

Caracterización de las Hormonas Hiperglucémicas de Crustáceos del camarón blanco *Litopenaeus vannamei*.

Elizabeth Ponce Rivas, Edna Sánchez Castrejón, Ma. Enriqueta Muñoz Márquez, Haydee López Rodríguez

CICESE. Departamento de Biotecnología Marina. Km. 107 carretera Tijuana-Ensenada. Ensenada, B.C. México 22860. Fax:(646)175-05-69. E-mail: eponce@cicese.mx

Palabras clave: neurohormonas, *L. vannamei*, CHH.

Introducción. La neurohormona hiperglucémica de crustáceos (CHH) es el miembro más abundante y mejor estudiado de la familia CHH/MIH/GIH. CHH tiene su principal función en el control de los niveles de glucosa en hemolinfa, aunque también tiene un papel importante en la regulación de la muda y reproducción (1).

En el presente trabajo se presenta el análisis estructural de Liv-CHH y de las isoformas Liv-CHH-SG1 y Liv-CHH-SG2 presentes en el pedúnculo ocular de *L. vannamei*. Asimismo, se presentan resultados obtenidos con relación a la clonación y expresión de las diferentes neurohormonas.

Metodología. El análisis estructural de los transcritos de Liv-CHH, así como Liv-CHH-SG1 y SG2 se llevó a cabo utilizando el programa DNASTAR. El DNAC de Liv-CHH, así como de las isoformas Liv-SG1 y SG2 fueron clonadas en *E. coli* y transfectadas en la levadura *Pichia pastoris* KM71 para ser expresadas bajo el control de un promotor de alcohol oxidasa (2). Las neurohormonas fueron detectadas por PAGE/Tricina-SDS y confirmadas por Western blot.

Resultados y discusión. Liv-CHH-SG1 y Liv-CHH-SG2 son isoformas producidas por corte y empalme alternativo del gen *chh* de *L. vannamei*. Liv-CHH-SG1 está formado por 4 exones y 3 intrones y Liv-CHH-SG2 por 3 exones y 2 intrones (Fig. 1).

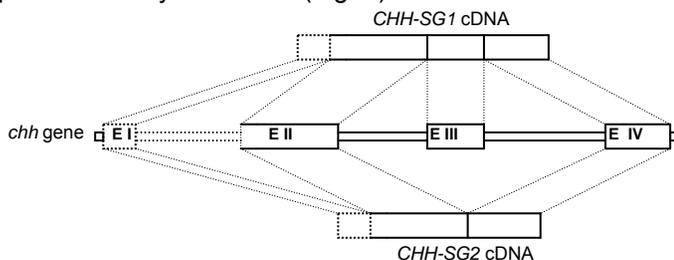


Fig. 1 Comparación de la estructura de la secuencia del gen *chh* y sus dos transcritos producidos por corte y empalme alternativo.

La isoforma SG1 tiene 73 aa y la SG2 74 aa. Ambas comparten los 40 primeros aa. La isoforma SG2 solo se transcribe en ciertas condiciones de estrés mientras que Liv-CHH y la isoforma SG1 han sido detectadas en diferentes condiciones de temperatura y salinidad. Por otro lado el gen que codifica para Liv-CHH es de 789 pb y presenta 2 exones y un intron y da lugar aun péptido de 74 aminoácidos.

Los cDNAs de los diferentes transcritos (Liv-CHH, Liv-CHH-SG1 y SG2) fueron clonados en *E. coli* en el vector pPICZαA. Las células de *P. pastoris* transfectadas con los diferentes vectores fueron asimismo analizadas por PCR y secuenciación para corroborar que el gen estuviera integrado al cromosoma de la levadura. En su región C-terminal contienen 22 aa del dominio de reconocimiento del anticuerpo anti-myc y la etiqueta de Histidinas (6X) para la purificación por una columna de afinidad. Las condiciones óptimas de inducción para Liv-CHH-SG1 fueron 4% metanol/día 1 (Fig. 2).



Fig. 2. Western blot de la proteína Liv-CHH-SG1 en diferentes concentraciones de MeOH/días. (1-2), 2% MeOH; (3), no inducido; (4), 0.5%/día 1; (5), 0.5%/día 2; (6), 2%/día 1; (7), 2%/día 2; (8), 4% /día 1; (9), 4%/día 2.

Liv-CHH-SG2 está en proceso de ser expresada. Los resultados de RT-PCR y western blot muestran que la neurohormona Liv-CHH se está produciendo pero no está siendo secretada al medio de cultivo.

Conclusiones. *L. vannamei* presenta al menos 3 diferentes CHH's en el pedúnculo ocular. Dos de ellas son isoformas por corte y empalme alternativo del gen *chh* y la tercera proviene de otro gen *chh* diferente. Estas neurohormonas fueron clonadas y están siendo expresadas en *Pichia* para poder determinar su actividad biológica.

Agradecimiento. Proyecto Interno de CICESE y Proyecto Ciencia Básica CONACyT No. 82311.

Bibliografía.

- Böcking, D.; Dirckensen, H. y Keller, R. (2001) The crustacean neuropeptides of the CHH/MIH/GIH family: structure and biological activities. En: WIESE, K. ed. *The crustacean nervous system*. New York, NY., Springer Verlag, , p. 84-97.
- Cereghino, J.L. and Gregg, J.M. (2000). Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiol. Rev.*, 24(1):45-66.