

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI TRIESTE

Sede Amministrativa del Dottorato di Ricerca

XX CICLO DEL
DOTTORATO DI RICERCA IN NEUROSCIENZE

***Studio della modulazione ormonale della riproduzione
e della crescita nei Crostacei Decapodi mediante l'uso
di neurormoni ricombinanti ed anticorpi specifici***

(Settore scientifico-disciplinare BIO/05)

DOTTORANDO
ALESSANDRO MOSCO

COORDINATORE DEL COLLEGIO DEI
DOCENTI

Prof.sa *PAOLA LORENZON*
Università degli Studi di Trieste

TUTORE

Dott. *PIERO G. GIULIANINI*
Università degli Studi di Trieste

CO-TUTORE

Dott. *PAOLO EDOMI*
Università degli Studi di Trieste

Indice

Introduzione	1
Localizzazione del cHH	2
Struttura del cHH	4
Maturazione	9
Funzione	10
Manipolazione ormonale	12
Scopo della tesi	13
Materiali e metodi	14
Clonaggio del cDNA nel vettore di espressione	14
<i>Clonaggio del Asl-rcHH-Gly-Lys</i>	<i>14</i>
<i>Clonaggio del Asl-rcHH-Gly</i>	<i>14</i>
Espressione dei peptidi ricombinanti	14
<i>Refolding</i> e purificazione	<i>16</i>
Reazione di ammidazione	<i>16</i>
Spettrometria di massa	<i>16</i>
Dicroismo circolare	<i>17</i>
Estratto di ghiandole del seno	<i>17</i>
Purificazione del cHH nativo	<i>17</i>
Misura della concentrazione	<i>17</i>
Produzione e purificazione di anticorpi anti-Asl-rcHH-Val-Gly	<i>18</i>
ELISA	<i>18</i>
Stabulazione degli animali	<i>19</i>
Saggi biologici <i>in vivo</i>	<i>19</i>
Inibizione del cHH in <i>A. leptodactylus</i>	<i>20</i>
Risultati	21
Clonaggio del cDNA codificante per cHH-Gly-Lys e cHH-Gly	21
Espressione dei peptidi ricombinanti	21
<i>Refolding</i> e purificazione	<i>21</i>
Ammidazione	<i>22</i>
Caratterizzazione biochimica	<i>22</i>
Quantificazione del cHH	<i>25</i>

Saggi omologhi	26
Saggi eterologhi	29
Risposta iperglicemica correlata al sesso	33
Caratterizzazione dell'anticorpo anti-cHH	35
Inibizione del cHH	36
Discussione	38
Bibliografia	45
Ringraziamenti	53

Introduzione

Negli animali pluricellulari la comunicazione intercellulare è di fondamentale importanza per il controllo dei processi fisiologici, per l'elaborazione degli stimoli sensoriali e per l'esecuzione degli atti motori. I meccanismi della comunicazione cellulare comprendono sistemi che operano a livello locale tra cellule che sono in diretto contatto fra di loro, oppure che agiscono su grandi distanze tramite il rilascio di specifiche molecole negli spazi intercellulari e che quindi possono interessare bersagli posti lontano dalla sorgente del segnale. Nel primo caso si ha la formazione di una rete di cellule specializzate connesse tra loro che vanno a costituire il sistema nervoso. Nel secondo caso si è in presenza di un sistema endocrino formato da ghiandole endocrine che secernono molecole segnale, gli ormoni. Accanto alle ghiandole endocrine, anche molti neuroni sintetizzano ormoni che sono sempre di tipo peptidico, e queste cellule neurosecretrici, nel loro complesso, formano il sistema neuroendocrino che è stato osservato in tutti gli animali che possiedono un sistema nervoso (Hartenstein, 2006).

Nei crostacei la maggioranza degli ormoni circolanti è sintetizzata da specifiche cellule neurosecretrici del sistema nervoso. Questi neuropeptidi sono responsabili della modulazione di numerosi processi fisiologici, quali la crescita, la riproduzione e l'omeostasi (Huberman, 2000; Diwan, 2005). I primi studi che hanno fatto supporre l'esistenza di fattori umorali implicati nel controllo della crescita nei crostacei risalgono a circa un secolo fa quando fu osservato che l'ablazione bilaterale dei peduncoli oculari in *Uca pugilator* induceva un accorciamento del periodo di intermuda (Zeleny, 1905). Il fattore responsabile del controllo della muta, il *Molt Inhibiting Hormone* (MIH), fu identificato nel 1987 in estratti di ghiandole del seno di *Carcinus maenas* e caratterizzato come un peptide di 6-14 kDa (Webster, 1986). Negli anni trenta si dimostrò il coinvolgimento di due fattori propri dei peduncoli oculari nel controllo dei cromatofori in *Palaemonetes* (Perkins, 1928; Brown, 1933; Kleinholz, 1934). Il primo di

questi fattori ad essere stato identificato è il *Red Pigment Concentrating Hormone* (RPCH), che è responsabile della concentrazione del pigmento nei cromatofori, ed è anche il primo neuroormone di un crostaceo la cui struttura molecolare sia stata delucidata (Fernlund e Josefsson, 1972). Il secondo fattore è il *Pigment Dispersing Hormone* (PDH), anch'esso correlato al controllo della concentrazione del pigmento nei cromatofori, ma avente un'azione antagonista, inducendo la dispersione del pigmento.

L'esistenza di un ormone gonado-inibitorio rilasciato dalle ghiandole del seno presenti nei peduncoli oculari fu proposta nel 1943 sulla base di alcuni esperimenti condotti su *Palaemon serratus* tramite l'ablazione dei peduncoli oculari. Gli esperimenti avevano messo in evidenza come questo trattamento inneschasse la crescita ovarica (Panouse, 1943). Successivamente, attraverso l'impianto in sede addominale della ghiandola del seno in animali epedunculati fu osservato che non vi era crescita ovarica e quindi dedotto che la ghiandola del seno era la sorgente dell'ormone che inibiva la maturazione ovarica (Panouse, 1944). Quarant'anni più tardi un fattore inibente la vitellogenesi, il *Vitellogenesis Inhibiting Hormone* (VIH), fu isolato da estratti di ghiandole del seno di *Homarus americanus* e la sua attività di inibizione della vitellogenesi venne dimostrata mediante un saggio eterologo su femmine di *Palaemonetes varians* ablate bilateralmente dei peduncoli oculari. La frazione bioattiva, purificata tramite RP-HPLC, fu identificata tramite SDS-urea-PAGE e risultò essere un peptide di 7-8 kDa (Soyez et al., 1987). Pochi anni dopo attraverso l'ibridizzazione *in situ* di mRNA in *H. americanus* fu trovato che non vi è differenza nel numero di cellule VIH positive negli organi X dei maschi e delle femmine. Questo indusse gli autori a proporre un ruolo endocrino per questo ormone anche nei maschi ed un altro nome, *Gonad Inhibiting Hormone* (GIH), che riflettesse la sua azione nel controllo dello sviluppo gonadico (de Kleijn et al., 1992).

Nel 1944 fu trovato un fattore diabetogeno negli estratti di peduncoli oculari di *U. pugilator* che

nei saggi *in vivo* induceva un marcato aumento della glicemia (Abramowitz et al., 1944). La caratterizzazione molecolare di questo peptide fu effettuata nel 1989 su estratti di ghiandole del seno di *C. maenas*. La sequenza amminoacidica del *crustacean Hyperglycemic Hormone* (cHH) risultò essere di 72 aa, con tre ponti disolfuro, l'estremità N bloccata dal piroglutammato e la parte C-terminale ammidata (Kegel et al., 1989).

L'ultimo neuropeptide ad essere stato purificato dalle ghiandole del seno è il *Mandibular Organ Inhibiting Hormone* (MOIH) (Wainwright et al., 1996). L'attività del MOIH si esplica inibendo l'organo mandibolare, che produce il metilfarnesoato (MF). Il MF è una forma non epossidata dell'ormone giovanile III degli insetti ed è coinvolto in processi riproduttivi e morfogenetici (Rodríguez et al., 2002; Laufer et al., 2005).

Localizzazione del cHH

Il sistema endocrino dei crostacei consiste di alcune ghiandole endocrine, l'organo Y (Gabe, 1953), l'organo mandibolare (Le Roux, 1968), la ghiandola androgenica (Hasegawa et al., 1993) e di una serie di gruppi di cellule neurosecretrici. L'organo Y è coinvolto nel controllo della muta attraverso la produzione di ecdisteroidi (Gabe, 1953; Skinner, 1985), mentre l'organo mandibolare è il sito di sintesi del MF (Laufer et al., 1987). La ghiandola androgenica controlla il differenziamento sessuale attraverso l'*Androgenic Gland Hormone* (AGH) che stimola la morfogenesi maschile ed inibisce il differenziamento femminile (Sagi e Khalaila, 2001). La parte neuroendocrina è composta dall'organo X, dall'organo postcommissurale e dall'organo pericardico (Figura 1).

L'organo X rappresenta il principale centro neuroendocrino dei crostacei. Quest'organo è associato ai gangli ottici presenti nei peduncoli oculari che comprendono la *lamina ganglionaris*, la *medulla externa*, la *medulla interna* e la *medulla terminalis*. Esso si trova presso la parte ventroprossimale del margine della *medulla terminalis* ed è formato da neuroni unipolari i cui assoni, riuniti nel nervo della ghiandola del seno, proiettano verso la ghiandola del seno (GS), una struttura neuroemale posta alla superficie della *medulla interna* o al margine tra la *medulla interna* e la *medulla externa* (Figure 1,2).

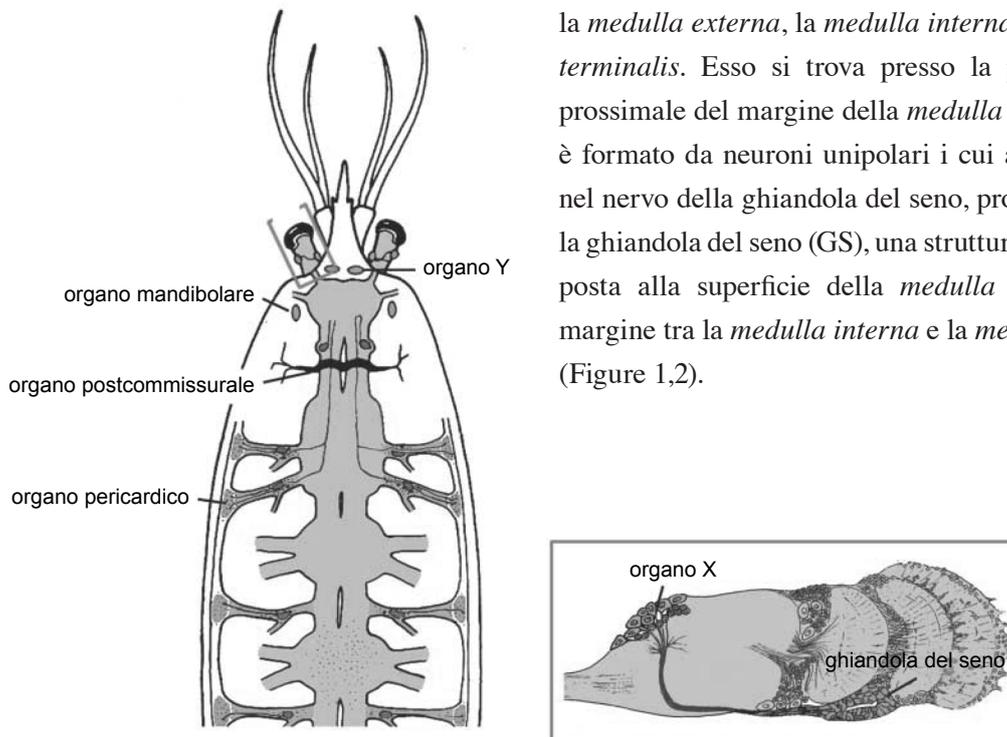


Figura 1. Visione dorsale del sistema nervoso ed endocrino dei crostacei. Le ghiandole endocrine controllate da neuroni sono l'organo pericardico, l'organo postcommissurale e la ghiandola del seno. Queste ghiandole secernono i neuropeptidi prodotti dalle cellule neurosecretrici. L'organo Y secerne l'ecdisione; l'organo mandibolare produce il metilfarnesoato. L'organo X è il sito di sintesi del cHH, GIH, MIH, MOIH, PDH e RPCH, che mediante trasporto assonale raggiungono la ghiandola del seno dove vengono rilasciati nell'emolinfa. Modificato da Hartenstein (2006).

L'organo X è composto da circa 100-250 corpi cellulari che contribuiscono per il 90% dei terminali secretori della GS. Una piccola parte degli assoni che raggiungono la GS derivano, invece, da neuroni posti nel cervello e nei gangli posteriori. (Cooke e Sullivan, 1982). Queste fibre collaterali terminano nel neuropilo della GS dove vanno ad innervare le arborizzazioni dendritiche delle cellule neurosecretrici (Andrew et al., 1978). Il rilascio a livello sinaptico di molecole di controllo quali le encefaline consente infine di modulare la secrezione dei neuropeptidi (Ollivaux et al., 2002). I corpi cellulari dell'organo X sono piuttosto grandi (35-50 μm) e si possono distinguere solamente tramite l'uso di anticorpi specifici o sonde specifiche mediante ibridizzazione *in situ* (Van Herp e Van Buggenum, 1979; de Kleijn et al., 1992; Rotllant et al.; 1993 Giulianini et al., 2002). I neuropeptidi sono sintetizzati in gruppi differenti di 15-20 cellule come riportato per il cHH e il MIH di *Metapenaeus ensis* (Gu et al., 2001) o anche meno come in *Armadillidium vulgare* (Gu et al., 2001; Azzouna et al., 2003) dove sono state riconosciute sei cellule che sintetizzano il cHH e quattro il VIH, oppure vi può essere una parziale colocalizzazione per cui neuroormoni diversi vengono sintetizzati dalle stesse cellule come è stato dimostrato per il cHH e il GIH di *H. americanus* (de Kleijn et al., 1992). Gli ormoni sintetizzati nell'organo X raggiungono quindi la ghiandola del seno mediante trasporto assonale.

La ghiandola del seno è un organo neuroemale ed è formata da terminali assonici, inframezzati da cellule gliali, che terminano sulla sottile lamina basale dei seni emolinfatici. I terminali assonici contengono i granuli neurosecretori che vengono rilasciati per esocitosi nei seni emolinfatici. Studi ultrastrutturali hanno evidenziato una notevole varietà micromorfologica nei granuli che differiscono per forma, dimensione, tessitura e densità elettronica. Ogni terminale assonico contiene un unico tipo di granuli. Anche il numero è variabile, si va dai due granuli di *Orconectes virilis* ai sette di *Callinectes sapidus* (Andrews et al., 1971; Andrew e Shivers, 1976). In *Astacus leptodactylus*

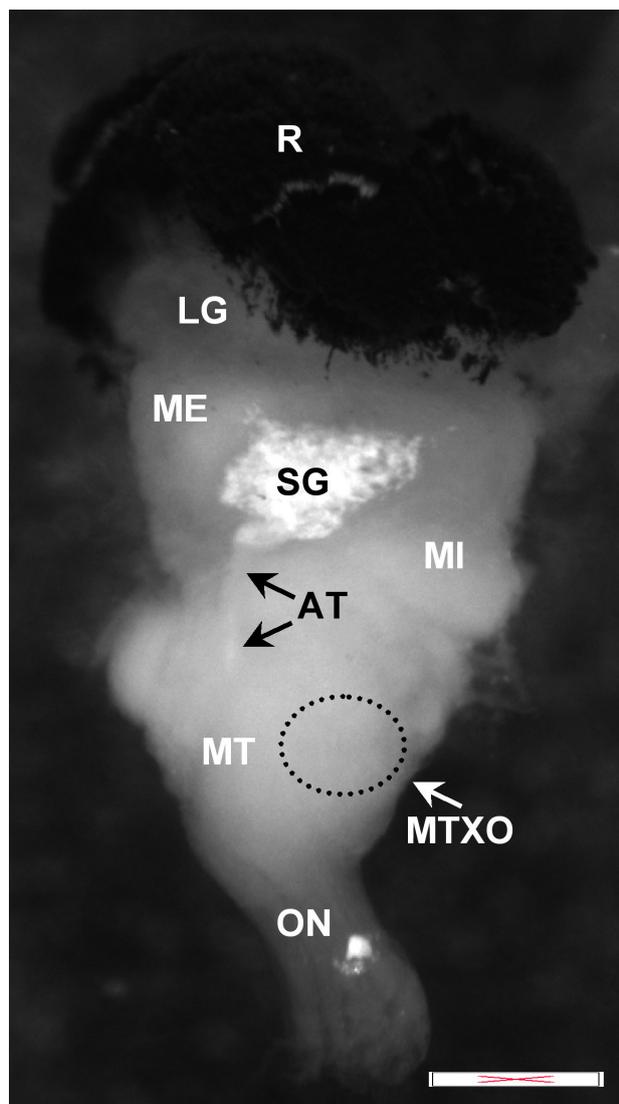


Figura 2. Gangli dissezionati dal peduncolo oculare destro di *Astacus leptodactylus* (non colorati). La ghiandola del seno (SG) è connessa mediante un tratto assonale (AT) diretto verso la parte posteriore dell'area della *medulla terminalis* che comprende l'organo X (MTXO, area tratteggiata). LG: *lamina ganglionaris*, ME: *medulla externa*, MI: *medulla interna*, MT: *medulla terminalis*, ON: *nervo ottico*, R: *retina*. Barra: 500 μm . Tratto da Giulianini e Edomi (2006).

i granuli sono stati suddivisi in cinque tipi, con dimensioni variabili da 50-220 nm, di cui solo i più grandi contengono il cHH. Oltre al complesso organo X ghiandola del seno, che è la principale struttura neuroendocrina dei crostacei, sono stati trovati altri siti di sintesi del cHH. Neuroni positivi al cHH sono stati identificati mediante tecniche immunocitochimiche nelle seconde radici dei gangli toracici e nel ganglio subesofageo di *H. americanus* (Chang et al., 1999) e nella retina di *Procambarus clarkii* (Escamilla-Chimal et al., 2001). Il cHH è stato trovato anche nei paraneuroni

dell'intestino anteriore e posteriore, nei neuroni addominali periferici e nell'organo pericardico, tutti in *C. maenas* (Webster et al., 2000; Dirksen et al., 2001; Chung e Webster, 2004). Il cHH isolato dall'organo pericardico è stato caratterizzato biochimicamente e consiste di un peptide di 73 aa non ammidato in posizione C-terminale. Le sequenze amminoacidiche del cHH peduncolare (SG-cHH) e del cHH pericardico (PO-cHH) coincidono per i primi 40 aa, mentre dalla posizione 41 le due sequenze differiscono considerevolmente. Il ruolo del PO-cHH resta ancora da scoprire dato che non esplica alcuna attività iperglicemizzante né inibisce l'organo Y (Dirksen et al., 2001). L'organo pericardico è il maggiore organo neuroemale dei crostacei ed è il sito di rilascio di numerose sostanze con attività cardioeccitatoria, tra cui due peptidi, la proctolina e il *crustacean Cardioactive Peptide* (cCAP), il primo con effetto inotropico ed il secondo soprattutto cronotropico (Stangier et al., 1986; Stangier et al., 1987). Per quanto riguarda l'organo postcommissurale la sua funzione sembra esaurirsi nell'accumulo e rilascio delle cromatoforine (Fingerman, 1966).

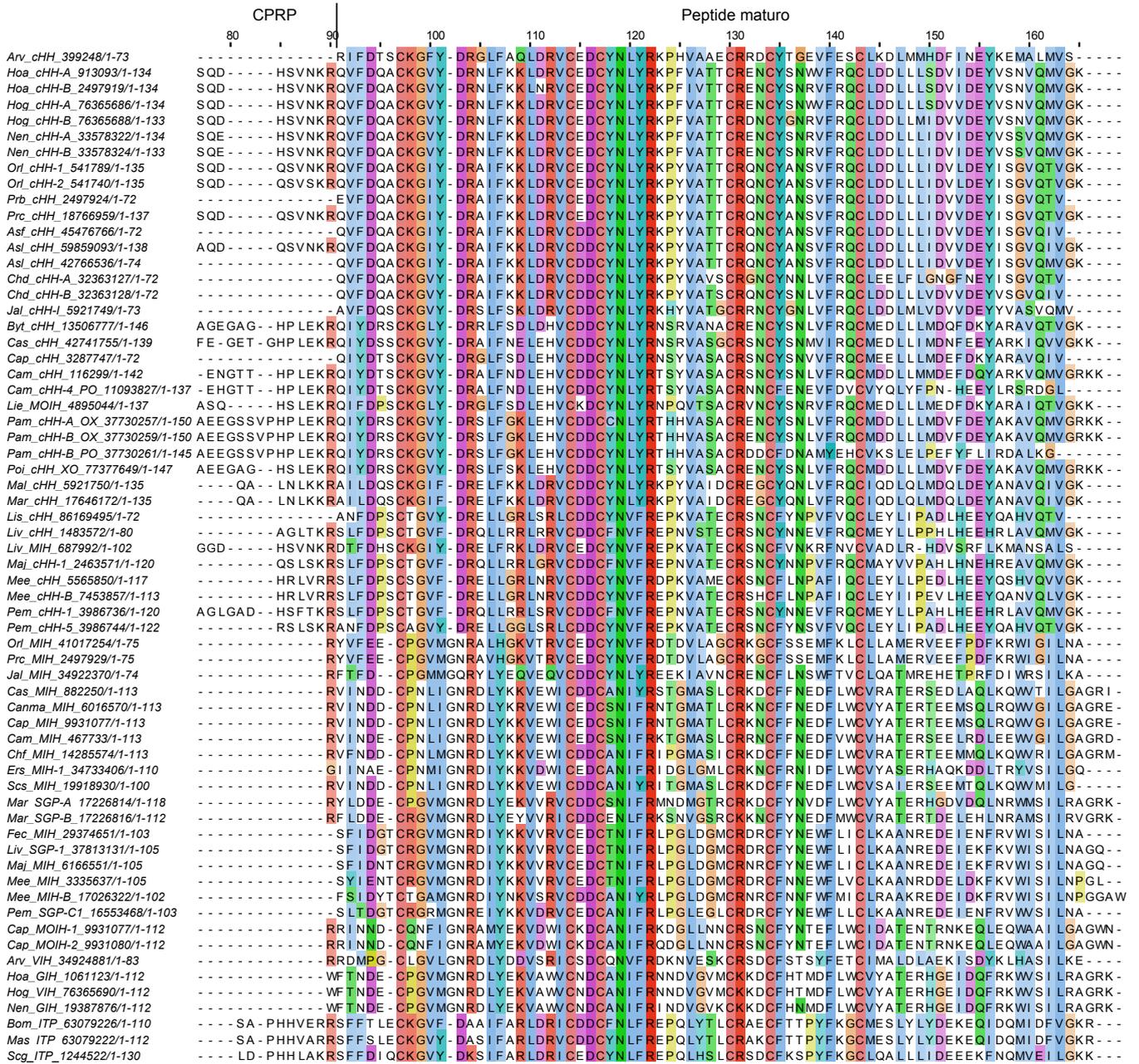
Struttura del cHH

Il cHH appartiene ad una famiglia di peptidi strutturalmente correlati che comprende oltre al cHH il MIH, il MOIH ed il VIH e che è suddivisa in due sottofamiglie, cHH e MIH/MOIH/VIH sulla base delle omologie riscontrate nella sequenza primaria (Lacombe et al., 1999). Questa famiglia di peptidi era considerata unica e tipica dei crostacei, ma la caratterizzazione biochimica del *Ion Transport Peptide* (ITP) in alcuni insetti ha dimostrato come questo ormone sia strutturalmente correlato al cHH estendendo i limiti della famiglia agli artropodi (Meredith et al., 1996; Endo et al., 2000; Drexler et al., 2007). La sottofamiglia del cHH comprende peptidi nei quali il preprormone è formato da un peptide segnale, una sequenza intercalata tra il peptide segnale e l'ormone (cHH *Precursor Related Peptide*, CPRP) e il neuropeptide maturo (Weidemann et al., 1989; de Kleijn et al.,

1995). La sottofamiglia MIH/MOIH/VIH differisce per l'assenza del CPRP e per avere invariabilmente un residuo di Gly in posizione 12 (Figura 3).

La prima caratterizzazione molecolare del cHH fu fatta in *C. maenas* dove il peptide isolato dalle ghiandole del seno risultò avere 72 amminoacidi, 3 ponti disolfuro che uniscono le cisteine 1-5, 2-4 e 3-6, l'estremità N-terminale bloccata dal piroglutammato e la valina C-terminale ammidata (Kegel et al., 1989). Successivamente sono stati isolati i cHH di numerose altre specie di crostacei ed i dati ottenuti hanno confermato la consistente omogeneità strutturale che lega questi neuropeptidi formati da una catena di 72 amminoacidi, tre ponti disolfuro sempre nella stessa posizione, un peso molecolare di circa 8400 Da ed un'omologia nella sequenza che varia dal 40% al 99% (Fanjul-Moles, 2006; Giulianini e Edomi, 2006). Nelle sequenze dei peptidi maturi sono stati identificati otto motivi, che sono regioni conservate nelle sequenze. Due di questi motivi, 1 e 3 corrispondenti ai residui 21-40 e 42-61, sono comuni a tutta la famiglia del cHH, mentre i motivi legati alle regioni N- e C-terminale differiscono nelle due sottofamiglie, con i motivi 2 e 5 che sono propri del cHH e i motivi 4 e 6 della sottofamiglia MIH/VIH. Il motivo 5 è invece assente da quelle varianti genetiche del cHH che derivano da *splicing* alternativi quali Mar-cHH-L, Cam-cHH-PO, Prc-cHH-L e Liv-MIH-1 (Figura 4). Le differenze nelle regioni N- e C-terminali tra il cHH e il MIH rivelano l'importanza che questi motivi hanno nel definire la specificità funzionale degli ormoni (Chen et al., 2005).

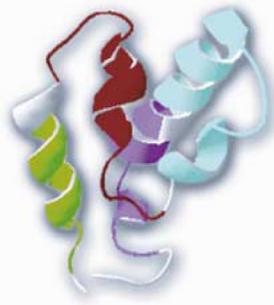
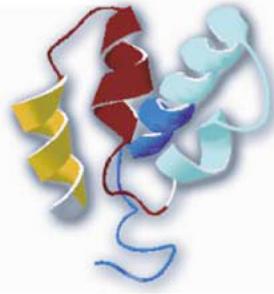
La struttura terziaria è stata risolta solo per il MIH di *Marsupenaeus japonicus* (Katayama et al., 2003) e consiste di cinque alfa eliche, con il residuo di Gly in posizione 12 tipico di questa sottofamiglia facente parte dell'elica $\alpha 1$, e nessun foglietto beta. Per quanto riguarda il cHH, è stato proposto un modello a nastro del Pej-SGP-III basato sul r-Pej-MIH di *M. japonicus* a cui risulta essere molto simile. La sua struttura differisce per l'assenza dell'alfa elica N-terminale, forse dovuta alla mancanza della Gly¹² e della coda C-terminale



Lo schema del colore degli amminoacidi emula lo schema usato per gli allineamenti in Clustal X. L'intensità del colore rispecchia l'indice di conservazione in una determinata posizione. Conservazione e consenso sono riportati in forma grafica in fondo alla tabella.

A

Name	Combined p-value	Motifs					
Arv-GIH	3.16e-27	4	1	3	6		
Foc-MIH-like	1.59e-54	4	1	3	6		
Mee-MIH-A	2.23e-52	4	1	3	6		
Mee-MIH-B	1.09e-50	4	1	3	6		
Maj-SGP-IV(MIH)	2.42e-56	4	1	3	6		
Pem-SGP-C1	7.92e-50	4	1	3	6		
Pem-SGP-C2	1.51e-51	4	1	3	6		
Prc-MIH	8.96e-37	4	1	3	6		
Cam-MIH	1.68e-44	4	1	3	6		
Cap-MIH	4.88e-48	4	1	3	6		
Chf-MIH	8.19e-47	4	1	3	6		
Cas-MIH	1.59e-45	4	1	3	6		
Cap-MOIH	3.52e-33	4	1	3	6		
Hoa-GIH	1.96e-47	4	1	3	6		
Nen-GIH	4.81e-40	4	1	3	7		
Mar-SGP-A	4.24e-41	4	1	3	6		
Mar-SGP-B	2.43e-34	4	1	3	6		
Jal-MIH	1.55e-35	4	1	3	6		
Ers-MIH-like	3.28e-44	4	1	3	7		
Lis-MIH-like	2.67e-47	4	1	3	6		
Trc-MIH-like	5.60e-44	4	1	3	6		
Byt-CHH	3.75e-45	2	1	3	5		
Cap-CHH	1.76e-46	2	1	3	5		
Lie-MOIH	7.10e-45	2	1	3	5		
Cam-CHH-SG	2.78e-46	2	1	3	5		
Cam-CHH-PO	7.61e-34	2	1	3			
Arv-CHH	2.85e-37	2	1	3	5		
Mal-CHH	4.32e-48	2	1	3	5		
Mar-CHH	4.32e-48	2	1	3	5		
Mar-CHH-L	7.39e-45	2	1	3	8		
Jal-CHH	1.07e-45	2	1	3	5		
Ori-CHH	1.28e-55	2	1	3	5		
Prc-CHH	4.69e-55	2	1	3	5		
Prc-CHH-L	4.36e-49	2	1	3	8		
Prb-CHH	3.75e-55	2	1	3	5		
Prb-MIH	8.52e-50	2	1	3	5		
Liv-MIH-1	1.22e-33	2	1	3			
Liv-MIH-2	7.26e-47	2	1	3	5		
Hoa-CHH-A	4.72e-52	2	1	3	5		
Hoa-CHH-B	3.80e-48	2	1	3	5		
Maj-CHH	4.37e-51	2	1	3	5		
Pem-CHH	1.60e-50	2	1	3	5		
Mee-CHH	4.90e-46	2	1	3	5		
Liv-CHH	1.04e-48	2	1	3	5		
Maj-SGP-I	1.78e-45	2	1	3	5		
Maj-SGP-II	3.97e-49	2	1	3	5		
Maj-SGP-III	4.88e-44	2	1	3	5		
Maj-SGP-V	4.37e-51	2	1	3	5		
Maj-SGP-VI	5.74e-51	2	1	3	5		
Maj-SGP-VII	1.46e-47	2	1	3	5		
SCALE		1	25	50	75		

B *Maj-MIH**Maj-CHH*

- Motif 1
- Motif 2
- Motif 3
- Motif 4
- Motif 5
- Motif 6

Figura 4. A: Configurazione dei motivi conservati nelle sequenze dei peptidi della famiglia del cHH dei Crostacei. B: Modelli a nastro del MIH e del cHH di *Marsupenaeus japonicus*. I motivi presenti nelle diverse sequenze sono codificati tramite un codice colore. I motivi 1 e 3 sono comuni a tutta la famiglia, mentre i motivi 2 e 5 sono tipici del cHH, e i motivi 4 e 6 sono condivisi da GIH, MIH e MOIH. Il motivo 5 è assente nelle sequenze dei cHH non peduncolari che derivano da splicing alternativi (Chen et al., 2005).

che, attraverso un'analisi della struttura secondaria, è stato predetto essere una struttura completamente elicoidale (Chen et al., 2004). L'elevata percentuale, circa il 40%, di segmenti elicoidali nel cHH è stata confermata più volte mediante dicroismo circolare (Huberman et al., 1989; Katayama et al., 2002). Sulla base di questi studi strutturali è stato proposto che il sito funzionale di questi neuropeptidi sia localizzato nella parte della sequenza che comprende i domini N- e C-terminali (Katayama et al., 2003).

In numerosi crostacei sono state isolate forme multiple o isoforme del cHH che sono il

risultato di modificazioni post-traduzionali oppure originano dalla codifica di geni multipli o derivano da *splicing* alternativi. In *C. maenas* e in *Cancer pagurus* sono state identificate due forme del cHH che differiscono per avere una come residuo N-terminale il piroglutammato e l'altra la glutammina. Poiché entrambe le forme hanno la stessa attività biologica ed uguale tasso di degradazione, è stato ritenuto che il blocco N-terminale non abbia alcun significato fisiologico e che la presenza di una forma non bloccata sia dovuta alla lentezza della ciclizzazione del residuo all'estremità N-terminale, da cui segue la sua presenza nei terminali della ghiandola del seno (Chung e Webster, 1996). Queste forme con l'estremità N-terminale libera o bloccata sembrano essere ristrette ai granchi nei quali, inoltre, non sono mai stati osservati peptidi con amminoacidi in configurazione D (Chung

et al., 1998). Riportata più frequentemente invece, è la presenza di stereoisomeri che derivano dall'epimerizzazione della Phe in posizione 3, per cui si hanno peptidi con la configurazione L o D, che sono stati identificati in *H. americanus* (Soyez et al., 1994), *Orconectes limosus* (Soyez et al., 1994), *P. clarkii* (Yasuda et al., 1994), *Procambarus bouvieri* (Aguilar et al., 1995), *A. leptodactylus* (Serrano et al., 2003), con l'isomero D che è presente in quantità inferiori rispetto all'enantiomero L, ma che comunque può rappresentare una frazione

cospicua, pari al 30-40% dell'isomero L come in *Cherax destructor* (Bulau et al., 2003). Altre forme sono varianti genetiche e derivano, invece, dalla presenza di più copie del gene per il cHH o da *splicing* alternativo. In *M. japonicus* sono state isolate dalle GS sei isoforme distinte, Pej-SGP-I - Pej-SGP-VI, tutte aventi attività iperglicemizzante eccetto il Pej-SGP-IV che invece è attivo nell'inibire la sintesi degli ecdisteroidi *in vitro* da parte dell'organo Y, e quindi è stato classificato come MIH. Isoforme con lievi differenze nella sequenza amminoacidica e quindi derivate da geni multipli sono state identificate in diverse specie. In *H. americanus* sono stati isolati i cDNA codificanti i preprormoni relativi a due isoforme, cHH-A e cHH-B, che differiscono per un residuo nel peptide segnale, due residui ed una delezione nel CPRP e per sei amminoacidi nel peptide maturo (de Kleijn et al., 1995). Una probabile duplicazione di un gene ancestrale è all'origine dei tre geni, *Pem-cHH-1*, *Pem-cHH-2*, *Pem-cHH-3*, che sono stati descritti in *P. monodon*. Il gene per il Pem-cHH-1 è formato da due esoni ed un introne, mentre i geni dei Pem-cHH-2 e Pem-cHH-3 hanno tre esoni e due introni (Wiwegweaw et al., 2004). Forme multiple con attività iperglicemizzante sono state trovate anche in *M. ensis* (Mee-cHH-A, Mee-cHH-B) (Gu et al., 2000), mentre in *Nephrops norvegicus* le sequenze dei peptidi maturi sono identiche, ma le due isoforme differiscono nei preprormoni, preprocHH-A e preprocHH-B (Mettulio et al., 2004). Dall'organo pericardico di *C. maenas* è stato isolato il PO-cHH, una forma cHH simile la cui sequenza coincide con quella del cHH peduncolare (SG-cHH) per i primi 40 amminoacidi e ne differisce dalla posizione 41 in poi. Le due sequenze sono il risultato di uno *splicing* alternativo, con il SG-cHH derivante dagli esoni I, II e IV, mentre il PO-cHH origina dagli esoni I, II e III (Dirksen et al., 2001). Risultati simili sono stati ottenuti in *Macrobrachium rosenbergii*, dove sono stati identificati due trascritti, *Mar-cHH* e *Mar-cHH-1*. Il primo è stato isolato dai peduncoli oculari e consiste degli esoni I, II e IV, mentre il secondo è stato trovato nel cuore, nel ganglio toracico, nelle

branchie e nelle ghiandole antennali ed è formato dagli esoni I, II, III e IV. Dallo *splicing* del *Mar-cHH-1* con perdita del quarto esone origina infine l'isoforma non peduncolare, il Mar-cHH-L. Le due sequenze peptidiche dedotte dai trascritti sono identiche nei primi 40 residui, mentre differiscono nelle posizioni seguenti (Chen et al., 2004).

Un'evidente caratteristica del cHH è la presenza di una sequenza peptidica, il CPRP, intercalata fra il peptide segnale e l'ormone maturo, da cui è separata da un sito di taglio dibasico. Nelle ghiandole del seno di *Cancer productus* sono stati identificati, mediante NanoLC-ESI-Q-TOF MS/MS, quattro diversi CPRP e 27 peptidi troncati ad essi correlati (Fu et al., 2005). La presenza di forme multiple del CPRP è stata riscontrata anche in *O. limosus* e *N. norvegicus*, specie in cui sono stati caratterizzati i cDNA codificanti il prepro-cHH che è presente in due forme le cui sequenze differiscono a livello del peptide segnale e del CPRP, ma che sono identiche per quanto riguarda la parte relativa all'ormone maturo (De Kleijn et al., 1994; Mettulio et al., 2004). Variazioni infra-specifiche del CPRP sono state riscontrate in *C. productus*. Mediante MALDI-FTMS da ghiandole del seno di singoli individui si è osservato che la distribuzione delle quattro isoforme presenti in questa specie è differenziata fra i diversi individui esaminati. Dei granchi esaminati il 61% possedeva il Capr-CPRP I e II, ma non il III o IV; il 26% Capr-CPRP I, II e III, ma non il IV; il 13% Capr-CPRP I, II e IV, ma non III (Stemmler et al., 2007). L'elevata percentuale di amminoacidi conservati nei CPRP degli Astacura come pure all'interno di *Carcinus* suggerisce che il CPRP abbia una funzione biologica che non è ancora nota, ma che si è mantenuta nel tempo (Mettulio et al., 2004; Fu et al., 2005). Per stabilire se il CPRP risponda ai requisiti richiesti per essere considerato un ormone secreto e circolante, sono stati studiati in *C. pagurus* il sito di sintesi ed i meccanismi di rilascio sia del CPRP che del cHH. Entrambi i peptidi sono co-secreti dalla ghiandola del seno e presenti nell'emolinfa, dove il CPRP viene degradato molto lentamente rispetto al cHH. Dunque il CPRP soddisfa alcuni

criteri per essere considerato un ormone, ma il fatto di avere un'emivita molto lunga è in contrasto con un ruolo ormonale e la sua presenza nell'emolinfa sembra essere solo il risultato di una co-secrezione. (Wilcockson et al., 2002).

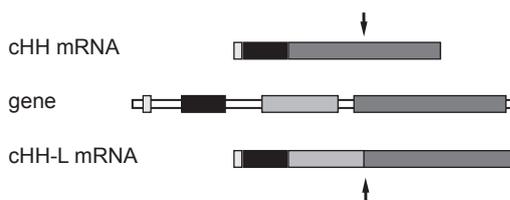
I dati riguardanti la struttura molecolare e l'organizzazione genica del cHH e dei peptidi correlati sono ancora scarsi. In *C. maenas* sono state trovate copie multiple del gene per il cHH che è formato da quattro esoni e tre introni. Il primo esone codifica per i primi cinque amminoacidi del peptide segnale, la parte rimanente del peptide segnale, il CPRP e i primi 40 residui del peptide maturo sono codificati dal secondo esone, gli esoni III e IV codificano per la sequenza C-terminale rimanente rispettivamente del PO-cHH e del SG-cHH (Dirksen et al., 2001). Una simile struttura molecolare è stata riportata anche per *M. rosenbergii* (Chen et al., 2004). Diversa è la struttura genica trovata in *M. ensis*, dove i sei geni per il cHH-A sono raggruppati in un *cluster* sul medesimo segmento cromosomico e sono formati da tre esoni e due introni di cui l'esone I codifica per i primi sei amminoacidi del peptide segnale, l'esone II sino al residuo 41 del peptide maturo e l'esone III per la parte C-terminale rimanente (Gu e Chan, 1998) (Figura 5). Anche in *P. monodon* è stato dimostrato che i geni per il cHH, tre copie del *Pem-cHH-1*, una copia del *Pem-cHH-2* e due copie del *Pem-cHH-2*, sono riuniti in un *cluster*, ma la struttura molecolare dei tre geni identificati è diversa. Il gene *Pem-cHH-1* consta di due esoni ed un introne, mentre i geni *Pem-cHH-2* e *Pem-cHH-3* di tre e due introni (Udomkit et al., 2000; Wiwegweaw et al., 2004).

Maturazione

I processi di maturazione post-traduzionale che portano alla formazione dell'ormone maturo sono stati studiati in dettaglio solamente per quanto riguarda il cHH di *O. limosus* (Ollivaux e Soyez, 2000). Il preormone, sintetizzato nell'organo X, subisce un primo taglio che lo priva del peptide segnale formando il pro-cHH. Questa molecola viene quindi tagliata a livello del sito dibasico Lys-

gene con quattro esoni

cHH di *M. rosenbergii*



gene con tre esoni

cHH di *M. ensis*



MIH di *M. ensis*



Figura 5. Struttura dei geni per il cHH e MIH in due specie di crostacei. In *M. rosenbergii* il gene per il cHH è composto da quattro esoni e tre introni che mediante uno *splicing* alternativo dà origine al cHH nei peduncoli oculari e al cHH-L nel cuore, branchie, ghiandole antennarie e ganli toracici. La freccia indica la posizione del codone di stop. La struttura dei geni per il cHH e MIH di *M. ensis* è più semplice, ogni gene essendo composto da tre esoni e due introni.

Arg da un enzima specifico, la promone convertasi 2 (Toullec et al., 2002), dando origine al CPRP e al cHH e, probabilmente in concomitanza, si ha anche l'ammidazione del C-terminale. Questa importante modifica è catalizzata in maniera sequenziale da parte di due enzimi negli invertebrati, una monossigenasi (*peptidylglycine- α -hydroxylating mono-oxygenase*, PHM) ed una liasi (*peptidyl α -hydroxyglycine- α -amidating lyase*, PAL), o un solo enzima bifunzionale (*peptidylglycine- α -amidating mono-oxygenase*, PAM) nei vertebrati, che agiscono su peptidi in cui è presente una Gly terminale (Kolhekar et al., 1997). Successivamente all'ammidazione si ha la ciclizzazione della Gln N-terminale a formare il piroglutammato che blocca questa estremità della sequenza. L'epimerizzazione della Phe³ di una parte dei peptidi, da cui origina l'isoforma D, avviene in specifici neuroni, all'interno dei granuli di secrezione (Gallois et al., 2003) prima della ciclizzazione del residuo Gln N-terminale (Figura 6).

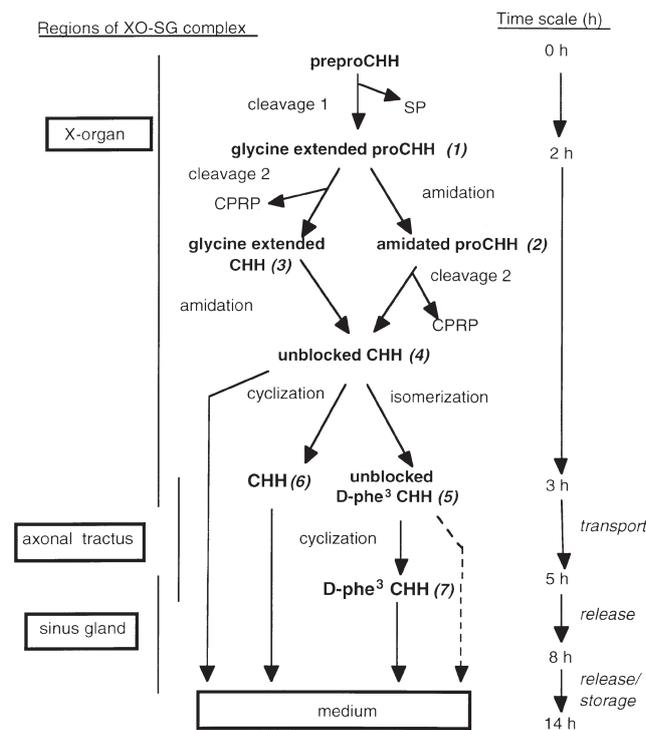


Figura 6. Diagramma del processo di maturazione delle isoforme di cHH nell'organo X di *O. limosus*. SP: peptide segnale, CPRP: cHH Precursor Related Peptide. Tratto da Ollivaux e Soyez (2000).

Delle modifiche post-traduzionali a cui va incontro il cHH, l'ammidazione è la più importante ed è fondamentale per conferirgli attività biologica. Numerosi peptidi identificati negli invertebrati e nei vertebrati recano l'estremità C-terminale ammidata come ad esempio: sostanza P, vasopressina, ossitocina, gastrina, l'ormone adipocinetico della locusta, molti peptidi antimicrobici dei gamberi (Prigge et al., 2000). Circa la metà dei neuropeptidi noti è ammidata, di cui i neuropeptidi secreti sono quasi l'esclusivo substrato per l'ammidazione. L'ammidazione, prevenendo la ionizzazione del dominio C-terminale, potrebbe rendere il peptide più idrofobico e quindi facilitare il legame col recettore. Infatti, studi condotti sull'interazione tra recettore e ligando hanno mostrato come l'ammide C-terminale sia determinante nel regolare l'affinità di legame (Gigoux et al., 1999). Nei crostacei l'ammidazione C-terminale riguarda numerosi neuropeptidi ed è stata trovata nel RPCH (Christensen et al., 1979), PDH (Riehm et al., 1985), cHH (Kegel et al., 1989; Huberman et al., 1993), MIH (Aguilar et al., 1996; Sonobe et al., 2001; Bulau et al.,

2005), VIH (Tsutsui et al., 2007). L'importanza dell'ammidazione C-terminale nel conferire un'attività biologica è stata sinora dimostrata nei crostacei solo per pochi neuropeptidi. In *U. pugilator* è stato osservato che analoghi sintetici del PDH, 1-17-NH₂ e 1-18-NH₂, erano tre volte più potenti del peptide 1-18-OH nell'indurre la dispersione del pigmento nei granchi epeduncolati (Riehm et al., 1985). Anche per il RPCH di *Leander adspersus* si sono ottenuti risultati analoghi, con il peptide ammidato che induceva la risposta maggiore (Christensen et al., 1979). Il gruppo funzionale ammidico è stato dimostrato essere importante anche per l'attività funzionale del VIH di *H. americanus*. Mediante un saggio *in vitro* eterologo usando frammenti ovarici di *M. japonicus* si è osservato che il peptide ricombinante rHoa-VIH-ammide riduceva significativamente i livelli del mRNA per le vitellogenine rispetto al rHoa-VIH-OH (Ohira et al., 2006). Per quanto riguarda il cHH la rilevanza dell'ammidazione per l'attività iperglicemizzante di questo ormone è stata dimostrata sinora solo per il cHH di *M. japonicus*, dove la funzionalità del peptide ricombinante Pej-SGP-I-ammide era comparabile con quella del peptide nativo, mentre il rPej-SGP-I-OH e il rPej-SGP-Gly avevano mostrato un'attività ridotta di un ordine di grandezza (Katayama et al., 2002).

Funzione

I primi dati sulla presenza di un fattore diabetogeno associato ai peduncoli oculari risalgono al 1944 quando Abramowitz dimostrò che un estratto di peduncoli oculari induceva un rapido ed intenso aumento della glicemia in *C. sapidus*. Studi successivi hanno confermato questi risultati ed il fattore iperglicemizzante fu identificato come un ormone prodotto dall'organo X e chiamato *crustacean Hyperglycemic Hormone*. Il cHH rappresenta la frazione principale dei neuropeptidi sintetizzati dall'organo X, 270-489 pmol/GS per il cHH contro 36-55 pmol/GS per il MIH di *C. maenas* (Chung e Webster, 2003) oppure 5, 18, 60,

20 ng/GS rispettivamente per il GIH, MIH, cHH-I e cHH-II di *P. bouvieri* (Huberman et al., 1995) e la sua principale funzione è quella del controllo del tasso glicemico nell'emolinfa. L'attività del cHH nel controllo della glicemia si esplica essenzialmente a livello muscolare e dell'epatopancreas dove l'ormone inibisce rapidamente la glicogeno sintetasi e favorisce il catabolismo del glicogeno attivando la glicogeno fosforilasi (Sedlmeier, 1982; Sreenivasula Reddy et al., 2007). Il cHH si lega ad uno specifico recettore di membrana (Kummer e Keller, 1993; Chung e Webster, 2006), che per quanto riguarda il cHH di *P. clarkii* è una guanilil ciclasi di membrana (Liu et al., 2004) la quale attraverso la formazione di cGMP come secondo messaggero attiva la cascata dei segnali cellulari accoppiati al metabolismo del glucosio (Goy, 1990; Chung e Webster, 2006). In *Gecarcinus lateralis* il cHH si lega in maniera specifica alla guanilil ciclasi II che è presente in diverse isoforme differenzialmente distribuite nei vari tessuti. Poiché il cHH è un ormone pleiotropico, ci si aspetta che i suoi recettori siano espressi in tutti i tessuti. Le diverse isoforme della guanilil ciclasi II potrebbero quindi conferire risposte tessuto-specifiche alle isoforme del cHH, modulando attività biologiche distinte (Lee et al., 2007). La secrezione del cHH da parte dei neuroni dell'organo X è regolata attraverso un feedback negativo legato alla concentrazione di glucosio nell'emolinfa (Glowik et al., 1997), stimolata dalla serotonina (Santos et al., 2001; Lorenzon et al., 2004) mentre la dopamina ed L-encefalina esercitano un effetto iper o ipoglicemizzante che sembra essere specie-specifico (Lorenzon et al., 2004).

Oltre all'attività iperglicemizzante, il cHH esplica numerose altre funzioni intervenendo sia nel controllo del metabolismo che della riproduzione. Gli effetti del cHH sul metabolismo dei lipidi sono stati studiati in *Chasmagnathus granulata*, *C. maenas* e *O. limosus*. L'epeduncolazione causa una diminuzione significativa dei lipidi circolanti nell'emolinfa di *C. granulata* e degli acidi grassi liberi in *C. maenas*, mentre uno studio *in vitro* in *O. limosus* ha dimostrato che il rilascio da parte

dell'epatopancreas di acidi grassi liberi e fosfolipidi è aumentato in presenza del cHH (Santos et al., 1997). Il cHH controlla anche il rilascio dell'amilasi da parte della ghiandola dell'intestino medio, come dimostrato da un esperimento *in vitro* in *C. maenas* in cui il cHH induceva un aumento della secrezione dell'enzima (Sedlmeier, 1988).

In alcuni casi è stato dimostrato che la multifunzionalità del cHH origina dalla sua variabilità strutturale dovuta a processi post-traduzionali o a varianti genetiche. In *P. clarkii* sono state identificate due varianti del cHH, cHH I e cHH II, distinte per l'epimerizzazione della Phe³. Entrambe le due isoforme hanno attività iperglicemizzante, ma l'isoforma D, Prc-cHH II, è risultata capace di reprimere la sintesi di ecdisteroidi *in vitro* da parte dell'organo Y ad una concentrazione 10 volte inferiore all'isoforma L (Yasuda et al., 1994). L'organo Y è la sede di sintesi degli ecdisteroidi che sono gli ormoni della muta. La produzione di ecdisteroidi è regolata negativamente dal MIH, ma in *C. maenas* è stato provato, *in vitro* su espianti di organo Y, che anche il cHH ha un effetto inibitorio sull'organo Y, sebbene a concentrazioni dieci volte superiori rispetto al MIH (Chung e Webster, 2005). Da notare che in questa specie il cHH è presente nell'emolinfa a concentrazioni di un ordine di grandezza superiori a quelle del MIH e quindi la sua azione, *in vivo*, non può essere marginale. Il cHH sembra essere coinvolto nel controllo della crescita in senso lato, non solo regolando la muta, ma anche avendo un'azione inibitoria sulla sintesi del metil-farnesoato, ormone che ha un ruolo centrale nella regolazione dello sviluppo e della riproduzione. Infatti, in *Libinia emarginata* è stato isolato un neuropeptide capace di inibire la sintesi *in vitro* del MF da parte dell'organo mandibolare e nel contempo di avere un'attività iperglicemizzante *in vivo* in *U. pugilator* (Liu et al., 1997).

Un ruolo specifico sostenuto dalle forme stereoisomere del cHH nel controllo di un'altra funzione, l'osmoregolazione, è stato stabilito in *A. leptodactylus* dove il D-Phe³-cHH oltre ad avere un effetto iperglicemizzante maggiore induceva

un aumento dell'osmolarità e della concentrazione di Na⁺ nell'emolinfa (Serrano et al., 2004). Il ruolo esercitato dal cHH nel controllo del trasporto ionico branchiale è stato dimostrato in *Pachygrapsus marmoratus* dove il cHH era in grado di aumentare l'influsso di Na⁺ (Spanings-Pierrot et al., 2000). Più recentemente attraverso un saggio sulla cinetica di legame del cHH ai recettori presenti nelle branchie di *C. maenas* è stato dimostrato che solo il cHH è in grado di indurre questo effetto, al contrario di cCAP, MIH e CPRP (Chung e Webster, 2006). Un elevato aumento del cHH circolante di anche 100 volte è stato osservato durante la tarda premeta e l'ecdisi in *C. maenas* (Chung et al., 1999). In questo caso il cHH non origina dai peduncoli oculari, bensì da alcuni paraneuroni dell'intestino anteriore e posteriore. L'improvviso aumento del cHH serve a regolare l'assorbimento dell'acqua in modo da favorire il rigonfiamento necessario per l'ecdisi e il successivo incremento nella taglia.

Diversi studi hanno indotto a ritenere che il cHH sia coinvolto anche nel controllo della riproduzione, ma i risultati ottenuti nelle diverse specie studiate sono contrastanti riguardo all'effetto esercitato. Il ciclo riproduttivo di *H. americanus* è stato studiato prendendo in considerazione il livello del mRNA di cHH e GIH nell'organo X, la presenza dei relativi peptidi nella ghiandola del seno e la loro concentrazione nell'emolinfa. La concentrazione del cHH nell'emolinfa varia durante il ciclo vitale, con un aumento durante la maturazione. Interessante è la variazione del rapporto fra il mRNA-cHH-A e il mRNA-cHH-B, con il primo che è presente ad un livello elevato nella previtellogenesi, mentre la concentrazione del secondo è aumentata negli stadi di previtellogenesi e di maturazione. Tutto ciò suggerisce che il cHH sia coinvolto nell'innescare la vitellogenesi (de Kleijn et al., 1998). Un diverso livello di espressione degli mRNA per due isoforme di cHH è stato trovato anche in *M. ensis*. In questa specie è stato osservato un elevato livello del mRNA-cHH-A durante i primi stadi della vitellogenesi, mentre il mRNA-cHH-B ha un livello minimo durante lo stadio mediano della vitellogenesi per poi

avere un massimo prima della deposizione. Queste osservazioni fanno ritenere che il rapporto fra le due isoforme sia importante per la regolazione della vitellogenesi (Gu et al., 2000). Risultati contrastanti sono stati ottenuti attraverso un saggio eterologo *in vitro* in cui peptidi della famiglia del cHH, purificati da estratti di ghiandole del seno di *M. japonicus*, inibivano la sintesi proteica e del mRNA negli ovari espianati di *P. semisulcatus* (Khayat et al., 1998). In un saggio omologo condotto su *M. japonicus* i risultati ottenuti sono stati simili, ed hanno messo in evidenza che, delle varie isoforme di cHH identificate, solo il Pej-SGP-III era in grado di inibire la sintesi del mRNA per le vitellogenine (Tsutsui et al., 2005).

Accanto alle funzioni esercitate nel controllo del metabolismo e della riproduzione il cHH è coinvolto nelle risposte a numerosi stressori ambientali, quali l'ipossia o i metalli pesanti. Condizioni ambientali sfavorevoli inducono un aumento della glicemia che è il risultato di un aumento della concentrazione di cHH circolante (Lorenzon, 2005). Il livello emolinfatico del cHH segue un ritmo circadiano in cui è presente un livello basale diurno ed un aumento della concentrazione di ormone circolante durante le ore notturne (Kallen et al., 1990). La secrezione del cHH nell'emolinfa è molto rapida, di pochi minuti dopo un evento stressorio, ed ha un andamento pulsatile od episodico atto a mantenere una concentrazione basale pari a circa 20 fmol/mL in *C. maenas* (Chung e Webster, 2005), 4 fmol/mL in *H. americanus* (Chang et al., 1998) o inferiore a 10 pmol/L in *C. pagurus* (Webster, 1996).

Manipolazione ormonale

I crostacei sono largamente allevati in tutto il mondo ed il controllo della riproduzione, che è fondamentale per un'efficiente gestione dei riproduttori e delle tecniche di produzione delle uova e delle larve, si basa unicamente sull'ablazione dei peduncoli oculari (Okumura, 2004). A tutt'oggi gli studi condotti per modulare dall'esterno l'asse endocrino organo X-ovari sono molto scarsi. Gli unici due dati positivi sinora presentati riguardano

l'uso di anticorpi specifici per inibire il cHH. In un saggio *in vivo* su *Palaemon elegans* è stato dimostrato che l'aggiunta di un anticorpo anti-cHH all'estratto di ghiandole del seno, prima della sua iniezione negli animali, inibiva l'attività ormonale. Da qui l'idea che gli anticorpi possano costituire un mezzo per modulare l'attività ormonale *in vivo* (Giulianini et al., 2002). Nel secondo studio, invece, è stato dimostrato che l'anticorpo iniettato direttamente nell'animale causa una diminuzione della glicemia del 30%-50%, dimostrando che un anticorpo specifico può essere adoperato per deprimere l'attività del cHH *in vivo* (Treerattrakool et al., 2006).

Scopo della tesi

Le funzioni biologiche svolte dai numerosi neuropeptidi sinora isolati dalla ghiandola del seno dei crostacei sono ancora poco chiare, soprattutto per il pleiotropismo funzionale posseduto da alcuni di questi peptidi. La possibilità di produrre, tramite tecniche di biologia molecolare, discrete quantità di ormoni ricombinanti con cui condurre saggi *in vivo/in vitro* è molto importante per ottenere una migliore comprensione delle funzioni di questi ormoni e per verificare quali modificazioni post-traduzionali siano rilevanti per la loro funzionalità biologica. Il presente progetto ha come obiettivi: lo studio del ruolo che l'ammidazione C-terminale ha nel conferire attività biologica al cHH di *A.*

leptodactylus, una specie pontica di notevole interesse economico; lo studio della funzione svolta dal cHH nella riproduzione; la modulazione dell'attività biologica del cHH mediante anticorpi specifici. A tal fine sono stati effettuati dei saggi omologhi ed eterologhi *in vivo* con trattamenti a base di cHH ricombinante ed anticorpi specifici anti-cHH.

La prima parte del progetto ha riguardato l'espressione, la purificazione e la caratterizzazione biochimica di due peptidi distinti a partire da cDNA di *A. leptodactylus* già esistente. Il primo peptide è il cHH-Gly che è il precursore del cHH-NH₂, il secondo peptide ad essere stato prodotto. La seconda parte si è focalizzata invece sull'esecuzione di saggi *in vivo* con i peptidi ricombinanti. Inoltre è stato prodotto un anticorpo anti-cHH di *A. leptodactylus* che è stato usato per verificare se fosse possibile deprimere la risposta biologica al cHH tramite l'iniezione dell'anticorpo nei gamberi.

Tali sperimentazioni potranno contribuire ad una migliore comprensione del ruolo svolto dall'ammidazione nel conferire funzionalità biologica al cHH ed alla stesura di protocolli di modulazione della condizione di maturità gonadica dei riproduttori, ad esempio tramite trattamenti ormonali accoppiati al blocco della funzionalità di altri fattori per mezzo di anticorpi specifici, negli impianti acquacolturali.

Materiali e metodi

Clonaggio del cDNA nel vettore di espressione

Clonaggio del *Asl-rcHH-Gly-Lys*

Il cDNA codificante per il cHH maturo di *A. leptodactylus*, precedentemente ottenuto tramite RT-PCR da RNA di peduncoli oculari (Mettulio et al., 2004), è stato amplificato dal vettore pET28a-cHH con i *primer* specifici ALE1, N-terminale (5'-ATGGTAGGTCTCAGCGCCCAGGTGTTCGATCAGGCGTGTA-3', in corsivo il sito di restrizione per *BsaI*) e ALE2, C-terminale (5'-ATGGTAGGTCTCATATCACTTGCCGACCATCTGGACTCC-3', in corsivo il sito di restrizione per *BsaI*, in grassetto il codone di fine) al fine di ottenere il peptide maturo composto da 74 amminoacidi. La miscela di amplificazione era costituita dal tampone di reazione 1 x, dNTP 200 µM ciascuno, *primer* 0,5 µM, Taq *Vent* (Neb) 0,6 U e da 1 µL del vettore pET28a-cHH in un volume finale di 50 µL. Le condizioni di amplificazione erano le seguenti: una denaturazione iniziale a 94 °C per 10 min; 30 cicli di denaturazione a 94 °C per 30 sec, appaiamento a 55 °C per 30 sec ed estensione a 72 °C per 45 sec; un'estensione finale a 72 °C per 5 min. Il prodotto dell'amplificazione è stato controllato su gel d'agarosio al 1,5%. L'inserto è stato purificato da gel d'agarosio al 1%, usando il kit Montage DNA gel extraction (Millipore) e quindi digerito per 5 h a 50 °C con 20 U di *BsaI* (NEB) nel tampone 1 x NEB3. Dopo l'inattivazione dell'enzima a 65° C per 20 min, il cDNA digerito è stato purificato con il kit Jetquick Gel Extraction Spin (Genomed) e ligato al vettore pPR2 (IBA) a 16 °C O/N con 0,5 U di T4 USB Ligase (USB) in un volume finale di 10 µL, generando il vettore d'espressione *Asl-cHH-Gly-Lys-pPR2*. Il vettore pPR2 era stato preparato per la ligazione mediante digestione con 20 U di *BsaI* (NEB) a 50 °C per 1 h ed un successivo passaggio di inattivazione dell'enzima a 65 °C per 20 min.

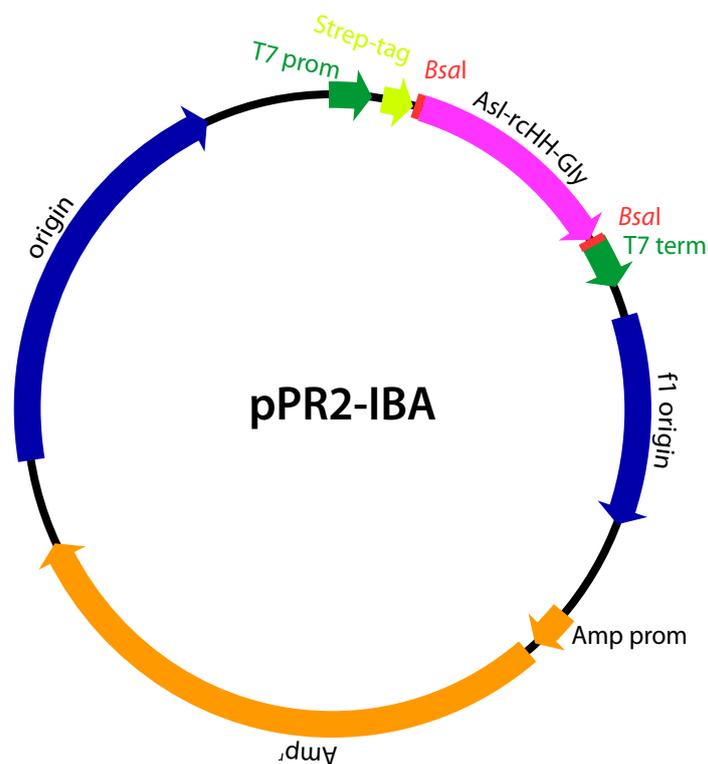
Clonaggio del *Asl-rcHH-Gly*

Il cDNA codificante per *Asl-rcHH-Gly-Lys* clonato in pPR2 è stato amplificato

con i *primer* specifici ALE1, N-terminale (5'-ATGGTAGGTCTCAGCGCCCAGGTGTTCGATCAGGCGTGTA-3', in corsivo il sito di restrizione per *BsaI*) e ALEAMID2, C-terminale (5'-ATGGTAGGTCTCATATCAGCCGACCATCTGGACTCCGAGGA-3', in corsivo il sito di restrizione per *BsaI*, in grassetto il codone di fine e sottolineati i tre nucleotidi codificanti per la Gly terminale) per ottenere il peptide di 73 amminoacidi recante la glicina C-terminale come donatore del gruppo ammidico (Figura 7). La miscela di amplificazione era costituita dal tampone di reazione 1 x, dNTP 200 µM ciascuno, *primer* 0,5 µM, Ex Taq (TaKaRa) 1 U e da 1 µL (200 ng) del vettore pPR2-cHH in un volume finale di 50 µL. Le condizioni di amplificazione erano le seguenti: una denaturazione iniziale a 94 °C per 10 min; 30 cicli di denaturazione a 94 °C per 30 sec, appaiamento a 55 °C per 30 sec ed estensione a 72 °C per 45 sec; un'estensione finale a 72 °C per 5 min. Il prodotto dell'amplificazione è stato controllato su gel d'agarosio. Il cDNA è stato purificato da gel d'agarosio al 1,5% usando il kit Jetquick Gel Extraction Spin (Genomed) e quindi digerito per 2 h a 50 °C con 20 U di *BsaI* (NEB) nel tampone 1 x NEB3. Dopo l'inattivazione dell'enzima a 65 °C per 20 min, il DNA digerito è stato ligato al vettore pPR2 (IBA) a 16 °C O/N con 1 U di T4 USB Ligase (USB) in un volume finale di 20 µL, generando il vettore d'espressione *Asl-cHH-Gly-pPR2*. Il vettore pPR2 era stato preparato per la ligazione mediante digestione con 20 U di *BsaI* (NEB) a 50 °C per 1 h e quindi l'enzima è stato inattivato a 65 °C per 20 min.

Espressione dei peptidi ricombinanti

I vettori d'espressione *Asl-cHH-Gly-Lys-pPR2* e *Asl-cHH-Gly-pPR2* sono stati usati per trasformare il ceppo *E. coli* XL1-Blue. A 100 µL di cellule competenti sono stati aggiunti 2 µL di vettore e quindi mantenute per 15 min in ghiaccio, portate a 42 °C per 50 sec e raffreddate per 2 min a 4 °C. Al termine dell'incubazione, ai batteri trasformati sono stati aggiunti 900 µL di terreno SOC a 4 °C



ALE1 for 5'ATGGTA GGTCTC Agc gcc CAG GTG TTC GAT CAG GCG TGT A-----TC TCC GGA GTC CAG ATG GTC GGC T 3'
 3'G GTC CAC AAG CTA GTC CGC ACA T-----AG AGG CCT CAG GTC TAC CAG CCG Act ata CTCTGG ATGGTA 5' ALEAMID2 rev
 Gly Ala Gln Val Phe Asp Gln Ala Cys ----- Ser Gly Val Gln Met Val Gly end
 Asl-rCHH-Gly

Figura 7. Schema del vettore d'espressione. Il cDNA per il cHH di *A. leptodactylus* è stato inserito usando i siti di restrizione per *Bsal*. Il promotore T7 garantisce l'espressione del DNA clonato dopo induzione con IPTG. Amp^r conferisce la resistenza all'ampicillina.

ed incubati a 37 °C. Dopo 1 h, 100 µL sono stati piastrati su un terreno con 100 µg/mL di ampicillina ed incubati O/N a 37 °C. Su dieci colonie è stata fatta una PCR di controllo per identificare quelle recanti l'inserto. Ogni colonia è stata stemperata in 20 µL di terreno 2 x YT, di cui 10 µL sono stati conservati a 4 °C per fungere da inoculo, e gli altri 10 µL aggiunti a 40 µL di Tween 20 0,1% in acqua, congelati e poi bolliti per 5 min. La miscela per l'amplificazione era costituita dal tampone di reazione 1x, dNTP 200 µM ciascuno, MgCl₂ 1,5 mM, primer 0,5 µM, Taq (Invitrogen). Le condizioni di amplificazione erano le seguenti: una denaturazione iniziale a 94 °C per 10 min; 30 cicli di denaturazione a 94 °C per 30 sec, appaiamento a 55 °C per 30 sec ed estensione a 72 °C per 45 sec; un'estensione finale a 72 °C per 5 min. I prodotti della PCR sono stati controllati su gel d'agarosio al 2%. Con i 10 µL conservati di una

colonia positiva sono stati inoculati 5 mL di terreno 2xYT, ampicillina 100 µg/mL, e fatti crescere O/N a 37 °C. I vettori sono stati poi purificati dalle cellule mediante il Jetquick Plasmid Purification Spin kit (Genomed).

Per l'espressione del cHH ricombinante è stato scelto il ceppo di *E. coli* BL21(DE3)pLys (Promega). Le cellule sono state trasformate seguendo il protocollo descritto precedentemente ed usando 1 µL di vettore Asl-cHH-Gly-Lys-pPR2 o Asl-cHH-Gly-pPR2. L'efficienza della trasformazione è stata controllata mediante PCR, usando il metodo ed i parametri descritti nel paragrafo precedente. I prodotti della PCR di cinque colonie sono stati controllati su gel d'agarosio al 2% ed una delle colonie risultate positive fatta crescere O/N a 37 °C in 6 mL di terreno 2xYT, ampicillina 100 µg/mL. 300 mL dello stesso terreno sono stati

inoculati con la pre-coltura ed incubati a 37 °C. Quando la densità ottica a 600 nm era pari a 0,5, è stato aggiunto isopropil-β-tiogalattoside (IPTG) ad una concentrazione finale di 0,5 mM. Dopo tre ore di incubazione le cellule sono state raccolte mediante centrifugazione. Per controllare il successo dell'induzione sono stati prelevati 500 µL della coltura prima dell'aggiunta dell'IPTG, centrifugati 5 min a 12 000 x g, ed il fondello risospeso in 25 µL di *sample buffer* 2 x (Tris-HCl 0,5 M, glicerolo 20%, SDS 4%, β-mercapto-etanolo 10%, blu di bromofenolo 0,05%, pH 6,8). Al termine dell'induzione sono stati prelevati 500 µL di coltura, centrifugati 5 min a 12 000 x g, ed il fondello risospeso in 50 µL di *sample buffer* 2x. Entrambi i campioni sono stati quindi analizzati mediante elettroforesi su gel di acrilammide al 10% SDS-PAGE tricina.

Refolding e purificazione

Le cellule batteriche centrifugate sono state risospese in 3 mL di tampone di lisi [Tris-HCl 100 mM, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, Triton X-100 0,5% (v/v), pH 8], sonicate e, dopo l'aggiunta di lisozima ad una concentrazione finale di 0,1 mg/mL, la sospensione è stata incubata a temperatura ambiente (TA) per 20 min. La sospensione è stata poi centrifugata per 20 min a 4 °C e 12 000 x g. Il sedimento è stato risospeso in 1 mL di tampone di lisi e sonicato per 30 sec. Questo passaggio è stato ripetuto per due volte. Dopo l'ultima centrifugazione, il sedimento è stato risospeso in 1 mL di tampone di lavaggio [Tris-HCl 100 mM, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, ditioneitolato (DTT) 1 mM, pH 8], sonicato per 30 sec e centrifugato per 20 min a 4 °C e 12 000 x g. Il fondello è stato risospeso e portato ad un volume finale di 1,5 mL con il tampone di solubilizzazione (Tris-HCl 100 mM, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, urea 8 M, DTT 1 mM, pH 8) ed incubato per 2 h a TA. Dopo un'ultima centrifugazione di 20 min a 15 °C e 20 000 x g, il soprannatante è stato raccolto.

Il *refolding* del peptide è stato fatto mediante cromatografia di esclusione su colonna. Una colonna da 5 mL HiTrap™ Desalting (GE Healthcare) è stata

equilibrata con il tampone di *refolding* [Tris 100 mM, L-arginina 0,5 M, NaCl 10 mM, CaCl₂ 2 mM, MgCl₂ 2 mM, PEG 8000 0,05% (p/v), L-glutazione ridotto 5 mM, L-glutazione ossidato 0,5 mM, pH 8,5] ad un flusso di 5 mL/min. Il peptide solubilizzato è stato caricato sulla colonna ed eluito con lo stesso tampone redox usato per equilibrare la colonna ad un flusso di 0,5 mL/min. Il rcHH foldato è stato purificato su una colonna Strep-Tactin® Superflow® (IBA) da 1 mL seguendo il protocollo della ditta per la purificazione manuale. Nel caso del peptide Asl-rcHH-Gly da usare per l'ammidazione, il tampone di eluizione è stato scambiato con un altro tampone (Tris-HCl 1 M, pH 7) con un ultimo passaggio su una colonna da 5 mL Hitrap™ Desalting (GE Healthcare) ad un flusso di 5 mL/min.

Reazione di ammidazione

Per la reazione di ammidazione, sono stati mescolati 100 µg di Asl-rcHH-Gly (400 µL) con 800 µL dell'enzima di ammidazione [*peptidylglycine α-amidating enzyme* (Wako) 750 U/mL, Tris 100 mM, NaCl 0,3 M, pH 9,3] e con 800 µL della soluzione di reazione [N-etilmaleimide 2,5 mM, acido ascorbico 2,5 µM, CuSO₄ 50 µM, Thesit 0,25% (v/v), catalasi 0,05% (p/v)]. Questa soluzione di ammidazione è stata incubata a 37 °C per 24 h e la reazione bloccata con l'aggiunta di 20 µL di acido trifluoroacetico (TFA). L'Asl-rcHH-ammide è stato purificato su un sistema HPLC (Gilson) che montava una colonna Zorbax SB300 CN da 2,1 x 150 mm (Agilent Technologies Inc., DE, USA) termostata a 25 °C. L'eluente A era TFA 0,1% in acqua, l'eluente B era TFA 0,1% in acetonitrile. La separazione è stata fatta usando un gradiente di B 0-30% in 5 min, B 30%-56% in 30 min e B 56%-90% in 2 min a 0,3 mL/min.

Spettrometria di massa

Le frazioni purificate tramite RP-HPLC sono state mescolate in rapporto 1:1 con una matrice di acido alfa-ciano-4-idrossi cinnamico (5mg/mL in 70% acetonitrile). 1 µL della miscela è stato depositato sulla piastra MALDI e analizzato sul

MALDI-TOF/TOF 4800 Proteomics Analyzer (Applied Biosystems) in modalità lineare a ioni positivi.

Dicroismo circolare

I campioni per la spettroscopia di dicroismo circolare sono stati preparati dissolvendo i peptidi, che erano stati purificati in RP-HPLC e liofilizzati, in Tris-HCl 5 mM pH 7. La concentrazione di Asl-rcHH-Gly e di Asl-rcHH-NH₂ era rispettivamente 21,6 e 6 µM. Gli spettri del dicroismo circolare sono stati registrati su uno spettropolarimetro Jasco J-810 nell'intervallo di 190-250 nm usando cuvette al quarzo da 0,1 cm. Per ogni spettro sono state registrate cinque scansioni a 10 nm/min e l'ellitticità media dei residui (MRE, deg cm² dmol⁻¹ residuo⁻¹) è stata calcolata dallo spettro corretto sulla linea di fondo. Una stima quantitativa delle strutture secondarie presenti è stata ottenuta usando il programma CDSSTR dal server DichroWeb (Lobley et al., 2002).

Estratto di ghiandole del seno

Venti peduncoli oculari di *A. leptodactylus* e *P. clarkii* sono stati sezionati e le ghiandole del seno raccolte e messe in 100 µL di una soluzione d'estrazione (MetOH 90%, acido acetico 9%, H₂O 1%). Dopo sonicazione, il campione è stato centrifugato per 10 min a 4 °C e 12 000 xg ed il soprannatante raccolto. Il fondello è stato risospeso in 100 µL della soluzione d'estrazione e centrifugato nuovamente. I due soprannatanti sono stati quindi mescolati assieme e la soluzione lasciata evaporare per tutta la notte a temperatura ambiente. L'estratto secco è stato dissolto in 50 µL di acqua MilliQ.

Purificazione del cHH nativo

Venti peduncoli oculari di *A. leptodactylus* sono stati sezionati e le ghiandole del seno raccolte e messe in 100 µL di una soluzione d'estrazione (MetOH 90%, acido acetico 9%, H₂O 1%). Dopo sonicazione, il campione è stato centrifugato per 10 min a 4 °C e 12 000 xg ed il soprannatante raccolto. Il fondello è stato risospeso in 100

µL della soluzione d'estrazione e centrifugato nuovamente. I due soprannatanti sono stati quindi mescolati assieme. Il cHH estratto è stato purificato su un sistema HPLC (Gilson) che montava una colonna Zorbax SB-C18 da 4,6x150 mm (Agilent Technologies Inc., DE, USA) termostata a 25 °C. L'eluente A era TFA 0,1% in acqua, l'eluente B era TFA 0,1% in acetonitrile. La separazione era stata fatta usando un gradiente di B 0-100% in 60 min a 1 mL/min. Le singole frazioni raccolte sono state liofilizzate e risospese in 60 µL di PBS sterile. La presenza del cHH nelle frazioni purificate tramite RP-HPLC è stata verificata mediante un saggio ELISA. 2 µL di campione sono stati aggiunti a 200 µL di PBS ed il tutto dispensato nei pozzetti della micropiastrella ed incubato O/N a 4 °C. La soluzione di *coating* è stata quindi rimossa ed i pozzetti lavati tre volte con una soluzione di lavaggio (PBS, Tween 20 0,05%). La saturazione dei siti liberi è stata fatta con 300 µL di PBS, Tween 20 0,05%, BSA 3% con un'incubazione di 1 h a TA. Dopo tre lavaggi con la soluzione di lavaggio, sono stati aggiunti 200 µL di anticorpo anti-Asl-rcHH diluito 1:5 000 in PBS con un'incubazione di 3 h a TA. Ai pozzetti, lavati come nel passo precedente, sono stati aggiunti 200 µL di anticorpo anti-coniglio coniugato con perossidasi diluito 1:10 000 in PBS ed incubati per 2 h a TA. Dopo un ultimo lavaggio, sono stati aggiunti 100 µL di una soluzione cromogena (1-Step™ Ultra TMB-ELISA, Pierce) e la reazione bloccata con l'aggiunta di 50 µL di acido solforico 1 M. L'assorbanza è stata misurata a 450 nm su un lettore per micropiastrella (Anthos 2020).

Misura della concentrazione

La concentrazione dei peptidi ricombinanti e del cHH nativo è stata determinata mediante assorbimento UV a 280 nm su uno spettrofotometro Jenway (Genova) usando una cuvette al quarzo da 1 cm. Per i peptidi ricombinanti è stato usato il valore del coefficiente di estinzione molare di 14 815 M⁻¹ cm⁻¹ riferito alla forma ossidata, mentre per il peptide nativo è stato usato il valore di estinzione molare di 9 315 M⁻¹ cm⁻¹. Entrambi i valori sono stati

calcolati usando il programma ProtParam sul server ExPASy (Gasteiger et al., 2005). La concentrazione dell'anticorpo purificato per affinità è stata determinata mediante assorbimento UV a 280 nm usando il valore del coefficiente di estinzione di massa (E0 1%, 1 mg/ml) di $1,4 \text{ g}^{-1} \text{ L cm}^{-1}$.

Produzione e purificazione di anticorpi anti-Asl-rcHH-Val-Gly

Per ottenere i sieri policlonali sono stati iniettati in due conigli 200 μg di Asl-rcHH-Val-Gly mescolati con adiuvante completo di Freund al 50% in soluzione salina e successivamente la stessa quantità di peptide in adiuvante incompleto ogni tre settimane. Le IgG sono state purificate dal siero mediante cromatografia di affinità su una colonna HiTrap™ Protein A HP (GE Healthcare) da 1 mL. 1,5 mL di siero sono stati caricati sulla colonna equilibrata con un tampone fosfato 20 mM, pH 7 e gli anticorpi eluiti con un tampone citrato 0,1 M, pH 3 a 1 mL/min. Alle frazioni da 500 μL raccolte sono stati aggiunti 100 μL di Tris-HCl 1 M, pH 9 per neutralizzare il tampone di eluizione e la purificazione controllata tramite elettroforesi su gel di acrilammide al 10% SDS-PAGE. L'anticorpo così ottenuto è stato ulteriormente purificato per affinità contro il cHH ricombinante. La colonna per la cromatografia di affinità è stata preparata usando il kit AminoLink® Plus Immobilization (Pierce). Circa 0,7 mg di peptide ricombinante sono stati legati alla resina, seguendo il protocollo fornito dalla ditta per l'accoppiamento a pH 10. 1 mL di anticorpo purificato su proteina A è stato caricato sulla colonna ed eluito con un tampone glicina 0,1 M, pH 3. Alle frazioni da 500 μL raccolte sono stati aggiunti 25 μL di Tris-HCl 1 M, pH 9 e la purezza dell'anticorpo eluito controllata mediante elettroforesi su gel di acrilammide al 10% SDS-PAGE. La specificità dell'anticorpo policlonale anti-Asl-rcHH così purificato è stata controllata mediante *western blot*, usando l'anticorpo anti Asl-rcHH diluito 1:500 in PBS ed un anticorpo secondario anti-coniglio coniugato con HRP diluito 1:5 000 in PBS. Per rilevare la perossidasi,

la membrana di nitrocellulosa è stata immersa in una soluzione cromogena seguendo il protocollo della ditta (SIGMAFAST™ 3,3'-Diaminobenzidine tablets, Sigma).

ELISA

Per stabilire i rapporti ottimali tra le diluizioni dell'anticorpo primario e di quello secondario è stata preparata una matrice di diluizioni seriali dei due anticorpi mantenendo costante la quantità di antigene che era pari a 2 μg per pozzetto di Asl-rcHH-Gly (Figura 8).

Dell'anticorpo primario è stata fatta una diluizione seriale a partire da 1:500 sino a 1:128 000 in PBS e dell'anticorpo secondario da 1:5 000 sino a 1:80 000. Il cHH ricombinante è stato legato alla micropiastra con un'incubazione notturna a 4 °C e quindi questa è stata lavata per tre volte con PBS, Tween 20 0,05%. La saturazione dei siti liberi è stata fatta con 300 μL di PBS, Tween 20 0,05%, BSA 3% con un'incubazione di 1 h a TA. Dopo tre lavaggi con PBS, Tween 20 0,05% sono stati aggiunti 200 μL delle diluizioni seriali dell'anticorpo anti-Asl-rcHH con un'incubazione di 3 h a TA. Dopo un lavaggio come nel passo precedente, sono stati aggiunti 200 μL delle diluizioni seriali di anticorpo anti-coniglio coniugato con perossidasi ed incubati per 2 h a TA. Dopo un ultimo lavaggio, sono stati aggiunti 100 μL di una soluzione cromogena (1-Step™ Ultra TMB-ELISA, Pierce) e la reazione bloccata con l'aggiunta

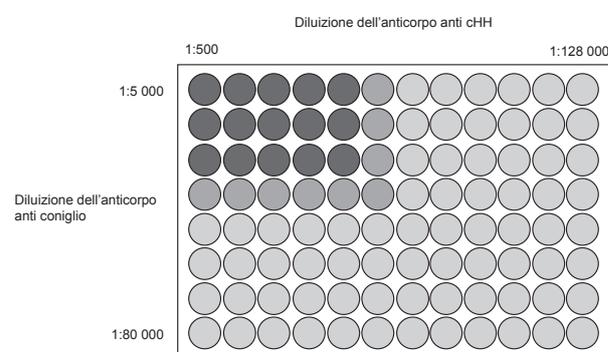


Figura 8. Schema della matrice di diluizioni seriali degli anticorpi primario e secondario. Nelle colonne le diluizioni seriali dell'anticorpo anti-Asl-rcHH a partire da una diluizione 1:500 in PBS. Nelle righe le diluizioni seriali dell'anticorpo anti-coniglio coniugato con HRP, a partire da una diluizione di 1:5 000 in PBS.

di 50 μ L di acido solforico 1 M. L'assorbanza è stata misurata a 450 nm su un lettore per micropiastre (Anthos 2020). Le curve di titolazione sono state interpolate usando il programma QtiPlot 0.9, <http://soft.proindependent.com/qtiplot.html>.

Il cHH presente negli estratti non purificati delle ghiandole del seno è stato quantificato mediante ELISA. Come riferimento è stato utilizzato il cHH purificato tramite RP-HPLC e gli standard preparati attraverso una serie di diluizioni progressive a partire da una quantità pari a 484 ng per pozzetto. Per quanto riguarda i campioni da dosare, la quantità usata per il saggio corrispondeva a quella estratta da una ghiandola del seno, da 2,5-3 μ L di estratto per pozzetto. 100 μ L di standard e campioni sono stati distribuiti nella micropiastre e lasciati incubare O/N a 4 °C. La soluzione di *coating* è stata quindi rimossa ed i pozzetti lavati tre volte con PBS, Tween 20 0,05%. La saturazione dei siti liberi è stata fatta con 300 μ L di PBS, Tween 20 0,05%, BSA 3% con un'incubazione di 1 h a TA. Dopo tre lavaggi con PBS, Tween 20 0,05% sono stati aggiunti 100 μ L di anticorpo anti-Asl-rcHH diluito 1:5 000 in PBS con un'incubazione di 3 h a TA. Dopo un lavaggio come nel passo precedente, sono stati aggiunti 100 μ L di anticorpo anti-coniglio coniugato con perossidasi diluito 1:10 000 in PBS ed incubati per 2 h a TA. Dopo un ultimo lavaggio, sono stati aggiunti 100 μ L di una soluzione cromogena (1-Step™ Ultra TMB-ELISA, Pierce) e la reazione bloccata con l'aggiunta di 50 μ L di acido solforico 1 M. L'assorbanza è stata misurata a 450 nm su un lettore per micropiastre (Anthos 2020). La concentrazione dei campioni è stata determinata sulla curva interpolata mediante il programma pro Fit versione 6.1.3 per Macintosh, QuantumSoft, www.quansoft.com.

Stabulazione degli animali

A. leptodactylus, importato dalla Turchia, è stato ottenuto da un commerciante locale; gli esemplari di *P. clarkii* sono stati gentilmente forniti da David Mazzoni; i gamberetti *P. elegans*, catturati nel golfo di Trieste con le nasse, sono stati forniti da pescatori locali. Il peso medio di *A. leptodactylus*

era di $32,4 \pm 5,3$ g, di *P. clarkii* $20,7 \pm 8,9$ g, mentre per *P. elegans* è stato considerato un peso di 3,5 g (10 animali pesavano 35 g). Gli animali sono stati tenuti in acquari da 120 L, in acqua dolce o salata a seconda della specie, ed ablati bilateralmente dei peduncoli oculari 48 h prima dei saggi *in vivo*. L'ablazione dei peduncoli oculari, che depriva gli animali della maggior fonte di cHH endogeno, è necessaria per avere la certezza che le variazioni della glicemia siano dovute esclusivamente ai peptidi iniettati. I saggi biologici, inoltre, sono stati effettuati due giorni dopo l'ablazione per dar modo agli animali di riprendersi e non oltre i quattro giorni per evitare che gli animali compensassero l'assenza del cHH di origine peduncolare con una maggior secrezione di ormone prodotto in altri distretti. Per quanto riguarda *A. leptodactylus* sono stati utilizzati solamente maschi in modo da evitare risposte anomale associate al ciclo riproduttivo delle femmine.

Saggi biologici *in vivo*

Gli estratti di ghiandole del seno di *A. leptodactylus* e di *P. clarkii* sono stati diluiti in PBS, pH 7,4 ed un volume di 100 μ L, contenente 1,5 pmol/g di peso vivo di Asl-cHH o 2,7 pmol/g di peso vivo di Prc-cHH, iniettato nei gamberi. I campioni di Asl-rcHH-Gly (1,7 pmol/g e 16,7 pmol/g di peso vivo) e di Asl-rcHH-ammide (1,7 pmol/g e 3,3 pmol/g di peso vivo) sono stati diluiti in PBS, pH 7,4 e 100 μ L di questa soluzione sono stati iniettati nei gamberi e 50 μ L nei gamberetti. Gli animali sono stati salassati a 0, 30, 60, 120 e 240 min dopo l'iniezione e la concentrazione di glucosio nell'emolinfa determinata con il kit One Touch glucose test (Lifescan). I valori della glicemia sono espressi come media \pm deviazione standard. L'analisi statistica dei dati è stata fatta usando il test *U* di Mann-Whitney o il *t* test utilizzando il programma GraphPad InStat versione 3.0b per Macintosh, GraphPad Software, San Diego California USA, www.graphpad.com.

Inibizione del cHH in *A. leptodactylus*

Per la prova di inibizione dell'attività *in vivo* del peptide ammidato, 98 pmol di anticorpo anti Asl-rcHH, diluiti in un volume di 150 μ L, sono stati iniettati in *A. leptodactylus*. Dopo 10 min sono stati iniettati 100 μ L di una soluzione contenente il 26,6 pmol di peptide ammidato (0,85 pmol/g di peso vivo). Come controllo sono stati usati gli stessi animali, trattati in una giornata diversa con 26,6 pmol di Asl-rcHH-ammidato in un volume di 100 μ L. L'anticorpo ed il cHH ricombinante sono stati diluiti in PBS. I prelievi sono stati fatti

al tempo -10 min, corrispondente all'iniezione dell'anticorpo e a 0, 30, 60, 120 e 240 min dopo l'iniezione col peptide ammidato. La concentrazione di glucosio nell'emolinfa è stata determinata con il kit One Touch glucose test (Lifescan) ed valori della glicemia espressi come media \pm deviazione standard. L'analisi statistica dei dati è stata fatta usando il t test appaiato utilizzando il programma GraphPad InStat versione 3.0b per Macintosh, GraphPad Software, San Diego California USA, www.graphpad.com.

Risultati

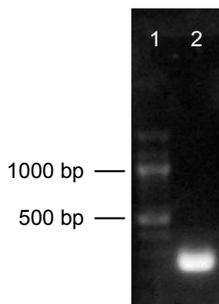
Clonaggio del cDNA codificante per cHH-Gly-Lys e cHH-Gly

L'amplificazione del cDNA per il cHH di *A. leptodactylus* a partire dal vettore pET28a-cHH è stata controllata su gel d'agarosio dove la presenza di una sola banda di circa 220 bp, corrispondente al valore atteso di 222 e 219 bp per il cHH-Gly-Lys e il cHH-Gly rispettivamente, ha confermato il successo dell'amplificazione (Figura 9).

Figura 9. Elettroforesi su gel d'agarosio al 1,5% di controllo del prodotto di amplificazione del cDNA per il cHH di *A. leptodactylus*.

Corsia 1: marcatori di peso molecolare.

Corsia 2: banda di circa 220 bp corrispondente al cDNA di Asl-cHH.



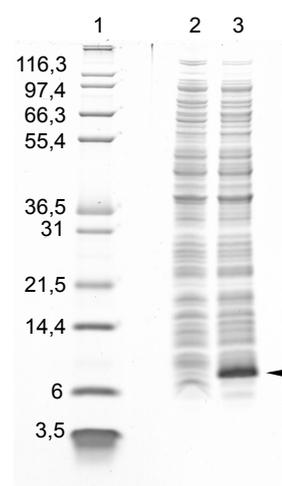
Espressione dei peptidi ricombinanti

Il successo dell'induzione è stato verificato mediante elettroforesi su gel di acrilammide SDS-PAGE tricina. Una banda intensamente colorata in Coomassie e con massa molecolare di circa 10 kDa era presente nell'estratto delle cellule indotte. Poiché la massa molecolare calcolata per i peptidi ricombinanti era di 9938 Da e 9804 Da per Asl-rcHH-Gly-Lys e per Asl-rcHH-Gly rispettivamente, la banda fu ritenuta dovuta alla presenza del peptide ricombinante (Figura 10). Dopo l'induzione le cellule batteriche sono state raccolte per centrifugazione, risospese in tampone di lisi e sonicate. Le frazioni solubile ed insolubile sono state separate per centrifugazione ed analizzate tramite SDS-PAGE tricina. La presenza di una banda di circa 10 kDa solamente nella frazione insolubile indicava chiaramente che il cHH ricombinante era presente sotto forma di corpi d'inclusione.

Ottenuta la conferma che i peptidi ricombinanti formavano aggregati insolubili si è approntato un protocollo per la purificazione dei corpi d'inclusione mediante una serie di lavaggi per togliere i contaminanti batterici, quali residui di membrana o acidi nucleici, e per la successiva solubilizzazione dei peptidi in un tampone denaturante.

Figura 10. Controllo mediante elettroforesi su gel di acrilammide al 10% (SDS-PAGE tricina, colorato con Coomassie) dell'induzione dei batteri trasformati.

Corsia 1: marcatori di peso molecolare, pesi in kDa; corsia 2: estratto da 0,5 mL di cellule non indotte; corsia 3: estratto da 0,5 mL di cellule indotte con IPTG. La freccia indica la posizione della banda relativa ad Asl-rcHH.



Refolding e purificazione

La formazione di corpi d'inclusione insolubili ed inattivi a seguito della produzione di proteine ricombinanti è un evento molto frequente nei microrganismi trasformati. Nel caso di proteine contenenti ponti disolfuro ed espresse in sistemi batterici, vi è quasi la certezza che i peptidi prodotti formino degli aggregati insolubili come conseguenza di un *refolding* scorretto dovuto all'ambiente riducente presente nel citosol batterico. Tuttavia, la formazione di corpi d'inclusione ha anche dei vantaggi in quanto questi vengono facilmente purificati, mentre le proteine aggregate sono protette dalla degradazione proteolitica e non vi è rischio di denaturazione (Vallejo e Rinas, 2004). Poiché il cHH ricombinante era stato solubilizzato in presenza di un agente riducente come il DTT in grado di rompere i ponti disolfuro, è stato necessario eseguire un passaggio di *refolding* per indurre la formazione di ponti disolfuro tra le cisteine. Per promuovere la formazione dei ponti disolfuro la soluzione deve contenere dei tioli a basso peso molecolare, come il glutatione, in forma ridotta ed ossidata. Queste condizioni consentono un rapido riarrangiamento dei ponti disolfuro finché la proteina non raggiunge la conformazione più stabile, che in genere è quella della proteina nativa. Il *refolding* è stato eseguito mediante cromatografia di esclusione ed il prodotto controllato mediante SDS-PAGE tricina (Figura 11). Questo metodo è stato scelto per la sua semplicità e per la buona resa di prodotto correttamente foldato (Batas e Chaudhuri, 1999; Li et al., 2004).

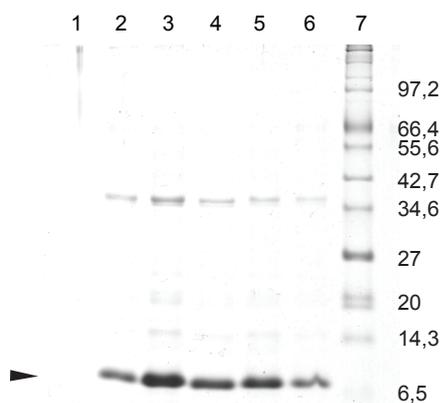


Figura 11. Elettroforesi su gel di acrilammide al 10% (SDS-PAGE tricina, colorato con Coomassie) di Asl-rcHH-Gly dopo *refolding*. Corsie 1-6: frazioni raccolte dopo *refolding* mediante cromatografia di esclusione; corsia 7: marcatori di peso molecolare, pesi in kDa. Per ogni campione sono stati caricati sul gel 2,5 μ L. La freccia indica la posizione relativa ad Asl-rcHH-Gly.

I peptidi foldati sono stati quindi purificati per affinità su una colonna Strep-Tactin® Superflow®, sfruttando la presenza del *tag* fuso in posizione N-terminale. Lo Strep-Tag II è un corto peptide di otto amminoacidi con forte affinità per la Strep-Tactin, una streptavidina ingegnerizzata. Il sistema consente una facile e rapida purificazione delle proteine ricombinanti in condizioni fisiologiche. Le frazioni dell'eluizione sono state controllate mediante SDS-PAGE tricina per verificare il grado di purezza dei peptidi ricombinanti purificati. Il *pattern* elettroforetico era costituito da una sola banda di circa 10 kDa a conferma che la purificazione aveva avuto successo (Figura 12).

Ammidazione

L'ammidazione C-terminale è una modificazione post-traduzionale molto frequente negli eucarioti, ma del tutto assente nei procarioti. Pertanto, il cHH ricombinante ha dovuto essere ammidato *in vitro* mediante l'uso di uno specifico enzima (*peptidylglycine α -amidating enzyme*), ed il prodotto della reazione purificato mediante RP-HPLC (Figura 13). Il protocollo della reazione di ammidazione ha consentito di ammidare soltanto un centinaio di microgrammi di Asl-rcHH-Gly alla volta, per cui la quantità di ormone ammidato ottenuto è stata piuttosto bassa, limitando, di conseguenza, il numero di saggi *in vivo* che era possibile condurre.

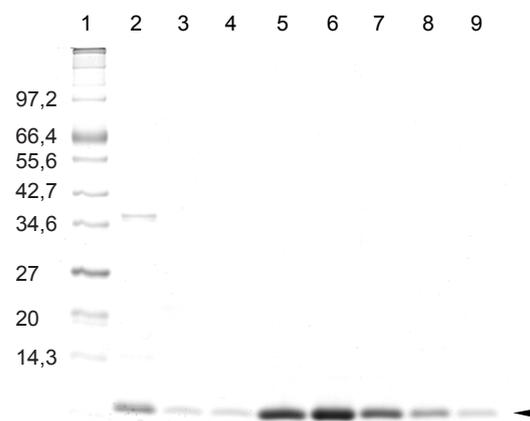


Figura 12. Elettroforesi su gel di acrilammide al 10% (SDS-PAGE tricina, colorato con Coomassie) delle frazioni purificate su una colonna Strep-Tactin® Superflow®. Corsia 1: marcatori di peso molecolare, pesi in kDa; corsie 2-3: frazioni raccolte mediante il tampone di lavaggio; corsie 4-9: frazioni eluite mediante destiobiotina 2,5 mM. Di ogni frazione sono stati caricati sul gel 2,5 μ L. La freccia indica la banda relativa ad Asl-rcHH-Gly.

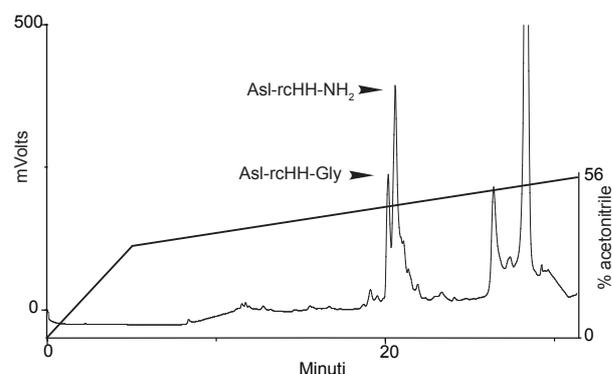


Figura 13. Profilo dell'eluizione mediante RP-HPLC di Asl-rcHH-ammide. La purificazione è stata fatta su una colonna Zorbax SB300 CN da 2,1x150 mm, termostata a 25 °C. L'eluente A era TFA 0,1% in acqua, l'eluente B era TFA 0,1% in acetonitrile. La separazione è stata fatta usando un gradiente di B 0-30% in 5 min e B 30%-56% in 30 min a 0,3 mL/min. Le frecce indicano i picchi relativi ad Asl-rcHH-Gly ed a Asl-rcHH-ammide.

Caratterizzazione biochimica

La massa molecolare dei peptidi ricombinanti purificati è stata ottenuta mediante MALDI-TOF. Attraverso l'analisi spettrometrica di massa del Asl-rcHH-Gly si è ottenuto un picco a m/z 9804,38 ($M+H$)⁺ che è in buon accordo col valore calcolato della massa molecolare media di 9804,25 Da, valore composto dal contributo dello Strep-tag e dai 73 amminoacidi dell'ormone, considerando la presenza di tre ponti disolfuro. Per quanto riguarda il Asl-rcHH-ammide è stato osservato un picco protonato

a m/z 9745,93 ($M+H$)⁺ coincidente con la massa molecolare calcolata di 9746,03 Da (Figura 14).

Gli spettri di dicroismo circolare sono stati registrati per stabilire se l'ammidazione influenzasse la struttura secondaria dei peptidi ricombinanti, Asl-rcHH-Gly e Asl-rcHH-ammido. Entrambi gli spettri presentano le caratteristiche tipiche delle strutture con alfa-eliche con una banda positiva a 190 nm e due bande negative a 208 nm e 222 nm (Figura 15). Le percentuali calcolate per le strutture secondarie trovate nei due peptidi erano differenti, con il peptide ammidato avente una maggiore frazione di alfa-eliche (Tabella 1).

Tabella 1. Composizione della struttura secondaria dei peptidi ricombinanti. I risultati della deconvoluzione degli spettri di dicroismo circolare indicano le percentuali delle strutture secondarie presenti.

Peptide	Eliche	Foglietti	Girate	Non ordinate	Totale
Asl-rcHH-Gly	0,21	0,23	0,17	0,38	0,99
Asl-rcHH-NH ₂	0,35	0,18	0,16	0,30	0,99

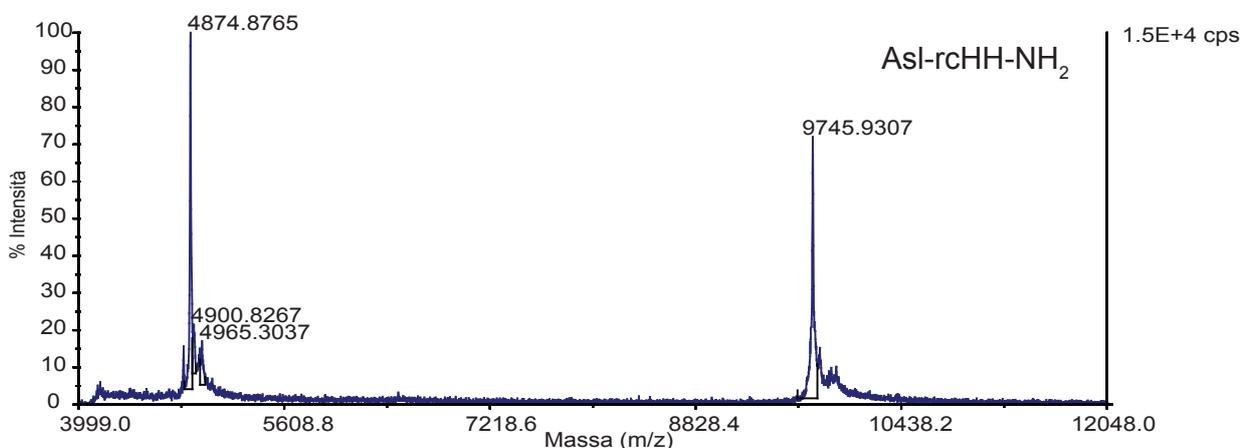
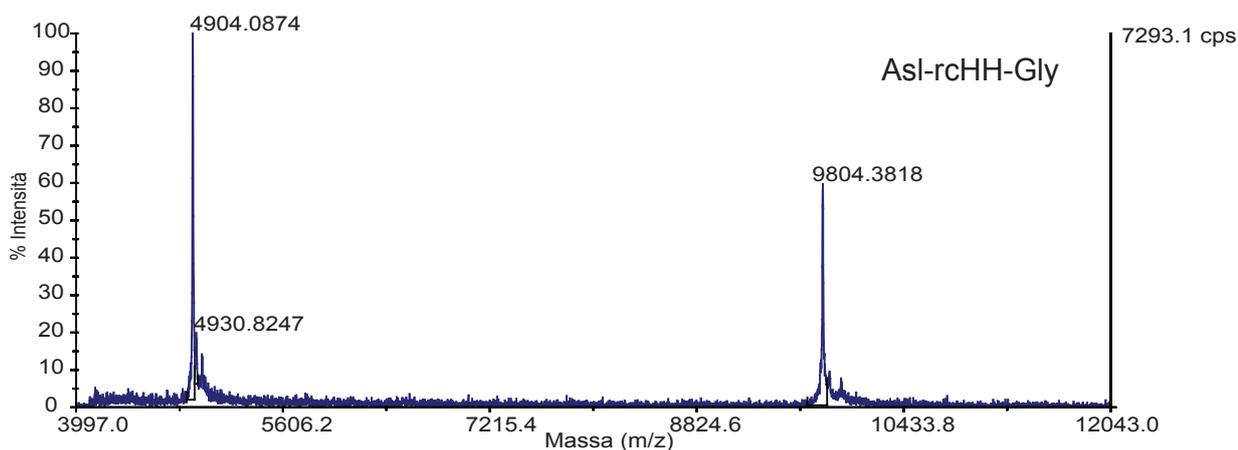


Figura 14. Spettri di massa di Asl-rcHH-Gly ed Asl-rcHH-ammido ottenuti mediante MALDI-TOF in modalità lineare a ioni positivi. Le frazioni purificate tramite RP-HPLC sono state mescolate in rapporto 1:1 con una matrice di acido alfa-ciano-4-idrossi cinnamico (5mg/mL in acetonitrile 70%).

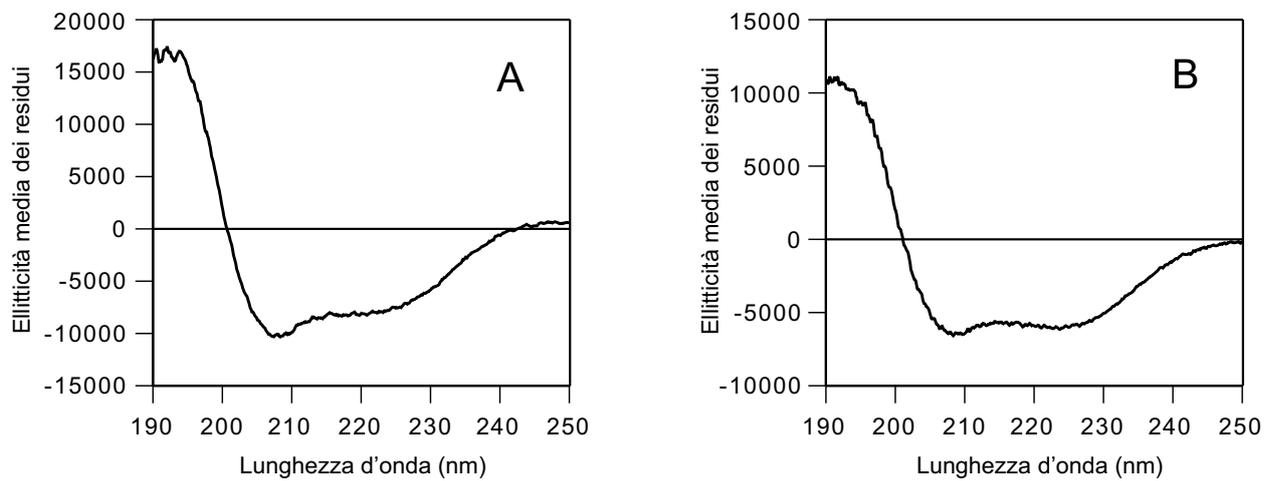


Figura 15. Spettri di dicroismo circolare di Asl-rcHH-ammide (A) e Asl-rcHH-Gly (B). I peptidi ricombinanti sono stati dissolti in Tris-HCl e gli spettri registrati nell'intervallo 190-250 nm usando cuvette al quarzo da 0,1 cm. La banda positiva a 190 nm e le due bande negative a 208 e 220 nm sono tipiche delle strutture ad alfa-elica.

La struttura terziaria del Asl-rcHH è stata modellata per omologia sull'unica struttura risolta che è quella del MIH di *M. japonicus* (Katayama et al., 2003), usando il Swiss-Model server. La struttura terziaria predetta è composta da quattro alfa-eliche inframezzate da sequenze non ordinate e girate (Figura 16).

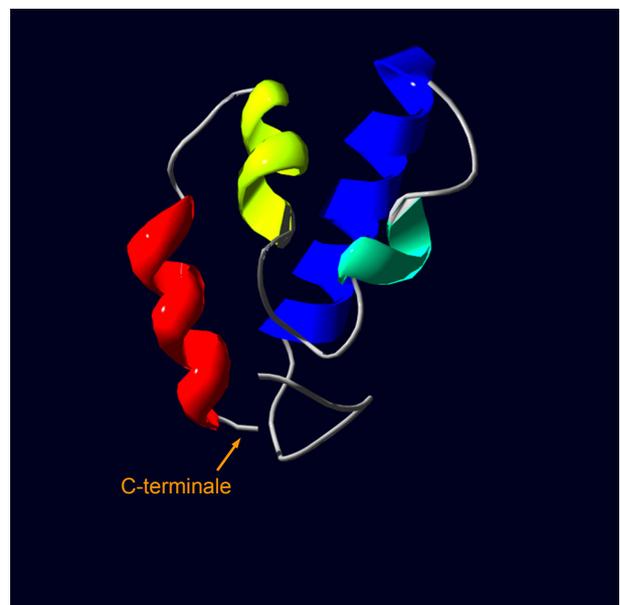


Figura 16. Modello a nastro del cHH di *A. leptodactylus*. La struttura è stata modellata per omologia sulla struttura del MIH di *M. japonicus* usando il SWISS-MODEL server (Arnold et al., 2006). L'immagine è stata generata mediante l'applicazione Swiss-PdbViewer, versione SPDBV_3.9b1.01_univ per OSX (Guex e Peitsch, 1997), mentre il *rendering* 3D è stato fatto mediante il programma MegaPOV.

Quantificazione del cHH

La quantità di cHH presente nelle ghiandole del seno di *A. leptodactylus* è stata determinata mediante una lettura spettrofotometrica sull'estratto purificato attraverso RP-HPLC che ha fornito un valore di 88,39 pmol (741 ng) per ghiandola del seno (Figura 17).

Questo estratto è stato quindi usato come riferimento in un saggio ELISA per determinare la quantità di cHH negli estratti non purificati di ghiandole del seno di *A. leptodactylus* e di *P. clarkii* (Figura 18). I valori ottenuti in altri due campioni di estratti di GS di *A. leptodactylus* erano di 52,01 pmol (436 ng) e 45,09 pmol (378 ng) per GS ed in *P. clarkii* di 58,21 pmol/GS (488 ng/GS).

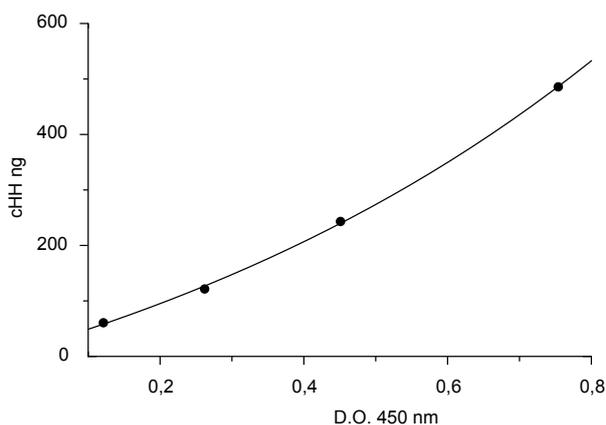


Figura 18. Curva standard ELISA ottenuta con quantità note di Asi-cHH purificato da ghiandole del seno mediante RP-HPLC. I punti sono stati interpolati con una funzione esponenziale usando il programma pro Fit 6.1.3 della Quantum Soft, www.quansoft.com.

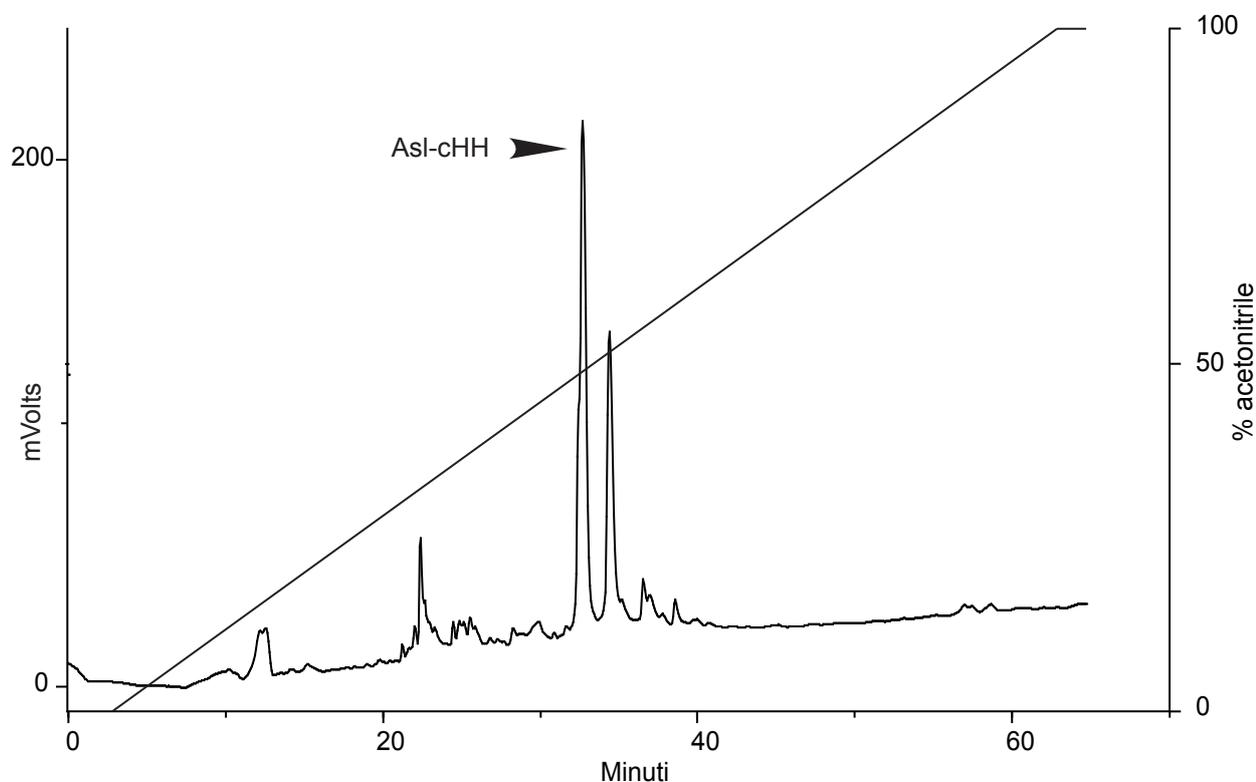


Figura 17. Profilo dell'eluizione mediante RP-HPLC del cHH di *A. leptodactylus* estratto dalle ghiandole del seno. La purificazione è stata fatta su una colonna Zorbax SB-C18 da 4,6x150 mm termostata a 25 °C. L'eluente A era TFA 0,1% in acqua, l'eluente B era TFA 0,1% in acetonitrile. La separazione è stata fatta usando un gradiente di B 0-100% in 60 min a 1 mL/min. La freccia indica il picco relativo al cHH nativo.

Saggi omologhi

I saggi biologici su *A. leptodactylus* sono stati condotti come esperimenti di risposta nel tempo per valutare l'attività dell'ormone ricombinante rispetto a quella dell'ormone nativo e come saggi dose-dipendenti per rilevare l'entità dell'effetto dose-risposta sulla concentrazione del glucosio nell'emolinfa. Gli animali sono stati ablati dei peduncoli oculari in modo da evitare interferenze nei risultati delle stimolazioni da parte del cHH endogeno. L'iniezione di un estratto equivalente ad una ghiandola del seno, pari a 1,5 pmol/g peso vivo di cHH, induceva un aumento della glicemia che raggiungeva un massimo di $30,7 \pm 30$ mg/dL, $n = 9$, dopo due ore ed il mantenimento di elevati livelli di glucosio fino a quattro ore dall'iniezione, quando è stato osservato un leggero decremento (Tabella 2; Figura 19).

L'iniezione di 1,7 pmol/g di peso vivo di Asl-rcHH-ammide induceva una risposta più rapida di quella indotta dall'estratto di ghiandole del seno con un picco massimo di glucosio di $17,5 \pm 7,9$ mg/dL, $n = 4$, dopo un'ora e con la glicemia che ritornava ai suoi livelli basali di $3,5 \pm 1,9$ mg/dL, $n = 4$, entro quattro ore (Tabella 3; Figura 19). L'iniezione di una quantità doppia di ormone, 3,3 pmol/g di peso vivo, induceva una risposta significativamente maggiore ($p < 0,05$) paragonata all'iniezione di 1,7 pmol/g di peso vivo (Tabella 3; Figura 20). Il picco di glucosio di $39,4 \pm 12,4$ mg/dL, $n = 7$, è stato osservato dopo due ore, mentre la concentrazione di glucosio scendeva lentamente senza raggiungere il livello iniziale dopo quattro ore.

Tabella 2. Valori della glicemia in *A. leptodactylus* dopo stimolazione con l'estratto di una ghiandola del seno.

<i>A. leptodactylus</i>, stimolo con 1,5 pmol/g di peso vivo di Asl-cHH						
ID animale	glicemia mg/dL					
	0'	30'	60'	120'	240'	
3	5	11	10	12	6	
4	3	24	58	109	97	
6	4	8	15	29	5	
7	4	9	13	16	10	
11	5	11	17	29	29	
13	2	7	10	14	13	
15	4	7	15	22	31	
17	1	7	14	24	27	
19	2	9	14	21	8	
media	3,3	10,3	18,4	30,7	25,1	
deviazione standard	1,4	5,4	15,0	30,0	28,9	

Tabella 3. Valori della glicemia in *A. leptodactylus* dopo stimolazione con 1,7 o 3,3 pmol/g di peso vivo di Asl-rcHH-ammide.

<i>A. leptodactylus</i>, stimolo con 1,7 pmol/g di peso vivo di Asl-rcHH-ammide						
ID animale	glicemia mg/dL					
	0'	30'	60'	120'	240'	
1	3	15	14	6	2	
3	4	20	23	12	4	
4	2	7	8	2	2	
5	5	21	25	9	6	
media	3,5	15,8	17,5	7,3	3,5	
deviazione standard	1,3	6,4	7,9	4,3	1,9	

***A. leptodactylus*, stimolo con 3,3 pmol/g di peso vivo di Asl-rcHH-ammide**

ID animale	glicemia mg/dL				
	0'	30'	60'	120'	240'
1	2	15	40	39	5
3	6	22	45	49	15
4	1	11	30	19	3
5	4	27	51	37	7
26	4	10	16	29	18
27	3	13	24	51	58
28	7	14	30	52	74
media	3,9	16,0	33,7	39,4	25,7
deviazione standard	2,1	6,2	12,3	12,4	28,4

L'effetto dose-risposta del Asl-rcHH-Gly era completamente diverso. Ad una dose di 1,7 pmol/g di peso vivo la sua capacità di aumentare il livello del glucosio era significativamente minore ($p < 0,05$) rispetto alla stessa quantità di peptide amidato, mentre il decorso temporale era simile con un picco di $6,6 \pm 1,2$ mg/dL, $n = 8$, di glucosio misurati dopo un'ora (Tabella 4; Figure 19, 20). Solamente una quantità di dieci volte superiore di Asl-rcHH-Gly, 16,7 pmol/g di peso vivo, induceva un rilevante aumento della concentrazione di glucosio emolinfatico, $22,8 \pm 11,3$ mg/dL, $n = 8$, che era comunque significativamente inferiore ($p < 0,05$) di quello indotto da 3,3 pmol/g di peso vivo di Asl-rcHH-ammide (Figura 20). Il decorso temporale era, invece, comparabile a quello registrato per 3,3 pmol/g di peso vivo di Asl-rcHH-ammide, con il picco massimo di concentrazione emolinfatica di glucosio a due ore dall'iniezione ed un effetto iperglicemizzante ancora rilevabile dopo quattro ore.

Tabella 4. Valori della glicemia in *A. leptodactylus* dopo stimolazione con 1,7 o 16,7 pmol/g di peso vivo di Asl-rcHH-Gly.

A. leptodactylus, stimolo con 1,7 pmol/g di peso vivo di Asl-rcHH-Gly					
ID animale	glicemia mg/dL				
	0'	30'	60'	120'	240'
6	4	7	8	4	3
7	7	7	7	7	2
8	1	5	7	2	2
9	3	5	7	2	5
10	4	8	8	8	4
11	6	6	6	5	2
12	1	6	5	3	3
13	4	8	5	5	3
media	3,8	6,5	6,6	4,5	3,0
deviazione standard	2,1	1,2	1,2	2,2	1,1

A. leptodactylus, stimolo con 16,7 pmol/g di peso vivo di Asl-rcHH-Gly					
ID animale	glicemia mg/dL				
	0'	30'	60'	120'	240'
1	6	10	19	23	11
3	8	14	24	31	20
4	6	14	26	41	30
6	3	9	15	13	6
7	4	9	13	12	10
8	1	8	16	34	13
10	2	11	11	16	10
11	3	7	8	12	5
media	4,1	10,3	16,5	22,8	13,1
deviazione standard	2,4	2,6	6,2	11,3	8,2

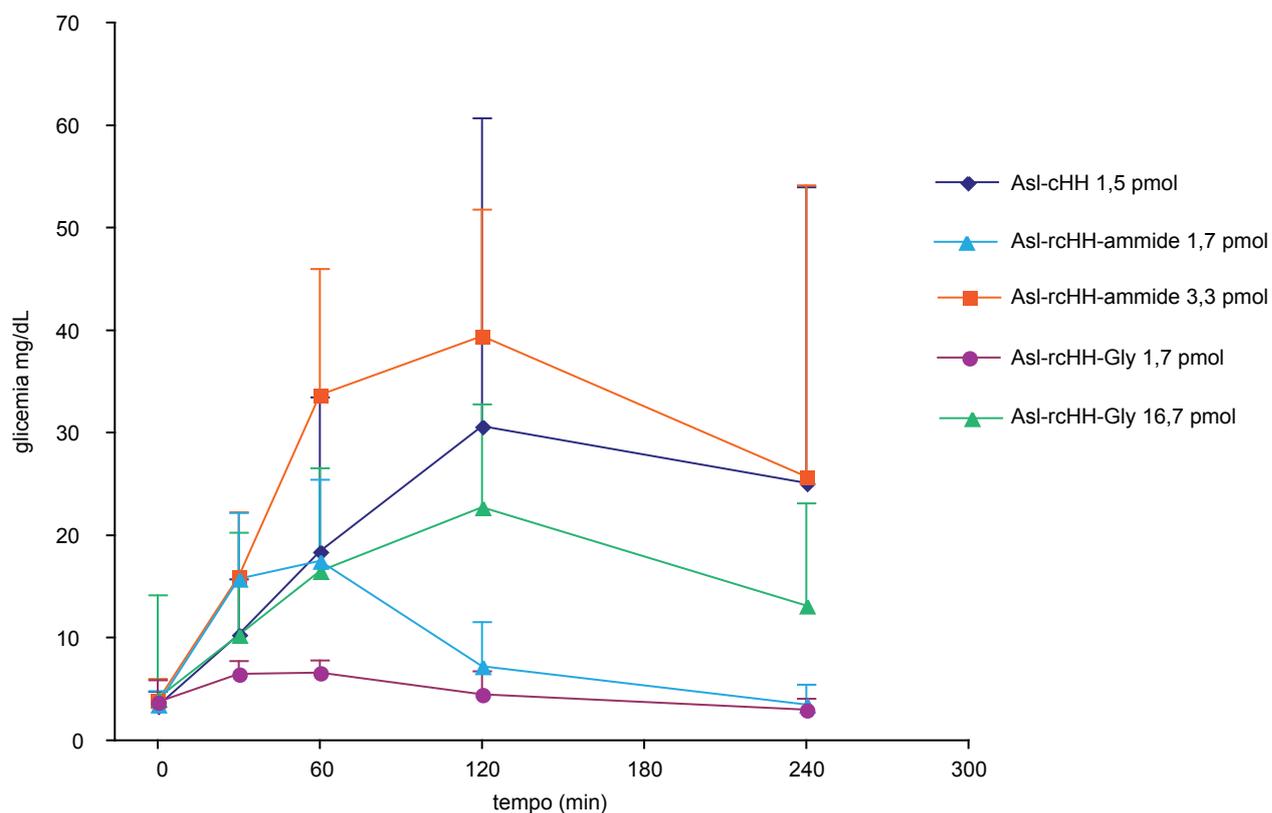


Figura 19. Curve da stimolo del cHH ricombinante e nativo in *A. leptodactylus*. Le quantità di ormone iniettate si riferiscono ad 1 g di peso vivo. I valori della glicemia sono espressi come media \pm deviazione standard.

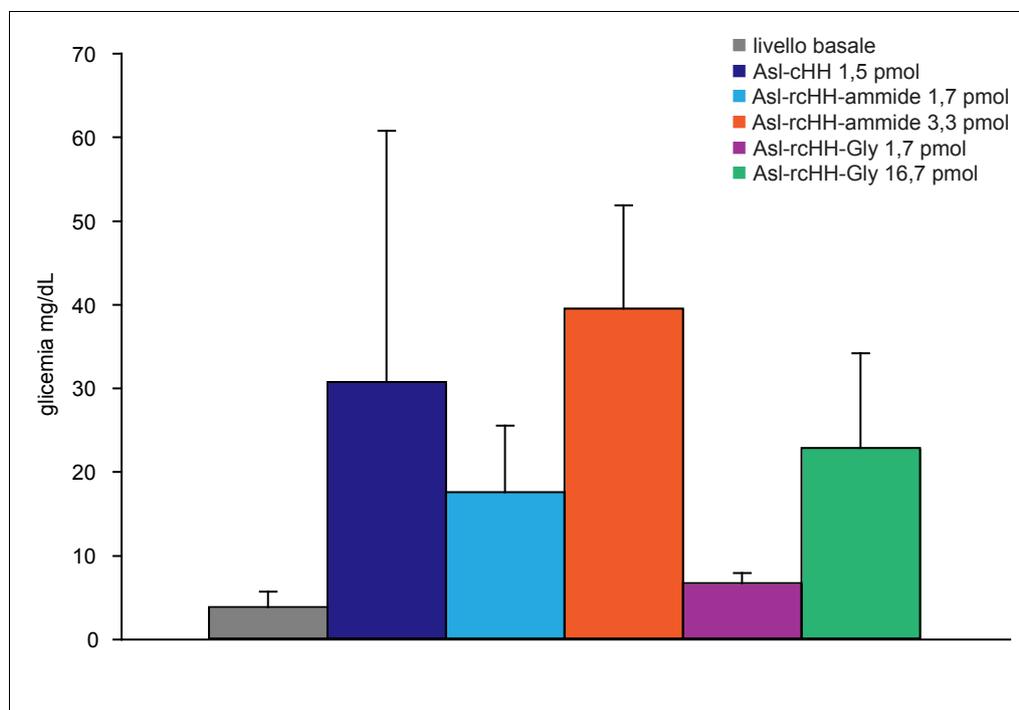


Figura 20. Paragone dei picchi di massima concentrazione della glicemia indotta dai peptidi ricombinanti e dall'estratto di ghiandole del seno in *A. leptodactylus*. Le quantità di ormone iniettate si riferiscono ad 1 g di peso vivo. Il livello basale si riferisce al valore della glicemia prima della stimolazione. I risultati sono espressi come media \pm deviazione standard. I valori della glicemia, riferiti ad Asl-rcHH-ammide 1,7 pmol/g di peso vivo e Asl-rcHH-ammide 3,3 pmol/g di peso vivo, sono significativamente diversi da quelli riferiti rispettivamente a Asl-rcHH-Gly 1,7 pmol/g di peso vivo e Asl-rcHH-Gly 16,7 pmol/g di peso vivo, $p < 0,05$.

Saggi eterologhi

Per verificare se Asl-rcHH esercitasse un'attività biologica anche in specie diverse da *A. leptodactylus* (famiglia Astacidae, superfamiglia Astacoidea, infraordine Astacidea), sono stati effettuati dei saggi eterologhi *in vivo* su *P. clarkii*, una specie appartenente alla stessa superfamiglia, ma ad una famiglia diversa (Cambaridae) e su una specie filogeneticamente più distante, *P. elegans*, che appartiene ad un altro infraordine, Caridea. Anche in questo caso l'ablazione bilaterale dei peduncoli oculari è stata fatta in modo da eliminare la fonte peduncolare del cHH endogeno. L'iniezione dell'estratto delle GS pari a 2,7 pmol/g peso vivo di Prc-cHH in *P. clarkii* ha indotto un aumento della glicemia che dopo due ore ha raggiunto un picco massimo di $80,6 \pm 46,5$ mg/dL, $n = 7$, seguito da un lento decremento nella concentrazione del glucosio che a quattro ore era di $51,7 \pm 26,2$ mg/dL, $n = 7$, (Tabella 5; Figure 21, 22). Una quantità di 3,3 pmol/g di peso vivo di Asl-rcHH-ammide ha indotto una risposta più debole paragonata a quella indotta in *A. leptodactylus*, con un picco di glucosio di $18,5 \pm 7,3$ mg/dL, $n = 4$. L'iniezione di una quantità cinque volte superiore di Asl-rcHH-Gly, 16,7 pmol/g di peso vivo, induceva una risposta molto più debole nonostante l'elevata quantità di ormone iniettata, con un picco di glucosio di $8,4 \pm 3,4$ mg/dL, $n = 5$, dopo 30 minuti, un valore inferiore a quello fornito dal peptide ammidato.

Tabella 5. Valori della glicemia in *P. clarkii* dopo stimolazione con l'estratto di ghiandola del seno, con 3,3 pmol/g di peso vivo di Asl-rcHH-ammide e con 16,7 pmol/g di peso vivo di Asl-rcHH-Gly.

<i>P. clarkii</i>, stimolo con 2,7 pmol/g di peso vivo di Prc-cHH						
ID animale	glicemia mg/dL					
	0'	30'	60'	120'	240'	
2	3	11	18	17	18	
3	4	13	19	15	19	
6	4	34	72	126	72	
7	3	28	45	77	45	
8	2	29	62	110	62	
9	2	26	58	114	58	
10	4	59	88	105	88	
media	3,1	28,6	51,7	80,6	51,7	
deviazione standard	0,9	15,9	26,2	46,5	26,2	

<i>P. clarkii</i>, stimolo con 3,3 pmol/g di peso vivo di Asl-rcHH-ammide						
ID animale	glicemia mg/dL					
	0'	30'	60'	120'	240'	
3	1	17	19	6	6	
5	1	9	23	20	4	
7	3	18	24	9	6	
9	3	12	8	6	13	
media	2,0	14,0	18,5	10,3	7,3	
deviazione standard	1,2	4,2	7,3	6,7	3,9	

<i>P. clarkii</i>, stimolo con 16,7 pmol/g di peso vivo di Asl-rcHH-Gly						
ID animale	glicemia mg/dL					
	0'	30'	60'	120'	240'	
2	5	8	7	3	2	
4	5	7	6	4	9	
6	4	5	6	4	5	
8	4	8	7	3	3	
10	6	14	12	7	7	
media	4,8	8,4	7,6	4,2	5,2	
deviazione standard	0,8	3,4	2,5	1,6	2,9	

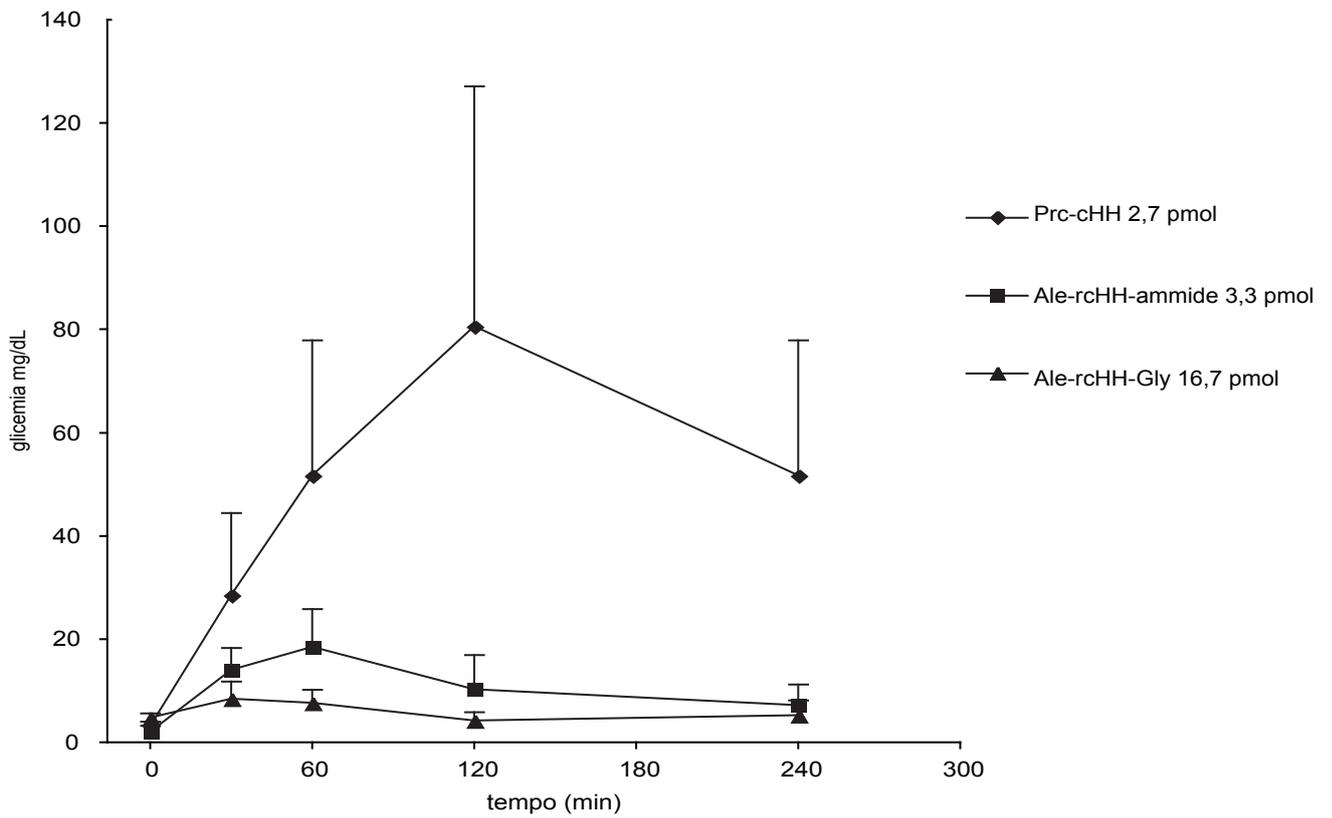
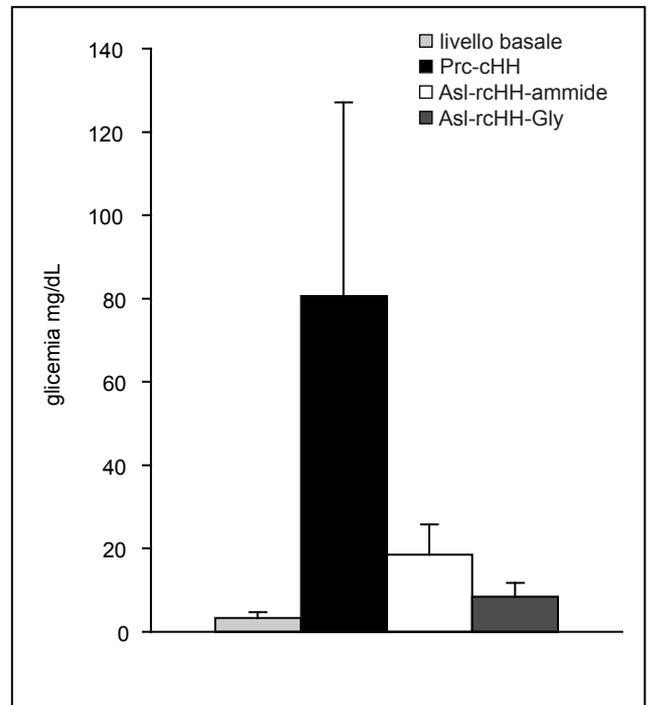


Figura 21. Curve da stimolo del cHH ricombinante e nativo in *P. clarkii*. Le quantità di ormone iniettato si riferiscono ad 1 g di peso vivo. I valori della glicemia sono espressi come media \pm deviazione standard.

Figura 22. Paragone dei picchi di massima concentrazione della glicemia indotta dai peptidi ricombinanti e dall'estratto di ghiandole del seno in *P. clarkii*. Il livello basale si riferisce al valore della glicemia prima della stimolazione. I risultati sono espressi come media \pm deviazione standard.



Asl-rcHH-ammide ha indotto una risposta iperglicemica anche in *P. elegans*. I valori della glicemia dopo stimolazione con l'estratto di una ghiandola del seno sono stati forniti da S. Lorenzon (comunicazione personale). La quantità media di Pae-cHH iniettata, 5,6 pmol per ghiandola del seno, è stata normalizzata rispetto al peso vivo considerando un peso medio dei gamberetti di 1,5 g (Lorenzon et al., 2004). In questa specie l'iniezione di 3,7 pmol/g peso vivo di Pae-cHH induceva un picco di glucosio di $22,8 \pm 3,6$ mg/dL, n = 10, dopo due ore, con la glicemia che tornava al livello basale alla quarta ora. L'iniezione di 3,3 pmol/g di peso vivo di Asl-rcHH-ammide ha indotto un aumento della concentrazione del glucosio pari a $16,4 \pm 5,8$ mg/dL, n = 8, dopo un'ora, mentre dopo l'iniezione di 16,7 pmol/g di peso vivo di Asl-rcHH-Gly è stato osservato un picco di glucosio di $13,4 \pm 10,4$ mg/dL, n = 7, sempre dopo un'ora (Tabella 6; Figure 23, 24).

Tabella 6. Valori della glicemia in *P. elegans* dopo stimolazione con l'estratto di una ghiandola del seno, con 3,3 pmol/g di peso vivo di Asl-rcHH-ammide e con 16,7 pmol/g di peso vivo di Asl-rcHH-Gly.

***P. elegans*, stimolo con 3,7 pmol/g di peso vivo di Pae-cHH**

ID animale	0'	glicemia mg/dL		
		60'	120'	240'
1	10	20	23	9
2	9	15	21	12
3	7	12	18	10
4	11	20	22	9
5	6	21	20	4
6	9	17	26	10
7	14	15	27	18
8	10	12	26	13
9	13	20	27	11
10	9	15	18	8
media	9,8	16,7	22,8	10,4
deviazione standard	2,4	3,4	3,6	3,6

***P. elegans*, stimolo con 3,3 pmol/g di peso vivo di Asl-rcHH-ammide**

ID animale	0'	glicemia mg/dL		
		60'	120'	240'
2	11	18	9	8
3	8	20	11	10
4	7	15	14	10
5	10	20	11	9
6	5	8	12	6
7	5	11	6	6
8	5	13	8	7
9	14	26	18	9
media	8,1	16,4	11,1	8,1
deviazione standard	3,3	5,8	3,7	1,6

***P. elegans*, stimolo con 16,7 pmol/g di peso vivo di Asl-rcHH-Gly**

ID animale	0'	glicemia mg/dL		
		60'	120'	240'
2	12	35	5	6
3	6	15	7	8
5	8	8	8	7
6	17	8	9	6
7	8	8	8	19
8	5	4	5	10
10	5	16	8	6
media	8,7	13,4	7,1	8,9
deviazione standard	4,4	10,4	1,6	4,7

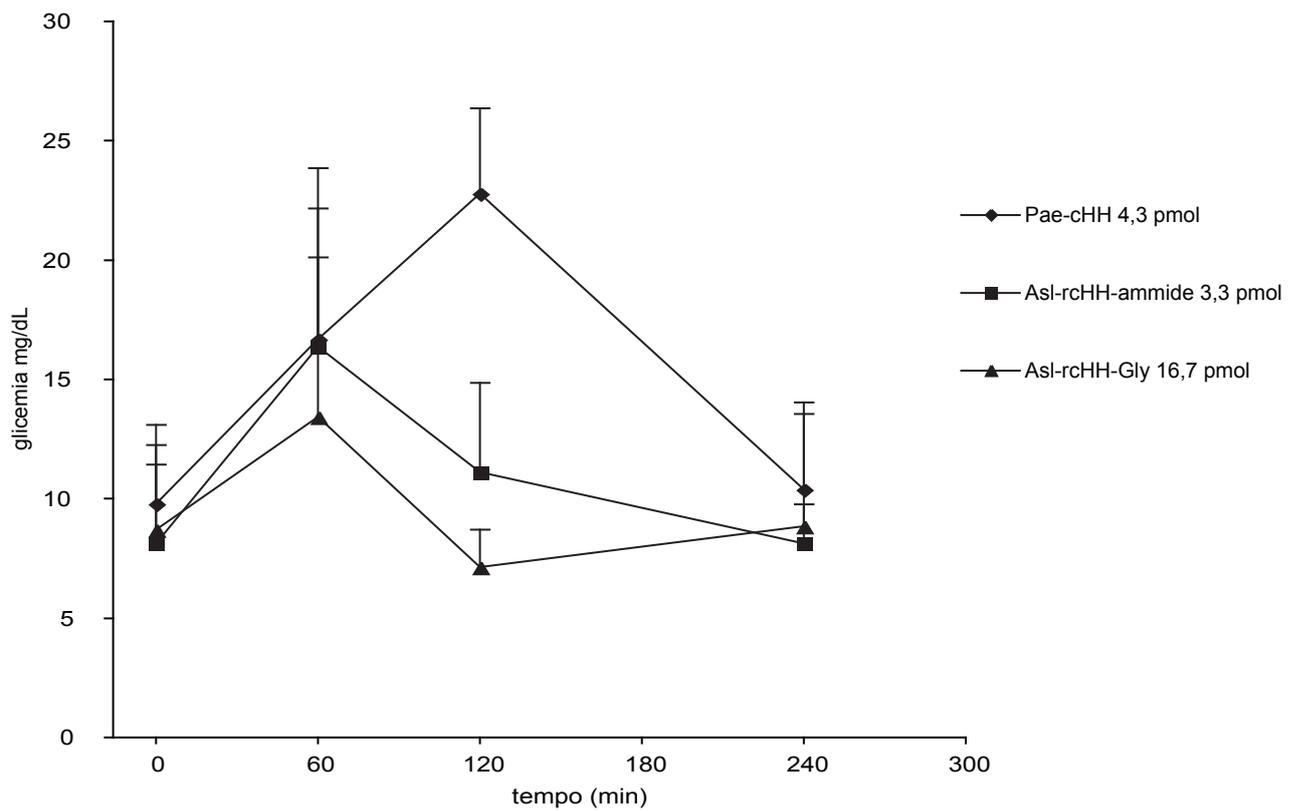
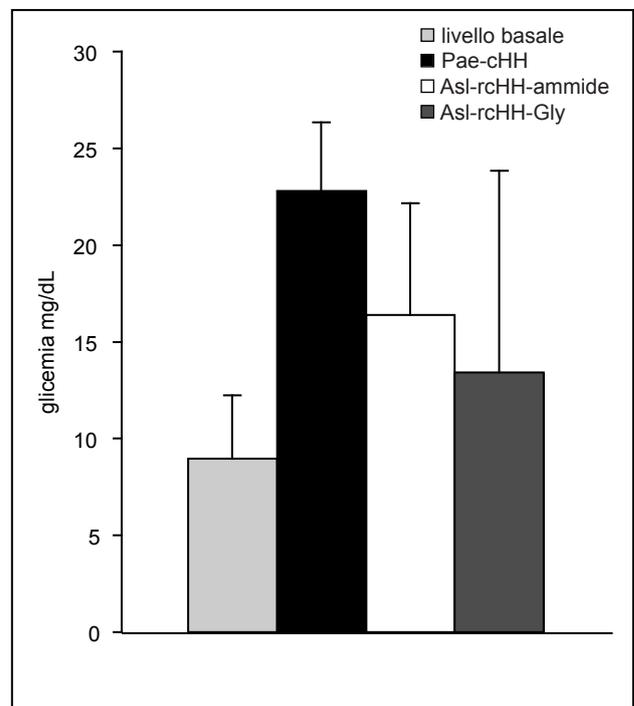


Figura 23. Curve da stimolo del cHH ricombinante e nativo in *P. elegans*. Le quantità di ormone iniettato si riferiscono ad 1 g di peso vivo. I valori della glicemia sono espressi come media \pm deviazione standard.

Figura 24. Paragone dei picchi di massima concentrazione della glicemia indotta dai peptidi ricombinanti e dall'estratto di ghiandole del seno in *P. elegans*. Il livello basale si riferisce al valore della glicemia prima della stimolazione. I risultati sono espressi come media \pm deviazione standard.



Risposta iperglicemica correlata al sesso

Per determinare se la risposta iperglicemica potesse essere correlata al sesso degli animali si è iniettata la medesima quantità di peptide amidato, 100 pmol per animale, sia nei maschi che nelle femmine. L'ormone iniettato era in quantità elevata ed ha indotto una risposta considerevole nei maschi con un massimo nella concentrazione emolinfatica di glucosio di $50 \pm 28,8$ mg/dL dopo 4 ore. Nelle femmine la risposta è stata di molto inferiore, con un picco di appena $9,3 \pm 2,5$ mg/dL a 120 min. I valori della glicemia a 120 min sono significativamente diversi tra maschi e femmine, $p < 0,05$ (Tabella 7; Figure 25, 26).

Tabella 7. Valori della glicemia nelle femmine e nei maschi di *A. leptodactylus* dopo stimolazione con 100 pmol di AsI-rCHH-ammide.

A. leptodactylus femmine, stimolo con 100 pmol di AsI rcHH-ammide					
ID animale	glicemia mg/dL				
	0'	30'	60'	120'	240'
23	5	5	10	12	4
24	1	3	7	7	4
25	4	6	6	9	6
media	3,3	4,7	7,7	9,3	4,7
deviazione standard	2,1	1,5	2,1	2,5	1,2

A. leptodactylus maschi, stimolo con 100 pmol di AsI rcHH-ammide					
ID animale	glicemia mg/dL				
	0'	30'	60'	120'	240'
26	4	10	16	29	18
27	3	13	24	51	58
28	7	14	30	52	74
media	4,7	12,3	23,3	44,0	50,0
deviazione standard	2,1	2,1	7,0	13,0	28,8

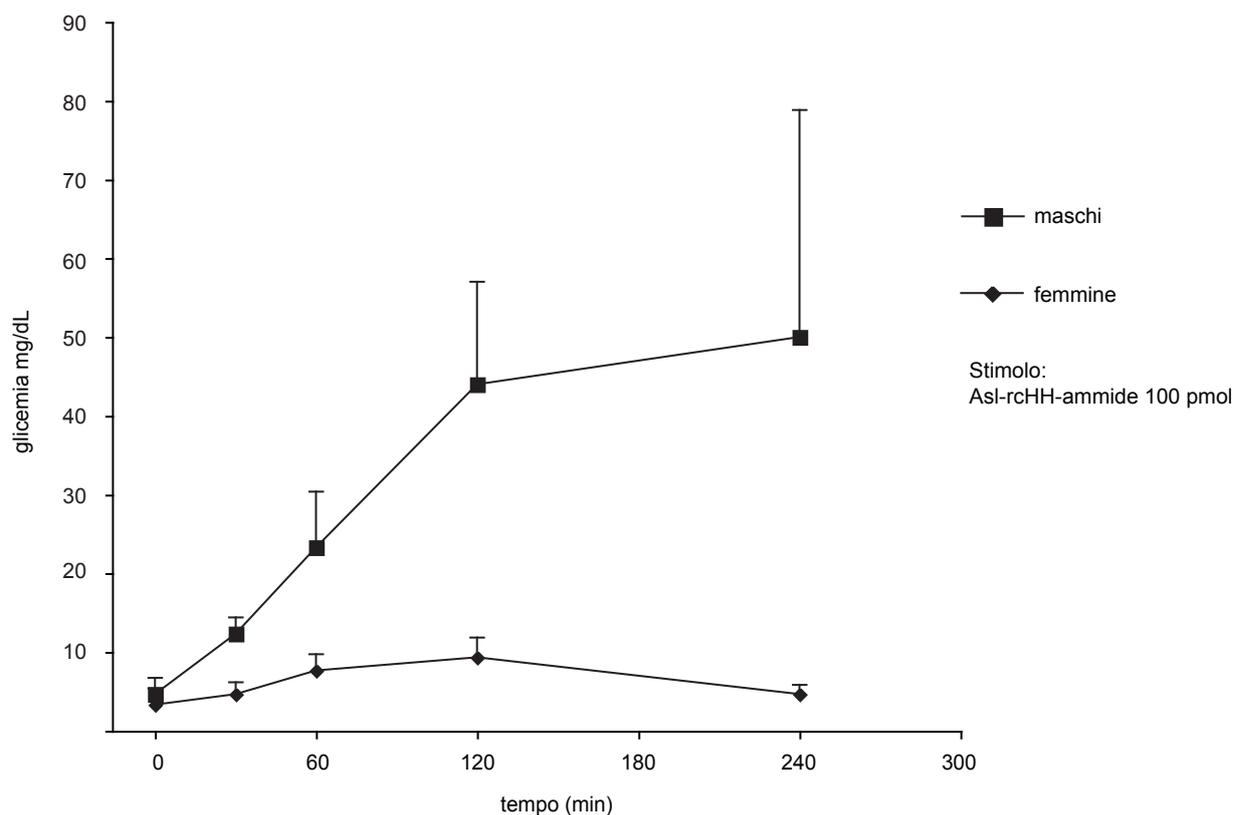
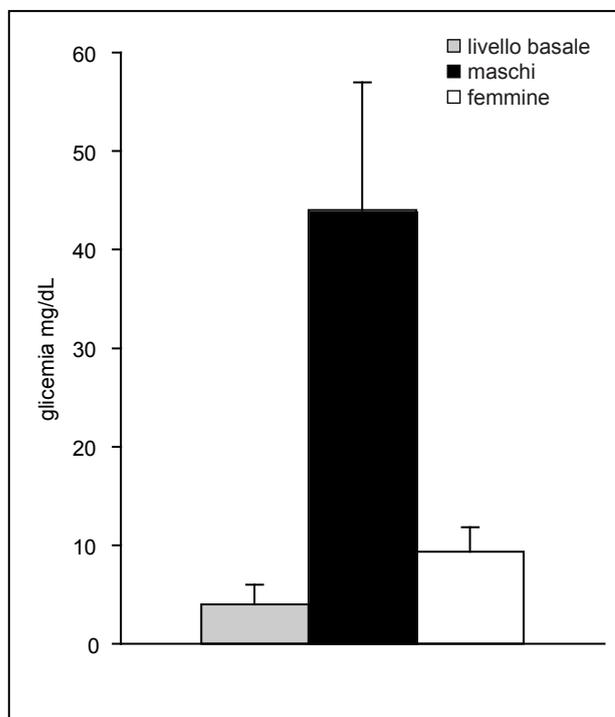


Figura 25. Curve da stimolo di Asl-rcHH-ammide in maschi e femmine di *A. leptodactylus*. I valori della glicemia sono espressi come media \pm deviazione standard.

Figura 26. Paragone dei picchi di massima concentrazione a 120 min della glicemia indotta da 100 pmol di Asl-rcHH-ammide in maschi e femmine di *A. leptodactylus*. Il livello basale si riferisce al valore della glicemia prima della stimolazione. I risultati sono espressi come media \pm deviazione standard. I valori della glicemia, nei maschi e nelle femmine, sono significativamente diversi, $p < 0,05$.



Caratterizzazione dell'anticorpo anti-cHH

L'anticorpo anti-Asl-rcHH è stato purificato da siero di coniglio attraverso due passaggi. Nel primo passaggio si sono isolate le IgG di coniglio mediante una cromatografia di affinità con proteina A. La specificità dell'anticorpo è stata quindi provata mediante *western blot* su campioni di estratto di peduncoli, estratto di ghiandole del seno e peptide ricombinante. Poiché l'anticorpo policlonale ottenuto mostrava una reattività crociata verso numerose proteine presenti nei peduncoli (Figura 27A), si è effettuata un'ulteriore purificazione per affinità, questa volta verso il peptide ricombinante. L'anticorpo così purificato si è dimostrato molto specifico, perdendo ogni reattività crociata (Figura 27B).

La sensibilità dell'anticorpo anti-Asl-rcHH è stata determinata mediante ELISA dove l'anticorpo, a diverse diluizioni, è stato fatto reagire con una quantità fissa di peptide

ricombinante. Attraverso una matrice di diluizioni seriali dell'anticorpo primario e di quello secondario si sono ottenute cinque curve di titolazione dalle quali risulta che l'anticorpo anti-Asl-rcHH è efficace sino a diluizioni molto spinte, come 1:128 000. Da queste curve si possono desumere anche i rapporti migliori delle diluizioni dei due anticorpi, che cadono nel punto di flesso delle curve (Figura 28).

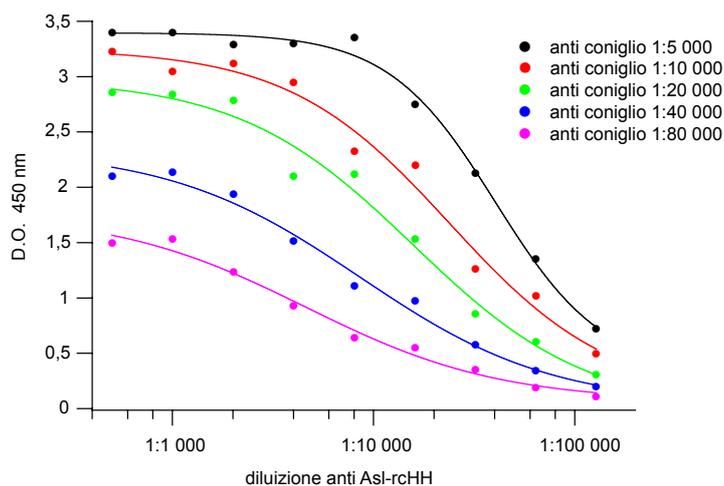


Figura 28. Curve di titolazione dell'anticorpo anti-Asl-rcHH riferite a diverse diluizioni dell'anticorpo secondario. Le curve sono state interpolate mediante il programma QtiPlot 0.9.

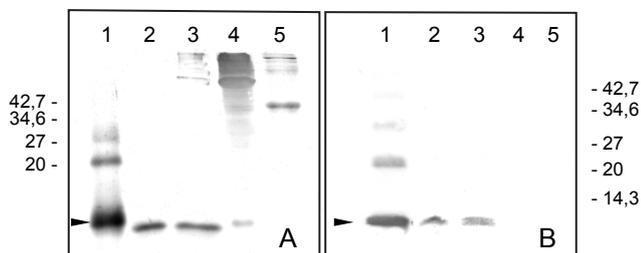


Figura 27. *Western blot* per il controllo della specificità dell'anticorpo anti-Asl-rcHH. A, *western blot* con l'anticorpo purificato mediante cromatografia di affinità con proteina A. Corsia 1: Asl-rcHH-Gly; corsia 2: estratto di ghiandole del seno di *P. clarkii*; corsia 3: estratto di ghiandole del seno di *A. leptodactylus*; corsia 4: estratto di peduncolo di *A. leptodactylus*; corsia 5: marcatori di peso molecolare, pesi in kDa. B, *western blot* con l'anticorpo purificato mediante cromatografia di affinità con Asl-rcHH-Gly. Corsia 1: Asl-rcHH-Gly; corsia 2: estratto di ghiandole del seno di *P. clarkii*; corsia 3: estratto di ghiandole del seno di *A. leptodactylus*; corsia 4: estratto di peduncolo di *A. leptodactylus*; corsia 5: marcatori di peso molecolare, pesi in kDa. L'antisiero purificato per affinità con proteina A presenta evidenti reazioni crociate con le proteine dell'emolinfa, dei peduncoli ed anche con alcune proteine dei marcatori di peso molecolare. Queste reazioni crociate scompaiono del tutto dopo la purificazione per affinità con il cHH. Le bande multiple presenti nelle corsie A1 e B1 sono dovute a forme polimeriche del cHH ricombinante. La freccia indica la posizione della banda relativa ad Asl-rcHH-Gly.

Inibizione del cHH

Per verificare se fosse possibile usare un anticorpo specifico per inibire l'attività biologica del cHH, si è approntato un esperimento in cui è stato iniettato in *A. leptodactylus* l'anticorpo anti-Asl-rcHH e successivamente il cHH ammidato. Le quantità di peptide e di anticorpo iniettate sono state calcolate in modo da avere un rapporto di 1 a 4 tra il cHH e l'anticorpo, in modo che questo fosse in concentrazione sufficiente a legare quanto più peptide possibile. In ogni animale sono stati iniettati 98 pmol di anticorpo e dopo 10 min 26,6 pmol di Asl-rcHH-ammide. Come controllo sono stati utilizzati gli stessi animali, iniettati con 26,6 pmol di Asl-rcHH-ammide, ma in un'altra giornata.

La curva da stimolo ottenuta dagli animali trattati con l'anticorpo è molto diversa dal controllo, con un picco della glicemia di $16 \pm 7,5$ mg/dL dopo un'ora, valore significativamente diverso ($p < 0,05$) dai $37 \pm 19,4$ mg/dL del controllo allo stesso tempo (Tabelle 8, 9; Figure 29, 30).

Tabella 8. Valori della glicemia in *A. leptodactylus* dopo stimolazione con 26,6 pmol di Asl-rcHH-ammide.

***A. leptodactylus*, stimolo con 26,6 pmol di Asl-rcHH-ammide**

ID animale	glicemia mg/dL				
	0'	30'	60'	120'	240'
1	8	35	47	42	14
3	7	27	40	36	12
5	7	12	13	11	8
6	5	16	23	14	11
7	16	38	62	59	34
media	8,6	25,6	37,0	32,4	15,8
deviazione standard	4,3	11,4	19,4	20,1	10,4

Tabella 9. Valori della glicemia in *A. leptodactylus* dopo l'iniezione di 98 pmol di anticorpo anti-rcHH seguita dallo stimolo con 26,6 pmol di Asl-rcHH-ammide.

***A. leptodactylus*, inibizione con 98 pmol di anti-Asl-rcHH stimolo con 26,6 pmol di Asl-rcHH-ammide**

ID animale	glicemia mg/dL					
	-10'	0'	30'	60'	120'	240'
1	11	11	16	24	14	14
3	7	7	10	16	9	7
5	7	7	11	9	7	6
6	6	6	9	8	7	7
7	15	15	23	23	19	19
media	9,2	9,2	13,8	16,0	11,2	10,6
deviazione standard	3,8	3,8	5,8	7,5	5,2	5,7

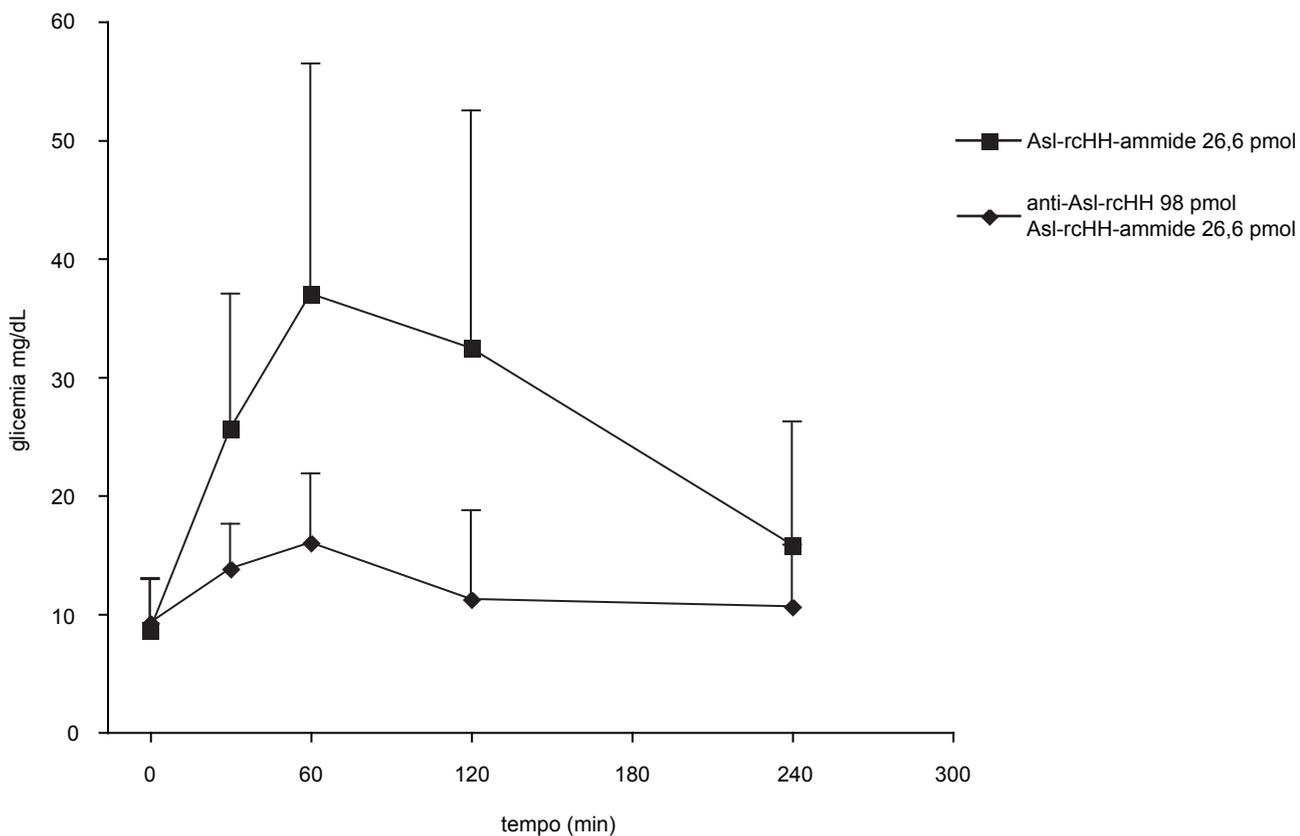
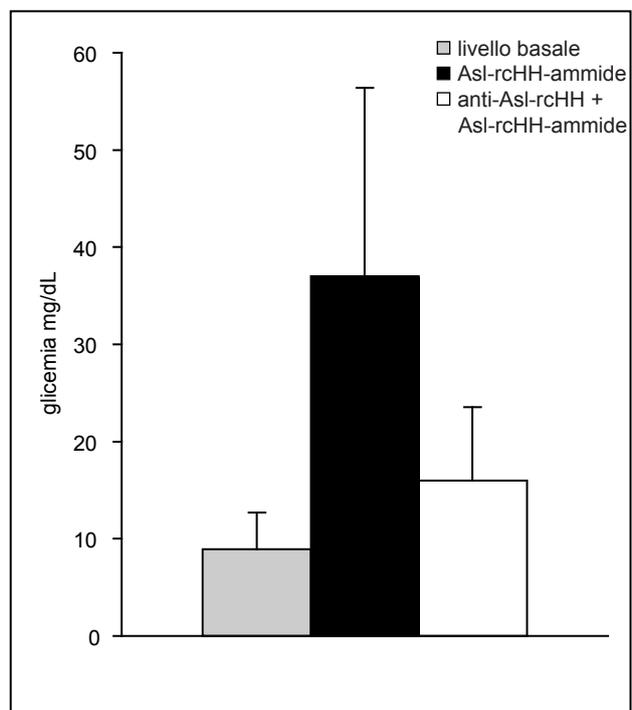


Figura 29. Curve da stimolo con Asl-rcHH-ammide e da inibizione dell'induzione con anticorpo anti-Asl-rcHH in *A. leptodactylus*. I valori della glicemia sono espressi come media \pm deviazione standard.

Figura 30. Paragone dei picchi di massima concentrazione della glicemia a 60 min indotta da 26,6 pmol di Asl-rcHH-ammide e dell'inibizione dell'induzione con anticorpo anti-Asl-rcHH in *A. leptodactylus*. Il livello basale si riferisce al valore della glicemia prima della stimolazione. I risultati sono espressi come media \pm deviazione standard. I valori della glicemia, tra gli animali stimolati con il peptide ammidato e quelli inibiti con l'anticorpo, sono significativamente diversi, $p < 0,05$.



Discussione

L'ammidazione C-terminale è una modificazione post-traduzionale molto diffusa, necessaria a conferire attività biologica a molti peptidi e circa alla metà dei neuropeptidi. Tutti i cHH sinora caratterizzati tramite tecniche biochimiche, quali la degradazione di Edman, possiedono la valina in posizione C-terminale ammidata (Fanjul-Moles, 2006; Giulianini e Edomi, 2006). Il ruolo fondamentale che questa modificazione ha per l'attività biologica dei neuropeptidi dei crostacei è stato sinora provato sperimentalmente per pochi ormoni, PDH, RPCH e VIH (Christensen et al., 1979; Riehm et al., 1985; Ohira et al., 2006). L'importanza dell'ammidazione per la funzionalità del cHH è stata stabilita in una sola specie, il peneide *M. japonicus* (Katayama et al., 2002). Il nostro studio ha provato che anche nel gambero *A. leptodactylus* il gruppo amminico C-terminale è fondamentale per la piena attività biologica del cHH ed ha esteso questa prova, mediante dei saggi biologici *in vivo*, ad altre due specie, *P. clarkii*, che appartiene alla stessa superfamiglia (Astacoidea) ed infraordine (Astacidea) di *A. leptodactylus*, e *P. elegans*, che appartiene ad una superfamiglia (Palaemonoidea) ed infraordine (Caridea) diversi.

La sequenza amminoacidica dei cHH è costante per quanto riguarda la sua lunghezza ed è formata da 72 residui (Fanjul-Moles, 2006; Giulianini e Edomi, 2006) e la sequenza del Asl-rcHH-ammide concorda con questo dato, essendo costituita da 72 amminoacidi propri dell'ormone e da un breve *tag* di 12 residui dovuto allo Strep-*tag* fuso all'estremità N-terminale. La massa molecolare del peptide ricombinante ammidato è di 9746,03 Da, un valore in ottimo accordo con quello di 9745,93 Da ottenuto dall'analisi spettrometrica MALDI-TOF. L'analisi conformazionale mediante dicroismo circolare ha evidenziato come entrambi i peptidi ricombinanti, Asl-rcHH-Gly e Asl-rcHH-ammide, abbiano un'elevata percentuale di alfa-eliche, con il peptide ammidato che ne possiede la percentuale più alta. Questi risultati sono in accordo con i dati precedentemente riportati per il cHH di *P. bouvieri*

e di *M. japonicus* e per il MIH di *M. japonicus* (Huberman et al., 1989; Katayama et al., 2002; Ohira et al., 2005) supportando l'ipotesi di una corretta conformazione dei peptidi ricombinanti. La struttura terziaria del Asl-cHH ottenuta per omologia verso il MIH di *M. japonicus* è risultata essere composta da quattro alfa-eliche. Il modello ottenuto è simile, nella struttura, al modello del cHH di *M. japonicus* ottenuto per omologia verso il MIH di *M. japonicus*, e come il Maj-cHH non possiede l'alfa-elica 1 che nel Maj-MIH si trova nel motivo 4 del tratto N-terminale della sequenza (Katayama et al., 2003). Una grossa differenza tra i peptidi appartenenti alle sottofamiglie del cHH e del MIH sta proprio in questa regione, dove sono stati identificati due motivi distinti, il 2 per il cHH e il 4 per il MIH, e dove nel MIH è presente un residuo di Gly in posizione 12 che è assente nel cHH (Chen et al., 2005). E' probabile, quindi, che l'assenza dell'alfa-elica 1 nel cHH sia dovuta alla mancanza della glicina.

Il breve *tag* fuso in posizione N-terminale, non ha intaccato l'attività biologica dei peptidi ricombinanti. Questo dato è in accordo con le caratteristiche biochimiche riportate per lo *Strep-tag* II che è biologicamente inerte e non interferisce con il *folding* delle proteine (Schmidt e Skerra, 2007). Risultati simili sulla mancata interferenza del *tag* di purificazione sulla funzionalità del cHH si sono ottenuti per il cHH di *M. ensis* dove un lungo *tag* di 27 residui fuso al N-terminale non ha influenzato l'attività biologica del peptide ricombinante ed anche per il rPej-SGP-I-ammide, un cHH ricombinante con un breve *tag* di quattro residui che aveva conservato la sua funzionalità (Gu et al., 2000; Katayama et al., 2002).

La stima della quantità di cHH presente nelle ghiandole del seno di *A. leptodactylus* e *P. clarkii* ha fornito valori compresi tra 45,09-88,39 pmol (378-741 ng) per GS. Questi dati sono in accordo con quanto riportato per una specie affine, *Astacus astacus*, in cui è stata determinata una quantità di 127 pmol/GS (1,065 µg/GS) (Röser, 2005). Valori diversi di un ordine di grandezza sono riportati

in letteratura per altre specie di crostacei. In *C. maenas* è stato determinato un intervallo di cHH pari a 270-489 pmol/GS, variabile a seconda dello stadio di muta degli animali (Chung e Webster, 2003). Valori inferiori sono stati invece trovati in *P. bouvieri* con 60 ng/GS per il cHH-I e 20 ng/GS per il cHH-II (Huberman et al., 1995), come pure in *P. elegans* nel quale la quantità stimata di cHH per ghiandola del seno era pari a $5,6 \pm 2,6$ pmol/GS (Lorenzon et al., 2004).

Questo studio ha dimostrato che in *A. leptodactylus* l'efficacia del Asl-rcHH-ammide era comparabile a quella del peptide nativo. Una quantità di 1,7 pmol/g di peso vivo era capace di elevare velocemente la concentrazione di glucosio nell'emolinfa, con un picco di massima osservabile dopo un'ora dall'iniezione. Dopo quattro ore il livello di glucosio era tornato ai valori basali. Il raddoppio della quantità di peptide ammidato iniettata ha prodotto una risposta più forte con una concentrazione di glucosio quasi raddoppiata, confermando così la relazione fra dose ed effetto tra il Asl-rcHH-ammide e il livello glicemico. Il profilo della curva da stimolo era diverso se l'iperglicemia era stata indotta da 1,7 pmol/g o 3,3 pmol/g di peso vivo di Asl-rcHH-ammide o dal peptide nativo. Il peptide ricombinante ha indotto un massimo di incremento dopo un'ora, mentre l'estratto di ghiandola del seno ha indotto una risposta più lenta, con il picco di glicemia presente alle due ore. Quando gli animali sono stati iniettati con la dose di 1,7 pmol/g di peso vivo di Asl-rcHH-ammide, l'effetto iperglicemico del peptide è calato entro le due ore ed alle quattro ore era scomparso del tutto. Questo risultato è in buon accordo con l'emivita di circa 10 min riportata per il cHH di *C. maenas* e quindi con la veloce clearance che ci si aspetta per un ormone (Chung e Webster, 1996; Wilcockson et al., 2002; Chung e Webster, 2005). La maggior dose di peptide ammidato iniettata non solo ha indotto un effetto quantitativamente superiore, ma ha anche rallentato il ritorno del glucosio al suo livello basale. Ciò è dovuto ad una insufficiente depurazione del peptide dall'emolinfa causata dall'alta concentrazione

dell'ormone circolante. Un andamento simile è stato osservato per l'estratto di ghiandole del seno che ha mantenuto un forte effetto iperglicemizzante anche alle quattro ore. L'estensione dell'attività biologica dei peptidi nativi potrebbe essere dovuta anche alla presenza di stereoisomeri differenti nell'estratto. In *A. leptodactylus* ed *O. limosus* sono stati trovati due isomeri che differiscono per l'epimerizzazione della Phe³. Le risposte iperglicemiche dei due isomeri erano simili per quel che riguarda la massima concentrazione del glucosio, ma differivano per l'andamento temporale, con l'isomero D-cHH che aveva un prolungamento dell'attività biologica (Soyez et al., 1994; Serrano et al., 2003).

Il peptide Asl-rcHH-Gly non ha mostrato una potenza comparabile. Alla dose di 1,7 pmol/g di peso vivo, la concentrazione di glucosio dopo un'ora era significativamente inferiore a quella osservata dopo la stimolazione con la stessa quantità di ormone ammidato. Solamente una dose dieci volte maggiore, 16,7 pmol/g di peso vivo, ha indotto un incremento consistente nella glicemia che è rimasto comunque inferiore a quello indotto da una dose cinque volte inferiore di peptide ammidato pari a 3,3 pmol/g di peso vivo. Questi risultati dimostrano chiaramente che l'ammidazione è essenziale nel fornire una piena funzionalità biologica al cHH, dato che l'ormone non ammidato possiede una potenza notevolmente inferiore. Infatti, per osservare un effetto iperglicemico con un peptide ricombinante non ammidato, è necessario adoperarlo ad alte dosi, come è stato fatto in un saggio eterologo su *A. leptodactylus* dove è stato iniettato un cHH ricombinante di *N. norvegicus* ad una concentrazione finale nell'emolinfa di 1×10^{-8} M, una concentrazione circa 100 volte superiore a quella massima usata in questo studio (Mettulio et al., 2004). La capacità dei peptidi non ammidati di indurre una risposta iperglicemica è stata confermata per Mee-rcHH-A e per Mee-rcHH-B (Gu et al., 2000) che possiedono una sequenza VGK C-terminale, e per rPej-SGP-I-Gly, il cui effetto è simile al rPej-SGP-I-OH e di un ordine di grandezza inferiore di quello di rPej-SGP-I-ammide

(Katayama et al., 2002). I dati ottenuti con questo studio sono in accordo con quanto riportato per *M. japonicus* (Katayama e Nagasawa, 2004) e provano come l'ammidazione influenzi la conformazione molecolare e sia importante per conferire l'attività iperglicemica. La minore affinità per il recettore che i peptidi non ammidati presentano è dovuta a diversi fattori; una modificazione nella struttura secondaria, con la presenza di una percentuale inferiore di alfa-eliche come rilevato dagli spettri di dicroismo circolare; un impedimento sterico al C-terminale della sequenza amminoacidica dovuto alla presenza del residuo di Gly; alla mancanza del gruppo amminico C-terminale, la cui presenza può rendere il peptide maggiormente idrofobico e quindi migliorare il suo legame al recettore (Prigge et al., 2000) (Figura 31).

Particolarmente interessante è il fatto che il peptide ammidato abbia indotto risposte diverse a seconda del sesso degli animali. Nei maschi si è ottenuta una forte risposta iperglicemica correlata all'elevata quantità di ormone iniettato, 3,3 pmol/g di peso vivo, con un picco di $50 \pm 28,8$ mg/dL a 4 ore. La risposta nelle femmine è stata di molto inferiore, con appena $9,3 \pm 2,5$ mg/dL. Questo dato fa supporre che nelle femmine vi fosse una diminuita affinità dei recettori verso il cHH oppure che le cascate dei segnali intracellulari attivati dal legame del cHH con i recettori fossero, in qualche modo, disattivate. Che la responsività al cHH da

parte degli organi bersaglio possa variare durante il ciclo vitale è stato dimostrato in *C. maenas*. In questa specie i livelli circolanti di MIH e cHH si mantengono pressoché costanti durante tutto il ciclo vitale, mentre la capacità di questi peptidi di inibire l'organo Y si riduce di molto durante le fasi di pre-muta ed ecdisi. Questa modifica nell'attività inibitoria dei due ormoni non è dovuta ad un'alterazione del legame col recettore, ma ad una diversa attività dei segnali intracellulari (Chung e Webster, 2003).

La diversa reattività al cHH tra maschi e femmine potrebbe essere dovuta al particolare stadio di maturazione degli animali dato che gli esperimenti sono stati condotti nei mesi invernali, momento in cui le femmine sono in vitellogenesi (Balik et al., 2005). La riproduzione è un processo in cui la richiesta energetica aumenta considerevolmente ed è accompagnata da una diversa mobilitazione delle risorse energetiche nei due sessi. In *Parastacus varicosus* le variazioni stagionali nel metabolismo intermedio sembrano essere correlate alla maturazione delle gonadi nelle femmine ed alla preparazione per la riproduzione nei maschi. In questa specie il periodo riproduttivo coincide con l'estate, come risulta dall'aumento dell'indice gonado-somatico. In questa stagione è stato osservato un calo nella concentrazione delle proteine nell'emolinfa in entrambi i sessi, e nelle femmine un aumento del glucosio nell'emolinfa

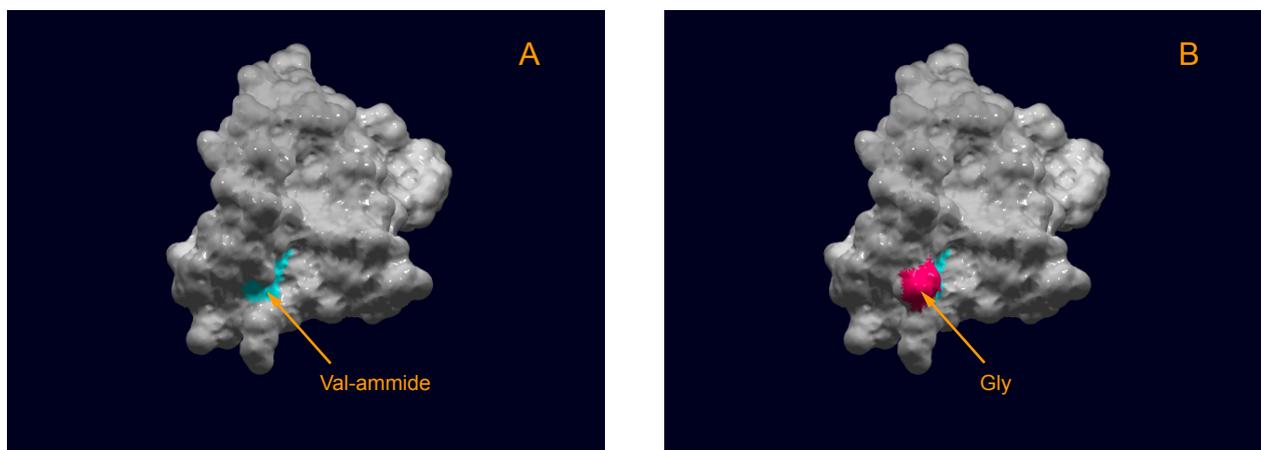


Figura 31. Struttura della superficie di AsI-cHH-amide (A) e AsI-cHH-Gly (B). La struttura è stata modellata per omologia sulla struttura del MIH di *M. japonicus* usando il SWISS-MODEL server (Arnold et al., 2006). L'immagine è stata generata mediante l'applicazione Swiss-PdbViewer, versione SPDBV_3.9b1.01_univ per OSX (Guex e Peitsch, 1997), mentre il rendering 3D è stato fatto mediante il programma MegaPOV.

correlato ad un decremento delle riserve di glicogeno muscolare ed ovarico. Inoltre, nelle femmine è stata osservata una diversa distribuzione delle riserve lipidiche che calano nell'epatopancreas e contemporaneamente aumentano nelle gonadi (da Silva-Castiglioni et al., 2007). L'osservazione che il cHH partecipa alla regolazione della vitellogenesi in *H. americanus* (de Kleijn et al., 1998) concorda con le variazioni metaboliche descritte per *P. varicosus* per quanto riguarda la glicemia e la distribuzione tissutale dei lipidi, in quanto il cHH è notoriamente coinvolto nella regolazione della glicemia, ma è stato dimostrato anche un suo coinvolgimento nel metabolismo lipidico (Santos et al., 1997). La differente risposta legata al sesso che è stata osservata, in cui le femmine hanno mostrato una ridotta reattività al cHH, induce a pensare che anche in *A. leptodactylus* il cHH sia coinvolto nella regolazione della vitellogenesi.

Per quanto riguarda i saggi eterologhi, si deve considerare che *A. leptodactylus* e *P. clarkii* appartengono a due famiglie sorelle e che le rispettive sequenze del cHH sono altamente omologhe in quanto differiscono solamente per due amminoacidi (Figura 32). Un residuo di Asp è presente nella posizione 24 della sequenza amminoacidica del cHH di *A. leptodactylus*, mentre in *P. clarkii* è presente un residuo di Glu. Entrambi questi amminoacidi sono acidi, l'unica differenza riguarda la lunghezza della catena laterale e quindi probabilmente non è così rilevante. L'altra differenza riguarda la coda C-terminale, dove la Met⁷¹ di *A. leptodactylus* è sostituita da un residuo di Thr (Figura 33).

Il Asl-rcHH-ammide è stato capace di indurre una consistente risposta iperglicemica in *P. clarkii*, sebbene inferiore a quella indotta in *A. leptodactylus*. Il profilo temporale della curva da stimolo era simile, con un picco presente ad un'ora. Invece, l'iniezione di Asl-rcHH-Gly ha dato come risultato uno scarso aumento nella concentrazione di glucosio, anche se la dose iniettata era cinque volte superiore a quella del peptide ammidato. L'iniezione di una ghiandola del seno equivalente di *Procambarus* ha indotto

un forte aumento della glicemia e, come avvenuto per *A. leptodactylus*, il picco di glucosio è stato osservato a due ore, seguito da un lento decremento nella concentrazione emolinfatica di glucosio che a quattro ore era ancora elevata. È probabile che la diminuita risposta iperglicemica indotta dal peptide ammidato in *P. clarkii* rispetto a quanto osservato nel saggio omologo con *A. leptodactylus* sia dovuta ad una minore affinità per il recettore, complice la sostituzione della Thr⁷¹ con una Met, e quindi che la specie-specificità del cHH sia correlata al dominio C-terminale. Infatti, è stato dimostrato per altri peptidi, che una corretta sequenza amminoacidica del dominio C-terminale è importante per la loro funzionalità. Analisi mutazionali condotte sul MIH di *M. japonicus* hanno provato che il sito funzionale di questo peptide è localizzato nelle regioni C-terminali delle alfa-eliche 1 (N-terminale) e 5 (C-terminale) (Katayama et al., 2004). L'importanza del ruolo della coda C-terminale è stata stabilita anche per un peptide correlato al cHH come l'*Ion Transport Peptide* (ITP) di *Schistocerca gregaria*. I peptidi non ammidati Kc1ITP-GKK e Kc1ITP-G secreti da cellule transfettate Kc1 di *Drosophila* avevano una ridotta attività stimolante paragonati a un ITP sintetico a causa dell'incompleta elaborazione della sequenza C-terminale, mentre il Kc1ITP-ammide aveva dimostrato avere un'attività paragonabile all'ITP di riferimento. Una completa perdita della funzione biologica è stata invece riportata per i mutanti troncati (Kc1ITP₇₁) che mancavano della sequenza LGKK al C-terminale (Wang et al., 2000).

Per provare la capacità del Asl-rcHH di indurre un effetto iperglicemizzante su una specie filogeneticamente distante da *A. leptodactylus* (Astacidea), si è scelto di eseguire un saggio eterologo sul gamberetto *P. elegans* (Caridea). La sequenza amminoacidica del cHH di *P. elegans* è sconosciuta, ma si può supporre che presenti un buon grado di omologia con la sequenza nota di un altro Palaemonoidea, *M. rosenbergii* (Chen et al., 2004) e quindi dovrebbe avere un'omologia più bassa con Asl-cHH (Chen et al., 2005). Pertanto ci

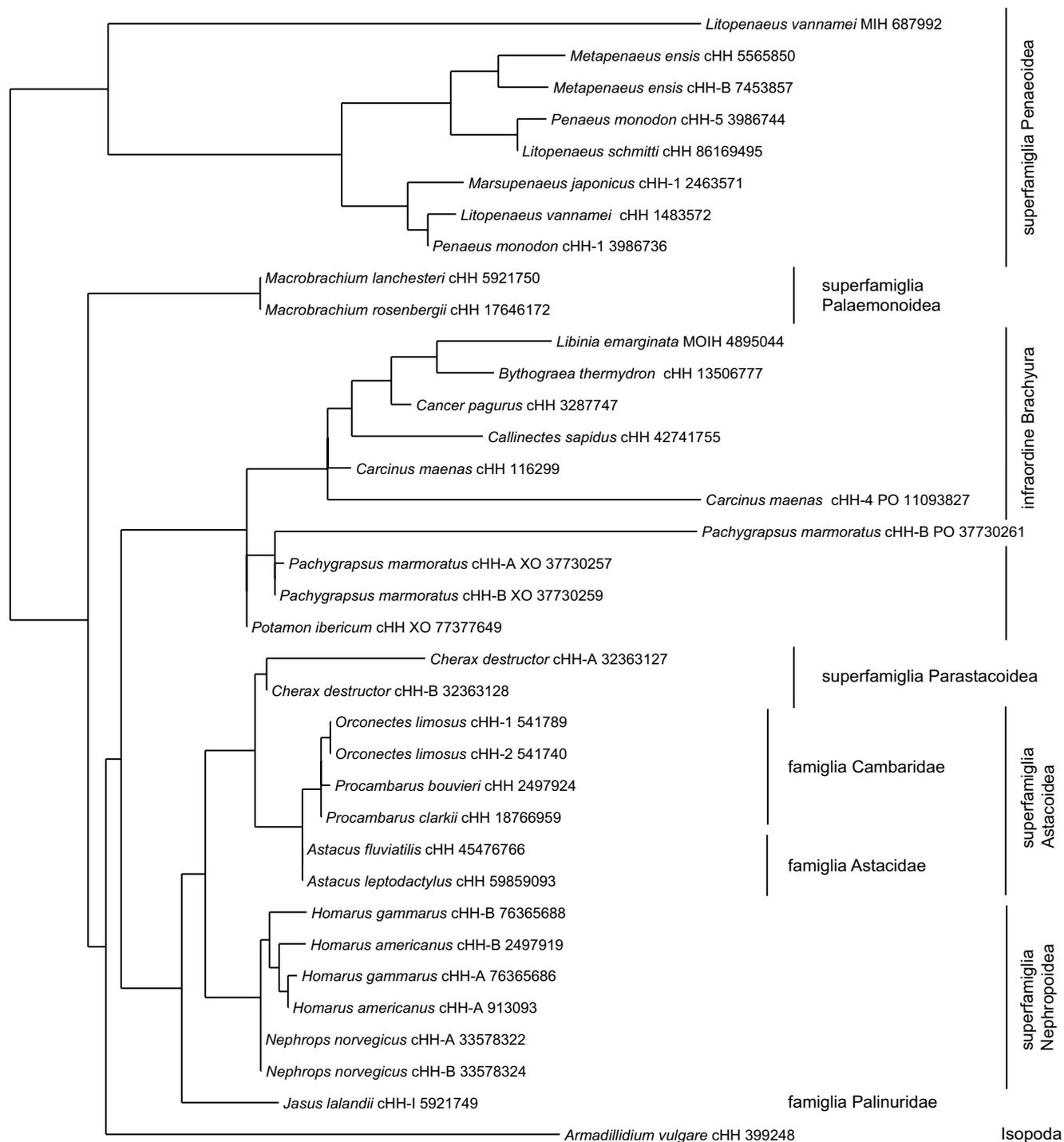


Figura 32. Dendrogramma delle sequenze del cHH costruito mediante la massima somiglianza usando il programma PHYLML sul server Phylogeny.fr. I numeri di identificazione delle sequenze, GI, seguono i nomi delle specie.

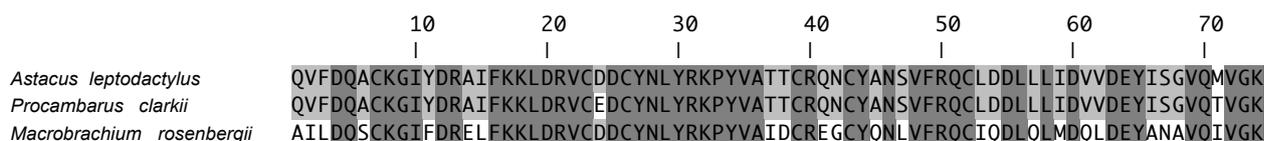


Figura 33. Paragone delle sequenze amminoacidiche dedotte del cHH di *A. leptodactylus* (GI 42766536), *P. clarkii* (GI 18766959) e *M. rosenbergii* (GI 17646172). Le sequenze di *A. leptodactylus* e *P. clarkii* hanno un'omologia del 97,3%, mentre l'omologia tra *A. leptodactylus* e *M. rosenbergii* è molto più bassa, 68,92%. Le omologie sono state calcolate usando il programma Jalview (Clamp et al., 2004).

si aspettava una minore attività biologica di Asl-rcHH in *P. elegans*. Saggi eterologhi condotti con estratti di ghiandole del seno avevano mostrato che l'estratto di *A. leptodactylus* non era in grado di indurre alcuna risposta in *P. serratus* (Leuven et al., 1982). Al contrario, 3,3 pmol/g di peso vivo di Asl-rcHH-ammide ha indotto in *P. elegans* una risposta rilevabile con un picco dopo un'ora che era il doppio del livello iniziale, un incremento che era però inferiore a quello osservato nel saggio omologo condotto su *A. leptodactylus*. Anche nel saggio eterologo con *P. elegans* l'andamento temporale della curva glicemica ha confermato la presenza del picco di massima concentrazione a 60 min dallo stimolo con il ritorno del livello di glucosio ai suoi valori basali dopo due ore. L'iperglicemia indotta da Asl-rcHH-Gly era inferiore a quella osservata dopo l'iniezione del peptide ammidato, ma la differenza non è risultata essere statisticamente significativa ($p > 0,05$). È comunque da considerare che il peptide non ammidato è stato iniettato ad una dose cinque volte superiore e quindi la sua attività biologica è dovuta alla maggiore quantità di ormone iniettata che compensa la probabile minore affinità per il recettore. Questo dimostra che persino in specie filogeneticamente distanti l'attività biologica viene parzialmente conservata, probabilmente a causa di una generale somiglianza strutturale del neuropeptide.

La mole di dati che si è accumulata negli ultimi anni riguardo alla biologia dei neuroormoni dei crostacei è notevole, ma i dati relativi ad una possibile manipolazione ormonale della riproduzione nei crostacei sono estremamente esigui, nonostante l'esigenza, per l'acquacultura, di disporre di tecniche meno cruente dell'ablazione dei peduncoli oculari per l'induzione della maturità ovarica (Okumura, 2004). Seguendo questo filone di ricerca si è dimostrato che anticorpi specifici possono interferire sull'attività biologica dei loro peptidi bersaglio. L'iniezione in *A. leptodactylus* di un anticorpo policlonale purificato anti-Asl-rcHH prima dell'iniezione di Asl-rcHH-ammide ha significativamente ridotto l'effetto iperglicemico del

peptide ammidato rispetto al controllo. Esperimenti in parte simili sono stati condotti su *P. elegans* e su *P. monodon*, ma in questi casi l'estratto di ghiandole del seno era stato preincubato con l'anticorpo prima di essere iniettato negli animali (Giulianini et al., 2002; Treerattrakool et al., 2006). In *P. monodon* è stato inoltre provato che l'anticorpo può inibire la funzionalità dell'ormone nativo. Infatti, l'iniezione di anti-Pem-cHH-1 ha causato un calo nella concentrazione di glucosio emolinfatico rispetto al controllo iniettato con PBS. La capacità dell'anticorpo anti-Asl-rcHH di deprimere considerevolmente la funzionalità del cHH ha definitivamente provato che è possibile usare anticorpi specifici per modulare l'attività biologica *in vivo* degli ormoni.

I crostacei rappresentano un ottimo modello animale per lo studio dei meccanismi d'azione ormonale. La crescente massa di informazioni disponibili ha evidenziato come il concetto che, in questo gruppo animale, ad ogni ormone corrisponda un'unica funzione sia ormai superato. Ogni neuropeptide può, infatti, essere considerato come un ormone multifunzionale coinvolto in una complessa rete di interazioni fisiologiche e con funzioni talvolta sovrapposte, dovute in parte ad una somiglianza strutturale. Per una migliore comprensione dei meccanismi d'azione di questi neuropeptidi è necessaria una pronta disponibilità di ormoni da usare in saggi *in vivo*, che si possono ottenere solamente mediante tecniche di biologia molecolare. Infatti, per l'estrazione dei peptidi nativi è necessario partire da un numero elevato di ghiandole del seno — per esempio sono serviti migliaia di peduncoli per ottenere il GIH di *H. americanus* (Meusy e Soyez, 1991). I peptidi ricombinanti hanno anche il vantaggio che possono essere facilmente modificati, consentendo lo studio delle funzioni svolte dalle modificazioni post-traduzionali o il riconoscimento dei ruoli funzionali propri delle diverse varianti genetiche. Le prospettive per una migliore comprensione delle funzioni dei peptidi appartenenti alla famiglia del cHH risiedono nella scelta di un numero limitato di

specie modello, nella standardizzazione dei saggi *in vivo/in vitro*, meglio se omologhi, nella produzione di peptidi ricombinanti pienamente funzionali e nella conoscenza dei meccanismi di risposta cellulare innescati da questi ormoni (Giulianini e Edomi, 2006).

Una migliore conoscenza dei meccanismi di controllo della crescita e della riproduzione nei crostacei è alla base per lo sviluppo di tecniche di manipolazione ormonale non invasive che ad oggi non esistono. I crostacei rappresentano una risorsa economica molto importante per molti paesi in via di sviluppo e sono estesamente allevati in impianti acquacolturali (Delmendo, 1989). Al momento la sola tecnica di manipolazione ormonale disponibile è l'ablazione dei peduncoli oculari che serve ad indurre la maturazione ovarica nei riproduttori (Primavera, 1978; Juinio-Menez e Ruinata, 1996). Per un effettivo miglioramento dei riproduttori sono necessarie tecniche di manipolazione ormonale meno invasive quali la somministrazione di ormoni esogeni o l'uso di anticorpi specifici e la disponibilità di metodiche per il dosaggio degli ormoni nell'emolinfa in modo da monitorare lo stadio di sviluppo dei riproduttori.

Con questo lavoro si è dimostrata l'importanza dell'ammidazione C-terminale per la funzionalità

biologica del cHH; si è prodotto un peptide ricombinante con un'attività biologica paragonabile a quella dell'ormone nativo; si è evidenziato che l'attività del cHH dipende non solo dalla quantità di ormone circolante, ma è anche legata alla responsività degli organi bersaglio; si è dimostrato che è possibile modulare la funzionalità di un ormone mediante l'iniezione di anticorpi specifici. La possibilità di avere a disposizione un cHH pienamente funzionante apre la strada a molteplici studi atti a comprendere meglio il ruolo di questo ormone nei processi fisiologici dei crostacei. Inoltre, è possibile pensare ad effettuare dei trattamenti a base di peptidi ricombinanti associati ad alginati (Gombotz e Wee, 1998), da somministrare sotto forma di mangime, in modo da avere una modulazione esogena degli assi ormonali, senza il bisogno di ricorrere a tecniche invasive quali l'ablazione dei peduncoli oculari, oggi comunemente adottata per indurre la maturazione ovarica. La preparazione di un anticorpo specifico anti-cHH consentirà la messa a punto di un dosaggio ELISA da usare per monitorare le variazioni nella concentrazione emolinfatica di questo ormone legate agli stadi di crescita o riproduzione oppure dovute a fattori stressogeni.

Bibliografia

- Abramowitz, A. A., Hisaw, F. L. e Papandrea, D. N. (1944). The occurrence of a diabetogenic factor in the eyestalks of crustaceans. *Biol Bull* **86**, 1-5.
- Aguilar, M. B., Falchetto, R., Shabanowitz, J., Hunt, D. F. e Huberman, A. (1996). Complete primary structure of the molt-inhibiting hormone (MIH) of the Mexican crayfish *Procambarus bouvieri* (Ortmann). *Peptides* **17**, 367-374.
- Aguilar, M. B., Soye, D., Falchetto, R., Arnott, D., Shabanowitz, J., Hunt, D. F. e Huberman, A. (1995). Amino acid sequence of the minor isomorph of the crustacean hyperglycemic hormone (CHH-II) of the Mexican crayfish *Procambarus bouvieri* (Ortmann): presence of a D-amino acid. *Peptides* **16**, 1375-1383.
- Andrew, R. D. e Shivers, R. E. (1976). Ultrastructure of neurosecretory granule exocytosis by crayfish sinus gland induced with ionic manipulations. *J Morphol* **150**, 253-278.
- Andrew, R. D., Orchard, I. e Saleuddin, A. S. M. (1978). Structural re-evaluation of the neurosecretory system in the crayfish eyestalk. *Cell Tissue Res* **190**, 235-246.
- Andrews, P. M., Copeland, D. E. e Fingerma, M. (1971). Ultrastructural study of the neurosecretory granules in the sinus gland of the blue crab, *Callinectes sapidus*. *Cell Tissue Res* **113**, 461-471.
- Arnold, K., Bordoli, L., Kopp, J. e Schwede, T. (2006). The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics* **22**, 195-201.
- Azzouna, A., Philippe, M., Jarry, T., Grève, P. e Martin, G. (2003). Localization of crustacean hyperglycemic and vitellogenesis-inhibiting hormones in separate cell types in the protocerebrum of the woodlouse *Armadillidium vulgare* (Crustacea, Isopoda). *Gen Comp Endocrinol* **131**, 134-142.
- Balik, I., Cubuk, H., Ozrok, R. e Uysal, R. (2005). Some biological characteristics of crayfish (*Astacus leptodactylus* Eschscholtz, 1823) in Lake Eğirdir. *Turk J Zool* **29**, 295-300.
- Batas, B. e Chaudhuri, J. B. (1999). Considerations of sample application and elution during size-exclusion chromatography-based protein refolding. *J Chromatogr A* **864**, 229-236.
- Brown, F. A. (1933). The Controlling mechanism of chromatophores in *Palaemonetes*. *PNAS* **19**, 327-329.
- Bulau, P., Meisen, I., Reichwein-Roderburg, B., Peter-Katalinić, J. e Keller, R. (2003). Two genetic variants of the crustacean hyperglycemic hormone (CHH) from the Australian crayfish, *Cherax destructor*: detection of chiral isoforms due to posttranslational modification. *Peptides* **24**, 1871-1879.
- Bulau, P., Okuno, A., Thome, E., Schmitz, T., Peter-Katalinić, J. e Keller, R. (2005). Characterization of a molt-inhibiting hormone (MIH) of the crayfish, *Orconectes limosus*, by cDNA cloning and mass spectrometric analysis. *Peptides* **26**, 2129-2136.
- Chang, E. S., Chang, S. A., Beltz, B. S. e Kravitz, E. A. (1999). Crustacean hyperglycemic hormone in the lobster nervous system: localization and release from cells in the subesophageal ganglion and thoracic second roots. *J Comp Neurol* **414**, 50-56.
- Chang, E. S., Keller, R. e Chang, S. A. (1998). Quantification of crustacean hyperglycemic hormone by ELISA in hemolymph of the lobster, *Homarus americanus*, following various stresses. *Gen Comp Endocrinol* **111**, 359-366.
- Chen, S. H., Lin, C. Y. e Kuo, C. M. (2004). Cloning of two crustacean hyperglycemic hormone isoforms in freshwater giant prawn (*Macrobrachium rosenbergii*): evidence of alternative splicing. *Mar Biotechnol (NY)* **6**, 83-94.
- Chen, S. H., Lin, C. Y. e Kuo, C. M. (2005). In silico analysis of crustacean hyperglycemic hormone family. *Mar Biotechnol (NY)* **7**, 193-206.
- Christensen, M., Carlsen, J. e Josefsson, L. (1979). Structure-function studies on red pigment-concentrating hormone, II. The significance of the C-terminal tryptophan amide. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* **360**, 1051-1060.
- Chung, J. S. e Webster, S. G. (1996). Does the N-terminal pyroglutamate residue have any physiological significance for crab hyperglycemic

- neuropeptides? *Eur J Biochem* **240**, 358-364.
- Chung, J. S. e Webster, S. G. (2003). Moulting cycle-related changes in biological activity of moulting-inhibiting hormone (MIH) and crustacean hyperglycaemic hormone (CHH) in the crab, *Carcinus maenas*. From target to transcript. *Eur J Biochem* **270**, 3280-3288.
- Chung, J. S. e Webster, S. G. (2004). Expression and release patterns of neuropeptides during embryonic development and hatching of the green shore crab, *Carcinus maenas*. *Development* **131**, 4751-4761.
- Chung, J. S. e Webster, S. G. (2005). Dynamics of in vivo release of moulting-inhibiting hormone and crustacean hyperglycemic hormone in the shore crab, *Carcinus maenas*. *Endocrinology* **146**, 5545-5551.
- Chung, J. S. e Webster, S. G. (2006). Binding sites of crustacean hyperglycemic hormone and its second messengers on gills and hindgut of the green shore crab, *Carcinus maenas*: a possible osmoregulatory role. *Gen Comp Endocrinol* **147**, 206-213.
- Chung, J. S., Dirksen, H. e Webster, S. G. (1999). A remarkable, precisely timed release of hyperglycemic hormone from endocrine cells in the gut is associated with ecdysis in the crab *Carcinus maenas*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 13103-13107.
- Chung, J. S., Wilkinson, M. C. e Webster, S. G. (1998). Amino acid sequences of both isoforms of crustacean hyperglycemic hormone (CHH) and corresponding precursor-related peptide in *Cancer pagurus*. *Regul Pept* **77**, 17-24.
- Clamp, M., Cuff, J., Searle, S. M. e Barton, G. J. (2004). The Jalview Java alignment editor. *Bioinformatics* **20**, 426-427.
- Cooke, I. M. e Sullivan, R. E. (1982). Hormones and neurosecretion. In *The biology of Crustacea* (ed. H. L. Atwood e D. C. Sandeman), Vol. 3, pp. 206-291. New York: Academic Press.
- da Silva-Castiglioni, D., Kaiser Dutra, B., Oliveira, G. T. e Bond Buckup, G. (2007). Seasonal variations in the intermediate metabolism of *Parastacus varicosus* (Crustacea, Decapoda, Parastacidae). *Comp Biochem Physiol A: Mol Integr Physiol* **148**, 204-213.
- de Kleijn, D. P. V., Coenen, T., Laverdure, A. M., Tensen, C. P. e Van Herp, F. (1992). Localization of messenger RNAs encoding crustacean hyperglycemic hormone and gonad inhibiting hormone in the X-organ sinus gland complex of the lobster *Homarus americanus*. *Neuroscience* **51**, 121-128.
- de Kleijn, D. P., de Leeuw, E. P., van den Berg, M. C., Martens, G. J. e van Herp, F. (1995). Cloning and expression of two mRNAs encoding structurally different crustacean hyperglycemic hormone precursors in the lobster *Homarus americanus*. *Biochim Biophys Acta* **1260**, 62-66.
- De Kleijn, D. P., Janssen, K. P., Martens, G. J. e Van Herp, F. (1994). Cloning and expression of two crustacean hyperglycemic-hormone mRNAs in the eyestalk of the crayfish *Orconectes limosus*. *Eur J Biochem* **224**, 623-629.
- de Kleijn, D. P., Janssen, K. P., Waddy, S. L., Hegeman, R., Lai, W. Y., Martens, G. J. e Van Herp, F. (1998). Expression of the crustacean hyperglycaemic hormones and the gonad-inhibiting hormone during the reproductive cycle of the female American lobster *Homarus americanus*. *J Endocrinol* **156**, 291-298.
- Delmendo, M. N. (1989). *Some advances attained in shrimp farming research and management practices: insights to future prospects for expansion of production*, Manila: ASEAN/UNDP/FAO.
- Dirksen, H., Böcking, D., Heyn, U., Mandel, C., Chung, J. S., Baggerman, G., Verhaert, P., Daufeldt, S., Plösch, T., et al. (2001). Crustacean hyperglycaemic hormone (CHH)-like peptides and CHH-precursor-related peptides from pericardial organ neurosecretory cells in the shore crab, *Carcinus maenas*, are putatively spliced and modified products of multiple genes. *Biochem J* **356**, 159-170.
- Diwan, A. D. (2005). Current progress in shrimp endocrinology — A review. *Indian J Exp Biol* **43**, 209-223.
- Drexler, A. L., Harris, C. C., Dela Pena, M. G.,

- Asuncion-Uchi, M., Chung, S., Webster, S. e Fuse, M. (2007). Molecular characterization and cell-specific expression of an ion transport peptide in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Cell Tissue Res* **329**, 391-408.
- Endo, H., Nagasawa, H. e Watanabe, T. (2000). Isolation of a cDNA encoding a CHH-family peptide from the silkworm *Bombyx mori*. *Insect Biochem Molec Biol* **30**, 355-361.
- Escamilla-Chimal, E. G., Van Herp, F. e Fanjul-Moles, M. L. (2001). Daily variations in crustacean hyperglycaemic hormone and serotonin immunoreactivity during the development of crayfish. *J Exp Biol* **204**, 1073-1081.
- Fanjul-Moles, M. L. (2006). Biochemical and functional aspects of crustacean hyperglycemic hormone in decapod crustaceans: review and update. *Comp Biochem Physiol C: Toxicol Pharmacol* **142**, 390-400.
- Fernlund, P. e Josefsson, L. (1972). Crustacean color-change hormone: amino acid sequence and chemical synthesis. *Science* **177**, 173-175.
- Fingerman, M. (1966). Neurosecretory control of pigmentary effectors in crustaceans. *Amer Zool* **6**, 169-179.
- Fu, Q., Christie, A. E. e Li, L. (2005). Mass spectrometric characterization of crustacean hyperglycemic hormone precursor-related peptides (CPRPs) from the sinus gland of the crab, *Cancer productus*. *Peptides* **26**, 2137-2150.
- Gabe, M. (1953). Sur l'existence, chez quelques Crustacés Malacostracés, d'un organe comparable à la glande de la mue des insectes. *C. R. Acad. Sci. Paris* **237**, 1111-1113.
- Gallois, D., Brisorgueil, M. J., Conrath, M., Mailly, P. e Soyez, D. (2003). Posttranslational isomerization of a neuropeptide in crustacean neurosecretory cells studied by ultrastructural immunocytochemistry. *Eur J Cell Biol* **82**, 431-440.
- Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins, M. R., Appel, R. D. e Bairoch, A. (2005). Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. In *The proteomics protocols handbook* (ed. J. M. Walker), pp. 571-607. Totowa, NJ: Humana Press.
- Gigoux, V., Escrieut, C., Fehrentz, J., Poirot, S., Maigret, B., Moroder, L., Gully, D., Martinez, J., Vaysse, N. e Fourny, D. (1999). Arginine 336 and asparagine 333 of the human cholecystokinin-A receptor binding site interact with the penultimate aspartic acid and the C-terminal amide of cholecystokinin. *J Biol Chem* **274**, 20457-20464.
- Giulianini, P. G. e Edomi, P. (2006). Neuropeptides controlling reproduction and growth in Crustacea: a molecular approach. In *Invertebrate neuropeptides and hormones: basic knowledge and recent advances* (ed. H. Satake), pp. 225-252. Trivandrum, Kerala: Transworld Research Network.
- Giulianini, P. G., Pandolfelli, N., Lorenzon, S., Ferrero, E. A. e Edomi, P. (2002). An antibody to recombinant crustacean hyperglycaemic hormone of *Nephrops norvegicus* cross-reacts with neuroendocrine organs of several taxa of malacostracan Crustacea. *Cell Tissue Res* **307**, 243-254.
- Glowik, R. M., Golowasch, J., Keller, R. e Marder, E. (1997). D-glucose-sensitive neurosecretory cells of the crab *Cancer borealis* and negative feedback regulation of blood glucose level. *J Exp Biol* **200**, 1421-1431.
- Gombotz, W. R. e Wee, S. (1998). Protein release from alginate matrices. *Adv Drug Deliver Rev* **31**, 267-285.
- Goy, M. F. (1990). Activation of membrane guanylate cyclase by an invertebrate peptide hormone. *J Biol Chem* **265**, 20220-20227.
- Gu, P. L. e Chan, S. M. (1998). The shrimp hyperglycemic hormone-like neuropeptide is encoded by multiple copies of genes arranged in a cluster. *FEBS Letters* **441**, 397-403.
- Gu, P. L., Chu, K. H. e Chan, S. M. (2001). Bacterial expression of the shrimp molt-inhibiting hormone (MIH): antibody production, immunocytochemical study and biological assay. *Cell Tissue Res* **303**, 129-136.
- Gu, P. L., Yu, K. L. e Chan, S. M. (2000). Molecular characterization of an additional shrimp

- hyperglycemic hormone: cDNA cloning, gene organization, expression and biological assay of recombinant proteins. *FEBS Lett* **472**, 122-128.
- Guex, N. e Peitsch, M. C. (1997). SWISS-MODEL and the Swiss-Pdb Viewer: An environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis* **18**, 2714-2723.
- Hartenstein, V. (2006). The neuroendocrine system of invertebrates: a developmental and evolutionary perspective. *J Endocrinol* **190**, 555-570.
- Hasegawa, Y., Hirose, E. e Katakura, Y. (1993). Hormonal control of sexual differentiation and reproduction in crustacea. *Amer Zool* **33**, 403-411.
- Huberman, A. (2000). Shrimp endocrinology. A review. *Aquaculture* **191**, 191-208.
- Huberman, A., Aguilar, M. B. e Quackenbush, L. S. (1995). A neuropeptide family from the sinus gland of the Mexican crayfish, *Procambarus bouvieri* (Ortmann). *Aquaculture* **135**, 149-160.
- Huberman, A., Aguilar, M. B., Brew, K., Shabanowitz, J. e Hunt, D. F. (1993). Primary structure of the major isomorph of the crustacean hyperglycemic hormone (CHH-I) from the sinus gland of the Mexican crayfish *Procambarus bouvieri* (Ortmann): interspecies comparison. *Peptides* **14**, 7-16.
- Huberman, A., Hernández-Arana, A., Aguilar, M. B. e Rojo-Domínguez, A. (1989). Secondary structure of a crustacean neuropeptide hormone family by means of CD. *Peptides* **10**, 1113-1115.
- Juinio-Menez, M. A. e Ruinata, J. (1996). Survival, growth and food conversion efficiency of *Panulirus ornatus* following eyestalk ablation. *Rev Biol Trop* **146**, 225-235.
- Kallen, J. L., Abrahamse, S. L. e Van Herp, F. (1990). Circadian rhythmicity of the crustacean hyperglycemic hormone (CHH) in the hemolymph of the crayfish. *Biol Bull* **179**, 351-357.
- Katayama, H. e Nagasawa, H. (2004). Effect of a glycine residue insertion into crustacean hyperglycemic hormone on hormonal activity. *Zoolog Sci* **21**, 1121-1124.
- Katayama, H., Nagata, K., Ohira, T., Yumoto, F., Tanokura, M. e Nagasawa, H. (2003). The solution structure of molt-inhibiting hormone from the Kuruma prawn *Marsupenaeus japonicus*. *J Biol Chem* **278**, 9620-9623.
- Katayama, H., Ohira, T., Aida, K. e Nagasawa, H. (2002). Significance of a carboxyl-terminal amide moiety in the folding and biological activity of crustacean hyperglycemic hormone. *Peptides* **23**, 1537-1546.
- Katayama, H., Ohira, T., Nagata, S. e Nagasawa, H. (2004). Structure-activity relationship of crustacean molt-inhibiting hormone from the kuruma prawn *Marsupenaeus japonicus*. *Biochemistry* **43**, 9629-9635.
- Kegel, G., Reichwein, B., Weese, S., Gaus, G., Peter-Katalinić, J. e Keller, R. (1989). Amino acid sequence of the crustacean hyperglycemic hormone (CHH) from the shore crab, *Carcinus maenas*. *FEBS Lett* **255**, 10-14.
- Khayat, M., Yang, W., Aida, K., Nagasawa, H., Tietz, A., Funkenstein, B. e Lubzens, E. (1998). Hyperglycaemic hormones inhibit protein and mRNA synthesis in in vitro-incubated ovarian fragments of the marine shrimp *Penaeus semisulcatus*. *Gen Comp Endocrinol* **110**, 307-318.
- Kleinholz, L. H. (1934). Eye-stalk hormone and the movement of distal retinal pigment in *Palaemonetes*. *PNAS* **20**, 659-661.
- Kolhekar, A. S., Roberts, M. S., Jiang, N., Johnson, R. C., Mains, R. E., Eipper, B. A. e Taghert, P. H. (1997). Neuropeptide amidation in *Drosophila*: separate genes encode the two enzymes catalyzing amidation. *J Neurosci* **17**, 1363-1376.
- Kummer, G. e Keller, R. (1993). High-affinity binding of crustacean hyperglycemic hormone (CHH) to hepatopancreatic plasma membranes of the crab *Carcinus maenas* and the crayfish *Orconectes limosus*. *Peptides* **14**, 103-108.
- Lacombe, C., Grève, P. e Martin, G. (1999). Overview on the sub-grouping of the crustacean hyperglycemic hormone family. *Neuropeptides* **33**, 71-80.
- Laufer, H., Borst, D., Baker, F. C., Reuter, C. C., Tsai, L. W., Schooley, D. A., Carrasco, C. e Sinkus,

- M. (1987). Identification of a juvenile hormone-like compound in a crustacean. *Science* **235**, 202-205.
- Laufer, H., Demir, N., Pan, X., Stuart, J. D. e Ahl, J. S. (2005). Methyl farnesoate controls adult male morphogenesis in the crayfish, *Procambarus clarkii*. *J Insect Physiol* **51**, 379-384.
- Le Roux, A. (1968). Description d'organes mandibulaires nouveaux chez les Crustacés Décapodes. *C. R. Acad. Sci. Paris* **266D**, 1414-1417.
- Lee, S. G., Bader, B. D., Chang, E. S. e Mykles, D. L. (2007). Effects of elevated ecdysteroid on tissue expression of three guanylyl cyclases in the tropical land crab *Gecarcinus lateralis*: possible roles of neuropeptide signaling in the molting gland. *J Exp Biol* **210**, 3245-3254.
- Leuven, R. S. E. W., Jaros, P. P., Van Herp, F. e Keller, R. (1982). Species or group specificity in biological and immunological studies of crustacean hyperglycemic hormone. *Gen Comp Endocrinol* **46**, 288-296.
- Li, M., Su, Z. G. e Janson, J. C. (2004). In vitro protein refolding by chromatographic procedures. *Protein Express Purif* **33**, 1-10.
- Liu, H. F., Lai, C. Y., Watson, R. D. e Lee, C. Y. (2004). Molecular cloning of a putative membrane form guanylyl cyclase from the crayfish *Procambarus clarkii*. *J Exp Zool A: Comp Exp Biol* **301**, 512-520.
- Liu, L., Laufer, H., Wang, Y. e Hayes, T. (1997). A neurohormone regulating both methyl farnesoate synthesis and glucose metabolism in a crustacean. *Biochem Biophys Res Commun* **237**, 694-701.
- Lobley, A., Whitmore, L. e Wallace, B. A. (2002). DICHROWEB: an interactive website for the analysis of protein secondary structure from circular dichroism spectra. *Bioinformatics* **18**, 211-212.
- Lorenzon, S. (2005). Hyperglycemic stress response in Crustacea. *Inv Surv J* **2**, 132-141.
- Lorenzon, S., Brezovec, S. e Ferrero, E. A. (2004). Species-specific effects on hemolymph glucose control by serotonin, dopamine, and L-enkephalin and their inhibitors in *Squilla mantis* and *Astacus leptodactylus* (crustacea). *J Exp Zool A: Comp Exp Biol* **301**, 727-736.
- Lorenzon, S., Edomi, P., Giulianini, P. G., Mettulio, R. e Ferrero, E. A. (2004). Variation of crustacean hyperglycemic hormone (cHH) level in the eyestalk and haemolymph of the shrimp *Palaemon elegans* following stress. *J Exp Biol* **207**, 4205-4213.
- Meredith, J., Ring, M., Macins, A., Marschall, J., Cheng, N. N., Theilmann, D., Brock, H. W. e Phillips, J. E. (1996). Locust ion transport peptide (ITP): primary structure, cDNA and expression in a baculovirus system. *J Exp Biol* **199**, 1053-1061.
- Mettulio, R., Edomi, P., Ferrero, E. A., Lorenzon, S. e Giulianini, P. G. (2004). The crustacean hyperglycemic hormone precursors a and b of the Norway lobster differ in the preprohormone but not in the mature peptide. *Peptides* **25**, 1899-1907.
- Mettulio, R., Giulianini, P. G., Ferrero, E. A., Lorenzon, S. e Edomi, P. (2004). Functional analysis of crustacean Hyperglycemic Hormone by in vivo assay with wild-type and mutant recombinant proteins. *Regul Pept* **119**, 189-197.
- Meusy, J. J. e Soyez, D. (1991). Immunological relationships between neuropeptides from the sinus gland of the lobster *Homarus americanus*, with special references to the vitellogenesis inhibiting hormone and crustacean hyperglycemic hormone. *Gen Comp Endocrinol* **81**, 410-418.
- Ohira, T., Katayama, H., Tominaga, S., Takasuka, T., Nakatsuji, T., Sonobe, H., Aida, K. e Nagasawa, H. (2005). Cloning and characterization of a molt-inhibiting hormone-like peptide from the prawn *Marsupenaeus japonicus*. *Peptides* **26**, 259-268.
- Ohira, T., Okumura, T., Suzuki, M., Yajima, Y., Tsutsui, N., Wilder, M. N. e Nagasawa, H. (2006). Production and characterization of recombinant vitellogenesis-inhibiting hormone from the American lobster *Homarus americanus*. *Peptides* **27**, 1251-1258.
- Okumura, T. (2004). Perspectives on hormonal manipulation of shrimp reproduction. *JARQ* **38**, 49-54.
- Ollivaux, C. e Soyez, D. (2000). Dynamics of biosynthesis and release of crustacean

hyperglycemic hormone isoforms in the X-organ-sinus gland complex of the crayfish *Orconectes limosus*. *Eur J Biochem* **267**, 5106-5114.

Ollivaux, C., Dircksen, H., Toullec, J. e Soyez, D. (2002). Enkephalinergetic control of the secretory activity of neurons producing stereoisomers of crustacean hyperglycemic hormone in the eyestalk of the crayfish *Orconectes limosus*. *J Comp Neurol* **444**, 1-9.

Panouse, J. B. (1943). Influence de l'ablation du pedoncle oculaire sur la croissance de l'ovaire chez la crevette *Leander serratus*. *C.R. Acad. Sci. Paris* **217**, 553-555.

Panouse, J. B. (1944). L'action de la glande du sinus sur l'ovaire chez la crevette *Leander*. *C.R. Acad. Sci. Paris* **218**, 293-294.

Perkins, E. B. (1928). Color changes in crustaceans, especially in *Palaemonetes*. *J Exp Zool* **50**, 71-105.

Prigge, S. T., Mains, R. E., Eipper, B. A. e Amzel, L. M. (2000). New insights into copper monooxygenases and peptide amidation: structure, mechanism and function. *Cell Mol Life Sci* **57**, 1236-1259.

Primavera, J. H. (1978). Induced maturation and spawning in five-month-old *Penaeus monodon* Fabricius by eyestalk ablation. *Aquaculture* **13**, 355-359.

Riehm, J. P., Rao, K. R., Semmes, O. J., Jorenby, W. H., Hintz, M. F. e Zahnow, C. A. (1985). C-terminal deletion analogs of a crustacean pigment-dispersing hormone. *Peptides* **6**, 1051-1056.

Rodríguez, E. M., López Greco, L. S., Medesani, D. A., Laufer, H. e Fingerman, M. (2002). Effect of methyl farnesoate, alone and in combination with other hormones, on ovarian growth of the red swamp crayfish, *Procambarus clarkii*, during vitellogenesis. *Gen Comp Endocrinol* **125**, 34-40.

Rotllant, G., De Kleijn, D., Charmantier-Daures, M., Charmantier, G. e Van Herp, F. (1993). Localization of crustacean hyperglycemic hormone (CHH) and gonad-inhibiting hormone (GIH) in the eyestalk of *Homarus gammarus* larvae by immunocytochemistry and in situ hybridization.

Cell Tissue Res **271**, 507-512.

Röser, T. (2005). *Untersuchungen zur Struktur und Physiologie des hyperglykämischen Hormons (CHH) beim europäischen Flusskrebs, Astacus astacus L*, Bonn.

Sagi, A. e Khalaila, I. (2001). The crustacean androgen: a hormone in an isopod and androgenic activity in decapods. *Amer Zool* **41**, 477-484.

Santos, E. A., Keller, R., Rodriguez, E. e Lopez, L. (2001). Effects of serotonin and fluoxetine on blood glucose regulation in two decapod species. *Braz J Med Biol Res* **34**, 75-80.

Santos, E. A., Nery, L. E., Keller, R. e Gonçalves, A. A. (1997). Evidence for the involvement of the crustacean hyperglycemic hormone in the regulation of lipid metabolism. *Physiol Zool* **70**, 415-420.

Schmidt, T. G. e Skerra, A. (2007). The Strep-tag system for one-step purification and high-affinity detection or capturing of proteins. *Nat Protoc* **2**, 1528-1535.

Sedlmeier, D. (1982). The mode of action of the crustacean neurosecretory hyperglycemic hormone (CHH) : II. Involvement of glycogen synthase. *Gen Comp Endocrinol* **47**, 426-432.

Sedlmeier, D. (1988). The crustacean hyperglycemic hormone (CHH) releases amylase from the crayfish midgut gland. *Regul Peptides* **20**, 91-98.

Serrano, L., Blanvillain, G., Soyez, D., Charmantier, G., Grousset, E., Aujoulat, F. e Spanings-Pierrot, C. (2003). Putative involvement of crustacean hyperglycemic hormone isoforms in the neuroendocrine mediation of osmoregulation in the crayfish *Astacus leptodactylus*. *J Exp Biol* **206**, 979-988.

Serrano, L., Grousset, E., Charmantier, G. e Spanings-Pierrot, C. (2004). Occurrence of L- and D-crustacean hyperglycemic hormone isoforms in the eyestalk X-organ/sinus gland complex during the ontogeny of the crayfish *Astacus leptodactylus*. *J Histochem Cytochem* **52**, 1129-1140.

Skinner, D. M. (1985). Molting and regeneration. In *The biology of Crustacea* (ed. D. E. Bliss e L. H. Mantel), Vol. 9, pp. 43-186, New York: Academic

Press.

Sonobe, H., Nishimura, T., Sonobe, M., Nakatsuji, T., Yanagihara, R., Kawakami, T. e Aimoto, S. (2001). The molt-inhibiting hormone in the American crayfish *Procambarus clarkii*: its chemical synthesis and biological activity. *Gen Comp Endocrinol* **121**, 196-204.

Soyez, D., Van Deijnen, J. E. e Martin, M. (1987). Isolation and characterization of a vitellogenesis-inhibiting factor from sinus glands of the lobster, *Homarus americanus*. *J Exp Biol* **244**, 479-484.

Soyez, D., Van Herp, F., Rossier, J., Le Caer, J. P., Tensen, C. P. e Lafont, R. (1994). Evidence for a conformational polymorphism of invertebrate neurohormones. D-amino acid residue in crustacean hyperglycemic peptides. *J Biol Chem* **269**, 18295-18298.

Spanings-Pierrot, C., Soyoz, D., Van Herp, F., Gompel, M., Skaret, G., Grousset, E. e Charmantier, G. (2000). Involvement of crustacean hyperglycemic hormone in the control of gill ion transport in the crab *Pachygrapsus marmoratus*. *Gen Comp Endocrinol* **119**, 340-350.

Sreenivasula Reddy, P., Ramachandra Reddy, P. e Pushpalatha, T. (2007). Differential mode of action of hyperglycemic hormones obtained from crab (Crustacea) and millipede (Myriapoda) in the crab, *Oziotelphusa senex senex*. *J Biol Sci* **7**, 145-152.

Stangier, J., Dirksen, H. e Keller, R. (1986). Identification and immunocytochemical localization of proctolin in pericardial organs of the shore crab, *Carcinus maenas*. *Peptides* **7**, 67-72.

Stangier, J., Hilbich, C., Beyreuther, K. e Keller, R. (1987). Unusual cardioactive peptide (CCAP) from pericardial organs of the shore crab *Carcinus maenas*. *PNAS* **84**, 575-579.

Stemmler, E. A., Hsu, Y. A., Cashman, C. R., Messinger, D. I., de la Iglesia, H. O., Dickinson, P. S. e Christie, A. E. (2007). Direct tissue MALDI-FTMS profiling of individual *Cancer productus* sinus glands reveals that one of three distinct combinations of crustacean hyperglycemic hormone precursor-related peptide (CPRP) isoforms are present in individual crabs. *Gen Comp Endocrinol*

154, 184-192.

Toullec, J. Y., Kamech, N., Gallois, D., Maibèche, M., Papon, V., Boscaméric, M. e Soyoz, D. (2002). Molecular cloning and cellular expression of crustacean PC2-like prohormone convertase. *Biochim Biophys Acta* **1574**, 145-151.

Treerattrakool, S., Udomkit, A. e Panyim, S. (2006). Anti-CHH antibody causes impaired hyperglycemia in *Penaeus monodon*. *J Biochem Mol Biol* **39**, 371-376.

Tsutsui, N., Katayama, H., Ohira, T., Nagasawa, H., Wilder, M. N. e Aida, K. (2005). The effects of crustacean hyperglycemic hormone-family peptides on vitellogenin gene expression in the kuruma prawn, *Marsupenaeus japonicus*. *Gen Comp Endocrinol* **144**, 232-239.

Tsutsui, N., Ohira, T., Kawazoe, I., Takahashi, A. e Wilder, M. N. (2007). Purification of sinus gland peptides having vitellogenesis-inhibiting activity from the whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Mar Biotechnol (NY)* **9**, 360-369.

Udomkit, A., Chooluk, S., Sonthayanon, B. e Panyim, S. (2000). Molecular cloning of a cDNA encoding a member of CHH/MIH/GIH family from *Penaeus monodon* and analysis of its gene structure. *J Exp Mar Biol Ecol* **244**, 145-156.

Vallejo, L. F. e Rinas, U. (2004). Strategies for the recovery of active proteins through refolding of bacterial inclusion body proteins. *Microb Cell Fact* **3**, 1-12.

Van Herp, F. e Van Buggenum, H. J. (1979). Immunocytochemical localization of hyperglycemic hormone (HGH) in the neurosecretory system of the eyestalk of the crayfish *Astacus leptodactylus*. *Experientia* **35**, 1527-1529.

Wainwright, G., Webster, S. G., Wilkinson, M. C., Chung, J. S. e Rees, H. H. (1996). Structure and significance of mandibular organ-inhibiting hormone in the crab, *Cancer pagurus*. Involvement in multihormonal regulation of growth and reproduction. *J Biol Chem* **271**, 12749-12754.

Wang, Y.-J., Zhao, Y., Meredith, J., Phillips, J. E., Theilmann, D. A. e Brock, H. W. (2000). Mutational analysis of the C-terminus in ion transport peptide

(ITP) expressed in *Drosophila* Kc1 cells. *Archiv Insect Biochem Physiol* **45**, 129-138.

Webster, S. G. (1986). Neurohormonal control of ecdysteroid biosynthesis by *Carcinus maenas* Y-organs in vitro, and preliminary characterization of the putative molt-inhibiting hormone (MIH). *Gen Comp Endocrinol* **61**, 237-247.

Webster, S.G. (1996). Measurement of crustacean hyperglycaemic hormone levels in the edible crab *Cancer pagurus* during emersion stress. *J Exp Biol* **199**, 1579-1585.

Webster, S. G., Dircksen, H. e Chung, J. S. (2000). Endocrine cells in the gut of the shore crab *Carcinus maenas* immunoreactive to crustacean hyperglycaemic hormone and its precursor-related peptide. *Cell Tissue Res* **300**, 193-205.

Weidemann, W., Gromoll, J. e Keller, R. (1989). Cloning and sequence analysis of cDNA for precursor of a crustacean hyperglycemic hormone. *FEBS Lett* **257**, 31-34.

Wilcockson, D. C., Chung, S. J. e Webster, S. G. (2002). Is crustacean hyperglycaemic hormone precursor-related peptide a circulating neurohormone in crabs? *Cell Tissue Res* **307**, 129-138.

Wiwegweaw, A., Udomkit, A. e Panyim, S. (2004). Molecular structure and organization of crustacean hyperglycemic hormone genes of *Penaeus monodon*. *J Biochem Mol Biol* **37**, 177-184.

Yasuda, A., Yasuda, Y., Fujita, T. e Naya, Y. (1994). Characterization of crustacean hyperglycemic hormone from the crayfish (*Procambarus clarkii*): multiplicity of molecular forms by stereoinversion and diverse functions. *Gen Comp Endocrinol* **95**, 387-398.

Zeleny, C. (1905). Compensatory regulation. *J Exp Zool* **2**, 1-102.

Ringraziamenti

Desidero ringraziare il mio tutore, Dott. Piero Giulianini, per avermi seguito durante questi anni e il Dott. Paolo Edomi per aver supervisionato la parte di ingegneria genetica. Il Dott. Sándor Pongor (ICGEB) ci ha gentilmente concesso l'uso del suo laboratorio e il Dott. Corrado Guarnaccia (ICGEB) si è prestato con entusiasmo ad accontentare le nostre richieste per la RP-HPLC, la spettrometria di massa e l'analisi conformazionale.

La Dott.sa Simonetta Lorenzon (OGS) ha collaborato nella realizzazione pratica dei saggi eterologhi su *P. elegans*. I miei due colleghi di dottorato, Dott.sa Sara Bembich e Dott. Andrea Cortini, mi hanno aiutato a risolvere i piccoli problemi quotidiani. Con la Dott.sa Marzia Martinis ho condiviso la gestione degli acquari. Un saluto particolare al Prof. Enrico Ferrero che dopo un intermezzo di vent'anni mi ha dato nuovamente modo di lavorare sull'endocrinologia dei crostacei.