

Identificación y caracterización de Arginina Cinasa, un probable alérgeno del mosquito *Anopheles albimanus*

Ciro Montero,^{1,2} Mónica Garrido,¹ Leticia Cortés,³ Mario Henry Rodríguez⁴ y Fidel Hernández^{1,3,4}

¹Universidad Simón Bolívar, México, D. F.; ²Centro de Investigación de Paludismo del INSP, Tapachula, Chiapas;

³Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, México, D. F.;

⁴Centro de Investigación sobre Enfermedades Infecciosas del INSP, Cuernavaca, Morelos.

Resumen

La Arginina Cinasa (AK) es una enzima que participa en la transferencia de un grupo fosfato entre N-fosfo-L-arginina y ADP. Se sabe que las AK de la polilla *Plodia interpunctella* y del camarón *Penaeus monodon* son alérgicas. En este trabajo, se aisló y se estudió un fragmento del cDNA que codifica para la AK en el mosquito *Anopheles albimanus*. Este cDNA (939 pb) se expresa en varios órganos del mosquito hembra adulto y codifica para un péptido de 57 aminoácidos, que contiene el dominio ATP-guanido fosfotransferasa C-terminal. El péptido tuvo alta identidad con AK de *An. gambiae*, *P. interpunctella* y *P. monodon*, entre otros.

Palabras clave: mosquito; saliva; Arginina Cinasa; alérgeno.

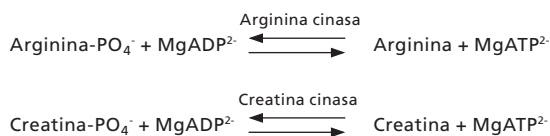
Abstract

Arginine kinase (AK) is an enzyme that catalyzes the reversible transphosphorylation between N-phospho-L-arginine and ADP. It is known that AK from the moth *Plodia interpunctella* and the shrimp *Penaeus monodon*, have allergen effect. In this work, a fragment of the cDNA encoding AK from the mosquito *Anopheles albimanus* was isolated and studied. This cDNA (939 bp) was expressed in several organs of the female adult mosquito and encode a 57 amino acids peptide, which contains the ATP-guanido phosphotransferase C-terminal domain. This peptide had a high identity with the AK from *An. gambiae*, *P. interpunctella*, *P. monodon*, among others.

Keywords: mosquito; saliva; Arginina Cinasa; alérgeno.

Introducción

La AK es una enzima que cataliza la transferencia reversible de un grupo fosforilo (PO_4^-) de la fosforilarginina a una adenosina difosfato (ADP), generando adenosina trifosfato (ATP) y arginina. La AK está presente en invertebrados inferiores y superiores, pero no en vertebrados (Morrison, 1973; Watts, 1973), pues éstos poseen una creatina cinasa (CK) con actividad similar a la AK (Morrison, 1973), que utiliza la fosforilcreatina como sustrato (Eppenberger, Dawson y Kaplan, 1967; Blethen y Kaplan, 1968).



Tanto AK como CK pertenecen a la familia de fosfógenos (guanidinio) cinasas, enzimas altamente conservadas (Suzuki, Fukuta, Nagato y Umekawa, 2000), que presentan dos dominios ATP-guanido fosfotransferasa: uno en la región N-terminal y otro en la región C-terminal. La alta homología en la secuencia de aminoácidos entre AK y CK sugiere que estas enzimas evolucionaron de un ancestro

común (Muhlebach *et al.*, 1994; Suzuki y Furukohri, 1994; Suzuki, Kawasaki y Furukohri, 1997; Perovic *et al.*, 2005).

Las enzimas AK y CK se hallan involucradas en procesos biológicos que requieren de gran demanda energética, como la contracción muscular, el movimiento flagelar y transporte de iones (Bessman y Carpenter, 1985; Wallimann, Wyss, Brdiczka, Nicolay y Eppenberger, 1992). Recientemente, Binder *et al.* (2001) reportaron a la AK como un alérgeno aislado de la larva *Plodia interpunctella*, una polilla que se encuentra distribuida desde los Estados Unidos hasta Europa, que acostumbra alimentarse de productos comestibles como granos, chocolate y fruta seca (Reichmuth, Matfin y Adelman, 1997). Por otro lado, Yu, Lin, Chiang y Chow (2003) demostraron que la AK del camarón *Penaeus monodon* también es alérgeno.

En mosquitos transmisores de enfermedades que están en constante interacción con el hombre, no se ha estudiado el efecto alérgico de AK. En este trabajo, se buscó, se identificó y se estudió la expresión de AK en *An. albimanus*, un mosquito vector de malaria que habita en el sureste de México, principalmente en las zonas costeras (Loyola, Arredondo, Rodríguez y Bown, 1991).

Objetivo

Identificar y aislar el cDNA que codifica para la AK del mosquito *An. albimanus*, y estudiar su expresión en diferentes órganos del insecto.

Metodología

Mosquitos. Para el desarrollo de este trabajo, se utilizó una colonia de mosquitos *An. albimanus* cepa franja blanca (Chan, Rodríguez, Torres, Rodríguez y Villareal, 1994), establecida en el Centro de Investigación de Paludismo de Tapachula, Chiapas, en México.

Síntesis de cDNA y amplificación por PCR. Para la amplificación del extremo 3' del cDNA que codifica para AK, se utilizó el sistema 3'-RACE (3'-Rapid Amplification of cDNA Ends; Gibco, BRL), el cual permite obtener, por medio de PCR, secuencias de ácidos nucleicos entre un sitio interno conocido y el extremo 3'

del RNAm. Para este fin, a partir de 1 µg de RNA total de glándulas salivales de *An. albimanus*, se sintetizó la primera cadena de cDNA con el iniciador AP (Adapter Primer) (5'-ggccacgctcgactagtagctactttttttttttttt-3') y la retrotranscriptasa MuLV libre de RNAsa. Después de la retrotranscripción (42 °C, 50 min) e inactivación de la enzima (70 °C, 15 min), el cDNA se amplificó con los iniciadores AK-1 (5'-ccaccgccgacaagtacaacc-3') y AUAP (Abridged Universal Amplification Primer) (5'-ggccacgctcgactagtagc-3') con 35 ciclos de 95 °C, 20 s; 50 °C, 30 s y 72 °C, 1 min. El iniciador AK-1 se diseñó a partir de la comparación de secuencias de AK de varios organismos, incluyendo la de *An. gambiae*, obtenida de la base de datos del genoma de este insecto que está disponible en la página electrónica www.anobase.org.

Clonación y secuenciación de cDNAs. Los cDNAs amplificados por 3'-RACE se ligaron en el vector pT-AdvanTAge™ (Clontech Lab, Palo Alto, Cal, USA) con DNA ligasa T4 (Gibco-BRL, Grand Island, NY, USA). Con esta ligación se transformaron bacterias *E. coli* cepa TOP10F' y éstas se sembraron en medio Luria-Bertani (LB) adicionado de ampicilina (100 µg/ml). Para conocer los productos clonados, se purificaron los plásmidos de 10 bacterias transformadas y se digirieron con la enzima *EcoRI* (Gibco-BRL). La secuenciación de los productos clonados se realizó con el sistema Big Dye (Perkin Elmer Biosystems, Foster City, CA).

Análisis de la expresión de AK por la reacción secuencial de transcriptasa reversa y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR). Para localizar la expresión del RNAm de AK en el mosquito *Anopheles* hembra adulto, se utilizó 1 µg de RNAm total de cada uno de los órganos: glándulas salivales, estómagos y ovarios; además se utilizó 1 µg de RNAm total de *An. albimanus* macho adulto. Después de la síntesis de la primera cadena de cDNA, se utilizaron los iniciadores AK-1 y AK-2 (5'-gctcgccagggtgtagcc-3') que amplifican, por PCR, un producto de 219 pb de la secuencia interna de AK de *An. albimanus*. El iniciador AK-2 es un iniciador en contra sentido que se diseñó a partir de la secuencia interna de AK.

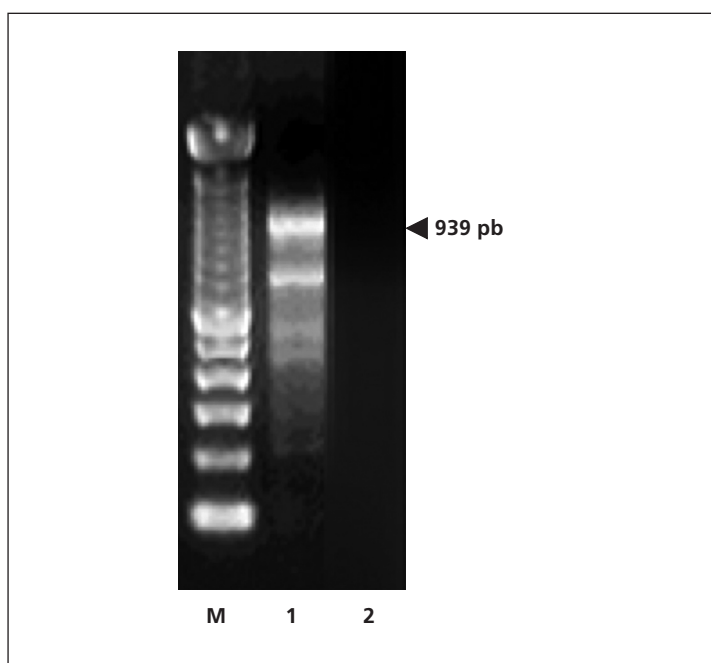
Análisis bioinformático de la secuencia de AK. La deducción de la secuencia de proteínas y alineamientos múltiples se hicieron con los programas Six-Frame y CLUSTALW (v.3.2), respectivamente, los cuales se hallan disponibles en "The San Diego Supercomputer Center" (<http://www.sdsc.edu>). El análisis y compa-

ración de secuencias de proteínas se realizó mediante el programa BLASTP (v.2.2.6) (Altschul *et al.*, 1997), que se encuentra en The National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Resultados

Amplificación del cDNA que probablemente codifica para AK en *An. albimanus*. Para la búsqueda de la secuencia parcial del cDNA que codifica para AK en *An. albimanus*, se diseñó el iniciador AK-1, y con la estrategia de 3' RACE, se obtuvieron varios productos amplificados, dos de ellos (~900 y 700 pb) se amplificaron con mayor especificidad a las condiciones de PCR utilizadas (Figura 1). Para identificar al probable cDNA que codifica para AK, se clonaron y se secuenciaron los productos generados en la PCR.

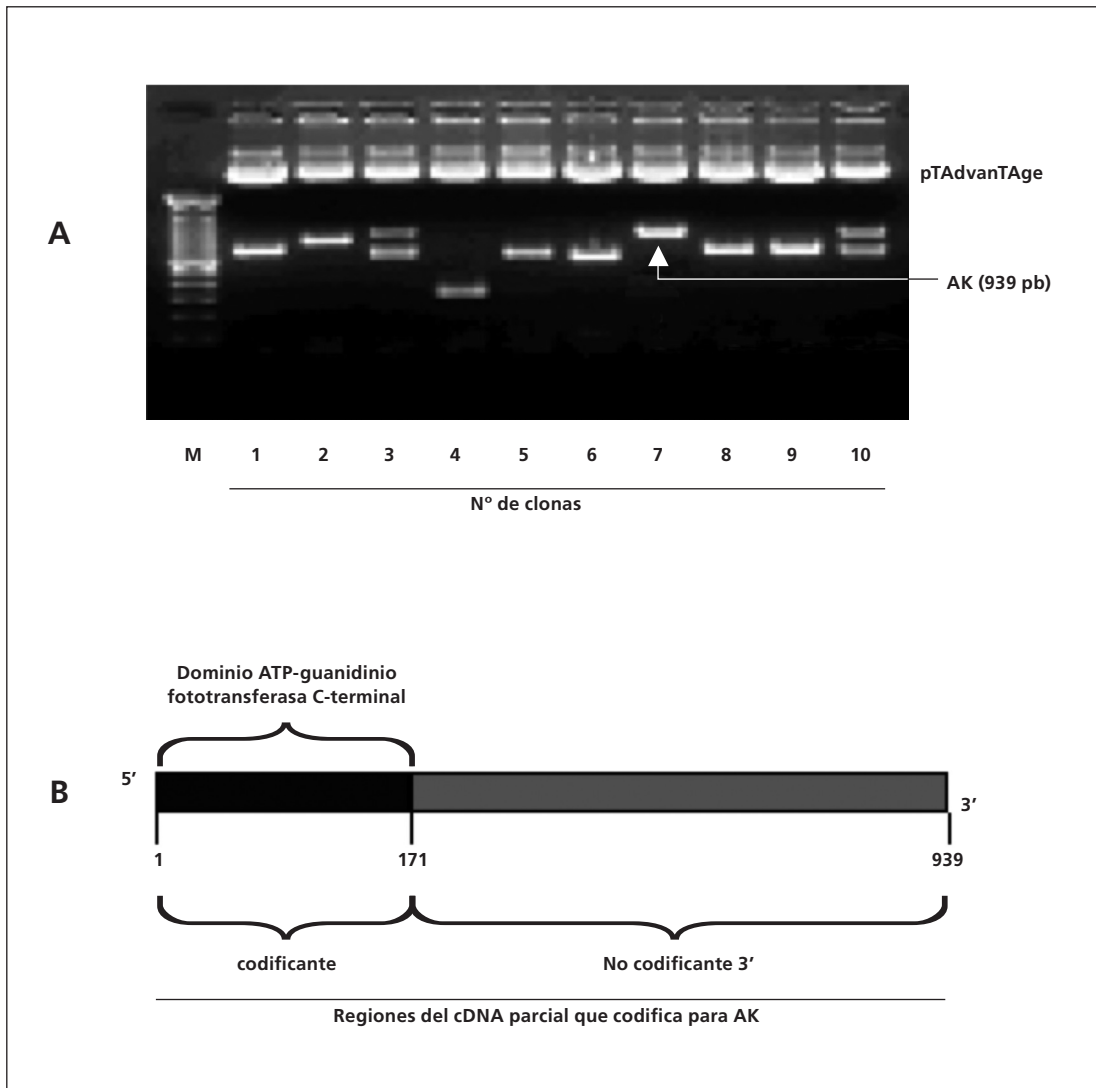
Figura 1. Amplificación de AK



Con la estrategia 3' RACE y utilizando el iniciador AK-1, se buscó el RNA mensajero que codifica para AK de *An. albimanus*, a partir de RNA total de glándulas salivales del mosquito (carril 1). Para descartar la presencia de contaminantes durante la amplificación, se hizo una reacción de PCR en ausencia de cDNA (carril 2). Carril M: marcadores de tamaño molecular ("escalera" de bandas de múltiplos de 100 bp).

Identificación de AK en *An. albimanus*. Para identificar el cDNA que codifica para AK en el mosquito *An. albimanus* hembra, se secuenciaron varios de los productos del 3'-RACE clonados en el vector pTAdvantAge (Figura 2a). La clona que contiene un fragmento de 939 pb (Figura 2a, clona 7) codifica para 57 aminoácidos y tiene una región 3' no codificante de 768 pb. El análisis de los 57 aminoácidos con el programa CD Search –disponible en la página electrónica (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), la cual busca la presencia de dominios conocidos– mostró la presencia del dominio ATP-guanido fosfotransferasa carboxilo terminal (Figura 2b) en el péptido.

Figura 2. Clonación y esquema del cDNA parcial que codifica para AK



Los productos de amplificación obtenidos por 3' RACE se clonaron en el vector pT-AdvantAge. A partir de clonas bacterianas candidatas a contener el cDNA del mosquito que codifica para AK, se purificó el plásmido y se cortó con la enzima *EcoRI*. El producto de inserción de 939 pb de la clona 7 se secuenció y se comprobó que codifica para AK (panel A). El cDNA que codifica para esta enzima tiene un marco de lectura abierto (nucleótidos 1-171), que codifica para 57 aminoácidos, que corresponde al dominio ATP-guanidinio fosfotransferasa C-terminal y una región 3' no codificante (nucleótidos 172-939) de 768 pb (panel B). M: como marcadores de peso molecular se colocó una "escalera" de moléculas de DNA en múltiplos de 100 bp.

Análisis comparativo de AK de *An. albimanus* con la de otros invertebrados. La secuencia peptídica de 57 aminoácidos obtenida de la secuencia parcial del cDNA de glándulas salivales de *An. albimanus*, se comparó con la de la AK ya secuenciada de otros invertebrados. El péptido de AK de *An. albimanus* tuvo 98% de identidad con la AK del mosquito *An. gambiae*, 88% con la AK del crustáceo *Artemia franciscana*, 83% con la de la polilla *Plodia interpunctella* y 80% con la del camarón *Penaeus monodon* y con la de la abeja *Apis mellifera* (Tabla 1).

Tabla 1. Comparación de secuencias de aminoácidos de AK de *An. albimanus* (AK-Ana) con la AK de otros organismos

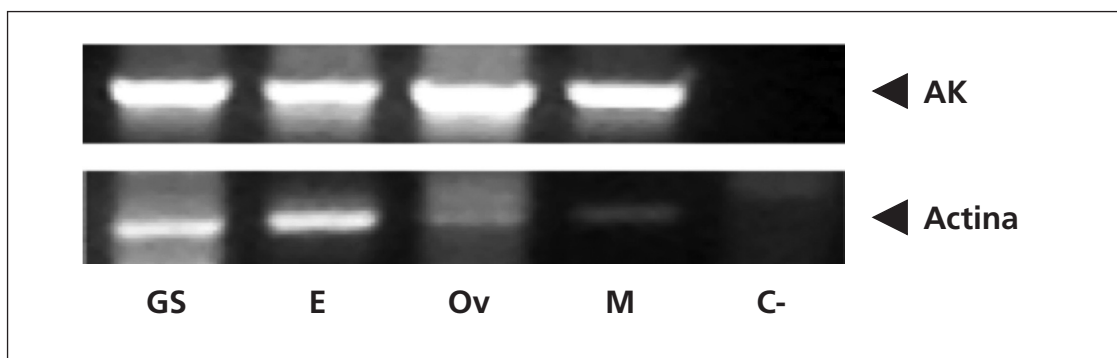
Organismo	Molécula / efecto de alérgeno	Identidad (%) con AK-Ana (6)	Código de acceso electrónico (www.ncbi.nlm.nih.gov)	Referencia
<i>An. gambiae</i> (1)	AK / N.D.	98	ENSANNGP00000023852	www.anobase.org
<i>A. franciscana</i> (2)	AK / N.D.	87	*16518985	Chen y MacRae,np
<i>P. interpunctella</i> (3)	AK / +	83	*15886861	Binder <i>et al.</i> , 2001
<i>P. monodon</i> (4)	AK / +	83	*27463265	Yu <i>et al.</i> , 2003
<i>A. mellifera</i> (5)	AK / N.D.	80	*58585146	Kucharski y Maleszka, 1988

(1) [303] TADKYNLQVRGTRGEHSEAEAGGIYDISNKRRMGLTEFQAVKEMYDGISEIIEKSL [355]
 (2) [301] VASKYNLQVRGTRGEHTEAEGGIYDISNKRRMGLTEYQAVKEMYDGIKLEKQSA [355]
 (3) [300] VASKYHLQVRGTRGEHTEAEGGVYDISNKRRMGLTEYQAVKEMYDGIKLEKSL [355]
 (4) [301] VAGKYNLQVRGTRGEHTEAEGGIYDISNKRRMGLTEFQAVKEMQDGIKLEKEM [356]
 (5) [300] IAGKFNLQVRGTRGEHTEAEGGIYDISNKRRMGLTEYQAVKEMHDGIKLEKEL [355]
 (6) TADKYNLQVRGTRGEHSEAEAGGIYDISNKRRMGLTEFQAVKEMYDGISEIIEASL
 * *.....*

(*) Aminoácidos idénticos (N. D.) No determinado
 (:) Aminoácidos similares (np) No publicadolares

Análisis de expresión de AK en diferentes órganos del mosquito *An. albimanus*. Para estudiar la expresión de AK en el mosquito *An. albimanus*, se utilizó la estrategia de RT-PCR. El RNAm de AK se expresó tanto en glándulas salivales, como en el estómago y ovarios de hembras adultas, así como en cuerpos completos de macho adulto. La presencia e integridad de cada uno de los RNAm utilizados se validó con la amplificación del RNAm de actina (Figura 3), un gen que se expresa constitutivamente.

Figura 3. Análisis de expresión del RNAm de AK en diferentes órganos y sexo de *An. albimanus*



Se analizaron, aproximadamente, 100 ng de RNA total de glándulas salivales (GS), estómago (E) y ovarios (Ov) de *An. albimanus* hembra y de *An. albimanus* macho completo (M), por RT-PCR con los iniciadores AK-1 y AK-2 (AK). La calidad de los cDNAs se comprobó con la amplificación de actina.

Discusión

En este trabajo se identificó y estudió un cDNA que codifica para un fragmento del extremo C-terminal de la enzima AK del mosquito *An. albimanus*. Para lograr esto, se realizó una búsqueda de las AK de varios artrópodos disponibles en la base de datos del Centro Nacional de Información Biotecnológica (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), se

alinearon las secuencias y se diseñó un oligonucleótido correspondiente a una región altamente conservada, que se utilizó para amplificar la región 3' del mRNA mediante la estrategia 3' RACE. De esta reacción se obtuvieron varios amplificadores y uno de ellos, de 939 pb, correspondió a un producto cuya secuencia traducida tiene alta identidad (80-98%) con la de las AK de otros organismos, pues presenta un dominio ATP-guanido fosfotransferasa C-terminal, propio de estas enzimas, lo que indicó que se había obtenido el producto esperado.

De la secuencia parcial del cDNA que codifica para AK de *An. albimanus*, sólo se han obtenido 57 aminoácidos que corresponden a AK, el resto de la secuencia (768 pb) corresponde a una región terminal no codificante (3' UTR). Esta extensa región 3' no codificante no se observa en los RNAm de AK de organismos como *A. mellifera* (Kucharski y Maleszka, 1998), *P. monodon* (Yu *et al.*, 2003) o *P. interpunctella* (Binder *et al.*, 2001), pero sí en *An. gambiae*; en este vector, la región no codificante 3' de AK es de 978 pb, 210 pb más que el identificado en *An. albimanus*.

La AK es una molécula que conserva su estructura (Suzuki *et al.*, 1997, 1999 y 2000), actividad (Kotlyar, Weihrauch, Paulsen y Towle, 2000; Takeuchi *et al.*, 2004; Perovic-Ottstad *et al.*, 2005), expresión y localización (Zhou *et al.*, 1997; Wang, Esbensen y Bentley, 1998). Por otra parte, se reportó que las AK de la mariposa *P. interpunctella* (alergeno Plo i 1) (Binder *et al.*, 2001) y del camarón *P. monodon* (alergeno Pen m 2) tienen efecto de alérgenos en el humano (Yu *et al.*, 2003). Al comparar el producto de traducción (57 aminoácidos) de la región codificante del cDNA de *An. albimanus* con la base de datos, este péptido tuvo 83% de identidad con la región carboxilo de los alérgenos Plo i 1 y Pen m 2. Este análisis bioinformático sugiere profundizar el estudio de la molécula AK para identificar los dominios que actúan como alérgenos, lo cual sería relevante para la elaboración de componentes específicos y para detectar casos de alergia producidas por AK del mosquito *An. albimanus*.


El RNAm de AK se expresa en el estómago, ovarios y glándulas salivales de *An. albimanus*, lo que podría estar relacionado con los requerimientos de ATP para la homeostasis de esos órganos, como sucede con la síntesis de ATP a partir de arginina fosfato en músculos que participan en el vuelo de los insectos (Nation, 2002). En el genoma de *An. gambiae*, un vector importante de malaria en África, se reportó la secuencia

que codifica para AK, mientras que en el mosquito *Aedes* adulto se demostró actividad enzimática para AK (Wang *et al.*, 1998). Sin embargo, no se han estudiado ni la presencia ni la función de esta enzima en el mosquito *Anopheles* ni tampoco en un órgano secretor, como lo son las glándulas salivales.

Durante la alimentación de un mosquito sobre un hospedero vertebrado, el vector inyecta proteínas salivales que son capaces de generar una reacción inmunológica en el hospedero (Mellanby, 1946; Peng, Li y Simon, 1998). Esta reacción produce anticuerpos IgE e IgG específicos de los componentes de la saliva del mosquito, así como la proliferación de linfocitos durante la reacción alérgica (Peng y Simons, 2004). Debido a la falta de componentes salivales de mosquito en el mercado, las moléculas introducidas en el cuerpo humano —mediante los piquetes de mosquito— que producen alergia no pueden diagnosticarse adecuadamente. Esto implica que la identificación y caracterización de nuevos alérgenos de insectos, y sobre todo de aquellos con hábitos hematófagos, serían útiles para producir alérgenos recombinantes accesibles para diagnóstico y, posteriormente, esto ayudaría a encontrar un tratamiento inmunoterapéutico para pacientes con alta sensibilidad a piquetes de mosquitos.

Conclusiones

La AK identificada en *An. albimanus* tiene alta identidad con AK de *An. gambiae* y con AK de otros organismos, incluyendo las AK de *P. interpunctella* y *P. monodon*, que tienen actividad de alérgeno, lo que indica, por un lado, el alto grado de conservación en la estructura de las AKs y, por el otro, sugiere que esta molécula del mosquito podría tener un efecto de alérgeno en el humano. El RNAm de AK se expresa, entre otros órganos, en las glándulas salivales de *An. albimanus* hembra, por lo que sería importante investigar si la proteína AK se secreta en la saliva del mosquito y si es inoculada al hospedero vertebrado mientras se alimenta de su sangre; estas condiciones sugerirían que AK tiene efecto de alérgeno. Además, sería importante investigar si este efecto de alérgeno modifica la respuesta inmune del vertebrado, lo que podría ser aprovechado por distintos parásitos durante su transmisión, como ocurre con componentes de saliva de otros insectos hematófagos, como las moscas *Phlebotomus papatasi* (Mbow, Bleyenbergh, Hall y Titus, 1998) y *Lutzomyia longipalpis* (Guilpin, Swardson, Nosbisch y Titus, 2002; Rogers, Ilg, Nicolaev,

Ferguson y Bates, 2004), cuyos componentes salivales hacen más eficiente la transmisión de los parásitos de *Leishmania* al hospedero vertebrado. 

Referencias

- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. & Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucl. Acids Res.*, 25, 3389-3402.
- Bessman, S. P. & Carpenter, C. L. (1985). The creatine-creatine phosphate energy shuttle. *Annu. Rev. Biochem.*, 54, 831-862.
- Binder, M., Mahler, V., Hayek, B., Sperr, W. R., Schöller, M., Prozell, S., Wiedermann, G., Valent, P., Valenta, R. & Duchêne, M. (2001). Molecular and immunological characterization of arginine kinase from the indianmeal moth, *Plodia interpunctella*, a novel cross-reactive invertebrate pan-allergen. *The J. Immunol.*, 167, 5470-5477.
- Blethen, S. L. & Kaplan, N. O. (1968). Characteristics of arthropod arginine kinases. *Biochemistry*, 7 (6), 2123-2135.
- Chan A. S. T., Rodriguez M. H., Torres J. A., Rodríguez M. C. & Villarreal, C. (1994) Susceptibility of three laboratory strains of *Anopheles albimanus* (Diptera: Culicidae) to coindigenous *Plasmodium vivax* in Southern Mexico. *J. Med. Entomol.*, 31, 400-403.
- Eppenberger, H. M., Dawson, D. M. & Kaplan, N. O. (1967). The comparative enzymology of creatine kinases. I. Isolation and characterization from chicken and rabbit tissues. *J. Biol. Chem.*, 242, 204-209.
- Guilpin, V. O., Swardson-Olver, C., Nosbisch, L. & Titus, R. G. (2002). Maxadilan, the vasodilator/immunomodulator from *Lutzomyia longipalpis* sand fly saliva, stimulates haematopoiesis in mice. *Parasite Immunol.*, 24, 437-446.
- Kucharski, R. & Maleszka, R. (1998). Arginine kinase is highly expressed in the compound eye of the honey bee, *Apis mellifera*. *Gene.*, 211, 343-349
- Loyola, E. G., Arredondo, J. I., Rodríguez, M. H. & Bown, M. A. (1991). *Anopheles vestitipenis*, The probable vector of *Plasmodium vivax* in the Lacandon forest of Chiapas, Mex. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 85, 171.
- Mbow, M. L., Bleyenbergh, J. A., Hall, L. R. & Titus, R. G. (1998). *Phlebotomus papatasi* sand fly salivary gland lysate down-regulates a Th1, but up-regulates a Th2, response in mice infected with *Leishmania major*. *J. Immunol.*, 161, 5571-5577.
- Mellanby, K. (1946). Man's reaction to mosquito bites. *Nature*, 158, 554.
- Morrison, J. F. (1973). Arginine Kinase and other invertebrate guanidino kinases. In P. D. Boyer (ed.). *The Enzymes* (pp.457-486). New York: Academic Press.
- Muhlebach, S. M., Gross, M., Wirz, T., Wallimann, T., Perriard, J. C. & Wyss, M. (1994). Sequence homology and structure predictions of the creatine kinase isoenzymes. *Mol. Cell Biochem.*, 133/134, 245-262.
- Nation J. L. (2002). *Insect physiology and biochemistry*. Gainesville, Florida, USA: CRC Press.
- Peng Z., Li H. & Simons, F. E. (1998). Immunoblot analysis of salivary allergens in 10 mosquito species with worldwide distribution and the human IgE responses to these allergens. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 101, 498-505.
- Peng Z. & Simons, F. E. (2004). Mosquito allergy: immune mechanisms and recombinant salivary allergens. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 133, 198-209.
- Perovic-Ottstadt S., Wiens, M., Schroder, H. C., Batel, R., Giovine, M., Krasko, A., Muller, I. M. & Muller, W. E. (2005). Arginine kinase in the demosponge *Suberites domuncula*: regulation of its expression and catalytic activity by silicic acid. *J. Exp. Biol.*, 208, 637-646.
- Reichmuth, D. A., Matfin, G. & Adelman, H. M. (1997). Acute onset of dermatitis, hepatitis, and eosinophilia. *Hosp. Pract. (Off Ed.)*, 32, 45-48.
- Rogers, M. E., Ilg, T., Nikolaev, A. V., Ferguson, M. A. & Bates, P. A. (2004). *Transmission of cutaneous leishmaniasis by sand flies is enhanced by regurgitation of fPPG*, 430, 463-467.
- Suzuki, T. & Furukohri, T. (1994). Evolution of phosphagen kinase. Primary structure of glycoamine kinase and arginine kinase from invertebrates. *J. Mol. Biol.*, 237, 353-357.
- Suzuki, T., Kawasaki, Y. & Furukohri, T. (1997). Evolution of phosphagen kinase. *Biochem. J.*, 328, 301-306.
- Suzuki T., Kamidochi M., Inoue N., Kawamichi H., Yazawa Y., Furukohri T. & Ellington, W. (1999). Arginine kinase evolved twice: evidence that echinoderm arginine kinase originated from creatine kinase. *Biochem. J.*, 340, 671-675.
- Suzuki, T., Fukuta, H., Nagato, H. & Umekawa, M. (2000). Arginine kinase from *Nautilus pompilius*, a living fossil. Site-directed mutagenesis studies on the role of amino acid residues in the Guanidino specificity region. *J. Biol. Chem.*, 275 (31), 23884-23890.
- Takeuchi, M., Mizuta, C., Uda, K., Fujimoto, N., Okamoto, M. & Suzuki, T. (2004). Unique evolution of Bivalvia arginine kinases. *Cell Mol. Life Sci.*, 61, 110-117.
- Wallimann, T., Wyss, M., Brdiczka, D., Nicolay, K. & Eppenberger, H. M. (1992). Intracellular compartmentation, structure and function of creatine kinase isoenzymes in tissue with high and fluctuating energy demands: the "phosphocreatine circuit" for cellular energy homeostasis. *Biochem. J.*, 281, 21-40.
- Wang, Y. E., Esbensen, P. & Bentley, D. (1998). Arginine kinase expression and localization in growth cone migration. *J. Neurosci.*, 18, 987-998.
- Watts, D. C. (1973). Creatine kinase (adenosine 5'-triphosphate-creatine phosphotransferase). In P. D. Boyer (ed.). *The enzymes* (pp. 383-455). New York: Academic Press.
- Yu, C. J., Lin, Y. F., Chiang, B. L. & Chow, L. P. (2003). Proteomics and immunological analysis of a novel shri allergen, Pen m 2. *J. Immunol.*, 170, 445-453.
- Zhou, G., Parthasarathy, G., Somasundaram, T., Ables, A., Roy, L., Strong, S. J., Ellington, W. R. & Chapman, M. S. (1997). Expression, purification from inclusion bodies, and crystal characterization of a transition state analog complex of arginine kinase: a model for studying phosphagen kinases. *Protein Sci.*, 6, 444-449.