

Aspectos biotecnológicos en larvas de "loco"

Biotechnological aspects in loco larvae

NIBALDO C. INESTROSA*, RODRIGO LABARCA, ALEJANDRA PERELMAN,
ELISEO O. CAMPOS, RICARDO ARANEDA, MAURICIO GONZALEZ,
ENRIQUE BRANDAN, JUAN PABLO SANCHEZ y ROBERTO GONZALEZ-PLAZA

Unidad de Neurobiología Molecular, Departamento de Biología Celular y Molecular,
Facultad de Ciencias Biológicas y Facultad de Medicina, P. Universidad Católica de Chile

The biology of planktotrophic larvae of *Concholepas concholepas* is the main bottleneck towards developing biotechnologies to rear this muricid. Data concerning planktonic larvae development, diets and environmental signals triggering larval settlement and recruitment is scarce. We have begun the study of the molecular and cell biology of embryos, larvae and recruits having as a final goal, the development of appropriate biotechnologies to rear this gastropod.

First, an inverse ratio between BuChE and AChE enzyme activities was established. This ratio may be a precise developmental marker for this species. Second, for the first time a phosphoinositide related regulatory pathway is reported in a muricid, opening a new approach to the biotechnological management of larvae. Third, the relation between sulfate in sea water and larval motility was studied. Concentrations below 125 μM sulfate decreases larval motility. The sulfate is incorporated in proteoglycans which participate in different developmental phenomena. Lastly, a genomic *Concholepas concholepas* DNA sequence, similar to that of a human growth hormone probe was detected. This is very interesting since growth factors are key molecules during development, growth and are involved in food conversion rates in fishes and also, a in variety of marine invertebrates.

La vida del molusco gastrópodo *Concholepas concholepas* es muy singular. Las hembras fecundadas depositan hasta 400 cápsulas por temporada, de las que eclosionan alrededor de 2×10^6 larvas velígeras con un tamaño aproximado de 270 μM . Las larvas se desarrollan hasta alcanzar un diámetro anteroposterior de 1.500-1.700 μM en un período entre 60-90 días. En esta etapa, señales ambientales específicas desencadenarían, al ser detectadas por receptores de membranas epiteliales, la transición plancton-bentos, con la subsecuente metamorfosis y reclutamiento en territorios inter y submareales. Este es el origen de las poblaciones naturales de "locos" que dan lugar a bancos de explotación (1, 2, 3, 4).

Concholepas concholepas ha sido, en la práctica, el gastrópodo de mayor valor socioeconómico en el Pacífico sudoeste.

Esto mismo ha ocasionado una sobreexplotación intensa y eficiente que desembocó en una veda por 2 años en todo el país. Se consideró que ésta era la única alternativa para salvar esta especie de su eventual extinción. Los esfuerzos para cultivar en forma controlada este gastrópodo se han topado con la larga vida planctónica del estado larval. En efecto, no se ha logrado conseguir un número significativo de larvas competentes necesarias para iniciar el cultivo masivo de juveniles (5). Vale decir, no ha sido posible mantener larvas planctónicas hasta el estado competente en el cual las larvas reconocen las instrucciones moleculares ambientales existentes en los sitios de reclutamiento.

La obtención de un número adecuado de larvas competentes para iniciar programas de repoblamiento y cultivo es, sin lugar a dudas, el problema a resolver. Nuestro trabajo de investigación implica usar biotecnologías en dos aspectos prin-

* A quien debe dirigirse la correspondencia.

cipales: el primero, consiste en determinar y usar las señales que definen la transición plancton-bentos de las larvas competentes y, segundo, identificar y utilizar factores de crecimiento para mejorar la eficiencia de conversión de las dietas con las que se alimentan las larvas.

Para lograr lo anterior hemos comenzado la búsqueda de marcadores moleculares del desarrollo que nos permitan definir señales inductoras del asentamiento. En especial, estudiamos la ontogenia de las colinesterasas, enzimas de sistemas neuronales, como alternativa para definir un índice bioquímico de desarrollo, la regulación de los fosfoinositoles que controlan importantes rutas metabólicas y el metabolismo del ion sulfato y macromoléculas sulfatadas; hemos también analizado secuencias de ADN genómico del "loco" con el objeto de detectar secuencias similares a factores de crecimiento.

MATERIALES Y METODOS

Obtención y mantención de larvas de C. concholepas

Las cápsulas fueron obtenidas en el submareal y mantenidas en condiciones de laboratorio como se ha descrito previamente (4). Los embriones fueron obtenidos por disección de las cápsulas y las larvas se obtuvieron luego de la eclosión espontánea de las cápsulas.

Obtención de AChE y BuChE. Electroforesis en geles de poliacrilamida

Las enzimas acetilcolinesterasa (AChE; E.C. 3.1.1.7) y butirilcolinesterasa (BuChE; E.C. 3.1.1.8) fueron extraídas de embriones, larvas velíferas y reclutas de *C. concholepas*.

Estos fueron homogeneizados (1:5, p/v) en Tris-HCl 50 mM y Tritón X-100 al 0,5%, en presencia de una mezcla de inhibidores de proteasas (6). El homogeneizado se centrifugó a 14.000 rpm durante 15 minutos a 4°C. Los ensayos enzimáticos se realizaron en los sobrenadantes, mediante un método colorimétrico (7). Para el ensayo de AChE se utilizó como sustrato yoduro de acetiltiocolina 0,75 mM y para BuChE, yoduro de butiriltiocolina 10 mM. Como inhibidor específico de la AChE se usó BW 284c51 (10 µM) y para la BuChE se usó tetraisopropilfosforamida (0,1 mM) (isoOMPA).

Las electroforesis se realizaron en geles de poliacrilamida al 7,5% en una cámara horizontal a 4°C durante una hora a 100 volts y luego 4 horas

a 150 volts de acuerdo a Toutant (8). Al finalizar la corrida los geles se incubaron en fosfato de sodio 0,2 M; pH 7,0 e isoOMPA 10^{-4} M o BW 10^{-5} . Las actividades enzimáticas se visualizaron por un método histoquímico (9), en presencia de los sustratos e inhibidores respectivos.

Metabolismo de fosfoinositoles

El estudio del metabolismo de los fosfoinositoles fue realizado de acuerdo a la metodología de Berridge (10); aproximadamente 1.500 larvas de *C. concholepas* fueron incubadas en 650 µl de agua de mar filtrada, con 10 µl de H³-mioinositol durante 2 horas a temperatura ambiente. Luego de la incubación las larvas fueron lavadas tres veces con agua de mar filtrada y homogeneizadas. La extracción de lípidos se realizó con 1,5 ml de CHCl₃/MetOH/HCl (10:200:1 v/v), se agitó y se agregaron 450 µl de CHCl₃ y 450 µl de agua de mar. La separación de la fase orgánica de la acuosa se obtuvo por centrifugación a 4.000 rpm durante 5 minutos. Para la separación cromatográfica de los fosfoinositoles se diluyeron 1,6 ml de la fase acuosa a 8 ml, previa neutralización con borato, los que se cargaron en una minicolumna (Bio-Rad, Richmond, Ca.) que contenía 1 ml de Dowex 1-X8 (100-200 mesh) en la forma formato. Las columnas fueron lavadas con 10 ml de agua destilada para remover restos de mioinositol, marcado no incorporado. El inositol-1-fosfato (IP) fue eluido con 6 ml de formato de amonio 0,2 M en ácido fórmico 0,1 M; el inositol-1,4-fosfato (IP₂) con 6 ml de formato de amonio 0,4 M en ácido fórmico 0,1 M y el inositol-1,4,5-fosfato (IP₃) fue eluido con 6 ml de formato de amonio 1 M en ácido fórmico 0,1 M (11). Volúmenes de 2 ml de los distintos eluidos se colocaron en mezcla de centelleo y la radiactividad se determinó en un contador de centelleo Beckmann LC 100.

Efecto de sulfato en la movilidad larval

En placas de Petri de 14 cm de diámetro se incubaron 25 a 50 larvas por 10 minutos en agua de mar artificial con sulfato 125 µM o 25 mM (concentración normal del agua de mar). Luego de la incubación se estimó el número de larvas presentes a 3,0 cm de diámetro del centro de la placa como, asimismo, las que se encontraban entre los 3,0 cm y el borde de la placa.

Incorporación de sulfato en larvas velíferas

Larvas velíferas (500-1.500) se incubaron en agua de mar artificial sin sulfato y con 10 µCi de sulfato-S³⁵ de sodio más distintas concentraciones de sulfato frío. A diferentes tiempos las larvas se lavaron y precipitaron con 1,5 de ácido tricloroacético (TCA) al 12% a 4°C, por 6 horas. Luego se centrifugaron a 14.000 rpm por 10 minutos. El sobrenadante fue descartado y el precipitado se resuspendió en 1 ml de TCA y la centrifuga-

ción se repitió tres veces. Finalmente, la radiactividad fue determinada en los precipitados resultantes.

Construcción de una genoteca de *Concholepas concholepas*

El ADN cromosomal fue extraído del pie de juveniles de *C. concholepas* (12). El precipitado final se resuspende en Tris-HCl 10 mM (pH 7,5) y EDTA 1 mM, recuperándose aproximadamente 0,5 mg de ADN por gramo de tejido muscular de pie. La calidad del ADN extraído fue evaluada dirigiéndolo con las enzimas BamHI, EcoRI y Hind III (13).

El ADN cromosomal fue digerido hasta un promedio de 1.000 a 2.000 pb, con la enzima MboI. La ligación de los fragmentos de ADN cromosomal se realizó con el vector BlueScript KS de Stratagene (13, 14), linearizado con BamHI, y removidos los grupos fosfatos del extremo 5' con fosfatasa alcalina (13). En la ligación se utilizó una proporción de ADN cromosomal, respecto del vector, de 3:1, utilizando ADN ligasa del fago T₄. La mezcla de ligación (1 µg/ml de ADN ligado), evaluada mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% y teñidos con bromuro de etidio (1 µg/ml), se utilizó directamente para transformar células competentes XLI Blue (14, 15). El crecimiento de las células transformadas se realizó en la presencia de X-GAL-IPTG. Las colonias transformadas fueron analizadas mediante hidrólisis alcalina para comprobar si poseían los insertos. La genoteca fue guardada en 4 réplicas en filtros de nitrocelulosa (16). La detección de secuencias homólogas a hormona de crecimiento humana en colonias recombinantes se realizó mediante un análisis primario de la genoteca por hibridación con una sonda de la hormona, que contenía la totalidad (80%) del cADN, obtenida por doble digestión con EcoRI y Hind III del plasmidio pSP64-GH-HA (17). El fragmento correspondiente a la hormona de crecimiento (600 pb) fue aislado por electroforesis, eluido en acetato de amonio 0,5 M, pH 8 y marcado con dCTP-P³² (13), obteniéndose 10⁷ cpm/µg de ADN. Cada filtro conteniendo la genoteca fue hibridado y lo mismo se realizó con réplicas de colonias positivas. Estas fueron crecidas en placas y se obtuvieron sus réplicas y el ADN plasmidial purificado (13, 18).

RESULTADOS Y DISCUSION

Nuestro estudio tiene como objetivo efectuar un avance paralelo en áreas críticas de la biología de larvas y juveniles de *Concholepas concholepas*. Este trabajo tiene facetas que se unifican en una meta final que es obtener condiciones para inducir el asentamiento y reclutamiento de larvas competentes de este murícido.

1. Ontogenia de las colinesterasas

Las enzimas del tipo colinesterasa, especialmente la acetilcolinesterasa (AChE), están involucradas en la transducción de señales que median las sinapsis colinérgicas. En este contexto hemos analizado las formas moleculares de estas enzimas presentes en reclutas de *C. concholepas*. La Fig. 1 muestra una electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones no desnaturantes de la AChE y la butirilcolinesterasa (BuChE). Se puede observar que existen tanto formas tetraméricas (G₄) como diméricas (G₂) de la AChE (Fig. 1, carril A) y formas diméricas (G₂) de la BuChE (Fig. 1, carril B).

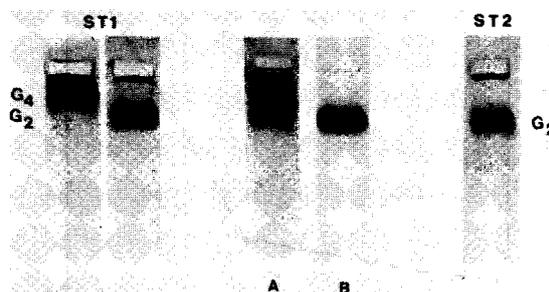


Fig. 1: Electroforesis de formas nativas de AChE y BuChE en *Concholepas concholepas* juvenil.

Alícuotas de un homogeneizado de un ejemplar de 1 cm (1:10 p/v; en Tris-HCl 50 mM (pH 7,0) y Tritón X-100 al 0,5%) se cargaron en geles de poliacrilamida en condiciones no desnaturantes. Las actividades de AChE y de BuChE se revelaron en los geles por la tinción de Karnovsky y Roots (1964).

ST 1: Estándar de las formas tetramérica G₄ y dimérica G₂ de AChE, obtenidas de cerebro de rata y de órgano eléctrico de *Discopyge tschudii*, respectivamente. A: Formas moleculares de AChE de *Concholepas concholepas* juvenil.

B: Formas moleculares de BuChE de *Concholepas concholepas* juvenil.

ST 2: Estándar de la forma dimérica G₂ de BuChE, obtenida de la fracción microsomal de hígado de rata.

Durante el desarrollo de *C. concholepas* hemos detectado que existe una relación inversa entre las actividades de AChE y BuChE. En efecto, la actividad de la BuChE aumenta precozmente desde el huevo hasta alcanzar niveles máximos en larvas prevelígeras y velígeras, manteniendo niveles similares después del asentamiento y reclutamiento del "loco" (Fig. 2A). Por otra parte, la actividad de la AChE aumenta lentamente alcanzando un máximo nivel en estados juveniles de 3 mm de diámetro

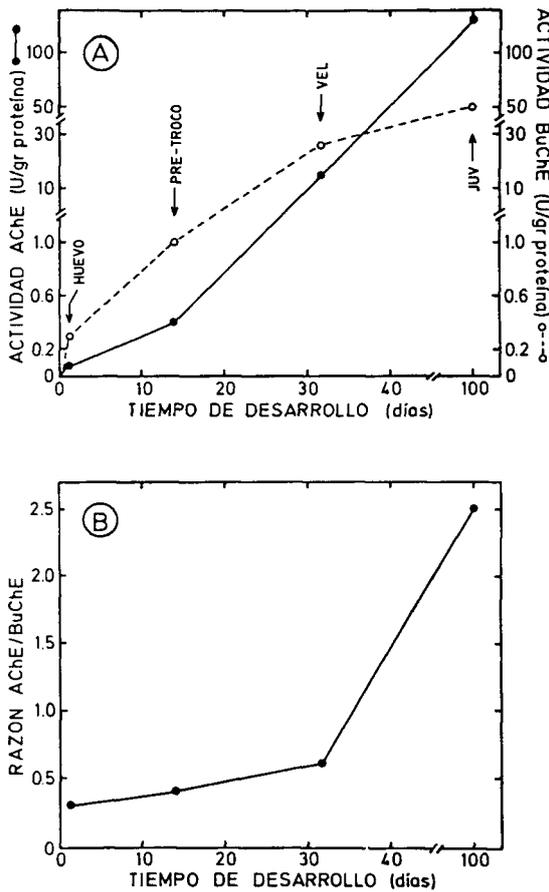


Fig. 2: Variaciones en AChE y BuChE durante el desarrollo de *Concholepas concholepas*.

A: Para los estados de huevo pretrocófora y velígera se homogeneizaron aproximadamente 8.000 individuos/ml en cada situación, en amortiguador Tris-HCl 50 mM (pH 7,0), Tritón X-100 al 0,5% e inhibidores de proteasas. Un juvenil de aproximadamente 1 cm de diámetro fue disectado y se homogeneizó (1:10, p/v) en el mismo amortiguador. En los homogeneizados se ensayaron, en triplicado, las actividades de AChE y de BuChE, en presencia de isoOMPA y BW, respectivamente.

B: Razón AChE/BuChE en función del desarrollo.

anteroposterior. Lo anterior nos permite sugerir que la razón AChE/BuChE podría ser un buen índice (Fig. 2B) para establecer un determinado estado de maduración del sistema nervioso de *Concholepas*, lo cual, a su vez, se correlaciona estrechamente con el estadio de desarrollo en que se encuentre el organismo.

2. Metabolismo de fosfoinositoles

Uno de los mecanismos utilizados por células para transducir información a través de sus membranas plasmáticas consiste en la

regulación de enzimas intracelulares, unidas a membranas, vía receptores de la superficie celular (19). Es probable que el desarrollo o parte del ciclo de vida de *Concholepas concholepas* esté mediado por alguno de estos mecanismos de regulación universales. Así, por ejemplo, en larvas del gastrópodo *Haliothis rufescens* se ha demostrado que GTP, diacilglicerol y ciertos diaminoácidos facilitan el asentamiento y la metamorfosis (20).

Hemos iniciado estudios del ciclo de fosfatidilinositol y su probable participación en alguna etapa del desarrollo de *Concholepas*. Nuestros resultados muestran que larvas velígeras de *C. concholepas* incorporan el precursor radiactivo (H^3 -mioinositol) (Fig. 3), lo que permite evaluar la presencia de inositol-1-fosfato (IP: 58%), inositol-1,4-difosfato (IP₂: 18%) e inositol-1,4,5-trifosfato (IP₃: 24%), este último es un conocido segundo mensajero que podría ser relevante en la fisiología del "loco".

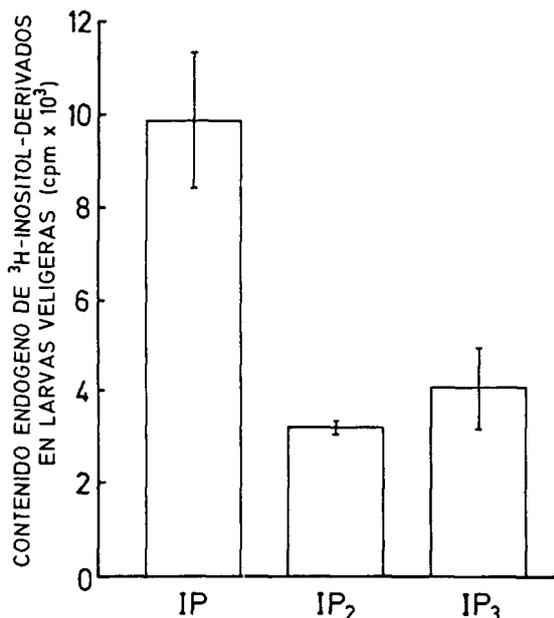


Fig. 3: Contenido endógeno de fosfoinositoles derivados de H^3 -mioinositol en larvas velígeras de *Concholepas concholepas*.

Las larvas velígeras fueron incubadas en presencia de H^3 -mioinositol, en agua de mar filtrada, durante dos horas, para, posteriormente, proceder a la extracción de lípidos, separación de la fase acuosa y separación cromatográfica de los metabolitos de fosfoinositoles marcados en una minicolumna de Dowex 1-X8, según la metodología de Berridge (1984).

Estos resultados demuestran la existencia del ciclo del fosfatidilinositol en larvas velíferas de *C. concholepas* y abren la posibilidad, que moléculas inductoras de asentamiento actúen a través de este mecanismo regulatorio.

3. Sulfatación y movilidad larval en *Concholepas*

La presencia de sulfato en el agua de mar produce un efecto notorio en la incorporación de sulfato radiactivo a macromoléculas precipitables con ácido (Fig. 4A). En contraste, prácticamente no hay efecto en la incorporación de metionina a proteínas sintetizadas *de novo*. Este resultado sugiere que la presencia de sulfato estimula la incorporación del ion de manera específica. En forma paralela hemos evaluado el efecto de la carencia de sulfato en la motilidad larval. Como se observa en la Fig. 4B, la preincubación de larvas velíferas en agua de mar carente de sulfato determina que las larvas se detengan, disminuyendo el movimiento ciliar del velo. Este fenómeno de inhibición de la capacidad natatoria es reversible, ya que las larvas recuperan su capacidad natatoria luego de retornarlas a agua de mar normal (2 horas). Parte del sulfato incorporado por las larvas se encuentra principalmente asociado a una familia discreta de proteoglicanos insolubles en detergente (4). La interrelación precisa entre estos proteoglicanos sulfatados y el efecto del ion sulfato en la capacidad natatoria no es clara. La tabla 1 muestra que la sulfatación aumenta 12 veces al comparar larvas velíferas con individuos en estado de blástula-gástrula. Un menor efecto es observado al evaluar la incorporación de metionina y glucosamina radiactivas durante etapas similares de desarrollo. Experimentos en progreso utilizando anticuerpos monoclonales contra proteoglicanos sulfatados sugieren que la aparición de éstos también estaría regulada en el desarrollo, observándose una expresión máxima del antígeno en estado de larva velífera, disminuyendo dramáticamente en reclutas (E. Brandan, resultados no publicados).

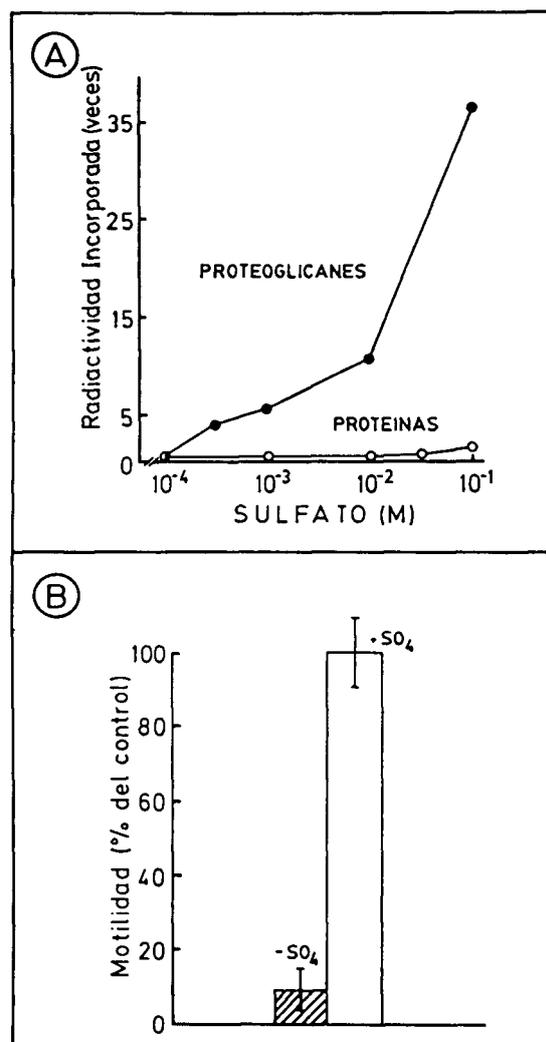


Fig. 4: Efecto de sulfato en la incorporación de SO_4^{35} a proteoglicanos y de S^{35} -metionina a proteínas y sobre la motilidad en larvas velíferas de *Concholepas concholepas*.

A: Las larvas velíferas se incubaron en agua de mar artificial, con $10 \mu\text{Ci}$ de sulfato- S^{35} y $10 \mu\text{Ci}$ de S^{35} -metionina, a las concentraciones de sulfato, indicadas en la figura. El material marcado se obtuvo por precipitación con TCA y resuspensión de los precipitados en $\text{NaOH } 1 \text{ N}$, a los que luego de neutralizarlos se les determinó la radiactividad.

B: La motilidad larval se determinó en grupos de 25-50 larvas velíferas, en placas de Petri, en agua de mar artificial, en presencia y en ausencia de sulfato (25 mM). A los 10 minutos se determinó el número de larvas entre los 3 cm y el borde de la placa.

4. Secuencias genómicas de factores de crecimiento

Un aspecto muy interesante, en términos de sus posibilidades futuras, es considerar el papel de factores de crecimiento en el

TABLA 1
Aumento de la sulfatación durante el desarrollo de
Concholepas concholepas

	Blástula- gástrula	Trocofora	Veliger
	(Veces de aumento)		
Sulfato-S ³⁵	1,0	6,0 ± 2,1	12,5 ± 2,6
Metionina-S ³⁵	1,0	N.D.	2,4
Glucosamina-H ³	N.D.	1,0	1,2

La incorporación de sulfato se realizó en cuatro experimentos distintos y el valor para blástula-gástrula fue de 219 ± 22 cpm/mg de proteínas (1,0). Todas las incubaciones se realizaron en agua de mar artificial con sulfato de 1 mM, durante 6 horas a temperatura ambiente. N.D. = No determinado.

desarrollo, crecimiento y utilización del alimento de larvas y juveniles de *Concholepas*.

Los factores de crecimiento son elementos regulatorios indispensables en el desarrollo y diferenciación de vertebrados e invertebrados (21). Usando una sonda que contiene 90% de la secuencia de la hormona de crecimiento humana, hemos detectado secuencias en el ADN del "loco" que hibridizan con la sonda. El ADN de *Concholepas concholepas* fue digerido y ligado al vector BlueScript K.S. (Fig. 5). El nuevo constructo fue usado para transformar *E. coli*, siendo la transformación establecida por crecimiento de las bacterias en

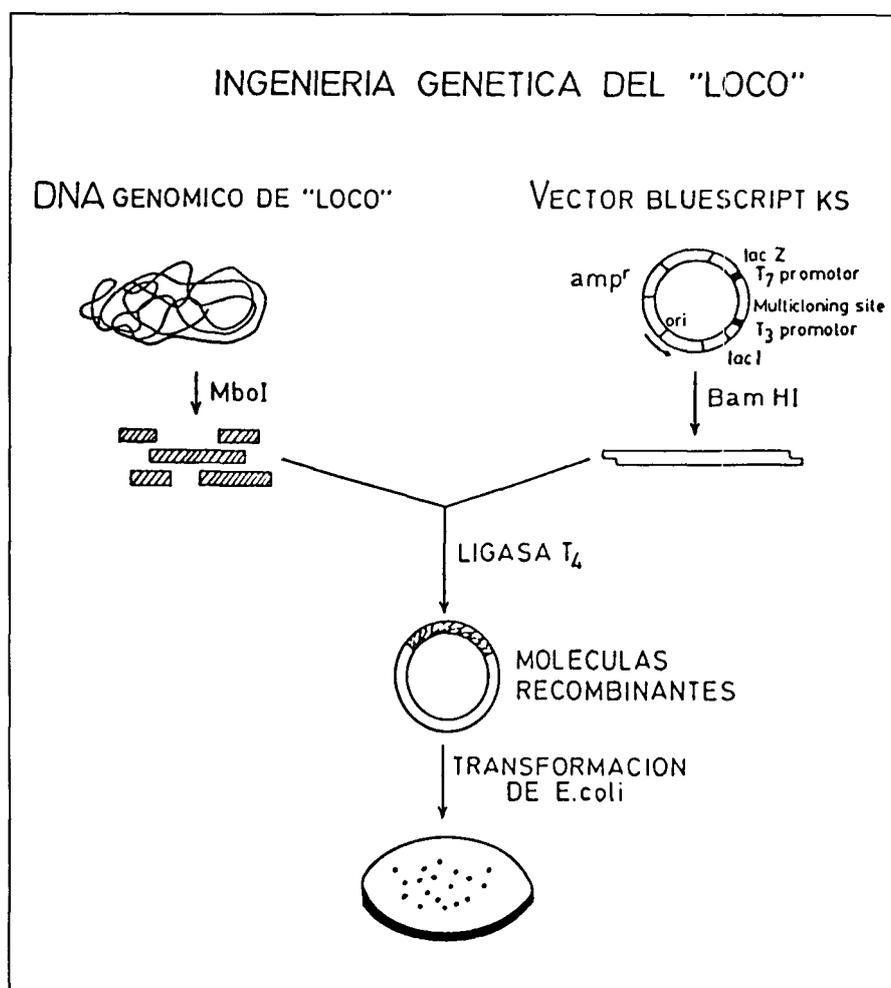


Fig. 5: Construcción de una genoteca de ADN genómico de *Concholepas concholepas*. El ADN fue digerido con MboI y ligado al vector BlueScript KS digerido con Bam HI. Moléculas recombinantes obtenidas con ligasa T-4 fueron usadas para transformar *Escherichia coli*. Las colonias recombinantes se detectaron por su resistencia a ampicilina y por hibridación con una sonda radiactiva de hormona de crecimiento humana.

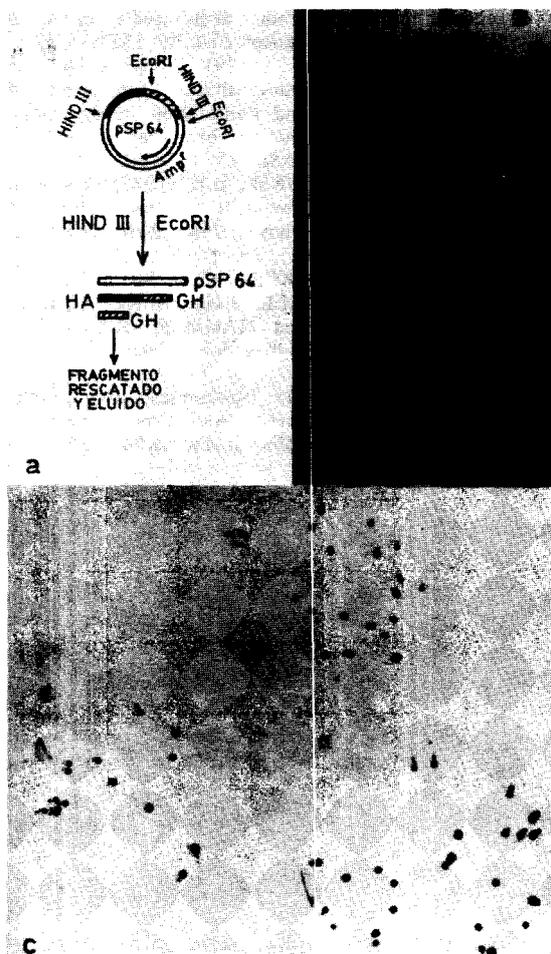


Fig. 6: Esquema, análisis y resultado de la hibridación del plasmidio pSP64 GH-HA conteniendo hormona de crecimiento con DNA de *Concholepas concholepas*.

A: Esquema del plasmidio pSP64 GH-HA.

B: Análisis del plasmidio pSP64 GH-HA por cortes con enzimas de restricción, en gel de agarosa al 1%.

Carril 1: ADN del fago Lambda digerido con Hind III.

Carril 2: ADN plasmidal, sobreenrollado, de pSP64 GH-HA.

Carril 3: ADN del pSP64 GH-HA digerido con Hind III y con Eco RI.

C: Autorradiografía de hibridación de tres colonias, plaqueadas en distintos filtros con el fragmento de la hormona de crecimiento marcada con alfa-dCTP-(³²P).

presencia de X-GAL-IPTG. Las colonias de placas positivas fueron hibridizadas con la sonda radiactiva (Fig. 6). Estos resultados indicarían que en el genoma de *Concholepas* existe una secuencia(s) similar a la secuencia de la sonda usada. En otros gastrópodos también se han encontrado secuencias similares a hormona de crecimiento e insulina (22). La construcción y análisis de la genoteca de *Concholepas concholepas* se plantea como una prioridad

necesaria para entender cabalmente los mecanismos que controlan tanto la diferenciación como el desarrollo de este importante molusco.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece el financiamiento de FONDECYT, Proyecto Sectorial Loco (3502/89), IFS (1407-1) y Sociedad de Inversiones "El Retiro".

REFERENCIAS

- GALLARDO, C. (1973) Desarrollo intracapsular de *Concholepas concholepas* (Bruguíere) (Gastropoda, Muricidae). Publicaciones Ocasionales 16. Museo Nacional de Historia Natural, Santiago de Chile, 16 pp.
- CASTILLA, J.C. (1987) Primer Informe. Segunda Fase. Proyecto: "Mariscos y Algas". CIID, Universidad Católica de Chile (3P-85-00).
- DISALVO, L.H. (1988) Observations of the larval and postmetamorphic life of *Concholepas concholepas* (Bruguíere, 1789) in laboratory culture. *The Veliger* 30: 358-368.
- INESTROSA, N.C.; GONZALEZ-PLAZA, R.; GONZALEZ, M.A.; PERELMAN, A.; SANCHEZ, J.P.; KOENIG, C. y BRANDAN, E. (1990) Investigación biotecnológica en larvas de "loco": *Concholepas concholepas*. *Biol. Pesq.* 17 (en prensa).
- LARA, E. y MONTES, E. (1989) Cultivo larval del recurso "loco" (*Concholepas concholepas*) en: "Investigación y repoblamiento de recursos bentónicos. Área piloto. IV Región. II Investigaciones Específicas". Informe Final. Proyecto CORFO/IFOP, Universidad del Norte.
- GONZALEZ, M.; PERELMAN, A.; FUENTES, M.E.; LABARCA, R.; CASTILLA, J.C.; GONZALEZ-PLAZA, R. and INESTROSA, N.C. (1990) The neurotransmitter-related enzyme acetylcholinesterase of *Concholepas concholepas* juveniles. *J. Exp. Zool.* 255: 1-8.
- ELLMAN, G.L.; COURTNEY, K.D.; ANDRES, V. JR. and FEATHERSTONE, R.M. (1961) A new and rapid colorimetric determination of AChE activity. *Biochem. Pharmacol.* 7: 88-95.
- TOUTANT, J.P. (1986) An evaluation of the hydrophobic interactions of chick muscle acetylcholinesterase by charge shift electrophoresis and gradient centrifugation. *Neurochem. Int.* 9: 111-119.
- KARNOVSKY, M.J. and ROOTS, L. (1964) A direct-coloring thiocholine method for cholinesterase. *J. Histochem. Cytochem.* 12: 219-222.
- BERRIDGE, M.J. (1984) Inositol trisphosphate and diacylglycerol as second messengers. *Biochem. J.* 220: 345-360.
- LABARCA, R.; JANDOSKY, A. and PAUL, S.M. (1987) Neurotransmitter-stimulated inositol phosphate accumulation in hippocampal slices. In: *Meth. in Enzymol.* 141: 192-201.
- BELTZ, G.A.; JACOBS, K.A.; EICKBUCH, T.H.; CHERBAS, P.T. and KAFATOS, F.C. (1983) Isolation of multigene families and determination of homologies by filter hybridization methods. *Meth. in Enzymol.* 100: 266-285.

13. MANIATIS, T.; FRITSCH, E.F. and SAMBROOK, J. (1982) *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y. USA.
14. VALENZUELA, P. and MENDEZ, B. (1982) *Techniques in Molecular Genetics*. San Francisco, USA.
15. HANAHAN, D. (1985) *Techniques for transformation of E. coli*. En: "DNA cloning. Vol. I. A practical approach". D.M. Glover (ed.). IRL Press, Oxford, Washington D.C., pp. 109-135.
16. GRUNSTEIN, M. and HOGNESS, D.S. (1975) Colony hybridization: A method for the isolation of cloned DNAs that contain a specific gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 72: 3961-3965.
17. RIZZOLO, L.J.; FINIDORI, J.; GONZALEZ, A.; ARPIN, M.; IVANOV, I.; ADESNIK, M. and SABATINI, D.D. (1985) Biosynthesis and intracellular sorting of growth hormone viral enveloped glycoprotein hybrids. *J. Cell. Biol.* 101: 1351-1362.
18. KAFATOS, F.; JONES, W.; ROSENTHAL, N. and RODAKES, G. (1979) Evolution of two majors genomic multigene families as inferred from cloned DNA and protein sequences. *Cell*. 16: 1317-1332.
19. ABDEL-LATIF, A.A. (1989) Calcium-mobilizing receptors, polyphosphoinositides, generation of second messengers and contraction in the mammalian iris smooth muscle: historical perspectives and current status. *Life Sci.* 45: 757-769.
20. BAXTER, G. and MORSE, D.E. (1987) G protein and diacylglycerol regulate metamorphosis of planktonic molluscan larvae. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 84: 1867-1870.
21. PURSELL, V.P.; PINKERT, C.A.; MILLER, K.F.; BOLT, D.J.; CAMPBELL, R.G.; PALMITER, R.D.; BRINSTER, R.L. and HAMMER, R.E. (1989) Genetic engineering of livestock. *Science* 244: 1281-1288.
22. MORSE, D.E. (1984) Biochemical and genetic engineering for improved production of abalones and other valuable molluscs. *Aquaculture* 39: 263-282.