accession numbers appear in print, whichever is first.

Please send any revisions, including bibliographic information (e.g., conversion from unpublished to published), biological data (e.g., new features), or sequence data as text in the body of an email to:

gb-admin@ncbi.nlm.nih.gov

Since the flatfile record is a display format only and is not an editable format of the data, do not make changes directly to a flatfile. In addition, please do not use bold, highlighted, or colored edits and do not use attached files or spreadsheets for additional or revised data.

You may be interested to know that there are two GenBank submission tools available, BankIt and Sequin. BankIt is available through the World Wide Web (WWW), and Sequin, a stand-alone program, can be downloaded from NCBI's anonymous ftp site. You can access these submission tools through the NCBI Home Page (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

For more information about the submission process or the available submission tools, please contact GenBank User Support at info@ncbi.nlm.nih.gov or at (301) 496-2475.

Respectfully,

Michael Fetchko

The GenBank Direct Submission Staff
Bethesda, Maryland USA

.....
(301) 496-2475
(301) 480-2918 fax
gb-admin@ncbi.nlm.nih.gov (for updates/replies to GenBank entries)
info@ncbi.nlm.nih.gov (for general questions regarding GenBank)

LOCUS bankit625501 646 bp RNA linear INV 31-MAY-2004
DEFINITION Cherax quadricarinatus Red Pigment Concentrating Hormone precursor mRNA.

ACCESSION bankit625501

KEYWORDS .

SOURCE Cherax quadricarinatus.

ORGANISM Cherax quadricarinatus
Eukaryota; Metazoa; Arthropoda; Crustacea; Malacostraca;
Eumalacostraca; Eucarida; Decapoda; Pleocyemata; Astacidea;
Parastacoidea; Parastacidae; Cherax.

REFERENCE 1 (bases 1 to 646)

AUTHORS Martinez-Perez, F., Zinker, S., Aguilar, G., Valdes, J. and Arachiga, H.

TITLE unpublished

JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 646)

AUTHORS Martinez-Perez, F., Zinker, S., Aguilar, G., Valdes, J. and Arachiga, H.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (31 MAY 2004) Posgrado en Ciencias Biologicas Facultad de Ciencias; Departamento de Genetica y Biologia Molecular, Universidad Autonoma de Mexico; Centro de Investigacion y de Estudios Avanzados del I.P.N., Av. Instituto Politecnico Nacional 2508, Mexico, Distrito Federal 07360, Mexico

COMMENT Bankit Comment: The mRNA sequence of red pigment concentrating hormone precursor was obtained by RACE 5' and 3' from eyestalk of crayfish, *Cherax quadricarinatus*. The mRNA is from 12h light-dark cycle. Samples were taken each 3 hours.

FEATURES Location/Qualifiers
source 1..646
/organism="Cherax quadricarinatus"
/db_xref="taxon:27406"
mRNA 88..360
/gene="Red Pigment Concentrating Hormone"
gene <88..360
/gene="Red Pigment Concentrating Hormone"
CDS <88..360
/gene="Red Pigment Concentrating Hormone"
/note="Pre-pro- neuropeptide from the red pigment concentrating hormone; SIGNAL PEPTIDE 88-150 RED PIGMENT CONCENTRATING HORMONE 151-177 RELATED PEPTIDE FROM RED PIGMENT CONCENTRATING HORMONE 184-360"
/codon_start=1
/product="Red Pigment Concentrating Hormone Precursor"

/translation="MVRGVSALLLVLVASSCVSAQLNFSFGWVKRTGTAAGGPDQTI
LHSSSPAAVASDNCGTIPVSVMHIYRLIRTEAARLVQCQEEYMG"

polyA_site 639..643
/note "Putative polyA site"

BASE COUNT 143 a 216 c 146 g 141 t

ORIGIN

```
1 ctctgcaggc agcctccagc gtggctccagc aacaggccagc atcgactgca ctccctccgt
61 taaccacacac tcacccagag tccaagaatg gtcccgcgca gtgtagccct cctgctgggtg
121 gtaactgggtg cctcctcctg cgtctccgcc cagcttaact tctccccggg ctggggcaaaa
181 cggaccggta ccgcggtctgg gggacctgac cagaccatcc tccactcact ctctcccgca
241 gccgtagcca cggacaactg cggcacaate cccgtctcag ccgtcatgca catctacagg
301 ctatttagga ctgaagcagc gagacttgta cagtgtcugg aagaagnata catgggttaa
361 atgcgacacc cccaccacta ccactaccag caaccaccat caccaccact accactacca
421 gcaaccactc tcgtcttagc taccagctgg gagagtcaca ctgctgtggtt agttccccag
481 gtcttccctt gaacacaaga gatgtctccc atcgtcttcc tctccccctc tggcccagtg
541 gtgggctggg gtttagcctc tcttggaatt catatatttt tctcgtcttt cggaaactcg
601 tggggtggac aactggaatc agaagtgttg gaatgatgaa taacat
```

//

LOCUS bankit633102 359 bp RNA linear INV 31-MAY-2004
 DEFINITION Cherax quadricarinatus mRNA from Hypothetical Neuropeptide precursor from Hypertrehalosaemic neuropeptide.
 ACCESSION ;
 KEYWORDS .
 SOURCE Cherax quadricarinatus.
 ORGANISM Cherax quadricarinatus
 Eukaryota; Metazoa; Arthropoda; Crustacea; Malacostraca;
 Eumalacostraca; Eucarida; Decapoda; Pleocyemata; Astacidea;
 Parastacoidea; Parastacidae; Cherax.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 359)
 AUTHORS Martinez-Perez, F., Zinker, S., Aguilar, G., Valdes, J. and Arachiga, H.
 TITLE Unpublished
 JOURNAL Unpublished
 REFERENCE 2 (bases 1 to 359)
 AUTHORS Martinez-Perez, F., Zinker, S., Aguilar, G., Valdes, J. and Arachiga, H.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (31-MAY-2004) Posgrado en Ciencias Biologicas Facultad de Ciencias; Departamento de Genetica y Biologia Molecular, Universidad Nacional Autonoma de Mexico; Centro de investigacion y de Estudios Avanzados del I.P.N., Av. Instituto Politecnico Nacional 2508, Mexico, Distrito Federal 07360, Mexico
 COMMENT Bankit Comment: The sequence was obtained by RACE 3' from eyestalk of crayfish, Cherax quadricarinatus. The mRNA is from 12h light-dark cycle. Samples were taken each 3 hours.
 .
 FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..359
 /organism="Cherax quadricarinatus"
 /db_xref="taxon:27406"
 CDS <1..162
 /codon_start=1
 /product="Hypothetical neuropeptide precursor similar
 to
 Hypertrehalosaemic neuropeptide"
 /translation="ALQLNFSPGWGHTGRRGLPCSQLTSGSCRGRKGPFGGRODGLLS
 WVHPAHGRI"
 BASE COUNT 57 a 111 c 125 g 66 t
 ORIGIN
 1 gcccttcagc ttaacttctc ccccggtctg gggcacacag gaaggagggg cctgccctgc
 61 tcacagctga catctgggag ctgcaggggc agaaagggcc cgcctggggg tcgggacct
 121 gggctcttgt cctgggtcca cccagcccat ggtcgcatat gactctttcc ctccctgggg
 181 cccagttcat aactgcactg ggagggggag gagatggtga tgtctcaagg gggactcagg
 241 tatgacaagg ggccccctct atcttagcca tcaactccatg cccggggggc cgtggctggt
 301 cagcctcggg ccgcctcgtg cagctgtggc cggggacagg agccatgctg atgggccag
 //

LOCUS bankit633162 322 bp RNA linear INV 31-MAY-2004
DEFINITION Hypothetical protein similar to ribosomal protein L23.

ACCESSION ;
KEYWORDS .

SOURCE Cherax quadricarinatus.
ORGANISM Cherax quadricarinatus
Eukaryota; Metazoa; Arthropoda; Crustacea; Malacostraca;
Eumalacostraca; Eucarida; Decapoda; Pleocyemata; Astacidea;
Parastacoidea; Parastacidae; Cherax.

REFERENCE 1 (bases 1 to 322)
AUTHORS Martinez-Perez,F., Zinker,S., Aguilar,G., Valdes,J. and Arachiga,H.
TITLE Unpublish
JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 322)
AUTHORS Martinez-Perez,F., Zinker,S., Aguilar,G., Valdes,J. and Arachiga,H.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (31-MAY-2004) Posgrado en Ciencias Biologicas Facultad de
Ciencias; Departamento de Genetica y Biologia Molecular,
Universidad Nacional Autonoma de Mexico; Centro de Investigacion y
de Estudios Avanzados del I.P.N., Av. Instituto Politecnico
Nacional 2508, Mexico, Distrito Federal 07360, Mexico

COMMENT Bankit Comment: This sequence was obtained by RACE 3' from eyestalk
of crayfish, Cherax quadricarinatus. The mRNA is from 12h
light-dark cycle. Samples were taken each 3 hours.

FEATURES Location/Qualifiers
source 1..322
/organism="Cherax quadricarinatus"
/db_xref="taxon:27406"
CDS <3..302
/codon_start=1
/product="Hypothetical protein similar to ribosomal
protein L23"

/translation="PFGVRGRLDRLPAAAVGDIVAATVKKGGKPELRKKVHPAVVVRQRKPYRRKDGVFIYFEDNAGVI
VNNKGEMKGSAITGPVAKCADLWPRIASNAGSIA"

BASE COUNT 88 a 62 c 97 g 71 t 4 others
ORIGIN
1 cgccctttgg ggtaagaggg cggctggatc gtttgccctgc tgctgctggt ggcgacattg
61 tggcagccac agtaaagaag ggaaagccgg agctcaggaa aaaagtgcac cctgccgtag
121 ttgtgaggca gaggaagcct taccgtagga aggacggggg gttcatctac tttgaagata
181 atgctggggg catagttaac aataaaggag aaatgaaagg ctcagccatc actggcccag
241 tggctaagga gtytgctgac ttgtggccca ggattgcttc aaatgctggn tcaattgcat
301 aaattnacca ntnagaaaaa ac

//