

00581

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE QUIMICA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

ESTUDIO ESTRUCTURAL DE VARIOS NEUROPEPTIDOS
HORMONALES DEL ACOCIL MEXICANO
Procambarus bouvieri (ORTMANN)

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS QUIMICAS
(BIOQUIMICA)

P R E S E N T A :

MANUEL B. AGUILAR RAMIREZ

MEXICO, D.F.

1993

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

CONTENIDO	Pág.
Abreviaturas usadas.	7
Abreviaturas de los aminoácidos	8
I. Resumen	9
Summary	11
II. Introducción	
A. La neurosecreción	
1. El concepto	13
2. Los órganos neurohémicos	14
B. La neurosecreción en los crustáceos	14
1. El sistema neurosecretor del tallo ocular de los decápodos	15
2. Las hormonas del sistema Organo X de la Médula Terminal-Glándula Sinusal	15
3. Acciones de las hormonas del sistema Organo X de la Médula Terminal-Glándula Sinusal	
a) La hormona hiperglucemiante	17
i) Metabolismo del glucógeno	18
ii) Digestión de los carbohidratos	20
b) La hormona inhibidora de la muda	20
c) La hormona inhibidora de la vitelogénesis	21
III. Objetivo	23
IV. Materiales, metodología y resultados	24
Artículo No. 1:	
Identificación, purificación y caracterización inicial de la hormona inhibidora de la vitelogénesis del acocil mexicano <i>Procambarus bouvieri</i> (Ortmann) [Identification, purification and initial characterization of the vitellogenesis-inhibiting hormone from the mexican crayfish <i>Procambarus bouvieri</i> (Ortmann). M.B. Aguilar, L.S. Quackenbush, D.F. Hunt, J. Shabanowitz and A. Huberman. <i>Comp. Biochem.</i>	

Artículo No. 2:

Estructura primaria del isomorfo mayoritario de la hormona hiperglucemiante (HHG-I) de la glándula sinusal del acocil mexicano *Procambarus bouvieri* (Ortmann) [Primary structure of the major isomorph of the crustacean hyperglycemic hormone (CHH-I) from the sinus gland of the Mexican crayfish *Procambarus bouvieri* (Ortmann). A. Huberman, M.B. Aguilar, K. Brew, J. Shabanowitz and D.F. Hunt. *Peptides* 14: 7-16 (1993)]

33

C. Experimentos y resultados adicionales

1. Presencia de las diferentes hormonas en función del sexo	43
2. Comparación fisiológica de los dos isomorfos de la Hormona Hiperglucemiante	43
3. Estudio de la Hormona Inhibidora de la Vitelogénesis, la Hormona Inhibidora de la Muda y la Hormona Hiperglucemiante-II	45
i) Masa molecular	45
ii) Composición de aminoácidos	47
iii) Mapas trípticos	49
iv) Composición de aminoácidos de los péptidos trípticos	51
v) Secuencia de los péptidos trípticos	51
vi) Puentes disulfuro	53
vii) Búsqueda de homologías	56
viii) Cálculo de la similitud de las secuencias de aminoácidos	56
ix) Predicción de las estructuras secundarias	59
 VI. Discusión	 64
 VII. Conclusiones	 72
 VIII. Bibliografía	 74

ABREVIATURAS

ARNm	Acido Ribonucleico Mensajero
CHH	Crustacean Hyperglycemic Hormone(s)
CHH-I	Major isomorph of the CHH
CHH-II	Minor isomorph of the CHH
CLAP-FR	Cromatografía Líquida de Alta Presión en Fase Reversa
GS	Glándula(s) Sinusal(es)
HHG	Hormona(s) Hiperglucemiante(s)
HHG-I	Isomorfo mayoritario de la HHG
HHG-II	Isomorfo minoritario de la HHG
HIG	Hormona(s) Inhibidora(s) de las Gónadas
HIM	Hormona(s) Inhibidora(s) de la Muda
HIV	Hormona(s) Inhibidora(s) de la Vitelogénesis
MIH	Molt-Inhibiting Hormone(s)
OXMT	Organo X de la Medulla Terminalis o Médula Terminal
pi	Punto isoeléctrico
RP-HPLC	Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography
VIH	Vitellogenesis-Inhibiting Hormone(s)

ABREVIATURAS DE LOS AMINOACIDOS

L-AMINOACIDO	ABREVIATURA DE 3 LETRAS	ABREVIATURA DE 1 LETRA
Acido aspártico	Asp	D
Acido glutámico	Glu	E
Alanina	Ala	A
Arginina	Arg	R
Asparagina	Asn	N
Cisteína	Cis	C
Fenilalanina	Fen	F
Glicina	Gli	G
Glutamina	Gln	Q
Histidina	His	H
Isoleucina	Ile	I
Leucina	Leu	L
Lisina	Lis	K
Metionina	Met	M
Prolina	Pro	P
Serina	Ser	S
Treonina	Tre	T
Triptofano	Trp	W
Tirosina	Tir	Y
Valina	Val	V
Acido aspártico o asparagina [†]	Asx	B
Acido glutámico o glutamina [†]	Glx	Z

[†] Durante la hidrólisis de una proteína, los grupos amida de los residuos de Asn y Gln se hidrolizan al mismo tiempo que los enlaces peptídicos y producen Asp y Glu. Por tanto, no es posible saber cuántos y cuáles de estos últimos, observados en el análisis de aminoácidos, se encontraban amidados, por lo que se designan como Asx y Glx, respectivamente.

RESUMEN

Los crustáceos poseen un sistema neurosecretor análogo al eje hipotálamo-neurohipófisis de los vertebrados y al sistema ganglio cerebroide-corpora cardiaca-corpora allata de los insectos. Este sistema, que en los decápodos se localiza en el tallo ocular, está formado por un grupo de neuronas peptidérgicas (el llamado órgano X de la medulla terminalis) y el conjunto de sus terminales axónicas (conocido como la glándula sinusal) que están en contacto directo con la hemolinfa. La glándula sinusal almacena y libera, mediante exocitosis, hormonas peptídicas que regulan procesos fisiológicos como la reproducción, la muda y el metabolismo de los carbohidratos, entre otros.

Con el fin de obtener información acerca de: (1) la relación estructura-función de las hormonas de invertebrados en particular y de las proteínas en general y (2) la evolución de las neurohormonas de los crustáceos, se determinaron las secuencias de aminoácidos, parciales o completas, de la Hormona Inhibidora de la Vitelogénesis (HIV), la Hormona Inhibidora de la Muda (HIM) y dos isomorfos de la Hormona Hiperglucemiante (HHG-I Y HHG-II) de un crustáceo decápodo mexicano, el acocil *Procambarus bouvieri* (Ortmann).

Las hormonas se purificaron mediante cromatografía líquida de alta presión en fase reversa (CLAP-FR) a partir de extractos de glándulas sinusales aisladas por microdissección de los tallos oculares. La identificación de las hormonas se llevó a cabo mediante bioensayos homólogos y heterólogos *in vivo* e *in vitro*. Los residuos de cisteína fueron reducidos y carboximetilados para facilitar las digestiones enzimáticas y para estabilizar a dichos residuos durante la degradación de Edman. Los residuos de arginina fueron modificados químicamente para alterar la sensibilidad de las hormonas a la tripsina. En todos los casos, la repurificación de las hormonas modificadas se realizó mediante CLAP-FR. Las composiciones de aminoácidos se determinaron mediante hidrólisis ácida, derivación con fenilisotiocianato y cuantificación por CLAP-FR. Para obtener péptidos traslapantes y poder establecer la estructuras completas se usaron digestiones con varias proteasas. Los fragmentos resultantes fueron purificados por CLAP-FR. La secuenciación se hizo mediante: (1) degradaciones de Edman, manual y automática, con identificación de los derivados de aminoácido de cada ciclo mediante CLAP-FR, (2) espectrometría de masas y (3)

digestiones con carboxipeptidasas Y y B e identificación de los aminoácidos liberados mediante reacción con cloruro de dansilo y cromatografía en capa fina de poliamida.

Las hormonas están constituidas por 72 residuos de aminoácido en una sola cadena peptídica y carecen de triptofano, histidina y metionina. Los 6 residuos de cisteína contenidos en ellas forman tres puentes disulfuro en las mismas posiciones en, por lo menos, tres de las cuatro hormonas. Los extremos amino y carboxilo están modificados postraduccionalmente en forma de ácido piroglutámico y valinamida, respectivamente. Sus masas moleculares están comprendidas entre 8300 y 8400 Da.

La comparación de las secuencias indica que las hormonas son proteínas homólogas y que la similitud entre cualquier par de ellas es muy alta y que existen por lo menos 2 genes que originan esta familia de péptidos.

Por otra parte, no se encontró homología de ninguna de las hormonas del acocil mexicano con las demás proteínas conocidas hasta la fecha, excepto otras hormonas de crustáceos estudiadas por otros grupos. Esto confirma la existencia de una nueva familia de neuropéptidos hormonales conocida sólo en los crustáceos.

La comparación de la secuencia del isomorfo más abundante de la HHG de *Procambarus bouvieri* con las de otros crustáceos confirmó las relaciones taxonómicas que entre éstos se habían establecido con base en criterios morfológicos. Asimismo, reveló el alto grado de conservación de esta molécula durante la evolución y señaló varios residuos que podrían tomar parte en la interacción con el receptor hormonal.

La presencia de los dos isomorfos de la HHG y del péptido que en las hembras actúa como la HIV, es independiente del sexo.

No hay diferencia significativa entre los dos isomorfos de la HHG en cuanto a su acción sobre la liberación de glucosa del hepatopáncreas y del músculo.

SUMMARY

Crustaceans possess a neurosecretory system analogous to the vertebrate hypothalamus-neurohypophysis axis and to the insect cerebral ganglion-corpora cardiaca-corpora allata system. This system, which in the decapods is located in the eyestalk, comprises a group of neurosecretory neurons (the so called *medulla terminalis* X-organ) and their axon endings, referred to as the sinus gland. The latter, which is in direct contact with the hemolymph, stores and releases, through exocytosis, a number of peptide hormones involved in the control of physiological processes such as reproduction, molting and carbohydrate metabolism, among others.

In order to obtain information about: (1) the structure-function relationship of the invertebrate peptide hormones in particular, and of proteins in general, and (2) the evolution of the crustacean neurohormones, the partial or complete amino acid sequences of the Vitellogenesis Inhibiting Hormone (VIH), the Molt Inhibiting Hormone (MIH) and two isomorphs of the Crustacean Hyperglycemic Hormone (CHH-I and CHH-II) of a decapod crustacean, the Mexican crayfish *Procambarus bouvieri* (Ortmann) were determined.

The hormones were purified by means of reversed-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) from extracts of sinus glands obtained by means of microdissection of eyestalks. Assignment of the hormone activities to specific chromatographic peaks was performed by means of homologous and heterologous *in vivo* and *in vitro* bioassays. Cysteine residues were reduced and carboxymethylated to allow enzymatic digestions and to stabilize these residues during Edman degradation. Arginine residues were modified chemically to alter the susceptibility of the hormones to trypsin. Re-purification of the modified hormones was performed by means of RP-HPLC. Amino acid analysis were conducted by means of acid hydrolysis, derivatization with phenylisothiocyanate and quantitation by means of RP-HPLC. Digestions with several proteases were used to obtain overlapping peptides which were required to establish the complete structures of the hormones. The resulting fragments were purified by means of RP-HPLC. The sequences were determined by means of: (1) manual and automatic Edman degradations and identification of the phenylthiohydantoin amino acid derivatives through RP-HPLC, (2) mass spectrometry and (3) digestions with carboxypeptidases Y and B, and identification of

the released amino acids by means of reaction with dansyl chloride and polyamide thin-layer chromatography.

The hormones comprise 72 amino acid residues in one peptide chain. They lack tryptophane, histidine and methionine. The 6 cysteine residues contained in them form 3 disulfide bridges in identical positions in at least three of the four hormones. The amino and carboxyl ends are modified postranslationally, as pyroglutamic acid and valinamide, respectively. Their molecular masses are in the range of 8300 to 8400 Da.

Sequences comparison showed that the hormones are homologous proteins and that there is a very high degree of similarity between any pair of them. The nature of the differences implies that there are at least two genes coding for the members of this peptide family.

There is no homology to any currently known protein, except other crustacean hormones studied by other groups. This findings confirm the presence of a new peptide family known only in crustaceans.

Comparison of the sequence of the most abundant CHH isomorph from *P. bouvieri* with those from other species confirmed their taxonomical relationships based on morphological criteria. Also, it showed that CHH is a very conserved molecule. Finally, it pointed out several residues which could play a role in the interaction with the hormone receptor.

The presence of the two isomorphs of the CHH and of the peptide which in the female crayfish acts as the VIH is not sex dependent.

There is no significant difference between the two CHH isomorphs with respect to their action on glucose release from the hepatopancreas and muscle.

INTRODUCCION

La neurosecreción

El concepto.

El concepto de neurosecreción fue establecido por Scharrer en 1928 (82) a partir de sus observaciones de la producción y liberación de hormonas hacia los fluidos circulatorio y cerebroespinal por parte de células nerviosas en vertebrados. En el mismo año se realizaron estudios que sugerían la existencia de la primera hormona conocida en los invertebrados, la cual era producida en el tejido nervioso de los ojos de los camarones (64,77).

Las neuronas que producen hormonas se conocen como células neurosecretoras. Al microscopio electrónico, estas células se caracterizan por la presencia de muchos gránulos de neurosecreción, los cuales son partículas esféricas, cuyo contenido es característicamente denso. Estos gránulos tienen generalmente de 100 a 300 um de diámetro y están rodeados por una membrana simple.

El proceso de la neurosecreción puede ser dividido en varias etapas: síntesis de las neurohormonas, formación de los gránulos de neurosecreción, transporte de los gránulos a través de los axones hacia las terminales axónicas, almacenamiento de los gránulos y liberación de las hormonas mediante exocitosis (69).

Cabe mencionar que la distinción clásica entre sustancias neurohormonales, neurotransmisoras y neuromoduladoras se ha desvanecido actualmente. Hay evidencias de que ciertos péptidos y aminos biogénicas, antes considerados como neurohormonas clásicas tanto en los vertebrados como en los invertebrados, pueden actuar como transmisores en una región del sistema nervioso, como moduladores en otra y como hormonas en algún otro tejido del organismo (11).

Los órganos neurohémicos.

Para permitir una descarga rápida de la secreción y a fin de que se alcancen las concentraciones hormonales requeridas, que son del orden nanomolar, las células neurosecretoras presentan varias adaptaciones: a) hay un aumento en el número de las células que intervienen en la secreción; b) cada célula tiene un número muy grande de terminaciones axónicas; c) las hormonas están muy concentradas en los gránulos neurosecretorios; d) las terminales axónicas se ensanchan (2 a 30 μm de diámetro), se ramifican y están en contacto íntimo con el fluido circulatorio, en algunos casos, separadas solamente de él por una membrana basal (separaciones de 1 a 5 μm) (11,69).

Esta unión estrecha entre el fluido circulatorio y las terminales axónicas ensanchadas, que son el sitio de liberación de las neurohormonas, condujo al concepto de "órgano neurohémico" (15), que fue establecido aproximadamente 20 años después del de "neurosecreción" y casi al mismo tiempo en los vertebrados y crustáceos.

La neurosecreción en los crustáceos.

Los crustáceos poseen varios sistemas neurosecretorios: los órganos poscomisurales, localizados en la comisura tritocerebral, liberan varios neuropéptidos cromatoforotrópicos (62,63) que son producidos por somas localizados putativamente en el ganglio cerebroide (15); los órganos pericárdicos, que se encuentran cerca del corazón (6,7) y algunas neuronas localizadas en los ganglios torácico (28,29) y subesofágico liberan aminas y péptidos (65). Además, el complejo del órgano X de la *medulla terminalis* y la glándula sinusal sintetiza y libera un gran número de péptidos que regulan muchos procesos fisiológicos.

El sistema neurosecretor del tallo ocular de los decápodos.

La glándula sinusal fue el primer órgano neurohémico encontrado en los crustáceos y fue llamada así por su descubridor, Hanstrom, debido a que su microanatomía, que se caracterizaba por tener agrupaciones de terminales axónicas ensanchadas adyacentes a senos circulatorios, sugería una función endócrina (36).

Bliss y Passano, independientemente, interpretaron en forma correcta la naturaleza de la glándula sinusal de los crustáceos, no como una glándula verdadera, sino como un sitio de almacenamiento y liberación de las neurohormonas (13,78).

En los crustáceos decápodos, como el acocil mexicano *Procambarus bouvieri* (Ortmann), el conjunto de somas neurosecretoras (el llamado órgano X de la medulla terminalis, OXMT) cuyas terminaciones axónicas forman a la glándula sinusal (GS) se localizan en el tallo ocular (figura 1); sin embargo, hay terminaciones axónicas que pueden originarse en neuronas de otras regiones del tallo ocular y de los ganglios cerebroide y torácico (9,34,78,98).

El complejo OXMT-GS se considera como el principal sistema neurosecretor de los crustáceos, por el gran número de procesos regulados por las hormonas que produce y libera. Debido a la accesibilidad y gran tamaño de las terminales axónicas y de los somas neurosecretoras, es también el más conocido en cuanto a anatomía, fisiología, ultraestructura y contenido.

El sistema OXMT-GS es un análogo funcional del eje hipotálamo-neurohipófisis de los vertebrados y del sistema ganglio cerebroide-corpora cardiacum-corpora allatum de los insectos (21,34), que son centros reguladores de primera importancia en dichos organismos.

Las hormonas del sistema OXMT-GS.

Varios estudios clásicos, basados en la extirpación de la glándula sinusal y en la sustitución de su función mediante la inyección de extractos de la misma, han indicado la participación

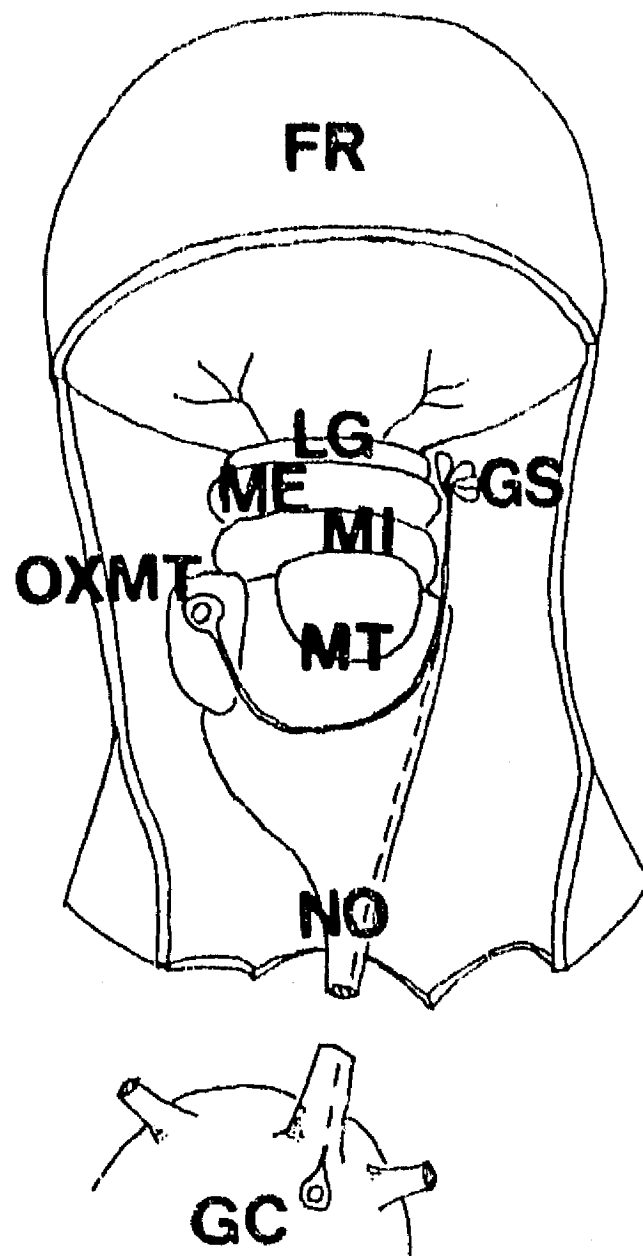


Figura 1

El tallo ocular de los crustáceos decápodos, derivado del ganglio cerebroide (GC), consiste de los fotorreceptores distales (FR) y de 4 ganglios o neurótipos: la médula terminal (MT), la médula interna (MI), la médula externa (ME) y la lámina ganglionar (LG). El sistema neurosecretor está formado por somas neurosecretoras situadas principalmente en la MT, denominados Organo X de la MT (OXMT) y de sus terminales axónicas ensanchadas que se agrupan y forman a la glándula sinusal (GS). Las terminales de otras somas situadas en el GC llegan a la GS a través del nervio óptico (NO).

del sistema OXMT-GS en la regulación de procesos tan diversos como la migración de pigmentos del exoesqueleto y del ojo, los balances hídrico y electrolítico, la muda, la reproducción, la regeneración de las extremidades perdidas o dañadas, la locomoción, la digestión y el metabolismo de los carbohidratos (57,58).

Hasta principios de 1991 solamente se había determinado la estructura completa de 4 neurohormonas de la glándula sinusal: 1) la hormona concentradora del pigmento rojo del camarón *Pandalus borealis* es un octapéptido neutro que tiene sus extremos bloqueados (31); 2) las hormonas concentradoras del pigmento retiniano distal u hormonas de adaptación a la luz del cangrejo *Uca pugilator* (80) y de *Pandalus borealis* (30) son octadecapéptidos con sus extremos carboxilo amidados; 3) la hormona hiperglucemiante (HHG) del cangrejo *Carcinus maenas* consiste de una cadena de 72 residuos de aminoácido, con los extremos bloqueados y 3 puentes disulfuro (49) y 4) la hormona inhibidora de la muda (HIM) de la langosta *Homarus americanus* contiene 71 residuos de aminoácido en una cadena con el extremo amino bloqueado (17) y presenta un grado apreciable de actividad hiperglucemiante.

Acciones de las hormonas del sistema OXMT-GS.

A) La hormona hiperglucemiante.

Abramowitz et al. (1) descubrieron un "factor diabetógeno" en los crustáceos cuando observaron que la inyección de extractos de tallos oculares del cangrejo *Callinectes*, en animales destallados de la misma especie, producía un efecto hiperglucemiante notable. Este "factor" fue llamado posteriormente la Hormona Hiperglucemiante (HHG) de los crustáceos (61).

Se ha encontrado que la ablación de los tallos oculares o de las glándulas sinusales conduce a una disminución muy grande en la concentración de glucosa de la hemolinfa. En *Procambarus bouvieri*, la glucosa prácticamente no puede ser detectada después de una semana de haber amputado los tallos oculares (4). También se ha

notado que el efecto hiperglucemiante de los extractos de tallos oculares se observa mejor en los animales destallados que en los intactos, los cuales tienen un nivel de glucosa variable, bajo con relación al de los vertebrados (12).

La forma de las curvas de glucemia contra tiempo en bioensayos homólogos es más o menos independiente de la especie del crustáceo y se caracteriza por un aumento rápido del nivel de glucosa dentro de los primeros 10 a 15 minutos después de la inyección, que alcanza un máximo entre la primera y la segunda horas. Luego, la concentración de glucosa disminuye hasta volver a los niveles basales al cabo de unas 6 h. Cabe mencionar que tanto el tiempo en que se alcanza la glucemia máxima como la magnitud de esta dependen de la dosis administrada y de si se trata de HHG pura o de un extracto de glándulas sinusales (54,59,91).

La forma de las curvas de hiperglucemia causada por la inyección de extractos de tallos oculares o glándulas sinusales sugiere que el fenómeno es causado por una movilización rápida de glucosa a partir de reservas de carbohidratos o por transferencia desde depósitos de monosacáridos u oligosacáridos en las células blanco, mas no por cambios de los flujos de las vías metabólicas principales (55).

i) METABOLISMO DEL GLUCOGENO.

La HHG podría producir su efecto mediante una acción glucogenolítica en los tejidos blanco. Un dato que apoya esta idea es la observación de que la inyección de la hormona conduce a una disminución en el glucógeno del músculo abdominal y de las gónadas de *Orconectes limosus* y de las branquias y tegumento de *Uca pugilator* (54). También se ha encontrado un aumento en la liberación de glucosa radiactiva a partir del músculo abdominal de *Cambarus robustus*, marcado previamente con ^{14}C -glucosa, al tratarlo *in vitro* con un extracto de tallos oculares (93); lo mismo se observó en un experimento semejante hecho con el hepatopáncreas de *Orconectes limosus*, al incubarlo con HHG purificada (87).

Por otra parte, se ha visto aumento en el contenido de glucógeno en el músculo abdominal y tegumento de *Panulirus japonicus* (84) y en el músculo abdominal de *Ocypode platytarsis* (75), como consecuencia de la extirpación de los tallos oculares.

Con un desarrollo temporal comparable al de la hiperglucemia, se ha encontrado activación de la fosforilasa de glucógeno del músculo abdominal de *Orconectes limosus* (50) *in vivo* por la inyección de extractos de tallos oculares; resultados similares se obtuvieron *in vitro* con el músculo de *Carcinus maenas* y *Eriocheir sinensis* (10). El efecto opuesto, es decir, la inactivación de la fosforilasa, se ha observado después de la eliminación de los tallos oculares de *Orconectes limosus* (50) y *Hemigrapsus* (79).

La actividad de la sintetasa de glucógeno se ha encontrado aumentada en el músculo abdominal de *Orconectes limosus* (51,85) y *Cancer* (79) después de la extirpación de los tallos oculares. En ambos casos, el efecto fue anulado por la inyección de extractos de estos últimos o de HHG purificada.

Se ha encontrado que los nucleótidos cíclicos, AMPc y GMPc, intervienen como mensajeros secundarios de la HHG. En estudios *in vivo*, varios tejidos (principalmente el corazón, el hepatopáncreas y el músculo abdominal, pero también la glándula antenaria) mostraron un aumento de dichos nucleótidos después de la inyección de la HHG (90).

Experimentos *in vivo* e *in vitro* han demostrado que el aumento intracelular de los nucleótidos cíclicos producido por la HHG en los tejidos blanco se debe a un aumento en la actividad de las ciclasas que los producen y no a una inhibición de la fosfodiesterasa que los degrada (23,86).

Como sucede en los organismos superiores, en los crustáceos los nucleótidos cíclicos se unen a cinasas de proteínas y las activan. Se ha encontrado en el músculo abdominal de *Orconectes limosus* un aumento en el cociente de actividad de dichas cinasas, que es paralelo al incremento de los nucleótidos cíclicos; en este sistema parece existir una sola clase de cinasa de proteínas que se une por igual al AMPc y al GMPc (20).

En el músculo abdominal de *Orconectes limosus* se ha encontrado que las ciclasas de adenilato y guanilato están reguladas por iones Ca^+ y calmodulina (89). La HHG podría afectar a las enzimas de la síntesis y degradación del glucógeno por medio de la liberación de iones Ca^+ a partir del retículo endoplásmico por la vía del fosfatidilinositol.

2) DIGESTION DE LOS CARBOHIDRATOS.

Se ha encontrado que la HHG puede intervenir en el metabolismo de los carbohidratos mediante la regulación de enzimas extracelulares. El hepatopáncreas, que posee receptores para la hormona, interviene en la secreción del fluido digestivo, en la absorción del alimento digerido y en el almacenamiento de lípidos y carbohidratos (16).

Se han observado cambios en las actividades amilolítica y proteolítica del hepatopáncreas como consecuencia de la inyección de extractos de tallos oculares, inclusive en animales en ayuno (33) y por extirpación de los tallos oculares, así como durante las diferentes etapas del ciclo de la muda (101). La HHG purificada aumenta notablemente la secreción hepatopancreática de amilasa (88).

Hasta la fecha se cree que la secreción de la amilasa está mediada por un aumento de los iones Ca^+ intracelulares y que es posible la intervención de nucleótidos cíclicos generados por ciclasas dependientes de Ca^+ y calmodulina (16,88).

B) La hormona inhibidora de la muda.

El complejo proceso de la muda de los crustáceos (y de los insectos) requiere la producción de la -ecdisona en etapas bien definidas del ciclo de la muda. La -ecdisona es un compuesto esteroidal que se produce en los llamados órganos Y a partir del colesterol ingerido en la dieta de los crustáceos, ya que estos no tienen la capacidad de sintetizarlo. La ecdisona, que puede tener

efectos hormonales por sí misma, es transformada en el hepatopáncreas, la epidermis, la hemolinfa y otros tejidos periféricos a -ecdisona, que se ha considerado como la forma activa de la hormona de la muda (16,37).

La idea de la existencia de un control neurohormonal de la muda surgió de la observación en muchas especies de crustáceos, principalmente decápodos, de que la extirpación de los tallos oculares producía una aceleración en el ciclo de la muda. Muchos experimentos han apoyado este concepto: la eliminación de los tallos oculares produjo aumentos notables en los niveles de ecdisteroides circulantes y los animales entraron en la etapa de premuda; la inyección de extractos de tallos oculares en ejemplares destallados condujo a concentraciones bajas de ecdisteroides en la hemolinfa; la secreción de ecdisona a partir de los órganos Y *in vitro* se inhibió en un medio de cultivo que había sido incubado con glándulas sinusales; los órganos Y de animales a los que se había inyectado extractos de glándulas sinusales mostraron, en cultivo, una producción disminuida de ecdisona (16).

La hormona inhibidora de la muda se une a sus receptores en los órganos Y y activa la producción de AMPc. Se ha encontrado que, tanto *in vivo* como *in vitro*, los extractos de tallos oculares inhiben la captación de colesterol por parte de los órganos Y. Asimismo, algunas fracciones de los extractos de glándulas sinusales disminuyen la síntesis de ARN y proteínas; esta última es necesaria para la elaboración de la -ecdisona (73).

C) La hormona inhibidora de la vitelogénesis (HIV) u hormona inhibidora de las gónadas (HIG).

La vitelogénesis es la última fase para formar un huevo maduro y comprende la síntesis o captación, o ambos, de la yema o vitelo, que es el material nutritivo para el futuro embrión (3). El componente principal del vitelo es la lipoproteína vitelina (27,67) que se genera a partir de su precursor, la vitelogenina, la cual puede ser producida en los ovarios (68) o en otros tejidos (18,32,97).

Diversos estudios han confirmado la presencia de una Hormona Inhibidora de la Vitelogenesis en el sistema neurosecretor del tallo ocular de los crustáceos: el desarrollo gonadal precoz resultante de la ablación de los tallos oculares fue observado por primera vez en el camarón *Palaemon serratus*; se ha encontrado en una variedad de crustáceos que la eliminación bilateral de los tallos oculares indujo desarrollos ováricos y testiculares aumentados (17).

La inhibición de la síntesis de proteínas ováricas *in vitro* por parte de extractos de tallos oculares demostró que la HIV puede actuar directamente en las gónadas de *Uca pugilator* (26,35). Por otra parte, la HIV tiene también un efecto inhibitor sobre la unión de la vitelogenina a su receptor en las membranas de los ovocitos del langostino *Macrobrachium rosenbergii* (44,45).

Cabe mencionar que, ya que la HIV puede afectar otros procesos reproductivos además de la vitelogenesis tanto en las hembras como en los machos, esta hormona se conoce también como la hormona inhibidora de las gónadas (HIG)(3).

OBJETIVO

El objetivo inmediato de este trabajo fue determinar la secuencia de aminoácidos completa del isomorfo más abundante de la Hormona Hiperglucemiante (HHG-I) del acocil mexicano *Procambarus bouvieri* (Ortmann). Se determinarán además, al menos parcialmente, las secuencias del otro isomorfo de la Hormona Hiperglucemiante (HHG-II) y la de la Hormona Inhibidora de la Muda (HIM). También se pretende identificar a la Hormona Inhibidora de la Vitelogenénesis e iniciar su caracterización, incluso su secuencia de aminoácidos.

Se compararán las estructuras primarias de las 4 hormonas y se correlacionarán con los datos de las estructuras secundarias (predichas y observadas) y con datos fisiológicos, para iniciar el estudio de la relación estructura-función en esta familia de neuropéptidos.

Desde otro punto de vista, las secuencias de aminoácidos podrían aclarar cuál es el mecanismo que genera a dicha familia de neuropéptidos (duplicación génica y evolución divergente, empalme alternativo del ARN mensajero, modificación postraduccional, o una combinación de ellas), lo cual es interesante desde el punto de vista de la evolución de las hormonas peptídicas de los invertebrados en particular y de las proteínas en general.

La comparación de la misma hormona en diferentes especies será importante para el estudio de las relaciones estructura-función desde el punto de vista evolutivo; se podrían localizar los diversos sitios funcionales de cada hormona y confirmar o modificar las relaciones taxonómicas, basadas en criterios morfológicos, que se han establecido entre los organismos que las producen.

Se buscarán homologías con proteínas de otros organismos, tanto invertebrados como vertebrados. En caso de hallar homología, se estudiarán las relaciones estructurales, funcionales y evolutivas.

MATERIALES, METODOLOGIA Y RESULTADOS

Una parte sustancial del contenido de esta Tesis ha sido publicada en dos revistas de circulación internacional en dos artículos que tratan, básicamente, uno, de la determinación de la secuencia de aminoácidos del isomorfo mayoritario de la Hormona Hipergluceante y el otro, de la identificación, purificación y caracterización inicial de la Hormona Inhibidora de la Vitelogenésis.

Debido a que cada artículo contiene sus propias secciones de Materials and methods y Results (véanse dichas secciones en cada uno de los artículos incluidos), los apartados sobre Materiales y métodos y Resultados de esta Tesis fueron agrupados en esta sección, que se tituló Materiales, metodología y resultados.

Además de los dos artículos mencionados en los párrafos anteriores, esta sección incluye un apartado titulado Experimentos y resultados adicionales. En este último se presenta información de importancia fundamental, obtenida durante el estudio de la familia de neuropéptidos de la glándula sinusal de *Procambarus bouvieri* (Ortmann).

IDENTIFICATION, PURIFICATION AND INITIAL CHARACTERIZATION OF THE VITELLOGENESIS-INHIBITING HORMONE FROM THE MEXICAN CRAYFISH *PROCAMBARUS BOUVIERI* (ORTMANN)

MANUEL B. AGUILAR,* L. SCOTT QUACKENBUSH,† DONALD T. HUNT,‡ JEFFREY SHABANOWITZ‡
and ALBERTO HUBERMAN*§

*Instituto Nacional de la Nutrición "Salvador Zubirán", Department of Biochemistry, Mexico City 14000, Mexico; †Florida International University, Department of Biological Sciences, Miami, FL, U.S.A.; and ‡University of Virginia, Department of Chemistry, Charlottesville, VA, U.S.A.

(Received 11 December 1991)

Abstract—1. By means of a single step of RP-HPLC on a μ Bondapak-Phenyl column, a neuropeptide with vitellogenesis-inhibiting hormone (VIH) activity was isolated from a crude extract of sinus glands (SG) of the crayfish *P. bouvieri*. The yield was 5.4 ng/SG.

2. The biological activity was tested in a heterologous *in vitro* bioassay as the depression of vitellogenin biosynthesis by cultured *Penaeus vannamei*'s ovaries.

3. The molecular mass was determined to be 8388 ± 2 Da by means of mass spectrometry.

4. The N-terminus was shown to be blocked by means of the dansyl-Cl method.

5. The following amino acid average composition was obtained by means of precolumn derivatization with phenylisothiocyanate: (Asx)₁₃, (Glx)₄, (Val)₇, (Arg, Cys, Leu)₆, (Tyr)₃, (Ala, Ile)₄, (Lys)₃₋₄, (Phe)₃, (Thr)₂₋₃, (Ser, Gly)₂, (Pro)₁. VIH consists of 72-74 amino acid residues. It does not contain Trp, His, or Met.

6. The tryptic peptides of the reduced and carboxymethylated VIH and of the crustacean hyperglycemic hormone (major isoform, CHH-I) were purified on an Ultrasphere-ODS column and the peptide maps compared with respect to retention times and composition. Forty-six percent of the total amount of amino acid residues were accounted for in 5 peptides which coincided in elution time and composition.

7. The remarkable resemblance between VIH and CHH-I confirms clearly that VIH belongs to the neuropeptide hormone family which includes the molt-inhibiting hormone (MIH) and the two isoforms of the crustacean hyperglycemic hormone (CHH-I and CHH-II, formerly designated CHH-B and CHH-C by us).

INTRODUCTION

Several studies have indicated and confirmed the presence of a vitellogenesis-inhibiting hormone (VIH; also known as gonad-inhibiting hormone, GIH) activity in the neurosecretory system of the crustacean eyestalk. Precocious gonadal growth after eyestalk ablation was first observed by Panouse (1943) in the shrimp *Palaemon serratus*. Subsequently, others showed that bilateral eyestalk ablation induced increased ovarian and testicular development in a variety of crustaceans (for reviews, see Charniaux-Cotton, 1985; Quackenbush, 1986;

Fingerman, 1987). Since the implantation of sinus glands (SG) into eyestalk-ablated fiddler crabs, *Uca pugilator* (Brown and Jones, 1948), spiny lobsters, *Panulirus argus* (Quackenbush and Herrnkind, 1981) and freshwater shrimps, *Atyaephyra desmaresti* (van Deijnen, 1986), suppressed the expected gonadal growth, the absence of a VIH was proposed to be responsible for the precocious gonadal growth that results from eyestalk ablation.

In crustacean females, the late phase of gonadal maturation to form mature ova is named vitellogenesis (for review, see Adiyodi, 1985). This process comprises the synthesis or deposition, or both, of yolk or vitellus. The major component of this nutritive material is the lipoprotein vitellin (Vn) (Lui and O'Connor, 1976; Eastman-Reks and Fingerman, 1985) which derives from a precursor, vitellogenin (Vg) that can be synthesized in extra-ovarian tissues (Wallace *et al.*, 1967; Fielder *et al.*, 1971; Charniaux-Cotton, 1985) or in the ovaries (Lui and O'Connor, 1977). The inhibition of ovarian protein synthesis *in vitro* by eyestalk extract showed that VIH can act directly on the gonads of *Uca pugilator* (Gorell and Gilbert, 1971; Eastman-Reks and Fingerman, 1984). On the other hand, VIH also has a direct inhibitory

§To whom correspondence should be addressed at Department of Biochemistry, I.N.N.S.Z., Vasco de Quiroga 15, Tlalpan, 14000 México, D.F., México.

Abbreviations—RP-HPLC, reverse-phase high-performance liquid chromatography; TNBS, 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid; Tris, tris(hydroxymethyl) aminomethane; TPCK, N-tosyl-L-phenylalanine chloromethyl ketone; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid, disodium salt; PMSF, phenyl-methylsulfonyl fluoride; DTT, dithiothreitol; PITC, phenylisothiocyanate; PBS, phosphate buffered saline.

action on the binding of vitellogenin to its receptor in the oocyte membrane of the crayfish *Macrobrachium rosenbergii* (Jugan, 1985; Jugan and Soyez, 1985).

For VIH, no data demonstrating, or at least suggesting sex, species or group specificity are known (for review, see Adiyodi, 1985; Kleinholz, 1985). Bomirski *et al.* (1981) described the partial purification of VIH from the crab *Cancer magister*. The animal used for monitoring the bioactivity was the shrimp *Crangon crangon*. Van Deijnen (1986) showed that inhibition of oocyte growth in the shrimp *Atyaephyra desmaresti* can be used as a measure of VIH activity in SG extracts of the lobster *Homarus americanus*.

Recently, Quackenbush and Keeley (1988) developed a suitable heterologous bioassay for the VIH of *Penaeus setiferus* which measures the *in vitro* Vg synthesis in cultured *Uca pugnator* ovaries using a polyclonal antibody to crab Vg.

Until now, VIH has been rather poorly characterized from the structural point of view. Data from several species indicate that it is thermostable and is dialyzable through cellophane membranes (for review, see Kleinholz, 1985). In *Cancer magister*, it has a molecular weight (mol. wt) of about 2000, estimated from its behavior on G-25 Sephadex chromatography (Bomirski *et al.*, 1981). Recently, van Deijnen (1986) found in *Homarus americanus* that VIH was separated into a heavy (45,000) and a light (7000) mol. wt form, according to urea-SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. The larger compound could be a precursor molecule. Moreover, Soyez *et al.* (1991) sequenced two isoforms of the VIH from the lobster *Homarus americanus*. Both consisted of a chain of 77 amino acid residues, with 3 disulfide bridges and a mol. wt of 9135.

We are interested in the structural characterization of neuropeptides from the SG of the Mexican crayfish *Procambarus bouvieri*. We have isolated and characterized two isoforms of the crustacean hyperglycemic hormone (CHH) and the MIH (Huberman and Aguilar, 1986, 1988a, 1988b, 1989a, 1989b).

Since one of the peptides that we were able to resolve by means of RP-HPLC was thought to be a good candidate for VIH on the basis of preliminary studies of amino acid composition, we employed the heterologous bioassay developed by Quackenbush and Keeley (1988) for the identification of the VIH of *P. bouvieri* in SG extracts fractionated by means of RP-HPLC. The peptide bearing VIH activity was characterized with respect to molecular mass, N-terminus, amino acid composition and tryptic mapping. The results demonstrate clearly that VIH belongs to the crustacean neuropeptide family which includes the CHH and the MIH.

MATERIALS AND METHODS

Animals, sinus glands and crude extracts

Adult crayfish (not selected for sex) were obtained from local fishermen in Uruapan, State of Michoacán. They were anesthetized with crushed ice and their eyestalks were cut and kept frozen at -70°C until used. The SG were dissected under the microscope while covered with ice-cold crustacean saline (van Harreveld, 1936) and kept in a small volume of ice-cold water (1 $\mu\text{l}/\text{SG}$). Each preparation consisted of 3000-6000 SG.

For the preparation of the crude extract, the protocol described by us (Huberman and Aguilar, 1986) was followed with slight modifications. Briefly, batches of 1000 SG in water, in 11 x 34 mm polycarbonate centrifuge tubes (Beckman), were disintegrated with three 30-sec bursts of a Kontex Micro-Ultrasonic Disrupter followed by centrifugation at 108,000 g (average) for 15 min at 2°C in a Beckman TL-100 tabletop ultracentrifuge provided with a TLA-100.2 rotor. After decanting the supernatant, the precipitate was resuspended in 800 μl of water and the process repeated twice. The three supernatants were mixed, centrifuged at 356,000 g (average) for 30 min at 2°C and concentrated to 0.5 $\mu\text{l}/\text{SG}$ in a Savant centrifugal concentrator. The concentrate was adjusted to 21% acetonitrile and 0.1% trifluoroacetic acid (TFA), and 0.67 $\mu\text{l}/\text{SG}$. After 15 min at 4°C, the last ultracentrifugation was repeated. Finally, the supernatant was filtered through a centrifugal microfiltration device provided with a 0.2 μm regenerated cellulose filter (Model MF-1, Bioanalytical Systems, Inc.) at 1800 g for 10 min at 4°C. Batches of 500 SG equivalents were submitted to HPLC.

HPLC

A Beckman/Altex system consisting of a Model 420 Microprocessor Controller/Programmer, two Model 110A pumps, a Model 210 manual injection valve and a Model CR1A Recorder/Data Processor was used. The detector was a LKB Uvicord-S provided with a 8 μl cell. The column for hormone purification was $\mu\text{Bondapak-Phenyl}$ (300 x 3.9 mm i.d., 10 μm particle size; Waters, Milford, MA). The effluent was monitored at 206 nm. Solution A was 0.1% aqueous TFA and solution B was 60% aqueous acetonitrile containing 0.1% TFA. A linear gradient from 35% B to 58% B in 10 min was followed by isocratic elution at 58% B for 50 min, at room temperature and a flow of 1 ml/min.

The carboxymethylated or pyridylethylated hormones were purified in a Novapak-C18 column (150 x 3.9 mm i.d., 5 μm particle size; Waters) using the same solutions as above. A linear gradient from 35% B to 100% B was run for 70 min at room temperature and at a flow of 1 ml/min.

For the purification of the tryptic peptides, an Ultrasphere-ODS column (250 x 4.6 mm i.d., 5 μm particle size; Beckman) provided with a precolumn (42 x 4.6 mm i.d., Beckman) was used at 30°C with the same solutions as above. After an isocratic step at 0% B for 10 min, a linear gradient from 0 to 85% B was developed in 100 min, at a flow rate of 1 ml/min.

For the amino acid analysis as phenylthiocarbamoyl amino acids (PTC-aa), one C18 Guard-Pack cartridge (Waters), one precolumn (42 x 4.6 mm i.d., Beckman) and two Ultrasphere-ODS columns (250 x 4.6 mm i.d. each, 5 μm particle size; Beckman) in tandem, were used at 45°C. The elution system described by Bidlingmeyer *et al.* (1984) was employed, with only minor adjustments: solution A was 140 mM sodium acetate containing 0.05% triethylamine (TEA) by volume, adjusted to pH 5.50 with acetic acid; solution B was 60% aqueous acetonitrile. A linear gradient from 15% B to 62% B was run for 29 min at 1.2 ml/min. The PTC-aa were monitored at 250 nm.

Protein determination

Samples were hydrolyzed in 5.7 M HCl at 145°C under nitrogen for 1 hr in calcined flame-sealed Pyrex tubes. The TNBS micro-method of Hazra *et al.* (1984) was employed, with bovine serum albumin (Sigma, St Louis, MO) as standard.

Bioassay

An *in vitro* tissue assay was used for the measurement of both total protein synthesis and specific yolk protein synthesis. This assay was described in detail for both crab and shrimp tissues (Quackenbush, 1989, 1991; Quackenbush and

Keeley, 1988). Ovaries were dissected from shrimp, *Penaeus vannamei*, under aerated cold saline (Cooke *et al.*, 1977). Tissue fragments (2–3 mm, about 0.5 mg total protein) from the ovary (20 fragments shrimp) were placed into 5 ml sterile plastic culture dishes containing 2 ml of a sterile incubation medium (Quackenbush and Keeley, 1988). The medium contained amino acids, salts, sugars, and antibiotics (Sigma's M-199, penicillin and streptomycin). Solutions (100 μ l) containing hormones or crude extracts, and adequate control solutions (muscle extracts) were added to the incubation medium directly. Radioactive leucine (14 C-leucine) was added to the culture medium at the start of incubation. Labeled and cold leucine were mixed together to provide a standard dose of 10 μ l mixture containing 0.5 μ Ci/5 nmol leucine. Incubation proceeded in a sealed chamber gassed with 95% O₂ and 5% CO₂ at 5 psi. Incubations for 4 hr at 30°C allowed about 5600 \pm 1000 dpm/mg/hr incorporation into ovarian proteins (Quackenbush and Keeley, 1988; Quackenbush, 1989). After incubation, tissues were homogenized and the proteins extracted in a salt buffer (Lui and O'Connor, 1976: 0.5 M NaCl, 0.5 M Tris, 5 mM EDTA, 0.001% PMSF, pH 7.5). The soluble proteins were precipitated from the extraction buffer by the addition of three volumes of saturated (NH₄)₂SO₄. After the salt precipitation, the mixture was centrifuged at 8000 g at 4°C. The pellet of protein was washed with phosphate buffer (PBS: 0.01 M NaH₂PO₄, 0.85% NaCl, pH 7.5) and re-precipitated with salt, three times. The final pellet was resuspended in PBS. Aliquots of this saline solution were taken for the determination of total protein (Bio-Rad Protein Reagent Assay) and the determination of labeled leucine incorporation via scintillation spectroscopy. Results from these procedures are expressed as dpm/mg/hr.

Incorporation of labeled leucine into yolk proteins was determined using a slight modification of the *in vitro* assay. To the pellet of the protein obtained by salt precipitation and solubilized in PBS was added 50 μ l of antibody to yolk protein from *Penaeus vannamei* (50 μ l of a 0.5 mg/ml affinity purified IgG fraction of rabbit serum). The mixture of proteins and antiserum was incubated for 18 hr at 4°C. An immunoprecipitate was obtained after centrifugation at 8000 g at 4°C for 10 min. The supernatant was retained and used as a control for the non-specific inhibition of protein synthesis (it contains those proteins other than the 97 kDa antigen of yolk complex). The pellet was washed four times in cold PBS and then solubilized in 1 N NaOH. Aliquots of this solution were used for the determination of total protein and labeled leucine incorporation as described above. The pellet contains the antigen (97 kDa) yolk protein and was thus a specific assay for vitellogenesis (Quackenbush, 1989). The activity of the peptide hormones tested in this system was measured using a formula for per cent inhibition: (Control dpm/mg – Test dpm/mg)/Control dpm/mg. Thus each potential hormone was tested for its inhibition of *in vitro* yolk protein synthesis. Doses of hormone were tested at 0.1, 1, 5, 10, 25, and 50 sinus gland equivalents on ten separate ovarian fragments. Controls for the hormones were muscle extract fractions at the equivalent protein dose measured in mg/ml.

Mass spectrometry

Mass spectra were recorded on a TSQ-70 triple quadrupole instrument (Finnigan-MAT, San Jose, CA) equipped for electrospray ionization (Hunt *et al.*, 1991). Samples were dissolved in 0.5% (v/v) acetic acid and an aliquot (5–10 pmol) was then injected into the electrospray ionization source from a syringe pump.

Cystine residues modification

For reduction and carboxymethylation of the disulfide bonds, the procedure described by Allen (1981) was followed with slight modifications. Thirty-two micrograms of VIH were dissolved in 100 μ l of 0.1 M Tris-HCl buffer

containing 6 M guanidinium Cl and 1 mM EDTA, adjusted to pH 8.30. After the addition of 2 μ l of 100 mM dithiothreitol (DTT), the tube was flushed with nitrogen for 2 min, vortexed for 15 sec and incubated at 37°C for 1 hr. Then, 7.5 μ l of 50 mM sodium iodoacetate were added to the reaction mixture and the flushing, vortexing and incubation (in the dark) were repeated. The reagent additions for reduction and carboxymethylation were repeated with incubation times of 60 min and 30 min respectively. Finally, 1 μ l of 2-mercaptoethanol was added, followed by 140 μ l of RP-HPLC solution A. For chromatography, the sample was filtered as described above for the crude extract.

The protocol recommended by Tarr (1986) was employed for reduction and pyridylethylation. Only minor adjustments were made. VIH from 3000 SG was dissolved in 100 μ l of 0.5 M *N*-ethylmorpholine buffer, adjusted to pH 8.3 with glacial acetic acid. Five microliters of 1 M DTT were added and the tube was flushed with nitrogen for 30 sec. After 4 hr at room temperature, 3 μ l of 4-vinylpyridine were added to the reaction mixture and incubation proceeded overnight. For RP-HPLC the sample was filtered as described above.

End group analysis

For *N*-terminal amino acid analysis, the dansyl-Cl method of Gray and Hartley (1963) as described by Allen (1981) was used. For identification, the dansyl amino acid derivatives (DNS-aa) were chromatographed on 3 \times 3 cm polyamide-coated aluminium sheets (Schleicher and Schuell, GmbH) employing solvent systems I (1.5% v/v aqueous formic acid), II (toluene/acetic acid, 10:1, v/v), III (ethyl acetate/methanol/acetic acid, 20:1:1, by vol) (Woods and Wang, 1967). When basic amino acids were suspected, solvent system IV (50 mM Na₃PO₄/ethanol, 3:1, v/v; Hartley, 1970) was used after the previous three. In the case of VIH, 0.46 μ g were hydrolyzed in the presence of 3% thioglycolic acid (Matsubara and Sasaki, 1969) in 6 M HCl at 145°C for 1 hr under nitrogen. The same procedure was applied to purified tryptic peptides, but without thioglycolic acid.

Trypsin digestion

The product resulting from 32 μ g of VIH after carboxymethylation and purification by means of RP-HPLC and 32 μ g of carboxymethylated CHH-I was suspended in 200 μ l of 0.1 M ammonium bicarbonate buffer, pH 8.7, containing 0.1 mM CaCl₂, with two 60-sec bursts of an ultrasonic disrupter. Four microliters of trypsin-TPCK, 1 mg/ml in 1 mM HCl were added to each sample and the hydrolysis mixtures were incubated for 2 hr at 37°C after flushing with nitrogen. For HPLC injection, 40 μ l of solution A were added and the samples were filtered as described.

Amino acid analysis

Acid hydrolysis, precolumn derivatization with phenylisothiocyanate and RP-HPLC quantitation of the phenylthiocarbonyl amino acid derivatives (PTC-aa) were conducted essentially as described by Bidlingmeyer *et al.* (1984). Briefly, aliquots of approximately 500 pmol of pyridylethylated VIH in 6 \times 50 mm Pyrex tubes were hydrolyzed with 20 μ l of 5.7 M HCl containing 0.1% w/v phenol at 110°C for 24, 48, and 72 hr under nitrogen. Amino acid standard H mixture (Pierce) and oxidized insulin B-chain were also processed as standards and controls, respectively. The hydrolyzates were taken to dryness in 0.5 ml Eppendorf centrifuge tubes. Ten microliters of methanol/water/TEA (2:2:1, by vol) were added and the tubes vortexed for 10 sec. After a second drying step, the samples were dissolved in 10 μ l of methanol/water/TEA/PITC (7:1:1:1, by vol) and the reaction was allowed to proceed at room temperature for 20 min. The PTC-aa were taken to dryness and dissolved in 50 μ l of 50%

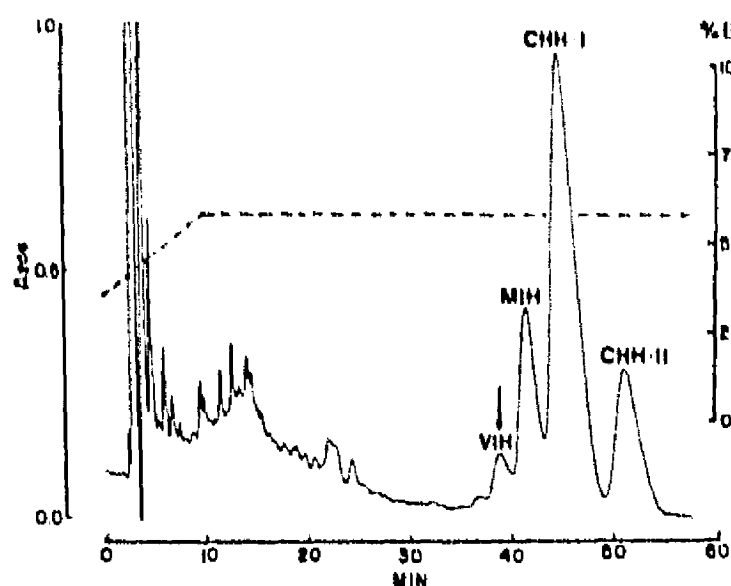


Fig. 1. Single-step purification of the VIH of *P. bouvieri*. Elution profile of a crude extract equivalent to 500 SG. Column: μ Bondapak-Phenyl (300 \times 3.9 mm i.d., 10 μ m particle size, Waters). Solvent A: 0.1% aqueous TFA; solvent B: 0.1% TFA in 60% aqueous acetonitrile. A linear gradient (dashed lines) from 35% B to 58% B was developed in 10 min. Elution was continued isocratically at 58% B for another 50 min, at room temperature. Flow rate: 1 ml/min. The absorbance of the eluate was monitored at 206 nm. Peak VIH (black arrow) inhibited vitellogenin biosynthesis in *Penaeus vannamei* ovaries cultured *in vitro*. The peak marked MIH corresponds to the molt-inhibiting hormone, whereas CHH-I and CHH-II are the major and the minor isoforms of the crustacean hyperglycemic hormone, respectively.

acetonitrile (v/v). Further dilutions to suitable concentrations were done with 5 mM Na_2PO_4 , pH 7.4/acetonitrile/methanol (19:1:5, by vol).

The presence of Met and Trp was determined on 0.46 μ g of VIH by means of acid hydrolysis in the presence of 3% thioglycolic acid, followed by dansylation and chromatography as described for the end group analysis.

The amino acid composition of the tryptic peptides from carboxymethylated VIH was determined in approximately 500 pmol of each peptide.

Reagents and glassware

All reagents were of analytical grade. HPLC solvents were from Fisher Scientific. Double-distilled water was further purified by passing through a Sybron-Barnstead NANOpure-A system, and only water with a resistivity above 10 megohm/cm was used. Glassware was calcined at 550°C for 4 hr. Other special reagents were: 4-vinyl pyridine, thioglycolic acid, dansyl-Cl, sodium iodoacetate, trinitrobenzene sulfonic acid and trypsin-TPCK (Sigma), triethylamine (Fisher), *N*-ethylmorpholine and phenylisothiocyanate (Pierce, sequencing grade). 4-Vinyl-pyridine and *N*-ethylmorpholine were distilled and trinitrobenzene sulfonate was recrystallized before use.

RESULTS

Single-step purification

Following the protocol developed for the purification of the crustacean hyperglycemic hormone, CHH (Huberman and Aguilar, 1986), with slight modifications, an aliquot of the crude extract corresponding to 500 SG was chromatographed under the conditions described in Materials and Methods.

Four highly hydrophobic peptides designated VIH, MIH, CHH-I and CHH-II in the order of elution are well separated in a single chromatographic step.

Peptides CHH-I and CHH-II correspond to the major and minor isoforms of the CHH, respectively, whereas peptide MIH is the molt-inhibiting hormone (Huberman and Aguilar, 1989a). Peptide VIH was collected manually in 1.5 ml Eppendorf tubes, avoiding the valley between it and peptide MIH. We have confirmed the reliability of this technique for collecting peptides, so we did not rechromatograph peptide VIH in order to verify its purity in view of the reduced amount of peptide and the high losses observed on rechromatography (Fig. 1).

The combined fractions corresponding to the putative VIH were taken to dryness for further processing.

Bioassay

Of the 4 peptides tested in the *in vitro* assay (VIH, MIH, CHH-I and CHH-II), only VIH inhibited incorporation of labeled leucine into yolk proteins. As can be seen in Table 1, one SG equivalent (5.4 ng) of VIH from *Procambarus bouvieri* produced a statistically significant inhibition of *Penaeus vannamei* yolk protein synthesis ($P < 0.05$). Higher doses produced increased inhibition up to the complete protein synthesis inhibition at 10 SG equivalents (54 ng). This material was as potent as crude extracts from shrimp eyestalks on a per weight basis, which implies that there is no species specificity of this material as tested.

Protein determination

The content of VIH per SG was determined from the amino acid analysis data. The weights of all the amino acid residues in the hydrolyzate (each one calculated from the corresponding amount in pmol, as quantified by means of RP-HPLC) were added up and corrected for the amount injected and for the amount of SG equivalents hydrolyzed. The average yield was 5.4 ng/SG. When larger lots of crude extract (6000 SG) were prepared, the yield of VIH was 6.0 ng/SG as determined by means of the TNBS method. Both of the above-mentioned results are not corrected for losses during isolation and purification.

Mass spectrometry

The vitellogenesis-inhibiting hormone adds 6 and 7 protons under electrospray ionization conditions and affords signals centered at m/z 1399.0 and 1199.0. The average mass of the $(M+H)^+$ ion calculated from these values is 8388.0 ± 2 .

End-group analysis

When 0.46 μ g of VIH (55 pmol) were dansylated, hydrolyzed and the resulting amino acid derivatives

Table 1. Dose-dependent inhibition of labeled leucine incorporation into vitellogenin synthesized *in vitro* by *Penaeus vannamei* ovary fragments on addition of purified VIH from *P. bouvieri*

Dose*	% Inhibition	Student's <i>t</i> -test	N†
0.1	12	NS‡	20
1.0	25	$P < 0.05$	10
5.0	35	$P < 0.05$	10
10	100	$P < 0.01$	20
25	100	$P < 0.001$	10
50	100	$P < 0.001$	20

*In sinus gland equivalents (1 SG eq. = 5.4 ng) of VIH.

†Number of fragments tested for each dose.

‡Not significant: *t*-test for two percentages.

Table 2. Amino acid composition of the VIH of *P. bouvieri* and comparison with the major peak of the CHH (CHH-I)

Amino acid	Average*	VIH residues†	CHH-I residues‡
ASX§	12.89	13	11
GLX§	8.18	8	7
SER	1.69	2	2
GLY	1.60	2	2
HIS	0	0	0
ARG	6.36	6	5
THR	2.59	2-3	3
ALA	3.85	4	4
PRO	0.64	1	1
TYR	4.93	5	6
VAL	7.23	7	8
MET*	0	0	0
ILE	3.95	4	4
LEU	6.00	6	6
PHE	2.64	3	3
LYS	3.69	3-4	4
TRP*	0	0	0
CYS	ND**	6**	6
		72-74	72

*Average values of residues per molecule obtained after acid hydrolysis in 5.7 M HCl + 0.1% phenol, for 24, 48 and 72 hr based on a mol. wt of 8388.

†Number of residues per molecule of mol. wt of 8388.

‡Huberman *et al.* (to be published).

§ASX = ASP + ASN; GLX = GLU + GLN.

||The average value was corrected on the basis of the amino acid analysis of the tryptic peptides.

*Determined by means of thin-layer chromatography after acid hydrolysis (5.7 M HCl + 3% thioglycolic acid, 145 C, 1 hr) and dansylation of 0.46 µg of VIH.

**ND = not determined. The final value was assigned on the basis of the high degree of homology with the CHH-I.

identified by thin-layer chromatography on polyamide plates, only the ϵ -dansyl lysine and the α -dansyl tyrosine derivatives were observed. This result is interpreted as the presence of a blocked *N*-terminal residue.

Amino acid analysis

The average values obtained from the hydrolysis of 3 lots of 5.1 µg (600 pmol) of reduced and carboxymethylated VIH during 24, 48, and 72 hr, respectively, are given in Table 2. The results obtained with another lot of 0.46 µg (55 pmol) of VIH hydrolyzed in the presence of 3% thioglycolic acid, in order to preserve Trp and Met residues from destruction, are also provided. In this case, the hydrolyzate was subjected to dansylation and thin-layer chromatography. In the same table, a comparison is made with the composition of the major peak of *P. bouvieri*

Table 3. Amino acid composition and *N*-terminus of the coincident tryptic peptides from VIH and CHH-I

Number*	Composition†	<i>N</i> -terminus‡
T1	R, T, T, A, V, C	V
T2	D, G, R, Y, I	G
T3	A, I, F, K	A
T4	D, E, E, A, V, F, K, C	-§
T5	D, D, E, S, R, A, Y, V, F, C	-§

*As numbered in Fig. 2, in the order of elution (T has been added to designate tryptic peptides).

†One-letter symbol for each amino acid residue. Determined by acid hydrolysis, derivatization with PITC and quantitation by RP-HPLC. The cysteine residues (as carboxymethyl-cysteine) were destroyed during hydrolysis. They were assigned on the basis of the homology with CHH-I.

‡As determined by dansylation, acid hydrolysis and thin-layer chromatography on polyamide sheets.

§*N*-terminus blocked.

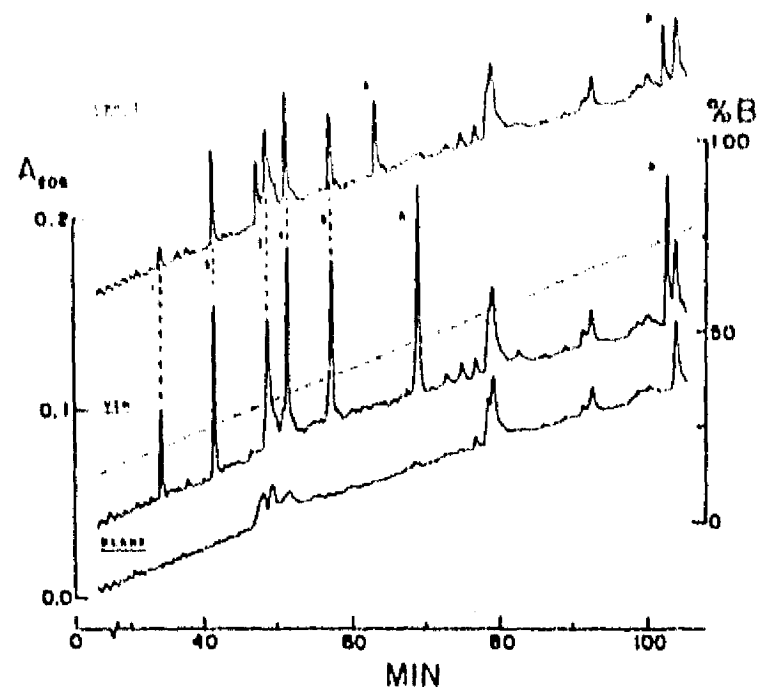


Fig. 2. Comparative tryptic peptide maps of the VIH (middle) and the CHH-I (upper) from *P. bouvieri* by means of RP-HPLC. Thirty-two micrograms of each hormone were reduced, carboxymethylated and repurified in a Novapak-C18 column (Waters). After digestion with trypsin-TPCK, the peptides were injected into an Ultrasphere-ODS column (250 x 4.6 mm i.d., 5 µm particle size, Beckman) provided with a pre-column. As a blank (lower), the same volume of digestion mixture was also chromatographed. Solvent A: 0.1% aqueous TFA; solvent B: 0.1% TFA in 60% aqueous acetonitrile. A linear gradient (dashed line) from 0% B to 85% B was developed in 100 min after an isocratic step at 0% B for 10 min. Temperature: 30°C. Flow rate; 1 ml/min. The absorbance of the eluate was monitored at 206 nm. Peptides which coincide in elution time and composition are connected by dashed lines and numbered from 1 to 5 in the order of elution, whereas pairs of peptides which have very similar composition are grouped by capital letters A and B. For clearness, the gradient scales are represented only on the middle chromatogram.

CHH (CHH-I) derived from its amino acid sequence (Huberman *et al.*, to be published).

Tryptic mapping

The elution profile of 31.8 µg (3.8 nmol) of VIH, after reduction, carboxymethylation and trypsin digestion is shown in Fig. 2. The RP-HPLC pattern of the tryptic peptides from the same amount of CHH-I, processed in an identical way, is also depicted. The peptides which coincide in retention time and amino acid composition are connected by dashed lines and numbered 1-5 in the order of elution (they will be referred to as T1-T5, respectively). Other peptides which have similar composition but different chromatographic behavior are designated by letters and will be referred to as TA and TB.

The first group, peptides T1-T5, comprises 33 amino acid residues or 46% of the total amount of residues (72) of CHH-I. In the second group (which includes the differences found before in amino acid composition between VIH and CHH-I, Table 2), the rest of the amino acid residues or 54% of the total are found.

Composition of the coincident peptides

One-fifth of each tryptic peptide obtained by means of RP-HPLC was hydrolyzed in 5.7 M HCl containing 0.1% phenol and the composition determined by

pre-column derivatization with PITC and RP-HPLC. The quantitative amino acid composition of the coincident tryptic peptides from VIH and CHH-I (peptides T1-T5) is shown in Table 3.

DISCUSSION

During the purification of the CHHs (Huberman and Aguilar, 1986, 1988a, 1988b) and of the MIH (Huberman and Aguilar, 1989a) of *P. bouvieri*, we found another well-resolved, hydrophobic, symmetric peak, which had a qualitative amino acid composition very similar to that of the above-mentioned hormones. As our laboratory is concerned with the structural characterization of crayfish neuropeptide hormones, we decided to subject this peptide to the heterologous bioassay developed by one of us (Quackenbush and Keeley, 1988; Quackenbush, 1989, 1991) in order to correlate the vitellogenesis-inhibiting activity first described by Panouse (1943) with a defined molecule. There were indications that the crustacean VIH was structurally related to the CHH and the MIH (Kegel *et al.*, 1989). In the *in vitro* bioassay, this peptide inhibited vitellogenin biosynthesis by cultured *Penaeus vannamei* ovaries, so it is reasonable to refer to it as the vitellogenesis-inhibiting hormone of *P. bouvieri*. This result agrees with earlier studies where no indications of species specificity were found (Bomirski *et al.*, 1981; van Deijnen, 1986; Quackenbush and Keeley, 1988).

On the other hand, it should be noted that neither the CHH isoforms, nor the MIH, displayed VIH activity when subjected to the same bioassay. Thus, it was confirmed that in *P. bouvieri*, at least, VIH and MIH are two distinct molecules. However, a possible MIH activity in the VIH cannot be ruled out because we have not subjected the VIH to the heterologous bioassay for MIH activity (Webster, 1986; Fenrich, 1987).

The hormone yield (about 5.4 ng/SG) as determined by amino acid analysis is in agreement with that obtained by the TNBS method and with calculations based on peak areas and protein content of the CHHs and MIH peaks. The amount of VIH is about one-tenth of that of the most abundant isoform of CHH (CHH-I). Moreover, VIH is the least abundant neuropeptide hormone in the sinus gland of *P. bouvieri*.

The first step in the characterization of the VIH was the accurate determination of its molecular mass by means of mass spectrometry. The value found for VIH (8388 ± 2) is very close to that of both isoforms of CHH and of MIH (to be published). An average mol. wt of 8514 can be calculated from Table 2. We believe, on the basis of preliminary amino acid composition analysis of the tryptic peptides, that the difference between this value and that obtained by mass spectrometry is due to an overestimation of the acidic residues in the amino acid analysis.

The amino acid composition confirmed further the suspected structural relationship of the VIH from *P. bouvieri* with the other neuropeptide hormones studied by us in the sinus gland of the same organism (CHH-I, CHH-II and MIH). All of them lack Trp, His and Met residues, have a mol. wt between 8300 and 8400, have a blocked *N*-terminus, and seven of

the 17 amino acids appear in the same number in the four hormones.

One blocked tryptic peptide from VIH (T4) coincided in composition and elution time with the *N*-terminal peptide of CHH-I (Huberman *et al.*, to be published), so a pyroglutamic acid residue is a good candidate for the *N*-terminus of VIH. This fact and the low amount of VIH in the SG has been an obstacle to the determination of the primary structure, which is under study at present.

The tryptic mapping enabled us to confirm the very high degree of homology between the VIH and CHH-I. We found 5 tryptic peptides which coincided in elution time and amino acid composition. From the analysis of the tryptic peptides of the two CHH isoforms, we have found that the peptides which coincide in chromatographic behavior and composition do have the same sequence (Huberman *et al.*, to be published). The number of residues contained in the coincident peptides accounts for 46% of the total residues in CHH-I. It should be noted that the two peptides from VIH which do not coincide with a CHH-I peptide (Fig. 2), have a counterpart which has an almost identical amino acid composition. This would indicate that the degree of homology must be much higher than 46%.

It has been shown recently that in *Carcinus maenas* the CHH (Kegel *et al.*, 1989) and the MIH (Webster, 1991) are clearly the products of two genes, as is the case of the MIH (Chang *et al.*, 1990) and the VIH (Soyez *et al.*, 1991) from *Homarus americanus*. Moreover, Tensen *et al.* (1991) have shown that the CHH isoforms from *Homarus americanus* originate from two different genes.

It will be very interesting to determine the amino acid sequence of the VIH from *P. bouvieri* and compare it with the CHHs and MIH from the same organism to get insight into the evolutionary relationship among the members of this family of neuropeptides.

At this point, it seems that the VIH from *P. bouvieri* will have more homology with the CHH from *P. bouvieri* than with the *Homarus* VIH.

There seem to be two kinds of SG peptide hormones. The first class includes peptides with a blocked *N*-terminus and 71-72 amino acid residues (mol. wt about 8500), such as the CHH from *Carcinus* (Kegel *et al.*, 1989), *Orconectes* (Keller *et al.*, personal communication) and *Procambarus* (Huberman *et al.*, to be published), and the MIH from *Homarus* (Chang *et al.*, 1990), whereas peptides with a free *N*-terminus and 77-78 amino acid residues (mol. wt about 9200), such as the MIH from *Carcinus* (Webster, 1991) and the VIH from *Homarus* (Soyez *et al.*, 1991) belong to the second one.

In conclusion, we have added a new member (VIH) to a family of very closely related neuropeptide hormones from the sinus gland of the Mexican crayfish *Procambarus bouvieri*, comprised also by the two isoforms of the CHH and the MIH.

Acknowledgements—This work was made possible by grants to A. H. from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) and from the Fondo de Fomento Educativo B.C.H. (FFE-BCH). L.S.Q. was supported by grant NA 89AA-D-SG053 from the U.S. Department of

Commerce, National Oceanic and Atmospheric Administration. The skilful assistance of Irma B. Mitre is gratefully acknowledged.

REFERENCES

- Adiyodi R. G. (1985) Reproduction and its control. In *The Biology of Crustacea* (Edited by Bliss D. E. and Mantel L. H.), Vol. 9, pp. 147-215. Academic Press, New York.
- Allen G. (1981) In *Sequencing of Proteins and Peptides* (Edited by Work T. S. and Burdon R. H.), pp. 30-31, 168-173. Elsevier/North-Holland, Amsterdam.
- Bidlingmeyer B. A., Cohen S. A. and Tarvin T. L. (1984) Rapid analysis of amino acids using pre-column derivatization. *J. Chromat.* **336**, 93-104.
- Bomirski A., Arendarczyk M., Kawainska E. and Kleinholz L. H. (1981) Partial characterization of crustacean gonad-inhibiting hormone. *Int. J. Invertebr. Reprod.* **3**, 213-219.
- Brown F. A. Jr and Jones G. M. (1948) Ovarian inhibition by a sinus gland principle in the fiddler crab. *Biol. Bull.* **96**, 228-232.
- Chang E. S., Prestwich G. D. and Bruce M. J. (1990) Amino acid sequence of a peptide with both molt-inhibiting and hyperglycemic activities in the lobster, *Homarus americanus*. *Biochem. biophys. Res. Commun.* **171**, 818-826.
- Charniaux-Cotton H. (1985) Vitellogenesis and its control in malacostracan Crustacea. *Am. Zool.* **25**, 197-206.
- Cooke I. M., Haylett B. and Weatherby T. (1977) Electrically elicited neurosecretory and electrical responses of the isolated crab sinus gland in normal and reduced salines. *J. exp. Biol.* **70**, 125-149.
- Eastman-Reks S. and Fingerman M. (1984) Effects of neuroendocrine tissue and cyclic AMP on ovarian growth *in vivo* and *in vitro* in the fiddler crab, *Uca pugnator*. *Comp. Biochem. Physiol.* **79A**, 679-684.
- Eastman-Reks S. and Fingerman M. (1985) *In vitro* synthesis of vitellin by the ovary of the fiddler crab, *Uca pugnator*. *J. exp. Zool.* **233**, 111-116.
- Fenrich R. (1987) Neuroendocrine regulation of the crayfish molting gland. Diploma Thesis. University of Bonn.
- Fielder D. R., Rao K. R. and Fingerman M. (1971) A female-limited lipoprotein and the diversity of hemocyanin components in the dimorphic variants of the fiddler crab, *Uca pugnator*, as revealed by disc electrophoresis. *Comp. Biochem. Physiol.* **39B**, 291-297.
- Fingerman M. (1987) Endocrine mechanisms in crustaceans. *J. Crustacean Biol.* **7**, 1-24.
- Gorell T. A. and Gilbert L. (1971) Protein and RNA synthesis in premolt crayfish, *Orconectes virilis*. *Z. vergl. Physiol.* **73**, 345-356.
- Gray W. R. and Hartley B. S. (1963) A fluorescent end-group reagent for proteins and peptides. *Biochem. J.* **89**, 59P.
- Hazra A. K., Chock S. P. Y. and Albers R. W. (1984) Protein determination with trinitrobenzene sulfonate: a method relatively independent of amino acid composition. *Analyt. Biochem.* **137**, 437-443.
- Hartley B. S. (1970) Strategy and tactics in protein chemistry. *Biochem. J.* **119**, 805-822.
- Huberman A. and Aguilar M. B. (1986) A neurosecretory hyperglycemic hormone from the sinus gland of the Mexican crayfish *Procambarus bowvieri* (Ortmann). I. Purification and biochemical characterization of the most abundant form of the hormone. *Comp. Biochem. Physiol.* **85B**, 197-203.
- Huberman A. and Aguilar M. B. (1988a) A neurosecretory hyperglycemic hormone from the sinus gland of the Mexican crayfish *Procambarus bowvieri* (Ortmann). II. Structural comparison of two isoforms of the hormone. *Comp. Biochem. Physiol.* **91B**, 345-349.
- Huberman A. and Aguilar M. B. (1988b) Single-step purification of two hyperglycemic neurohormones from the sinus gland of *Procambarus bowvieri*. Comparative peptide mapping by means of high-performance liquid chromatography. *J. Chromat.* **443**, 337-342.
- Huberman A. and Aguilar M. B. (1989a) A neuropeptide with molt-inhibiting hormone activity from the sinus gland of the Mexican crayfish *Procambarus bowvieri* (Ortmann). *Comp. Biochem. Physiol.* **93B**, 299-305.
- Huberman A., Hernández-Arana A., Aguilar M. B. and Rojo-Dominguez A. (1989b) Secondary structure of a crustacean neuropeptide hormone family by means of CD. *Peptides* **10**, 1113-1115.
- Hunt D. F., Alexander J. E., McCormack A. L., Martino P. A., Michel H., Shabanowitz J., Sherman N., Moseley M. A., Jorgenson J. W. and Tomer K. B. (1991) Mass spectrometric methods for protein and peptide sequence analysis. In *Techniques in Protein Chemistry—II* (Edited by Villafranca J. J.), pp. 441-454. Academic Press, New York.
- Jugan P. (1985) Régulation de la croissance ovocytaire chez le crustacé *Macrobrachium rosenbergii* (de Man). Démonstration d'une endocytose par récepteurs et approche du mode d'action de la neurohormone inhibitrice de la vitellogénèse, pp. 1-68. Thèse Doctorat de l'Université Pierre et Marie Curie, Paris.
- Jugan P. and Soyez D. (1985) Démonstration *in vitro* de l'inhibition de l'endocytose ovocytaire par un extrait de glandes du sinus chez la crevette *Macrobrachium rosenbergii*. *C.r. Acad. Sci., Paris* **300**, 705-709.
- Kegel G., Reichwein B., Weese S., Gaus G., Peter-Katalinić J. and Keller R. (1989) Amino acid sequence of the crustacean hyperglycemic hormone (CHH) from the shore crab, *Carcinus maenas*. *FEBS Lett.* **255**, 10-14.
- Kleinholz L. H. (1985) Biochemistry of crustacean hormones. In *The Biology of Crustacea* (Edited by Bliss D. E. and Mantel L. H.), Vol. 9, pp. 463-522. Academic Press, New York.
- Lui C. W. and O'Connor J. D. (1976) Biosynthesis of lipovitellin by the crustacean ovary. II. Characterization and *in vitro* incorporation of amino acids into purified subunits. *J. exp. Zool.* **195**, 41-52.
- Lui C. W. and O'Connor J. D. (1977) Biosynthesis of lipovitellin. III. The incorporation of labeled amino acids into purified lipovitellin of the crab, *Pachygrapsus crassipes*. *J. exp. Zool.* **199**, 105-108.
- Matsubara H. and Sasaki R. M. (1969) High recovery of tryptophan from acid hydrolysates of proteins. *Biochem. biophys. Res. Commun.* **35**, 175-181.
- Panouse J. B. (1943) Influence de l'ablation du pédoncule oculaire sur la croissance de l'ovaire chez la crevette *Leander serratus*. *C.r. Acad. Sci., Paris* **217**, 553-555.
- Quackenbush L. S. (1986) Crustacean endocrinology: a review. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **43**, 2271-2282.
- Quackenbush L. S. (1989) Vitellogenesis in the shrimp, *Penaeus vannamei*: *in vitro* studies of the isolated hepatopancreas and ovary. *Comp. Biochem. Physiol.* **94B**, 253-261.
- Quackenbush L. S. (1991) Regulation of vitellogenesis in penaeid shrimp. In *Frontiers in Shrimp Research* (Edited by DeLoach A., Dougherty W. J. and Davidson M.), pp. 125-140. Elsevier Press, Amsterdam.
- Quackenbush L. S. and Herrnkind W. F. (1981) Regulation of molt and gonadal development in the spiny lobster, *Panulirus argus* (Crustacea: Palinuridae): effect of eyestalk ablation. *Comp. Biochem. Physiol.* **69A**, 523-527.
- Quackenbush L. S. and Keeley L. L. (1988) Regulation of vitellogenesis in the fiddler crab, *Uca pugnator*. *Biol. Bull.* **175**, 321-331.
- Soyez D., Le Caer J. P., Noel P. Y. and Rossier J. (1991) Primary structure of two isoforms of the vitellogenesis inhibiting hormone from the lobster *Homarus americanus*. *Neuropeptides* **20**, 25-32.

- Tarr G. E. (1986) Manual Edman sequencing system. In *Methods of Protein Microcharacterization* (Edited by Shively J. E.), pp. 155-194. The Humana Press, Clifton, NJ.
- Tensen C. P., De Kleijn D. P. V. and Van Herp F. (1991) Cloning and sequence analysis of cDNA encoding two crustacean hyperglycemic hormones from the lobster *Homarus americanus*. *Eur. J. Biochem.* **200**, 103-106.
- Van Deijnen J. E. (1986) Structural and biochemical investigations into the neuroendocrine system of the optic ganglia of decapod crustacea, pp. 105-176. Thesis. Faculty of Science, Catholic University, Nijmegen.
- Van Harreveld A. (1936) A physiological solution for freshwater crustaceans. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* **34**, 428-432.
- Wallace R. A., Walker S. L. and Hauschka P. V. (1967) Crustacean lipovitellin. Isolation and characterization of the major high density lipoprotein from eggs of decapoda. *Biochemistry* **6**, 1582-1590.
- Webster S. G. (1986) Neurohormonal control of ecdysteroid biosynthesis by *Carcinus maenas* Y-organs *in vitro*, and preliminary characterisation of the putative moult-inhibiting hormone (MIH). *Gen. comp. Endocr.* **61**, 237-247.
- Webster S. G. (1991) Amino acid sequence of putative moult-inhibiting hormone from the crab *Carcinus maenas*. *Proc. R. Soc. Lond. B* **244**, 247-252.
- Woods K. R. and Wang K.-T. (1967) Separation of dansyl-amino acids by polyamide chromatography. *Biochim. biophys. Acta* **133**, 369-370.

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

ALBERTO HUBERMAN,*¹ MANUEL B. AGUILAR,* KEITH BREW,†
JEFFREY SHABANOWITZ‡ AND DONALD F. HUNT‡

*Department of Biochemistry, Instituto Nacional de la Nutrición "S. Zubirán,"
Vasco de Quiroga 15, Tlalpan, Mexico City 14000, Mexico,

†University of Miami School of Medicine, Department of Biochemistry and Molecular Biology,
R. Bunn Gautier Bldg., 1011 NW 15th Street, Miami, FL 33136, and

‡Department of Chemistry, University of Virginia, Charlottesville, VA 22901

Received 14 May 1992

HUBERMAN, A., M. B. AGUILAR, K. BREW, J. SHABANOWITZ AND D. F. HUNT. 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(1) 7-16, 1993.—The amino acid sequence of this neuropeptide was elucidated by means of a combined approach of enzymatic digestions, manual and automatic Edman degradations, and mass spectrometry. It is a 72 residue peptide (molecular mass 8388 Da), with six cysteines forming three disulfide bridges connecting residues 7-43, 23-39, and 26-52, with blocked N- and C-termini, and lacking the amino acids histidine, methionine, and tryptophan. The CHH-I of *Procambarus bouvieri* is compared with the other known CHHs from *Orconectes limosus* (98.6% identity), *Homarus americanus* isomorph A (83.3% identity), *Homarus americanus* isomorph B (79.2% identity), and *Carcinus maenas* (61.1% identity).

Crustacean hyperglycemic hormone	Neuropeptide	Isomorph	Sequence	<i>Procambarus bouvieri</i>	Crayfish
----------------------------------	--------------	----------	----------	-----------------------------	----------

THE sinus gland (SG) of the crustacean eyestalk (ES) is a neurohemal organ constituted by bulbous axonic terminals of neurosecretory cell somata that are clustered together in the medulla terminalis X-organ (MTXO) (7,37). The SG-MTXO neurosecretory system is a major integrating center. It regulates many important physiological processes by releasing into the hemolymph, by a process of exocytosis, a variety of hormonal factors involved in the control, among others, of external color changes, molt cycle, gonadal development, light adaptation, and glucose levels in the hemolymph (27).

The SG of the Mexican crayfish *Procambarus bouvieri* contains a family of four neuropeptide hormones that have been purified and characterized in our laboratory (2,13-17). They are distinguished by their hydrophobicity, blocked N-terminus, mo-

lecular mass close to 8300-8400 Da, 72 amino acid residues, six cysteines forming three disulfide bridges, and the lack of histidine, methionine, and tryptophan. Two of these peptides have hyperglycemic activity in both intact and destalked animals and they are present in a 3:1 proportion (CHH-I:CHH-II) (13,14).

This hyperglycemic activity was first described 48 years ago, when a diabetogenic factor was found in ES crude extracts of the crab *Callinectes sapidus* (1). This factor, which became known as the crustacean hyperglycemic hormone (CHH) (29), has been subjected to various physiological and biochemical studies that have been reviewed recently (24,26). The presence of more than one hyperglycemic molecule has been demonstrated in most of the crustacean species studied by means of

¹ Requests for reprints should be addressed to Dr. Alberto Huberman, Head, Department of Biochemistry, Instituto Nacional de la Nutrición, "S. Zubirán," Vasco de Quiroga 15, Tlalpan, México, D.F. 14000, Mexico.

gel filtration (GFC), ion-exchange chromatography (IEC), polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE), or reversed-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) (4,13,20,23,25,28,35,36,41,43-45,48,51,52). In addition to its role in the regulation of circulating glucose, CHH has a secretagogue action over the amylase released from the midgut gland (40).

The amino acid sequences of CHHs from several species have been determined (21,22,47). The homology between any pair of them ranges from 61% to 81%. Furthermore, they do not show significant homology to any known peptide, except to the molt-inhibiting hormone (8,53) and the vitellogenesis-inhibiting hormone (42), also from decapod crustaceans. With them, CHHs constitute a novel neuropeptide family that, so far, has no counterpart in any other organism.

We report here the complete amino acid sequence of the most abundant CHH isomorph (CHH-I) of the crayfish, *Procambarus bouvieri*, and compare it with the other CHHs known at present.

METHOD

Animal Maintenance and Purification of Sinus Gland Extracts

Adult crayfish were obtained from local fishermen in Uruapan, State of Michoacán. The procedures for keeping them at the laboratory, and for ES ablation (under cold anesthesia) and storage, SG dissection, crude extract (CE) preparation, and purification of crustacean hormones by means of RP-HPLC on a μ Bondapak-Phenyl column (Waters, Milford, MA), have been described (2,13-16).

The average yield of pure CHH-I was 55-60 ng/SG as determined by means of the 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) method (12).

Reagents and Glassware

All reagents were of analytical or sequencing grade. The RP-HPLC solvents were from Fisher Scientific (Springfield, NJ). Reagents for the automatic Edman degradation were purchased from Applied Biosystems (Foster City, CA). Double-distilled water was further purified by passing through a Sybron-Barnstead (Boston, MA) NANOpure-A system, and only water with a resistivity above 10 M Ω /cm was used. *N*-Ethylmorpholine (NEM, Pierce, Rockford, IL), 4-vinylpyridine (VP, Sigma), and triethylamine (TEA, Fisher) were distilled. The TNBS and 1,2-cyclohexanedione (CHD, Sigma) were recrystallized. Glassware was calcined at 550°C for 4 h.

Chemical Modification of Residues

Cystine residues were reduced with dithiothreitol after dissolving native CHH-I in 0.1 M Tris(hydroxymethyl)amino-methane (Sigma), containing 1 mM ethylenediaminetetraacetic acid, disodium salt (EDTA, Sigma), pH 8.3, or in 0.5 M NEM-acetate, pH 8.3, and alkylated with iodoacetic acid (Sigma) (3) or VP (46), respectively. The carboxymethylated (CM-CHH-I) and pyridylethylated (PE-CHH-I) derivatives were purified by means of RP-HPLC on a Novapak C18 column (Waters) as reported (15). Arginine residues in PE-CHH-I were irreversibly modified with CHD (49). The reaction product with CHD (CHD-PE-CHH-I) was purified as described above.

End-Group Analysis

The 1-dimethylaminonaphthalene-5-sulfonyl (dansyl) chloride (Sigma) method (10) was used as described (3). The dansyl

derivatives (DNS-aa) of the amino acids were identified by means of thin-layer chromatography (TLC) on 3 \times 3 cm polyamide-coated aluminum sheets (Schleicher & Schuell, Keene, NH) employing solvent system I (1.5%, v/v, aqueous formic acid), II (toluene:acetic acid, 10:1, v/v), and III (ethyl acetate:methanol:acetic acid, 20:1:1, by vol.) (54). As the basic DNS-aa give one coincident spot after the three previous steps, a fourth step consisting in solvent system IV (50 mM Na₂PO₄:ethanol, 3:1, v/v) (11) was applied in order to identify DNS-Arg, ϵ -DNS-Lys, and DNS-His.

Amino Acid Analysis

CHH-I. Acid hydrolysis was carried out in vacuo at 110°C for 72 h in 6 M HCl containing 0.1% (w/v) phenol and 0.05% (w/v) sodium dithiodipropionate (DTDP, Aldrich, Milwaukee, WI) (5). Amino acid standard H mixture (Pierce) was processed identically. Precolumn derivatization with phenylisothiocyanate (Pierce), and RP-HPLC quantitation of the phenylthiocarbonyl amino acid derivatives (PTC-aa) on two Ultrasphere-ODS columns (Beckman Instruments, San Ramon, CA) in tandem, were conducted essentially as described (6), with only minor adjustments (2).

Enzymatic fragments. Qualitative amino acid composition was determined in fragments derived from digestions with trypsin, chymotrypsin, and protease V8 as follows. Acid hydrolysis was carried out under nitrogen at 145°C for 1 h in 6 M HCl containing 2% (v/v) thioglycolic acid (Sigma) (33). Identification of the amino acid residues was performed by means of the dansyl chloride method and TLC (see End-Group Analysis). Quantitative analysis by means of RP-HPLC was performed as described for CHH-I, after hydrolysis in constant boiling HCl containing 0.1% (w/v) phenol at 110°C for 24 h, under nitrogen.

Enzymatic Cleavages

Trypsin [from bovine pancreas; *N*-tosyl-L-phenylalanyl chloromethyl ketone (TPCK)-treated] (Sigma). Carboxymethylated CHH-I, PE-CHH-I, and CHD-PE-CHH-I were suspended in 0.1 M NH₄HCO₃, pH 8.3, and incubated at 37°C for 1 h with an enzyme:substrate ratio of 1:25 (w/w). The resulting tryptic peptides (TPs) were purified by means of RP-HPLC on an Ultrasphere-ODS column (Beckman), essentially as reported (15,16). Native CHH-I was dissolved in 0.1 M Tris-HCl containing 5% (v/v) acetonitrile (MeCN), and incubated at 37°C for 24 h at an enzyme:substrate ratio of 1:20 (w/w). For the determination of the disulfide bridges, the tryptic peptides of native CHH-I were purified on a Novapak C18 column.

α -*Chymotrypsin* [from bovine pancreas; *N*-tosyl-L-lysyl chloromethyl ketone (TLCK)-treated] (Sigma). Pyridylethylated CHH-I was dissolved in 0.1 M NH₄CO₃, pH 8.0, containing 1 mM CaCl₂ and 0.01% (w/v) thiodiglycol, and incubated at 30°C for 48 h with an enzyme:substrate ratio of 1:50 (w/w). The resulting chymotryptic peptides (QTPs) were purified as described for TPs, on a Novapak C18 column.

Protease V8 [from *Staphylococcus aureus*, Sigma]. Pyridylethylated CHH-I or tryptic peptides T4, T5, and T7 were dissolved in 50 mM KH₂PO₄, pH 7.8, and incubated at 37°C for 72 h at an enzyme:substrate ratio of 1:15 (w/w). The fragments produced (V8Ps) were purified as stated for the TPs.

Pyroglutamate aminopeptidase (PGAP, *Bacillus amyloliquefaciens*, Sigma). Pyridylethylated CHH-I and tryptic peptides T4 and T6 were dissolved in 0.1 M K₂HPO₄, 0.01 M EDTA \cdot 4Na, 0.01 M β -mercaptoethanol, pH 8.0, and incu-

TABLE I
AMINO ACID COMPOSITION OF CHH-I AND OF THE SEQUENCED TRYPTIC PEPTIDES

Res.	Anal.*	Comp.†	T0	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T0-T7‡	CHH-I§
Asx	9.96	10	1.08	0.93			0.91	2.16	2.51	4.64	11-13	8 + 3
Glx	6.81	7					1.98	1.11	1.38	3.46	7-8	2 + 5
Ser	2.22	2							1.18	1.21	2	2
Gly	2.50	2-3		0.95						1.18	2	2
Arg	5.13	5	0.75	1.00	1.00			1.00	1.00		5	5
Thr	2.50	2-3			1.71					0.97	3	3
Ala	4.10	4			0.93	1.05	1.02		1.03		4	4
Pro	1.13	1			1.01						1	1
Tyr	5.95	6		1.01	0.93			1.72	0.87	0.93	6	6
Val	7.87	8			0.91		0.92	0.92	1.23	3.22	7	8
Ile	4.42	4-5		0.74		1.00				2.00	4	4
Leu	6.83	7	0.90					1.21		3.99	6	6
Phe	3.50	3-4				0.96	0.80		0.68		3	3
Lys†	3.32	3	1		1	1	1				4	4
Cys†	5.86	6			1		1	1	1	1	5	6
Total		70-74	4	5	9	4	8	9	10	21-23	70-73	72

* From the amino acid analysis (hydrolysis at 100°C for 72 h in the presence of DTDP).

† Nearest integer from the amino acid analysis.

‡ Sum of the nearest integers of all the tryptic peptides.

§ Deduced from the sequence. Glu + Gln and Asp + Asn are listed separately in this order.

¶ Reasonably accurate quantitation by means of RP-HPLC was hindered by coelution with by-products of the Edman chemistry. Nevertheless, their presence was unambiguously assessed (see text and Table 2).

bated at 37°C for 4 h with an enzyme:substrate ratio of 1:1 (w/w). The resulting peptides were purified as described previously.

Carboxypeptidase B [CPB, from hog pancreas; diisopropylfluorophosphate (DFP)-treated] (Sigma). Tryptic peptides T3 and T4 were dissolved in 0.5 M NEM-acetate, pH 8.3, and incubated at 37°C for 1 h at an enzyme:substrate ratio of 1:25 (w/w). The released amino acids were identified by means of the dansyl chloride method and TLC as described under End-Group Analysis. An extraction with ethyl acetate was done before TLC.

Carboxypeptidase Y (CPY, from baker's yeast, Sigma). Peptide T4/V8-1, resulting from digestion of T4 with protease V8, was dissolved in 0.44 M Na₃PO₄, pH 6.75, and incubated at 37°C for 40 h with an enzyme:substrate ratio of 1:28 (w/w). The released amino acids were analyzed as stated for CPB.

Microsequencing

A film method with polybrene (Sigma) (46) for manual Edman microsequencing was conducted with only minor adjustments. The phenylthiohydantoin derivatives (PTH-aa) were identified by means of RP-HPLC on two Ultrasphere-ODS columns (Beckman) in tandem, with an ammonium acetate/acetonitrile elution system (34).

Automatic Edman degradation was performed on an Applied Biosystems 470A Protein Sequencer (Applied Biosystems), updated to pulse-liquid chemistry and fitted with a Model 120A PTH-amino acid analyzer and a Model 900A Data Analysis Module.

Mass Spectrometry

Mass spectra were recorded on a TSQ-70 triple quadrupole instrument (Finnigan-MAT, San Jose, CA) equipped for elec-

troscopy ionization (18). Samples were dissolved in 0.5% (v/v) acetic acid and an aliquot (5-10 pmol) was then injected into the electrospray ionization source from a syringe pump. The C-terminal decapeptide obtained from digestion with Asp-N (Boehringer Mannheim, Germany) was converted to the corresponding methyl ester following the protocol described (19).

Sequence Comparison Search

The FASTA program was used on the PIR on-line system of the University of Miami School of Medicine (38). The complete set of the National Biomedical Research Foundation (NBRF) Protein Library and the GENPEPT Protein Data Bank were searched.

RESULTS

Mass Spectrometry

Under electrospray ionization conditions CHH-I adds six and seven protons and affords signals centered at m/z 1396.5 and 1197.2. The average mass of the (M + H)⁺ ion calculated from these values is 8374.

Amino Acid Composition

When the value for M_r (8373) derived from mass spectrometry was used to calculate the amino acid composition of CHH-I, 70 to 74 amino acid residues were accounted for (Table 1). The hydrolysis method employed allows the determination of cysteine plus cystine residues but it destroys tryptophan residues and deamidates asparagine and glutamine residues to aspartic and glutamic acids, respectively. Neither methionine nor histidine residues were observed, confirming previous studies (13-15) (Fig. 1).

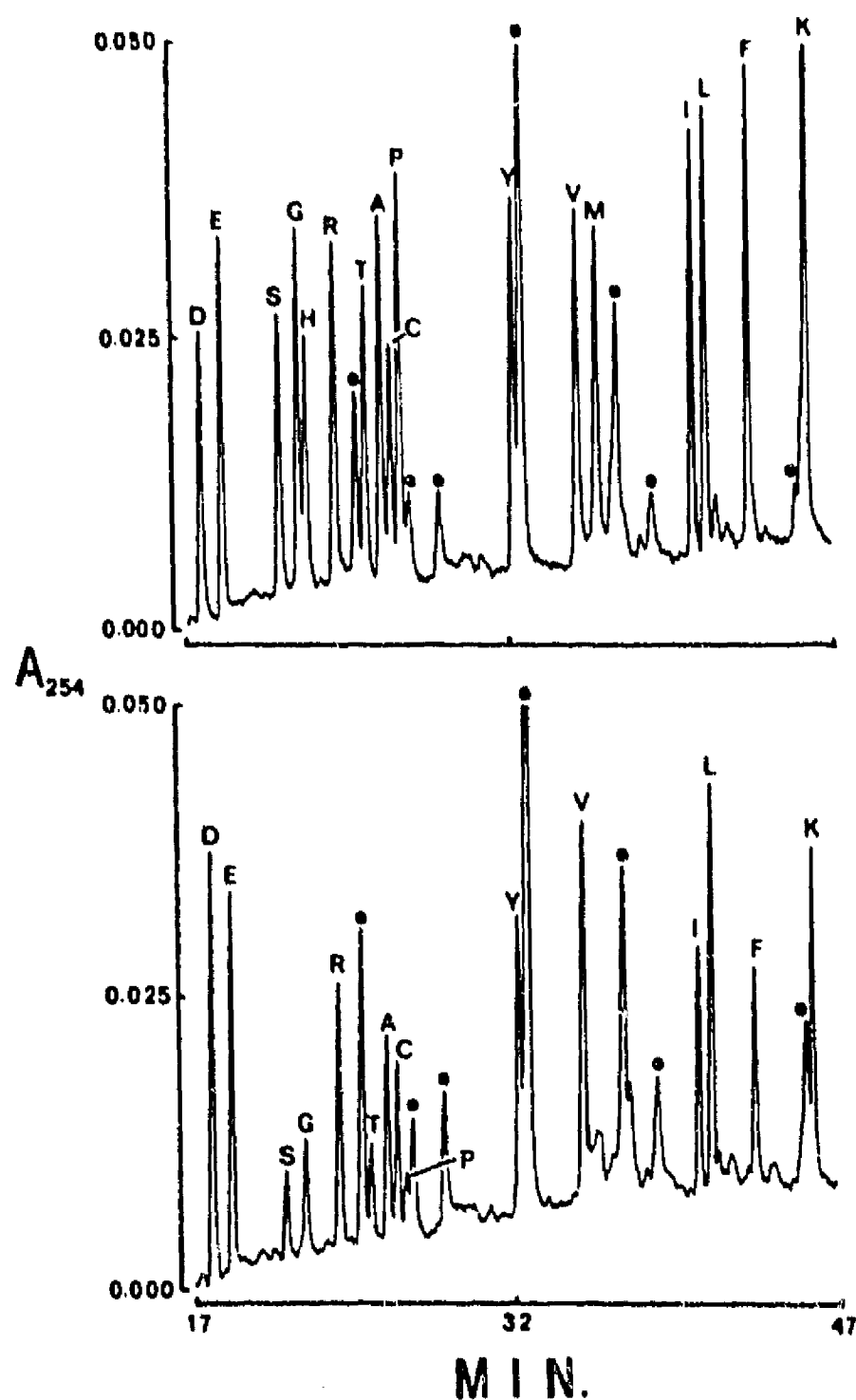


FIG. 1. Amino acid analysis of CHH-I by means of RP-HPLC. Native CHH (approximately 2600 pmol) and an amino acid standard mixture (12,500 pmol of each amino acid) were hydrolyzed in vacuo with 6 M HCl containing 0.1% (w/v) phenol and 0.05% (w/v) sodium DTDIP for 72 h at 110°C and derivatized with phenylisothiocyanate. The elution profiles correspond to the PTC-aa of CHH-I (approximately 85 pmol, bottom) and of the amino acid standard mixture (200 pmol, top). The column consisted of one C18 Guard-Pack cartridge (Waters), one precolumn (42 × 4.6 mm i.d., 5 μm particle size, Beckman), and two Ultrasphere-ODS columns (250 × 4.6 mm i.d., 5 μm particle size, Beckman) in tandem. Solvent A: 140 mM sodium acetate containing 0.05% (v/v) TEA adjusted to pH 4.5 with acetic acid. Solvent B: 60% (v/v) aqueous MeCN. A linear gradient from 15% B to 62% B was run for 29 min. Flow rate: 1.2 ml/min. Temperature: 45°C. The PTC-aa were monitored at 254 nm. The one-letter code was used to name the amino acids. The main by-products of the reaction are indicated by a full dot (●).

Enzymatic Fragments and Analysis

The RP-HPLC profile of the fragments generated by trypsin during a 1-h digestion is depicted in Fig. 2. All of the theoretical peptides (T0 to T7) were observed, plus four fragments (T2a, T2b, T6a, and T6b) resulting from unexpected cleavages of T2 and T6, and three peptides (T0', T5', and T5'') that resulted from incomplete proteolysis of peptides T0 and T5.

The amino acid composition and *N*-terminus of some of these peptides are shown in Tables 1 and 2. As can be easily seen, the

Tps were discriminated on the basis of their amino acid composition and *N*-terminus.

The chromatograms of other kinds of enzymatic fragments that proved useful during the study, namely peptides T-R, V8, QT1, QT2, and QT3, are shown (Figs. 3-5). The data of their compositional and *N*-terminal analysis are presented in Table 2.

Sequence of the Tryptic Peptides

No special problems were found during either the manual or the automated Edman degradations. The observed partial degree of deamidation of glutamine or asparagine did not preclude the identification of acidic and amidated residues unequivocally. A small amount of the previous residue was generally observed in each cycle. As an example of the manual microsequencing, the complete sequence of a medium-sized tryptic peptide (T2) is depicted in Fig. 6.

N-terminal sequence. When PE-CHH-I was digested with PGAP and analyzed for *N*-terminus, DNS-Val was observed, thus establishing T4 as the *N*-terminal peptide. All of the seven remaining residues in T4 after treatment with PGAP were determined by means of the sequencer. The sequence had been previously deduced from:

1. compositional and *N*-terminal analysis, and enzyme specificity, and
2. digestion with CPY and analysis of two fragments (T4/V8-1 and T4/V8-2) generated by digestion with V8 (Fig. 7).

T7. Both manual and automated microsequencing allowed the identification of the five residues that comprise this peptide (positions 9-13 in CHH-I).

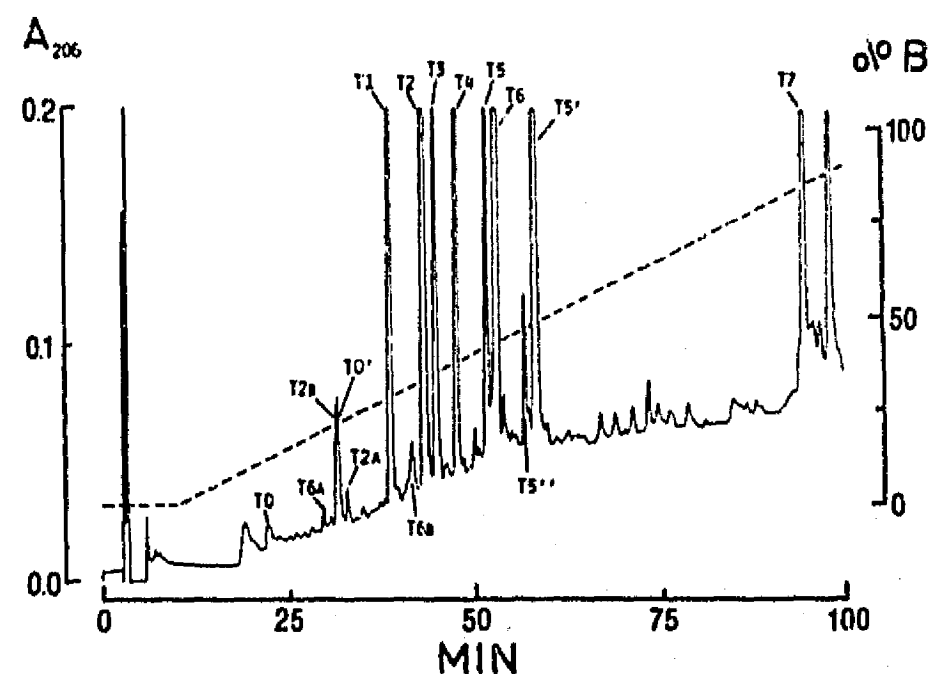


FIG. 2. Tryptic peptide map of CHH-I. Approximately 10 nmol of reduced and carboxymethylated protein was digested for 1 h as described in the Method section. The product was chromatographed in an Ultrasphere-ODS column (250 × 4.6 mm i.d., 5 μm particle size, Beckman) provided with a precolumn (42 × 4.6 mm i.d., 5 μm particle size, Beckman). Solvent A: 0.1% (w/v) aqueous trifluoroacetic acid (TFA). Solvent B: 0.1% (w/v) TFA in 60% (v/v) aqueous acetonitrile. A linear gradient (dashed line) from 0% B to 100% B was developed in 100 min after an isocratic step at 0% B for 10 min. Temperature: 30°C. Flow rate: 1 ml/min. The absorbance of the eluate was monitored at 206 nm. Expected peptides are designated by capital letters and numbered in the order of elution (see Table 1 and Fig. 7), whereas fragments resulting from unexpected cleavages are indicated by the corresponding tryptic peptide number followed by the letters A or B. Peptides T0', T5', and T5'' resulted from incomplete digestion of peptides T0 and T5.

TABLE 2
QUALITATIVE AMINO ACID COMPOSITION AND N-TERMINUS OF
ENZYMATIC FRAGMENTS FROM CHH-I*

Fragment	Composition
T0'	Lys (Leu, Asx, Arg)
T1	Gly (Ile, Tyr, Asx, Arg)
T2	Lys (Pro, Tyr, Val, Ala, Thr, Cys, Arg)
T3	Ala (Ile, Phe, Lys)
T4†	pGlu (Val, Phe, Asx, Glx, Ala, Cys, Lys)
T5	Val (Cys, Glx, Asx, Tyr, Leu, Arg)
T6†	pGlu (Asx, Cys, Tyr, Ala, Ser, Val, Phe, Arg)
T7	Glx (Cys, Leu, Asx, Ile, Val, Glx, Tyr, Ser, Gly, Thr)
T5'	Lys (Cys, Glx, Asx, Tyr, Leu, Arg, Val)
T-R	Gly (Ile, Tyr, Asx, Arg, Ala, Phe, Lys)
QT1	Arg (Lys, Pro, Tyr)
QT2	Arg (Glx, Cys, Leu, Asx, Ile, Val, Tyr)
QT3	Lys (Leu, Asx, Arg, Val, Cys, Glx, Tyr)
V8†	pGlu (Ala, Cys, Lys, Gly, Ile, Tyr, Asx)

* N-terminal residues are outside the parentheses.

† Since no derivatives were observed by means of the dansyl chloride method and these peptides could contain Gln residues, the presence of pyroglutamic acid as the N-terminus was attributed to Gln cyclization in T6 and V8. In the case of T4, pyroglutamic acid is originally present as a posttranslational modification.

T3. The four residues (positions 14–17 in CHH-I) were sequenced by means of the automated procedure. Confirmation was obtained from compositional and N-terminal analysis, and from digestion with CPB and analysis of the released amino acids.

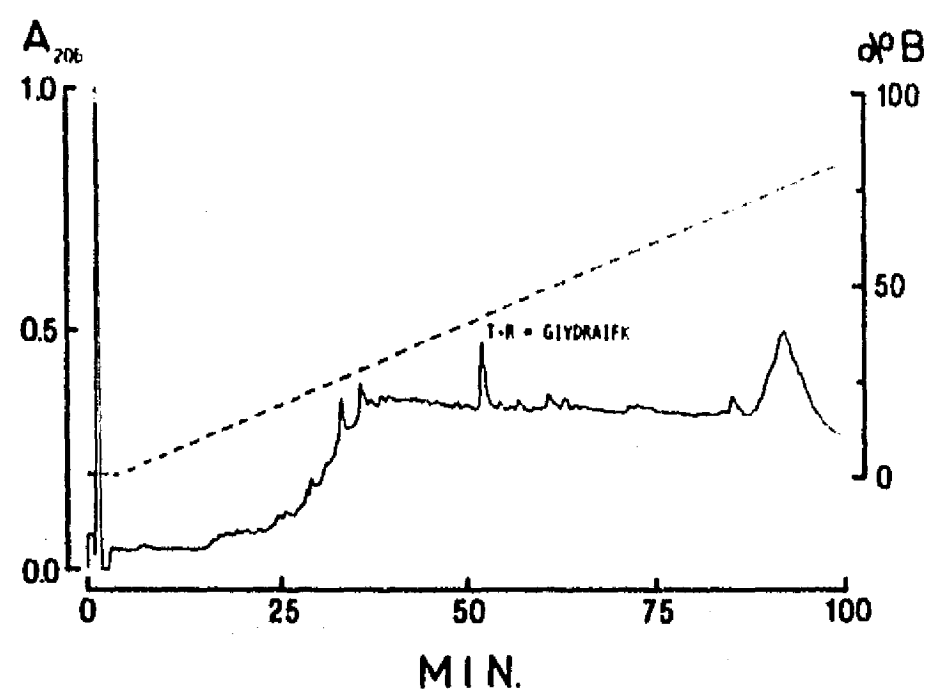


FIG. 3. Elution profile on RP-HPLC of a 1-h tryptic digestion of approximately 6.8 nmol of CDH-PE-CHH-I. Column: Ultrasphere-ODS (250 × 4.6 mm i.d., 5 μm particle size, Beckman) provided with a pre-column (42 × 4.6 mm i.d., 5 μm particle size, Beckman). Solvent A and B were the same as described in Fig. 2. A linear gradient from 0% B to 100% B was developed in 114 min after an isocratic step at 0% B for 4 min. Flow rate: 1 ml/min. Temperature: 30°C. The absorbance was monitored at 206 nm. Peptide T-R, which on analysis was shown to consist of the tryptic peptides (TPs) T1 + T3, is indicated. The broad peak eluting from 95 to 100 min corresponded, on analysis, to TPs T5 + T2 + T6 + T7.

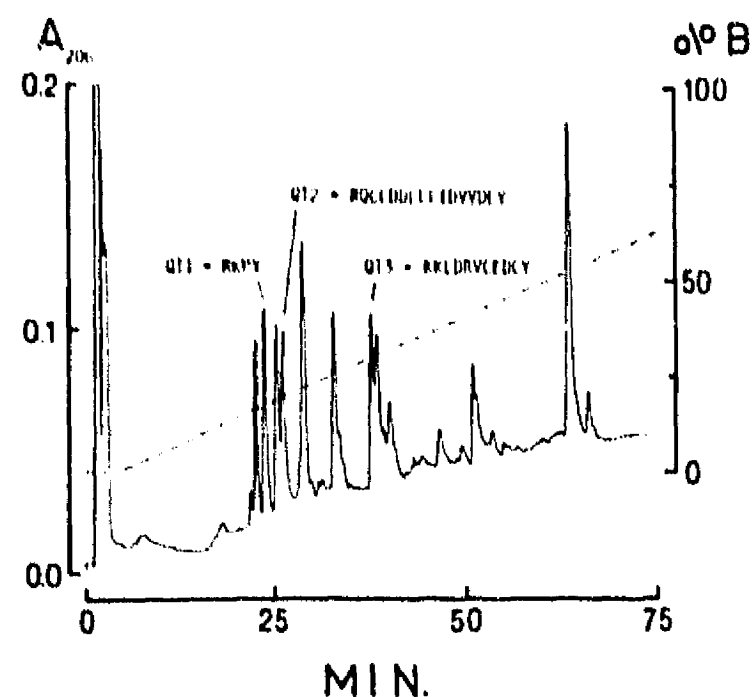


FIG. 4. Peptide map of a 48-h chymotryptic digest of PE-CHH-I (approximately 11.7 nmol). Column: Novapak C18 (150 × 3.9 mm i.d., 5 μm particle size, Waters). Solvents A and B were the same as described in Fig. 2. A linear gradient from 0% B to 69% B was developed in 78 min after an isocratic step at 0% B for 4 min. Flow rate: 1 ml/min at room temperature. The absorbance was monitored at 206 nm. Peptides that provided useful information for the alignment of the tryptic peptides (after N-terminal and compositional analysis) are indicated and described in the order of elution (see Fig. 7).

T5'. Automated degradation determined the order of the 14 residues (positions 18–31 in CHH-I). This fragment produces quantitatively T0' and T5 when it is subjected to longer digestion. The sequences of these peptides were also determined by means of automated degradation. In the case of T0', only three residues could be identified. The fourth residue (Arg) was deduced from the amino acid composition and enzyme specificity.

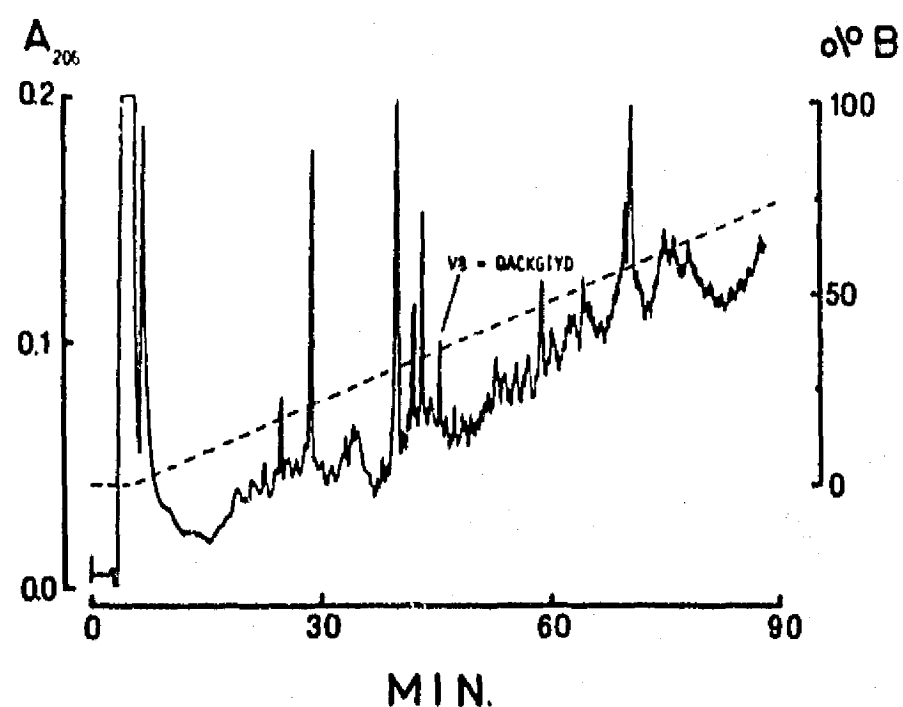


FIG. 5. Elution profile on RP-HPLC of approximately 13 nmol of PE-CHH-I digested by protease V8 for 96 h. Column: Ultrasphere-ODS (250 × 4.6 mm i.d., 5 μm particle size, Beckman) provided with a pre-column (42 × 4.6 mm i.d., 5 μm particle size, Beckman). Solvents A and B were as described in Fig. 2. A linear gradient from 0% B to 87% B was developed in 100 min after an isocratic step at 0% B for 5 min. Flow rate: 1 ml/min. Temperature: 30°C. The absorbance was monitored at 206 nm. Peptide V8, which on analysis was shown to consist of four residues each from TPs T4 and T1, is indicated.

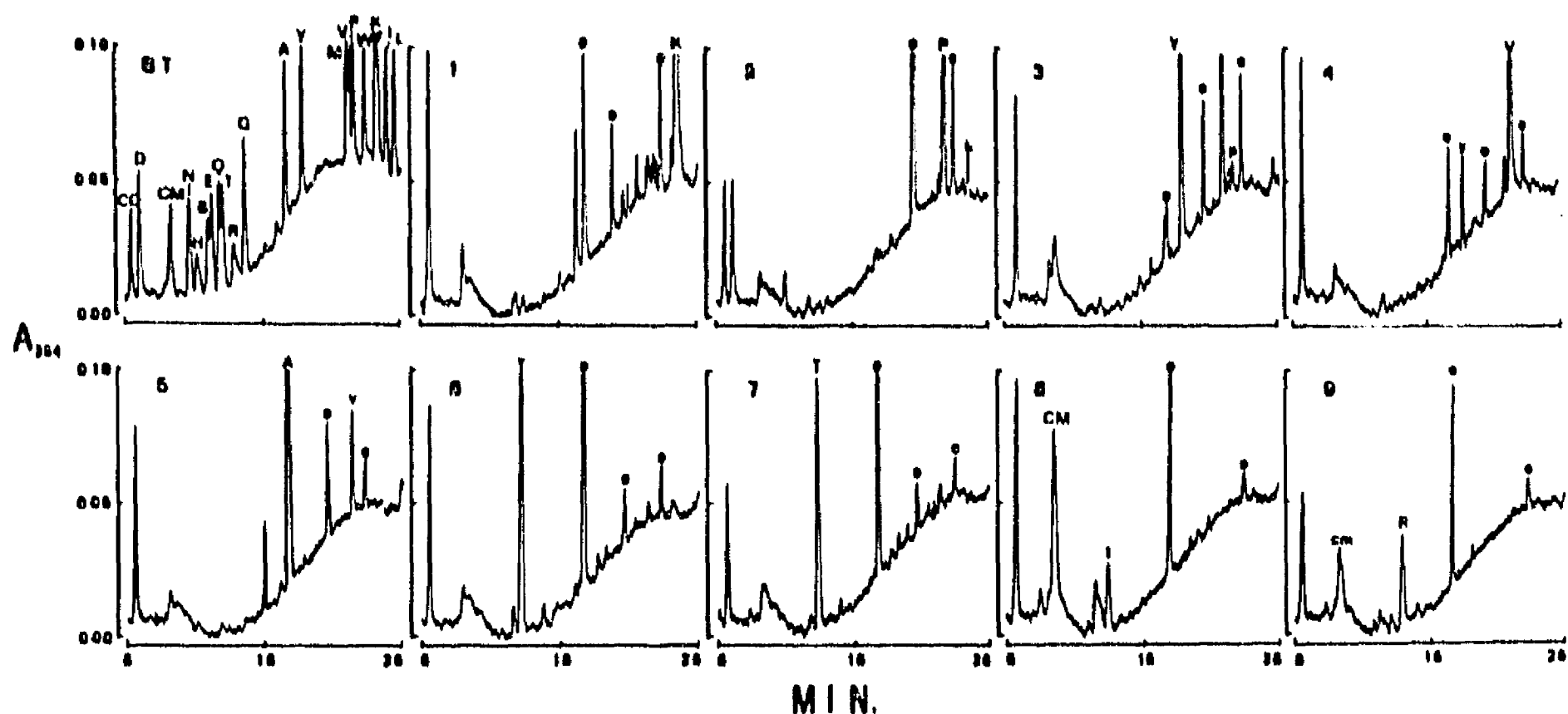


FIG. 6. Manual microsequencing of approximately 1.7 nmol of the tryptic peptide T2. SD = RP-HPLC chromatography of a standard mixture of PTH-amino acid derivatives (100 pmol each). 1 to 9 = cycles 1 to 9 from approximately 680 pmol of T2. Column: one C18 Guard-Pack (Waters), one C18 precolumn (42 × 4.6 mm i.d., 5 μm particle size, Beckman), and two Ultrasphere-ODS (250 × 4.6 i.d., 5 μm particle size, Beckman) in tandem. Solvent A: 25.6 mM ammonium acetate containing 10% MeCN, pH 4.5. Solvent B: 25.6 mM ammonium acetate containing 90% MeCN, pH 4.5. A linear gradient from 15% B to 56% B was developed in 12 min after an isocratic step at 15% B for 5 min. Then, another isocratic step at 56% B was run for 10 min. Flow rate: 1.2 ml/min. Temperature: 45°C. PTH-aa were monitored at 254 nm. One-letter code was used to designate amino acids. CO = cysteine acid, CM = carboxymethyl cysteine. Small amounts of the previous PTH-aa are indicated by lower case letters. The main by-products of the Edman chemistry under the conditions employed are indicated by a full dot (●).

T2. All of the nine residues (positions 32–40 in CHH-I) were identified by means of manual microsequencing. The automated procedure confirmed the first eight residues (Fig. 6).

T6. Eight residues (positions 42–48 in CHH-I) out of the nine remaining in T6 after treatment with PGAP were identified by means of manual sequencing. The first (Gln 41) and the tenth (Arg 50) residues were deduced from the amino acid composition and enzyme specificity.

T7. The first 16 residues (positions 51–66 in CHH-I) were determined by means of the sequencer. The manual sequencing of two of its fragments (peptides T7/v8-2 and T7/V8-3) generated by digestion with protease V8 confirmed positions 56–62 and 65–68.

C-terminal sequence. One decapeptide generated by means of the Asp-N protease was sequenced by means of tandem mass spectrometry. The $(M + H)^+$ ion for the fragment shifts from m/z 1009 to 1037 when it is converted to the corresponding methyl ester. Since this peptide contains two acidic residues and incorporates only two methyl groups, it was concluded that it is amidated.

It should be noted that besides establishing the sequence of the C-terminal decapeptide by means of mass spectrometry, the sequence of the first 50 residues of CHH-I was also confirmed by this technique. It should also be remarked that data from protein chemistry (end-group analysis, amino acid composition, Edman degradation) complemented the data from mass spectrometry, which, at present, cannot distinguish between residues Ile and Leu, and between Gln and Lys.

Alignment

The fact that the TPs could be discriminated on the basis of their amino acid composition and N-terminus allowed us to

establish the connections between them, by using only qualitative compositional and end-group analysis of one TP (T-R, connection T1/T3, Fig. 3), three QTPs (QT3, connection T3/T0/T5; QT1, connection T5/T2; and QT2, connection T6/T7, Fig. 4), and one V8P (V8, connection T4/T1, Fig. 5) (see also Table 2).

These data and the identification of Val as the N-terminus of CHH-I after treatment with PGAP, and the subsequent assignment of T4 as the N-terminal TP, implicated the order T4/T1/T3/T0/T5, because peptide T5', obtained during a short-term digestion, was shown to consist of T0' plus T5 in this order (Figs. 2 and 7).

Although QT1 could originate from connection T5/T2 or T6/T2 and QT2 from connection T6/T7 or T5/T7, the final alignment was established when junction T5/T7 was ruled out because T6 had to be included in the sequence, and T7 had been demonstrated to be the C-terminal fragment. Thus, QT2 was deduced to originate from a T6/T7 linkage, which in its turn ruled out connection T6/T2 and defined the complete order of the TPs as T4/T1/T3/T0/T5/T2/T6/T7 (Fig. 7).

Disulfide Bridges

When native CHH-I was digested with trypsin, five major peptides were obtained during the RP-HPLC of the product (Fig. 8). On compositional analysis, they showed to be T0', T1, T3, T4/T6, and T2/T5/T7, in the order of elution.

Since preliminary experiments had shown that T5 could be cut between the fourth (Asp) and the fifth (Cys) residues by digestion with protease V8, peptide T2/T5/T7 was incubated with this enzyme. Two of the five major fragments resolved by means of RP-HPLC were found, by means of N-terminal and compositional analysis, to correspond to T2 plus the first four residues in T5, and to the N-terminal V8P from

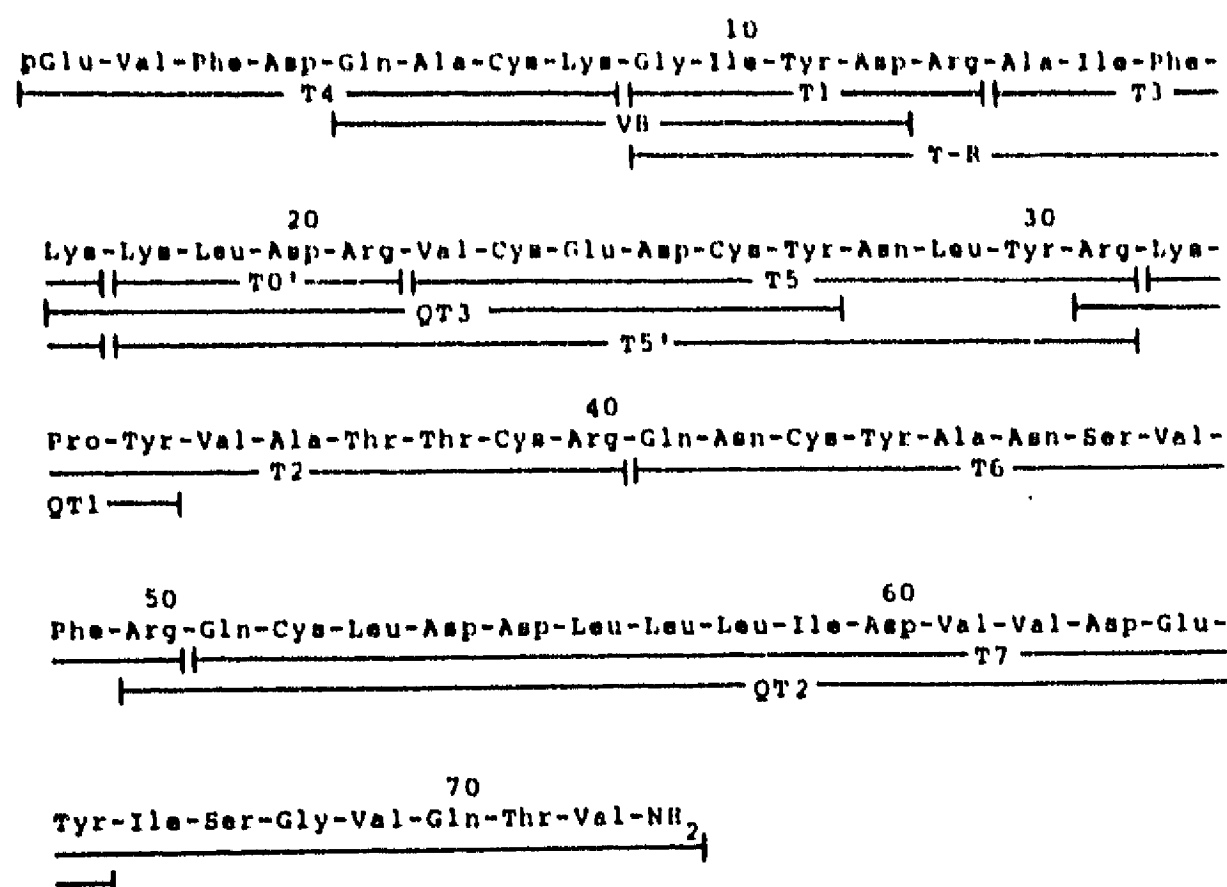


FIG. 7. Primary structure of the most abundant isomorph of the CHH of the Mexican crayfish *Procamburus bouvieri*. The tryptic peptides (T0' to T7), as well as T5', were sequenced. T-R was identified on the basis of *N*-terminal and compositional analysis, as well as V8 and QT1, QT2, and QT3, produced by proteases V8 and chymotrypsin, respectively. For more information about the fragments, see the text, Fig. 2, and Tables 1 and 2.

T7 plus the last six residues in T5, respectively. Thus, disulfide bridges in CHH-I connect Cys residues I-V, II-IV, and III-VI, which correspond to sequence positions 7-43, 23-39, and 26-52, respectively.

Homology Search

When the NBRF and the GENPEPT protein sequence data banks were searched with the sequence of CHH-I using the FASTA program (3), three entries from each data bank showed significant sequence similarity to CHH-I (optimized scores > 308). All other sequences identified in the search had scores that were < 69, which reflected similarities of small sections of sequence from CHH-I with regions from larger proteins. Based on the low scores, as well as the partial nature of the similarities, these were judged to be insignificant. Sequences showing the closest similarities to CHH-I were hyperglycemic hormones A and B from *Homarus americanus*, GENPEPT entries X54842-1 and X54843-1 (83.3% and 79.2% identity, respectively) and residues 67-142 of the crustacean hyperglycemic hormone from *Carcinus maenas*, GENPEPT entry X17596-1 (61.1% identity). A sequence listed in the NBRF data bank (PIR 3:A35897) as molt-inhibiting peptide from *Homarus americanus* appears to correspond to hyperglycemic hormone B from the same organism, since the only differences can probably be attributed to sequencing errors, being two amide assignments and the deletion of one residue at the *C*-terminus in the molt-inhibiting peptide sequence.

DISCUSSION

Our laboratory has been concerned with the study of several neuropeptide hormones from the sinus gland of the Mexican crayfish *Procamburus bouvieri*. Two molecular species of the CHH [CHH-I and CHH-II, so far referred to as CHH-B and

CHH-C, respectively (13-15)], the MIH (16), and the VIH (2) have been purified and characterized biochemically.

Here we report the elucidation of the complete amino acid sequence of the most abundant isomorph of the CHH, CHH-I, which accounts for 64% of the total hyperglycemic activity in the sinus gland (13). Automated Edman degradations of the complete hormone was not attempted in view of the occurrence of a blocked *N*-terminus (13) and of the low yield of deblocked CHH-I after treatment with PGAP. The basic approach was the generation and sequencing of its tryptic peptides. A combined protocol involving *N*-terminal and compositional analysis, manual and automated microsequencing, and mass spectrometry of fragments derived from digestions with specific proteases was followed (Fig. 2).

Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) had indicated the molecular mass (M_r) of CHH-I to be about 6500 Da and the amino acid composition calculated on this basis accounted for 52-53 residues (13,14). However, mass spectrometry rendered a higher value for the calculated ($M + H$)⁺ ion, 8374 Da in this study. This value was used to calculate the amino acid composition on another sample of CHH-I and 70-74 residues were accounted for (Table 1), which agrees very well with the sum of all of the residues found in the sequence (72 residues, 8388 Da; Fig. 7). An underestimated M_r , ranging from about 6000 to 7000 Da, has been found consistently for most of the CHHs in several organisms (*Carcinus maenas*, *Orconectes limosus*, and *Homarus americanus*) when calculated from SDS-PAGE or gel filtration data in comparison with the final sequence (21,22,47).

During the tryptic peptide mapping analysis of CM-CHH-I we found two anomalous cuts. The unexpected cleavage of T2 could be explained as due to the chymotryptic-like activity of ψ -trypsin, an autolysis product of trypsin that may be present in commercial preparations (3), whereas a neighboring-

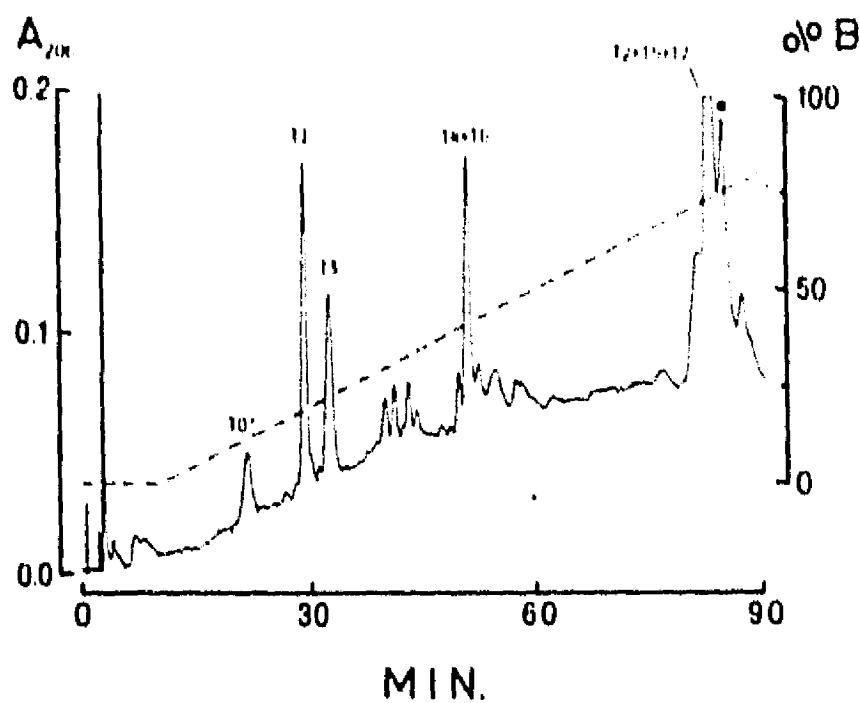


FIG. 8. Peptide map of approximately 4.2 nmol of native CHH-I after a 24-h digestion with trypsin-TPCK, for the determination of the disulfide bridges. Column: Novapak C18 (150 × 3.9 mm i.d., 5 μm particle size, Waters). Solvents A and B were as described in Fig. 2. A linear gradient from 0% B to 100% B was developed in 100 min after an isocratic step at 0% B for 10 min. Flow rate: 1 ml/min at room temperature. The absorbance was monitored at 206 nm. The composition of the indicated peaks is expressed as the content of tryptic peptides obtained from reduced and carboxymethylated CHH (see Fig. 2 and Tables 1 and 2). The peak marked with a full dot (●) corresponded, on analysis, to nondigested CHH-I.

sequence-enhanced deamidation and spontaneous cleavage could be proposed for the anomalous cut observed in T6 (50).

When we conducted either the manual or automated sequencing procedures, no gaps were found. Only C-terminal Arg residues in T0' and T6 could not be observed, but they were deduced with certainty from the amino acid composition and enzyme specificity. This confirmed the previously reported absence of Trp, His, and Met residues in CHH-I (13).

It should be noted that the CHH from a closely related organism, the crayfish *Orconectes limosus*, also lacks all of these residues (21).

No significant sequence homology between the CHH from the green crab *Carcinus maenas* and any known peptide has been found (22). The same result was obtained in the case of the hormone from *Procambarus bouvieri* when investigated by means of a search using the FASTA program (38), with the remarkable exceptions of the CHH from *Carcinus maenas*, the MH from the lobster *Homarus americanus* (8), and two CHH isomorphs from the lobster *H. americanus* (47). The crustacean hyperglycemic hormones and the molt-inhibiting hormone were confirmed to be members of a crustacean neuropeptide family when the sequences of the *Homarus* MH and CHHs were determined and compared to the *Carcinus* CHH. Therefore, the significant homology of *Procambarus* CHH-I with all the above-mentioned hormones was, in fact, expected, and confirmed the proposed membership of *Procambarus* in the neuropeptide family that is at present known only in crustaceans.

When we compared the CHH from *Procambarus* with the CHH from *Carcinus maenas*, with the CHH isomorphs A and B from *Homarus americanus* as deduced from their cDNAs (47), and with the CHH from the crayfish *Orconectes limosus* (21), 61.1, 83.3, 79.2, and 98.6 percent homologies were found, respectively. These values are in agreement with the phylogenetic distances among these organisms (39). The CHHs from the two species of crayfish differ only by one residue (Val 62 in *Procambarus* is Leu in *Orconectes*), whereas there are about fifteen amino acid substitutions (some of them conservative) when compared to the lobster CHHs, and about twice this number with regard to the crab CHH (Fig. 9). The lower homology scores between species belonging to different infraorders are in agreement with studies on the electrophoretic mobility of CHHs on SDS-PAGE (23). The relative degrees of homology are also in accordance with the results of studies about the interspecies hyperglycemic activity. It has been found that the injection of an ES crude extract from a Brachyuran has little or no hyperglycemic activity on an Astacidean, and vice versa (24,28). Also, the CHH from a decapod crustacean (*Carcinus maenas*) has no effect on the

		10		20		30		40
Prb I	pEVFDQ	ACKGI	YDRAI	FKKLD	RVCED	CYNLY	RKPYV	ATTCT
Orl	pEVFDQ	ACKGI	YDRAI	FKKLD	RVCED	CYNLY	RKPYV	ATTCT
Hoa a	pEVFDQ	ACKGV	YDRNL	FKKLD	RVCED	CYNLY	RKPFV	ATTCT
Hoa b	pEVFDQ	ACKGV	YDRNL	<u>FKKLN</u>	RVCED	CYNLY	RKPFV	VTTCR
Cam	<u>pEIIYDT</u>	<u>SCKGV</u>	<u>YDRAL</u>	<u>FNDLE</u>	<u>HVCDD</u>	<u>CYNLY</u>	<u>RTBYV</u>	<u>ABACR</u>
		50		60		70		
Prb I	QNCYA	NSVFR	QCLDD	LLLID	VVDEY	ISGVQ	TV-NH ₂	
Orl	QNCYA	NSVFR	QCLDD	LLLID	VLDEY	ISGVQ	TV-NH ₂	
Hoa a	<u>ENCYS</u>	<u>NWVFR</u>	QCLDD	LLLSD	VIDEY	VSNVQ	MV-NH ₂	
Hoa b	<u>ENCYS</u>	<u>NRVFR</u>	QCLDD	LLMID	VIDEY	VSNVQ	MV-NH ₂	
Cam	<u>ENCYS</u>	<u>NLVFR</u>	<u>QCND</u>	<u>LLHMD</u>	<u>EPDQY</u>	<u>ARKVQ</u>	<u>MV-NH₂</u>	

FIG. 9. Comparison between the CHH-I of the Mexican crayfish *Procambarus bouvieri* with the CHH from the crayfish *Orconectes limosus*, two CHH isomorphs from the lobster *Homarus americanus*, and the CHH from the green crab *Carcinus maenas*. Residues that differ with respect to the corresponding one in the hormone from *P. bouvieri* are indicated by boldface letters. Residues that introduce, cancel, or change a charge with respect to the majority of the residues at any position are underlined. Stretches of strictly conserved residues are indicated by heavy lines below the sequences.

terrestrial isopod, *Porcellio dilatatus* (31,32). The bioassays have shown differences that could not be observed by means of immunocytochemical studies, and the specificity emerges at the infraorder level (30).

There are 10 positions within the CHH molecule where suppression, introduction, or change of charge occur (Fig. 9). Four of them (positions 61, 64, 67, and 68) could be important for the interaction with the CHH receptor because they are consistently the same type among the CHHs from the crayfish and the lobster (Astuceans), whereas a remarkable change in the charge or polarity occurs in the hormone from the crab (Brachyuran). This finding agrees with the results mentioned concerning interspecies activity.

It can be seen in Fig. 9 that CHH is a very conserved molecule. Forty of 72 residues are identical in the five structures known so far. There are several stretches of conserved residues that could be very important for the maintenance of the secondary and tertiary structure of such a small molecule as CHH. On secondary structure prediction (9) and preliminary modeling, we realized that some of these stretches could have the same or very similar secondary structure and that parts of them could be forming α -helical, β -sheet (parallel and antiparallel), β -turns, and coiled structures, which have been detected in the CHH isomorphs from *Procambarus bouvieri* by means of circular dichroism (17). These conserved regions could account for the

cross-reactivity found in radioimmunoanalytical and immunocytochemical studies (24,31,32,48).

It deserves attention that the six Cys residues are included among the conserved amino acids. Since the connectivity between the Cys residues is the same type (I-V, II-IV, III-VI) in both the *Carcinus* (22) and *Procambarus* hormones, this topology could be a common feature of all the members of this neuropeptide family. It should be mentioned that during the study of the connectivity between the Cys residues, all of the theoretical tryptic peptides were obtained, which could imply that all the basic residues are exposed to the solvent and are accessible to the enzyme in the native CHH-I molecule.

We are at present sequencing the minor crustacean hyperglycemic hormone isomorph (CHH-II) from *Procambarus bouvieri* to determine the mechanism that originates two hyperglycemic peptides within this organism. It has been found that, in *Homarus americanus*, two isomorphs of the CHH are encoded by two different genes (47). It could also be the case in *Procambarus*.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was made possible by grants to A.H. from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) and the Third World Academy of Sciences (TWAS). The skillful assistance of Irma B. Mitre is gratefully acknowledged.

REFERENCES

- Abramowitz, A. A.; Hisaw, F. L.; Papandrea, D. N. The occurrence of a diabetogenic factor in the eyestalk of crustaceans. *Biol. Bull. (Woods Hole)* 86:1-5; 1944.
- Aguilar, M. B.; Quackenbush, L. S.; Hunt, D. F.; Shabanowitz, J.; Huberman, A. Identification, purification and initial characterization of the vitellogenesis-inhibiting hormone from the Mexican crayfish *Procambarus bouvieri* (Ortmann). *Comp. Biochem. Physiol.* 102B: 491-498; 1992.
- Allen, G. In: Work, T. S.; Burdon, R. H., eds. Sequencing of proteins and peptides. Amsterdam: Elsevier/North Holland; 1981.
- Andrew, R. D.; Saleuddin, A. S. M. Two-dimensional gel-electrophoresis of neurosecretory polypeptides in crustacean eyestalk. *J. Comp. Physiol. [B]* 134:303-315; 1979.
- Barkholt, V.; Jensen, A. L. Amino acid analysis: Determination of cystine plus half-cystine in proteins after hydrochloric acid hydrolysis with a disulfide compound as additive. *Anal. Biochem.* 177:316-322; 1989.
- Bidlingmeyer, B. A.; Cohen, S. A.; Tarvin, T. L. Rapid analysis of amino acids using precolumn derivatization. *J. Chromatogr.* 336: 93-104; 1984.
- Bliss, D. E. Metabolic effects of sinus gland or eyestalk removal in the land crab, *Gecarcinus lateralis*. *Anat. Rec.* 111:502-503; 1951.
- Chang, E. S.; Prestwich, G. D.; Bruce, M. J. Amino acid sequence of a peptide with both molt-inhibiting and hyperglycemic activities in the lobster, *Homarus americanus*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 171:818-826; 1990.
- Chou, P. Y.; Fasman, G. D. Prediction of protein conformation. *Biochemistry* 13:222-245; 1974.
- Gray, W. R. A fluorescent end-group reagent for proteins and peptides. *Biochem. J.* 89:59P; 1963.
- Hartley, B. S. Strategy and tactics in protein chemistry. *Biochem. J.* 119:805-822; 1970.
- Hazra, A. K.; Chock, S. P. Y.; Albers, R. W. Protein determination with trinitrobenzene sulfonate: A method relatively independent of amino acid composition. *Anal. Biochem.* 137:437-443; 1984.
- Huberman, A.; Aguilar, M. B. A neurosecretory hyperglycemic hormone from the sinus gland of the Mexican crayfish *Procambarus bouvieri* (Ortmann). I. Purification and biochemical characterization of the most abundant form of the hormone. *Comp. Biochem. Physiol.* 85B:197-203; 1986.
- Huberman, A.; Aguilar, M. B. A neurosecretory hyperglycemic hormone from the sinus gland of the Mexican crayfish *Procambarus bouvieri* (Ortmann). II. Structural comparison of two isoforms of the hormone. *Comp. Biochem. Physiol.* 91B:345-349; 1988.
- Huberman, A.; Aguilar, M. B. Single step purification of two hyperglycaemic neurohormones from the sinus gland of *Procambarus bouvieri*. Comparative peptide mapping by means of high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 443:337-342; 1988.
- Huberman, A.; Aguilar, M. B. A neuropeptide with molt-inhibiting hormone activity from the sinus gland of the Mexican crayfish *Procambarus bouvieri* (Ortmann). *Comp. Biochem. Physiol.* 93B:299-305; 1989.
- Huberman, A.; Hernández-Arana, A.; Aguilar, M. B.; Rojo-Domínguez, A. Secondary structure of a crustacean neuropeptide family by means of CD. *Peptides* 10:1113-1115; 1989.
- Hunt, D. F.; Alexander, J. E.; McCormack, A. L.; Martino, P. A.; Michel, H.; Shabanowitz, J.; Sherman, N.; Moseley, M. A.; Jorgerson, J. W.; Tomer, K. B. Mass spectrometric methods for protein and peptide sequence analysis. In: Villafranca, J. J., ed. *Techniques in protein chemistry II*. New York: Academic Press; 1991:441-454.
- Hunt, D. F.; Yates, J. R., III; Shabanowitz, J.; Bruns, E.; Bruns, D. E. Amino acid sequence analysis of two mouse calbindin-D_{9k} isoforms by tandem mass spectrometry. *J. Biol. Chem.* 264:6580-6586; 1989.
- Kallen, J. L.; Reijntjens, F. M. J.; Peters, D. J. M.; Van Herp, F. Biochemical analyses of the crustacean hyperglycemic hormone of the crayfish *Astacus leptodactylus*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 61:248-259; 1986.
- Kegel, G.; Reichwein, B.; Tensen, C.; Keller, R. Amino acid sequence of crustacean hyperglycemic hormone (CHH) from the crayfish, *Orconectes limosus*. Emergence of a novel neuropeptide family. *Peptides* 12:909-913; 1991.
- Kegel, G.; Reichwein, B.; Weese, S.; Gaus, G.; Peter-Katalinić, J.; Keller, R. Amino acid sequence of the crustacean hyperglycemic hormone (CHH) from the shore crab, *Carcinus maenas*. *FEBS Lett.* 255:10-14; 1989.
- Keller, R. Comparative electrophoretic studies of crustacean neurosecretory hyperglycemic and melanophore-stimulating hormones from isolated sinus glands. *J. Comp. Physiol.* 122:359-373; 1977.
- Keller, R.; Jaros, P. P.; Kegel, G. Crustacean hyperglycemic neuropeptides. *Am. Zool.* 25:207-221; 1985.

25. Keller, R.; Kegel, G. Studies on crustacean neuropeptides by use of high-performance liquid chromatography. In: Hoffman, J. A.; Prochet, M., eds. Biosynthesis, metabolism and mode of action of invertebrate hormones. Heidelberg: Springer; 1984:145-154.
26. Keller, R.; Sedlmeier, D. A metabolic hormone in crustaceans: The hyperglycemic neuropeptide. In: Laufer, H.; Downer, R. G. H., eds. Invertebrate endocrinology, vol. 2: Endocrinology of selected invertebrate types. New York: Alan R. Liss; 1988:315-326.
27. Kleinholz, L. H. Biochemistry of crustacean hormones. In: Bliss, D. E.; Mantel, L. H., eds. The biology of Crustacea, vol. 9: Integument, pigments and hormonal processes. New York: Academic Press; 1985:463-522.
28. Kleinholz, L. H.; Keller, R. Comparative studies in crustacean neurosecretory hyperglycemic hormones. I. The initial survey. Gen. Comp. Endocrinol. 21:554-564; 1973.
29. Kleinholz, L. H.; Kimball, F.; McGarvey, M. Initial characterization and separation of hyperglycemic (diabetogenic) hormone from the crustacean eyestalk. Gen. Comp. Endocrinol. 8:75-81; 1967.
30. Leuven, R. S. E. W.; Jaros, P. P.; Van Herp, F.; Keller, R. Species- or group-specificity in biological and immunological studies of crustacean hyperglycemic hormone. Gen. Comp. Endocrinol. 46:288-296; 1982.
31. Martin, G.; Jaros, P. P.; Beese, G.; Keller, R. The hyperglycemic neuropeptide of the terrestrial isopod, *Porcellio dilatatus*. II. Immunocytochemical demonstration in neurosecretory structures of the nervous system. Gen. Comp. Endocrinol. 55:217-226; 1984.
32. Martin, G.; Keller, R.; Kegel, G.; Beese, G.; Jaros, P. P. The hyperglycemic neuropeptide of the terrestrial isopod, *Porcellio dilatatus*. I. Isolation and characterization. Gen. Comp. Endocrinol. 55:208-216; 1984.
33. Matsubara, H.; Sasaki, R. M. High recovery of tryptophan from acid hydrolysates of proteins. Biochem. Biophys. Res. Commun. 35:175-181; 1969.
34. Meuth, J. L.; Fox, J. L. Separation of amino acid phenylthiohydantoin derivatives by high-pressure liquid chromatography. Anal. Biochem. 154:478-484; 1986.
35. Newcomb, R. Peptides in the sinus gland of *Cardisoma carnifex*. Isolation and amino acid analysis. J. Comp. Physiol. 153:207-221; 1983.
36. Newcomb, R.; Stuenkel, E.; Cooke, I. Characterization, biosynthesis and release of neuropeptides from the X-organ-sinus gland system of the crab *Cardisoma carnifex*. Am. Zool. 25:157-171; 1985.
37. Passano, L. M. The X-organ-sinus gland neurosecretory system in crabs. Anat. Rec. 111:86-87; 1951.
38. Pearson, W. R.; Lipman, D. J. Improved tools for biological sequence comparison. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444-2448; 1988.
39. Schram, F. R. The fossil record and evolution of Crustacea. In: Bliss, D. E., ed. The biology of Crustacea, Vol. 1: Systematics, the fossil record, and biogeography. New York: Academic Press; 1982:93-147.
40. Sedlmeier, D. The crustacean hyperglycemic hormone (CHH) releases amylase from the crayfish midgut gland. Regul. Pept. 20:91-98; 1988.
41. Skorkowski, E. F.; Rykiert, M.; Lipinska, B. Hyperglycemic hormone from the eyestalk of the shrimp, *Crangon crangon*. Gen. Comp. Endocrinol. 33:460-467; 1977.
42. Soyez, D.; Le Caer, J. P.; Noël, P. Y.; Rossier, J. Primary structure of two isoforms of the vitellogenesis inhibiting hormone from the lobster *Homarus americanus*. Neuropeptides 20:25-32; 1991.
43. Soyez, D.; Noël, P.; Van Deijnen, J. E.; Martin, M.; Morel, A.; Payen, G. G. Neuropeptides from the sinus gland of the lobster, *Homarus americanus*: Characterization of hyperglycemic peptides. Gen. Comp. Endocrinol. 79:261-274; 1990.
44. Stuenkel, E. L. Biosynthesis and axonal transport of proteins and identified peptide hormones in the X-organ sinus gland neurosecretory system. J. Comp. Physiol. 153:191-205; 1983.
45. Stuenkel, E. L. A common precursor to two major crab neurosecretory peptides. Peptides 7:397-406; 1986.
46. Tarr, G. E. Manual Edman sequencing system. In: Shively, J. E., ed. Methods of protein microcharacterization. Clifton: The Humana Press; 1986:155-194.
47. Tensen, C. P.; De Klein, D. P. V.; Van Herp, F. Cloning and sequence analysis of cDNA encoding two crustacean hyperglycemic hormones from the lobster, *Homarus americanus*. Eur. J. Biochem. 200:103-106; 1991.
48. Tensen, C. P.; Janssen, K. P. C.; Van Herp, F. Isolation, characterization and physiological specificity of the crustacean hyperglycemic factors from the sinus gland of the lobster, *Homarus americanus* (Milne-Edwards). Invert. Reprod. Dev. 16:155-164; 1989.
49. Toi, K.; Bynum, E.; Norris, E.; Itano, H. A. Studies on the chemical modification of arginine. J. Biol. Chem. 242:1036-1043; 1967.
50. Tyler-Cross, R.; Schirch, V. Effects of amino acid sequence, buffers and ionic strength on the rate and mechanism of deamidation of asparagine residues in small peptides. J. Biol. Chem. 266:22549-22556; 1991.
51. Van Deijnen, J. H. M. Structural and biochemical investigations into the endocrine system of the optic ganglia of decapod Crustacea. Faculty of Science, Catholic University, Nijmegen; 1986. Thesis.
52. Van Wormhoudt, A.; Van Herp, F.; Bellon-Humbert, C.; Keller, R. Changes and characteristics of the crustacean hyperglycemic hormone (CHH material) in *Palaemon serratus* Pennant (Crustacea, Decapoda, Natantia) during the different steps of the purification. Comp. Biochem. Physiol. 79B:353-360; 1984.
53. Webster, S. G. Amino acid sequence of putative moult-inhibiting hormone from the crab *Carcinus maenas*. Proc. R. Soc. Lond. [Biol.] 244:247-252; 1991.
54. Woods, K. R.; Wang, K.-T. Separation of dansyl-amino acids by polyamide chromatography. Biochim. Biophys. Acta 133:369-370; 1967.

EXPERIMENTOS Y RESULTADOS ADICIONALES

PRESENCIA DE LAS DIFERENTES HORMONAS EN FUNCION DEL SEXO

Una posibilidad para el origen de los dos isomorfos de la HHG era que la presencia de uno u otro estuviera ligada al sexo. Se prepararon y analizaron, separadamente, extractos de glándulas sinusales de 100 hembras y 102 machos con el fin de contestar esta pregunta. Se utilizó la metodología descrita previamente (4,38). Una situación semejante existía acerca de la HIV, que interviene en la maduración de los ovocitos, como se mencionó (Introducción).

La figura 2 muestra los perfiles cromatográficos de extractos de glándulas sinusales de acociles hembras y machos. Como puede verse, la presencia de uno u otro isomorfo de la HHG no depende del sexo y lo mismo es cierto para el péptido que en la hembras tiene la función de la HIV.

COMPARACION FISIOLOGICA DE LOS DOS ISOMORFOS DE LA HHG

Ya que los dos isomorfos de la HHG son producidas en ambos sexos y en cada individuo, surgió la pregunta de una razón fisiológica para dicho polimorfismo. Esta hormona tiene funciones múltiples como estimular tanto la liberación de glucosa a partir del hepatopáncreas y del músculo (principalmente), como la síntesis y secreción de amilasa a partir del hepatopáncreas (Introducción). Por lo anterior, cabía la posibilidad de que uno de los isomorfos fuera más potente que el otro con respecto a cualquiera de dichas funciones, o que uno de los isomorfos no tuviera alguna de ellas. Para explorar esta posibilidad se estudió la relación dosis-respuesta para cada isoformo con respecto al efecto hiperglucemiante debido a la liberación de glucosa a partir del hepatopáncreas y del músculo y se compararon los resultados. Los isomorfos se cuantificaron mediante el método del ácido trinitrobencensulfónico, como se ha descrito (4,38), y se diluyeron a la misma concentración inicial, a partir de la cual se prepararon

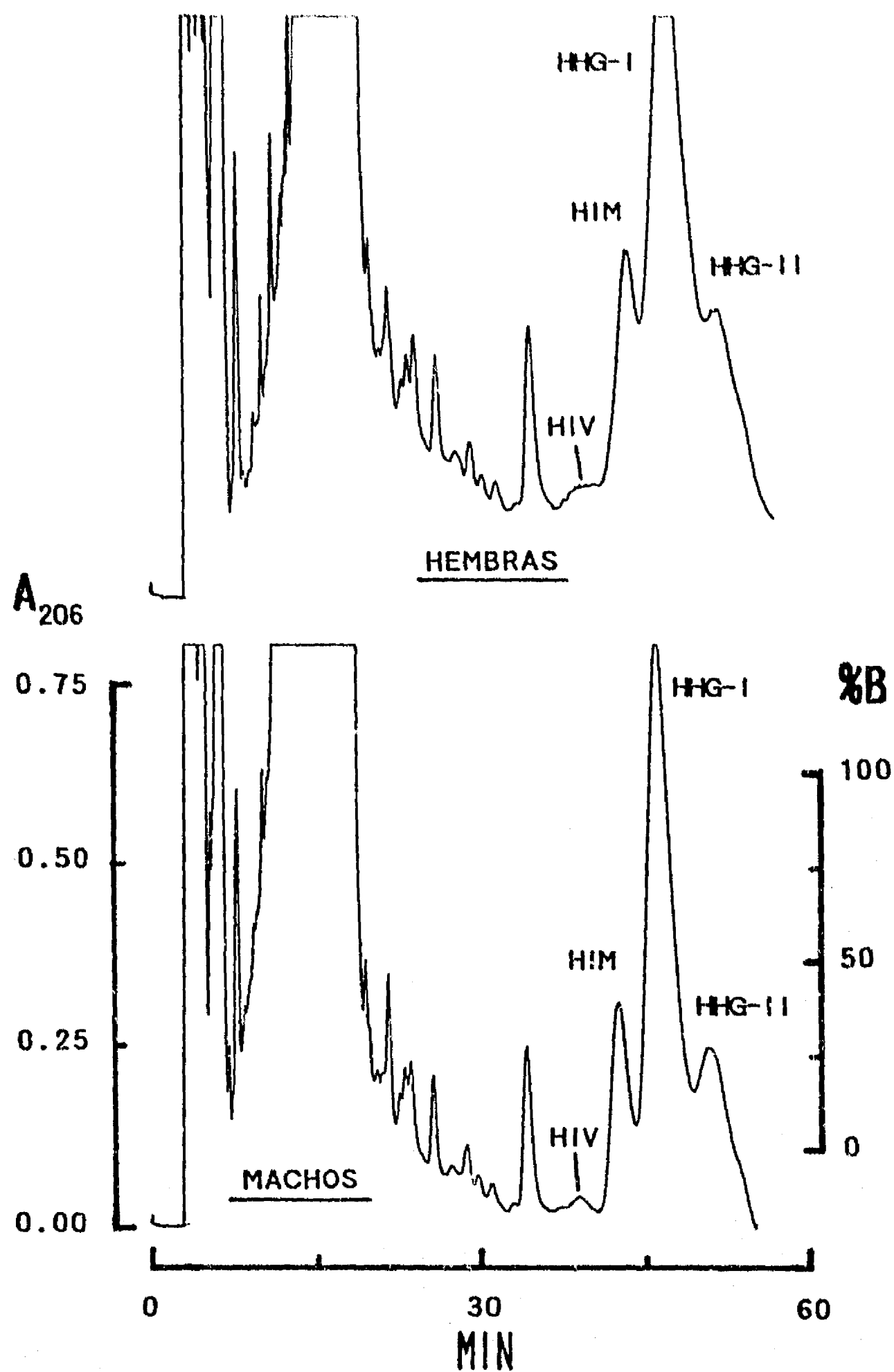


Figura 2
 Cromatografía líquida de alta presión en fase reversa de extractos de 200 glándulas sinusales de acociles hembras (parte superior) y de 204 glándulas sinusales de machos (parte inferior). Columna: uBondapak-Phenyl (300 X 3.9 mm, partículas de 10 μ m; Waters, Mildford MA). Solución A= ácido trifluoroacético (ATFA) al 0.1% (p/v), solución B= ATFA al 0.1% en acetonitrilo al 60% (v/v). Gradiente de 35 a 55%B en 15 min. y elución isocrática a 55%B durante 45 min. Flujo: 1 ml/min. a 30°C. La absorbencia del eluido se registró a 206 nm. HIV, Hormona Inhibidora de la Vitelogénesis; HIM, Hormona Inhibidora de la Muda; HHG-I y HHG-II, isomorfos mayoritario y minoritario de la Hormona Hiperglucemiante, respectivamente.

dos series de diluciones en paralelo (una serie para cada isomorfo). Para el bioensayo (4,39) se usaron animales destallados 12 días antes y sometidos a un ayuno de 8 días. Las alícuotas (5 ul) de hemolinfa se tomaron a los 0 y 60 min. Los isomorfos se administraron en dosis equivalentes a 0.01, 0.05, 0.1, 0.5 y 1.0 GS/20 g de peso (42.7 pg, 213.5 pg, 427 pg, 2.1 ng y 4.3 ng/g respectivamente. La glucosa se cuantificó por el método específico de la glucosa oxidasa (Lakeside, Boehringer, Mannheim).

La figura 3 indica que no hay diferencia significativa en los niveles de glucosa de la hemolinfa producidos por la inyección de dosis equivalentes de cada uno de los isomorfos y por tanto tampoco la hay en lo referente a la glucogenólisis en el hepatopáncreas y en el músculo; una contribución a la hiperglucemia medida causada por la acción de amilasa secretada por el hepatopáncreas quedó descartada por el ayuno, ya que no había alimento que pudiera ser digerido y contribuir a la glucemia.

ESTUDIO DE LA HIV, LA HIM Y LA HHG-II

Dado que diversos datos habían confirmado la existencia de una familia de neuropéptidos en *Procambarus bouvieri* (5,38-42), se procedió a caracterizar a sus miembros, conforme la disponibilidad de cada uno de ellos, para definir las semejanzas y diferencias entre ellos y aclarar preguntas referentes a las relaciones estructura-función en ellos y a su evolución. Los métodos y técnicas empleados fueron los mismos que se usaron con la HHG-I (artículo No. 2).

MASA MOLECULAR

El primer paso fue la determinación de la masa molecular, con un grado muy alto de exactitud, mediante la espectrometría de masas (43). La tabla 1 muestra el gran parecido entre las 4 hormonas, que tienen masas comprendidas entre 8,300 y 8,400 Da.

Es importante mencionar que la electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante había conducido a subestimar las

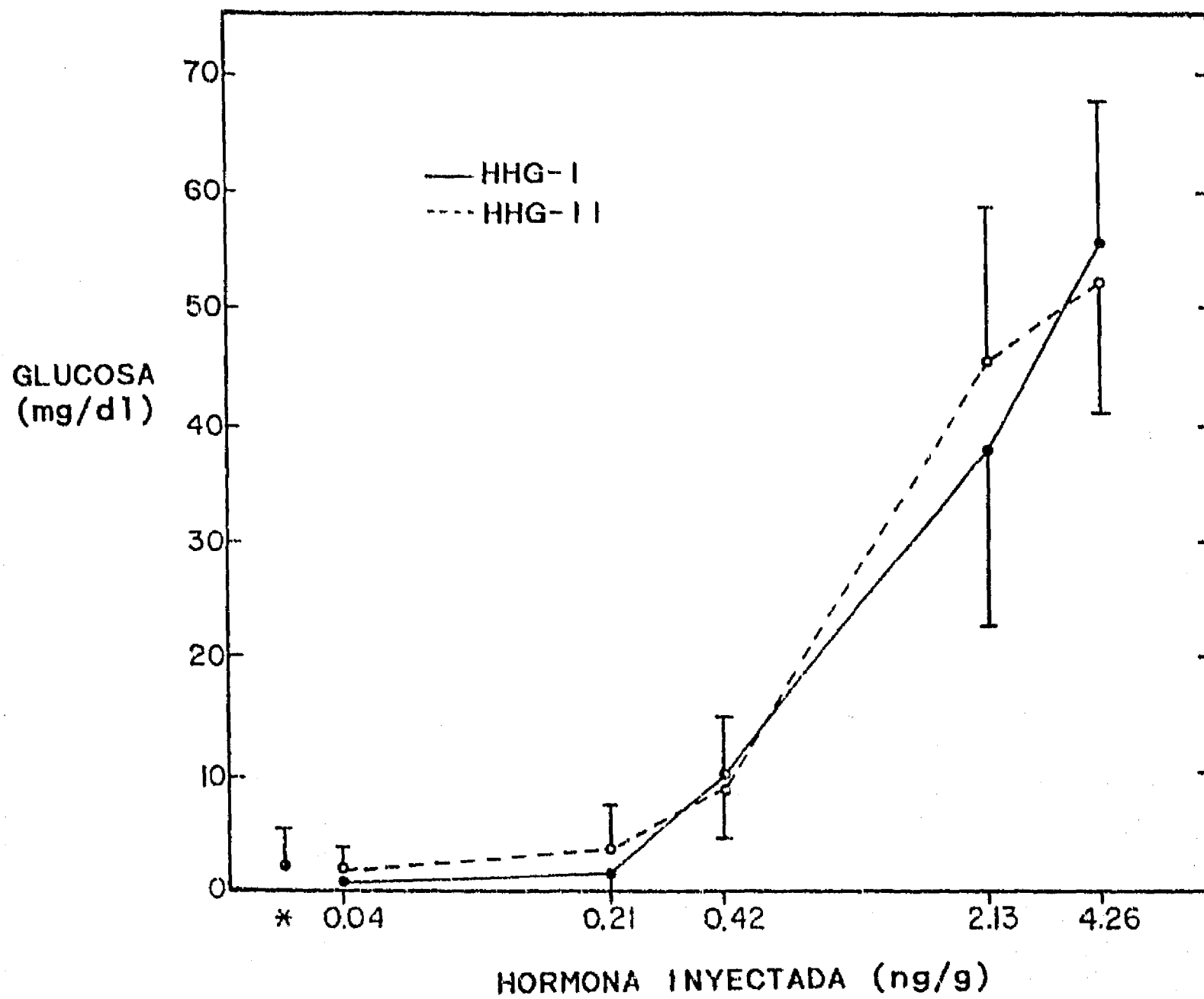


Figura 3

Curvas dosis-respuestas de los niveles de glucosa de la hemolinfa producidos por los isomorfos mayoritario (HHG-I) y minoritario (HHG-II) de la HHG en animales destallados 12 días antes, sometidos a 8 días de ayuno. La primera muestra de hemolinfa se tomó justo antes de inyectar las hormonas en las dosis indicadas y la segunda se obtuvo 60 minutos después.

Tabla 1. Masa molecular determinada por espectrometría de masas.

HORMONA	Iones observados	Carga	Masa calculada del ión (M + H) [†]	Masa molecular promedio (Da)
HIV ^a	1,199	+7	8,387	8,387
	1,399	+6	8,389	
HIM	1,038.6	+8	8,302	8,301
	1,187	+7	8,303	
	1,384.5	+6	8,302	
HHG-I ^b	1,197.2	+7	8,374	8,373
	1,396.5	+6	8,374	
HHG-II	1,196.7	+7	8,371	8,371
	1,396.4	+6	8,373	

^a Datos tomados del artículo No. 1.

^b Datos tomados del artículo No. 2.

masas moleculares por casi 2,500 Da. Este mismo fenómeno se ha observado consistentemente en varios organismos, cuando se han aplicado la electroforesis desnaturizante y la filtración en gel al estudio de las masas moleculares de este tipo de hormonas (17,48,49,95).

COMPOSICION DE AMINOACIDOS

El siguiente paso fue la determinación de la composición de aminoácidos, para cuyos cálculos se usaron los valores de las masas moleculares que proporcionó la espectrometría de masas. Se hidrolizaron lotes nuevos de la HIV (artículo No. 1) y de la HHG-I (artículo No. 2), mientras que las composiciones de la HHG-II (39) y la HIM (41) sólo se volvieron a calcular y se muestran en la tabla 2 con los de la HIM y la HHG-I.

Tabla 2. Composición de aminoácidos de la familia de neuropéptidos de la glándula sinusal de *Procambarus bouvieri*.

RESIDUO	HIV ^a		HIM ^b		HHG-I ^c			HHG-II ^b	
Asx	12.89	13	9.91	10	9.96	10	(8+3)	9.92	10
Glx	8.18	8	7.14	7	6.81	7	(2+5)	7.46	7-8
Ser	1.69	2	2.20	2	2.22	2	(2)	2.78	3
Gli	1.60	2	2.35	2	2.50	2-3	(2)	2.75	3
His	0.00	0	0.00	0	0.00	0	(0)	0.00	0
Arg	6.36	6	6.70	7	5.13	5	(5)	7.13	7
Tre	2.59	3	1.88	2	2.50	2-3	(3)	2.60	3
Ala	3.85	4	4.05	4	4.10	4	(4)	4.33	4
Pro	0.64	1	1.07	1	1.13	1	(1)	1.40	1
Tir	4.93	5	4.41	4-5	5.95	6	(6)	3.96	4
Met	0.00	0	0.00	0	0.00	0	(0)	0.00	0
Val	7.23	7-8 ^d	7.43	7-8	7.87	8	(8)	7.31	7-8 ^d
Ile	3.95	4	3.92	4	4.42	4-5	(4)	3.82	4
Leu	6.00	6	6.90	7	6.83	7	(6)	5.44	5-6
Trp	0.00	0	0.00	0	0.00	0	(0)	0.00	0
Fen	2.64	3	4.01	4	3.50	3-4	(3)	3.92	4
Lis	3.69	4	5.56	5-6	3.32	3	(4)	4.66	4-5
Cis	N.D. [†]	6 [‡]	5.87	6	5.86	6	(6)	5.96	6
Total	74-75		71-74		70-74 (72)			72-76	

^a Valores promedio obtenidos de las hidrólisis en HCl 5.7 M + 0.1% (p/v) de fenol, bajo nitrógeno, durante 24, 48 y 72 h, a 110°C. Tomados del artículo No. 1.

^b Valores promedio obtenidos de las hidrólisis en HCl 5.7 M + 0.16% (p/v) de fenol, durante 24, 48 y 72 h, a 110°C, bajo nitrógeno. La Cis se determinó como ácido cisteico. Calculados a partir de los datos de (39) para la HHG-II y (41) para la HIM.

^c Hidrólisis *in vacuo* en HCl 6 M + 0.1% (p/v) de fenol y 0.05% (p/v) de ditiodipropionato de sodio, durante 72 h a 110°C. Tomados del artículo No. 2. Los valores entre paréntesis se dedujeron de la secuencia final. Asn + Asp y Gln + Glu enlistados por separado, en este orden.

^d El límite superior es posible debido a la existencia de enlaces parcialmente resistentes a la hidrólisis ácida entre residuos de aminoácidos hidrofóbicos.

[†] No determinado. Asignado con base en la homología con la HHG-I.

Probablemente, las 4 hormonas están constituidas por 72 residuos de aminoácido, ya que el error en la estimación del número de residuos mediante la composición de aminoácidos es de ± 2 residuos; este último valor se dedujo de la comparación del número real de residuos, 72, de la HHG-1, deducidos de su secuencia de aminoácidos, con el número de residuos calculados a partir de la composición de aminoácidos, 70 a 74, (tabla 2).

MAPAS TRIPTICOS

Para comparar con mayor detalle a la HIV con las demás (5,40,41), se desarrolló su mapa tríptico mediante la cromatografía líquida de alta presión en fase reversa (artículo No. 1). Para tener una comparación más confiable, se prepararon hidrolizados de todas las hormonas.

En la figura 4 puede verse la identidad de 3 péptidos trípticos entre las 4 hormonas. Los 15 residuos incluidos en estos fragmentos (figura 6) equivalen al 21% de cada hormona y definen un valor mínimo de similitud entre todas ellas (ver la sección *Secuencias de los péptidos trípticos*). Cabe mencionar que en los casos de las HHG el péptido tríptico T2b que coincide con el péptido T2 del par HIV/HIM [figura 2 del artículo No. 2 (pág.36) y figura 4 de esta Tesis] es producto de un corte no esperado, originado aparentemente por la actividad de -tripsina, que resulta de la autólisis de la tripsina y que está presente con frecuencia en las preparaciones comerciales (8).

Al observar los mapas trípticos, hechos mediante cromatografía líquida de alta presión en fase reversa, es posible separar a las 4 hormonas en 2 grupos. El primero incluye a la HIV y a la HIM, que aparentemente no muestran diferencias perceptibles en sus péptidos trípticos. Es obvio que debe existir alguna diferencia, ya que las hormonas intactas se separan satisfactoriamente en la cromatografía líquida de alta presión en fase reversa y difieren claramente en hidrofobicidad y masa molecular y ligeramente en composición de aminoácidos (el error que se obtiene en esta técnica (tabla 2) no permite señalar con seguridad las diferencias en composición). El segundo grupo comprende a los 2 isomorfos de la HHG, que se

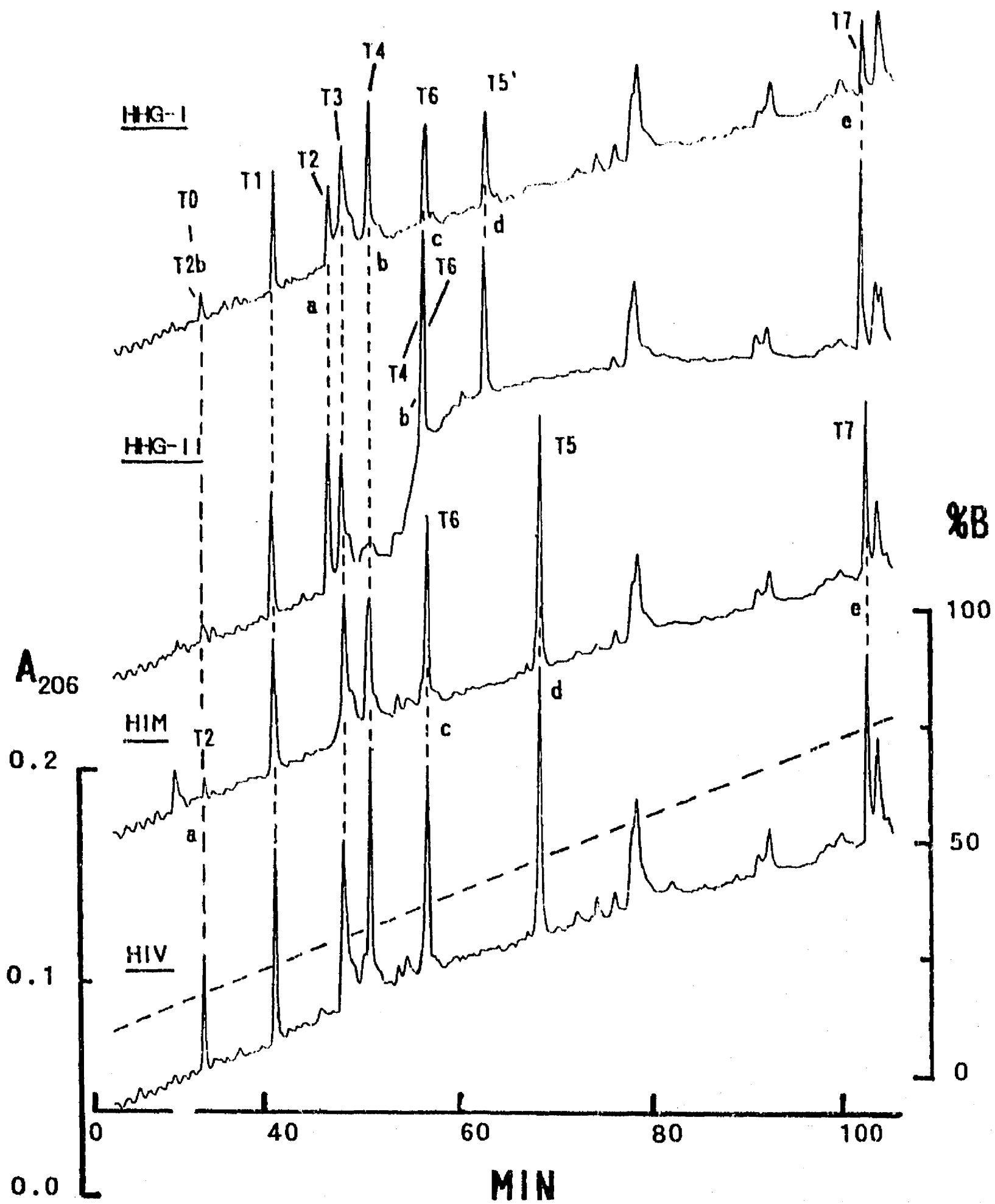


Figura 4
 Mapas trípticos de la Hormona Inhibidora de la Vitelogenésis, HIV, la Hormona Inhibidora de la Muda, HIM y los dos isomorfos de la Hormona Hiperglucemiante, HHG-I y HHG-II (4 nmol de cada hormona reducida y carboximetilada, digeridas con tripsina (condiciones cromatográficas: figura 2 del artículo No. 1, pág. 29). Los péptidos están numerados en la parte superior de la figura (HHG-I); los péptidos de las otras hormonas que tienen diferente tiempo de retención (con respecto a los de la HHG-I) se indican aparte. Los pares de péptidos que entre cualquier par de hormonas difieren en tiempo de retención, pero tienen composiciones de aminoácidos muy parecidas están señalados con letras minúsculas.

diferencian, aparentemente, en un solo péptido tríptico.

COMPOSICION DE AMINOACIDOS DE LOS PEPTIDOS TRIPTICOS

La tabla 3 muestra que, entre cualquier par de hormonas, existen péptidos trípticos que no coinciden en tiempo de retención, pero que tienen composiciones de aminoácidos muy semejantes (señalados con letras minúsculas en la figura 4).

Cabe mencionar que la cantidad de material disponible para el análisis cuantitativo de la composición de aminoácidos de los péptidos trípticos era muy pequeña. Esto condujo a obtener resultados cuantitativos no confiables para la mayoría de los péptidos trípticos. Debido a esto se pensó que sería más real hacer las comparaciones cualitativamente. Hay que hacer notar que aunque los péptidos de tres de los cuatro pares comparados tienen, aparentemente, la misma composición, pueden distinguirse claramente en los mapas trípticos, por sus diferentes tiempos de elución.

Dadas las semejanzas en masa molecular, hidrofobicidad y composición de aminoácidos entre las hormonas intactas, las semejanzas tan altas en la composición de los péptidos trípticos mencionados implican un grado muy alto de similitud en sus secuencias de aminoácidos. Esto sugiere claramente que el parecido entre las 4 hormonas es mucho mayor al 21% establecido con base en los péptidos trípticos que coinciden en tiempo de retención.

SECUENCIAS DE LOS PEPTIDOS TRIPTICOS

La determinación de la secuencia de aminoácidos de la HHG-I requirió la combinación de la degradación de Edman, manual y automática, y la espectrometría de masas. La estrategia estuvo centrada en los péptidos trípticos (algunos de ellos desbloqueados por la piroglutamilaminopeptidasa), pero se produjeron fragmentos con otras enzimas proteolíticas (proteasa V8 y quimotripsina) y se modificó la susceptibilidad a la tripsina (mediante modificación de los residuos de Arg) para obtener fragmentos traslapantes con los péptidos trípticos y poder establecer el orden de éstos en la

Tabla 3. Composición de aminoácidos cualitativa de los péptidos trípticos que no coinciden en tiempo de retención.

PEPTIDO TRIPTICO	COMPOSICION
b=T4=HIV-4, HIM-4, HHG-1-4	Glx, Val, Fen, Asx, Ala, Cis, Lis
b=T4=HHG-11-4	Glx, Val, Fen, Asx, Ala, Cis, Lis
d=T5=HIV-5, HIM-5	Lis, Leu, Glx, Val, Cis, Asx, Tir, Arg
d=T5'=HHG-1-5', HHG-11-5'	Lis, Leu, Glx, Val, Cis, Asx, Tir, Arg
c=T6=HIV-6, HIM-6	Glx, Asx, Cis, Tir, Ala, Ser, Val, Fen, Arg
c=T6=HHG-1-6, HHG-11-6	Glx, Asx, Cis, Tir, Ala, Ser, Val, Fen, Arg
e=T7=HIV-7, HIM-7	Glx, Cis, Leu, Asx, Ile, Val, Tir, Ser, Gli
e=T7=HHG-1-7, HHG-11-7	Glx, Cis, Leu, Asx, Ile, Val, Tir, Ser, Gli, Tre

' (') indica que se trata de péptidos en los que un enlace Arg-Val no fue cortado.

NOTAS: Los datos cuantitativos eran confiables sólo para algunos péptidos trípticos, por lo que se consideró que sería más real hacer las comparaciones cualitativamente. Los derivados feniltiocarbamilados y dansilados de los aminoácidos se identificaron mediante CLAP-FR (artículo No. 1) y cromatografía en capa fina de poliamida, respectivamente, como se describió (4,38). Las letras minúsculas indican los pares de péptidos que tienen composiciones de aminoácidos muy parecidas (pero diferentes tiempos de retención), según está indicado en la figura 3, mientras que T4 a T6 corresponden a la numeración de los péptidos trípticos. HIV-4 es el péptido tríptico T4 de la HIV, HIM-4 es el T4 de HIM y así sucesivamente.

molécula intacta (artículo No. 2).

Se postuló que la posición 4 de la HHG-II corresponde a un residuo de Asn en lugar del Asp de la HHG-I (figura 5); esta asignación se basó en el hecho de que la proteasa V8 no cortó el péptido tríptico T4 de la HHG-II (datos no publicados) y sí el fragmento correspondiente del otro isomorfo. Dado que se observó solamente Asp durante la secuenciación manual del péptido tríptico de la HHG-II (desbloqueado con la piroglutamilaminopeptidasa), la identidad aparente en la secuencia puede deberse a una desamidación virtualmente total del residuo de Asn, debido al efecto del tratamiento con la dicha enzima o de los 3 ciclos de la degradación de Edman, o de ambos (96).

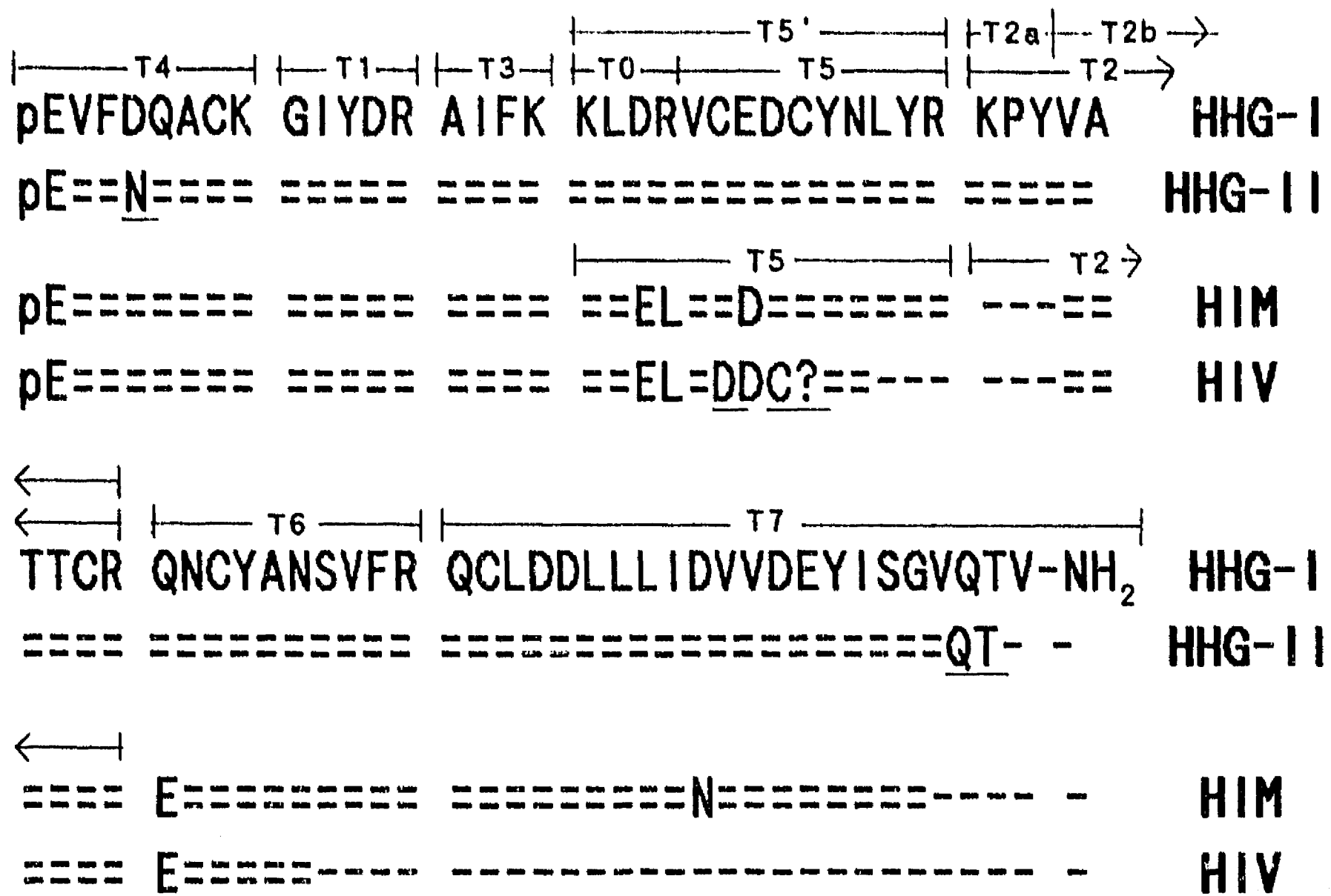
Los datos de las secuencias de la HHG-II y de la HIM fueron obtenidos mediante secuenciación manual y digestión con las carboxipeptidasas Y ó B, mientras que los de la HIV provienen de la secuenciación automática. En lo referente a la HIV y a la HIM, las 2 diferencias (posiciones 24 y 26) que se observan en la figura 5 podrían, muy probablemente, no ser reales, ya que además de que se encuentran en péptidos trípticos que coinciden en tiempo de retención, su asignación en la HIV es dudosa debido a que la cantidad del péptido tríptico usada para la secuenciación automática era muy baja.

En resumen, se confirmó el alto grado de similitud predicho para los péptidos trípticos que tienen composiciones de aminoácidos muy parecidas así como la identidad de los que coincidían virtualmente en tiempo de retención (figura 4).

PUENTES DISULFURO

Para la identificación de los residuos de cisteína que forman cada uno de los puentes disulfuro de la HIM y la HHG-II, se generaron péptidos trípticos a partir de las hormonas intactas, y se purificaron y analizaron como se hizo en el caso de la HHG-I (artículo No. 2).

La figura 6 muestra los péptidos trípticos obtenidos a partir



HHG-I y HHG-II, isomorfos mayoritario y minoritario de la Hormona Hiperglucemiante; HIM, Hormona Inhibidora de la Muda; HIV, Hormona Inhibidora de la Vitelogénesis. Secuencias idénticas con respecto a la HHG-I, ==; secuencias no determinadas definitivamente, pero aparentemente similares, ---; posiciones donde no se observó ningún aminoácido durante la degradación de Edman, ?. La asignación de los residuos subrayados es dudosa. T0 a T7 corresponden a los péptidos trípticos de la figura 4. Para facilitar la comparación visual de las secuencias y para relacionarlas con los mapas trípticos se dejaron espacios vacíos en las uniones de los péptidos trípticos, excepto entre T0 y T5 de las HHG.

Figura 5

Comparación de las secuencias de los 4 miembros de la familia de neurohormonas de la glándula sinusal de *Procambarus bouvieri*.

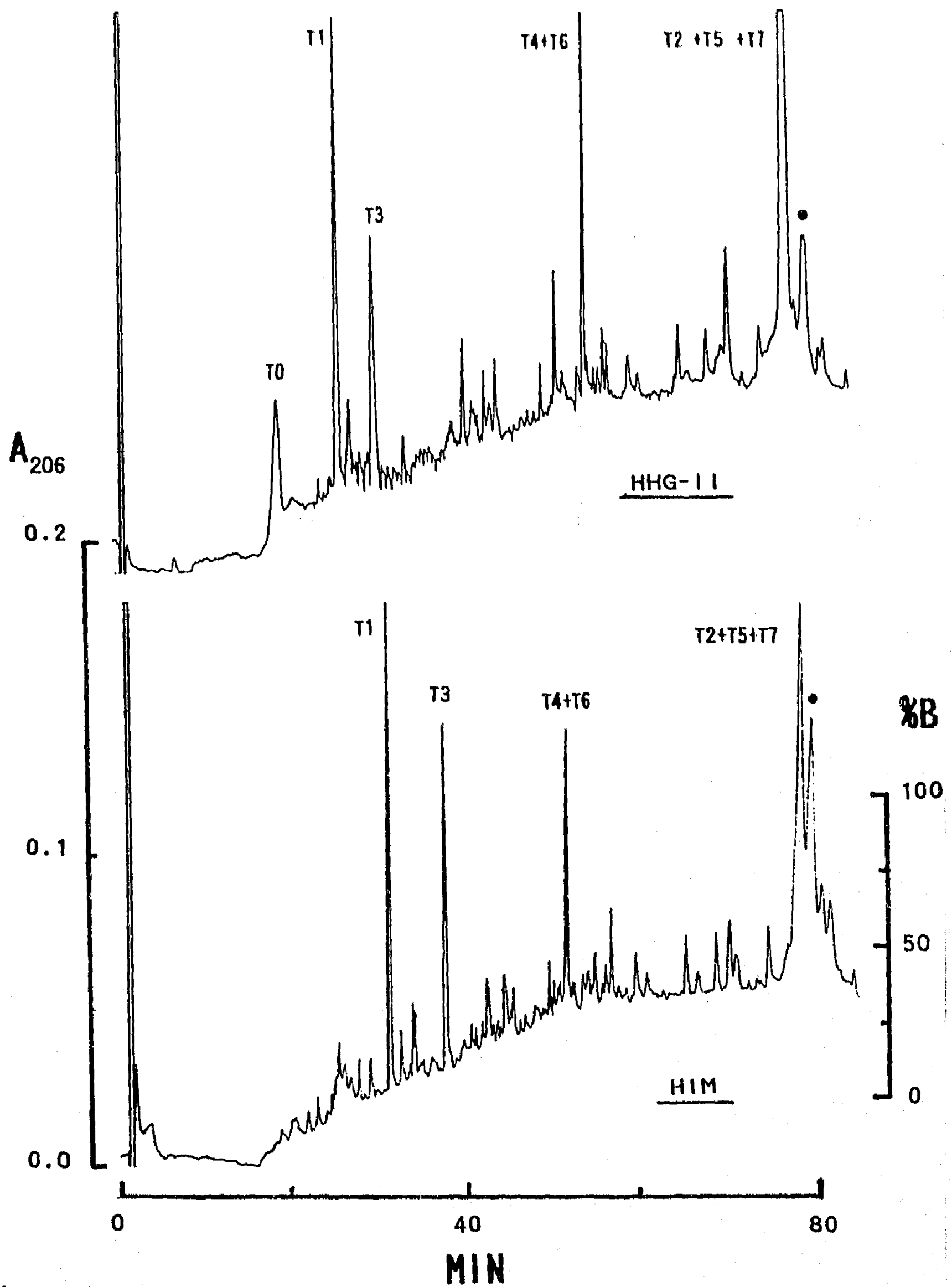


Figura 6
 Mapas trípticos de aproximadamente 4 nmol del isomorfo minoritario de la Hormona Hipergluceante (HHG-II) y de la Hormona Inhibidora de la Muda (HIM) sin haber reducido ni carboximetilado sus puentes disulfuro. Para detalles cromatográficos y explicación de la notación, ver la figura 8 del artículo No. 2 (p. 40).

de la HIM y la HHG-II sin haber sido reducidas y carboximetiladas e indica sus composiciones expresadas como el contenido en péptidos trípticos que se obtienen de las hormonas reducidas y carboximetiladas. En ambos casos, uno de los fragmentos contiene a los péptidos trípticos T4 y T6, mientras que otro está formado por T2, T5 y T7. La digestión, con la proteasa V8, de los 2 fragmentos (1 de cada hormona) que comprenden a 3 péptidos trípticos, y los análisis de extremo amino y composición de aminoácidos de los péptidos resultantes demostraron que, en cada caso, T2 está unido a la primera cisteína de T5, y que T7 se une a la segunda. Por lo tanto, las conexiones entre las cisteínas son las mismas en la HHG-II y la HIM y coinciden con las de la HHG-I (artículo No. 2), que corresponden a las posiciones 7-43, 23-39 y 26-52 de la cadena peptídica. Este tipo de arreglo se denomina I-V, II-IV, III-VI, donde los números romanos indican el número de una cisteína en la secuencia con respecto a las otras, es decir, uno de los puentes disulfuro está formado por la primera y la quinta cisteínas (I-V), que en la secuencia de la hormona ocupan las posiciones 7 y 43, respectivamente.

BUSQUEDA DE HOMOLOGIAS

Se buscó en la totalidad de la NBRF Protein Library y del GENPEPT Protein Data Bank, como se describió (artículo No. 1).

Ni la HHG-I ni los otros 3 neuropéptidos tienen homología con otras proteínas (artículo No. 2). Una excepción son algunas hormonas de crustáceos, como las HHG del cangrejo *Carcinus maenas* (49) y de la langosta *Homarus americanus* [isomorfo A e isomorfo B (95)] y la HIM de *H. americanus* (17).

CALCULO DE LA SIMILITUD EN LAS SECUENCIAS DE AMINOACIDOS

Ya que las hormonas comparadas tienen prácticamente el mismo número de residuos, no hubo necesidad de emplear algoritmos complicados para calcular el grado de similitud. Simplemente se calculó un porcentaje de similitud, dado por el cociente que resulta de dividir el número de residuos idénticos entre 2 ó más hormonas por la longitud promedio de las hormonas comparadas.

Aunque la determinación de las secuencias de aminoácidos no ha sido terminada, los datos disponibles demuestran que la similitud entre cualquier par de hormonas es muy alta, por lo menos 94.4% entre los dos isomorfos de la HHG y 83.3% entre la HHG-I y la HIM. Hasta el momento se ha encontrado sólo una posible diferencia entre los dos isomorfos de la HHG, ninguna, aparentemente, entre la HIV y la HIM, y 5 diferencias entre las HHG y el par HIV/HIM. Es necesario mencionar que ya que los cálculos anteriores se basan en la suposición poco probable de que todos los residuos dudosos y no asignados son diferentes, la similitud es seguramente mayor. En la figura 4 puede apreciarse el grado tan alto de similitud entre las 4 hormonas de *Procambarus bouvieri*, sobre todo entre las dos HHG por un lado y la HIV y la HIM por el otro.

Por comparación visual con secuencias publicadas que todavía no habían sido depositadas en las bases de datos investigadas, se encontró homología de la HHG-I de *Procambarus bouvieri* con otras hormonas de crustáceos, como las HHG del isópodo terrestre *Armadillidium vulgare* [44.1% de similitud, (72)], del cangrejo *Carcinus maenas* [61.1% de similitud, (49)], de la langosta *Homarus americanus* [isomorfo A, 83.3% de similitud, e isomorfo B, 79.2% de similitud, (95)] y del acocil *Orconectes limosus* [98.6% de similitud, (48)], las HIM de *H. americanus* [81.1% de similitud, (17)] y de *C. maenas* [25.3% de similitud, (100)], y la HIV de *H. americanus* [22.8% de similitud, (92)]. La figura 7 muestra en forma gráfica los resultados del cálculo de la similitud entre la HHG-I de *Procambarus bouvieri* y dos HIM y una HIV de otros crustáceos decápodos, mientras que la figura 8 presenta la comparación de las HHG de diferentes organismos.

En la figura 7 se puede ver que hay dos categorías dentro de la familia de neuropéptidos de la glándula sinusal de los crustáceos. Un grupo comprende a neurohormonas que tienen sus extremos amino bloqueados (excepto la HHG de *Armadillidium vulgare*) y formados por 71 a 73 residuos de aminoácido (masa molecular cercana a 8,500), como las HHG de *P. bouvieri* (artículo No. 2), *O. limosus* (48), *H. americanus* (95), *C. maenas* (49) y *Armadillidium vulgare* (72), las HIM de *H. americanus* (17) y *P. bouvieri* (figura 5 y (41)) y la HIV de *P. bouvieri* (figura 5). El otro incluye a hormonas con extremo amino libre y constituidos por 77 o 78

HIV-Hoa	ASA WFT-- ---GV M----- --E-- A-V-N --A-- --NND VGVM-
HIM-Cam	RVIND ECPNL IGNRD LYKKV EWICE DCSNI FRKTG MASLC
	- - - - -
	= = ===== = == == == == ===== = = ==
HIM-Hoa	pEVFDQ ACKGV Y DRN LFKKL DRVCE DCYNL YRKPF VATTG
HHG-I-Prb	----- ---- - --- ----- ----- ----Y -----
HIV-Hoa	KKD-- HTMW- L---Y ----H G-IDQ FRK-- S--R
HIM-Cam	RRNCF FNEDF VWCVH ATERS EELRD LEEWV GILGA GRD
	- - - - -
	= === = = == = = =====
HIM-Hoa	RENCY SNWVF RQCLD DLLLS DVIDE YVSNV QM
HHG-I-Prb	-Q--- A-S-- ----- ---- --V-- -I-G- -TV-NH ₂

Figura 7

Comparación de la HHG-I de *Procambarus bouvieri* (HHG- I-Prb) con las HIM de *Homarus americanus* (HIM-Hoa) y *Carcinus maenas* (HIM-Cam) y con la HIV de *Homarus americanus* (HIV-Hoa). Los guiones indican identidad con el residuo correspondiente en HIV-Hoa o HIM-Hoa. Las series de residuos conservados estrictamente están señalados con líneas delgadas entre las dos series de hormonas, mientras que las que, además de los residuos mencionados, incluyen sustituciones conservativas (definidas como las que no cambian a un residuo polar, cargado o sin carga, por uno no polar o viceversa) están marcadas con líneas gruesas. Para facilitar la comparación visual de las secuencias se han dejado espacios vacíos cada 5 residuos. Los puntos representan los huecos introducidos para permitir un alineamiento óptimo de las secuencias.

residuos (masa molecular alrededor de 9,200), como la HIM de *C. maenas* (100) y la HIV de *H. americanus* (92). La similitud entre los miembros de cada grupo es alta (44.1% a 98.6% en el primero y 47.7% en el segundo), pero este valor disminuye a 15% si se consideran todas las hormonas conocidas. Cabe mencionar que, para alinear a todos los residuos de Cis de los dos grupos, se introdujo un hueco del tamaño de un residuo, en la región comprendida entre la primera y la segunda Cis de las hormonas de la primera categoría (figura 7).

La HHG es una molécula muy conservada en el curso de la evolución. Cuarenta residuos (55.6%) son idénticos en las hormonas de los decápodos y 31 residuos (43.1%) se conservan si se incluye en la comparación a la hormona del isópodo; en cualquiera de los casos, el parecido aumenta notablemente si se incluyen en el cálculo a las sustituciones conservativas (figura 8).

PREDICCIÓN DE LAS ESTRUCTURAS SECUNDARIAS

Se utilizó el método de Chou y Fasman (19) con las constantes optimizadas, según el programa Antheprot (22), que incluye varios métodos de predicción. En cálculos preliminares se encontró que los resultados de los diferentes métodos producían resultados diferentes, desde un grado ligero hasta uno moderado (datos no mostrados). Ya que el método de Chou y Fasman daba resultados semejantes a la mayoría de los que los otros producían, se tomó como representativo. Se consideró que lo más importante era hacer todas las predicciones con el mismo método para tener comparaciones confiables y usar un algoritmo que fuera capaz de predecir un porcentaje alto de la estructura total de las hormonas.

Aunque la predicción de las estructuras secundarias, en general, no es muy exacta y pudo ser afectada por las secuencias incompletas o posiblemente erróneas en el caso de los neuropéptidos de *Procambarus bouvieri*, se puede ver fácilmente en la figura 9 que no hay diferencias muy grandes en las estructuras secundarias de las tres hormonas estudiadas: los dos isomorfos de la HHG y la HIM.

La figura 10 muestra las estructuras predichas de las HHG conocidas hasta la fecha. No hay diferencias notables entre las HHG de los astacuros (excepto un isomorfo de *Homarus americanus*, Hoa B), mientras que, con respecto a las anteriores, las hormonas del braquiuro *Carcinus maenas*, Cam y del isópodo *Armadillidium vulgare*, Arv, difieren aproximadamente en el mismo grado y carecen de la región helicoidal en el extremo amino y presentan hélice alfa en el extremo carboxilo en lugar de estructura beta.

	10	20	30	40
Prb I	pEVFDQ ACKGI YDRAI FKKLD RVCED CYNLY RKPYV ATTCR			
Orl	pEVFDQ ACKGI YDRAI FKKLD RVCED CYNLY RKPYV ATTCR			
Hoa A	pEVFDQ ACKGV YDRNL FKKLD RVCED CYNLY RKPFV ATTCR			
Hoa B	pEVFDQ ACKGV YDRNL FKKLN RVCED CYNLY RKPFI VTTCR			
Cam	pEIYDT SCKGV YDRAL <u>FNDLE</u> HVCDD CYNLY <u>RISYV</u> ASACR			
Arv	<u>RIFDT</u> SCKGV YDRGL <u>FAQLD</u> RVCED CYNLY <u>RKPHV</u> <u>AEACR</u>			
	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
	====	====	====	====
	50	60	70	
Prb I	QNCYA NSVFR QCLDD LLLID VVDEY ISGVQ TV-NH ₂			
Orl	QNCYA NSVFR QCLDD LLLID VLDEY ISGVQ TV-NH ₂			
Hoa A	<u>ENCYS</u> <u>NWVFR</u> QCLDD LLLSD VIDEY VSNVQ MV-NH ₂			
Hoa B	<u>ENCYS</u> <u>NRVFR</u> QCLDD LLMID VIDEY VSNVQ MV-NH ₂			
Cam	SNCYS NLVFR QCMDD LLMMD <u>EFDQY</u> <u>ARKVQ</u> MV-NH ₂			
Arv	<u>RDCYT</u> <u>TEVFE</u> <u>SCLKD</u> <u>LMMHD</u> FINEY <u>KEMAQ</u> MVS-NH ₂			
	-- -- -- -- --	-- -- -- -- --	-- -- -- -- --	-- -- -- -- --
	== = ==	=== = === =	= =	== = =

Figura 8

Comparación de la HHG-I del acocil mexicano *Procambarus bouvieri* (Prb I) con las HHG del acocil *Orconectes limosus* (Orl), de la langosta *Homarus americanus* (isomorfos Hoa A y Hoa B), del cangrejo *Carcinus maenas* (Cam) y de la cochinilla *Armadillidium vulgare* (Arv). Los residuos que difieren de los de la HHG-I del acocil mexicano están en negrillas, mientras que los que introducen, cancelan o cambian una carga positiva o negativa, con respecto a la mayoría de los residuos en una posición dada, están subrayados. Las series de residuos conservados estrictamente están señaladas con líneas delgadas debajo de la última HHG, mientras que las series que, además de los residuos mencionados anteriormente, incluyen sustituciones conservativas (definidas como las que no cambian un residuo polar, cargado o sin carga, por uno no polar o viceversa) están marcadas con líneas dobles.

```

QVFDQ ACKGI YDRAI FKKLD RVCED CYNLY RKPVY ATTCR
cccc c[[[[ cccc cccc [[ [///// // [/////
QVFNQ ACKGI YDRAI FKKLD RVCED CYNLY RKPVY ATTCR
cccc c[[[[ cccc cccc [[ [///// // [/////
QVFDQ ACKGI YDRAI FKKLE LVCDD CYNLY R___V ATTCR
cccc c[[[[ cccc ccccc cc[[[ [///// // [/////
-----

```

```

QNCYA NSVFR QCLDD LLLID VVDEY ISGVQ TV HHG-I
[[[[ [ [/// //ccc ccc// //
QNCYA NSVFR QCLDD LLLID VVDEY ISGVQ T HHG-II
[[[[ [ [/// //ccc ccc// //
ENCYA NSVFR QCLDD LLLIN VVDEY ISGVQ MIH
  [ [ [/// //ccc ccc// //
  --

```

Figura 9

Predicción de estructuras secundarias para los dos isomorfos de la HHG y la HIM de *Procambarus bouvieri*. Se utilizó el programa Antheprot (22) con el método de Chou y Fasman (19) con las constantes optimizadas. Los residuos que difieren de los correspondientes en la HHG-I están indicados con negrillas y aquellos cuya asignación es dudosa se encuentran subrayados. Las series de residuos que tienen la misma estructura (c= hélice alfa, /= estructura beta, [= giros beta) en las 3 hormonas están señalados con líneas delgadas en la parte inferior de la figura. Dado que sólo se conocen 70 residuos de la HIM y con el fin de obtener datos más comparables, no se incluyeron en la predicción los últimos dos residuos (posiciones 71 y 72) de la HHG-I ni el último residuo conocido (posición 71) de la HHG-II; esto está indicado con la línea de guiones verticales. Debido a que el programa no admite modificaciones postraduccionales, se introdujo un residuo de glutamina como extremo amino en lugar del de ácido piroglutámico que está presente en las hormonas; se consideró que la glutamina es más parecida al ácido piroglutámico que el ácido glutámico, ya que los dos primeros no tienen carga y el último sí tiene. Los tres residuos subrayados juntos en la HIM no se conocen con certeza, pero la predicción con todas las secuencias posibles (KPK, KPR, RPK y RPR) dió el mismo resultado.

DISCUSION

El primer indicio de la existencia de una familia de neurohormonas en *Procambarus bouvieri* fue la semejanza relativa en hidrofobicidad entre 4 péptidos (moderadamente hidrofóbicos) que se separaban claramente y en forma reproducible del resto del contenido de los extractos de glándulas sinusales en la cromatografía líquida de alta presión en fase reversa en una columna uBondapak-Phenyl(Waters)(4,38). Dichos péptidos podían ser obtenidos puros en un solo paso de cromatografía si se evitaba recolectar los valles entre los picos; su pureza fue demostrada mediante la recromatografía y los análisis de extremo amino y de pl (4,38,39,41).

Mediante bioensayos homólogos y heterólogos *in vivo* e *in vitro* se ha demostrado que los neuropéptidos corresponden, en el orden de elución, a la hormona inhibidora de la vitelogenénesis u hormona inhibidora de las gónadas (HIV) (artículo No. 1), a la hormona inhibidora de la muda (HIM) (41) y a dos isomorfos de la hormona hipergluceante (HHG) (4,38) (figura 2, pág. 44). Durante este trabajo se encontró que el péptido que en las hembras tiene la función de la HIV está presente también en la glándula sinusal de los machos. Esto concuerda con estudios que no reportaron diferencias entre la HIV de las hembras y la hormona inhibidora de las gónadas de los machos. Es más, se ha encontrado en otras especies que el número de neuronas productoras de este neuropéptido es el mismo en ambos sexos (56); en los machos, podría tener también un papel importante en la regulación de la reproducción.

El segundo indicio de la semejanza entre los 4 neuropéptidos lo había aportado el estudio de sus masas moleculares mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato de sodio, donde la HIM (41) y las HHG (39) se comportaron como moléculas con masas cercanas a 6,000 Da. El parecido fue confirmado posteriormente en este trabajo mediante espectrometría de masas [tabla 1, pág. 47; artículo No. 2] y extendido a la HIV (artículo No. 1); las 4 hormonas tienen masas comprendidas entre 8,300 y 8,400 Da.

Los datos de composición de aminoácidos de las HHG (4,39) y de la HIM (41) habían proporcionado el tercer criterio de parecido entre dichas hormonas. Estos resultados eran erróneos debido a que fueron calculados con base en masas moleculares de 6,000 Da y condujeron a pensar que las moléculas eran de menor longitud (20 residuos menos, aproximadamente) que la real y a calcular que el péptido tríptico carboxilo terminal comprendía sólo 8 residuos (41). También se pensaba que las HHG y la HIM contenían solamente 4 residuos de Cis (39, 41). Sin embargo, las semejanzas que se habían encontrado se mantuvieron cuando se calcularon las composiciones de acuerdo con los valores para las masas que resultaron de la espectrometría de masas (tabla 2, pág. 48; artículos No. 1 y 2).

La comparación de los mapas trípticos de las HHG (40) y de la HIM (41) mediante cromatografía líquida de alta presión en fase reversa había indicado que la semejanza global en composición llegaba hasta el nivel de la secuencia de aminoácidos (5). Durante el estudio de la HIV (artículo No. 1; figura 4, pág. 50) se comprobó que lo mismo se aplica a esta hormona y que los aminoácidos contenidos en los péptidos trípticos comunes a las 4 hormonas corresponden al 21% de los residuos de cada una de ellas. Se tuvo la certeza de que el parecido en secuencia debía ser mucho mayor cuando se encontró que había pares de péptidos (uno de cada una de dos hormonas dadas) que diferían en sus tiempos de retención en grado variable (figura 4, pág. 50), pero que tenían composiciones de aminoácidos muy parecidas (tabla 3, pág. 52).

Si la hipótesis de que la posición 4 de la HHG-II corresponde a un residuo de Asn es correcta, los isomorfos de la HHG parecerían diferir solamente en la posición 4, que se encuentra en los péptidos trípticos que son diferentes en cuanto a tiempo de retención. La asignación de esta posición como Asn en la HHG-II y como Asp en la HHG-I implica que debe existir otra diferencia en los 3 últimos residuos de la HHG-II, ya que ambos isomorfos tienen el mismo pI (39) y la Asn de la posición 4 de la HHG-II requeriría la desamidación de otro residuo para mantener el pI. Dada la naturaleza de los últimos residuos de la HHG-II, podría considerarse la posibilidad de que la Gln-70 o la Val-amida-72 fueran ácidos en la HHG-II o que la Tre-71 estuviera sustituida por

Asp o Glu en la HHG-II; esto último queda descartado por la presencia de Tre en el péptido tríptico carboxilo terminal de la HHG-II (tabla 3, pág. 52). Por otra parte, la presencia de un residuo ácido en el péptido carboxilo terminal de la HHG-I en comparación con un residuo amidado en el péptido correspondiente de la HHG-II podría no contribuir de manera significativa a una diferencia en hidrofobicidad entre dos péptidos desnaturalizados de 22 residuos pero sí afectar la hidrofobicidad de la HHG-II nativa.

Hasta este momento no es posible decir si los 2 isomorfos de la HHG se originan por modificaciones postraduccionales o si provienen de 2 genes distintos (5,39,40), como ocurre en *Homarus americanus* (95); podría pensarse que lo último es más probable, ya que las HHG conocidas hasta la fecha (17,48,49,72,92,95,100) no presentan alteraciones postraduccionales adicionales a la modificación de los extremos amino y carboxilo. Como no se han encontrado uniones intrón-exón en las regiones codificadoras de los genes de las HHG de *C. maenas* (99) y *Homarus americanus* (95), tampoco es muy probable que el procesamiento alternativo del ARNm sea el mecanismo responsable del polimorfismo de la HHG.

Con respecto a la secuenciación de la HIV, la HIM y la HHG-II, no se juzgó necesario producir juegos de péptidos traslapantes para establecer el orden de los péptidos trípticos en las hormonas intactas. Se consideró que el orden debía ser el mismo que en la HHG-I debido a la homología de ésta con cada una de las otras hormonas, que era evidente a partir de los datos de masa molecular, composición de aminoácidos, mapas trípticos y composición y secuencia de los péptidos trípticos.

Como se mencionó, debe haber diferencias entre la HIV y la HIM, ya que se separan fácilmente en la cromatografía líquida de alta presión en fase reversa. Es muy probable que la(s) diferencia(s) se encuentre(n) en el extremo carboxilo, ya que un sólo residuo del péptido tríptico carboxilo terminal (que comprende 22 residuos y cuya secuencia en el caso de la HIV no se conoce) podría causar la diferencia en hidrofobicidad entre las hormonas intactas. La contribución de un sólo residuo a la hidrofobicidad podría no ser significativa en fragmentos muy hidrofóbicos y desnaturalizados como son los péptidos trípticos carboxilo

terminales de ambas hormonas y por lo que dichos péptidos podrían ser indistinguibles en la cromatografía líquida de alta presión en fase reversa.

Las secuencias de aminoácidos conocidas hasta el momento (figura 5, pág. 54) permiten explicar algunas de las diferencias que se observan en los mapas tripticos y en las hormonas intactas de los 2 grupos de hormonas, las dos HHG por una parte y la HIV y la HIM por la otra, que forman la familia de neuropéptidos. La Asn-4 de la HHG-II en relación con el Asp-4 de la HHG-I concuerda con la mayor hidrofobicidad del péptido triptico T4 de la primera y también podría explicar la mayor retención de la hormona intacta. La diferencia en la posición 21, Arg en las HHG y Leu en el par HIV/HIM, puede explicar la hidrofobicidad menor del péptido triptico T5' de las HHG en relación con el fragmento correspondiente, T5, de las otras hormonas; las diferencias en las posiciones 20 (Asp en las HHG y Glu en el par HIV/HIM) y 24 (Glu en las HHG y Asp en el par HIV/HIM) pueden considerarse nulas, ya que son recíprocas. La diferencia en la posición 41 (Gln en las HHG y Glu en el par HIV/HIM) no produjo una distinción clara en los fragmentos T6, pero la polaridad mayor del Glu podría contribuir a la menor hidrofobicidad del par HIV/HIM). La Asn-60 en la HIV/HIM concuerda con la mayor retención del péptido triptico T7 de estas hormonas en relación a los de las HHG, en que esta posición corresponde a un residuo de Asp.

Hasta este punto no parece haber explicación convincente de la menor hidrofobicidad del par HIV/HIM. Sin embargo, hay evidencia de que la posición 34, que en las HHG está ocupada por un residuo de Tir, corresponde a un residuo básico en el par HIV/HIM; esto se deduce de la observación de que el péptido triptico T2 se produce cuantitativamente en las digestiones de corta duración del par HIV/HIM, mientras que T2b, que es idéntico al T2 mencionado, sólo se produce en grado apreciable en digestiones muy largas de las HHG, por el efecto de la -tripsina, como ya se mencionó [figura 2 del artículo No. 2, pág. 36]. Por otra parte, un residuo básico en la posición 34 del par HIV/HIM estaría de acuerdo con el pI mayor de la HIM en relación a las HHG (41). Con respecto a la diferencia entre los miembros del par HIV/HIM, la menor hidrofobicidad de la HIV podría serle conferida por algún(os) residuo(s) localizado(s)

en el péptido tríptico carboxilo terminal como ya se indicó, o en la región que comprende a los residuos 32 a 34 que no se conoce en ninguna de dichas hormonas.

Si se considera que el caso de *P. bouvieri* es similar al de *C. maenas* en cuanto a la ausencia de intrones en el gen de la HHG (95,99), entonces las diferencias en secuencia de aminoácidos que se observan en la figura 5, pág. 54, (Asp-20 y Arg-21 en las HHG son, respectivamente, Glu-20 y Leu-21 en la HIV y la HIM) permiten concluir que hay por lo menos 2 genes que producen la familia de neuropéptidos, ya que dichas diferencias no pueden originarse mediante modificaciones postraduccionales. Uno de ellos codificaría las HHG, mientras que el otro dictaría la producción de la HIV y de la HIM. En ambos casos sería necesaria la intervención de las modificaciones postraduccionales para generar a una o a las dos hormonas a partir del producto primario de la traducción; sin embargo, como ya se mencionó, la intervención de las modificaciones postraduccionales como medio para generar a otros miembros de la familia de neurohormonas parece poco probable. Tomando en cuenta esto último, es posible que en ambos casos exista otro gen relacionado que codifique al otro miembro del par. Es bien conocido que la duplicación génica a partir de un gen primitivo y la evolución divergente es un mecanismo común de generación de multiplicidad estructural y funcional en las hormonas (2,74). Este proceso y la expresión génica diferencial (46) explicaría la observación de una localización selectiva de los distintos péptidos de esta familia (24,25,81) y de sus ARNm (56,66,81) en diferentes somas neuronales, axones y terminales axónicas del sistema neurosecretor del tallo ocular de los crustáceos.

Los valores de la similitud entre las HHG de los distintos crustáceos concuerdan con las distancias filogenéticas entre ellos, establecidos de acuerdo a criterios morfológicos (83). Los valores más bajos corresponden a especies que pertenecen a infraórdenes diferentes y las diferencias concuerdan con las variaciones en la movilidad observadas en la electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante (52) y con los estudios de la actividad hiperglucemiante interespecífica. Con respecto al último punto, se ha encontrado que la inyección de extractos de tallos oculares de braquiuros no tiene (o tiene muy poca) actividad en los astacuros

y vice versa (54,55). Además, la hormona de un decápodo (*C. maenas*) no tiene actividad en un isópodo (*P. dilatatus*)(71); esto está de acuerdo con el grado de similitud entre las hormonas de *C. maenas* y el isópodo terrestre *A. vulgare* (56.6%), que es más bajo que el de cualquier par de hormonas de organismos acuáticos.

Se encontró que de las 10 posiciones dentro de la moléculas de la HHG de los crustáceos acuáticos donde hay supresión, introducción o cambio de carga con respecto a la mayoría de los residuos en esa posición dada, 4 pueden ser importantes para la interacción con el receptor hormonal (artículo No. 2; figura 8, pág. 61). En las posiciones 61, 64, 67 y 68, la carga es del mismo tipo en las hormonas de los astacuros, mientras que hay un cambio notable en la hormona del cangrejo (braquiuro). Estos residuos podrían estar muy cerca unos de los otros en la estructura tridimensional (figura 11, pág. 70), lo que puede significar que tales posiciones son responsables de los resultados encontrados en los estudios de actividad hiperglucemiante interespecífica mencionados anteriormente. Cuando se compara la HHG del isópodo con las de los decápodos, se observa diferencia de carga en 8 posiciones más (figura 8, pág. 61); alguna(s) de estas posiciones podría(n) ser la(s) responsable(s) de la ausencia de actividad cruzada que se ha mencionado (71).

Por otra parte, los residuos o series de residuos conservados podrían explicar la reactividad cruzada que se ha observado en estudios radioinmunoanalíticos e inmunocitoquímicos (55,56), de los cuales es notable la cuantificación y localización tisular de la HHG en un isópodo mediante un anticuerpo producido contra la hormona de un decápodo (70,94). En otro contexto, las regiones conservadas podrían ser fundamentales en la determinación y mantenimiento de las estructuras secundaria y terciaria. Mediante la predicción de la estructura secundaria y del modelaje preliminar se ha encontrado que tales regiones pueden tener estructuras (como hélice alfa, estructura beta paralela y antiparalela, giros beta y estructuras irregulares) iguales o muy parecidas en las hormonas de los decápodos [figura 9, pág. 62; figura 10, pág. 63]. Estas estructuras han sido observadas en las hormonas de *P. bouvieri* por medio del dicroísmo circular (42).

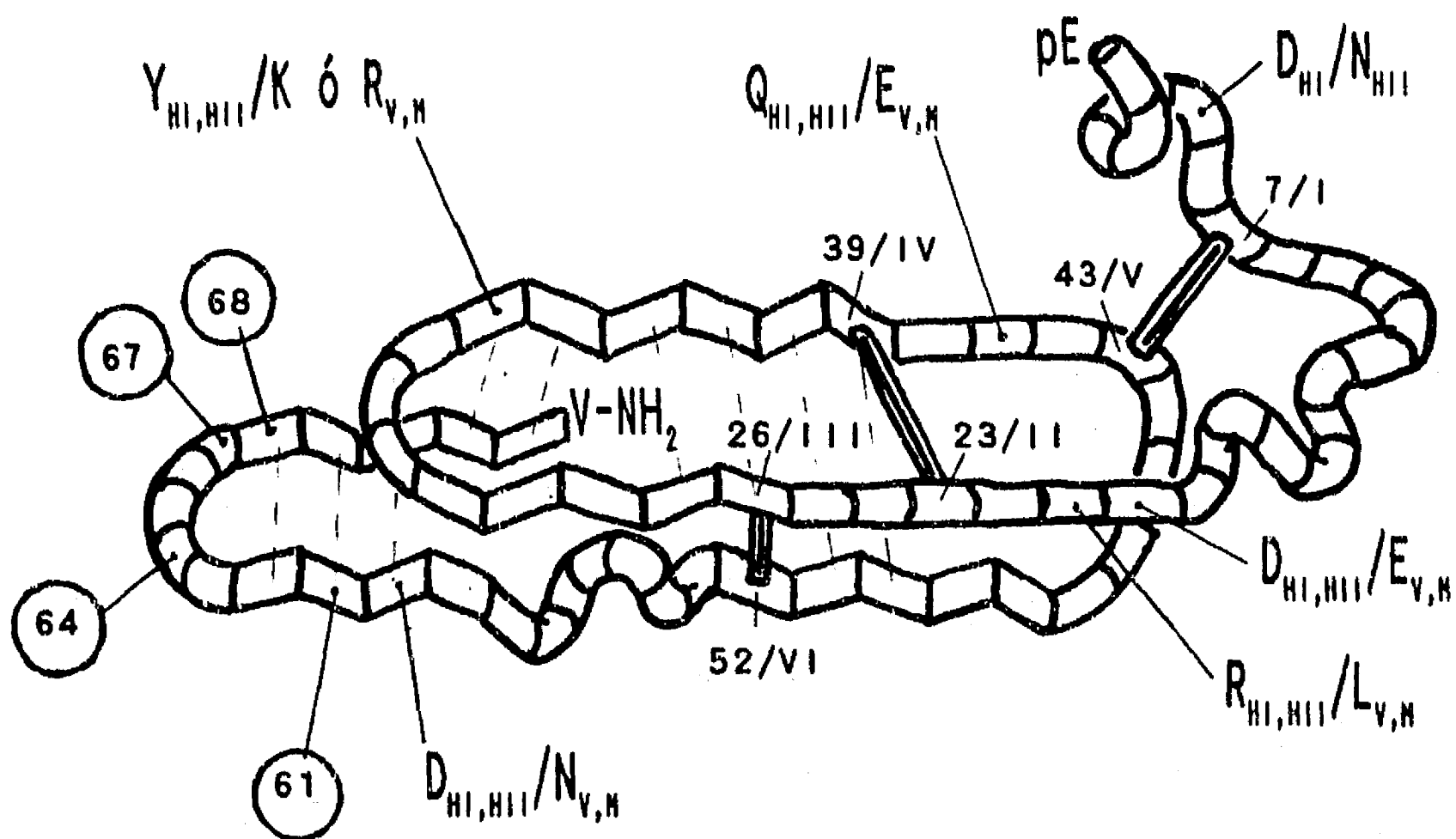


Figura 11

Modelo preliminar de la estructura terciaria de la HHG-I (H1), la HHG-II (H2), la HIV (V) y la HIM (M) de *Procambarus bouvieri* (Ortmann). Basado en las conexiones entre las cisteínas y en la predicción de regiones con estructura helicoidal alfa y de hoja beta plegada según el método de Chou y Fasman (19), mediante el programa Antheprot (22). Las posiciones absolutas de las cisteínas están señaladas con los números arábigos 7, 23, 26, 39, 43, 52, y el orden de las cisteínas en la secuencia está indicado con números romanos (I, II, III, IV, V, VI). Los residuos que difieren entre las distintas hormonas de *Procambarus bouvieri* están indicados con el subíndice de la hormona correspondiente. Las posiciones donde hay diferencias notables de carga entre las hormonas de los astacuros y las de los braquiuros (figura 8) están señaladas con números encerrados en círculos.

La correlación entre la cantidad de la estructura de hélice alfa calculada a partir de los datos del diroísmo circular [HHG-I, 27%; HHG-II, 33% (tabla 1 de (42))] y la predicha (figura 9, pág. 62, 27% para ambas HHG) es buena para el caso de los dos isomorfos de la HHG, que en ambos casos presentaron un parecido muy grande. Esto concuerda con la observación de que los dos isomorfos de la HHG tienen el mismo grado de actividad hiperglucemiante (figura 3, pág. 46). Sin embargo, las cantidades de hélice alfa y estructura beta predicha para la HIM son prácticamente iguales a las de las HHG.

La semejanza estructural predicha entre las HHG y la HIM no se contrapone necesariamente a la diferencia en sus actividades biológicas. Es posible que dos péptidos muy semejantes en sus estructuras secundaria (y terciaria) puedan ser distinguidos por sus correspondientes receptores debido a diferencias de carga en regiones pequeñas expuestas de dichos péptidos (figura 11, pág 70); diferencias de esta naturaleza han sido encontradas entre las HHG y la HIM (figura 5, pág. 54), como ya se discutió.

Hasta el momento, los diferentes miembros de esta familia de neurohormonas en un organismo dado pertenecen a distintas categorías (pág. 58 de esta Tesis). Es decir, las HHG de *Homarus americanus* y de *Carcinus maenas* pertenecen al primer grupo, mientras que la HIV y la HIM de dichos organismos, respectivamente, se clasificarían dentro del segundo grupo. Sin embargo, en el caso de *Procambarus bouvieri* todo indica que tanto la HIV como la HIM pertenecerán al mismo grupo que la HHG-I.

Es importante mencionar que 6 (40%) de los 15 aminoácidos conservados en las 9 hormonas de la familia corresponden a residuos de Cis. El tipo de puentes disulfuro I-V, II-IV y III-VI es el único que ha sido encontrado en los péptidos de *C. maenas* (49), *Armadillidium vulgare* (72) y *P. bouvieri* [figura 6, pág. 55; artículo No. 2], por lo que esta conectividad podría ser común a todos los miembros de esta familia de neurohormonas y constituir una característica fundamental de sus estructuras tridimensionales. La presencia de 3 puentes disulfuro en moléculas pequeñas como las hormonas mencionadas impone restricciones conformacionales muy grandes en sus estructuras (figura 11, pág. 70). Los integrantes de

esta familia de neuropéptidos son las únicas hormonas de crustáceos que poseen residuos de cisteína y puentes disulfuro (53). Es más, dentro de los artrópodos, el arreglo I-V, II-IV y III-VI sólo se ha reportado en la hormona de la eclosión de *Manduca sexta* (47), que pertenece a un grupo taxonómico muy cercano a los crustáceos, los insectos.

CONCLUSIONES

- Se identificó, se purificó y se caracterizó parcialmente a la Hormona Inhibidora de la Vitelogenesis (HIV) del acocil mexicano *Procambarus bouvieri* (Ortmann).
- Se demostró que la HIV pertenece a la misma familia de neuropéptidos que, en *Procambarus bouvieri*, incluye a la Hormona Inhibidora de la Muda (HIM) y a dos isomorfos de la Hormona Hiperglucemiante (mayoritario, HHG-I, y minoritario, HHG-II).
- Se determinó la secuencia de aminoácidos completa de la HHG-I y, parcialmente, las de la HIV, la HIM y HHG-II. Todas las hormonas consisten de una sola cadena peptídica. La HHG-I, y posiblemente las otras tres hormonas también, está formada por 72 residuos de aminoácido. Las estructuras incluyen 6 cisteínas que forman tres puentes disulfuro entre las posiciones 7-43, 23-39 y 26-52. Todas las hormonas tienen un residuo de ácido piroglutámico como extremo amino. El extremo carboxilo de la HHG-I, y probablemente el de los otros neuropéptidos, es un residuo de valinamida.
- Las masas moleculares de las cuatro hormonas están comprendidas entre 8,300 y 8,400 Da.
- Se correlacionaron los datos fisiológicos, y estructurales y se propusieron explicaciones de las semejanzas y diferencias, en dichos aspectos, entre las cuatro hormonas.
- Existen por lo menos dos genes que codifican a esta familia de neurohormonas.

- Se confirmó que el elevado grado de similitud que se había observado entre todas las hormonas mencionadas se extiende hasta la secuencia de aminoácidos y tiene valores de por lo menos 83.3% entre los isomorfos de la HHG y mayores al 94.4% entre la HHG-I y la HIM.
- Se encontró que esta familia de neuropéptidos no tiene homología con ninguna proteína cuya secuencia hubiera sido depositada hasta mediados de 1991, excepto otras neurohormonas de crustáceos estudiadas por otros grupos. Así pues, las cuatro hormonas representan una familia de proteínas conocida sólo en los crustáceos.
- Se comparó la secuencia de la HHG-I de *Procambarus bouvieri* con las de otros organismos y se relacionaron con los datos fisiológicos e inmunocitoquímicos de la literatura. Se comprobaron las relaciones taxonómicas establecidas con base en criterios morfológicos y se propusieron cuatro residuos que posiblemente interactúan con el receptor hormonal.
- Se encontró que, por sus características de elución en cromatografía líquida de alta presión en fase reversa, el péptido que en las hembras tiene la función de la HIV está presente también en los machos, en los que probablemente regula alguna(s) función(es) reproductiva(s).
- No se encontró diferencia significativa entre los dos isomorfos de la HHG en cuanto al efecto hiperglucemiante debido a la glucogenólisis en el hepatopáncreas y en el músculo.

BIBLIOGRAFIA

1. Abramowitz, A. A., Hisaw, F. L. and Papandrea, D. N. The occurrence of a diabetogenic factor in the eyestalk of crustaceans. *Biol. Bull. (Woods Hole)* 86: 1-5 (1944).
2. Acher, R. Evolution of neuropeptides. *Trends Neurosci.*, Septiembre: 225-229 (1981).
3. Adiyodi, R. G. Reproduction and its control. En: *The Biology of Crustacea*, Vol. 9, pp. 147-215, (D.E. Bliss y L.S. Mantel, eds.). Academic Press, New York (1985).
4. Aguilar, M. B. Aislamiento, purificación y caracterización parcial de la hormona hiperglucemiante de *Procambarus bouvieri* (Ortmann). Tesis Profesional. Facultad de Química, Universidad Veracruzana, Xalapa (1986).
5. Aguilar, M. B. Estudio de varios neuropéptidos de *Procambarus bouvieri* (Ortmann). Tesis de Maestría. Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D. F. (1989).
6. Alexandrowitz, J. S. Nervous organs in the pericardical cavity of the decapod Crustacea. *J. Mar. Biol. Assoc. UK* 31: 563-580 (1953).
7. Alexandrowitz, J. S. and Carlisle, D. B. Some experiments on the function of the pericardical organs in Crustacea. *J. Mar. Biol. Assoc. UK* 32: 175-192 (1953).
8. Allen, G. Sequencing of proteins and peptides, (T.S. Work y R.H. Burdon, eds.). Elsevier/North Holland, Amsterdam (1981).
9. Andrew, R. D., Orchard, I. and Saleuddin, A. S. Structural reevaluation of the neurosecretory system in the crayfish eyestalk. *Cell Tiss. Res.* 190: 235-246 (1978).
10. Bauchau, A. G., Mengeot, J. C. and Olivier, M. A. Action de la sérotonine et de l'hormone diabétogene des crustacés sur la phosphorylase musculaire. *Gen. Comp. Endocrinol.* 11: 132-138 (1968).
11. Beltz, B. S. Crustacean neurohormones. En: *Endocrinology of Selected Invertebrate Types*, Vol. 2, pp. 235-258, (H. Laufer y R.G.H. Downer, eds.). Alan R. Liss Inc. New York (1988).

12. Berdeja, G. Y. Significado de las respuestas glucemiantes en *Procambarus bouvieri* (Ortmann). Tesis Profesional. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, p. 47 (1972).
13. Bliss, D. E. Metabolic effects of sinus gland or eyestalk removal in the land crab, *Gecarcinus lateralis*. *Anat. Rec.* 111: 502-503 (1951).
14. Carlisle, D. B. and Knowles, F. G. W. Neurohaemal organs in crustaceans. *Nature* 172: 404 (1953).
15. Carlisle, D. B. and Knowles, F. G. W. Endocrine control in crustaceans. Cambridge University Press. London and New York (1959).
16. Chang, E. S. and O'Connor J. D. Crustacea: Molting. En: *Endocrinology of Selected Invertebrate Types*, Vol. 2, pp. 235-258 (H. Laufer y R.G.H. Downer, eds.). Alan R. Liss Inc. New York (1988).
17. Chang, E. S., Prestwich, G. D. and Bruce, M. J. Amino acid sequence of a peptide with both molt-inhibiting and hyperglycemic activities in the lobster, *Homarus americanus*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 171: 818-826 (1990).
18. Charniaux-Cotton, H. Vitellogenesis and its control in Malacostracan Crustacea. *Am. Zool.* 25: 197-206 (1985).
19. Chou, P. and Fasman, G. D. Prediction of protein conformation. *Biochemistry* 13: 222-245 (1974).
20. Christ, B. Untersuchungen zur Charakterisierung und zur hormonellen Regulation von cAMP und cGMP abhängigen Proteinkinasen des Flußkrebsses, *Orconectes limosus*. Thesis. University of Bonn, Bonn (1984).
21. Cooke, I. and Sullivan, R. E. Hormones and neurosecretion. En: *The Biology of Crustacea/Neurobiology: Structure and function*, Vol. 3, pp. 205-290 (D. Bliss, ed.). Academic Press, New York (1982).
22. Delèage, G. Programa Antheprot versión 3.0 (1990).
23. Dieberg, G. and Sedlmeier, D. Properties of crayfish abdominal muscle adenylate cyclase. *Comp. Biochem. Physiol.* 77B: 687-691 (1984).

24. Dircksen, H. Fine structure of the neurohemal sinus gland of the shore crab, *Carcinus maenas*, and immuno-electron-microscopic identification of neurosecretory endings according to their neuropeptide contents. *Cell Tissue Res.* 269: 249-266 (1992).
25. Dircksen, H., Webster, S. G. and Keller, R. Immunocytochemical demonstration of the neurosecretory systems containing moult-inhibiting hormone and hyperglycemic hormone in the eyestalk of brachyuran crustaceans. *Cell Tissue Res.* 251: 3-12 (1988).
26. Eastman-Reks, S. and Fingerman, M. Effects of neuroendocrine tissue and cyclic AMP on ovarian growth *in vivo* and *in vitro* in the fiddler crab, *Uca pugilator*. *Comp. Biochem. Physiol.* 79A: 679-684 (1984).
27. Eastman-Reks, S. and Fingerman, M. *In vitro* synthesis of vitellin by the ovary of the fiddler crab *Uca pugilator*. *J. Exp. Zool.* 233: 111-116 (1985).
28. Evans, P. D., Kravitz, E. A., Talamo, B. R. and Wallace, B.G. The association of octopamine with specific neurons along lobster nerve trunks. *J. Physiol. (London)* 262: 51-70 (1976).
29. Evans, P. D., Kravitz and E. A., Talamo, B. R. Octopamine release at two points along lobster nerve trunks. *J. Physiol. (London)* 262: 71-89 (1976).
30. Fernlund, P. Structure of a light-adapting hormone from the shrimp, *Pandalus borealis*. *Biochim. Biophys. Acta* 439: 17-25 (1976).
31. Fernlund, P. and Josefsson, L. Crustacean color-change hormone: amino acid sequence and chemical synthesis. *Science* 177: 173-175 (1972).
32. Fielder, D. R., Rao, K. R. and Fingerman, M. A female-limited lipoprotein and the diversity of hemocyanin components in the dimorphic variants of the fiddler crab, *Uca pugilator*, as revealed by disc electrophoresis. *Comp. Biochem. Physiol.* 39B: 291-297 (1971).
33. Fingerman, M., Dominiczak, T., Miyawaki, A., Oguro, C. and Yamamoto, Y. Neuroendocrine control of the hepatopancreas in the crayfish *Procambarus clarkii*. *Physiol. Zool.* 40: 23-30 (1967).
34. Gabe, M. "Neurosecretion" Pergamon Press, Oxford (1966).

35. Gorell, T. A. and Gilbert, L. Protein and RNA synthesis in premolt crayfish, *Orconectes virilis*. *Z. Vergl. Physiol.* 73: 345-356 (1971).
36. Hanström, B. Neue untersuchungen über sinnesorgane und nervensystem der crustaceen. *Z. Morphol. Okol. Tiere* 23: 80-236 (1931).
37. Huberman, A. Hormonal control of molting in crustaceans. En: *Progress in Comparative Endocrinology*, Vol. 342 of *Progress in Clinical and Biological Research*. A. Epple, C. G. Scanes and M. H. Stetson, ed. Wiley-Liss, N. Y. 1990 pp. 205-210
38. Huberman, A. and Aguilar, M. B. A neurosecretory hyperglycemic hormone from the sinus gland of the Mexican crayfish *Procambarus bouvieri* (Ortmann). I. Purification and biochemical characterization of the most abundant form of the hormone. *Comp. Biochem. Physiol.* 85B: 197-203 (1986).
39. Huberman, A. and Aguilar, M. B. A neurosecretory hyperglycemic hormone from the sinus gland of the Mexican crayfish *Procambarus bouvieri* (Ortmann). II. Structural comparison of two isoforms of the hormone. *Comp. Biochem. Physiol.* 91B:345-349; 1988.
40. Huberman, A. and Aguilar, M. B. Single step purification of two hyperglycaemic neurohormones from the sinus gland of *Procambarus bouvieri*. Comparative peptide mapping by means of high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 443: 337-342; 1988.
41. Huberman, A. and Aguilar, M. B. A neuropeptide with molt-inhibiting hormone activity from the sinus gland of the Mexican crayfish *Procambarus bouvieri* (Ortmann). *Comp. Biochem. Physiol.* 93B:299-305; 1989.
42. Huberman, A., Hernández-Arana, A., Aguilar, M. B. and Rojo-Domínguez, A. Secondary structure of a crustacean neuropeptide family by means of CD. *Peptides* 10: 1113-1115 (1989).
43. Hunt, D. F., Alexander, J. E., McCormack, A. L., Martino, P. A., Michel, H., Shabanowitz, J., Sherman, N., Moseley, M. A., Jorgerson, J. W. and Tomer, K. B. Mass spectrometric methods for protein and peptide sequence analysis. In: *Techniques in protein chemistry II* pp. 441-454 (Edited by Villafranca, J. J.). Academic Press, New York (1991).

44. Jugan, P. Régulation de la croissance ovocytaire chez le crustacé *Macrobrachium rosenbergii* (de Man). Démonstration d'une endocytose par récepteurs et approche du mode d'action de la neurohormone inhibitrice de la vitellogénèse. Thèse Doctorat de l'Université Pierre et Marie Curie, Paris. pp. 1-68 (1985).
45. Jugan, P. and Soyez, D. Démonstration *in vitro* de l'inhibition de l'endocytose ovocytaire par un extrait de glandes du sinus chez la crevette *Macrobrachium rosenbergii*. Cr. Acad. Sci., Paris 300: 705-709 (1985).
46. Kakita, K., Giddings, S. and Permutt, M. A. Biosynthesis of rat insulins I and II. Evidence for differential expression of the two genes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79: 2803-2807 (1982).
47. Kataota, H., Li, J. P., Lui, A. S. T., Kramer, S. J. and Schooley, D. A. Complete structure of eclosion hormone of *Manduca sexta*. Int. J. Pept. Prot. Res. 39: 29-35 (1992).
48. Kegel, G., Reichwein, B., Tensen, C. and Keller, R. Amino acid sequence of crustacean hyperglycemic hormone (CHH) from the crayfish, *Orconectes limosus*: Emergence of a novel neuropeptide family. Peptides 12: 909-913 (1991).
49. Kegel, G., Reichwein, B., Weese, S., Gaus, G., Peter-Katalinic, J. and Keller, R. Amino acid sequence of the crustacean hyperglycemic hormone (CHH) from the shore crab, *Carcinus maenas*. FEBS Lett. 255: 10-14 (1989).
50. Keller, R. Über eine hormonale Kontrolle des Polysaccharide Stoffwechsels beim Flußkrebis *Cambarus affinis* Say. Z. Vergl. Physiol. 51: 49-59 (1965).
51. Keller, R. Über eine hormonale Regulation der Glycogensynthese beim Flußkrebis *Orconectes limosus*. Verh. Deutsch Zool. Ges. Zool. Anz. Suppl. Bd. 30: 272-273 (1966).
52. Keller, R. Comparative electrophoretic studies of crustacean neurosecretory hyperglycemic and melanophore-stimulating hormones from isolated sinus glands. J. Comp. Physiol. 122: 359-373 (1977).
53. Keller, R. Crustacean neuropeptides: Structures, functions and comparative aspects. Experientia 48: 439-448 (1992).

54. Keller, R. and Andrew, F. M. The site of action of the crustacean hyperglycemic hormone. *Gen. Comp. Endocrinol.* 20: 572-578 (1973).
55. Keller, R.; Jaros, P. P. and Kegel, G. Crustacean hyperglycemic neuropeptides. *Amer. Zool.* 25: 207-221 (1985).
56. De Kleijn, D. P. V., Coenen, T., Laverdure, A. M., Tensen, C. P. and Van Herp, F. 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 (1992).
57. Kleinholz, L. H. Crustacean neurosecretory hormones and physiological specificity. *Amer. Zool.* 16: 151-166 (1976).
58. Kleinholz, L. H. Biochemistry of crustacean hormones. En: *The biology of Crustacea Vol. 9*, pp. 463-522 (D. Bliss y L.H. Mantel, eds.). Academic Press, New York (1985).
59. Kleinholz, L. H., Havel, V. J. and Reichart, R. Studies in the regulation of blood sugar concentration in crustaceans. II. Experimental hyperglycemia and the regulatory mechanism. *Biol. Bull.* 99: 454-468 (1950).
60. Kleinholz, L. H. and Keller, R. Comparative studies in crustacean neurosecretory hyperglycemic hormones. I. The initial survey. *Gen. Comp. Endocrinol.* 21: 554-564 (1973).
61. Kleinholz, L. H.; Kimball, F. and McGarvey, M. Initial characterization and separation of hyperglycemic (diabetogenic) hormone from the crustacean eyestalk. *Gen. Comp. Endocrinol.* 8: 75-81 (1967).
62. Knowles, F. G. W. Hormone production within the nervous system of a crustacean. *Nature (London)* 167: 564 (1951).
63. Knowles, F. G. W. Endocrine activity in the crustacean nervous system. *Proc. R. Soc. Lond.* 141: 248-267 (1953).
64. Koller, G. Versuch über die inkretorischen Vorgänge beim Gräncelfarbwechsel. *Z. Vgl. Physiol.* 8: 601 (1928).

65. Kravitz, E. A., Beltz, B., Glusman, S., Goy, M., Harris-Warrick, R., Johnston, M., Livingstone, M., Schwartz, T. and Siwicki, K. K. The well modulated lobster: the roles of serotonin, octopamine and proctolin in the lobster nervous system. En: *Model neural networks and behavior* (A. Selverston, ed.) pp. 339-369. Plenum Press, New York (1985).
66. Laverdure, A.-M., Desmoucelles-Carette, C., Breuzet, M. and Hayes, T. K. Combination of *in situ* hybridization and immunocytochemistry to detect peptide messenger RNAs in the X-organ of Penaidae. Première Conférence européenne sur les Crustacés (First European Crustacean Conference, Abstracts) agosto 31-septiembre 5, Paris (1992).
67. Lui, C. W. and O'Connor, J. D. Biosynthesis of lipovitellin by the crustacean ovary. II. Characterization and *in vitro* incorporation of amino acids into purified subunits. *J. Exp. Zool.* 195: 41-52 (1976).
68. Lui, C. W. and O'Connor, J. D. Biosynthesis of lipovitellin. III. The incorporation of labeled amino acids into purified lipovitellin of the crab, *Pachygrapsus crassipes*. *J. Exp. Zool.* 199: 105-108 (1977).
69. Maddrell, S. H. P. and Nordmann, J. J. "Neurosecretion" /Tertiary Level Biology. Blackie & Son Limited, London (1979).
70. Martin, G., Jaros, P. P., Beese, G. and Keller, R. The hyperglycemic neuropeptide of the terrestrial isopod, *Porcellio dilatatus*. II. Immunocytochemical demonstration in neurosecretory structures of the nervous system. *Gen. Comp. Endocrinol.* 55: 217-226 (1984).
71. Martin, G., Keller, R., Kegel, G., Beese, G. and Jaros, P. P. The hyperglycemic neuropeptide of the terrestrial isopod, *Porcellio dilatatus*. I. Isolation and characterization. *Gen. Comp. Endocrinol.* 55: 208-216 (1984).
72. Martin, G., Sorokine, O. and Van Dorsselaer, A. Isolation and molecular characterization of a hyperglycemic neuropeptide from the sinus gland of the terrestrial isopod *Armadillidium vulgare* (Crustacea). *Eur. J. Biochem.* 211: 601-608 (1993).
73. Mattson, M. P. and Spaziani, E. Regulation of Y-organ ecdysteroidogenesis by molt-inhibiting hormone in crabs: involvement of cyclic AMP-mediated protein synthesis. *Gen. Comp. Endocrinol.* 63: 414-423 (1986).

74. Niall, H. D. The evolution of peptide hormones. *Ann. Rev. Physiol.* 44: 615-624 (1982).
75. Parvathy, K. Endocrine regulation of carbohydrate metabolism during the moult cycle in crustaceans. I. Effect of eyestalk removal in *Ocypode platytarsis*. *Mar. Biol.* 14: 58-62 (1972).
76. Passano, L. M. The X-organ-sinus gland neurosecretory system in crabs. *Anat. Rec.* 111: 86-87 (1951).
77. Perkins, E. M. Colour change in Crustaceans, especially in *Palaemonetes*. *J. exp. Zool.* 50: 71-195 (1928).
78. Potter, T. G. Observations on the neurosecretory system of Portunid crabs. Ph. D. Thesis, Harvard University. Cambridge, Massachusetts (1956).
79. Ramamurthi, R., Mumbach, M. W. and Scheer, B. T. Endocrine control of glycogen synthesis in crabs. *Comp. Biochem. Physiol.* 26: 311-319 (1968).
80. Ranga Rao, K., Riehm, J. B., Zahnow, C. A., Kleinholz, L.H., Tarr, G. E., Johnson, L., Norton, S., Landau, M., Semmes, O. J., Sattelberg, R. M., Jorenby, W. H. and Hintz, M. F. Characterization of a pigment-dispersing hormone in eyestalks of the fiddler crab *Uca pugilator*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 5319-5322 (1985).
81. Rotllant, G., Charmantier-Daurès, M., Trilles, J. P. and Charmantier, G. The sinus gland of *Homarus americanus* - Histological and ultrastructural studies in embryos and larval stages. Première Conférence européenne sur les Crustacés (First European Crustacean Conference, Abstracts) August 31th-September 5th, Paris (1992) p. 100.
82. Scharrer, E. Die Liechtempfindlichchkeit blinder Elrizen. 1. Untersuchungen über das Zwischenhirn der Fische. *Z. Vgl. Physiol.* 7: 1-38 (1928).
83. Schram, F. R. The fossil record and evolution of crustacea. In: *The biology of Crustacea*, Vol. 1, pp. 93-147 (Edited by Bliss and Mantel, D. E.). New York: Academic Press (1982).
84. Schwabe, C. W., Scheer, B. T. and Scheer, M. A. R. The molt cycle in *Panulirus japonicus*. Part two of the hormonal regulation of metabolism in crustaceans. *Physiol. Comp. Endocrinol.* 47: 426-432 (1982).

85. Sedlmeier, D. The mode of action of the crustacean neurosecretory hyperglycemic hormone (CHH). II. Involvement of glycogen synthase. *Gen. Comp. Endocrinol.* 47: 426-432 (1982).
86. Sedlmeier, D. Mode of action of the crustacean hyperglycemic hormone. *Am. Zool.* 25: 223-232 (1985).
87. Sedlmeier, D. The role of hepatopancreatic glycogen in the action of the crustacean hyperglycemic hormone (CHH). *Comp. Biochem. Physiol.* 87A: 423-425 (1987).
88. Sedlmeier, D. The crustacean hyperglycemic hormone (CHH) releases amylase from the crayfish midgut gland. *Regul. Pept.* 20: 91-98 (1988).
89. Sedlmeier, D. and Dieberg, G. Crayfish abdominal muscle adenylate cyclase. Studies on the stimulation by a Ca^{2+} -binding protein. *Biochem. J.* 211: 319-322 (1983).
90. Sedlmeier, D. and Keller, R. The mode of action of the crustacean neurosecretory hyperglycemic hormone. I. Involvement of cyclic nucleotides. *Gen. Comp. Endocrinol.* 45: 82-90 (1981).
91. Skorkowski, E. F., Rykiert, M. and Lipinska, B. Hyperglycemic hormone from the eyestalk of the shrimp *Crangon crangon*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 33: 460-467 (1977).
92. Soyez, D., Le Caer, J. P., Noël, P. Y. and Rossier, J. Primary structure of two isoforms of the vitellogenesis inhibiting hormone from the lobster *Homarus americanus*. *Neuropeptides* 20: 25-32 (1991).
93. Teldford, M. Blood glucose in crayfish. III. The source of glucose and the role of the eyestalk factor in hyperglycemia of *Cambarus robustus*. *Comp. Biochem. Physiol.* 51B: 69-73 (1975).
94. Tensen, C. P., Janssen, K. P. C. and Van Herp, F. Isolation, characterization and physiological specificity of the crustacean hyperglycemic factors from the sinus gland of the lobster, *Homarus americanus* (Milne-Edwards). *Invert. Reprod. Dev.* 16: 155-164 (1989).
95. Tensen, C. P., De Klein, D. P. V. and Van Herp, F. Cloning and sequence analysis of cDNA encoding two crustacean hyperglycemic hormones from the lobster *Homarus americanus*. *Eur. J. Biochem.* 200: 103-106 (1991).

96. Tyler-Cross, R. and Schirch, V. Effects of amino acid sequence, buffers and ionic strength on the rate and mechanism of deamidation of asparagine residues in small peptides. *J. Biol. Chem.* 266: 22549-22546 (1991).
97. Wallace, R. A., Walker, S. L. and Hauschka, P. V. Crustacean lipovitellin. Isolation and characterization of the major high density lipoprotein from eggs of decapoda. *Biochemistry* 6: 1582-1590 (1967).
98. Welsh, J. Neurohumors and neurosecretion. En: *The Physiology of Crustacea*, Vol. 2 (T.H. Waterman, ed.). Academic Press, New York (1961).
99. Weidemann, W., Gromoll, J. and Keller, R. Cloning and sequence analysis of cDNA for precursor of a crustacean hyperglycemic hormone. *FEBS Lett.* 257: 31-34 (1989).
100. Webster, S. G. Amino acid sequence of putative moult-inhibiting hormone from the crab *Carcinus maenas*. *Proc. R. Soc. London B* 244: 247-252 (1991).
101. Van Wormhoudt, A., Bellon-Humbert, C. and Malcoste, R. Effets de l'ablation des glandes endocrines pédonculaires (glandes sinus, MEX, et organe de Bellonci) et de la lumière sur les variations des activités enzymatiques digestives de *Palaemon serratus* (Pennant). *Arch. Zool. Exp.* 117: 451-458 (1976).