

**Akadémiai Doktori Értekezés
tézisei**

**ÚJ EREDMÉNYEK A ROVAR-NEUROPEPTID KUTATÁSBAN:
IZOLÁLÁSOK, MEGHATÁROZÁSOK ÉS HATÁSMECHANIZMUSOK**

Fónagy Adrien

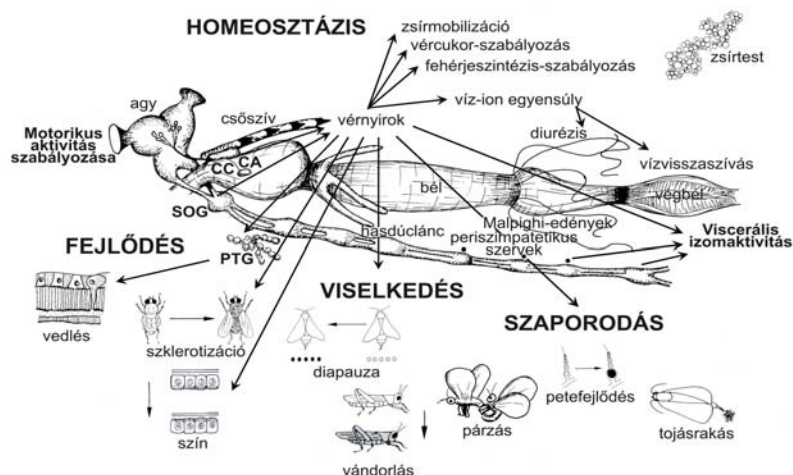
a biológiai tudomány kandidátusa

MTA Növényvédelmi Kutatóintézete

Budapest, 2006

I. TUDOMÁNYOS ELŐZMÉNYEK; A ROVAR-NEUROENDOKRINOLÓGIA ÁLTALÁNOS ÁTTEKINTÉSE

Az egy- és többsejtű élőszervezetek egységes belső egyensúly –a homeosztázis– megteremtésére és annak megőrzésére törekcszenek. Két, szorosán egymásra épülő rendszer, az idegi- és endokrinrendszer folyamatos kölcsönhatásának eredménye és valamennyi szereplője együtt és külön-külön is felelős, azért a harmóniáért, ami minden soksejtű állati szervezet, így a rovarok sajátja is. A rovarok valamennyi életfunkciójának és homeosztázisának háttérében is az idegi kontroll, ill. az ehhez kapcsolódó (neuro)-hormonok/peptidek állnak (Fónagy, 2006a).



1. ábra: A (neuro)hormonok által irányított legfontosabb életfolyamatok a rovarokban

A rovar-neuropeptid kutatás új korszakba lépett, amikor immáron több mint 30 éve izolálták és szekvenálták az első rovar-neuropeptidet, a *proktolint* amerikai csótányból (*Periplaneta americana*)–ezt, az egyébként a rovarokban igen általánosan előforduló pentapeptidet– (Starratt és Brown, 1975). Mostani ismereteinket, tudásunkat elsősorban magasnyomású folyadékkromatográfiás (*HPLC*), valamint tömegspektrometriás (*MS*), továbbá immunanalitikai, és mikro-analitikai elválasztás technikai módszereknek, legújabbán pedig molekuláris biológiai eszközöknek köszönhetjük. Az elválasztás nyomonkövetésének sikeressége, a hormon biológiai hatásának, pontosabban a csótány utóbél spontán izomműködését serkentő képességének volt köszönhető akkor is. A klasszikus hagyományokat követő rovar-neuropeptid kivonás, tisztítás, elválasztás, majd szerkezet-meghatározás folyamatában még napjainkban is jelentős szerepük van az *in vivo* és/vagy *in vitro* rovar-bioteszt (*bioassay*) rendszereknek (Miller, 1980). Sok esetben azonban már elégséges csupán 1-10-50 állatból (ideg)szövetmintát venni, majd néhánylépcsős eljárást (pl. kapilláris-*HPLC*) követően, a minták mátrixközvetített lézereszorpciós repülési idő *MS* (*MALDI-ToF MS*) vizsgálat alapján mintegy ujjenyomatszerűen le- és összeolvashatók a valószínűsíthető peptidszerkezetek. Igaz, a biológiai aktivitásra a megfelelő és teljes bizonyosságot továbbra is a szintetikus változat(ok) dózis-hatás vizsgálatait jelentik.

A rovar-neuropeptidek szerkezetének, részletes hatásmechanizmusának, élettani hatásainak, valamint az összefüggések minél pontosabb megismerése elengedhetetlenül szükséges mind az alap

mind pedig az alkalmazott kutatások területén, melyek megszerzése megfelelő és megbízható biotesztek nélkül elképzelhetetlen. A modell rendszerek használata alapvető biológiai és orvos-biológiai történések tanulmányozására hosszú múltra tekint vissza, de főleg emlős szervezetekre korlátozottan. Újabban, megfelelő kísérleti modelleket már a gerinctelenek, ill. a nem emlős gerincesek körében is keresnek (Scharrer, 1987). Megnőtt az érdeklődés az alacsonyabb rendűek irányába, a viszonylagos egyszerűségből, könnyebb hozzáférhetőségből és alkalmazhatóságból adódóan. A vizsgálatok eredményei feltűnő strukturális és élettani párhuzamokra mutatnak rá, akár a két állattörzs, az ízeltlábúak (köztük a rovarok), valamint a gerincesek között. Ezek az analógiák vonatkozhatnak mind a molekuláris, sejt, vagy akár szervezeti szintekre. A széles alapokon nyugvó összehasonlító tanulmányok ősi biológiai törvényszerűségekre hívják fel a figyelmet, és gyakran olyan szabályszerűségekre mutatnak rá melyeket csupán emlősökön vizsgálva, aligha fedezhetnénk fel.

Az idegi eredetű neuropeptideket a neuronok, bizonyos neuroszekréciós sejtek (*Ns*) termelik. Ez utóbbiak rendelkeznek az idegsejt összes jellemző morfológiai és funkcionális sajátosságával, de mirigysejtek módjára neurohormonokat szintetizálnak. E neuronok szerepét az endokrin rendszerrel való kommunikációban Ernst Scharrer (1928) vetette fel, amikor felfedezte egy csontos halban (*Phoxinus laevis*) azokat a sejteket, melyek a hipotalamo-hipofízis rendszer részeit alkotják. A rovar-neuroendokrinológia hajnalát, sejtani értelemben, 1937-re tesszük, amikor Berta Scharrer madeira csótányokban (*Leucophaea maderae*) először írt le mirigyfunkciójú idegsejteket (Scharrer, 1937).

Az agyi neuroszekréciós központok (és/vagy garatalatti dúc /*Suboesophageal ganglion; SOG*/), – amelyekben az aktív anyagok keletkeznek– első nélkülözhetetlen részét képezik a szervrendszernek, melyek feltűnően hasonlóak mind szerkezet, mind funkció terén a rovarokban és a gerincesekben. Második része az agyon kívül elhelyezkedő neurohemális régió, ahol a neuroszekréciót tárolódik, majd kibocsátódik. A *Ns* idegrostja végignyúlik a központi idegrendszeren, de a sejtre jellemző helyen áthatol a vér(nyirok)-agy gáton, így a szekréciót a neurohemális területen a testfolyadékba ürül. Jól körülhatárolt rész esetén neurohemális szervről beszélünk (pl. *Corpus cardiacum /CC/*, periszimpatikus szerv /*PSO*/). A harmadik eleme, egy nem idegi eredetű, belső elválasztású mirigy, mely többnyire szorosan kapcsolódik az előzőhöz (pl. *Corpus allatum /CA/*, előtöri mirigy /*Prothoracic gland; PTG*/).

A két nagy állattörzs közötti neuroendokrin hasonlóság a következőképpen mutatható be: A rovarok elülső agyában található páros *Ns*-ek a gerincesekben található hipotalamusz *Ns*-ekkel analógok. Az idegrostok belépnek a rovarok legfontosabb neurohemális szervébe –a *CC*-ba-, mely a gerinces agyalapi mirigy hátsó lebenyének „felel meg”. A vérnyirokba (*haemolymph*) később nemcsak a tárolt anyagok jutnak el, hanem a *CC* saját „mirigysejtjeiben” termeltek is. További idegrost kötegek pedig belépnek a *CA*-ba, amely egy jellegzetesen rovar-endokrin mirigy, a gerinces agyalapi mirigy elülső lebenyével hozható párhuzamba. A rovarok esetében –ez az ún. kétlépcsős irányítási rendszer– két esetben figyelhető meg a maga teljességében: a *CA*-ban termelődő szeszkviterpén szerkezetű *juvenilehormonok (JH)*, ill. a *PTG*-ben termelődő vedlési hormon, a szteroid típusú *ekdizon* esetében,

ugyanis szintézisüket az agyi neuroszekrécións központokban termelődő –majd CC-ben tárolódó– regulációs peptidek befolyásolják. A gerincesekhez hasonlóan a rovarokban is sok (vagy még több is!) a neuropeptid, de ezek többnyire közvetlenül (egy lépcsőben) fejtik ki hatásukat.

A peptidhormonok oligopeptidek (~10-20 aminosav) vagy kis fehérjemolekulák lehetnek (0,50-40 kD móltömeg között). Bioszintézisükről tudjuk, hogy egy-egy neurohormon egy gén termékének csak egy részét képezi és a prekursor molekula poszt-transzlációsan, enzimatikusan feldarabolódik, módosul. Legegyszerűbb esetben, a *pre-pro*hormont egy szignál peptid és az aktív neuropeptid alkotja, mint a vedlés egyes mozzanatait befolyásoló eklóziós hormon (*Ecdysis hormone; EH*) esetében. Van, amikor egy nagyobb protein molekula végül csak egyetlen kisebb aktív peptidet, továbbá számos strukturálisan „közömbös” fragmentumot eredményez, mint például a lipid háztartásért felelős adipokinetikus hormonok (*Adipokinetic hormone; AKH*) szintéziséénél. Máskor, pl. egy csótányfaj (*Diploptera punctata*) esetében 13, részben különböző, a CA működését gátló allatosztatikus molekulát (*Allatostatin; AST*) azonosítottak. Végezetül pl. a selyemlepkében (*Bombyx mori*) esetében a diapauzáért felelős hormon (*Diapause hormone; DH*), valamint az előbbihez részben hasonló feromon-bioszintézist serkentő hormon (*Pheromone Biosynthesis Activating Neuropeptide; PBAN*) egyetlen prekurborból származik, bár funkciójuk térben és időben jól elkülönül.

A neuroszekrétumok hormonként (vérfolyékba ürülnek és mivel vízben oldódnak, könnyen eljutnak a célszervig/-sejtig és ott, termelődésüktől távol fejtik ki hatásukat), egyesek neuro-modulátorként (lokális kibocsátás/hatás) vagy neurotranszmitterként (szinapszis) is működhetnek. Az utóbbi időkben, a szerkezet-hatás *in vivo* és *in vitro* rovar-biotesztekhez kapcsolódó vizsgálatoknak köszönhetően már nem csak farmakológiai értelemben rendelkezünk ismeretekkel a célszervekben található receptorokról (*r*), hanem a molekuláris biológia térhódítása miatt az alábbi, élettani szempontból is fontos receptorokat azonosítottak, izoláltak és írtak már le (a legfontosabbak közlési sorrendben): ecetmuslica (*Drosophila melanogaster*) *TKr* (*Tachykinin-like peptide*), dohányzsender (*Manduca sexta*) *DPr* (*Diuretic peptide*) és ecetmuslica *ASTr* valamennyit ún. reverz fiziológiai megközelítéssel. Igazi áttörést, az első valódi rovar neuropeptid-receptor, az *AKHr* klónozása jelentette szintén ecetmuslicából és selyemlepkéből (Staubli és mtsai., 2002). Külön említendő a kukorica bagolylepke (*Helicoverpa/Heliothis/ zea*), *H. zea-PBANr* (Choi és mtsai., 2003) és a *B. mori-PBANr* (Hull és mtsai., 2004), ugyanis strukturálisan és funkcionálisan is különböznek (lásd lentebb; a két fajban eltérő a *PBAN* jelátadása/*signal transduction*/ és hatásmechanizmusa) annak ellenére, hogy a két fajban található *PBAN* C-terminális aktív szekvenciája (*FXPRLamid*, X=T;V;S) azonos és a két molekula között is nagyfokú azonosság van (megj: ez a C-terminális vég egyébként a *Pirokinin* (*PK*) típusú viscerális izmokat serkentő (*Miotropikus; MT*) neuropeptidekre is jellemző).

Az elmúlt bő tíz évben tárgyi tudásunk gyarapodásával (lsd. internetes gén- és peptidszekvenciák adatbázisai), **jelentősen szaporodtak ismereteink ezért bátrabban és megalapozottabban vállalkozhattam korszerű csoportosításukra és bemutatásukra részben összefoglalók revíziójával,**

valamint saját korábbi (Fónagy, 1994) és újabb eredményeim segítségével. A Doktori Értekezésemben vázoltam a már ismert neuropeptidek, valamint pl. molekuláris biológiai eszközökkel előre jelzett, valószínűsített szerkezetek csoportosításának szempontjait. Alapvetően funkció szerint osztályozzuk a rovar-neuropeptideket, ami sok esetben szerkezeti hasonlóságot is jelent, de nem szükségképpen. **A közelmúltban megjelent tanulmányom alapján (Fónagy, 2005) a következő felosztás ajánlható: Növekedéssel és fejlődéssel, valamint Szaporodással kapcsolatos neuropeptidek** (Gäde és Hoffmann, 2005; De Loof és mtsai., 2001); **Metabolizmust és homeosztázist** (Gäde, 2004), ill. **Izommozgásokat befolyásoló neuropeptidek** (Schoofs és mtsai., 1994). Az 1. táblázaton bemutatott peptidek csupán a legfontosabbak, bővebb tájékozódást további még nagyobb összefoglalók biztosítanak (Holman és mtsai., 1990; Gäde és mtsai., 1997; Gäde, 1997).

Egy-egy azonosított neuropeptid, néha több megvizsgált funkció tekintetében is aktívnak bizonyul, tehát *pleiotropikus*. Ez a következőből fakadhat: egyrészt, egyes hasonló szerkezetű/végződésű neuropeptidek, mint tudjuk, térben és időben elkülönülnek (pl. *DH* és *PBAN*), de többféle (homológ /azonos fajtól/ vagy heterológ /más fajtól származó/) biotesztben hatásosnak bizonyulnak, másrészt pl. a spontán izommozgásra ható rovar *Kininek* (*K*) aktívan befolyásolják az emésztőrendszer viscerális izomsejtjeit (emésztési folyamat) és a *Malpighi*-edények mozgását (kiválasztási folyamat) is. Nevezéktanuk tekintetében Raina és Gäde (1988) által javasolt rendszer terjedt el, ami áll a rovar fajnév kezdőbetűiből ahonnan izolálták és egy funkció, vagy szerkezeti utalás rövidítésből: *Lom-AKH*, (és kiegészítő sorszámból: *Lom-AKH-I, II, III*), *Bom-PBAN*, *Lom-TK* stb. (*Lom: Locusta migratoria*; *Bom: Bombyx mori*; *AKH: Adipokinetic hormone*; *TK: Tachykinin*). Az eredmények akkor a legteljesebbek, ha sikerül az adott peptid izolációja, azonosítása (majd szintézise), keletkezési helyének, transzportjának feltárása, a célszerven dózis-hatás, végezetül hatásmechanizmus vizsgálata. A posztembrionális fejlődés, lipid/szénhidrátháztartás, feromon-bioszintézis, stb. endokrinológiája már napjainkra részben feltárt, amit egy nemrég megjelent összefoglalóban saját eredményeimmel kiegészítve foglaltam össze (Fónagy, 2006b).

A rovar-neuroendokrinológia fejlődésének köszönhetően –és ezzel egy időben– viszont még fokozottabbá vált az igény az új ismeretekre alapozott környezetkímélőbb növényvédelmi módszerek kifejlesztésére, majd alkalmazására, ami egyre több laboratóriumot készítet a rovarélettan területén ismereteik összegzésére a kártevők minél hatékonyabb leküzdése érdekében. A cél azonban sohasem a teljes megsemmisítés, hanem sokkal inkább egyfajta faj, vagy csoport specifikus szabályozás, mely azonban csak akkor valósítható meg, ha a rovarélettan, -endokrinológia, -biokémia, valamint -ökológia legújabb eredményeit felhasználjuk. Miután a neuropeptidek kulcsfontosságú életfolyamatokat irányítanak a rovarok életében ezért ezek a specifikus anyagok, pontosabban természetes és/vagy szintetikus analógjaik, mimetikumaik, agonistáik vagy antagonistáik ígéretes jelöltként jöhetnek szóba a modern növényvédelmi stratégiák kidolgozásában is. Ez utóbbiak is bizonyítják, hogy a rovarélettan és rovar-endokrinológiai kutatások mennyire időszerűek és magasszintű művelésük nélkülözhetetlenek, ha értően és körültekintéssel szeretnénk beavatkozni sokszor amúgy is alaposan felbolygatott környezetünkbe.

	Neuropeptid	Elsődleges hatás	Szerkezet
Növekedés és fejlődés	Bom-PTTH (monomer)	Ekdizon bioszintézist serkenti az előtöri mirigyben	GNIQVENQAIPDPCTCKYKKEIEDLGENSVPRFIETRN-CNKTQQPTCRPPYICK ESLYSITILKRRETKSQESLEIPN-ELKYRWVAESHVPVSVACLCTRDYQLRYNNN
	A lánc:Bombyxin-II <i>A lánc:Humán inzulin</i>	Glikogén, trehalóz csökken <i>Vércukor szint csökken</i>	GIVDECCLRPCSDVLLSYC GIVEQCCTSICSLYQLENYCN
	Mas-AT	JH szintézis serkentése	GFKNVEMMTARGFamid
	Mas-AST	JH szintézis gátlása	pQVRFRCQCYFNPISCF
	Dip-AST-1=Pea-AST-1	JH szintézis gátlása	LYDFGLamid
	Dip-AST-2=Pea-AST-2	JH szintézis gátlása	AYSYVSEYKRLPVYNFGLamid
	Mas-EH	Vedlés részfolyamatait, a potroh motoros neuronjait serkenti	NPAIATGYDPMEICIENCAQCKKMLGAWFEG-PLCAESCIKFKGKLIPECEDFASIAPFLNKL
	Bom-MRCH-I(=PBAN-I)	Melanin képződést serkenti	LSEDMPATPADQEMYQDPPEEMESRTRYFSPRLamid
Bom-DH	Embriónális diapauzát indukál	TDMKDESDRGAHSERGAALCFGPRLamid	
Szaporodás	Lom-OMP (kétféle izoform)	Pete fejlődést serkenti	YYEAPPDGRHLLLQPAPAAPAVAPA(A/S)PASWPH-QRRQALDEFAAAAAAAAADAQFQDEEEDGGRRV
	Aea-OEH	Ovárium ekdizon termelését serkenti	QPTNVLEIRCKLYSGPAVQNTGECVHGAEINPCGKLSCLKGVG-DKCGESTAGIIMSGKASGLMCCGGQCVCCKNGICDHRLCPRL
	Lyd-TE	Herék ekdizon termelését serkenti	ISDFEYEPLNDADNNEVLDF
	Aea-TMOF	Tripszin aktivitást gátolja	YDPAPPPPPP
	Neb-kolloosztatin	Pete szikbeépülését gátolja	SIVPLGLPVPIGPIVVGPR
	Hez-PBAN	Feromon szintézist serkenti	LSDDMPATPADQEMYRQDPEQIDSRTKYFSPRLamid
Metabolizmus és homeosztázis	Lom-AKH-I	Lipid mobilizációt serkenti	pQLNFTPNWGTamid
	Mas-AKH	Lipid mobilizációt serkenti	pQLTFTSSWGamid
	Pea-CAH-I	Szívfrekvencia fokozó	pQVNFSPNWamid
	Hez-HrTH	Trehalóz szintet fokozó	pQLTFSSGWGNamid
	Mas-DP-I	Folyadék kiválasztást serkenti	RMPSLSIDLPMSVLRQKLSLEKERKVHALRAANRNFLNDIamid
	<i>Patkány-CRF</i>	<i>ACTH termelést serkenti</i>	<i>EEPPISLDLTFHLLREVLEMARAEQLAQQAHSNRKLMELIamid</i>
	Lom-AVP-DP <i>Gerinces-AVP</i>	Folyadék kiválasztást serkenti <i>Vér-agy gát permeabilitást serkenti</i>	CLITNCPRG amid CLITNCPRGamid CYFQNCPRG amid
Lom-neuroparsin	Antidiuretikus hatású a végbélben	NPISRSCEGANCVVDLTRCEYGDVTDFFGRKVCAGKPGDKC-GGPYELHGKCGVGMDCRCGLCSGCSLHNLQCFEFEGGLPSSC	
Izommozgások	(Pea)-Proktolin	Általános izomszerkentő	RYLPT
	Mas-CAP	Szív működést serkenti	pQLYAFPAVamid
	Lom-TK-I <i>Emlős Substance P</i>	Viscerális izmokat serkenti <i>Bél simaizom serkentő stb.</i>	GPSGFYGVRamid <i>RPKPQQFFGLMamid</i>
	Lem-MK-I	Viscerális izmokat serkenti	DPAFNSWGamid
	Lem-PK	Viscerális izmokat serkenti	pQTSFTPRLamid
	Lem-SK-I <i>Gerinces-CCK</i>	Viscerális izmokat serkenti <i>Bélmozgás és pankreáz enzim szekréció serkentő</i>	EQFEDY(SO ₃ H)GHMRFamid <i>DY(SO₃H)MGWMDFamid</i>
	Lom-MIP	Mioinhibitor hatású	AWQDLNAGWamid
	Lom-FaRP-I	Mioinhibitor hatású	GQERNFLRFamid
	Neb-MS (FaRP) <i>Puhatestű-FMRF</i>	Mioszuppresszin hatású <i>Motoros neuronok gátlása</i>	TDVDHVFLRFamid <i>FMRFamid</i>

1. táblázat: A legfontosabb és legismertebb rovar-neuropeptidek bemutatása a dolgozatban vázolt csoportosítás alapján.

A *dölt betűkkel* a felette található hormonnal rokonságot mutató ismert, egyéb állati eredetű neuropeptid kerül bemutatásra. A **vastagított karakterek** pedig az azonos aminosavakat, vagy rokon vegyületeket, ill. hasonló végződéseket emelik ki. Egybetűs kódok: A: Ala; C: Cys; D: Asp; E: Glu; F: Phe; G: Gly; H: His; I: Ile; K: Lys; L: Leu; M: Met; N: Asn; P: Pro; Q: Gln; R: Arg; S: Ser; T: Thr; V: Val; W: Trp.

II. CÉLKITŰZÉSEK

A Doktori Értekezés –a rovar-endokrinológián belül– a neuropeptidek kutatásában és hatásmechanizmus vizsgálatok világából két fő területet ölel fel: Egyrészt újabb rovar-neuropeptidek eredményes tisztítását és izolációját ill. meghatározását írom le káposzta bagolylepkéből (*Mamestra brassicae*; Noctuidae, Lepidoptera), valamint kapcsolódó hatásvizsgálatokat rovar-biotesztek alkalmazásával (**1. rész**), másrészt a selyemlepke (*Bombyx mori*; Bombycidae, Lepidoptera) feromonszintézisének folyamatát és sejttani eseményeit bemutató egyedülállóan részletes és kidolgozott modelljét ismertetem és kissé rövidebben, hasonlóan, a *M. brassicae*-ben (**2. rész**).

1. rész: Több csoportba tartozó, különféle neuropeptidek tisztítása, izolálása és meghatározása káposzta bagolylepkéből, valamint kapcsolódó hatásvizsgálatok, legfontosabb biológiai jellemzőinek leírása, klasszikus eszközök felhasználásával. (i.e. „Többfélélt” egyből megközelítés). Általánosságban, egyébként létezik „aktivitás-irányultság” (van elképzelésünk előzetesen a peptid funkciójáról), vagy „szerkezet-irányultság” (adott szerkezetű peptid léte valószínűsíthető) peptidkutatás (Fónagy, 1994).

A feladat megvalósítása magába foglal bizonyos megfelelő bioteszt módszerek kidolgozását vagy továbbfejlesztését, olyan szempontból is, hogy később más fajra ill. hatások vizsgálatára is lehetőleg alkalmasak legyenek: Feromonotropikus (*Pheromonotropic*; *PT*; a feromontermelés célszervére ható), adipokinetikus (tartalék lipid, szénhidrát/trehalóz/mobilizációs), valamint mioaktivitás (viscerális izmok spontán működésére ható) tesztek használata homológ (azonos faj) és heterológ (más faj) rendszerekben.

2. rész: A *PBAN* neuropeptidek hatásmechanizmusának részletes feltárása a feromonmirigyben (*Pheromone gland*; *PG*) mint célszervben, a feromonszintézis folyamatának és sejttani eseményeinek összehasonlítása a *B. mori*-ban és a *M. brassicae*-ben a legkorszerűbb eszközök igénybevételével, a vizsgálati módszerek széles spektrumának alkalmazásával. (i.e. „Egyfélélt” többől megközelítés).

Cél volt, hogy a korábbi eredményeket kiindulásként felhasználva részletesen feltárjuk a *PBAN* hatásmechanizmusát, jelátadási rendszerét elsősorban a selyemlepkében, valamint a lehetőségekhez mérten a káposzta bagolylepkében és ezért az alábbi megközelítéseket választottuk:

- A folyamatban résztvevő enzimeket hagyományos izolációs módszerekkel ill. közvetett vizsgálati eszközökkel meghatározni és jellemezni;

- Farmakológiai ágensek igénybevételével feltárni a jelátadás lépéseit;

- Fény-, fluoreszcens- és elektronmikroszkópia lehetőségeinek felhasználásával (különféle vizualizációs metódikák) morfológiai megfigyelésekkel is „végigkövetni” a feromon-bioszintézisének;

- A prekursorok és közti termékek vizsgálata és azok kompartmentalizációja;

- A *PBAN* sejtszintű hatásmechanizmusának, a feromon-bioszintézis egyes lépéseinek figyelembevételével a folyamat modellszerű kidolgozása a fenti vizsgálatok, valamint egyéb kutatási eredmények segítségével.

III. VIZSGÁLATI ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Az egyes területeken az igényeknek megfelelően, széleskörűen választottam a kísérleti és vizsgálati módszereket, technikákat, valamint számos egyedi fejlesztést, módosítást is végrehajtottam.

Az **1. rész**ben elsősorban neuropeptidok kivonása, tisztítása és lehetőség szerinti azonosítása volt a legfőbb feladat káposzta bagolylepke agy-SOG, vagy CC-CA szövet extraktumokból. Az elválasztáshoz és tisztításhoz megfelelő mennyiségű idegszövetet (fej-ekvivalensnyi egységben számolva) használtunk és az előkészített kivonatokat általában fordított fázisú (*Reverse phase; RP*) oszlopokon, különféle elválasztó elegyek alkalmazásával, gradiens futtatásoknak vetettük alá. A kivonat biológiai aktivitásának nyomonkövetéséhez három különféle biotesztet alkalmaztunk: *in vivo PT* bioteszt; *in vivo* adipokinetikus (vagy tartalék lipid, szénhidrát mobilizációs) bioteszt; *in vitro* mioaktivitás bioteszt.

-*PT* biotesztet végeztünk a célállatban vagy a feltételezett keresztreaktivitás miatt egy másik vándor bagolylepkefajban (*H. virescens*) is. A kezelés hatására a *PG*-ben termelődött, majd kivont feromont vagy saját fejlesztésű vékonyréteg kromatográfiás (*Thin Layer Chromatography; TLC*) teszttel vagy *GC*-vel határoztuk meg. A tisztított agy-SOG mintákat kiegészítésképpen Enzim kapcsolt immunabszorpciós próbával (*Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay; ELISA*) is megvizsgáltuk *PT/PK* típusú, azaz *FXPRLamid* C-terminálissal rendelkező peptideket keresve.

-A *CC-CA* kivonat adipokinetikus biotesztjét elsősorban a célállatban végeztük szintén saját, új kombinált módszer szerint, de egy konvencionális teszttálon, a vándorsáskán (*Locusta migratoria*) is. A kezelés hatására a tartaléktápanyagok változását a vérnyirokban spektrofotometriásan mértük.

-Az agyi-SOG szövetkivonatok mioaktivitásának vizsgálatára csak heterológ, *in vitro* utóbél preparátumot használtunk –eddig elsőként– a chilei óriáscsótányból (*Blaberus craniifer*). Az izomaktivitás változását egy transzducer közbeiktatásával potenciometriás rekorderen rögzítettük.

-Az izolált peptidek aminosav sorrendjét, vagy hagyományos *Edman*-degradációs módszerrel, és/vagy *MALDI-ToF MS* technika segítségével határoztuk meg, következtettük ki.

A **2. rész**ben a *PBAN* neuropeptid hatásmechanizmusának és jelátadásának vizsgálatában a módszerek és technikák sokkal szélesebb körét alkalmaztam még több egyéni fejlesztéssel.

B. mori-ban végzett vizsgálatok:

-A *Ca-kalmodulin (CaM)* feltételezett fontos jelátvivő szerepe okán a *Bom-CaM* kivonásához és meghatározásához több száz *PG*-ből készült citoszól kivonatot használtunk fel, melyet tovább-tisztítottunk *RP-HPLC*-vel és aminosav sorrendjét *Edman*-degradációs módszerrel határoztuk meg, molekulatömegét pedig *MALDI-ToF MS*-el.

-A *kalcineurin*/poszfoprotein-foszfataz (2B)(*CaN;PP2B*) *PBAN* jelátadási folyamatban történő részvételének bizonyításához specifikus *CaN* inhibitorokat (*cyclosporin A, CsA; FK 506*) használtunk *in vitro PT* biotesztokban (a *bombykolt* /feromon főkomponens/ *HPLC*-vel kvantifikáltuk mindvégig).

A kísérletek során izolált *PG*-k feromontermelő képességét vizsgáltuk *Bom-PBAN* (vagy analóg) jelenlétében, valamint az inhibitorokkal együtt. A *CaN* részvételét a jelátadási rendszerben *SDS*-poliakril gélelektroforézis (*SDS-PAGE*) és *Western-blot* analízissel is alátámasztottunk. Kifejlesztettünk egy ún. sejtmentes *PG* mikroszóma tesztet is (a frakció szubsztrát és „sejtenergia” hozzáadásával *bombykolt* képes termelni) melyet a későbbiekben sokrétűen és hatékonyan felhasználtunk.

-Kidolgoztuk a mirigy ún. *bombykol* termelő sejtjeinek leválasztását a kutikuláról (papainos emésztéssel) és sikerült a sejteket életben tartani, melyekkel morfológiai és további farmakológiai vizsgálatokat végeztünk (pl. *Ca ionophore A23187*; *ionomycin* kezelések, melyek a divalens kationok beáramlását serkentik és a *PBAN* hatását szimulálják, ill. többféle /enzim/ gátlószert is használtunk).

-A *bombykol* termelő *PG* sejtek fény-, fluoreszcensz-, valamint elektronmikroszkóppal történő vizsgálata során részletesen leírtuk és kvantifikáltuk a napi (fény és sötét fázisú) változásokat, különös tekintettel a neutrális zsírokat (*Nilus*-vörös festéssel) tartalmazó lipid cseppekre (*lipid droplet*; *LD*).

-Részletesen megvizsgáltuk az *LD*-k kémiai összetételét, tekintettel arra, hogy az eredmények alapján bizonyosan *bombykol* előanyagokat tartalmaznak zsírsavak (*fatty acid*; *Fa*) formájában trigliceridekbe (*Tg*) beépülve és a cseppek dinamizmusa egyértelmű *PBAN* befolyás alatt van. Az *LD*-k tartalmát kivontuk, majd többlépcsős normál ill. *RP-HPLC* tisztításnak vetettük alá azokat, végül a mintákat egyenként *FAB-MS*-el, valamint *MS-MS*-el analizáltuk. *RP-HPLC*-vel megmértük a *LD*-k *Tg*-jeinek mennyiségi változását is több napon keresztül és különböző napszakokban.

-Kidolgoztunk egy új eljárást a *PG*-ből származó *LD*-k non-destruktív izolálására, hogy a módszer segítségével a felszínükön található ún. *LD*-khez kapcsolódó fehérjéket (*LD Associated Protein*; *LDAP*) kivonhassuk, jellemezhesük. Ezeknek a fehérjéknek (dokkoló fehérjék, lipázok) szerepük lehet a *LD*-kben raktározott *de novo* szintetizált *bombykol* előanyag(ok) felszabadításában.

-Kivontuk és meghatároztuk azokat a diglicerideket (*Dg*) melyeket a vérnyirokban szállító funkcióval bíró lipoforinok (*Lf*), valamint a membránon történő átszállítást végző lipid-transzfer részek (*Lipid Transfer Particle*; *LTP*) hordoznak és résztvesznek a *LD*-k *Tg*-jeinek felépítésében a nevezett *Fa*-k mellett. Ezeket a *Dg*-ket az *Lf*-ekről, valamint *LTP*-kről történő leválasztást követően *HPLC* tisztításnak vetettük alá és a mintákat egyenként *FAB-MS*-el, valamint *MS-MS*-el analizáltuk.

M. brassicae-ben végzett vizsgálatok:

-A *PBAN* jelátadási mechanizmusát a *PG*-ben először *in vivo* kísérletekkel vizsgáltuk. Az injekciót követően dózis-hatás, idő-hatás vizsgálatokat végeztünk a feromon-főkomponens (*Z11-16OAc*) *GC*-vel történő mérésével. Valamennyi kezelést követően megmértük a *cAMP* szintjének változását (izotópos módszerrel) a jelátadási folyamatban történő részvételének bizonyításához és leírásához.

-*In vitro* *PG* inkubációs kísérletek során farmakokémikáliák segítségével (*Ca ionophore A23187*; *ionomycin*, valamint *forskolin* /Adenilát-cikláz aktivátor/, továbbá LaCl_3 /divalens kationok beáramlását gátolja/, *Trifluoroperazin*; *TFA* /*CaM* inhibitor/) vizsgáltuk a *PG*-k feromontermelő képességét, valamint megmértük a *cAMP* szintjének változásait.

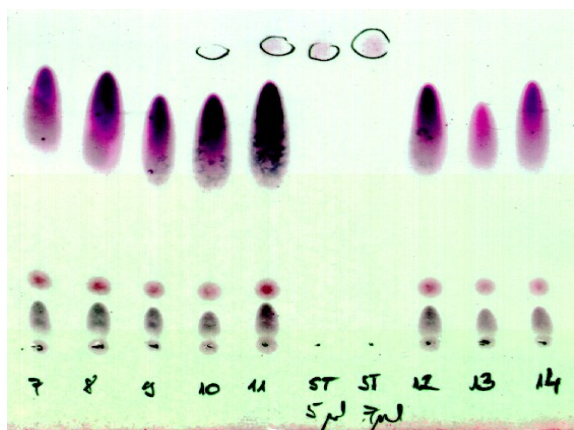
IV. EREDMÉNYEK ÉS RÖVID MEGVITATÁSAIK

1. rész: KÜLÖNFÉLE NEUROPEPTIDEK TISZTÍTÁSA, IZOLÁLÁSA, MEGHATÁROZÁSA
MAMESTRA BRASSICAE-BŐL, VALAMINT KAPCSOLÓDÓ HATÁSVIZSGÁLATOK

IV.1. FEROMONOTROPIKUS NEUROPEPTIDEK

– Alkalmazott *in vivo* bioteszt a *PT* aktivitás vizsgálatára

Új eredményként könyvelhető el és a gyakorlatban igen hasznosnak bizonyult a *M. brassicae*-ben kidolgozott *PT* aktivitás bioteszt (gyorsteszt), amelynek segítségével *TLC* lapon történő *PG* extraktum futtatás majd vizualizációval jól értékelhetően teszteltük a klf. korai fázisban tisztított frakciók biológiai aktivitását (2. ábra). Ezzel a módszerrel kiváltottuk a költséges és munkaigényes *GC*-vel történő feromon-főkomponens vizsgálatát (Jacquin-Joly és mtsai., 1994).



2. ábra: A hormontartalmú tisztított minták *PT* hatásának vizsgálata *TLC* lapokon

A *PG*-ben termelődött feromon mennyiségét (azaz a tisztított minta biológiai aktivitását) a felvitt 5-7 μ -nyi Z11-16OAc standard (*M. brassicae* feromon főkomponense) alapján határoztuk meg. A sorszámazásból látszik, hogy az egyik vizsgált frakció sorozat 11. számú mintája egyértelmű biológiai aktivitással rendelkezik. Futtató elegy: diklórmetán:toluol; 5:2.

– A *Mab-PT* izolációja és meghatározása

Az agy-*SOG* komplexből a tisztítás és izolálás során több *PT* aktivitással rendelkező frakciót is sikerült találni, de a többlépcsős tisztítási folyamat és a korlátozott mennyiségben rendelkezésre álló extraktum miatt végül csak egyetlen neuropeptidet azonosítottunk. Öt különböző tulajdonságú *HPLC* oszlopon és körülmény között végeztük az elválasztást és tisztítást. A három utolsó fázisban a minták biológiai aktivitását *in vivo PT* bioteszttel ellenőriztük *M. brassicae*-ben és/vagy *H. virescens*-ben is. Ekkor azonban már csak *GC*-vel történt a termelődött főkomponens mérése.

A peptid molekulaion tömegét 2137,6 D (m/z)-nek (*FAB-MS*) állapítottuk meg, ahol egyetlen tiszta csúcs adódott a spektrumon. A fenti *FAB-MS* eredményt is figyelembe véve *Edman*-degradációval próbáltuk meghatározni az új *PT* peptid szekvenciáját. A javasolt aminosav sorrendre azonban a kapott molekulásúly és más hasonló szekvenciák alapján is következtettünk. A feltételezett szekvencia a következő (a dőlt betűs aminosavak bizonytalanságot jelölnek):

***Mab-PT*: SLAYVQKVFENVEFVPRLamid.** (vö.: IV.3. MIOAKTÍV NEUROPEPTIDEK).

– További *Mab-PT*-k kimutatása kompetitív *ELISA*-val

A fent bemutatott 18 aminosavból álló *Mab-PT*-n kívül még további biológiailag aktívnek mutakozó frakciókban *ELISA*-val is kimutattunk *PT* peptideket, ami egyértelműen arra utalt, hogy

volt(ak) benne olyan neuropeptid(ek) melynek C-terminális vége *FXPRLamid*. Pozitív eredményt kaptunk az előtisztítás során aktívnak bizonyuló frakciókkal. Ezek alapján valamennyi vizsgált frakcióban találtunk olyan peptidet, amelyik a jellegzetes *PK* típusú C-terminális pentapeptiddel rendelkezik, ami egyben közvetett bizonyíték a *Mab-PT* általunk javasolt C-terminális végére is.

– Rövid megvitatás

A 18 tagú *PT* hatású peptidek körében a meghatározás bejelentése (Fónagy és mtsai., 1996), majd a későbbi közlés idejében is (Fónagy és mtsai., 1998) ez volt az első (és ez a mai napig érvényes), ténylegesen adultból származó, valódi izoláción és tisztításon alapuló neuropeptid azonosítás. Korábban mindössze a *P. separata* lárvákból izolált 18 tagú *Pss-PT* volt ismert (Matsumoto és mtsai., 1992a), mely szintén hordozza a jól ismert *FXPRLamid* C-terminális pentapeptidet és aminek köszönhetően több bioteszt rendszerben is aktívnak bizonyult, tehát *pleiotropikus*. Teljes *PBAN*-ek tekintetében pedig csak *Hez-PBAN* (Raina és mtsai., 1989), *Bom-PBAN I-II*, (Kitamura és mtsai., 1989, 1990) és a *Lyd-PBAN* (Masler és mtsai., 1994) voltak ismertek és klasszikus kivonási és tisztítási eljárással egyébként azóta sem határoztak meg újabbat. Molekuláris biológiai módszereken alapuló vizsgálatok alapján mindössze a *B. mori*-ban (Sato és mtsai., 1993) és a *H. zea*-ban (Ma és mtsai., 1995) ismertük a *PBAN*, valamint kapcsolódó peptideket kódoló teljes prekursor protein génjének valószínűsíthető szerkezeteit, melyekre általánosan elmondható, hogy egy α -, β -, *PBAN*-, valamint γ -peptidszakasz egységből áll. Az α -szakasz 7, a β -szakasz a 18 aminosavból álló egység, a *PBAN* 33-34 aminosavból, míg a γ -szakasz 8 aminosavból épül fel. Klónozással és előrejelzéssel azóta ismertté váltak a *M. brassicae*, (Jacquin-Joly és mtsai., 1998), valamint *H. assulta* (keleti dohánymoly), *Agrotis ypsilon* (ypszilon bagolylepke), *S. litura* és *Plutella xylostella* (káposztamoly) fajok fent nevezett teljes gén szakaszai, így szekvenciájuk is.

Megállapítható, hogy a *Hez-PBAN* és a *Bom-PBAN-I* tényleges aminosav szekvenciája és a klónozás alapján talált szekvencia között nincs különbség. A 18 tagú un. β szakaszok esetében ilyen jellegű összehasonlításra azonban nincsen lehetőség, mert vagy hagyományos kivonás és aminosav szekvenálási eredmények állnak rendelkezésre (*P. separata*), vagy molekuláris biológiai eszközzel előrejelzett javasolt aminosav szekvenciára vonatkozó adatunk van. Ez alól egyedül a *M. brassicae* a kivétel, ugyanis a mindkét módon „meghatározott” szekvenciát ismerjük, de három pozícióban azonban eltérés mutatkozik, de ebből két helyen azonban, esetünkben, az *Edman*-meghatározás mást mutatott ki és csak egy helyen van tényleges bizonytalanság. A többi tisztított peptid frakció vizsgálatát/meghatározását nem tudtuk elvégezni pedig *ELISA*-val egyértelműen kimutattuk, hogy további *FXPRLamid* végű neuropeptideket vontunk ki, melyek közül egyik-másik bizonyára a fent bemutatott hosszú gén szakasz termékei lehetnek, de az is valószínűsíthető, hogy a *pleiotropikus* hatás révén esetleg primer módon inkább *miotropikus* (*MT*) peptidek. (Lsd. még IV.3. MIOAKTÍV NEUROPEPTIDEK).

A fentiek alapján és a közismert keresztthatás miatt (Matsumoto és mtsai., 1992b; Fónagy és mtsai., 1992c) megállapítható, hogy sok rovar, –vagy esetünkben például a lepkeféléken belül– hordoz homológ

gént mely több, rövidebb-hosszabb C-terminálisan azonos, de funkciójában mégis eltérő neuropeptidet kódol. Szemben a magasabb rendűekkel jónéhány neuropeptid keletkezik akár egyetlen *SOG Ns*-ben jelentősebb változtatás nélkül a poszt-transzlációs folyamatban, de hatásuk térben (hím és nőstény közötti különbség) és időben (pl. lárvakori vagy imágó) elkülönül és ezért még az is valószínű, hogy receptoraik igen hasonlóak. A szabályozás tehát akár különböző „osztályozás”, „csomagolás” és „célbajuttatás” révén is befolyásolódik.

IV.2. ADIPOKINETIKUS NEUROPEPTIDEK

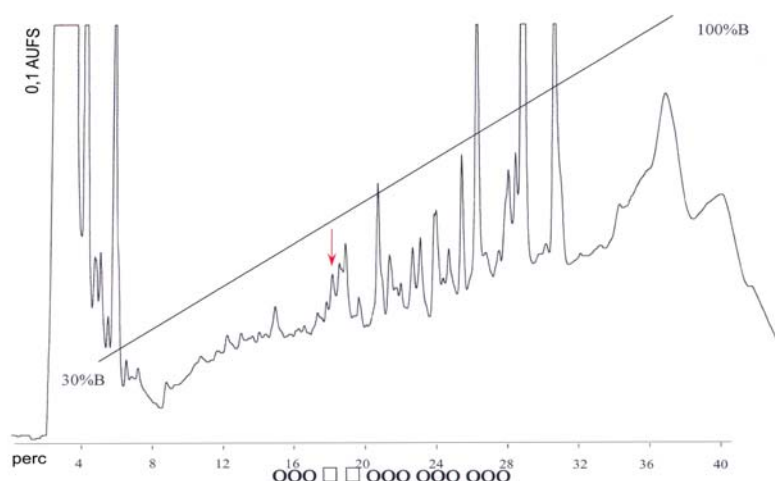
– Alkalmazott *in vivo* biotesztek a metabolikus változásokra

A *M. brassicae*-re átdolgozott bioteszt(ek), mely(ek) a metabolikus változások nyomonkövetésére hivatott(ak) a korábban leírt módszer (Holwerda és mtsai., 1977) alapján megfelelőnek bizonyult(ak). A **kifejlesztett kombinált bioteszt** esetében hangsúlyozandó, hogy ennek a metodikának az a lényege, hogy **egyetlen állatból nyerhetünk többféle –a homeosztázis állapotot jellemző– adatot a vételezett vércsírok megfelelő, többirányú vizsgálatával** (lipid- és trehalóztartalom változás is meghatározható). A módszer, kisebb módosításokkal más rovarokra is alkalmazható, szükség szerint.

Méréseink alapján megállapítottuk, hogy **a lipidtartalom –azaz a *Dg*– 55±10µg/µl körül mozog**, míg **a trehalóz kontroll értéke 40±10 µg/µl a vércsírokban**. A kontrollokban tapasztalt eltérések az egyedek korával ill. nemével magyarázhatók.

– A *Mab/(Mas)-AKH* neuropeptid izolációja és meghatározása

A nőstényekből és a hímekből külön-külön készített *CC-CA* kivonatokat egy lépcsőben *RP-HPLC*-n szétválasztottuk és a frakciókat biotesztnak vetettük alá. **Találtunk egy *AKH* jellegű neuropeptidet, ugyanis retenciós ideje jól egyezik a *Mas-AKH*-el** (az első, *Lepidoptera*-ból, pontosabban a *M. sexta*-ból származó és azonosított *AKH*-el; Ziegler és mtsai., 1985) (3. ábra). A frakciót először a *M. brassicae* homológ biotesztben vizsgáltuk és igen aktívnak mutatkozott. Ezt a felfedezést alátámasztják azok az eredmények is, amelyeket ún. heterológ bioteszt rendszerben kaptunk, azaz a kérdéses rész/frakció(k) biológiai aktivitást mutatott a *L. migratoria* lipid mobilizációs tesztben is (Fónagy és mtsai., 2002).



3. ábra: A *M. brassicae* *CC-CA* kivonatának *RP-HPLC* kromatogramja.

UV-detekció 214 nm-en. *BST Nucleosil 5 RP-C₁₈* oszlopon (A=víz; B=60% *AcNi* 0,11%*TFA*; 30-100%B 36 perc alatt; 1ml/perc) Az aktív régiót □-val jelöltem. A piros nyíl a *Mas-AKH* retenciós helyét jelöli.

Az elvégzett *MALDI-ToF MS* szerkezet meghatározások is (azonos „molekula ionok” detektálása révén) igazolták feltevésünket, hogy a *M. brassicae*-ből izolált *AKH* bizonyára megegyezik a *Mas-AKH*-el, mely szerkezet azonos néhány más lepkefajból izoláltéval is. A **molekulaion (*Mas-AKH Na⁺*) tömegét *MALDI-ToF MS* mérés alapján **1030,47 D-nak állapítottuk meg** és a feltételezett szerkezete:**

(*Mas*)-*Mab-AKH*: pQLTFTSSWGamid

– Rövid megvitatás

Mint az a korábbi nagyobb összefoglalókból ismert volt az *AKH* neuropeptideket széles körben kutatták (Gäde, 1990; Gäde, 1997; Gäde és mtsai, 1997) és hatásmechanizmusuk is viszonylag jól ismert (Gäde és Auerswald, 2003). Érdekes módon azonban a lepkék rendjén belül még csak néhány eredményes izolációról volt tudomásunk. Egységesen előforduló kilenctagú *Mas-AKH*-t a dohányszenderben (Ziegler és mtsai., 1985), a kukorica bagolylepkében (*H. zea*) (Jaffe és mtsai., 1986a) vagy a se-lyemlepkében (*B. mori*) (Ishibashi és mtsai., 1992) ill. később, a bogáncslepkében (*Vanessa cardui*) (Köllisch és mtsai., 1999) is megtalálták. Ez utóbbi fajban azonban azonosítottak egy jelentősen eltérő szerkezetű *-Vac-AKH-* neuropeptidet is (Köllisch és mtsai., 2000). A *H. zea*-ből kivontak egy másik metabolikus peptidet (*Hipertrehalosemic hormone, HrTH*), ami inkább a vérnyirok trehalóz szintjét emelte (Jaffe és mtsai., 1986b). Mind a *Mas-AKH*-hez mind pedig a *Hez-HrTH*-hez hasonló vagy azonos peptidet (fizikai módszerrel megvizsgálva) találtak két további lepkefajban (*Hippoteon eson* és *Imbrasia cytherea*) habár pontos szerkezet meghatározásra nem is került sor (Liebrich és Gäde, 1995).

A fenti eredményeket –hogy ugyanis a *M. brassicae*-ből izolált *AKH* egyezik a *M. sexta*-ból kivontéval– mindössze egy tény vonhatja kétségbe, nevezetesen az, hogy pozitív kontrollként alkalmazott *Mas-AKH* a homológ biotesztekben általában gyengébb aktivitást mutatott (magasabb dózisban is), mint a kivonat vagy tisztított neuropeptid. Ezért felmerülhet a kérdés, hogy esetleg a konformáció kialakításban fontos szerepet játszó (pl. 4. vagy 8. pozícióban található aminosav mégis eltérő lehet, amit viszont a piroglutamát deblokkolás után csak *Edman*-degradációval lehetne meghatározni. A kapott molekulatömeg azonban ellentmond ennek a feltételezett eltérésnek. Ezt a bizonytalanságot eddig azonban nem sikerült még tisztáznunk.

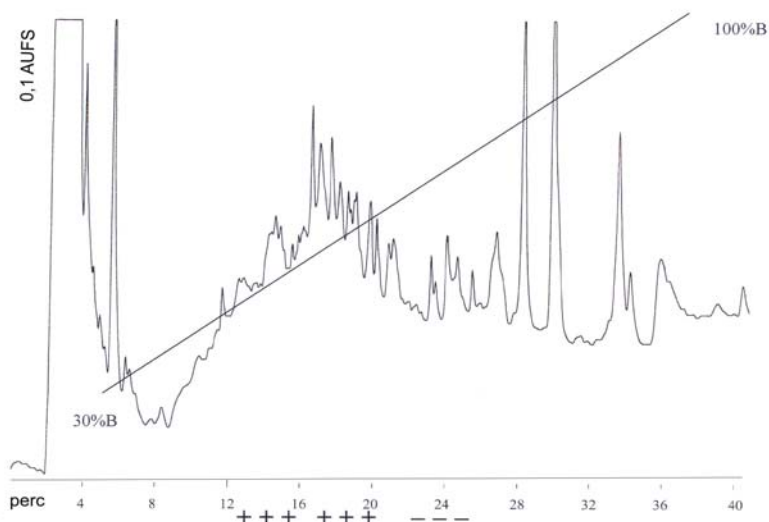
IV.3. MIOAKTÍV NEUROPEPTIDEK

– Alkalmazott *in vitro* bioteszt a mioaktivitás vizsgálatára

Először alkalmaztuk a *B. craniifer* óriáscsótány utóbél preparátumot *in vitro* mioaktivitás nyomonkövetésére. A beállítás során megállapítottuk, hogy a *Lom-MT-II*, valamint a *Pss-PT* szintetikus neuropeptidek 10^{-9} M, ill. 10^{-8} M koncentrációtartományban még aktívak, tehát megbízható módon alkalmas a teszt sorozatvizsgálatra ill. bármilyen biológiailag aktív, a spontán izomműködésre ható biológiai minta vagy szintetikus anyag stb. (farmakológiai jellegű) rutinvizsgálatára.

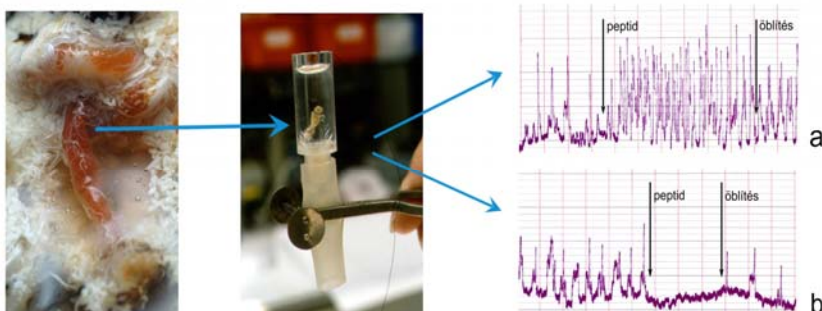
– Mioaktív neuropeptidok frakcionálása, biológiai hatásai és szerkezetük

A nőstényekből és a hímekből külön-külön készített *agy-SOG* komplex extraktumokat egy lépcsőben, *RP-HPLC*-n frakcionáltuk és a beszárított mintákat biotesztnak vetettük alá. A biotesztek alapján **hat miotropikus (MT)**, továbbá **három mioinhibitor (MIP) hatású frakciót találtunk** (4, 5. ábra) (Fónagy és mtsai., 2002).



4. ábra: A *M. brassicae* agy-SOG komplex kivonatának RP-HPLC futtatás kromatogramja.

UV-detekció 214 nm. *BST Nucleosil 5 RP-C₁₈* oszlopon (A=víz; B=60% *AcNi* 0,11%TFA; 30-100%B 36 perc alatt; 1ml/perc) Az aktív régiókat jelöltem. A + a serkentő hatású frakciókat, míg a – pedig a gátló hatású frakciókat jelölik.



5. ábra: Mioaktivitás bioassay. A *B. craniifer* csótány utóbelének *in situ* bemutatása, majd a kamrában történő elhelyezkedése a preparálást követően.

Az a. ábrán a 4. ábra „19” frakciójának serkentő hatása (tónus, frekvencia és amplitúdó), míg a b. ábrán a „24” frakció erősen gátló hatása látható.

Az elvégzett *MALDI-ToF MS* szerkezet-meghatározások számos ismert és azonosítható „molekula ionok” meglétére engedett következtetni, de sok új is felbukkant, ami megakadályozta az egyértelmű „ujjlenyomatszerű” detektálást és teljes összeolvasást. Az alábbiakat tudtunk megállapítani:

Serkentő hatású minták:

***Mab-PT* (β -*PBAN*):SLAYVQKVFENVEFVPRLamid molekula tömeg: 2141,99 (Lsd. még:IV/1.)**

***/Arg⁷/Korazonin* H⁺:pQTFQYSRGWTNamid molekula tömeg: 1369,62**

Gátló hatású minta:

***(Mas)-Mab-FLRFamid-I* H⁺: pQDVVHSFLRFamid molekula tömeg: 1229,64**

– Rövid megvitatás

A legklasszikusabbnak számító *in vitro* rovar-biotesztet –a madeira csótányban és az amerikai csótány utóbelének spontán aktivitásának befolyásolásához– mioaktív neuropeptidek izolálásához fejlesztették ki, amint ezt Holman és mtsai. (1991) később összefoglalták. Ennek segítségével sikerült meghatározni korábban a *proktolint* (Starratt és Brown, 1975) is. Ezt később továbbfejlesztették több más zsigeri izomzatra, mint pl. szívcsőre (Konopińská és mtsai., 1986) vagy petevezetőre (Paemen és mtsai., 1991). Ezek a farmakológiai jellegű rovarszetek igen fontosak, mert alapjait képezik az élettani és hormon-hatásmechanizmus vizsgálatoknak ill. szintetikus analógok (agonisták és antagonisták stb.) fejlesztésében. A *B. craniifer* óriáscsótányon beállított bioteszt nagyon hatékonynak és hasznosnak bizonyult és mindenképpen bővíti a vizsgálati lehetőségeinket. Megkíséréltem, hogy magából a káposzta bagolylepke valamelyik zsigeri izomszövetéből készítek preparátumot (pl. ötödik stádiumú lárva beléből is), de még az imágó legígéretebbnek tűnő petefészek/petevezető szövete sem volt megfelelő mérésre alkalmas izolált szerv készítésére a mi eszközeinkkel és főleg a szövetek rendkívüli lágyágából adódóan, ezért végig a heterológ mioaktivitás biotesztet használtuk.

A munkával kapcsolatban kiemelendő, hogy a lepkeféléken belül nagyon kevés ismeretünk van a *MT/MIP* neuropeptidekről. Ismerjük a *helikokinin-I, II (Hez-K-I, II)* molekulákat, de ezek is elsősorban diuretikus aktivitásúak, ami természetesen viscerális aktivátor szerepükkel van összefüggésben (Blackburn és mtsai., 1995b). Azonosítottak továbbá a dohányszenderből inhibitorokat (*Mas-MIP-I, II*) (Blackburn és mtsai., 1995a) és *FarP* típusú inhibitorokat is (*Mas-FLRFamid-I, II, III*) (Kingan és mtsai., 1996). Ezeken túlmenően a peptidomika (kis proteinek *MALDI-ToF MS* sorozatvizsgálata) új tudományos módszerével a viaszmolylepke, *Galleria mellonella*, lárvajából a közelmúltban szintén azonosították a *Hez-K-I, II*-t, az *(Arg⁷)-korazonint*, egy *PK* típusú (konzervatív C-terminálissal rendelkező) neuropeptidet, valamint *Mas-FLRFamid-I, II*-t az agy-*SOG* komplex nyers kivonatából (Huybrechts és mtsai., 2005). Hasonlóképpen sikerült közel egy tucat már ismert neuropeptid tömegét azonosítani ezzel a módszerrel a dohányszender hímjeiben és nőstényeiben egyaránt, úgy mint *Mas-AKH, FLRFamid-I, II, III*, két *CAP*-ot, három *MIP*-et, végül *korazonint* és *Mas-AST*-t (Audsley és Weaver, 2003). További hat, más ismert *Lepidoptera* peptidet is kimutattak ezekből a mintákból (Audsley és Weaver, 2003).

Munkánkban ötvöztük a klasszikusnak számító tisztítási majd biológiai aktivitás vizsgálatainak lépéseit, valamint a peptidomika adta lehetőségeket még Audsley és Weaver (2003), valamint Huybrechts és mtsai. (2005) által közzé tett eredmények előtt. Tekintettel arra, hogy *Edman*-degradáción alapuló aminosav meghatározásra nem volt lehetőség ezért –a biológiai hatás és aktivitás révén– célszerűnek látszott legalább a fizikai „meghatározás” módszerét alkalmazni tájékozódás és összehasonlítás végett. Eddigi eredményeink is igazolják, hogy a legfontosabb ismert neuropeptidek egy körültekintő monitorozással –biológiai és szerkezeti szempontból– azonosíthatók és továbbvizsgálva esélyt ad újabbak felfedezésére is.

2. rész: A FEROMON-BIOSZINTÉZISÉNEK HORMONÁLIS IRÁNYÍTOTTSÁGA ÉS A FOLYAMATOT KÍSÉRŐ SEJTANI ESEMÉNYEK BEMUTATÁSA A BOMBYX MORI-BAN, VALAMINT A MAMESTRA BRASSICAE-BEN

IV.4. A PBAN HATÁSMECHANIZMUSA A B. MORI-BAN

– A *Bom-CaM* izolációja, meghatározása és jellemzése

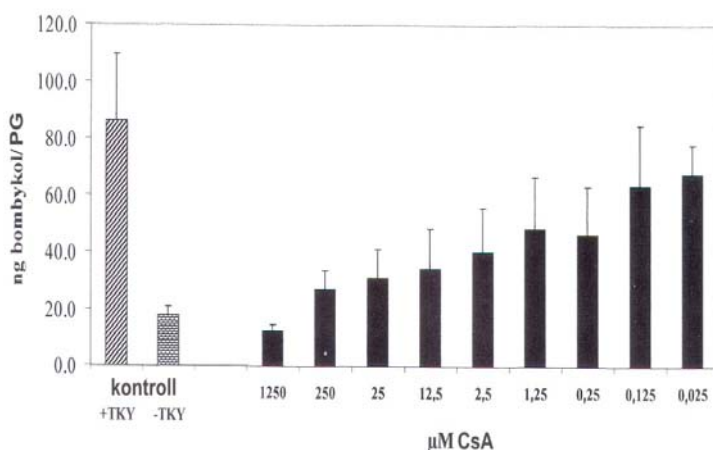
A *Bom-CaM* fehérjét a *PG* kivonat citoszolikus frakciójából tisztítottuk több lépcsőn keresztül. Először ion-cserélő oszlopon, majd *RP-HPLC*-vel végeztük az elválasztást és mintegy 200 pmol-nyi anyagmennyiséget izoláltunk és *MALDI-ToF MS* segítségével pedig megállapítottuk, hogy a ***Bom-CaM* mért tömege 16701 D**, mely eredmény jó egyezést mutatott más *CaM* molekulákkal is.

Az analízis során sikerült megállapítani, hogy az N-terminális aminosav ténylegesen egy blokkolt N-acetil-Ala, mely szintén hasonlít más ismert *CaM* molekulákhoz, valamint azt, hogy a C-terminális vég nem amidált. Leszögeztük, hogy egy 148 aminosavból álló molekuláról van szó, aminek a tényleges (számított) molekula tömege: **16711,8 D**. A részegységek tömegeinek, valamint azok szekvencia analíziseit követően a rendelkezésre álló mozaikok segítségével az alábbi aminosav sorrendet állapítottuk meg (Iwanaga és mtsai., 1998):

***Bom-CaM*: Ac-ADQLTEEQIAEFKEAFSLFDKDGDDTITTKELGTVMRS LGQNPTEAELQD-MINEVDADGNGTIDFPEFLTMMARKMKDTDSEEEIREAFRVFDKDGNGFI-SAAELRHVMTNLGEKLTDEEVDEMIREADIDGDGQVNYEEFVTMMTSK-OH.**

– *CaN* szerepének bizonyítása a *PBAN* jelátadási folyamatában

Mind a *CsA*, mind pedig az *FK 506* –melyek specifikus inhibitorai a *CaN*-nek (Kunz és Hall, 1993)– **határozott dózis-hatás gátlást (telítődési görbe) mutatott az *in vitro* izolált *PG* vizsgálatokban**, amikor *TKYFSPRLamid*, vagy *Bom-PBAN-I* neuropeptiddel együtt inkubáltuk (6. ábra). A legmagasabb koncentrációban (1250 μM) gyakorlatilag 100%-os gátlást sikerült elérni, továbbá az ED_{50} mindkét farmakokemikáliánál közel azonosnak (1,25 μM) adódott.



6. ábra: A *CsA* *in vitro* feromonszintézis gátló hatása *TKY(FSPRLamid)* szintetikus peptid jelenlétében.

A *PG*-ket 40 μl *Grace* médiumban inkubáltuk a jelöléseknek megfelelő inhibitor kombinációban és koncentrációban. A +*TKY* vagy a pozitív kontroll jelöli (5 pmol) amelyhez csak *EtOH*: *DMSO*-t adtunk. A „-” kontroll nem tartalmazott peptidet. A számított átlagok legalább 9 független minta eredményéből származnak, a vékony vonalak az \pm SD-t jelölik.

A *CaN* részvételét a jelátadási rendszerben *SDS-PAGE* hagyományos gélelektroforézis rendszer alkalmazásával standard marha-agy *CaN*-val párhuzamosan futtatva, valamint *Western blot* segítségével is megerősítettük.

Figyelemreméltó metodikai részeredmény –melyek rendkívül jól szolgálják a *bombykol* termelés folyamatának vizsgálatát–, hogy korábbi módszereket továbbfejlesztve és befejezve, **sikerült teljesen kidolgozni egy működőképes, sejtmentes ún. CHAPS Sup. mikroszóma teszt rendszert**, melynek leggyakrabban használt standardizált körülményeit Fónagy és mtsai. (1999) ismertették részletesen. Vizsgálatainkban, **a kontrollhoz képest ugyanannyi bombykolt termel egy-egy teszt összeállítás (170±15 ng bombykol/PG ekvivalens)**, mind pl. *CsA*, mind pedig *FK 506* jelenlétében, mely bizonyítja, hogy az eljárás során a citoszólikus frakcióba elválasztásra kerülnek a *PBAN* jelátadási mechanizmusban egyébként nélkülözhetetlen elemek.

A mikroszóma *CHAPS Sup.* rendszert használtuk egy másik farmakológiai vizsgálati sorozathoz, amely az acil-*CoA*-reduktáz (*ACR*) enzim kulcsfontosságú szerepét volt hivatott igazolni. Feltételeztük ugyanis, hogyha a *kompaktin*/-sav képes volt *in vitro* gátolni a *bombykol* termelést (a végső redukciós lépés gátlásával) *PT/PBAN* jelenlétében (Ozawa és mtsai., 1995), akkor minden bizonnyal, a mikroszóma *CHAPS Sup.* rendszerben is kifejti gátló hatását annak ellenére, hogy „energiával” (*NADPH*, *ATP*) és „szubsztráttal” (*AcCoA*) ellátjuk. **A kompaktin/-sav szignifikánsan gátolta a bombykol termelést** ugyanis a *CHAPS Sup.* mikroszóma frakcióban aktívan működik többek között az *ACR* is.

– A *bombykol* termelő *PG* sejtek azonosítása és kultúrában tartása

Célunk az volt, hogy a tényleges epidermális eredetű mirigy sejteket elkülönítsük, sejt kultúrában tartsuk különböző vizsgálatok céljából. **A *PG* ún. belső** (vagy alsó, epidermális mirigysejtek), **valamint a külső** (vagy felső, kutikula) **rétegét egy sikeres papainos emésztési folyamattal és eljárással rutinszerűen tudtuk szétválasztani**, melynek részletes leírását Fónagy és mtsai. (2000) adják meg. Számos emésztő enzim került kipróbálásra (pl. kollagenáz, diszpáz, pankreatin stb.), továbbá jónéhány egyéb lepke *in vitro* kísérletekhez javasolt *Ringer* rendszer is (valamint a *Grace* médium), de számunkra továbbra is a Matsumoto és mtsai. (1995) által használt bizonyult a legjobbnak. A papainos emésztés a két réteg közötti emésztésre nyújt megoldást, de nem emésztí az azonos sejt-sejt közötti kapcsolatot, ami viszont fontos előny lehet a sejtek integritásának és életben maradásának biztosításában.

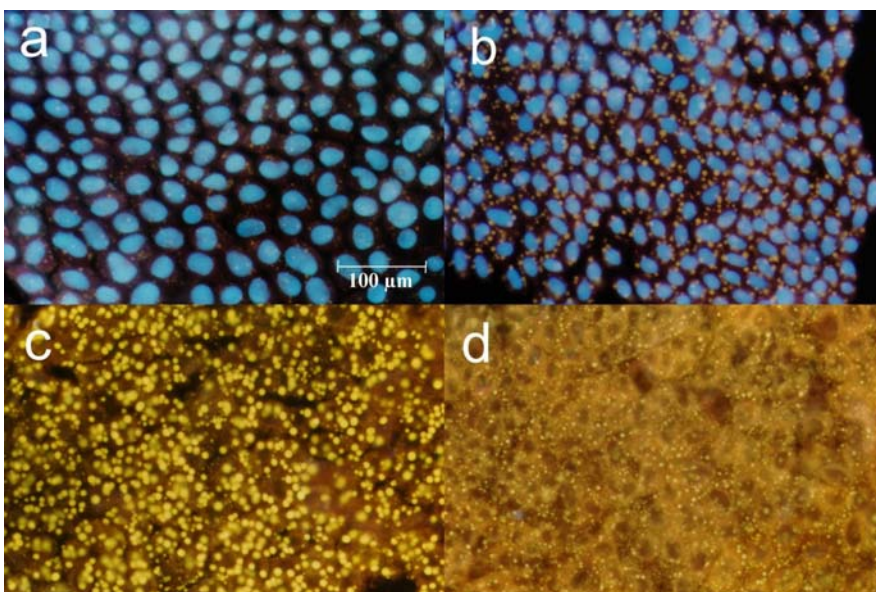
Farmakológiai vizsgálatokat végeztünk a belső sejtréteggel, valamint kontrollként a külső módosult kutikulával, ill. a korábban is rendszeresen használt *in vitro PG* egész miriggyel és a szétterített miriggyel. **A dózis-hatás vizsgálatok eredményei a *TKYFSPRLamid* szintetikus peptiddel, valamint az *ionomycin* és *Ca ionophore* ágensekkel a várakozásnak megfelelően, a korábban *in vitro PG* kísérleteknél tapasztalt leghatékonyabb dózisokkal egyezett meg.** A kutikula réteg semmilyen termelést nem mutatott (Fónagy és mtsai., 2000).

A kultúrában tartott sejtek steril körülmények között öt napig megőrizték működőképességüket.

– A *bombykol* termelő *PG* sejtek fluoreszcenz mikroszkópos vizsgálata, valamint jellegzetes sejttani dinamizmusa és a folyamat *PBAN* általi befolyásoltsága

Fluoreszcenz mikroszkópos vizsgálatokat végeztünk, ahol *Nilus*-vörös festés alkalmazása egy rendkívül hatékony, egyben viszonylag könnyebben kivitelezhető módszernek bizonyult. Ehhez kapcsolódóan a *Hoechts* sejtmagfestés (kék), valamint ezen két festés egyidejű alkalmazása egy speciális rovar-szövet vizsgálatához újdonságnak számított. Vizsgálataink során elsősorban változó mennyiségű és nagyságú *LD*-kre lettünk figyelmesek. Megállapítottuk, hogy a sejtek átmérője 25-35 μm és 15 ± 3 sejt/ $0,01 \text{ mm}^2$ a sejtsűrűség és egy igen homogén, szorosan egymás mellett elhelyezkedő sejtállományról van szó. A nagy sejtmagot számos dinamikusan változó *LD* veszi körül. A sejtek életképességét (elsősorban az emésztéses szétválasztás után) ellenőriztük *Calcein* (fluoreszcenz) vitális festéssel, ahol a sejtek 80-90%-a élő volt. Vizsgáltuk *Acridine orange*-al, hogy az adott időszakban már nincsen sejtproliferáció, hanem a sejtek funkcionális dinamizmus miatt változnak.

A *PBAN* szerepének tisztázására a *LD*-k változásában volt az egyik legfontosabb feladat (Fónagy és mtsai., 2001). Néhány fluoreszcenz felvétel segítségével bemutatom a jellegzetes folyamatot: Két nappal kelés előtt az *LD*-k száma kevés és kicsinyek ($<5 \mu\text{m}$) (7. a. kép). Egy nappal a kelés előtt ez már változik (7. b. kép), míg a kelés idejére (egybeesik a napi fényperiódus kezdetével) méretük és számuk nagy lesz (4-10 μm) (7. c. kép). A 7. d. képen –a fényperiódus középidejében– az *LD*-k ismét kicsik lesznek és számuk is csökken (a sötétebb árnyak a sejtmagok). A keléstől számítottan négy napon keresztül ugyanebben a fényperiódus fázisban hasonlót lehet megfigyelni. A mérések alapján a *bombykol* termelés azonban ekkor éri el napi csúcspontját. Megfigyeltük továbbá, hogy a dekapitált nőstények esetében óriás méretű cseppek (12-14 μm) láthatók, míg a háromszor *in vivo Bom-PBAN*-el kezelt dekapitált nőstény *PG* szövetében sok apró *LD* alakul ki, tehát a kezelés kiürülési folyamatot indít meg. Leírtuk, hogy az egynapos pároztatott nőstény, ill. egynapos dekapitált nőstény *PG*-je hasonlóan néz ki, mivel mindkét esetben már felfüggesztődött a *bombykol* termelődés.



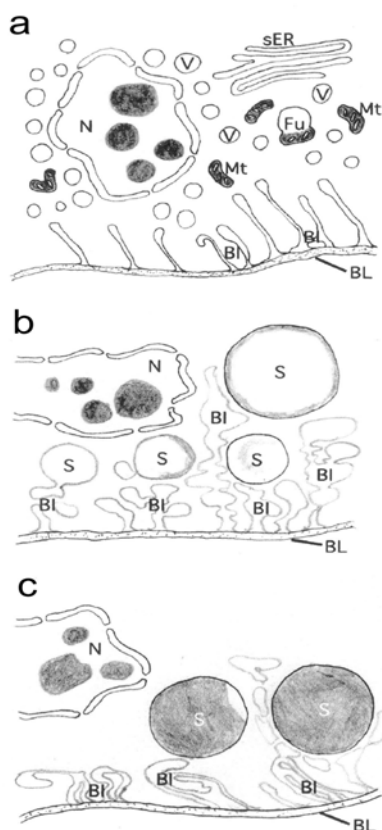
7. ábra: *PG* sejtek fluoreszcenz mikroszkópos képei

Az a. és b. dupla festés, a c. és d. *Nilus*-vörös festés. Magyarázatot lsd. fenti szövegben.

A *PG*-ben talált feltűnő mennyiségű és méretében változó *LD* arra sarkallt bennünket, hogy a folyamatot részleteiben is megvizsgáljuk, ezért a kelést megelőzően, majd további hat napon keresztül (a kelést követően napi négy időpontban) folytattunk morfometriai méréseket. **Megállapítottuk, hogy a *LD*-k mérete és száma legnagyobb a kelést követő első és második napon, mégpedig a fényperiódus elején, amit később nagyon magas *bombykol* termelés is kísér, követ.** A kelést követő harmadik napon már tompul majd a negyedik napra az említett dinamikus fluktuáció jelentősen lecseng.

– A *bombykol* termelő *PG* sejtek ultrastrukturális vizsgálata, jellegzetes dinamikus folyamatok feltérképezése és leírása

Részletes elektronmikroszkópai vizsgálatokat végeztünk, melynek eredményeit és következtetéseit közöltük (Yokoyama és mtsai., 2003). A sok időpontban készített felvétel alapján kidolgoztunk egy sematikus modellt a *LD*-k kialakulásának folyamatára (8. ábra).



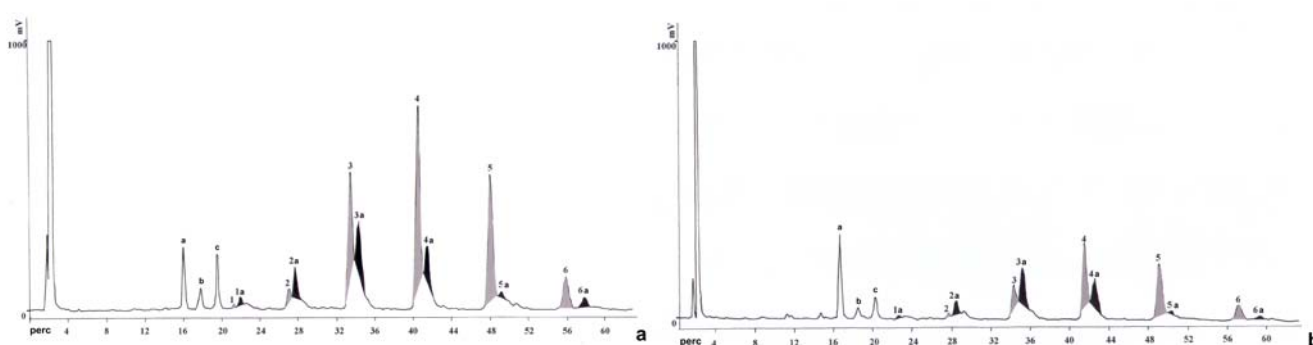
8. ábra: A *PG*-sejtben zajló dinamikus sematikus ábrázolása a mikroszkópos képek alapján; az *LD*-k kialakulása és fejlődése.

Az a. ábra két nappal a kelés előtti állapotot mutatja, ahol jól megfigyelhető, hogy az alacsony elektrodenzitású vezikulumok (*V*) a mitokondriumokkal (*Mt*) fuzionálnak (*Fu*), továbbá a bazális lamina (*BL*) alatt kialakuló betűrődéseket (*BI*) lehet látni. Ezzel együtt jól kirajzolódnak az apikális oldalon hosszú ciszternákkal övezett sima endoplazmatikus retikulumok (*sER*), amik a következő napokban azonban már alig kivehetők. A b. képen különböző méretű (fejlődési állapotú) elektrodenzzé váló gömb alakú struktúrák láthatók (*S*). A c. ábra már a kelés utáni állapotot mutatja nagyobb méretű *S* képletekkel.

– A *bombykol* termelő *PG* sejtek citoplazmatikus *LD*-k kémiai elemzése

Az *LD*-k kémiai elemzését megelőzte itt is egy **eljárás kidolgozása, melynek révén megbízhatóan –mennyiségi és minőségi értelemben is– kivontuk a vizsgálandó zsírszerű anyagokat a *PG* sejtekből.** Az acetonos kivonás mellett döntöttünk és a továbbiakban a nem-poláros zsírok elemzésére összpontosítottunk. Ennek köszönhetően nyertük azokat az elsődleges frakciókat, melyeket továbbtisztítottunk. Végezetül kizárólag a *Tg*-ket vizsgáltuk tovább, ugyanis láthatóan ezek mutattak mennyiségi változást pl. a bábállapot és a kelést követően ill. később napszakosan is.

A *Tg*-ket tartalmazó előtisztított frakciókat hét napon keresztül vizsgáltuk a kelési naptól kezdve naponta kétszer, hogy a fény, valamint fluoreszcenz mikroszkóppal végzett vizsgálataink eredményét relatív mennyiségi *Tg* vizsgálatokkal is összevethessük. A 9 a. és b. ábrákon két fontos időpontban (de. 10 órakor ill. du. 18 órakor) kapott jellegzetes *HPLC* kromatogram látható. **Megállapítható, hogy a minták között lényeges mennyiségi eltérés van az egyes komponensek között.** A csúcsokat számokkal és ehhez kapcsolódó betű, vagy csak betű kódokkal láttuk el és három fő csoportra osztottuk azokat. Valamennyi időpontban több párhuzamos futtatást (min. kettő) végeztünk, majd a három különböző csoport eredményeit összesítettük, kiértékeljük. **Kijelenthető, hogy fluktuációjuk összhangban van a fluoreszcenz mikroszkóp segítségével meghatározott *LD* méret és mennyiségi eredményekkel.** A kelést követő harmadik naptól ingadozásuk csökken, tompul.



9. ábra: Az előtisztított *Tg* mintákat tartalmazó frakciók *RP-HPLC*-vel *Senshu-C₂₂* oszlopon végzett elválasztás kromatogramja *ELSD*-detekció segítségével. (a. ábra keléskor, b. ábra kelés után 8 órával) (A= *AcN:EtOH*; 6:4; B=*AcNi:EtOH*; 2:8; 0-100% B 60 perc alatt; 1,5ml/perc). A fő csúcsokat 1-6-ig (szürke szín), míg a mellécsúcsok 1a-6a-ig (fekete szín) jelöli. A szám nélküli egyéb csúcsokat a-c jelöli.

A jellegzetes *Tg* csoportok mennyiségi változását követően elvégeztük valamennyi frakció minőségi analízisét. A csúcsok kézi gyűjtését követően még egy *HPLC* tisztításnak vetettük alá azokat. A számított ill. mért molekula tömegek alapján meghatároztuk a *Tg*-k összetételét. **Megállapítottuk, hogy összesen ötféle *Fa* található 16 különböző kombinációban a *Tg*-kben** (Matsumoto és mtsai., 2002):

Δ^{11} -hexadecenoát, $\Delta^{10,12}$ -hexadekadienoát, Δ^9 -oktadecenoát, $\Delta^{9,12}$ -oktadekadienoát és $\Delta^{9,12,15}$ -oktadekatrienoát

Az eredményekből feltétlenül kiemelendő, hogy a jelentős fluktuációt mutató csúcsok esetében (elsősorban 1-5 főcsúcsok) mindig kimutatható volt a $\Delta^{10,12}$ -hexadekadienoát, ami a *bombykol* előanyaga. Fontos továbbá, hogy az 1a-4a mellécsúcsok között is megtaláljuk vagy a $\Delta^{10,12}$ -hexadekadienoátot, vagy pedig előanyagát (közterméket), a Δ^{11} -hexadecenoátot. A harmadik csoport csúcsai között megállapítottunk bizonyos fluktuációt, de a kis a-c csúcsok nem *Tg* természetű zsírok.

Enzimatis hidrolízis segítségével (sertés pankreáz) **meghatároztuk, hogy az azonosított $\Delta^{10,12}$ -hexadekadienoát melyik pozícióban található. Megállapítottuk, hogy az elsősorban az *Sn-1* és/vagy 3-as helyen található, praktikusán biztosítva a könnyű hozzáférhetőséget a specifikus lipáz számára.** Az *Sn-2*-es helyen pedig gyakran találtunk *C₁₈*-as telítetlen *Fa*-t.

– A citoplazmatikus *LD*-k non-destruktív izolálása további vizsgálatok céljából

A *LD*-k non-destruktív izolálása azért vált szükségessé, hogy a hozzájuk kapcsolódó *LDAP*-k és/vagy ún. (feltehetően) hormon szenzitív lipázok izolálásához és azonosításához biztosítsuk a kiindulási anyagot. A módszernek csak orvos-biológiai előzményei voltak (Sato és mtsai., 2002), **tehát a kidolgozott rovar-szövet feldolgozására kialakított eljárás fontos eredmény. A több lépcsős kivonási eljárás, homogenizálásokat és kétszeres ultracentrifugálást igényelt. Az ún. „zsír-réteg” szeparálása, fagyasztás, majd lemetszés útján pedig metodikailag teljesen új megoldás volt, tekintettel a rendelkezésre álló kevés kiindulási biológiai mintára (Fónagy és mtsai., 2005).**

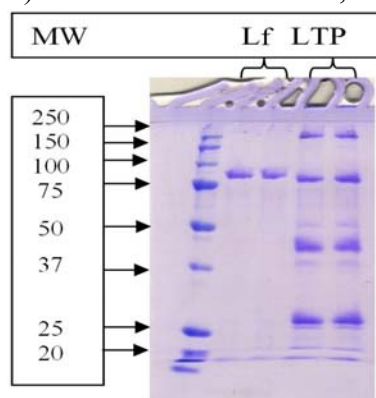
Az *LD*-k izolálását követően, azért, hogy a kapcsolódó *LDAP* proteineket azonosíthassuk hagyományos *SDS-PAGE* elválasztásnak vetettük alá. Az *LD*-k felületéről kivont proteineket ezek után kivágtuk, majd enzimatikusan emésztettük, *HPLC*-vel frakcionáltuk, melyet *MS* meghatározás és peptid szekvenálás követett. Az elsődleges eredmények alapján **néhány azonosított enzim és/vagy protein:**

***B.mori*-aktin, arginin-kináz, anti-kimotripszin-II, gliceraldehid-3-foszfát dehidrogenáz.**

A bemutatott előzetes eredmények biztatóak és lehetőséget kínálnak arra, hogy ezzel a módszerrel *LDAP*-ket, valamint specifikus lipázok azonosítását elvégezhessük a későbbiekben.

– *Lf*-ek és *LTP*-k részleges elválasztása és tisztítása az általuk szállított zsírszerű anyagokkal összefüggésben

A vérnyirokban keringő *LDL*-ek és a *HDL*-ek, valamint *LTP*-k kivonására Tsuchida és mtsai. (1997) módszerét alkalmaztuk, eredményességét *SDS-PAGE* eljárással ellenőriztük (10. ábra).



10. ábra: *SDS-PAGE* (14%) elválasztása a vérnyirokból tisztított *Lf*-eknek és *LTP*-knek.

A minták egy nappal a kelés előtti nőstények vérnyirokjából származtak. A mintázat megfelelt a várákozásnak (Tsuchida és mtsai., 1997). Az ellenőrzést követően került sor a *Dg*-k kivonására, elválasztására és analízisére.

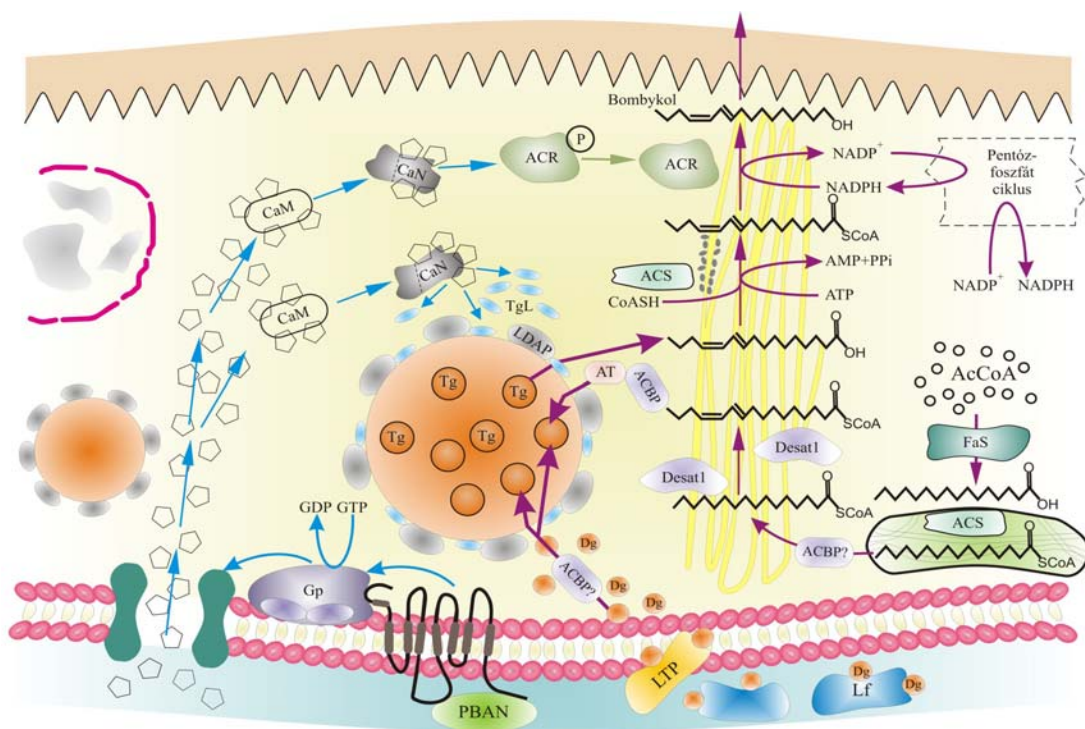
A kivonatból a zsírokat kirázással nyertük ki (*Folchs* reagens), majd *HPLC*-vel szétválasztottuk és szintén *MS*-el meghatároztuk. A kísérletekhez a kelést megelőző napokban majd keléskor, utána, valamint dekapitálást követően is vettünk mintákat. **A kivont *Dg*-k az *Fa*-k különféle keverékeit tartalmazzák (Fónagy és mtsai., 2005):**

Δ^9 -oktadecenoát > hexadecanoát >> oktadecanoát > $\Delta^{9,12}$ -oktadekadienoát >> nyomnyi hexadecenoát és $\Delta^{9,12,15}$ -oktadekatrienoát

A *Fa*-k jórészt megtalálhatók a korábban analizált *LD*-k *Tg* alkotóelemei között. A **bombykol előanyagának számító $\Delta^{10,12}$ -hexadekadienoátot** ill. ennek előanyagát Δ^{11} -hexadecenoátot **nem azonosítottuk, ami megerősítette azt, hogy az kizárólag a *PG*-kben *de novo* szintetizálódik**, míg a *Tg*-k további alkotórészeit (egyéb *Fa*-k) ellenben a vérnyirok áram útján a táplálékból származtathatjuk.

– Rövid megvitatás

Az egy évtizedes kutatómunka –a japán kutatókkal karöltve– egy teljesen egyedülálló igen részletes modell kidolgozását tette lehetővé a selyemlepke *PG*-ben, a feromonszintézis és azt kísérő sejttani eseményeinek folyamatában a legkorszerűbb eszközök igénybevételével, a vizsgálati módszerek széles spektrumának alkalmazásával (11. ábra). Ennek a modellnek a megalkotásához korábbi ismeretek és az új eredmények biztosították az alapot. A *PBAN* célszerveként a *PG*-t jelölték meg és a Ca^{++} döntő szerepét a jelátadási folyamatban Fónagy és mtsai. (1992a,b) mutatták ki. Ozawa és mtsai. (1993, 1995) több farmakológiai *in vitro* vizsgálattal a *CaM* nélkülözhetetlen szerepére mutattak rá, valamint arra, hogy a *bombykol* végső redukciós lépése áll a *PBAN* kontrollja alatt, mivel az *ACR* enzim defoszforilációja és aktivációja a *CaN* közreműködésével zajlik le (Matsumoto és mtsai.,1995).



11. ábra: A *PBAN* hatásmechanizmusa és jelátadási folyamata (—→), valamint az *Fa*-k és *bombykol* *de novo* bioszintézise (—→) a *B. mori* *PG* sejtjeiben. A részletes magyarázatot lsd. a szövegben.

A vérnyirokban (halvány türkizkék) keringő *PBAN* a *Gp* kapcsolt receptorhoz történő kötődést követően külső Ca^{++} áramlik be a megnyíló csatornán keresztül. *Bom*-*CaM*-komplex keletkezik, ami indukálja a *CaN* (avagy *PP2B*) enzimrendszert, serkentve a *bombykol* bioszintézisében kulcsszerepet játszó *ACR*-t (*B. mori*-*PG*-*FAR*; Moto és mtsai., 2003). A végső redukciós lépésen túlmenően a *PBAN* aktiválja a (hormon szenzitív) *Tg* lipázokat (*TgL*) melyeket a *LD*-khez (nagy narancssárga körök) kapcsolódó proteinek (*LDAP*) kötnek le. A lipolízis eredményeképpen, a napi szinten dinamikusan

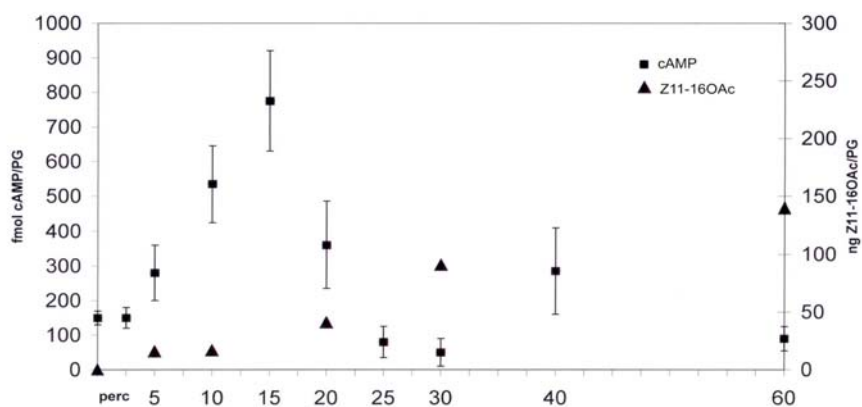
változó cseppekből szabaddá válnak a *Tg*-kben „tárolt” *Fa*-előanyagok, melyek a sejtek citoszóljában (halvány sárga háttér) zsírsav-szintáz (*FaS*) által *AcCoA*-ból kiindulva zsír-acil intermediereken keresztül (palmitát) szintetizálódik egyébként más lepkefajokhoz hasonlóan (Bjostad és mtsai., 1987). Az *Mt*-kben (halványzöld, csöves-vezikuláris szerkezetű organelum) zajló folyamatos *Fa*-szintézis eredményeként (palmitinsav) (*Acil-CoA*-szintetáz: *ACS*), majd a fajra jellemző telítetlen kötések (bifunkcionális deszaturáz: *Desat.1*: Moto és mtsai, 2004) kialakulását követően keletkeznek. Ez utóbbi reakciók már valószínűleg az *acil-CoA*-kötőfehérjék (*Acyl-CoA Binding Protein*; *ACBP*; Matsumoto és mtsai, 2001) által a *sER*-hez (sárga lamellák) történő szállítás után következnek be. Az acil-transzferáz (*Acyl-transferase*; *AT*) a *Fa*-vá alakítást végzi el és bekerülnek a LD-kbe. A *Tg*-k a „fajspecifikus” *Fa*-n ($\Delta^{10,12}$ -hexadekadienoát) kívül a vérnyirok *Lf*-jei által szállított, táplálékból származó, majd *LTP*-k segítségével a sejtbe juttatott *Dg*-kből épülnek fel. Az lipázok (*L*) által az *LD*-kből szabaddá váló specifikus *Fa* a mikroszómákhoz (kis ovális szürke testek) kapcsolódó *ACS* segítségével konvertálódik, a közti terméket végül az aktivált *ACR* alkohollá redukálja. A *bombykol* végezetül a sejt mikrovillusain (fogazott szerkezet), valamint kutikulán (világos barna sáv) a mirigy felszínére jut, és onnan a légtérbe.

A receptor-aktivált Ca^{++} csatorna szerepe döntő fontosságú a *B. mori*-ban a *PBAN* jelátadásában, szemben a feszültség-függő Ca^{++} csatornáéval a kukorica bagolylepke, *H. zea*-ban (Rafaeli, 2002). Hasonló következtetésre jutottunk a *S. litura* esetében (Fónagy és mtsai. 1992a,b; Ozawa és mtsai., 1995), ill. kukoricamolylepke, *Ostrinia nubilalis*-ban is Ma és Roelofs (1995) nemcsak a Ca^{++} csatornát illetően, hanem abban is, hogy a nevezett fajokban a végső redukációs lépés áll *PBAN* kontroll alatt. A jelátadásban közreműködő általunk azonosított *Bom-CaM* teljesen megegyezik a *D. melanogaster*-ből molekuláris biológiai eszközökkel azonosított (Smith és mtsai., 1987), egyébként igen konzervatív szerkezetű proteinnel. A *CaN* részvételét a folyamatban bizonyítottuk és ezt erősítették meg Yoshiga és mtsai. (2002) eredményei, mely szerint egy katalitikus *CaN-A* alegységet és egy *CaN-B cDNS* alegységet klónoztak. A gének már lárvakorban is expresszázódtak, a *PG*-ben viszont a kelést megelőző harmadik naptól (báb korban) lesz egyre intenzívebb a génkifejeződés, ami a kelést követően is jól nyomonkövethető. A *CaN* szerepe kulcsfontosságú, mert egyrészt defoszforiláció révén stimulálja az *ACR*-t, másrészt aktiválja a *TgL*-eket és így „felszabadulnak” a *bombykol* előanyagok az *LD*-kből.

IV.5. A *PBAN* HATÁSMECHANIZMUSA A *M. BRASSICAE*-BEN

– A *cAMP* szerepének *in vivo* vizsgálata a *PBAN* jelátadási folyamatában

Megállapítottuk, hogy egyértelmű dózis-hatás mutatható ki a *PBAN* injektálást követően, de a 10 ill. 20 ng-os kezelések esetében szignifikáns különbség nem mutatkozott a feromon-főkomponenst illetően (128±35 ng ill. 143±29 ng), tehát maximum közeli válasz váltható így ki. Az idő-hatás vizsgálatok esetében a maximális mennyiséget egy óra elteltével mértük (12. ábra).



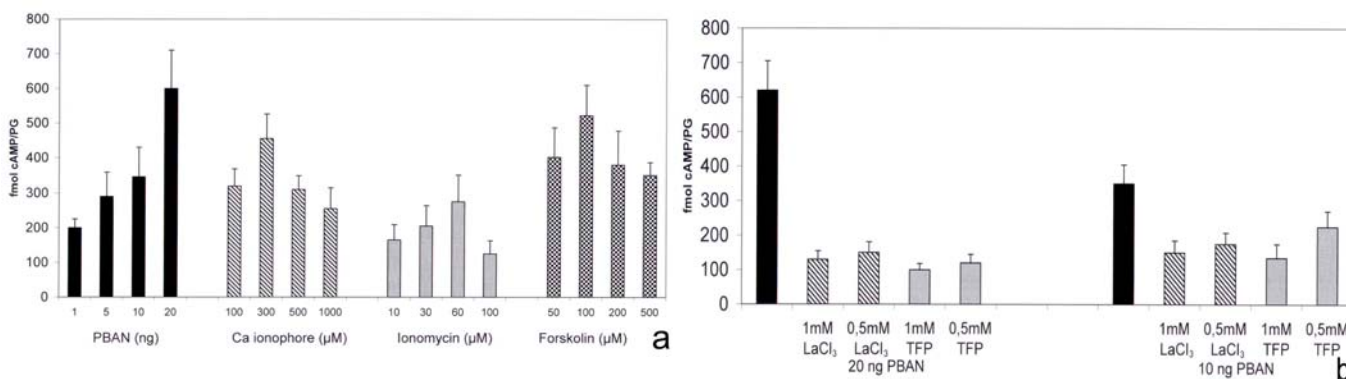
12. ábra: A *cAMP* és *Z11-16OAc* tartalom változása *in vivo* *PBAN* kezelést követően *M. brassicae*-ben. A számított átlagok legalább 3 független minta eredményéből származnak, a vékony vonalak a \pm SD-t jelölik. (Megj: A feromontartalom esetében a jobb áttekinthetőség kedvéért a szórások nincsenek feltüntetve).

A *cAMP* mennyiségi változását és időbeni lefutását illetően a 12. ábrán jól látható, hogy a *PBAN* (20 ng) injektálást követően a 15. percben érte el a maximumot a *cAMP* szintje a *PG*-ben, míg egy másik kisebb csúcs a 40. perc környékén detektálható. Ezzel párhuzamosan viszont a feromontermelés maximuma a 60. perc körülre esik folyamatos növekedés eredményeképpen.

– A *cAMP* szerepének *in vitro* vizsgálata a *PBAN* jelátadási folyamatában

A szintetikus *Hez-PBAN*-nel elvégzett *in vitro* dózis-hatás, valamint idő-hatás vizsgálatok alapvetően az optimális körülmények megállapítását célozták, a farmakokémikáliákkal történő vizsgálatokhoz. A dekapitált nőstényekből eltávolított *PG*-k *in vitro* kísérletekben (60 perces inkubációt követően) a 20 ng-os kezelésre válaszoltak maximális feromontermeléssel (65 \pm 21 ng).

A kísérletek során megállapítottuk, hogy mind a *Ca ionophore*, mind pedig az *ionomycin* esetében a leghatékonyabbnak bizonyuló dózisban (300 μ M, ill. 60 μ M) a kontrollhoz képest (20ng *PBAN* kezelés) közel 60%-os feromontermelést tapasztaltunk, míg a *forskolin* (0,1mM) esetében még nagyobb (\pm 70%). A *LaCl₃*, valamint a *TFP* (1mM) a *PBAN*-el (20 ng) együtt inkubálva ellenben jelentősen gátolta a feromontermelést, az előbbi több mint 50%-ban, míg az utóbbi 80%-ban.



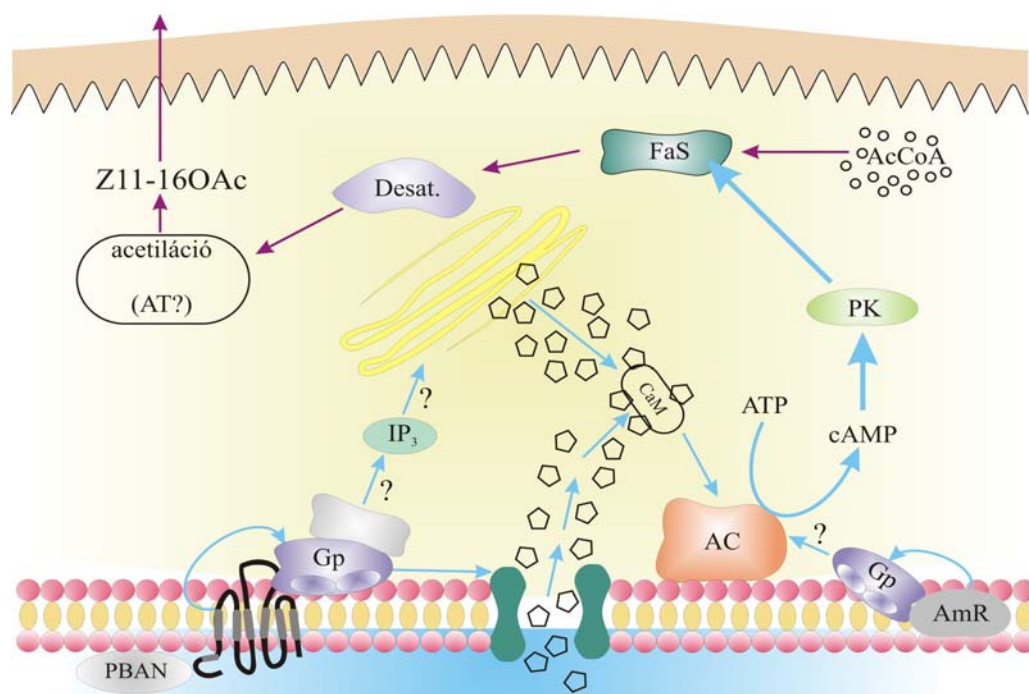
13. ábra: A *cAMP*-tartalom változása *in vitro* történő kezeléseket követően (2,5-3 perces inkubáció).

A 40 μ l Grace médiumban a megadott koncentrációban volt jelen a vizsgálandó ágens. Az átlagok 6 független minta eredményéből származnak (vékony vonalak \pm SD-t jelölik). a. ábra: *PBAN*-nel, *Ca ionophore*-rel, *ionomycin*-nel és *forskolin*-nal történő kezelés; b. ábra: *PBAN*-nel (fekete szín), valamint *LaCl₃*-dal, ill. *TFA*-val és *PBAN*-el együtt kezelve.

A *cAMP* mérések során is a 20 ng-os *PBAN* kezeléseket alkalmaztuk és a sűrű mintavételezésnek köszönhetően megállapítottuk, hogy a *cAMP* szintje a 2-3 percnél volt a legmagasabb, amit két kisebb csúcs követett a 10. majd 25. percben. Ezért a kezeléseket követően a mintákat 2,5-3 perc után gyűjtöttük és a 13. a. ábrán a *Ca ionophore*-ral, *ionomycin*-nel, valamint *forskolin*-nal történő kezelések eredményei láthatók. A gátlás hatékonyságát (*PBAN* és LaCl_3 , valamint *TFP*-vel történő együttes inkubáció) a jelátvivő rendszert tekintve a 13. b. ábrán mutatom be. Az eredmények jól alátámasztják a feromon-főkomponens mennyiségének mért adatait, melyeket 60 perces inkubáció után mértünk.

– Rövid megvitatás

A *M. brassicae* feromontermelésének hormonális irányítottságának vizsgálatánál kiindulásként felhasználtuk azokat az előzményeket, amelyek elsősorban a *Heliothis* fajokra vonatkoztak (Soroker és Rafaeli, 1989; Jurenka és mtsai., 1991), valamint Bestmann és mtsai. (1989) és Jacquin-Joly és mtsai. (1994) addig közöltek a káposzta bagolylepkére. Bizonyosnak tűnt, hogy vagy a Δ -deszaturáz szintjén (Bestmann és mtsai. 1989) vagy még valószínűbb, hogy a *Fa*-szintézis előtt fejt ki hatását a *PT/PBAN* ezért indokolt volt a *cAMP* vizsgálata farmakokémikáliákkal közvetve, ill. *cAMP* mérésén keresztül közvetlenül. Feltételeztük ugyanis, hogy ezeknél a fajknál a *cAMP* jelátviteli rendszer segítségével indukálódnak a protein-kinázok (*PK*), melyek a *Fa*-szintézis enzimmérszletét (*FaS*) aktiválják. Végtermék, vagy szubsztrát beépülés eredményei alapján következtettek a *cAMP* szerepére és kevés konkrét adat állt rendelkezésünkre. Jurenka (1996) áttekintő tanulmányában részletesebb *cAMP* szint méréseket sürgetett.



14. ábra: A *PBAN* hatásmechanizmusa és feltételezett jelátadási folyamata (—————>), valamint a Z11-16OAc bioszintézise (—————>) szematikusan a *M. brassicae* PG sejteiben. A részletes magyarázatot lsd. a szövegben.

A vizsgálataink eredménye alapján bemutatott modell rajza a *PBAN* hatásmechanizmusát és a feromon-bioszintézist ábrázolja *M. brassicae*-ben (14. ábra). A javasolt modell, egyébként sokban megegyezik Rafaeli (2002) összefoglalójában –általában *Heliothis* fajokon végzett kísérletek

alaján– közöltekkel és rajzoltakkal, viszont ennek egy korábbi, egyszerűsített verzióját már hamarabb bemutattam és ismertettem saját eredményeim alapján (Fónagy, 1999).

Ca^{++} ionok beáramlásának jelentőségét a jelátviteli rendszerben bizonyítottuk és szerepe van továbbá még a *CaM*-nak, azonban valószínűleg nemcsak a külső beáramló Ca^{++} ionok, hanem a belső rezervoárokból (*sER*) az inozitol trifoszfát (*IP₃*) jelátadó rendszernek köszönhetően további Ca^{++} ionok szabadulnak fel, melyek együttesen serkentik a *CaM*-hoz kötődve a membrán kötött adenilát-cikláz (AC). A *cAMP* által aktivált *PK*-k a feromon-bioszintézis kezdeti szakaszában játszanak szerepet.

Megállapítható tehát, hogy a szexferomon-bioszintézis ***PBAN* által irányított kulcslépésekben és a jelátadási mechanizmusában valójában két fő típus van, amit kísérleteinkkel is bizonyítottunk– azaz *cAMP* által közvetített (pl. *Helicoverpa*, *Mamestra* fajok) vagy anélküli (pl. *Bombyx*, *Ostrinia* fajok)–**, ellenben abban nincs eltérés, hogy egyeseknél foszfatázokat stimulál, másoknál *PK*-kat, mert elképzelhető, hogy csak foszfatázok játszanak szerepet (Jurenka, 1996; Rafaeli, 2002), ugyanis ahol a *FaS* áll hormonális irányítás alatt ott az első enzimet, az *AcCoA*-karboxiláz defoszforilálja, ahol pedig a végső redukciós lépés áll hormonális kontroll alatt ott az *ACR*-t aktiválja defoszforilációval.

V. KITEKINTÉS

A peptidek jellemzésén és a szerkezet-hatás vizsgálatokon keresztül molekuláris szinten, prekursorok azonosítása, bioszintézise, receptorok és a neuropeptidek kapcsolódása, majd a degradáció területeire hatolhatunk be. Ezen módszerek „összegyűrése” –a biológiai hatásvizsgálatoktól a molekuláris biológiáig – kivételes lehetőségeket nyújtanak arra, hogy a jövőben hatékony, könnyebben kezelhető, specifikus védekezést dolgozzunk ki a rovarkártevők ellen. A különböző szintetikus analógjainak/ mimetikumoknak racionális (az ismert és biológiailag aktív neuropeptid térszerkezetét optimálisan követő) tervezése, szintetizálása és sorozatvizsgálata új perspektívákat nyitnak meg, amint azt Gäde és Goldsworthy (2003) nemrég összefoglalták és ezt a –gyakorlat szempontjából igen fontos– témát a közelmúltban két tanulmányomban is feldolgoztam (Fónagy, 2006b, c).

Kutatásaimmal és az eredmények ismertetésével példát szerettem volna nyújtani arra, hogy a rovarbiokémiai és rovarélettani ismeretek mennyire nélkülözhetetlenek a környezetkímélő, növényvédelmi indíttatású kémiai és/vagy biotechnológiai úton történő beavatkozásokhoz. **A mindenkori gyakorlat tehát semmiképpen sem nélkülözheti az alapkutatás segítségével megszerzett ismereteket és tudást.**

VI. ÚJ EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA

1. Az elmúlt bő tíz évben tárgyi tudásunk gyarapodásával, **jelentősen szaporodtak ismereteink ezért bátrabban és megalapozottabban vállalkozhattam a rovar-neuropeptidek újabb, korszerű csoportosítására. Bemutatásukat részben összefoglalók revíziójával, valamint saját korábbi (Fónagy, 1994) és újabb eredményeim segítségével végeztem el. A közelmúltban megjelent**

tanulmányom alapján (Fónagy, 2005) a következő felosztás ajánlható: Növekedéssel és fejlődéssel, valamint Szaporodással kapcsolatos neuropeptidek (Gäde és Hoffmann, 2005; De Loof és mtsai., 2001); Metabolizmust és homeosztázist (Gäde, 2004), ill. Izommozgásokat befolyásoló neuropeptidek (Schoofs és mtsai., 1994). (1. táblázat).

NEUROPEPTIDEK TISZTÍTÁSA ÉS IZOLÁCIÓJA *M. BRASSICAE*-BŐL

2. A neuropeptid izolációs munkát megelőzően a *PT* aktivitás vizsgálatára -egy *TLC*-detekción alapuló- biotesztet (gyorstesztet) dolgoztunk ki a *M. brassicae*-ben (2. ábra). Az agy-*SOG* komplexből többlépcsős (*RP-HPLC*) tisztítást követően izoláltunk egy *Mab-PT* peptidet melynek molekulaion tömegét 2137,6 D (m/z)-nek állapítottuk meg és a szekvencia valószínűsíthetőleg a következő:

Mab-PT: SLAYVQKVFENVEFVPRLamid.

3. A biológiailag aktív frakciókból további *Mab-PT*-ket kompetitív *ELISA*-val sikerült kimutatni, tehát volt(ak) benne olyan neuropeptid(ek) melynek C-terminális vége *FXPRLamid*.

4. A metabolikus változások nyomonkövetésére a *M. brassicae*-re átdolgoztunk és kifejlesztettünk egy kombinált biotesztet. A metodikának az a lényege, hogy egyetlen állatból nyerhetünk többféle –a homeosztázis állapotot jellemző– adatot a vételezett vérnyirok megfelelő, többirányú vizsgálatával (lipid- és trehalóztartalom változás is meghatározható). Méréseink alapján a lipiddtartalom –azaz a *Dg*– $55 \pm 10 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ körül mozog, míg a trehalóz kontroll értéke $40 \pm 10 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ a vérnyirokban.

5. A *CC-CA* kivonatból származó *Mab*/(*Mas*)-*AKH* neuropeptid izolációja és meghatározása során találtunk egy *AKH* jellegű neuropeptidet, ugyanis retenciós ideje (*RP-HPLC*) jól egyezik a *Mas-AKH*-el (az első, *Lepidoptera*-ból, a *M. sexta*-ból származó és azonosított *AKH*-val) (3. ábra). A molekulaion (*Mas-AKH* Na^+) tömegét 1030,47 D-nak állapítottuk meg és feltételezett szerkezete:

(*Mas*)-*Mab-AKH*: pQLTFTSSWGamid

6. Először alkalmaztuk a *B. craniifer* óriáscsótány utóbél preparátumot *in vitro* mioaktivitás nyomonkövetésére. A beállítás során megállapítottuk, hogy megbízható módon alkalmas a teszt sorozatvizsgálatra, ill. bármilyen biológiailag aktív, a spontán izomműködésre ható biológiai minta vagy szintetikus anyag stb. (farmakológiai jellegű) rutinvizsgálatára (5. ábra). A biotesztek alapján hat miotropikus (*MT*), továbbá három mioinhibitor (*MIP*) hatású frakciót találtunk. (4, 5. ábra). A *MALDI-ToF-MS* szerkezet-meghatározás alapján az alábbiakat azonosítottuk: Serkentő hatású minták:

Mab-PT (β -*PBAN*) : SLAYVQKVFENVEFVPRLamid molekula tömeg: 2141,99

/ Arg^7 /Korazonin H^+ : pQTFQYSRGWTNamid molekula tömeg: 1369,62

Gátló hatású minta: (*Mas*)-*Mab-FLRFamid-I* H^+ : pQDVVHSFLRFamid molekula tömeg: 1229,64

A *PBAN* HATÁSMECHANIZMUSA A *B. MORI*-BAN

7. Sikeresen elvégeztük a *Bom-CaM* fehérje kivonását és tisztítását a *PG* citoszolikus frakciójából. *MALDI-ToF MS* segítségével megállapítottuk, hogy a *Bom-CaM* mért tömege 16701 D. A részegységek tömegeinek és mozaikok segítségével a következő aminosav sorrendet állapítottuk meg:

Bom-CaM: Ac-ADQLTEEQIAEFKEAFSLFDKDGDDTITTKELGTVMRS LGQNPTAEALQD-MINEVDADGNGTIDFPEFLTMMARKMKD TDSEEEIREFRVFDKDGNGFI-SAAELRHVMTNLGEKLTDEEVDEMIREADIDGDGQVNYEEFVTMMTSK-OH.

8. Bizonyítottuk a *CaN* szerepét a *PBAN* jelátadási folyamatában a *PG*-ben, ugyanis mind a *CsA*, mind pedig az *FK 506* –melyek specifikus inhibitorai a *CaN*-nek– határozott dózis-hatás gátlást (telítődési görbe) mutatott az *in vitro* izolált *PG* vizsgálatokban (6. ábra). A *CaN* részvételét *SDS-PAGE*, valamint *Western blot* segítségével is megerősítettük.

9. Kifejlesztettünk egy ún. sejtmentes működőképes *PG CHAPS Sup.* mikroszóma tesztet is (a frakció szubsztrát és „sejtenergia” hozzáadásával *bombykolt* képes termelni), melyet a későbbiekben sokrétűen és hatékonyan felhasználtunk. Az *in vitro PG* teszthez képest közel annyi *bombykolt* termel egy-egy teszt összeállítás (170 ± 15 ng *bombykolt/PG* ekvivalens), mint a kontroll.

10. A *PG CHAPS Sup.* rendszer segítségével igazoltuk és megerősítettük az *ACR* enzim kulcsfontosságú szerepét a *bombykol* végső redukciós lépésében. A *kompaktin/-sav* szignifikánsan gátolta a *bombykol* termelést, ugyanis a *CHAPS Sup.* mikroszóma frakcióban aktívan működik többek között az *ACR* is.

11. Kidolgoztuk a mirigy ún. *bombykol* termelő sejtjeinek leválasztását a kutikuláról (papainos emésztéssel) és sikerült a sejteket életben tartani (akár öt napig is), melyekkel morfológiai és további farmakológiai vizsgálatokat végeztünk (pl. *Ca ionophore A23187*; *ionomycin* kezelések, melyek a divalens kationok beáramlását serkentik és a *PBAN* hatását szimulálják, ill. többféle /enzim/ gátlószert is használtunk). A dózis-hatás vizsgálatok eredményei a *TKYFSPRLamid* szintetikus peptiddel, valamint az *ionomycin* és *Ca ionophore* ágensekkel a korábban *in vitro PG* biotesztknél tapasztalt leghatékonyabb dózisokkal egyezett meg.

12. Fluoreszcenz mikroszkópos vizsgálatokat végeztünk, ahol *Nilus-vörös* festés alkalmazása (neutrális zsírokra), valamint a *Hoechts* (sejtmagfestés), egyidejű alkalmazása egy speciális rovarszövet vizsgálatához újdonságnak számított. Változó mennyiségű és nagyságú *LD*-kre lettünk figyelmesek. Megállapítottuk, hogy a sejtek átmérője $25-35 \mu\text{m}$ és 15 ± 3 sejt/ $0,01 \text{ mm}^2$ a sejtsűrűség és egy igen homogén, szorosan egymás mellett elhelyezkedő sejtállományról van szó. A nagy sejtmagot számos dinamikusan változó *LD* veszi körül.

13. Tisztáztuk a *PBAN* szerepét a *PG*-ben található *LD*-k tekintetében és részletesen leírtuk és kvantifikáltuk a napi (fény és sötét fázisú) változásokat. Két nappal kelés előtt az *LD*-k száma kevés és kicsinyek ($<5 \mu\text{m}$). Egy nappal a kelés előtt ez már változik, míg a kelés idejére (egybeesik a napi fényperiódus kezdetével) méretük és számuk nagy lesz ($4-10 \mu\text{m}$). Naponta a, fényperiódus középidejében, az *LD*-k ismét kicsik lesznek és számuk is csökken (7a-d. kép). A dekapitált nőtények esetében óriás méretű cseppek ($12-14 \mu\text{m}$) láthatók, míg a háromszor *in vivo Bom-PBAN*-el kezelt dekapitált nőtény *PG* szövetében sok apró *LD* alakul ki.

14. Morfometriai vizsgálatokkal is megerősítettük a vizuálisan tapasztaltakat és megállapítottuk, hogy a *LD*-k mérete és száma legnagyobb a kelést követő első és második napon, mégpedig a fényperiódus

elején, amit később nagyon magas *bombykol* termelés is követ. A kelést követő harmadik napon már tompul, majd a negyedik napra a dinamikus fluktuáció jelentősen lecseng.

15. Fény- és elektronmikroszkópos vizsgálatok segítségével ábrázoltuk a *PG* sejtekben zajló folyamatokat, az *LD*-k kialakulását és fejlődését a kelést megelőzően, majd a kelés utánig (8. ábra).

16. Egy új eljárás keretében, megbízhatóan –mennyiségi és minőségi értelemben is– kivontuk a vizsgálandó zsírszerű anyagokat, a *Tg*-ket, a *PG* sejtek *LD*-jeiből. A kivont mintákat *HPLC*-vel analizáltuk és kijelenthető, hogy fluktuációjuk összhangban van a fluoreszcenz mikroszkóp segítségével meghatározott *LD* méret és mennyiségi eredményekkel (9. ábra). A jellegzetes *Tg* csoportok mennyiségi változását követően elvégeztük valamennyi frakció minőségi analizisét. Megállapítottuk, hogy összesen ötféle *Fa* található 16 különböző kombinációban a *Tg*-kben :

Δ^{11} -hexadecenoát, $\Delta^{10,12}$ -hexadekadienoát (*bombykol* előanyaga), Δ^9 -oktadecenoát, $\Delta^{9,12}$ -oktadeka-dienoát és $\Delta^{9,12,15}$ -oktadekatrienoát.

Meghatároztuk a $\Delta^{10,12}$ -hexadekadienoát pozícióját és megállapítottuk, hogy az elsősorban az *Sn-1* és/vagy 3-as helyen található, így biztosítva a könnyű hozzáférhetőséget a lipázok számára.

17. Kidolgoztunk egy új eljárást a *PG*-ből származó *LD*-k non-destruktív izolálására, hogy a módszer segítségével a felszínükön található ún. *LD*-khez kapcsolódó fehérjéket (*LDAP*) kivonhassuk, jellemezhesük. Ezeknek a fehérjéknek (dokkoló fehérjék, lipázok) kulcsszerepük lehet a *LD*-kben raktározott *de novo* szintetizált *bombykol* előanyag(ok) felszabadításában. A többlépcsős eljárás során az alábbi néhány enzimet és/vagy proteint sikerült azonosítani:

B.mori-aktin, arginin-kináz, anti-kimotripszin-II, glicerinaldehid-3-foszfát dehidrogenáz.

18. Kivontuk és meghatároztuk azokat a *Dg*-ket melyeket a vérnyirokban szállító funkcióval bíró *Lf*-ek, valamint a membránon történő átszállítást végző *LTP*-k hordoznak és résztvesznek a *LD*-k *Tg*-jeinek felépítésében a nevezett *Fa*-k mellett (10. ábra). A kivont *Dg*-k az *Fa*-k keverékeit tartalmazzák:

Δ^9 -oktadecenoát > hexadekanoát >> oktadekanoát > $\Delta^{9,12}$ -oktadekadienoát >> nyomnyi hexadecenoát és $\Delta^{9,12,15}$ -oktadekatrienoát.

A *bombykol* előanyagát a $\Delta^{10,12}$ -hexadekadienoátot ill. ennek előanyagát Δ^{11} -hexadecenoátot nem azonosítottuk, ami megerősítette azt, hogy az kizárólag a *PG*-kben, *de novo* szintetizálódik.

19. Kidolgoztuk a *PBAN* jelátadási mechanizmusát, valamint a feromonszintézisének folyamatát és sejttani eseményeit bemutató egyedülállóan részletes modelljét a *B. mori* *PG*-ben (11. ábra).

A *PBAN* HATÁSMECHANIZMUSA A *M. BRASSICAE*-BEN

20. *In vivo* kísérletekkel vizsgálva dózis-hatás mutatható ki a *PBAN* injektálást követően a főkomponens, *Z11-16OAc* tekintetében. Az idő-hatás vizsgálatok esetében a maximumot egy óra elteltével mértük a *PG*-ben. A *cAMP* mennyiségi változását és időbeni lefutását illetően a *PBAN* injektálást követően a 15. percben volt a maximum, egy kisebb csúcs a 40. perc körül (12. ábra).

21. ***PG*-k *in vitro* kísérletekben a *Ca ionophore*, az *ionomycin* esetében a leghatékonyabbnak bizonyuló dózisban a kontrollhoz képest közel 60%-os feromontermelést tapasztaltunk, a *forskolin* (adenilát-cikláz aktivátor) esetében még nagyobbat ($\pm 70\%$). A LaCl_3 , valamint a *TFP* a *PBAN*-el együtt inkubálva jelentősen gátolt. A *cAMP* szintje a 2-3 percnél volt a legmagasabb, amit két kisebb csúcs követett a 10. majd 25. percben. A gátlás hatékonyságát bizonyítottuk (*PBAN* és LaCl_3 , valamint *TFP*-vel történő együttes inkubáció) a *cAMP* jelátvivő rendszert tekintve (13. ábra).**
22. A vizsgálataink eredménye és általában *Heliothis* fajokon végzett kísérletek alapján közöltekkel és rajzoltakkal, a bemutatott modell a *PBAN* hatásmechanizmusát és a feromon-bioszintézisét ábrázolja *M. brassicae*-ben (14. ábra). *PBAN* által irányított kulcslépésekben és jelátadási mechanizmusában a *PG*-kben valójában tehát két fő típus van, azaz *cAMP* által közvetített (pl. *Heliothis*, *Mamestra* fajok) vagy anélküli (pl. *Bombyx*, *Ostrinia* fajok).

VI. IRODALOM

(Vastagított karakterrel a Doktori minősítéshez kiemelt publikációkat jelöltem)

- Audsley, N. és Weaver, R. (2003): A comparison of the neuropeptides from the retrocerebral complex of adult male and female *Manduca sexta* using MALDI-TOF mass spectrometry. *Regul. Peptides*. 116: 127-137.
- Bestmann, H.J., Herrig, M., Attygalle, A.B. és Hupe, M. (1989): Regulatory steps in sex pheromone biosynthesis in *Mamestra brassicae* L. (Lepidoptera: Noctuidae). *Experientia*. 45: 778-781.
- Bjostad, L.B., Wolf, W.A. és Roelofs, W.L. (1987): Pheromone biosynthesis in lepidopterans: Desaturation and chain shortening. In: Prestwich, G.D., Blomquist, G.J. (Eds.) *Pheromone Biochemistry*, Academic Press, Orlando, Fl. 77-120.
- Blackburn, M.B., Wagner, R.M., Kochansky, J.P., Harisson, D.J., Thomas-Laemont, P. és Raina, A.K. (1995a): The identification of two inhibitory peptides, with sequence similarities to the galanins, isolated from the ventral nerve cord of *Manduca sexta*. *Regul. Pept.* 57: 213-219.
- Blackburn, M.B., Wagner, R.M., Shabanowitz, J., Kochansky, J.P., Hunt, D.F., és Raina, A.K. (1995b): The isolation and identification of three diuretic kinins from the abdominal ventral nerve cord of *Helicoverpa zea*. *J. Insect Physiol.* 41: 723-730.
- Choi, M.-Y., Fuerst, E.-J., Rafaeli, A. és Jurenka, R. (2003): Identification of a G protein-coupled receptor for pheromone biosynthesis activating neuropeptide from pheromone glands of the moth *Helicoverpa zea*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100: 9721-9726.
- De Loof, A., Baggerman, G., Breuer, M., Claeys, I., Cerstiaens, A., Clynen, E., Janssen, T., Schoofs, L. és Van den Broeck, J. (2001): Gonadotropins in insects: An overview. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 47: 129-138.
- Fónagy, A. (1994): Új miotropikus és feromonotropikus rovar neuropeptidek izolálása, meghatározása és biológiai aktivitása; Egyéb kapcsolódó peptidek hatásmechanizmusa különböző rovarbiológiai vizsgálati rendszerekben. MTA Kand. Ért. pp: 1-78+mellk.
- Fónagy, A. (1999): A PBAN (Pheromone Biosynthesis Activating Neuropeptide) hatásmechanizmusa lepkékben. In: Sáringer, Gy., Balázs, K. és Szemessy Á (Eds.) Növényvédelmi Tudományos Napok '99 Budapest, Reprint Kft. Budapest. Abs. Vol. p: 47.**
- Fónagy, A. (2005): Betekintés a rovar-neuroendokrinológiába. I. A neuropeptidek szintézise, hatásai, csoportosításuk. Biokémia. 29: 60-67.**
- Fónagy, A. (2006a): A rovarok legfontosabb ritmikus életfolyamatai és azok hormonális háttere. In: Biológiai órák. Ritmikus biológiai folyamatok az élővilágban eds: Csernus V. és Mess B. Akadémiai Kiadó, Budapest pp. 37-62.**
- Fónagy, A. (2006b): Betekintés a rovar-neuroendokrinológiába. II. A neuropeptidek receptorai, hatásmechanizmusuk, valamint ezen ismeretek gyakorlati alkalmazhatósága. Biokémia. 30: 7-14.**
- Fónagy, A. (2006c): Insect neuropeptides and their potential application for pest control. Acta Phytopathol. Entomol. Hung. 41: 137-152.**
- Fónagy, A., Marco, M. és Gäde, G. (2002): Myotropic and metabolic neuropeptides from the pest species, *Mamestra brassicae* (Noctuidae, Lepidoptera). 21st Conf. Eur. Comp. Endocrinol. Bonn, . Abs. Vol. p.101.**

- Fónagy, A., Matsumoto, S., Uchiumi, K. és Mitsui, T. (1992a): Role of calcium ion and cyclic nucleotides in pheromone production in *Bombyx mori*. J. Pestic. Sci. 17: 115-121.
- Fónagy, A., Matsumoto, S., Uchiumi, K., Orikasa, C. és Mitsui, T. (1992b): Action of pheromone biosynthesis activating neuropeptide on pheromone glands of *Bombyx mori* and *Spodoptera litura*. J. Pestic. Sci. 17: 47-54.
- Fónagy, A., Schoofs, L., Matsumoto, S., De Loof A. és Mitsui, T. (1992c): Functional cross reactivities of some locustamyotropins and *Bombyx* pheromone biosynthesis activating neuropeptide. J. Insect Physiol. 38: 651-657.
- Fónagy, A., Ohnishi, A., Esumi, Y., Suzuki, Y. és Matsumoto, S. (2005): Further studies of lipid droplets in the bombykol producing pheromone gland of *Bombyx mori*. In: Vaudry, H., Schoofs, L., Flick, G. és Larhammar, D. Trends in Comparative Endocrinology and Neurobiology. Annals New York Acad. Sci. 1040: 310-314.**
- Fónagy, A., Yokoyama, N., Okano, K., Ozawa, R., Tatsuki, S., Maeda, S. és Matsumoto, S. (1999): Involvement of Calcineurin in the signal transduction of PBAN in the silkworm, *Bombyx mori* (Lepidoptera). Comp. Biochem. Physiol. 124B: 51-60.
- Fónagy, A., Yokoyama, N., Okano, K., Tatsuki, S., Maeda, S. és Matsumoto, S. (2000): Pheromone-producing cells in the silkworm, *Bombyx mori*: identification and their morphological changes in response to pheromonotropic stimuli. J. Insect Physiol. 46: 735-744.
- Fónagy, A., Yokoyama, N. és Matsumoto, S. (2001): Physiological status and change of cytoplasmic lipid droplets in the pheromone-producing cells of the silkworm, *Bombyx mori* (Lepidoptera, Bombycidae). Arthr. Struct. Dev. 30: 113-123.
- Fónagy, A., Teal, P., Meredith, J., Körmendy, C. és Tumlinson, J. (1996): The purification, isolation and partial identification of a new pheromonotropic peptide from the moth *Mamestra brassicae* (Lepidoptera). Annales d'Endocrinol. Vol 57: 18th Conf. of Eur. Comp. Endocrinol., Rouen, Abs. Vol: C18.
- Fónagy, A., Teal, P., Meredith, J., Körmendy, C. és Tumlinson, J. (1998): Partial identification of a new pheromonotropic peptide from *Mamestra brassicae*. In: Vaudry, H., Tonon, M-C., Roubos, E. és De Loof, A. (Eds). Trends in Comparative Endocrinology and Neurobiology. Annals New York Acad. Sci. 839: 488-490.
- Gäde, G. (1990): Structure-function studies on hypertrehalosemic and adipokinetic hormones: activity of naturally occurring analogues and some N- and C-terminal modified analogues. Physiol. Ent. 15: 299-316.
- Gäde, G. (1997): The explosion of structural information on insect neuropeptides. In: Herz, W., Kirby, G. W., Moore, R. E., Steglich, W. és Tamm, C. (Eds.). Progress in the Chemistry of Organic Natural Products, Springer, Wien, New York. pp:1-128.
- Gäde, G. (2004): Regulation of intermediary metabolism and water balance of insects by neuropeptides. Annu. Rev. Entomol. 49: 93-113.
- Gäde, G. és Auerswald, L. (2003): Mode of action of neuropeptides from the adipokinetic hormone family. Gen. Comp. Endocrinol. 132: 10-20.
- Gäde, G. és Goldsworthy, G. (2003): Insect peptide hormones: a selective review of their physiology and potential application for pest control. Pest Manag. Sci. 59: 1063-1075.
- Gäde, G. és Hoffmann, K-H. (2005): Neuropeptides regulating development and reproduction in insects. Physiol. Entomol. 30: 103-121.
- Gäde, G., Hoffmann, K-H. és Spring, J. H. (1997): Hormonal regulation in insects: Facts, gaps, and future directions. Physiol. Rev. 77: 963-1032.
- Holman, G.M., Nachman R.J., Schoofs, L., Hayes, T.K., Wright, M.S. és De Loof, A. (1991): The *Leucophaea maderae* hindgut preparation: a rapid and sensitive bioassay tool for the isolation of insect myotropins of other insect species. Insect Biochem. 21: 107-112.
- Holman, G. M., Nachman, R. J. és Wright, M. S. (1990): Insect neuropeptides. Annu. Rev. Entomol. 35: 201-217.
- Holwerda, D.A., van Dorn, J. és Beenackers, A.M.T. (1977): Characterization of the adipokinetic and hyperglycemic substances from the locust corpus cardiacum. Insect Biochem. 7: 151-157.
- Hull, J.J., Ohnishi, A., Moto, K., Kawasaki, Y., Kurata, R., Suzuki, M.G. és Matsumoto, S. (2004): Cloning and characterization of the pheromone biosynthesis activating neuropeptide receptor from the silkworm, *Bombyx mori*. J. Biol. Chem. 279: 51500-51507.
- Huybrechts, J., Verleyen, P. és Schoofs L. (2005): Mass spectrometric analysis of head ganglia and neuroendocrine tissue of larval *Galleria mellonella* (Arthropoda, Insecta). J. Mass Spectrom. 40: 271-276.
- Ishibashi, J., Kataoka, H., Nagasawa, H., Isogai, A. és Suzuki, A. (1992): Isolation and identification of adipokinetic hormone of the silkworm, *Bombyx mori*. Biosci. Biotech. Biochem. 56: 66-70.
- Iwanaga, M., Dohmae, N., Fónagy, A., Takio, K. Kawasaki, H., Maeda, S. és Matsumoto, S. (1998): Isolation and characterization of calmodulin in the pheromone gland of the silkworm, *Bombyx mori*. Comp. Biochem. Physiol. 120B: 761-767.**

- Jacquin-Joly, E., Burnet, M., Francois, M., Ammar, D., Nagnan-le Meillour, P. és Descoins, C. (1998): cDNA cloning and sequence determination of the pheromone biosynthesis activating neuropeptide of *Mamestra brassicae*: A new member of the PBAN family. *Insect Biochem. Molec. Biol.* 28: 251-258.
- Jacquin-Joly, E., Jurenka, R.A., Ljungberg, H., Nagnan, P., Löfstedt, C., Descoins, C. és Roelofs, W.L. (1994): Control of sex pheromone biosynthesis in the moth *Mamestra brassicae* by pheromone biosynthesis activating neuropeptide. *Insect Biochem. Molec. Biol.* 24: 203-211.
- Jaffe, H., Raina, A.K. és Hayes, D.K. (1986a): HPLC isolation and purification of pheromone biosynthesis activating neuropeptide of *Heliothis zea*. In: Borkovec, A.B. és Gelman, D.B. (Eds.) *Insect Neurochemistry and Neurophysiology*. Humana Press, N.J. pp: 219-224.
- Jaffe, H., Raina, A.K., Riley, C.T., Fraser, B.A., Holman, G.M., Wagner, R.M., Ridgway, R.L. és Hayes, D.K. (1986b): Isolation and primary structure of a peptide from the corpora cardiaca of *Heliothis zea* with adipokinetic activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 135: 622-628.
- Jurenka, R.A. (1996): Signal transduction in the stimulation of sex pheromone biosynthesis in moths. *Arch. Insect. Biochem. Physiol.* 33: 245-258.
- Jurenka, R.A., Jacquin, E. és Roelofs, W.L. (1991): Stimulation of pheromone biosynthetic pathway in *Helicoverpa zea*: action of a brain hormone on pheromone glands involves Ca^{++} and cAMP as second messengers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88: 8621-8625.
- Kingan, T.G., Shabanowitz, J., Hunt, D.F. és Witten, J.L. (1996): Characterization of two myotropic neuropeptides in the FMRFamide family from segmental ganglia of the moth *Manduca sexta*: candidate neurohormones and neuromodulators. *J. Exp. Biol.* 199: 1095-1104.
- Kitamura, A., Nagasawa, H., Kataoka, H., Inoue, T., Matsumoto, S., Ando, T. és Suzuki, A. (1989): Amino acid sequence of pheromone biosynthesis activating neuropeptide (PBAN) of the silkworm, *Bombyx mori*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 163: 520-526.
- Kitamura, A., Nagasawa, H., Kataoka, H., Ando, T. és Suzuki, A. (1990): Amino acid sequence of pheromone biosynthesis activating neuropeptide-II (PBAN-II) of the silkworm, *Bombyx mori*. *Agric. Biol. Chem.* 54: 2495-2497.
- Konopińska, D., Sobotka, W., Lesicki, A., Rosinski, G. és Sujak, P. (1986): Synthesis of proctolin analogs modified in the position 2 of peptide chain and their cardioexcitatory effect on the cockroach *Periplaneta americana* and the yellow mealworm *Tenebrio molitor*. *Int. J. Peptide Protein Res.* 27: 597-603.
- Köllisch, G.V., Verhaert, P.D., Lorenz, M.W., Kellner, R., Gäde, G. és Hoffmann, K.H. (1999): Structure elucidation of Mas-AKH as the major adipokinetic hormone in the butterfly *Vanessa cardui* (Lepidoptera: Nymphalidae). *Eur. J. Entomol.* 96: 309-315.
- Köllisch, G.V., Lorenz, M.W., Kellner, R., Verhaert, P.D. és Hoffmann, K.H. (2000): Structure elucidation and biological activity of an unusual adipokinetic hormone from corpora cardiaca of the butterfly, *Vanessa cardui*. *Eur. J. Biochem.* 267: 5502-5508.
- Kunz, J. és Hall, M.N. (1993): Cyclosporin A, FK 506 and *rapamycin*: more than just immunosuppression. *Trends Biochem. Sci.* 18: 334-338.
- Liebrich, W. és Gäde, G. (1995): Adipokinetic neuropeptides and flight metabolism in three moth species of the families *Sphingidae*, *Saturniidae* and *Bombycidae*. *Z. Naturforsch.* 50: 425-434.
- Ma, P.W., Knipple, D.C. és Roelofs, W.L. (1994): Structural organization of the *Helicoverpa zea* gene encoding the precursor protein for pheromone biosynthesis-activating neuropeptide and other neuropeptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91: 6506-6510.
- Ma, P.W.K. és Roelofs, W.L. (1995): Calcium involvement in the stimulation of sex pheromone production by PBAN in the European corn borer, *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Pyralidae). *Insect Biochem. Mol. Biol.* 25: 467-473.
- Masler, E.P., Raina, A.K., Wagner, R.M. és Kochansky, J.P. (1994): Isolation and identification of a pheromonotropic neuropeptide from the brain-suboesophageal ganglion complex of *Lymantria dispar*: a new member of the PBAN family. *Insect Biochem. Molec. Biol.* 24: 829-836.
- Matsumoto, S., Fónagy, A., Kurihara, M., Uchiumi, K., Nagamine, T., Chijimatsu M. és Mitsui, T. (1992a): Isolation and primary structure of a novel pheromonotropic neuropeptide structurally related to Leucopyrokinin from the armyworm larvae, *Pseudaletia separata*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 182: 534-539.
- Matsumoto, S., Fónagy, A., Yamamoto, M., Yokoyama, N., Esumi, Y., Suzuki, Y. és Yamaguchi, I. (2002): Chemical characterization of cytoplasmic lipid droplets in the pheromone-producing cells of the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochem. Molec. Biol.* 32: 1447-1455.**
- Matsumoto, S., Ozawa, R., Nagamine, T., Kim, G-H., Uchiumi, K., Shono, T. és Mitsui, T. (1995): Intracellular transduction in the regulation of pheromone biosynthesis of the silkworm, *Bombyx mori*: suggested involvement of calmodulin and phosphoprotein phosphatase. *Biosci. Biotech. Biochem.* 59: 560-562.

- Matsumoto, S., Yamashita, O., Fónagy, A., Kurihara, M., Uchiumi, K., Nagamine T. és Mitsui, T. (1992b): Functional diversity of a pheromonotropic neuropeptide: Induction of cuticular melanization and embryonic diapause in lepidopteran insects by *Pseudaletia* pheromonotropin. *J. Insect Physiol.* 38: 847-851.
- Matsumoto, S., Yoshiga, T., Yokoyama N., Iwanaga, M., Koshiha, S., Kigawa, T., Hirota, H., Yokoyama, S., Okano, K., Mita, K., Shimada, T. és Tatsuki, S (2001): Characterization of acyl-CoA-binding protein (ACBP) in the pheromone gland of the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochem. Molec. Biol.* 31: 603-609.
- Miller, T.A. (Ed.) (1980): Neurohormonal techniques in insects. Springer-Verlag, New York, Heidelberg, Berlin. pp: 1-282.
- Moto, K., Suzuki, M. G., Hull, J.J., Kurata, R., Takahashi, S., Yamamoto, M., Okano, K., Imai, K., Ando, T. és Matsumoto, S. (2004): Involvement of a bifunctional fatty-acyl desaturase in the biosynthesis of the silkworm, *Bombyx mori*, sex pheromone. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101: 8631-8636.
- Moto, K., Yoshiga, T., Yamamoto, M., Takahashi, S., Okano, K., Ando, T. Nakata, T. és Matsumoto, S. (2003): Pheromone gland-specific fatty-acyl reductase of the silkworm, *Bombyx mori*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100: 9156-9161.
- Ozawa, R., Ando, T., Nagasawa, H., Kataoka, H. és Suzuki, A. (1993): Reduction of the acyl group: The critical step in bombykol biosynthesis that is regulated *in vitro* by the neuropeptide hormone in the pheromone gland of *Bombyx mori*. *Biosci. Biotech. Biochem.* 57: 2144-2147.
- Ozawa, R., Matsumoto, S., Gil Hah, K., Uchiumi, K., Kurihara, M., Shono, T. és Mitsui, T. (1995): Intracellular signal transduction of PBAN action in lepidopteran insects: inhibition of sex pheromone production by compactin, an HMG CoA reductase inhibitor. *Regul. Peptides.* 57: 319-327.
- Paemen, L., Tips, A., Schoofs, L., Prost, P., Van Damme, J. és De Loof, A. (1991): Lom-AG-myotropin: A novel myotropic peptide from the male accessory glands of *Locusta migratoria*. *Peptides*, 12: 7-10.
- Rafaeli, A. (2002): Neuroendocrine control of pheromone biosynthesis in moths. *Int. Rev. Cytol.* 213: 49-91.
- Raina, A.K. és Gäde, G. (1988): Insect peptide nomenclature. *Insect Biochem.* 18: 785-787.
- Raina, A. K., Jaffe, H., Kempe, T. G., Keim, P., Blacher, R. W., Fales, H., Riley, C. T., Klun, J. A., Ridgway, R. L. és Hayes, D. K. (1989): Identification of a neuropeptide hormone that regulates sex pheromone production in female moths. *Science.* 244: 796-798.
- Sato, S., Fukasawa, Y., Yamakawa, Y., Suzuki, T., Miyamura, T. és Masahiro, N. (2002): Proteome analysis of lipid droplet. In: 75th Ann. Meeting of the Jap. Biochem. Soc.
- Sato, Y., Oguchi, M., Menjo, N., Imai, K., Saito, H., Ikeda, M., Isobe, M. és Yamashita, O. (1993): Precursor polyprotein for multiple neuropeptides secreted from the suboesophageal ganglion of the silkworm *Bombyx mori*: Characterization of the cDNA encoding the diapause hormone precursor and identification of additional peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90: 3251-3255.
- Scharrer, B. (1937): Über sekretorisch tätige Nervenzellen bei wirbellosen Tieren. *Naturwissenschaften.* 25:131-8.
- Scharrer, B. (1987): Insects as models in neuroendocrine research. *Ann. Rev. Entomol.* 32: 1-16.
- Scharrer, E. (1928): Die Lichtempfindlichkeit blinder Elritzen (Untersuchungen über das Zwischenhirn der Fische). *Z. Vgl. Physiol.* 7: 1-38.
- Schoofs, L., Holman, G. M., Nachman, R. N., Hayes, T. K. és De Loof, A. (1994): Structure, function, and distribution of insect myotropic peptides. In: Davey, K. D., Peter, R. E. és Tobe, S. S. (Eds.). *Perspectives in Comparative Endocrinology.* Natl. Res. Council. Can. Ottawa: 155-165.
- Smith, V.L., Doyle, K.E., Maune, J.F., Munjaal, R.P. és Beckingham, K. (1987): Structure and sequence of the *Drosophila melanogaster* calmodulin gene. *J. Mol. Biol.* 196: 471-485.
- Soroker, V. és Rafaeli, A. (1989): *In vitro* hormonal stimulation of acetate incorporation by *Heliothis armigera* pheromone glands. *Insect Biochem.* 19: 1-5.
- Starratt, A. N. és Brown, B.E. (1975): Structure of pentapeptide proctolin, a proposed neurotransmitter in insects. *Life Sci.* 17: 1253-1256.
- Staubli, F., Jørgensen, T.J.D., Cazzamali, G., Williamson, M., Lenz, C., Søndergaard, L., Roepstorff, P. és Grimmelikhuijzen, C.J.P. (2002): Molecular identification of the insect adipokinetic hormone receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99: 3446-3451.
- Tsuchida, K., Soulages, J.L., Moribayashi, A., Suzuki, K., Maekawa, H. és Wells, M.A. (1997): Purification and properties of lipid transfer particle from *Bombyx mori*: Comparison to the lipid transfer particle from *Manduca sexta*. *Biochem. Biophys. Acta.* 1337: 57-65.
- Yokoyama, N., Fónagy, A., Tatsuki, S., Arie, T., Yamashita, S. és Matsumoto, S. (2003): Ultrastructural studies on the pheromone producing cells in the silkworm *Bombyx mori*: formation of cytoplasmic lipid droplets before adult eclosion. *Acta Biol. Acad. Sci. Hung.* 54: 299-311.**
- Yoshiga, T., Yokoyama, N., Imai, N., Ohnishi, A., Moto, K. és Matsumoto, S. (2002): cDNA cloning of calcineurin heterosubunits from the pheromone gland of the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochem. Molec. Biol.* 32: 477-486.
- Ziegler, R., Eckart, K., Schwarz, H. és Keller, R. (1985): Amino acid sequence of *Manduca sexta* adipokinetic hormone elucidated by combined fast atom bombardment (FAB)/ tandem mass spectrometry. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 133: 337-342.

TARTALOMJEGYZÉK

I. TUDOMÁNYOS ELŐZMÉNYEK; A ROVAR-NEUROENDOKRINOLÓGIA	
ÁLTALÁNOS ÁTTEKINTÉSE	1
II. CÉLKITŰZÉSEK	6
III. VIZSGÁLATI ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	7
IV. EREDMÉNYEK ÉS RÖVID MEGVITATÁSAIK	9
1.rész: KÜLÖNFÉLE NEUROPEPTIDEK TISZTÍTÁSA, IZOLÁLÁSA, MEGHATÁROZÁSA MAMESTRA BRASSICAE-BŐL, VALAMINT KAPCSOLÓDÓ HATÁSVIZSGÁLATOK	9
IV.1. FEROMONOTROPIKUS NEUROPEPTIDEK.....	9
IV.2. ADIPOKINETIKUS NEUROPEPTIDEK.....	11
IV.3. MIOAKTÍV NEUROPEPTIDEK	12
2. rész: A FEROMON-BIOSZINTÉZISÉNEK HORMONÁLIS IRÁNYÍTOTTSÁGA ÉS A FOLYAMATOT KÍSÉRŐ SEJTTANI ESEMÉNYEK BEMUTATÁSA A BOMBYX MORI- BAN, VALAMINT A MAMESTRA BRASSICAE-BEN	15
IV.4. A <i>PBAN</i> HATÁSMECHANIZMUSA A <i>B. MORI</i> -BAN	15
IV.5. A <i>PBAN</i> HATÁSMECHANIZMUSA A <i>M. BRASSICAE</i> -BEN.....	22
V. KITEKINTÉS	25
VI. ÚJ EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA	25
VII. IRODALOM	29