

Betekintés a rovar-neuroendokrinológiába

II. A neuropeptidok receptorai, hatásmechanizmusuk, valamint ezen ismeretek gyakorlati alkalmazhatósága

Insight into insect neuroendocrinology

II. Receptors, modes of action of neuropeptides and possible application of available knowledge in practice

Fónagy Adrien

MTA Növényvédelmi Kutatóintézete,
Ökotoxikológiai és Környezetanalitikai Osztály
1022 Budapest, Herman Ottó út 15.
Tel.: (1) 391-8612
Fax: (1) 391-8655
E-mail: h7191fon@ella.hu

Összefoglalás

Ismereteink a rovar-neuropeptidok elsődleges szerkezetét, szintézisét, kibocsátódását, receptorhoz történő kötődését, szerkezet-hatás összefüggéseit és hatásmechanizmusát illetően drámai mértékben bővültek az elmúlt tíz esztendőben. A rovar-neuroendokrinológia fejlődésének köszönhetően – és ezzel egy időben – fokozottabbá vált az igény a még környezetkímélőbb növényvédelmi módszerek kifejlesztésére. A cél ma már sohasem a rovarkártevő teljes megsemmisítése, hanem sokkal inkább faj- vagy csoportspecifikus népességszabályozása, mely azonban csak akkor valósítható meg, ha a rovarélet-tan, -endokrinológia, -biokémia, valamint az ökológia legújabb eredményeit felhasználjuk. Miután a neuropeptidok kulcsfontosságú életfolyamatokat irányítanak a rovarok életében, ezek a specifikus anyagok, pontosabban szintetikus analógjaik, mimetikumaik, agonistáik vagy antagonistáik ígéretes jelöltként jöhetnek szóba a modern növényvédelmi stratégiák kidolgozásában.

Fónagy, A.

Plant Protection Institute of the Hungarian Academy of Sciences, Department of Ecotoxicology and Environmental Analysis, H-1022 Budapest, Herman Ottó út 15., Hungary, phone: (36) 1 391-8612, fax: (36) 1 391-8655, E-mail: h7191fon@ella.hu

Summary

Our current knowledge regarding the primary structure, synthesis, release, receptor-binding, structure-activity relationships and mode of action of insect neuropeptides has increased dramatically during the past decade. Thanks to the development of insect neuroendocrinology – and in parallel to this progress – an even increasing need for modern, yet environmentally sound strategies of plant protection has arisen. The ultimate aim is, not the total eradication of harmful insects, but rather, selective targeting by using species- or group-specific control strategies, which can only be achieved by taking note of recent results in insect physiology, endocrinology, biochemistry and ecology. The rationale behind this approach is, that, since neuropeptides regulate key biological events, these “special agents” or their synthetic analogues, mimetics, agonists or antagonists may be effective tools in combating insect pests.

A rovar-neuropeptidok szerkezetének, hatásmechanizmusának, élettani hatásainak, valamint a szerkezet-hatás összefüggések minél pontosabb megismerése elengedhetetlenül szükséges, s ez megfelelő és megbízható biotesztek (*bioassay*) nélkül elképzelhetetlen lenne. Modellrendszerek használata alapvető biológiai és orvosbiológiai történések tanulmányozására hosszú múltra tekint vissza, de főleg emlősszervezetekre korlátozódott.

Újabban, megfelelő kísérleti modelleket már a gerinctelenek vagy nem emlős gerincesek körében is keresnek – részben az ezen módszerek viszonylagos egyszerűségéből, könnyebb hozzáférhetőségéből és alkalmazhatóságából adódóan. A vizsgálatok eredményei feltűnő strukturális és élettani párhuzamokra mutatnak rá, akár a két állattörzs, az ízeltlábúak és a gerincesek között (*lásd még e tanulmány első részét* [1]). Ezek az analógiák vonat-

kozhatnak 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 első rovar-neuropeptidek azonosítása után (lásd [1]), robbanásszerűen követték egymást a szerkezetmeghatározások, és nyomban megkezdődtek az általánosabb – például proktolin – [2], majd specifikusabb neuropeptidek – mint például az adipokinetikus hormon (AKH), a pirokinin (PK) típusú, a tripszin „mennységét” befolyásoló oosztatikus faktor (TMOF) vagy az allatosztatinok (AST) – különböző szintetikus analógjainak/mimetikumainak racionális (az ismert és biológiailag aktív neuropeptid térszerkezetét optimálisan követő) tervezése, szintetizálása és sorozatvizsgálata [3]. Alapkövetelmény, hogy az aminosav-szekvencia meghatározásán túl szintetikus peptidek/peptidszakaszok segítségével fel kell deríteni az aktív régiót, a hatáshoz szükséges minimális szekvenciát, lehetőség szerint *in vivo* és *in vitro* tesztekben is. Napjainkban a feltételezett háromdimenziós térszerkezet megállapítására is van már lehetőség, ami szintén segíti a hatékony molekulatervezést. Szükséges azonban, hogy a gyakorlati célú mimetikumok hő- és fénystabilak legyenek, a kutikulán és/vagy a bél hámsejtjein akadálytalanul átjuthassanak, endopeptidázoknak ellenálljanak (vagy az aktivitást nem befolyásoló „védelemmel” legyenek ellátva, esetleg alapvetően nem peptidtermészetű molekulák, hanem ún. pszeudopeptidek legyenek). Használatos egy másik, szélesebb körű új fogalom is, az ún. gyógyszerképesség (amit az angol „drugable” kifejezés jelöl), mely ugyan a gyógyszerteremtésből származik, de esetünkben rovarok ellen felhasználható olyan számítógépes szimulációval tervezett virtuális molekulát jelent, amely

elektrosztatikusan és alakilag megfelelő, emellett nem oldhatatlan óriásmolekula vagy illékony kismolekula, a szervezetben jól felszívódik és várhatóan nem toxikus. Megemlítendő, hogy a modern inszekticidkutatásnak az ún. természetes eredetű biológiai aktív anyagok közvetlen (különböző növényi kivonatok, vírusok, baktériumok élettani, toxikológiai hatásai célszervezeteken) vagy közvetett (hatékonyan talált vegyületek, komponensek mimetikumainak, analógjainak tervezése, előállítás) vizsgálata külön tudományterület [4]. Ezek az anyagok nem peptidtermészetűek, ellenben endokrin hatásuk lehet, ezért szerepük és jelentőségük semmiképp sem elhanyagolható.

A szerkezet-hatás összefüggések *in vivo* és *in vitro* rovarbiotesztekhez kapcsolódó vizsgálatainak eredményeképpen már nemcsak farmakológiai értelemben rendelkezünk ismeretekkel a célszervekben található receptorokról, hanem a molekuláris biológia térhódításának köszönhetően közülük az alábbiakat már azonosították, izolálták és leírták, valamennyit ún. reverz fiziológiai megközelítéssel (a legfontosabbak közlési sorrendben): ecetmuslica (*Drosophila melanogaster*) tahikinin típusú receptor (TKr) [5]; dohányyszender (*Manduca sexta*) diuretikushormon-receptor (DHr) [6]; ecetmuslica AST-receptor [7]. Igazi áttörést a valódi rovarneuropeptid-receptor, az AKHr klónozása jelentette, szintén ecetmuslicából és a selyemlepkéből (*Bombyx mori*) [8]. Külön említendő a kukorica bagolylepke (*Helicoverpa zea*) feromon-bioszintézisét serkentő neuropeptid receptora (PBANr) [9] és a *B. mori* PBANr [10], ugyanis ezek egymástól strukturálisan és funkcionálisan is különböznek (lásd *lentebb*), annak ellenére, hogy a két faj PBAN hormonjának C-terminális aktív szekvenciája (FXPRLamid, X=T;V;S) azonos, és a két molekula között is nagyfokú azonosság mutatkozik.

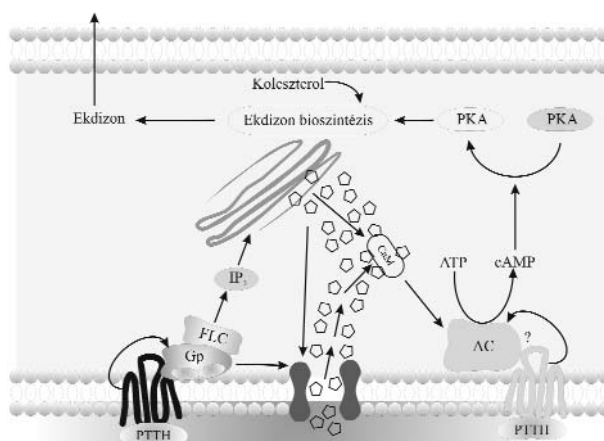


Fónagy Adrienne 1984-ben végzett az ELTE TTK biológus szakán. Az MTA belföldi tudományos ösztöndíjasaként kezdte pályáját az MTA Növényvédelmi Kutatóintézete Állattani Osztályán, és kezdettől fogva rovarélettannal foglalkozott. Eleinte hormonok, hormonanalógok és kemosteriláns vegyületek szaporodásbiológiai és fejlődéstani hatásait vizsgálta, melyek eredményeiből írta egyetemi doktori dolgozatát. 1988-tól elsősorban a rovarneuropeptid-kutatás felé fordult, és addigi eredményeit összegezve 1994-ben MTA kandidátusi fokozatot (biológiai tudomány) szerzett. 1994-től tudományos főmunkatársként dolgozik, kutatási területe a rovar-feromonotropikus neuropeptidek, valamint hatásmechanizmusuk tanulmányozása, illetve mioaktív és metabolikus folyamatokra ható neuropeptidek izolálása, meghatározása és hatásaik vizsgálata, valamint új típusú, a rovarok életfolyamataira ható, szintetikus peptidanalógok vizsgálatára is alkalmas bioassay rendszerek kidolgozása és rendszerbe állítása. 2004-től csatlakozott az Intézet Ökotoxikológiai és Környezetanalitikai Osztályához. Számos hazai és külföldi ösztöndíjban, meghívásban részesült, jelenleg az MTA Bolyai-ösztöndíjasa.

Ismereteink sokat bővültek a vedlési hormon, az ekdizon receptoráról [11]. A szteroid hormonok a sejthártyán áthatolva a sejtmagban a DNS-receptoron keresztül kapcsolódnak – melynek van egy DNS- és egy hormonspecifikus doménje –, és a szteroid kapcsolódását követve aktiválódik a megfelelő gén-szakasz. Ez az alapmechanizmus már jóval a gerinctelenek és gerincesek szétválása előtt kialakult a törzsejlődés során. Az ekdizonreceptor térszerkezetét illetően már vannak ismereteink, melyek nagymértékben megkönnyítik a célmolekulák tervezését, míg a többi neuropeptid-receptor esetében azok térbeli struktúrája és a sejtmembránban történő elhelyezkedése még kevésbé feltárt. A receptor-kutatásokon túl jelentős sejttani és élettani vizsgálatok folynak, melyek egyik alapkérdése az ismert szerkezetű neuropeptidok minél részletesebb hatásmechanizmusának feltárása a gyakorlati alkalmazhatóság szempontjából. Lehetnek olyan támadáspontok is, mint az adott neuropeptid szintézise, kibocsátódása, keringése stb. Az alábbiakban, a korábbi tanulmányban [1] is alkalmazott konvenciót követve (négy fő neuropeptid-csoport alapján) a neuropeptidok egy-két fontos képviselőjét kiragadva bemutatásra kerül hatásmechanizmusuk, illetve ezen keresztül azon irányzatok és törekvések, melyek segítségével célzottan próbálják a kutatók-fejlesztők felvenni a harcot a különféle kártevőkkel szemben.

Növekedés és fejlődés

Az egyik legismertebb neuropeptid, az előtöri mirigyben (PTG) folyó ekdizon bioszintéziséért felelős pro-toracikotropikus hormon (PTTH) elveikben is érdekes, hiszen hatásmechanizmusa *in vitro* kísérletek tucatjai alapján jól ismert (1. ábra) [12]. Egy klasszikus cAMP közvetítette jelátadási (szignál-transzdukciós) folyamat zajlik le, és azt is tudni kell, hogy amennyiben a lárvális karakterekért felelős juvenilhormon (JH) koncentrációja magas az adott szervezetben, akkor egyrészt a PTTH-receptor inkompetens, másrészt pedig maga az ekdizonszintézis folyamata is gátlást szenved [13]. A PTTH mennyiségét és kibocsátását egyrészt belső óramechanizmusok befolyásolják a neuroszekréciós sejtekben, másrészt proteázok bontják a feleslegben keringő és receptorhoz nem kötött PTTH-t. A fentiek ellenére sajnos jelentős eredmények nem állnak rendelkezésre aktív molekulák kifejlesztésére az ekdizon-bioszintézis, -kijutás stb. gátlása szempontjából.



1. ábra A PTTH hatásmechanizmusa a *Manduca*, *Bombyx* lepkefajok előtörimirigy-sejtjeiben. A vérnyirokban keringő PTTH G-proteinhez (Gp) kapcsolt receptorhoz kötődve megnyitja a Ca^{2+} -csatornákat, majd a beáramló Ca^{2+} -ionoknak és a kapcsolódó foszfolipáz C (FLC) enzimnek köszönhetően az inozitol-trifoszfát (IP_3) közreműködésével további Ca^{2+} -ionok szabadulnak fel az endoplazmatikus retikulum rezervoárjából (szürke lemezes szerkezet). A kialakuló Ca^{2+} -kalmodulin komplex (CaM) hatása (valamint közvetlen receptor-koösszönhatás is?) aktiválja az adenilát cikláz (AC), és a keletkezett cAMP indukálja a protein kináz A (PKA) enzimet. Ezt követően szintetizálódik és aktiválódik a koleszterolból ekdizon szintetizáló enzimmé. A végtermék a vérnyirokba ürül.

Az allatoregulációs peptidek közül a *Corpus allatum* mirigyben a JH-szintézist az allatotropinok (AT) serkentik, míg az allatosztatinok (AST) gátolják. Eddig a Mas-AT [14] (melyet számos más fajból is izoláltak) és az ettől csak N-terminálisan kissé eltérő sárgalázszúnyog (*Aedes aegypti*) Aae-AT serkentőket ismerjük [15]. A JH-szintézis gyorsítása elsősorban a megnövekedett CoA-észterek, acetyl- és propionil-CoA (ezek a JH-bioszintézishez nélkülözhetetlenek) biztosításán keresztül nyilvánul meg. A transzaminázok serkentése Ca^{2+} -beáramlás, valamint inozitol-trifoszfát jelátadási úton keresztül történik.

Az AST-oknak eddig három fő szerkezeti típusa ismert. Az első az A típusú, „csótány-AST”, amelynek C-terminális vége Y/FXFGL/Iamid. Más fajokból (például ecetmuslica, csípőszúnyog, köpölgény) is izoláltak vagy előre jeleztek A típusú AST peptidet, de ezek a JH-bioszintézis *in vitro* gátlását csak csótányokban és tücskökben okozták. Az első AST-receptort is az ecetmuslicából izolálták [7], de ún. reverz fiziológiai módszerrel, nevezetesen úgy, hogy az emlősök szomatosztatin/galanin/opioid-receptorcsaládjaival rokonságot mutató új receptorhoz kerestek funkcionális ligandumot, melynek

köszönhetően szintén ecetmuslicából sikerült azonosítani egy, az A típusú AST-okhoz hasonló molekulát, ami viszont elsősorban a spontán visceralis izomaktivitást gátolja. A második a B típusú, „tücsök-AST”, ami a JH-szintézis hatásos inhibitora ebben a fajban, továbbá a vándorsáskában az utóbél és petevezető spontán izommozgását gátolja *in vitro*, ellenben nem allatosztatikus hatású. További érdekesség, hogy a selyemlepkében a PTG PTH-szintézisét gátolja lárvakorban. A harmadik a C típusú, „molylepke-AST”, ezt a dohányszenderből izolálták, és nemrég azonosították G-proteinhez kapcsolt (GpC) receptorát is, szintén az ecetmuslicából [16]. Molekuláris biológiai eszközökkel C típusú AST-t is izoláltak ecetmuslicából, de ennek a JH-bioszintézisre *in vitro* gátló hatása csak egyes lepkékben mutatkozik.

A Mas-AST-ra vonatkozó ismereteinkhez kapcsolódik egy gyakorlati szempontból ígéretes felfedezés, mely más peptidekre is alkalmazható lehet. Egy kertészeti kártevőből, a paradicsommolyból (*Lacanobia oleracea*) is sikeresen izolálták az AST proteint, melyről kiderült, hogy azonos a már ismert Mas-AST-nal. A szintetikus Mas-AST *in vivo* injekálásával sem a JH-szintézis gátlását, sem más érdemi eredményt nem sikerült elérni, mivel a molekulát a neuropeptid proteázok gyorsan lebontják, ezért célszerű volt azt megfelelő „védelemmel” ellátni. A megoldás egy korábbi felfedezésnek köszönhető, mely szerint egyes növényi lektinek emésztési és egyéb más károsodás nélkül, akadálytalanul átlépik a bél epitheliumsejtjeit, és a vérnyirokba kerülnek. Ezt felismerve a hóbagyó (*Galanthus nivalis*) agglutinjének génjét fuzionálták a Mas-AST génjével, majd a kapott polinukleotidot *Eschericia coli* szervezetben kifejezték, és az így termeltetett proteint a mesterséges tápba keverték. A jelentősnek mondható hatás – táplálkozáscsökkenés, visszamaradt fejlődés, 80% körüli lárvális mortalitás – nem maradt el, ellenben pontos hatásmechanizmusa még kérdéses, ugyanis inkább a bél izomzatára gyakorolt spontán mozgást gátló hatása tűnik valószínűbbnek, szemben a JH-bioszintézis gátló képességével [17].

A Dip-AST Y/FXFGL/Iamid aktív szekvenciaszakasza az analógok tervezésével foglalkozó peptid-kémikusokat egy olyan pszeuropeptid megalkotására ihlette, amely maximálisan ellenáll a vérnyirokban keringő, illetve szövetekhez kötött peptidázoknak [18]. A peptidbe olyan struktúrát építettek be

(indángyűrűt és ciklopropilgyűrűt tartalmazó analógok), amely a kialakult szterikus gátlás miatt lehetetlenné tette a peptidázok kapcsolódását, tehát a specifikus helyen elmaradt a kötés bontása.

Szaporodás

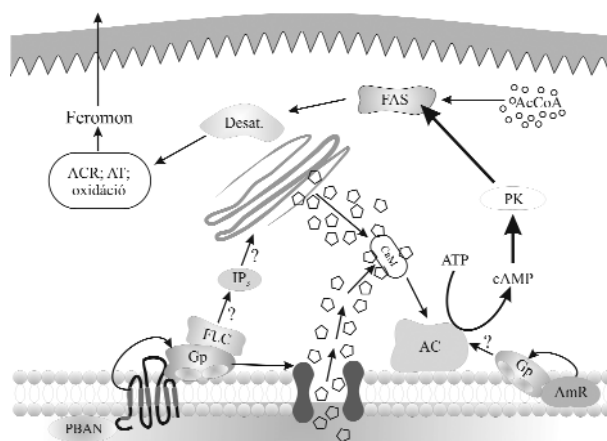
A gerincesek esetében a gonadotropinok struktúráisan és hatásaikban is viszonylag egységesek. A rovarok szaporodása ezzel szemben számos egymásra épülő mozzanat sorozata, kezdve a nemek meghatározásától a peterakásig bezárólag, mely folyamatokat humoralis tényezők, mint a JH-k, ekdizin és számos neurohormon irányítanak, s melyek akár fajspecifikusak is lehetnek. Az ún. potenciális bioracionális inszekticidek tervezésének területén külön figyelmet érdemel a nem klasszikus értelemben vett neuropeptid TMOF [19,20], amely vérszívást követően néhány órával a szúnyogpetefészek folliculáris hámsejtjeiben szintetizálódik, majd a vérnyirokban szállítódva a középbél specifikus receptorához kötődve gátolja a proteázok (főleg tripszin, esetleg kimotripszin) szintézisét/aktivitását. Ennek köszönhetően leáll a vér emésztődése, aminosavak felszabadulása, ami csökkenti a szik szintézisét és felhalmozódását, s megáll a petefejlődés. A TMOF hatása révén igen vonzó, és alkalmazására több irányban indult kutatás [20]. Megállapították, hogy az a táplálék útján imágó szúnyogokba juttatva a bél epitheliumsejtjein keresztül a vérnyirokba kerül, végül kötődik a középbél hámsejtjeihez, és leállítja a tripszin-bioszintézist, miközben megtartja biológiai aktivitását. A vízbe juttatva pedig hatására a szúnyoglárva is elpusztulnak, ugyanis a táplálék megemésztéséhez szintén szükséges tripszin jellegű enzim. Ez esetben azonban viszonylag nagyobb mennyiség kell a letális hatáshoz, ezért célszerű a peptidet valamilyen közvetítő vagy vivőanyagra kötni. Kísérletképpen a *Chlorella* alga genetikailag módosított változatával (TMOF-gén beépítésével) sikerült jobb eredményeket elérni [19], bár ennek alkalmazása környezeti és egyéb szempontból aggályos. Ezért inkább a stabil mimetikumok jelenthetik a távlati megoldást.

A szaporodás szempontjából – elsősorban a lepkék esetében – fontosak a feromonotropikus neuropeptidek, azon belül a PBAN-ek. Mind a PBAN-ek keletkezése, mind pedig a vérnyirokban történő keringésük, végül pedig a nőstényekben található cél-

szervben, a feromonmirigyben (PG) kifejtett hatásuk (feromontermelés indukálásával) a rovarendokrinológia, -élettan és -biokémia egyik legkutatottabb területe. Ez főleg abból fakad, hogy a rovarferomonok (elsősorban a szexferomonok) fajspecifikusak, szerepük a nemek egymásra találásában döntő. Ez a faji sajátosság viszont tág lehetőséget biztosít arra, hogy akár monitorozásra, előrejelzésre, esetleg állománygyerítésre vagy a tényleges utódszám csökkentésére használjuk a megfelelő szintetikus feromonkészítményeket. Ebből az is következik, hogy jó eredményre vezethet, ha sikerül célzottan megakadályozni vagy befolyásolni a nőtények szigorú endokrin irányítás (elsősorban a PBAN, valamint JH és ecdizon) alatt álló feromontermelését. Az érdeklődés a PBAN-ek, valamint az FXPRLamid C-terminális vég megegyezése révén a vele rokonságot mutató PK-k (spontán izommozgást serkentők) felé fokozott, ugyanis a biológiai aktivitáshoz már a C-terminális pentapeptid is elégséges. A nőtényekbe injektált szintetikus PBAN-ek vagy PK-k hatékonyak maradnak, és a feromontermelés révén jól vizsgálhatók. Az előzőekből következik, hogy PBAN/PK-analógok, -mimetikumok, -agonisták/-antagonisták tervezése és előállítása komoly gyakorlati lehetőségekkel kecsegtet.

Choi és mtsai [9] sikeresen azonosítottak, majd teljes hosszában klónoztak a *H. zea* lepke PG-ből egy ún. G-proteinhez kapcsolt, 346 aminosavból álló receptort (PBAN/PK_r). Jelen ismereteink szerint két *Helicoverpa* fajban, továbbá egy sodrómolyban (*Argyrotaenia velutinana*) [21], valamint saját kutatásaink alapján a káposzta-bagolylepkében (*Mamestra brassicae*) [22] is így zajlik a jelátadás (2. ábra).

Hull és mtsai [10] a közelmúltban a Hez-PBAN-receptornál 67 aminosavval hosszabb, G-proteinhez kapcsolt Bom-PBAN-receptort klónozták a selyemlepke PG-ből. Mint kimutatták, ez a C-terminálisan „elhelyezkedő” hosszabb szakasz nélkülözhetetlen szerepet játszik a PBAN-hez történő kötődés (aktiválódás) során az internalizáció folyamatában. A különbség, meglehet, egyben magyarázza azt a lényegi eltérést is, hogy a jelátadás folyamata és a feromon-bioszintézis serkentése ebben a fajban, továbbá például a kukoricamolyban (*Ostrinia nubilalis*) és a trópusi lápi bagolylepkében (*Spodoptera littoralis*) a fentieként eltér. A PBAN tehát kettős funkcióval bír, mert stimulálja mind a lipázokat, mind pedig az ACR-t. Egy egyedülálló,



2. ábra A PBAN hatásmechanizmusa *Helicoverpa*, *Mamestra*, *Argyrotaenia* lepkefajok feromonmirigy-sejtjeiben. A vérnyirokban keringő PBAN a G-proteinhez (Gp) kapcsolt receptorhoz kötődve megnyitja a Ca^{2+} -csatornákat és külső Ca^{2+} -ionok áramlanak be, valamint a kapcsolódó foszfolipáz C (FLC) és inozitol-trifoszfát (IP_3) feltételezett közreműködésének köszönhetően további Ca^{2+} -ionok szabadulnak fel a sejt rezervoárjából (szürke lemezes szerkezet). A kialakuló Ca^{2+} -kalmodulin (CaM) komplex (valamint esetleg más aminerg receptorokon (AmR) keresztül) aktiválja az adenilát cikláz (AC), és a keletkezett cAMP protein kinázokat (PK) indukál. A PK ezekben a fajokban a feromon-bioszintézis kezdeti lépéseit stimulálja a zsírsav szintáz (FAS) enzimrendszeren keresztül, acetyl-CoA (AcCoA) enzimből. A telítetlen kötések a desaturázok (Desat.) alakítják ki, melyet a végső redukció (ACR), aciltranszfer (AT) vagy oxidáció követ, kialakítva a fajspecifikus feromont (vagy elegyet), mely a sejt mikrovillusain (fogazott szerkezet), illetve a kutikulán (szürke sáv) keresztül jut a kívüllágba.

komplex modell – melyet részleteiben a 3. ábra mutat be – magába foglalja mind a jelátadási mozzanatokat, mind a kapcsolódó biokémiai eseményeket, valamint morfológiai megfigyelésekkel is kiegészíti azokat [23–27].

A feromon-bioszintézisbe történő beavatkozás eredményében a két legismertebb kutatási irány a PBAN peptidomimetikus antagonisták, illetve a PBAN pszeudopeptid-analógok tervezése és tesztelése. Az első megközelítés és annak szélesebb körű kidolgozása a Substance P gerinces neuropeptid analógiája alapján került kidolgozásra [28]. A rovar PBAN/PK-csoportra kidolgozott eljárás [29] a peptidlánc meghatározott szakaszának „gyűrűbe zárásán” vagy „fej-láb” ciklizálásán alapuló módszer (*Backbone cyclic neuropeptide-based antagonist*; BBC-NBA) röviden az alábbi lépéseket jelenti: (1) A kívánt funkció (ez esetben feromon-bioszintézis) irányításáért felelős neuropeptid azonosítása. (2) A peptiden belül a legrövidebb szakasz behatárolása, amely a kívánt hatásért felelős

3. ábra (lásd a címlapon) A PBAN hatásmechanizmusa és feromon (bombykol) bioszintézise a selyemlepke (*Bombyx mori*) feromonmirigy-sejtjeiben. A vérnyirokban (halvány türkizkék) keringő PBAN a G-proteinhez (Gp) kapcsolt receptorhoz történő kötődést követően külső Ca^{2+} -ionok áramlanak be a megnyíló Ca^{2+} -csatornán keresztül. Kialakul a Ca^{2+} -kalmódulin (CaM) komplex, ami indukálja a foszfoprotein-foszfataz-2B (vagy kalcineurin, CaN) enzimszisztémát, stimulálva a bombykol (E,Z-10,12-hexadekadién-1-ol) bioszintézisében kulcsszerepet játszó acil-CoA-reduktázt (ACR, B. mori-PG-FAR). A végső redukciós lépésen túlmenően a PBAN aktiválja a hormonérzékeny triglicerid lipázokat (TgL), melyeket a lipidcseppekhez (nagy narancssárga körök) kapcsolódó proteinek (LDAP) kötnek le (a jelátadás folyamatát kék nyilak jelölik). A lipolízis eredményeképpen, a napi szinten dinamikus változó cseppekből szabaddá válnak a trigliceridekben (Tg) „tárolt” zsírsavprekurzorok, melyek a sejtek citoszoljában (halványsárga háttér) zsírsav szintáz által (FAS) acetyl-CoA-ból (AcCoA), továbbá a mitokondriumban (halványzöld, csöves-vesikuláris szerkezetű organelum) zajló folyamatos zsírsavszintézis (Acil-Co-A szintetáz: ACS), majd telítetlen kötések (bifunkcionális desaturáz: Desat.1) kialakulását követően keletkeznek. Ez utóbbi reakciók már valószínűleg az acetyl-Co-A-kötő fehérjék (ACBP) által a sima felszíni endoplazmatikus retikulumba (sárga lamellák) történő szállítás után következnek be. Az aciltranszferáz (AT) a zsírsavvá alakítást végzi el. A Tg-k a fajspecifikus zsírsavon ($\Delta^{10,12}$ -hexadecadienoát) kívül a vérnyirok lipoforinjai (Lf) által szállított, táplálékból származó, majd lipidtranszfer proteinek (LTP) segítségével a sejtbe juttatott digliceridekből (Dg) épülnek fel. A lipidcseppekből szabaddá váló fajspecifikus zsírsav a mikroszómákhoz (kis ovális szürke testek) kapcsolódó ACS segítségével konvertálódik, illetve az intermediert végül az aktivált ACR alkohollá redukálja. A bombykol végezetül a sejt mikrovilluszain (fogazott szerkezet), valamint kutikulán (világosbarna sáv) a mirigy felszínére és onnan a légterbe jut (a szintézis folyamatát lila nyilak jelölik). A PBAN-receptor, a CaM, CaN, illetve az ACBP, Desat.1, ACR szerkezetét már meghatározták és ismerjük ebben a fajban.

(lehetőleg a természetes peptid-dózistartományban). (3) Az előző eredmény alapján egy antagonistá vezérvegyület felfedezése/előállítása. (4) Egy potenciális BBC-antagonista előállítása, amely nem agonista hatású. (5) Az antagonistá hatásért felelős struktúra pontos meghatározása. (6) Egy inszekticid-prototípus előállítása (szintézis, formázás, kipróbálás stb.), amely kis molekulatömegű, metabolikusan stabil, a kutikulán/bélen átjutó, szelektív hatású, s nem utolsósorban költségkímélő. A fenti pontoknak csak olyan molekulák tudnak megfelelni, amelyek térszerkezete nem rugalmas, hanem erősen kötött és ezáltal stabil, amit eddig főként a BBC módszerrel értek el [28].

A másik megközelítés, a PBAN pszeudopeptid-analóg kifejlesztése [30]. Az alapkoncepció szerint a szintetikus aktív peptidszekvenciát olyan védelemmel kell ellátni, amely megkönnyíti a poláros

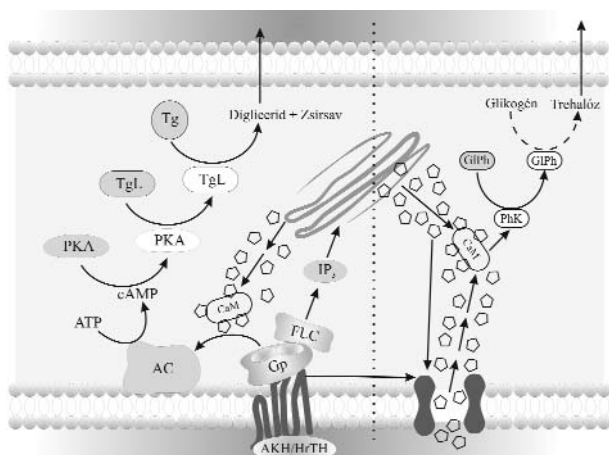
molekula átjutását az apoláros kutikula-lipid-mátrixon, valamint ellenáll a bél és vérnyirok peptidázainak. Példaként említendő az az eljárás, amikor kiindulásként az FTPRLamid C-terminális aktív szekvenciában a fenil-alanin fenilgyűrűjét egy hidrofób karboranil (2-karboránecetsav; Cbe) taggal helyettesítették, létrehozva a Cbe-TPRLamid molekulát [30], amely a célállatba injektálva még az eredeti PBAN molekulánál is hatásosabbnak bizonyult. További amfifilikus analóg esetében a hidrocinnamil-TPRLamid szuperagonista hatást mutatott, míg a 9-fluorénacetyl-FTPRLamid és a 1-pirénbutiril-FTPRLamid pedig 20 órán keresztül aktív volt, úgy, hogy a topikális kezelést követően a molekulák kitűnően átjutottak a hidrofób kutikulán.

Metabolizmus és homeosztázis

Rovarokban az intermedier-anyagcsere fő színtere egy sajátos szerv, a zsírtest, ami lebenyekből, szalagokból áll, és csaknem a teljes testüreget kitölti. Szerepe van tartaléktápanyagok felhalmozásában, a lipidek/zsírok, szénhidrátok stb. anyagcseréjében, valamint a tojások fejlődése szempontjából nélkülözhetetlen szikanyag és egyes fajokban az ún. diapauzaproteinek bioszintézisében, továbbá részben a méregtelenítésben, kiválasztásban, s emellett benne fejlődnek a vérsejtek is. Több azonosított neuropeptid célszerve a zsírtest, mint például az AKH-eké, a vérnyirok trehalózsintjéért felelős hipertrehalozémikus hormonoké (HrTH) és hipotrehalozémikus hormonoké (HoTH). Az AKHr azonosítása [8], jelentős lökést adott ennek a területnek, bár addig is számos ígéretes eredmény született, mely azzal a ténnyel van összefüggésben, hogy az AKH-ok pleiotropikus és a fő lipidmobilizációs hatása mellett emelheti a vérnyirok szénhidrátszintjét a zsírtest glikogén foszforiláz aktiválásával, csökkentheti a zsírsavszintézist az acetátfelvétel gátlásán keresztül, csökkentheti az RNS-szintézist, de lehet miotropikus is. Repülő fajoknál jelentős izommozgás-serkentő hatása repülési sebesség vagy intenzitás növekedésében nyilvánulhat meg, míg nem repülőknél a mozgási aktivitás nő szintetikus peptid injektálását vagy topikális kezelést követően [31].

Az AKH egyszerűsített hatásmechanizmusa a 4. ábrán látható [32]. A repüléshez lipidet használó fajok esetében (sáskák, molylepkek, bogarak) első

lépcsőben a vérnyirokban keringő AKH kötődik a sejthártyáján található GpC-receptorhoz, majd az adenilát cikláz aktiválódása révén megemelkedik a cAMP szintje. A cAMP, valamint a felszabaduló belső Ca^{2+} -tartalékok és a kívülről beáramló Ca^{2+} -ionok a protein kinázon keresztül aktiválják a Tg-lipázt. A sáskák esetén a keletkezett diglicerid a sejtől kijutva, a vérnyirokban lipoproteinekhez (lipoforin) kötődve eljut az izomsejtekig, ahol β -oxidációt követően energia szabadul fel (4. ábra, bal oldal). Egy gyümölcsbogárfaj (*Pachnoda sinuata*) zsírtestjében, a lehasított szabad zsírsav β -oxidációját követően keletkező acil-CoA a beáramló alaninnal prolinná alakul, mely utóbbi szolgál végül energiaforrásként. A repüléshez szénhidrátot használó fajoknál, mint például a csótányoknál, az AKH (vagy HrTH) hatására jelentősen megemelkedik a Ca^{2+} -szint így aktiválva a foszforiláz-kináz enzimet, mely glikogén bontásának lépéseit serkenti (4. ábra, jobb oldal). A gyakorlati alkalmazás



4. ábra Az AKH (hiperlipémikus) hatásmechanizmusa *Locusta* (bal oldal), illetve az AKH/HrTH (hipertrehalozémikus) hatásmechanizmusa *Periplaneta* (jobb oldal) fajok zsírtestsejtjeiben. Bal oldal: A kötődő AKH a G-proteinhez (Gp) kapcsolt receptoron keresztül és a felszabaduló Ca^{2+} -ionokkal együtt aktiválja a membránkötött adenilát cikláz (AC). A cAMP aktiválja protein kináz A (PKA) enzimet, mely viszont a digliceridek (és zsírsavak) keletkezését serkenti triglicerid lipázok (Tg) által. A digliceridek a vérnyirokba jutnak és lipoforinok szállítják a célszervig. Jobb oldal: Az AKH/HrTH hormon a Gp-hez kötődik, mely közvetlenül nyitja meg a Ca^{2+} -csatornákat, valamint a kapcsolódó foszfolipáz C (FLC) közreműködésével inozitol-trifoszfát (IP_3) keletkezik, mely további Ca^{2+} -ionokat szabadít fel a rezervoárból (szürke lemezes szerkezet). A kiszabaduló Ca^{2+} -ionok szintén nyitják a Ca^{2+} -csatornákat. Végül a Ca^{2+} -kalmodulin (CaM) komplexek foszforiláz-kinázokat (PhK) és ezen keresztül glikogén foszforilázokat (GpH) stimulálnak, és több közti termékén keresztül glikogénből trehalóz keletkezik, ami a vérnyirokba kerül.

igényével többféle AKH-t, ahol vagy a C- [33] vagy az N-terminális [34] véget módosították, de egyetlen aminosavcserével [35] vagy matematikai modellezés segítségével [36] is próbáltak még optimálisabb és hatékonyabb mimetikumot előállítani.

A diuretikus peptidek (DP) közül a legfontosabbak a kortikotropin-felszabadulási faktor (CRF) és a kinek (K). Mindkettő elsősorban a fő kiválasztó szervre, a Malpighi-edényekre hat, ahol a CRF-DP a cAMP jelátadási rendszeren keresztül fokozza a húgyanyag-eltávolítást, míg a K-ek – más receptorhoz kötődve – a Ca^{2+} -beáramlás serkentése révén segítik elő az elválasztást. Az utóbbi szinergista hatása oly módon is kifejeződik, hogy az izomsejtek ingerlése révén az edények tubulusainak tekerdő-csavaró mozgását is fokozza [37]. Az $\text{FX}_1\text{X}_2\text{TG}$ amid végű K-ek esetén akár az X_1 -et vagy X_2 -et egy sztérikus gátló hatással rendelkező Aib (amino-izovajsav) taggal helyettesítve, kitűnő diuretikus jellegű, továbbá az endopeptidázokkal szemben ellenálló analógot nyertek [38]. A víz- és ionegyensúly célzott módon történő megzavarása gyakorlatilag kiemelkedő jelentőségű lehet.

Izommozgások

A nem váz-, hanem zsigeri izmok (például visceralis bélizomzat, a petevezető izomzata, szívizomzat, illetve a Malpighi-edények körkörös és hosszanti izomzata stb.) jelentős részben saját miogénaktivitással rendelkeznek. Mozgásukat ezen túlmenően irányíthatják a központi idegrendszerből, illetve egyes idegdúcokból kifutó idegek, továbbá számos ún. miotropikus és mioinhibitor neuropeptid. A mioaktív peptidek a központi idegrendszerben vagy környéki dúcokban szintetizálódnak, majd vagy a vérnyirok közvetítésével, vagy közvetlenül az idegrostokon vándorolva jutnak el a célszervig.

Már 1997-ben mintegy 80 olyan proktolinanalóg szintéziséről és szerkezet-hatás összefüggés-vizsgálatának – *in vitro* rovar- és *in vivo* patkánytoxikológiai – eredményéről számoltak be, amelyben a pentapeptid-szekvenciában 1–5 pozícióban történt csere: vagy gyűrűbe zárták, vagy rövidebb-hosszabb peptidláncot kapcsoltak az alapmolekulához [2]. Több rovarfajban, farmakológiai értelemben már karakterizálták a proktolinreceptort, de azonosítása még nem történt meg. Az analógok vizsgálata is inkább elméleti jelentőségű, mert eddig kutikulán áthaladó és egyéb értelemben is stabilnak mondható analógot nem sikerült előállítani.

A K-ekhez tartozó molekulák esetében utalni kell a már említett PBAN/PK-analógokra, melyek pleiotropikusak lévén lehetnek miotropikus hatásúak [29,30]. Kiemelendő még a mioinhibitorok közül egy nem peptidtermészetű agonista, a Bztc (benzetónium-klorid), ami képes az FLRFamid végű mioszuppresszinekét tökéletesen utánozni több független *in vitro* biotest rendszerben [39]. A Bztc mérete, funkciós csoportja, térszerkezete, töltése révén képes az eredeti neuropeptidet agonizálni, ami újabb bizonyíték a lehetséges specifikus hatás eléréséhez és beavatkozáshoz, mesterséges úton.

Irodalomjegyzék

- [1] Fónagy, A. (2005) Betekintés a rovar neuroendokrinológiába I. A neuropeptidek szintézise, hatásai, csoportosításuk. *Biokémia*, **XXIX**: 60–67.
- [2] Konopińska, D. (1997) Insect neuropeptide proctolin and its analogues. *J. Peptide Res.* **49**: 457–466.
- [3] Gäde, G., Goldsworthy, G. (2003) Insect peptide hormones: a selective review of their physiology and potential application for pest control. *Pest Manag. Sci.*, **59**: 1063–1075.
- [4] Ujváry, I. (2006) The importance of natural products in insect control. *Pestycidy/Pesticides (in press)*.
- [5] Li, X. J., Wolfgang, W., Wu, Y. N., North, R. A., Forte, M. (1991) Cloning, heterologous expression and developmental regulation of a *Drosophila* receptor for tachykinin-like peptides. *EMBO J.*, **10**: 3221–3229.
- [6] Reagan, J. D. (1994) Expression cloning of an insect diuretic hormone receptor: a member of the calcitonin/secretin receptor family. *J. Biol. Chem.*, **269**: 9–12.
- [7] Fígül, N., Weise, C., Kreienkamp, H.-J., Richter, D. (1999) Reverse physiology in *Drosophila*: identification of a novel allatostatin-like neuropeptide and its cognate receptor structurally related to the mammalian somatostatin/galanin/opioid receptor family. *EMBO J.*, **18**: 5892–5900.
- [8] Staubli, F., Jørgensen, T. J. D., Cazzamali, G., Williamson, M., Lenz, C., Søndergaard, L., Roepstorff, P., Grimmekhuizen, C. J. P. (2002) Molecular identification of the insect adipokinetic hormone receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **99**: 3446–3451.
- [9] Choi, M.-Y., Fuerst, E. J., Rafaeli, A., 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.
- [10] Hull, J. J., Ohnishi, A., Moto, K., Kawasaki, Y., Kurata, R., Suzuki, M. G., Matsumoto, S. (2004) Cloning and characterization of the pheromone biosynthesis activating neuropeptide receptor from the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Biol. Chem.*, **279**: 51500–51507.
- [11] Riddiford, L. M., Truman, J. W. (1993) Hormone receptors and the regulation of insect metamorphosis. *Amer. Zool.*, **33**: 440–447.
- [12] Smith, W. A. (1995) Regulation and consequences of cellular changes in the prothoracic glands of *Manduca sexta* during the last larval instar: a review. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, **30**: 271–293.
- [13] Gu, S.-H., Chow, Y.-S., Yin, C.-H. (1997) Involvement of juvenile hormone in regulation of prothoracicotropic hormone transduction during the early last larval instar of *Bombyx mori*. *Mol. Cell. Endocrinol.*, **127**: 109–116.
- [14] Kataoka, H., Tosci, A., Li, J.-P., Carney, R.-L., Schooley, D. A., Kramer, S. J. (1989) Identification of an allatotropin from the adult *Manduca sexta*. *Science*, **243**: 1481–1483.
- [15] Veenstra, J. A., Costes, L. (1999) Isolation and identification of a peptide and its cDNA from the mosquito *Aedes aegypti* related to *Manduca sexta* allatotropin. *Peptides*, **20**: 1145–1151.
- [16] Kreienkamp, H. J., Larusson, H. J., Witte, I., Roeder, T., Birgöl, N., Honck, H. H., Harder, S., Ellinghausen, G., Buck, F., Richter, D. (2002) Functional annotation of two orphan G-protein-coupled receptors, Drostar-1 and -2, from *Drosophila melanogaster* and their ligands by reverse pharmacology. *J. Biol. Chem.*, **277**: 39937–39943.
- [17] Audsley, N., Weaver, R. J., Edwards, J. P. (2001) In vivo effects of *Manduca sexta* allatostatin and allatotropin on larvae of the tomato moth, *Lacanobia oleracea*. *Physiol. Entomol.*, **26**: 181–188.
- [18] Nachman, R. J., Garside, C. S., Tobe, S. S. (1999) Hemolymph and tissue bound peptidase-resistant analogs of the insect allatostatin. *Peptides*, **20**: 23–29.
- [19] Borovsky D., Powell, C. R., Dawson, W. O., Shivprasad, S., Lewandowski, D. J., De Bondt, H. L., De Ranter, C., De Loof, A. (1998) Trypsin modulating oostatic factor (TMOF): a new biorational insecticide against mosquitoes. In: Insects: chemical, physiological and environmental aspects (Konopińska, D., Goldsworthy, G., Nachman, R. J., Nawrot, J., Orchard, I., Rosiński, G., Eds.) (University of Wrocław, Wrocław, Poland) pp.131–140.
- [20] Borovsky, D. (2003) Trypsin-modulating oostatic factor: a potential new larvicide for mosquito control. *J. Exp. Biol.*, **206**: 3869–3875.
- [21] Rafaeli, A. (2002) Neuroendocrine control of pheromone biosynthesis in moths. *Int. Rev. Cytol.*, **213**: 49–92.
- [22] Fónagy, A. (1999) A PBAN (Pheromone Biosynthesis Activating Neuropeptide) hatásmechanizmusuk leképezés. Növényvédelmi Tudományos Napok '99, Abs. Vol. (Sálinger, Gy., Balázs, K., Szemessy, Á., Eds.) (RePrint Kft., Budapest) p. 47.
- [23] Iwanaga, M., Dohmae, N., Fónagy, A., Takio, K., Kawasaki, H., Maeda, S., Matsumoto, S. (1998) Isolation and characterization of Calmodulin in the pheromone gland of the silkworm, *Bombyx mori*. *Comp. Biochem. Physiol.*, **120B**: 761–767.
- [24] Fónagy, A., Yokoyama, N., Okano, K., Ozawa, R., Tatsuki, S., Maeda, S., Matsumoto, S. (1999) Involvement of Calcineurin in the signal transduction of PBAN in the silkworm, *Bombyx mori* (Lepidoptera). *Comp. Biochem. Physiol.*, **124B**: 51–60.
- [25] Fónagy, A., Yokoyama, N., Okano, K., Tatsuki, S., Maeda, S., 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.
- [26] Matsumoto, S., Fónagy, A., Yamamoto, M., Yokoyama, N., Esumi, Y., Suzuki, Y., 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.
- [27] Ohnishi, A., Hull, J. J., Matsumoto, S. (2006) Targeted disruption of genes in the *Bombyx mori* sex pheromone biosynthetic pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **103**: in press.
- [28] Gilon, C., Halle, D., Chorev, M., Selinger, Z., Byk, G. (1991) Backbone cyclization: a new method for conferring conformational constraint on peptides. *Biopolymers*, **31**: 745–750.
- [29] Altstein, M., Ben-Aziz, O., Scheffler, I., Zeltser, I., Gilon, C. (2000) Advances in the application of neuropeptides in insect control. *Crop Prot.*, **19**: 547–555.
- [30] Nachman, R. J., Teal, P. E. A., Radcliff, P., Holman, G. M., Abernathy, R. L. (1996) Potent pheromonotropic/ myotropic activity of a carboranyl pseudotetrapeptide analogue of the insect pyrokinin/PBAN neuropeptide family administered via injection or topical application. *Peptides*, **17**: 747–752.
- [31] Kodrik, D., Socha, R., Zemek, R. (2002) Topical application of Py-AKH stimulates lipid mobilization and locomotion in the flightless bug, *Pyrrhocoris apterus* (L.) (Heteroptera). *Physiol. Entomol.*, **27**: 15–20.
- [32] Gäde, G., Auerswald, L. (2003) Mode of action of neuropeptides from the adipokinetic hormone family. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **132**: 10–20.
- [33] Lee, M. L., Goldsworthy, G. J., Poulos, C. P., Velentza, A. (1996) Synthesis and biological activity of adipokinetic hormone analogues modified at the C-terminus. *Peptides*, **17**: 1285–1290.
- [34] Lee, M. L., Cusinato, O., Luswata, R., Wheeler, C. H., Goldsworthy, G. J. (1997) N-terminal modifications to AKH-I from *Locusta migratoria*: assessment of biological potencies *in vivo* and *in vitro*. *Regul. Pep.*, **69**: 69–76.
- [35] Ziegler, R., Cushing, A. S., Walpole, P., Jasensky, R. D., Morimoto, H. (1998) Analogs of *Manduca* adipokinetic hormone tested in a biotest and in a receptor-binding assay. *Peptides*, **19**: 481–486.
- [36] Lee, M. J., de Jong, S., Gäde, G., Poulos, C., Goldsworthy, G. J. (2000) Mathematical modelling of insect neuropeptide potencies. Are quantitatively predictive models possible? *Insect Biochem. Molec. Biol.*, **30**: 899–907.
- [37] Coast, G. M. (1998) Insect diuretic peptides: Structures, evolution and actions. *Amer. Zool.*, **38**: 442–449.
- [38] Nachman, R. J., Isaac, R. E., Coast, G. M., Holman, G. M. (1997) Aib-containing analogues of the insect kinin neuropeptide family demonstrate resistance to an insect angiotensin-converting enzyme and potent diuretic activity. *Peptides*, **18**: 53–57.
- [39] Nachman, R. J., Olender, E. H., Roberts, V. A., Holman, G. M., Yamamoto, D. (1996) A nonpeptidic peptidomimetic agonist of the insect FLRFamide myosuppressin family. *Peptides*, **17**: 313–320.