

## HORMONALNA REGULACJA PROCESU ROZRODU OWADÓW

### HORMONAL REGULATION OF INSECT REPRODUCTION

Elżbieta CZARNIEWSKA

Zakład Fizjologii i Biologii Rozwoju Zwierząt,  
Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu

*Streszczenie:* W cyklu rozrodczym samic owadów funkcję jajnika kontrolują neurohormony oraz hormony pochodzenia tkankowego. Hormony peptydowe pochodzenia mózgowego i tkankowego wykazują zróżnicowany mechanizm działania gonadotropowego. W niniejszej pracy przedstawiono aktualny stan wiedzy odnośnie do funkcji fizjologicznych, jakie pełnią hormony w regulacji rozwoju jajnika, wzrostu i dojrzewania oocytów, biosyntezy białek witelogenin w ciele tłuszczowym, syntezy trypsyny i proteaz serynowych w jelicie podczas cyklu rozrodczego oraz kontroli biosyntezy ecdyzonu w nabłonku folikularnym rozwijającego się pęcherzyka jajnikowego. Peptydy gonadotropowe poza regulacją procesów związanych z rozrodem wykazują gatunkowo- i narządowo-zróżnicowaną aktywność plejotropową, charakteryzującą się oddziaływaniem miotropowym, kardiotropowym, czy hemocytotropowym. W pracy zamieszczono ponadto nowe wyniki z przeprowadzonych badań dokumentujące plejotropowy charakter działania gonadotropowego hormonu peptydowego *Neb*-kolostatyny w regulacji czynności jajnika samicy chrząszcza *Hylobius abietis* oraz funkcji hemocytów u chrząszcza *Tenebrio molitor*.

*Słowa kluczowe:* rozmnażanie owadów, hormony gonadostymulujące, hormony gonadoinhibicyjne, wzrost oocytu, witelogeneza, *Neb*-kolostatyna, aktywność hemocytotropowa

*Summary:* In insect, the function of ovary is regulated by hormones isolated from brain and ovaries. These gonadotropic hormones show different activities, they stimulate or inhibit ovary development and oocyte growth, affect of vitellogenin biosynthesis in the fat body, inhibit the synthesis of trypsin and serine proteases in the gut and they regulate the ecdysone biosynthesis in the follicular epithelium of the oocyte chamber. Moreover, the gonadoactive peptides display diverse pleiotropic, species- and organ-specific activities, causing myotropic, cardiotropic or haemocytotropic effects. In this paper, new studies on the pleiotropic activity of gonadoinhibitory peptide, *Neb*-colloostatin are presented.

*Key words:* reproduction, gonadostimulatory hormones, gonadoinhibitory hormones, oocyte growth, vitellogenesis, *Neb*-colloostatin, haemocytotropic activity

## WSTĘP

U owadów wiele procesów fizjologicznych związanych z rozmnażaniem, takich jak wzrost i dojrzewanie oocytów, synteza witelogenin, owulacja oraz składanie jaj podlega kontroli hormonalnej [51]. Zasadniczą rolę w regulacji cyklu rozrodczego u samic owadów pełnią neurohormony peptydowe wydzielane przez komórki neurosekrecyjne *pars intercerebralis* mózgu oraz układu retrocerebralnego *corpora cardiaca/corpora allata* (CC/CA) [44]. W cyklu gonadotropowym u samic owadów funkcję jajnika kontrolują również hormony pochodzenia tkankowego – hormon juwenilny (JH) i ekdyzon, które różnią się strukturą chemiczną, pierwszy jest związkiem seskwiterpenowym, drugi zaś jest steroidem. Hormony peptydowe pochodzenia mózgowego i tkankowego wykazują zróżnicowany mechanizm działania gonadotropowego. Wśród nich zidentyfikowano zarówno hormony hamujące, jak i stymulujące rozwój jajnika, oddziałujące na wzrost i dojrzewanie oocytów, biosyntezę witelogenin w ciele tłuszczowym, hamujące syntezę trypsyny i proteaz serynowych w jelicie oraz regulujące biosyntezę ekdyzonu w nabłonku folikularnym rozwijającego się pęcherzyka jajnikowego [36].

W pracy przedstawiono aktualny stan wiedzy dotyczący fizjologicznej roli hormonów owadów w regulacji cyklu gonadotropowego u samic owadów. Ponadto zamieszczono nowe wyniki z przeprowadzonych badań plejotropowego charakteru działania gonadoaktywnego hormonu peptydowego *Neb*-kolostatyny w regulacji czynności jajnika u szceliniaka sosnowca *Hylobius abietis* oraz kontroli aktywności hemocytów u mączniaka młynarka *Tenebrio molitor*.

## HORMON JUWENILNY

Hormon juwenilny syntetyzowany w CA kontroluje procesy morfogenetyczne związane ze wzrostem i rozwojem larw owadów, natomiast w organizmie osobników dorosłych pełni istotne funkcje w regulacji wielu procesów fizjologicznych związanych przede wszystkim z rozwojem gonad oraz rozrodem. U dojrzałych płciowo samic owadów JH indukuje w komórkach ciała tłuszczowego oraz w komórkach nabłonka folikularnego syntezę witelogenin, zwiększając równocześnie proces pobierania tych białek z hemolimfy przez rosnące oocyty [80, 29]. Sevala i Davey [69] wykazali bezpośrednie działanie hormonu juwenilnego na komórki nabłonka folikularnego pluskwia *Rhodnius prolixus*. Hormon ten wiążąc się z receptorem błonowym komórek folikularnych aktywuje wewnątrzkomórkowy szlak transdukcji sygnału związany z aktywnością kinazy białkowej C. Badacze ci [69] sugerowali, że kinaza białkowa C fosforyluje białko o masie cząsteczkowej 100 kDa, które odpowiada podjednostce  $\alpha$   $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATP-azy. W ciągu kilku minut od

interakcji JH-receptor aktywowana zostaje  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATP-aza. W wyniku indukowanych przez JH zmian fizjologicznych i biochemicznych woda wypływa z komórek folikularnych i komórki te obkurczają się, a nabłonek folikularny staje się przepuszczalny dla witelogenin. Taki stan strukturalny nabłonka folikularnego określane jest jako nabłonek o zwiększonych przestworach międzykomórkowych (ang. *patency*). Sevala i wsp. [70] potwierdzili opisany powyżej mechanizm działania JH na nabłonek folikularny w eksperymentach *in vitro* na izolowanym jajniku szarańczy *Locusta migratoria*.

Najnowsze badania sugerują występowanie dwóch receptorów dla hormonu juwenilnego [59]. Pierwszy z nich to białko Ultraspiracle (USP), które należy do rodziny jądrowych receptorów wiążących hormony. Stwierdzono, że receptor Ultraspiracle tworząc heterodimer z receptorem ekdyzonu aktywuje szlak transdukcji sygnału związany z tym hormonem [60]. Drugi receptor zidentyfikowano u *Drosophila* podczas badań, które wykazały niewrażliwość muszek na działanie analogu JH – metoprenu. Receptor ten jest białkiem cytozolowym (*Met*), które wykazuje wysokie powinowactwo do JH III. [91]. U mutantów *Met* stwierdzono opóźnienie dojrzewania komórek jajowych oraz znaczne obniżenie płodności [59].

Synteza witelogenin w ciele tłuszczowym u samic *Tribolium castaneum* indukowana jest zarówno przez pobieranie pokarmu, jak i pośrednio przez działanie hormonu juwenilnego [59, 91, 71]. Badania Shenga i wsp. [71] wykazały, że samice *Tribolium* zaczynają odżywiać się po dwóch i pół dniach od linienia imaginalnego, natomiast poziom *Vg2* mRNA w komórkach ciała tłuszczowego wzrasta stopniowo od 4 dnia i osiąga najwyższy poziom w 5 dniu po linieniu. Autorzy ci stwierdzili, że przy braku aktywności JH pobieranie pokarmu hamuje ekspresję genu kodującego *Vg2* mRNA. Synteza witelogenin może być jednak przywrócona po iniekcji samicom wołowej insuliny. W innym eksperymencie wykazano, że wyciszenie za pomocą RNAi ekspresji czynnika transkrypcyjnego FOXO (ang. *Forkhead box protein O*) należącego do insulinozależnego szlaku transdukcji sygnału wywołuje u samic *Tribolium* indukcję *Vg2* mRNA już w 2 dniu po linieniu imaginalnym [59]. Z drugiej strony pobieranie pokarmu przez samice chrząszcza stymuluje ekspresję *ILP3* (ang. *Insulin-Like Peptide 3 gene*) i pojawienie się *Vg2* mRNA w komórkach ciała tłuszczowego. W eksperymentach *in vivo* oraz *in vitro* wykazano, że JH indukuje w komórkach ciała tłuszczowego i w mózgu wzrost transkrypcji *ILP2* mRNA, natomiast wyciszenie genu *Met* za pomocą RNAi hamuje transkrypcję tego mRNA [71]. Wykazano ponadto, że odżywianie stymuluje w komórkach ciała tłuszczowego transkrypcję *ILP3* mRNA i następnie *Vg2* mRNA. W eksperymentach tych udowodniono również, że JH stymuluje poprzez receptor *Met* wzrost poziomu *ILP2*, natomiast pobieranie pokarmu indukuje syntezę *ILP3* w ciele tłuszczowym. Z kolei wyciszenie ekspresji *ILP2* lub *ILP3* przez RNAi powoduje częściowe lub całkowite zahamowanie syntezy *Vg2* w ciele tłuszczowym samic *Tribolium* [71]. Sheng i wsp. [71] sugerują więc, że hormon juwenilny działając przez szlak transdukcji sygnału

związany z receptorem Met podwyższa syntezę ILP2, natomiast odżywianie stymuluje syntezę ILP3. ILP2 oraz ILP3 poprzez indukcję szlaku transdukcji sygnału związanego z aktywnością insuliny wywołują fosforylację FOXO przez AKT (ang. *protein kinase B*) i zatrzymanie tego czynnika transkrypcyjnego w cytoplazmie, co z kolei aktywuje ekspresję genu *Vg2*. JH stymuluje więc pośrednio w wyniku złożonego procesu transdukcji sygnału syntezę witelogenin w komórkach ciała tłuszczowego u samic *Tribolium* [59].

Działanie fizjologiczne JH w regulacji procesów związanych z rozrodem owadów jest wielokierunkowe. Schal i wsp. [63] wykazali zależność między produkcją i uwalnianiem feromonów płciowych a zwiększeniem syntezy JH u samic karaczana *Blatella germanica*. Badania innych autorów udowodniły ponadto znaczenie JH w regulacji dojrzewania płciowego [76], kojarzenia się motyli [57], migracji motyli [93, 30], diapauzie rozrodczej [19, 58, 62,] oraz różnicowaniu się kast u owadów społecznych [55].

Biosynteza JH oraz jego uwalnianie z gruczołów *corpora allata* do hemolimfy regulowana jest na drodze hormonalnej. Aktywność biosyntetyczna i wydzielnicza CA kontrolowana jest przez allatotropiny – neuropeptydy działające stymulująco na proces produkcji i uwalniania JH oraz przez allatostatyny – neuropeptydy działające hamująco na te procesy [2, 36]. Neurohormonami oddziałującymi inhibicyjnie na aktywność biosyntetyczną CA są również neuroparsyny [36].

## EKDYSTEROIDY

Inną grupą „klasycznych” hormonów regulujących rozmnażanie i rozwój owadów są ekdysteroidy: ekdyzon (E) oraz 20-hydroksyekdyzon (20E). 20E syntetyzowany jest z ekdyzonu, przy udziale 20-monooksygenazy, enzymu obecnego w wielu tkankach docelowych i jest hormonem ok. 100 razy bardziej aktywnym niż jego prekursor [54, 90]. Ekdysteroidy są ważnymi regulatorami procesu linienia u owadów. U larw owadów ekdyzon syntetyzowany jest z cholesterolu lub roślinnych steroli w gruczołach protorakalnych pod kontrolą hormonu protorakotropowego (PTTH). Przed osiągnięciem stadium imago komórki gruczołów protorakalnych ulegają apoptozie i zanikają, a produkcja ekdyzonu indukowana jest zarówno w jądrach, jak i w jajnikach [33, 72]. Fizjologiczna aktywność ekdysteroidów pochodzenia jajnikowego wykazuje charakter plejotropowy. Udowodniono, że hormony te wpływają na rozwój jajnika [12], indukują dojrzewanie oocytów [39], a wchłaniane i gromadzone w oocytach stanowią źródło ekdysteroidów dla rozwijającego się zarodka [10, 34, 79]. Ekdysteroidy jajnikowe uwalniane do hemolimfy działają na tkanki docelowe i indukują w nich specyficzną odpowiedź fizjologiczną. U Diptera 20E indukuje w komórkach ciała tłuszczowego syntezę witelogenin, głównych białek

deponowanych w dojrzewających oocytach [21]. W nielicznych jeszcze badaniach endokrynowych wykazano, że biosynteza ekdyzonu w jajniku komara *A. aegypti* stymulowana jest przez hormon peptydowy OEH, (ang. *Ovary Ecdysteroidogenic Hormone*) zidentyfikowany w mózgu tego owada. Neurohormon ten strukturalnie podobny jest do *Lom*-neuroparsyny i poza indukcją syntezy ekdyzonu stymuluje syntezę witelogenin w ciele tłuszczowym *A. aegypti* [11].

W latach 80 wykazano, że ekdyzon wiązany jest przez receptor ekdysteroidowy (EcR). EcR jest dotychczas jedynym poznanym receptorem jądrowym bezkręgowców, którego ligandem jest hormon sterydowy. U *Drosophila* obecność EcR wykazano w komórkach centralnego układu nerwowego, ciała tłuszczowego, jelita, tkankach męskiego i żeńskiego układu rozrodczego oraz w oenocytach [67]. Sugeruje się, że kluczowe znaczenie dla transmisji sygnału hormonalnego ma zdolność EcR do tworzenia heterodimerycznego kompleksu z białkiem Usp, ponieważ stwierdzono, że powinowactwo 20-E do heterodimeru EcR/Usp jest 10-krotnie wyższe niż do monomeru EcR [27]. Jak dotąd nie udało się otrzymać specyficznego przeciwciała dla Usp, jednak przypuszcza się, że u muszki *Drosophila* ekspresja genu kodującego białko Usp zachodzi w tych samych tkankach, co ekspresja EcR [68]. Wykazano, że w jajniku *Drosophila* w wyniku aktywacji szlaku transdukcji sygnału związanego z ekdyzonem dochodzi do ekspresji grupy genów określanych mianem genów wczesnych (*Eip74EF*, *Eip75B* i *Br*), których aktywność reguluje wzrost lub degenerację niedojrzałych komórek jajowych [77, 78]. U mutantów muszki owocowej, które mają zaburzony poziom ekdyzonu lub białka EcR stwierdzono nieprawidłowy przebieg procesu oogenezy. U tych muszek w wyniku wzrostu stężenia ekdyzonu albo ektopej ekspresji genu *Eip75B* lub *br* dochodziło do indukcji apoptozy w oocytach będących w 8-9 stadium rozwoju [77]. Wykazano, że iniekcja hormonu juwenilnego zmutowanym samicom *Drosophila* hamuje apoptozę oocytów, ponieważ hormon ten może hamować szlak transdukcji sygnału związany z ekdyzonem [78].

## NEUROPARSYNY I PARSYNY

Neuroparsyny i parsyny są polipeptydami o długości łańcucha 78-83 oraz 93 aminokwasów, które zostały zidentyfikowane w CC szarańczy wędrownej *L. migratoria* oraz szarańczy pustynnej *Schistocerca gregaria* [23, 25, 26, 64]. W badaniach *in vivo* wykazano, że fizjologiczna aktywność neuroparsyn u *L. migratoria* polega na inhibicji biosyntezy JH w *corpora allata*, co w rezultacie prowadzi do zahamowania rozwoju jajnika oraz biosyntezy witelogenin [25]. Nieliczne dotąd badania wskazują, że fizjologiczna aktywność parsyn jest odmienna od działania neuroparsyn. Prowadzone eksperymenty *in vivo* na dojrziałych płciowo samicach szarańczy wędrownej dowiodły, że parsyny indukują syntezę witelogenin i stymulują wzrost

oocytów [24]. Wykazano również stymulujące działanie tych peptydów na syntezę ekdyzonu w nabłonku folikularnym szarańczy [24] i stąd parsyny uważa się za fizjologiczne odpowiedniki ssaczych hormonów gonadotropowych, follikulotropiny (FSH) i luteotropiny (LH) [18].

## ALLATOTROPINY I ALLATOSTATYNY

Pierwszym neurohormonem spośród nielicznych dotąd zidentyfikowanych allatotropin owadów jest peptyd, określany akronimem Manse AT (GFKNVEMMTAR-Ga), izolowany z mózgu ćmy *Manduca sexta* [18]. Kataoka i wsp. [35] wykazali, że neurohormon ten stymuluje syntezę oraz uwalnianie JH z CA dorosłych ciec *M. sexta*, ale nie powoduje tego efektu u gąsienic. Jednak Audsley i wsp. [1] oraz Li i wsp. [40] wykryli stymulujący wpływ tego neurohormonu na biosyntezę JH u gąsienic motyli *Lacanobia oleracea* i *Samia cynthia ricini*. Allatotropina izolowana z *M. sexta* stymulowała również syntezę JH w innych heterologicznych biotestach u pszczoły *Apis mellifera* [55] oraz muchy *Phormia regina* [83]. Obecność Manse AT-podobnych peptydów stwierdzono ponadto za pomocą badań immunohistochemicznych u motyli *Spodoptera frugiperda* [48] i *Agrius convolvuli* [82] oraz u komara *Aedes aegypti* [86], gdzie peptyd ten wykazywał dawko- oraz wiekowo-zależne oddziaływanie na CA osobników dorosłych [42]. Nie stwierdzono natomiast wpływu tego peptydu na uwalnianie JH z *corpora allata* larw, poczwerek oraz dorosłych samic chrząszcza *T. molitor*, karaczana amerykańskiego *Periplaneta americana* oraz szarańczaka *Schistocera nitens* [35]. Manse AT oprócz regulacji czynności wydzielniczej CA wykazuje szeroką aktywność plejotropową [44]. Peptyd ten działa miostymulująco na endogenną aktywność kurczliwą jelita ciec *Helicoverpa armigera* [20] i *Heliothis virescens* [49] oraz kardiostymulująco na pracę serca ćmy *M. sexta* i karaczana *Periplaneta unipuncta* [81]. Iniekcja Manse AT powodowała również skrócenie długości życia dorosłych samic *M. sexta* [49].

W przeciwieństwie do allatotropin, allatostatyny stanowią obecnie liczną grupę neuropeptydów izolowanych z różnych gatunków owadów. Pierwszą allatostatynę Dippu-AST-1 (LYDFGLa) odkryto u karaczana *Diploptera punctata* [92]. Peptyd ten obecnie zaliczany jest do allatostatyn tworzących rodzinę określaną skrótem FGL/AST, wskazującym na posiadanie przez należące do tej grupy peptydy wspólnego, trójaminokwasowego fragmentu od C-końca łańcucha peptydowego [43]. Dotychczas u owadów i innych bezkręgowców poznano ponad 70 bioanalogów należących do tej rodziny peptydów [43, 61, 84]. W badaniach *in vivo* i *in vitro* wykazano, że u świerszczy, karaczanów i termitów aktywność fizjologiczna allatostatyn związana jest z hamowaniem biosyntezy JH w *corpora allata* nie tylko u osobników dorosłych, ale również u zarodków oraz larw [75, 92]. Z drugiej stro-

ny, w eksperymentach przeprowadzonych na niektórych gatunkach szarańczaków, pszczoł, much, komarów i patyczaków stwierdzono, że allatostatyny nie regulują aktywności biosyntetycznej CA [41, 75]. Podobnie jak allatotropiny, neuropeptydy z rodziny FGL-amidu wykazują aktywność plejotropową [75]. Martins i wsp. [45, 46] analizując działanie kilku allatostatyn obserwowali u karaczana *Blattella germanica* inhibicję syntezy witelogenin w ciele tłuszczowym oraz hamowanie uwalniania tych białek z ciała tłuszczowego do hemolimfy. U tego gatunku scharakteryzowano również dawko-zależną aktywność kardioinhibycyjną allatostatyn z grupy FGL/AST [87], a u innego karaczana *D. punctata* wykazano stymulujący wpływ tych peptydów na aktywność sacharydaz w jelicie [22].

### *Aea*-TMOF

Pierwszym odkrytym u owadów hormonem peptydowym pochodzenia jajnikowego o właściwościach gonadoinhibycyjnych jest *Aea*-TMOF o sekwencji aminokwasowej: YDPAPPPPPP [4]. Zespół profesora Borovsky'ego wykazał, że iniekcja tego peptydu samicom *A. aegypti*, bezpośrednio po pobraniu przez nie krwi, hamuje w ich jelicie syntezę enzymów proteolitycznych, co prowadzi do zmniejszenia zdolności do trawienia pokarmu [4]. Peptyd ten został w pełni zidentyfikowany w 1993 roku przez tych samych autorów i określony akronimem *Aea*-TMOF (ang. *trypsin modulating oostatic factor*) [3]. Badania fizjologicznych właściwości *Aea*-TMOF wykazały, że w zakresie stężeń fizjologicznych (1 nM-1 μM) peptyd ten wiąże się do specyficznych receptorów komórek nabłonka jelita i powoduje hamowanie transkrypcji genu kodującego mRNA dla enzymu trawiącego – trypsyny. W warunkach naturalnych, po pobraniu przez samicę komara krwi, komórki nabłonkowe jelita zaczynają syntetyzować trypsynę, która jest następnie wydzielana do światła jelita. Po 24 godzinach od pobrania przez samicę pokarmu synteza trypsyny osiąga najwyższy poziom, a nabłonek folikularny pęcherzyków jajnikowych w ostatnim stadium witelogenezy syntetyzuje i wydziela do hemolimfy *Aea*-TMOF. Najwyższy poziom syntezy tego peptydu przypada na 36 godzinę po pobraniu krwi przez samicę, po czym stopniowo zmniejsza się i po 48 godzinach jest podobny jak w kontroli. *Aea*-TMOF po 48 godzinach hamuje całkowicie syntezę trypsyny w jelicie [4, 3, 7, 8, 9]. Zablockowanie syntezy trypsyny w przewodzie pokarmowym komara prowadzi do inhibicji syntezy witelogenin w ciele tłuszczowym, co skutkuje zmniejszeniem podaży tych białek do oocytu i zaznacza się efektem oostatycznym [6, 9]. Badania współzależności struktura-aktywność wykazały, że za efekt oostatyczny oraz hamowanie funkcji enzymatycznych w jelicie przez *Aea*-TMOF u *A. egypti* oraz *N. bullata* odpowiedzialny jest 5-aminokwasowy fragment [29, 36, 44, 51, 80] -*Aea*-TMOF od *N*-końca cząsteczki [6, 9, 73]. W eksperymentach *in vivo* stwierdzono,

że syntetyczne analogi *Aea*-TMOF wykazują wyższą toksyczość u larw komara *Culex pipiens* niż natywny peptyd. Analogi te były również toksyczne w stosunku do gąsienic szkodnika tytoniu – *Heliothis virescens*, szkodnika bawełny – *Helicovera zea* oraz karaczana *B. germanica* i dlatego sugeruje się możliwość praktycznego zastosowania analogów *Aea*-TMOF pod postacią pseudopeptydów i pseudomimetyków jako potencjalnych bioinsektycydów [85].

### ***Neb*-TMOF**

Drugi hormon peptydowy o silnym działaniu gonadoinhibicyjnym, *Neb*-TMOF (NPTNLH), wyizolowany został w 1994 roku przez zespół profesora De Loof'a z późnych witelogenicznych jajników muchy *Neobellieria bullata* [14]. Biologiczna aktywność tego heksapeptydu jest zbliżona do działania *Aea*-TMOF mimo różnic w sekwencji aminokwasowej między tymi peptydami. Mechanizm działania *Neb*-TMOF u *N. bullata* polega również na inhibicji syntezy trypsyny lub trypsynopodobnych enzymów w jelicie środkowym owada, co prowadzi do zahamowania wzrostu i dojrzewania oocytów w jajniku. Następstwem niewystarczającej ilości trypsyny w jelicie muchy jest bowiem zmniejszone trawienie białek i wchłanianie aminokwasów do hemolimfy. Spadek poziomu aminokwasów w hemolimfie prowadzi do inhibicji syntezy witelogenin w ciele tłuszczowym, co jest przyczyną zahamowania rozwoju i dojrzewania oocytów w jajniku *N. bullata* [5, 14]. Hua i wsp. [31, 32] wykazali ponadto, że *Neb*-TMOF hamuje również syntezę ekdyzonu u larw much *N. bullata* i *Calliphora vomitoria*. Zhu i wsp. [94] w bioteście *in vitro* zbadali stabilność znakowanego trytem *Neb*-TMOF przy inkubacji z hemolimfą i jelitem muchy *N. bullata*. Autorzy ci stwierdzili szybką degradację enzymatyczną peptydu w hemolimfie, natomiast w obecności jelita peptyd ten był stabilny. Ostatnio stwierdzono, że gonadoinhibicyjna aktywność *Neb*-TMOF nie jest gatunkowo-specyficzna. Badania Kuczer i wsp. [38] oraz Wasilewskiego i Rosińskiego [89] wykazały *in vivo* oostatyczne działanie *Neb*-TMOF u dwóch gatunków chrząszczy *T. molitor* i *Zophobas atratus*. U *T. molitor* *Neb*-TMOF oprócz działania oostatycznego powoduje opóźnianie składania jaj, zmniejszenie ilości złożonych przez samice jaj oraz redukcję wylęgalsność larw ze złożonych jaj.

### ***Neb*-KOLOSTATYNA**

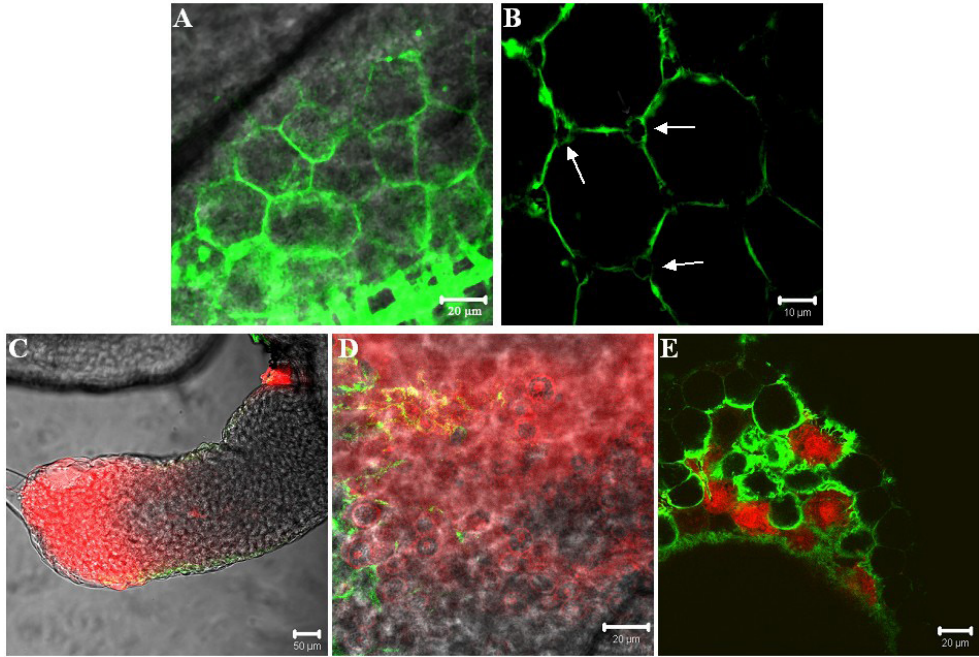
*Neb*-kolostatyna jest peptydem zbudowanym z 19 aminokwasów (SIVPLGL-PVPIGPIVVGPR), który odkryty został przez zespół De Loof'a przy okazji izolacji *Neb*-TMOF z jajników muchy *N. bullata* [13]. Podobnie jak *Neb*-TMOF, peptyd



ten wykazuje silne właściwości gonadoinhibycyjne. *Neb*-kolostatyna zawdzięcza swoją nazwę dzięki częściowemu podobieństwu do sekwencji aminokwasowych kilku znanych kolagenów oraz oostatycznej aktywności [13]. Bylemans i wsp. stwierdzili, że iniekcje fizjologicznych dawek *Neb*-kolostatyny 4-dniowym samicom muchy *N. bullata*, których ciało tłuszczowe nie syntetyzowało jeszcze witelogenin, powodują całkowite zahamowanie wzrostu oocytów [13]. Dowiedli oni, że ta folikulostatyna hamuje deponowanie witelogenin w oocytach wyłącznie w prewitelogenicznych pęcherzykach jajnikowych. Co więcej, iniekcje *Neb*-kolostatyny 3-dniowym prewitelogenicznym samicom powodowały znaczący spadek ilości krążących w hemolimfie witelogenin w porównaniu z kontrolnymi samicami muchy. Przeciwnie do efektu *Neb*-TMOF, iniekcje *Neb*-kolostatyny nie hamowały jednak w jelicie dorosłych samic *N. bullata* aktywności trypsyny oraz syntezy ekdyzonu u larw tej muchy [13]. W biotestach heterologicznych z *T. monitor* stwierdzono, że hormon ten powodował zahamowanie rozwoju jajników oraz procesu wzrostu i dojrzewania oocytów [38, 89].

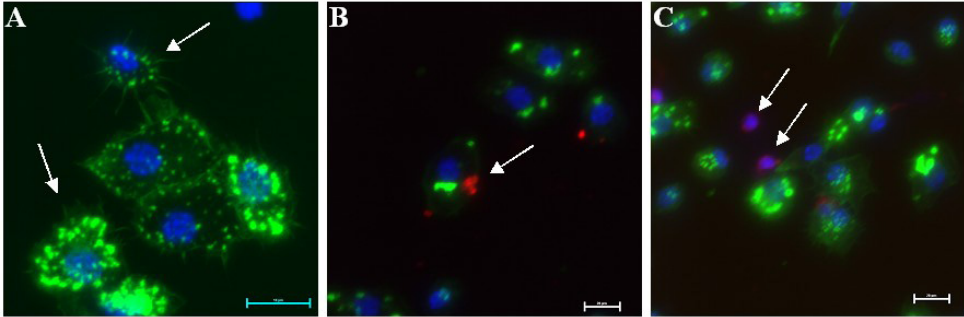
Iniekcje kolostatyny wywoływały także redukcję ilości składnych jaj przez samice *T. molitor*, zaburzały proces embriogenezy oraz zmniejszały wylęgalskość larw ze złożonych jaj [89]. Badania Czarniewskiej i wsp. wykazały, że u chrząszcza *T. molitor* *Neb*-kolostatyna w fizjologicznych stężeniach (w dawce 5 nmoli lub 500 pmoli peptydu/owada) indukuje w pęcherzykach owarioli proces atrezji, tak w stadiach prewitelogenicznych, jak i witelogenicznych rozwoju oocytu [17]. W przeprowadzonych badaniach wykazano, że atrezja pęcherzyków jajnikowych indukowana *Neb*-kolostatyną jest ściśle powiązana ze zmianami w przepuszczalności nabłonka folikularnego dla witelogenin. Stwierdzono, że w wyniku działania tego peptydu dochodzi w komórkach folikularnych do depolimeryzacji F-aktyny, a powstałe zmiany w cytoszkieletcie tych komórek prowadzą następnie do zahamowania tworzenia przestrzeni międzykomórkowych w nabłonku folikularnym. Brak przestrzeni międzykomórkowych w nabłonku folikularnym hamuje proces transportu witelogenin do oocytów. W odpowiedzi na działanie tej folikulostatyny dochodzi również do aktywacji kaspaz w pęcherzykach jajnikowych i w efekcie tych zmian do atrezji całych pęcherzyków jajnikowych [17].

Podobnie jak u *T. molitor*, iniekcje *Neb*-kolostatyny powodują atrezję pęcherzyków jajnikowych w heterologicznym bioteście u samic *H. abietis*. Oprócz hamowania tworzenia przestrzeni międzykomórkowych w nabłonku folikularnym i wywoływania atrezji pęcherzyków jajnikowych, *Neb*-kolostatyna indukuje depolimeryzację F-aktyny i aktywację kaspaz w komórkach germarium u tego chrząszcza (ryc.1). Zmiany wywołane przez *Neb*-kolostatynę w germarium *H. abietis* są nowym efektem działania tego peptydu w jajniku owada. Przeprowadzone w tej pracy badania aktywności fizjologicznej *Neb*-kolostatyny wykazały nie tylko jej plejotropowy charakter działania w stosunku do tkanek rozrodczych, ale również do komórek nie biorących udziału w procesie rozrodu.



RYCINA 1. Zmiany morfologiczne w jajniku chrząszcza *Hylobius abietis* po jednym dniu od iniekcji płynu fizjologicznego (kontrola; A, B) oraz *Neb*-kolostatyny w dawce 5 nmoli (C, D, E). Jajniki wybarwiono według metody opisanej przez Czarniewską i wsp. [17]. Na kolor zielony wybarwiono fluorochromem Oregon Green® 488 Phalloidin (Invitrogen) cytoszkielet aktynowy. Na kolor czerwony wybarwiono znakowanym fluorescencyjnie inhibitorem SR-VAD-FMK (AK-115, BIOMOL, PA) aktywne kaspazy. W kontroli w korowej cytoplazmie komórek germarium widoczny jest dobrze cytoszkielet F-aktynowy (A), a pomiędzy komórkami nabłonka folikularnego widoczne są przestrzenie międzykomórkowe (strzałki) (B). *Neb*-kolostatyna powoduje depolimeryzację F-aktyny w komórkach germarium (C, D), hamuje powstawanie przestrzeni międzykomórkowych w nabłonku folikularnym (E) oraz indukuje w komórkach obu struktur owarioli proces apoptozy (kolor czerwony). W germarium (A) oraz w komórkach nabłonka folikularnego (B) w kontroli nie obserwowano aktywnych kaspaz

FIGURE 1. Morphological changes in the *Hylobius abietis* ovary 1 day after physiological saline (control; A, B) and *Neb*-colloostatin injection in dose of 5 nmole (C, D, E). Ovaries were stained by the method described by Czarniewska et al. [17]. The color green shows F-actin cytoskeleton stained with fluorochrome Oregon Green® 488 Phalloidin (Invitrogen). The color red shows active caspase stained with a potent inhibitor of caspase activity (SR-VAD-FMK; AK-115, BIOMOL, PA). In the cells of the control germarium, a strong fluorescent signal was localized subcortically (A) and in vitellarium a maximum patency of follicular epithelium was visible (arrows) (B). *Neb*-colloostatin induces F actin depolymerization in the germarium cells (C, D) and it inhibits the patency in the follicular epithelium (E). In the control, the active caspase was not observed in germarium (A) and in the follicular epithelium (B), whereas *Neb*-colloostatin injection activate this enzyme in both structures of ovariole (C, D, E)



RYCINA 2. Hemocyty chrząszcza *Tenebrio molitor* po iniekcji płynu fizjologicznego (A) oraz *Neb*-kolostatyny w stężeniu 5 nmoli (B, C). Hemocyty wybarwiono według metody opisanej przez Czarniewską i wsp. [16]. Na kolor zielony wybarwiono fluorochromem Oregon Green® 488 Phalloidin (Invitrogen) cytoszkielet F-aktyny. W kontrolnych hemocytach widoczna jest dobrze F-aktyna. Komórki po 15 minutach adhezji tworzą filopodia (strzałki) (A). *Neb*-kolostatyna powoduje w hemocytach agregację F-aktyny i hamuje powstawanie filopodiów (B, C). Na kolor czerwony wybarwiono znakowanym fluorescencyjnie inhibitorem SR-VAD-FMK (AK-115, BIOMOL, PA) aktywne kaspazy. W kontrolnych hemocytach nie obserwowano aktywnych kaspaz (A). *Neb*-kolostatyna aktywowała kaspazy w hemocytach (strzałki) (B, C). Na kolor niebieski wybarwiono jądra komórkowe za pomocą fluorochromu DAPI (A-C). Skala wynosi 20  $\mu$ m

FIGURE 2. Haemocytes of *Tenebrio molitor* beetle after physiological saline (control; A) and *Neb*-colloostatin injection in dose of 500 pmole (B, C). Haemocytes were stained by the method described by Czarniewska et al. [16]. The color green shows F-actin cytoskeleton of haemocytes stained with fluorochrome Oregon Green®488 Phalloidin (Invitrogen). The color red shows active caspase stained with a potent inhibitor of caspase activity (SR-VAD-FMK; AK-115, BIOMOL, PA). The control haemocytes formed extensive filopodia (arrows), in which the F-actin microfilaments were detected after the cells had been allowed to adhere to the cover slips for 15 minutes (A). Injection of *Neb*-colloostatin resulted in the accumulation of large F-actin aggregates. The peptide-stimulated haemocytes were less able to form filopodia in comparison to the control haemocytes (B, C). The active caspase was not observed in the control haemocytes (A). *Neb*-colloostatin injection induces the caspase activation in haemocytes (arrows) (B, C) The color blue shows nuclei which were stained with DAPI fluorochrome (A-C). The scale is 20  $\mu$ m

Wykryto pro-apoptyczne działanie *Neb*-kolostatyny (ryc. 2) w stosunku do hemocytów owadów [16]. Sugeruje się, że *Neb*-kolostatyna w hemolimfie może odgrywać istotną rolę w regulacji aktywności hemocytów u owadów oraz modyfikować odpowiedź immunologiczną [16]. Badania zależności struktura-aktywność wykazały, że również syntetyczne analogi *Neb*-kolostatyny działają pro-apoptycznie w stosunku do hemocytów [36]. Stwierdzono, że wymiana Ser w 1 pozycji sekwencji aminokwasowej *Neb*-kolostatyny na aminokwasy hydrofobowe (Ala lub Val), a także na aminokwasy zawierające w cząsteczce polarną resztę (Glu lub Asp) powoduje zwiększenie aktywności hemocytotoksycznej analogów u *T. molitor* [36].

## INHIBITORY $\alpha$ -CHYMOTRYPSYNY I PROTEAZ SERYNOWYCH

W nielicznych jeszcze pracach sugeruje się, że wyizolowane z jajników szarańczy pustynnej *S. gregaria* 5 oligopeptydów (SGP-1-5) oraz 30-aminokwasowy peptyd o masie cząsteczkowej 6-kDa wykazują działanie gonadoinhibicyjne [28, 64]. Jednak do tej pory nie zbadano wpływu tych cząsteczek na wzrost i dojrzewanie oocytów. Hamdaoui i wsp. [28] wykazali jedynie, że SGP-1-5 hamują aktywność  $\alpha$ -chymotrypsyny i innych proteaz serynowych w jelicie. Autorzy ci stwierdzili obecność tych oligopeptydów nie tylko w jajniku, ale również w hemolimfie i ciele tłuszczowym szarańczy.

### Led-NPF

Zespół De Loof'a wyizolował w 1996 roku z mózgu stonki ziemniaczanej *Leptinotarsa decemlineata* dwa neuropeptydy, które zaliczono do rodziny owadzich neuropeptydów F (ang. *NPY-like peptides*, NPFs). Pierwszy z wyizolowanych peptydów Led-NPF-1 jest deka-peptydem o sekwencji aminokwasowej Ala-Arg-Gly-Pro-Gln-Leu-Arg-Leu-Arg-Phe-NH<sub>2</sub>, natomiast drugi peptyd Led-NPF-2 jest okta-peptydem o sekwencji Ala-Pro-Ser-Leu-Arg-Leu-Arg-Phe-NH<sub>2</sub> [74]. W bioteście heterologicznym z szarańczą *L. migratoria* stwierdzono, iż Led-NPF-1 bierze udział w regulacji cyklu gonadotropowego poprzez stymulację dojrzewania oocytów w jajniku tego owada. Podobnej odpowiedzi w jajniku nie stwierdzono jednak po iniekcji Led-NPF-2 [15, 66]. Mechanizm gonadostymulującego działania Led-NPF-1 nie został do tej pory poznany i sugeruje się, że może on polegać na indukcji zwiększonej syntezy JH i ekdyzonu, a także na stymulowaniu uwalniania zgromadzonych w *corpora cardiaca* parsyn [88]. Wydaje się, że aktywność fizjologiczna Led-NPF-1 może być gatunkowo specyficzna, ponieważ eksperymenty przeprowadzone na innych gatunkach, takich jak mucha *N. bullata* oraz chrząszcz *T. molitor* nie wykazały wpływu tego hormonu na składanie jaj i wylęgłość larw ze złożonych jaj [15, 88]. Z drugiej strony przeprowadzone dotychczas badania aktywności fizjologicznej Led-NPF-1 i Led-NPF-2 ujawniły plejotropowy charakter działania tych peptydów. Kuczer i wsp. [38] stwierdzili kardiainhibicyjne działanie obu peptydów w bioteście *in vitro* na półizolowanym sercu chrząszczy *T. molitor* i *Z. atratus*.

## SIEĆ POWIĄZAŃ FUNKCJONALNYCH MIĘDZY ODŻYWIANIEM A AKTYWACJĄ SZLAKÓW SYGNAŁOWYCH REGULUJĄCYCH WITELOGENEZĘ

U owadów proces oogenezy jest ściśle związany z pobieraniem pokarmu. U chrząszczy *Tribolium* wykazano, że głodzenie samic po linieniu imaginalnym hamuje syntezę witelogenin w komórkach ciała tłuszczowego, natomiast nie hamuje dojrzewania oocytów aż do momentu zatrzymania oogenezy. U samic głodzonych oocyty w jajniku są więc mniejsze i słabiej wykształcony jest nabłonek pęcherzyka folikularnego niż u samic odżywiających się. Badania Parthasarathy'ego i współpracowników [52, 53] wykazały, że hormon juwenilny może aktywować syntezę witelogenin w komórkach ciała tłuszczowego samic *Tribolium* jedynie wtedy, gdy rosnące oocyty osiągną takie stadium rozwoju, w którym są zdolne do gromadzenia żółtka. 20E indukuje natomiast dojrzewanie oocytów w jajniku i w ten sposób pośrednio reguluje syntezę witelogenin w komórkach ciała tłuszczowego. W ostatnim czasie zastosowanie w badaniach mechanizmów regulacji hormonalnej oogenezy u owadów technik biologii molekularnej, m. in. PCR w czasie rzeczywistym, mikromacierzy DNA i interferencyjnego RNA (RNAi), ujawniło istnienie wzajemnych powiązań funkcjonalnych między odżywianiem a aktywacją szlaku sygnałowego dla insuliny (IIS), aktywacją szlaku sygnałowego mTOR (ang. *mammalian Target Of Rapamycin*) oraz procesem witelogenezy [50]. Ta funkcjonalna sieć wzajemnych zależności jest kluczowa dla procesu syntezy witelogenin oraz dojrzewania oocytów i została opisana u muszki *D. melanogaster*, moskitów *Aedes aegypti* i *Anopheles gambiae*, szarańczaka *Romalea microptera* oraz ostatnio u chrząszcza *T. castaneum* [50]. U *Tribolium* Parthasarathy i Palli [50] stwierdzili, że w porównaniu z odżywiającymi się samicami, samice głodzone mają zwiększony poziom ekspresji genów kontrolujących homeostazę energetyczną oraz obniżony poziom ekspresji genów zaangażowanych w produkcję jaj. Autorzy ci stosując dsRNA wyciszyli ekspresję genów związanych ze szlakami IIS-TOR, takich jak gen kodujący receptor insuliny InR, geny kodujące Chico (ang. *Insulin Receptor substrate 1*), Akt, FOXO, PI<sub>3</sub>K (ang. *Phosphoinositide 3-Kinase*), RHEB (ang. *GTP-binding protein*), TOR, gen kinazy S6 oraz gen kodujący czynnik transkrypcyjny GATA. W wyniku tych manipulacji molekularnych otrzymali sterylne samice i wykazali, że obie drogi sygnałowe odgrywają kluczową rolę w procesie syntezy witelogenin w komórkach ciała tłuszczowego i dojrzewaniu oocytów w jajniku *Tribolium*.

W badaniach wykonanych na głodzonych samicach tego chrząszcza Parthasarathy i Palli analizowali także oddziaływanie hormonu juwenilnego, 20 E oraz odżywiania na rozwój jajnika i dojrzewanie oocytów [50]. W biotestach samice po linieniu imaginalnym iniekowano dsRNA dla genów *JHAMT* kodującego metyltransferazę niezbędną do biosyntezy JH, *EcR* kodującego receptor ekdyzonu, *Usp* kodującego receptor Usp tworzący heterodimer z EcR oraz genów *InR* i *TOR*, natomiast samice kontrolne iniekowano dsRNA dla genu *malE* (*E. coli*). Następnie iniekowane samice głodzono przez 4 kolejne dni. Stwierdzono, że u samic iniekowanych dsRNA dla *JHAMT* oocyty pierwotne były powiększone i otoczone nabłonkiem folikularnym, natomiast w jajniku samic iniekowanych dsRNA dla *EcR*, *Usp*, *InR* i *TOR* oocyty zostały zahamowane w 2 stadium rozwoju. W przeprowadzonych badaniach wykazano, że aktywność 20E oraz szlaków sygnalizacji IIS-TOR jest kluczowa dla procesu dojrzewania oocytów u *T. castaneum* [50].

## PODSUMOWANIE

Wiele gatunków owadów powoduje szkody w uprawach rolniczych, sadowniczych i leśnych, a także przenosi choroby u ludzi i zwierząt. Ogromny sukces ewolucyjny i ekologiczny owadów, które stanowią najliczniejszą grupę zwierząt żyjących na Ziemi, związany jest między innymi ze złożonym, ale niezwykle wydajnym rozmnażaniem. Do niedawna badania nad rozrodem owadów skupiały się głównie na wyjaśnieniu roli „klasycznych” hormonów, hormonu juwenilnego i ekdysteroidów w regulacji cyklu gonadotropowego. Jednak identyfikacja i poznanie fizjologicznej aktywności nowych cząsteczek o charakterze peptydowym przyczyniły się do poszerzenia naszej wiedzy odnośnie do regulacji rozmnażania owadów oraz zainspirowało wielu badaczy do intensywnych poszukiwań nowych syntetycznych analogów oraz peptydomimetyków, które pozwalałyby kontrolować liczebność populacji szkodników. Mechanizm działania peptydów gonadotropowych nie jest do końca poznany, wiele z tych cząsteczek wykazuje działanie plejotropowe. Dalsze badania aktywności fizjologicznej tych hormonów peptydowych oraz ich syntetycznych analogów mogą przyczynić się do praktycznego zastosowania tych związków jako bezpiecznych dla środowiska nowej generacji bioinsektycydów, które wykazywałyby dużą selektywność gatunkową i specyfikę fizjologicznego działania [47, 85].

## PODZIĘKOWANIA

Praca częściowo finansowana z grantu NN 309 066 739

## LITERATURA

- [1] AUDSLEY N, WEAVER RJ, EDWARDS JP. Juvenile hormone biosynthesis by corpora allata of larval tomato moth *Lacanobia oleracea* and regulation by *Manduca sexta* allatostatin and allatotropin. *Insect Biochem Mol Biol* 2000; **30**: 681-689.
- [2] BELLÉS X, MAESTRO JL. Endocrine peptides and insect reproduction. *Invertebrate Reprod Dev* 2005; **47**: 23-37.
- [3] BOROVSKY D, CARLSON DA, GRIFFIN PR, SHABANOWITZ J, HUNT DF. Mass spectrometry and characterization of *Aedes aegypti* trypsin modulating oostatic factor (TMOF) and its analogs. *Insect Biochem Mol Biol* 1993; **23**: 703-712.
- [4] BOROVSKY D, CARLSON DA, GRIFFIN PR, SHABANOWITZ J, HUNT DF. Mosquito oostatic factor: a novel decapeptide modulating trypsin-like enzyme biosynthesis in the midgut. *FASEB J* 1990; **4**: 3015-3020.
- [5] BOROVSKY D, JANSSEN I, VANDEN BROECK J, HUYBRECHTS R, WRHAERT P, DE BONDT' HL, BYLEMANS D, DE LOOF A. Molecular sequencing and modeling of *Neobellieria bulata* trypsin. Evidence for translational control *Neobellieria bulata* trypsin-modulating oostatic factor. *Eur J Biochem* 2006; **273**: 237-287.
- [6] BOROVSKY D, JANSSEN I, VANDEN BROECK J, HUYBRECHTS R, WRHAET P, DE BONDT' HL, BYLEMANS D, DE LOOF A. Molecular sequencing and modeling of *Neobellieria bulata* trypsin. Evidence for translational control *Neobellieria bulata* trypsin-modulating oostatic factor. *Eur J Biochem* 2006; **273**: 237-287.
- [7] BOROVSKY D, POWELL CA, NAYAR JK, BLALOCK JE, HAYES TK. Characterization and localization of mosquito-gut receptors for trypsin modulating oostatic factor using complementary peptide and immunocytochemistry. *FASEB J* 1994; **8**: 350-355.
- [8] BOROVSKY D, SONG Q, MA MC, CARLSON DA. Biosynthesis, secretion and immunochemistry of trypsin modulating oostatic factor of *Aedes aegypti*. *Arch Insect Biochem Physiol* 1994; **27**: 27-38.
- [9] BOROVSKY D., MAHMOOD F. Feeding the mosquito *Aedes aegypti* with TMOF and its analogs, effect on trypsin biosynthesis and egg development. *Regul Pept* 1995; **57**: 273-281.
- [10] BOWNES M, SHIRRAS A, BLAIR M, COLLINS J, COULSON A. Evidence that insect embryogenesis is regulated by ecdysteroids released from yolk proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988; **85**: 1554-1557.
- [11] BROWN MR, GRAF R, SWIDEREK KM, FRENDELY TH, CHAMPAGNE DE, LEA AO. Identification of a steroidogenic neurohormone in female mosquitoes. *J Biol Chem* 1998; **273**: 3967-3971.
- [12] BUSZCZAK M, FREEMAN MR, CARLSON JR, BENDER M, COOLEY L, SEGRAVES WA. Ecdysone response genes govern egg chamber development during mid-oogenesis in *Drosophila*. *Development* 1999; **126**: 4581-4589.
- [13] BYLEMANS D, BOROVSKY D, HUNT DF, SHABANOWITZ J, GRAUWELS L, DE LOOF A. Sequencing and characterization of trypsin modulating oostatic factor (TMOF) from the ovaries of the grey fleshfly, *Neobellieria bullata*. *Regul Pept* 1994; **50**: 61-72.
- [14] BYLEMANS D, PROOST P, SAMIJN B, BOROVSKY D, GRAUWELS L, HUYBRECHTS R, VAN DAMME J, VAN BEEUMEN J, DE LOOF A. *Neb*-colloostatin, a second folliculostatin of the grey fleshfly, *Neobellieria bullata*. *Eur J Biochem* 1995; **228**: 45-49.
- [15] CERSTIAENS A, BENFEKIH L, ZOUTEN H, VERHAET P, DE LOOF A, SCHOofs L. *Led*-NPF-1 stimulates ovarian development in locusts. *Peptides* 1999; **20**: 39-44.
- [16] CZARNIEWSKA E, MRÓWCZYŃSKA L, KUCZER M, ROSIŃSKI G. The pro-apoptotic action of the peptide hormone *Neb*-colloostatin on insect haemocytes. *J Exp Biol* 2012; **215**: 4308-4313.
- [17] CZARNIEWSKA E, ROSIŃSKI G, GABALA E, KUCZER M. The natural insect peptide *Neb*-colloostatin induces ovarian atresia and apoptosis in the mealworm *Tenebrio molitor*. *BMC Developmental Biology* 2013 – w druku.
- [18] DE LOOF A, HUYBRECHTS R, KOTANEN S. Review: reproduction and love: strategies of the organism's cellular defense system? *Comp Biochem Physiol C* 1998; **120**: 167-176.
- [19] DENLINGER DL. Hormonal control of diapause. W: Kerkut GA, Gilbert GI [red] *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*. Oxford, Pergamon Press 1985; **8**: 353-412.

- [20] DUVE H, EAST PD, THORPE A. Regulation of lepidopteran foregut movement by allatostatins and allatotropin from the frontal ganglion. *J Comp Neurol* 1999; **413**: 405-416.
- [21] FALLON AM, HAGEDORN HH. Synthesis of vitellogenin by fat body in *Aedes aegypti*: effect of injected ecdysone. *Am Zool* 1972; **12**: 697
- [22] FUSÉ M, ZHANG JR, PARTRIDGE E, NACHMAN RJ, ORCHARD I, BENDENA WG, TOBE SS. Effects of an allatostatins and a myosuppressin on midgut carbohydrate enzyme activity in the cockroach *Diploptera punctata*. *Peptides* 1999; **20**: 1285-1293.
- [23] GIRARDIE J, GIRARDIE A, HUET JC, PERNOLLET JC. Amino acid sequence of locust neuroparsins. *FEBS Lett* 1988; **254**: 2-8.
- [24] GIRARDIE J, GIRARDIE A. Lom OMP, a putative ecdysio-tropic factor for the ovary in *Locusta migratoria*. *J Insect Physiol* 1996; **42**: 215-221.
- [25] GIRARDIE J, HUET JC, ATAY-KADIRI Z, ETTOUIL S, DELBECQUE JP, FOURNIER B, PERNOLLET JC, GIRARDIE A. Isolation, sequence determination, physical and physiological characterization of the Neuroparsins and Ovary Maturing Parsins of *Schistocerca gregaria*. *Insect Biochem Mol Biol* 1998; **28**: 641-650.
- [26] GIRARDIE J, RICHARD O, HUET JC, NESPOULOUS C, VAN DORSSELAER A, PERNOLLET JC. Physical characterization and sequence identification of the ovary maturing parsin. A new neurohormone purified from the nervous corpora cardiaca of the African locust (*Locusta migratoria migratorioides*). *Eur J Biochem* 1991; **202**: 1121-1126.
- [27] GREBE M, PRZIBILLA S, HENRICH VC, SPINDER-BARTH M. Characterization of the ligand-binding domain of the ecdysteroid receptor from *Drosophila melanogaster*. *Biol Chem* 2003; **1**: 105-116.
- [28] HAMD AOUI A, WATALEB S, DEVREESE B, CHIOU SJ, VANDEN BROECK J, VAN BEEUMEN J, DE LOOF A, SCHOofs L. Purification and characterization of a group of five novel peptide serine protease inhibitors from ovaries of the desert locust, *Schistocerca gregaria*. *FEBS Lett*. 1998; **422**: 74-78.
- [29] HARTFELDER K. Insect juvenile hormone: status quo to high society, *Braz J Med Biol Res* 2000; **33**: 157-177.
- [30] HERMAN WS, TATAR M. Juvenile hormone regulation of longevity in the migratory monarch butterfly. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 2001; **268**: 2509-2514.
- [31] HUA YJ, BYLEMANS D, DE LOOF A, KOOLMAN J. Ecdysone synthesis in flies is inhibited by a hexapeptide. *Exp Clin Endocrinol* 1994; **102**: 164.
- [32] HUA YJ, BYLEMANS D, DE LOOF A, KOOLMAN J. Inhibition of ecdysone biosynthesis in flies by a hexapeptide isolated from vitellogenic ovaries. *Mol Cell Endocrinol* 1994; **104**: R1-R4.
- [33] HUYBRECHTS R, DE LOOF A. Induction of vitellogenin synthesis in male *Sarcophaga bullata* by ecdysterone. *J Insect Physiol* 1977; **23**: 1359-1362.
- [34] ISAAC RE, REES HH. Isolation and identification of ecdysosteroid phosphates and acetylcysteroid phosphates from developing eggs of the locust, *Schistocerca gregaria*. *Biochem J* 1984; **221**: 459-464.
- [35] KATAOKA H, TOSCHI A, LI JP, CARNEY RL, SCHOOLEY DA, KRAMER SJ. Identification of an allatotropin from adult *Manduca sexta*. *Science* 1989; **243**: 1481-1483.
- [36] KUCZER M, CZARNIEWSKA E, ROSIŃSKI G, LISOWSKI M. The pro-apoptotic action of new analogues of the insect gonadotropic peptide *Neb*-colloostatin: synthesis and structure-activity studies. *Peptides* 2013; **44**: 149-157.
- [37] KUCZER M, ROSIŃSKI G, KONOPIŃSKA D. Insect gonadotropic peptide hormones; some recent developments. *J Pept Sci* 2007; **13**: 16-26.
- [38] KUCZER M, WASIELEWSKI O, SKONIECZNA M, GRODECKI S, ROSIŃSKI G, LOMBARSKA-ŚLIWIŃSKA D, KONOPIŃSKA D. Insect oostatic and gonadotropic peptides: synthesis and new biological activities in *Tenebrio molitor* and *Zophobas atratus*. *Pesticides* 2004; **3-4**: 25-31.
- [39] LANNOT R, THIEBOLD J, COSTET-CORIO MF, BENVENISTE P, HOFFMAN JA. Further experimental evidence for the involvement of ecdysone in the control of meiotic reinitiation in oocytes of *Locusta migratoria* (Insecta, Orthoptera). *Dev Biol* 1988; **126**: 212-214.



- [40] LI S, JIANG RJ, CAO MX. Allatotrophic and allatostatic activities in extracts of brain and the effects of *Manduca sexta* allatotropin and *Manduca sexta* allatostatin on juvenile hormone synthesis *in vitro* by corpora allata from the Eri silkworm, *Samia cynthia ricini*. *Physiol Entomol* 2002; **27**: 322-329.
- [41] LI Y, HERNANDEZ-MARTINEZ S, NORIEGA FG. Inhibition of juvenile hormone biosynthesis in mosquitoes: effect of allatostatic head factors, PISCF- and YXFGL-amide-allatostatins. *Regul Pept* 2004; **118**: 175-182.
- [42] LI Y, UNNITHAN GC, VEENSTRA JA, FEYEREISEN R, NORIEGA FG. Stimulation of JH biosynthesis in the corpora allata of adult female *Aedes aegypti* *in vitro*: effect of farnesoic acid and *Aedes* allatotropin. *J Exp Biol* 2003; **206**: 1825-1832.
- [43] LUBAWY J, CZARNIEWSKA E, KUCZER M, ROSIŃSKI G. Allatostatyny – plejotropowe neurohormony owadów. *Post Biol Kom* 2013; **40**: 385-400.
- [44] MARCINIAK P, SZYMCAK M, ROSIŃSKI G. Hormony peptydowe owadów. Przegląd najważniejszych rodzin. *Post Biol Kom* 2011; **38**: 43-63.
- [45] MARTIN D, PIULACHS MD, BELLÉS X. *Allatostatin* inhibits vitellogenin release in a cockroach. *Ann N Y Acad Sci* 1998; **839**: 341-342.
- [46] MARTIN D, PIULACHS MD, BELLÉS X. Inhibition of vitellogenin production by allatostatin in the German cockroach. *Mol Cell Endocrinol* 1996; **121**: 191-196.
- [47] NACHMAN RJ, COAST GM, HOLMAN M, BEIER RC. Diuretic activity of C-terminal group analogues of the insect kinins in *Acheta domesticus*. *Peptides* 1995; **16**: 809-813.
- [48] OEH U, ANTONICEK H, NAUEN R. 2003. Myotropic effect of heliocokinins, tachykinin related peptides and *Manduca sexta* allatotropin in the gut *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae). *J Insect Physiol* 1999; **49**: 323-337.
- [49] OEH U, LORENZ MW, DYKIER H, LÖSEL P, HOFFMANN KH. Interaction between *Manduca sexta* allatotropin and *Manduca sexta* allatostatin in the fall armyworm *Spodoptera frugiperda*. *Insect Biochem Mol Biol* 2000; **30**: 729-727.
- [50] PARTHASARATHY R, PALLI SR. Molecular analysis of nutritional and hormonal regulation of female reproduction in the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. *Insect Biochem Mol Biol* 2011; **41**: 294-305.
- [51] PARTHASARATHY R, SHENG Z, SUN Z, PALLI SR. Ecdysteroid regulation of ovarian growth and oocyte maturation in the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. *Insect Biochem Mol Biol* 2010; **40**: 429-439.
- [52] PARTHASARATHY R, SHENG Z, SUN Z, PALLI SR. Ecdysteroid regulation of the ovarian growth and oocyte maturation in the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. *Insect Biochem Mol Biol* 2010b; **40**: 429-439.
- [53] PARTHASARATHY R, SUN Z, BAI H, PALLI SR. Juvenile hormone regulation of vitellogenin synthesis in the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. *Insect Biochem Mol Biol* 2010a; **40**: 405-414.
- [54] PETRYK A, WARREN JT, MARQUES G, JARCHO MP, GILBERT LI, KAHLER J, PARVY JP, LI Y, DAUPHIN-VILLEMANT C, O'CONNOR MB. Shade is the *Drosophila* P-450 enzyme that mediates the hydroxylation of ecdysone to the steroid insect molting hormone, 20-hydroxyecdysone. *Proc Natl Acad Sci US A* 2003; **100**: 13773-13778.
- [55] RACHINSKY A, FELDLAUFER MF. Responsiveness of honey bee (*Apis mellifera* L.) corpora allata to allatostatic peptides from four insect species. *J Insect Physiol* 2000; **46**: 41-46.
- [56] RACHINSKY A, TOBE SS, FELDLAUFER MF. Terminal steps in JH biosynthesis in the honey bee (*Apis mellifera* L.): developmental changes in sensitivity to JH precursor and allatotropin. *Insect Biochem Mol Biol* 2000; **30**: 729-737.
- [57] RAMASWAMY SB, SHU S, PARK YI, ZENG F. Dynamics of juvenile hormone-mediated gonadotropism in the Lepidoptera. *Arch Insect Biochem Physiol* 1997; **35**: 539-558.
- [58] READIO J, CHEN MH, MEOLA R. Juvenile hormone biosynthesis in diapausing and nondiapausing *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol* 1999; **36**: 355-360.
- [59] RIDDIFORD LM, CHERBAS PT, TRUMAN JW. Ecdysone receptors and their biological actions. *Vit Horm* 2001; **60**: 1-73.

- [60] RIDDIFORD LM. How does juvenile hormone control insect metamorphosis and reproduction? *Gen Comp Endocrinol* 2012; **179**: 477-484.
- [61] RUDOLPH P, STAY B. Cockroach allatostatin-like immunoreactivity in the central nervous system of the freshwater snails *Bulinus globosus* (Planorbidae) and *Stagnicola elodes* (Lymnaeidae). *Gen Comp Endocrinol* 1997; **106**: 241-250.
- [62] SAUNDERS DS, RICHARD DS, APPELBAUM SW, MA M, GILBERT LI. Photoperiodic diapause in *Drosophila melanogaster* involves a block to the juvenile hormone regulation of ovarian maturation. *Gen Comp Endocrinol* 1990; **79**: 174-184.
- [63] SCHAL C, HOLBROOK GL, BAHMANN JAS, SEVALA VL. Reproductive biology of the German cockroach, *Blattella germanica*: Juvenile hormone as a pleiotropic master regulator. *Arch Insect Biochem Physiol* 1997; **35**: 405-426.
- [64] SCHOOF L, HAMDADOU A, DEVRESE B, VAN BEEUMEN J, DE LOOF A. The ovary of the desert locust *Schistocerca gregaria* contain a glycine-rich peptide that displays sequence similarities with a new class of GPRP proteins from plants. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; **243**: 390-394.
- [65] SCHOOF L, VEELAERT D, VANDEN BROECK J, DE LOOF A. Review: peptides in the locusts: *Locusta migratoria* and *Schistocerca gregaria*. *Peptides* 1997; **18**: 145-156.
- [66] SCHOOF L, CLYNEN E, CERSTIAENS A, BAGGERMAN G, WEI Z, VERCAMMEN T, NACHMAN R, DE LOOF A, TANAKA S. Newly discovered functions for some myotropic neuropeptides in locusts. *Peptides* 2001; **22**: 219-227.
- [67] SCHWEDES CC, CARNEY GE. Ecdyson signaling in adult *Drosophila melanogaster*. *J Insect Physiol* 2012; **58**: 293-302.
- [68] SCHWEDES CC, TULSIANI S, CARNEY GE. Ecdysone receptor expression and activity in adult *Drosophila melanogaster*. *J Insect Physiol* 2011; **57**: 889-907.
- [69] SEVALA VL, DAVEY KG, PRESTWICH GD. Photoaffinity labeling and characterization of a juvenile hormone binding protein in the membranes of follicle cells of *Locusta migratoria*. *Insect Biochem Mol Biol* 1995; **25**: 267-273.
- [70] SEVALA VL, DAVEY KG. Action of juvenile hormone on the follicle cells of *Rhodnius prolixus*: evidence for a novel regulatory mechanism involving protein kinase C. *Experientia* 1989; **45**: 355-356.
- [71] SHENG Z, XU J, BAI H, ZHU F, PALLI SR. Juvenile hormone regulates vitellogenin gene expression through insulin-like peptide signaling pathway in the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. *J Biol Chem* 2011; **286**: 41924-41936.
- [72] SIMONET G, POELS J, CLAEYS I, VAN LOY T, FRANSENS V, DE LOOF A, VANDEN BROECK J. Neuroendocrinological and molecular aspects of insect reproduction. *J Neuroendocrinol* 2004; **16**: 649-659.
- [73] SLANINOVA J, BENNETTOVA B, NAZAROV ES, SIMEK P, HOLIK J, VLASAKOVA V, HLAVACEK J, CERNY B, TYKVA R. Activity and mechanism of action of insect oostatic peptides in flesh fly. *Bioorg Chem* 2004; **32**: 263-273.
- [74] SPITTALES K, VERHAERT P, SHAW C, JOHNSON RN, DEVRESE B, VAN BEEUMEN J, DE LOOF A. Insect Neuropeptide F (NPF)-related Peptides: Isolation from Colorado Potato Beetle (*Leptinotarsa decemlineata*). *Insect Biochem Mol Biol* 1996; **26**: 375-383.
- [75] STAY B. A review of the role of neurosecretion in the control of juvenile hormone synthesis: a tribute to Berta Scharer. *Insect Biochem Mol Biol* 2000; **30**: 653-662.
- [76] TATAR M, YIN C. Slow aging during insect reproductive diapause: why butterflies, grasshoppers and flies are like worms. *Exp Gerontol* 2001; **36**: 723-738.
- [77] TERASHIMA J, BOWNES M. A microarray analysis of genes involved in relating egg production to nutritional intake in *Drosophila melanogaster*. *Cell Death Differ* 2005; **12**: 429-440.
- [78] TERASHIMA J, BOWNES M. *E75A* and *E75B* have opposite effects on the apoptosis/development choice of the *Drosophila* egg chamber. *Cell Death Differ* 2006; **13**: 454-464.
- [79] THOMPSON MJ, SVOBODA JA, WEIRCH GF. Ecdysteroids in developing ovaries and eggs of the tobacco hornworm. *Steroids* 1984; **43**: 333-341.
- [80] TOBE SS, BENDENA WG. Allatostatins in the insects. W: Kastin AJ [red.] Handbook of biologically active peptides. Elsevier 2006: 201-206.

- [81] TOBE SS, BENDENA WG. The regulation of juvenile hormone production in arthropods. Functional and evolutionary perspectives. *Ann N Y Acad Sci* 1999; **897**: 300-310.
- [82] TRUESDELL PF, KOLADICH PM, KATAOKA H, KUNIYAKI K, SUZUKI A, MCNEIL JN, MIZOGUCHI A, TOBE SS, BADENA WG. Molecular characterization of a cDNA from the true armyworm *Pseudaletia unipuncta* encoding *Manduca sexta* allatotropin peptide. *Insect Biochem Mol Biol* 2000; **30**: 691-702.
- [83] TU M, KOU R, WANG Z, STTOFOLANO JG JR, YIN C. Immunolocalization and possible effect of a moth allatotropin-like substance in a fly, *Phormia regina* (Diptera: Calliphoridae). *J Insect Physiol* 2001; **47**: 233-244.
- [84] VANDEN BROECK J, SCHOofs I, DE LOOF A. Insect neuropeptides and their receptors. New leads for medical and agricultural applications. *TEM* 1997; **8**: 321-326.
- [85] VANDERHERCHEN MB, ISHERWOOD M, THOMPSON DM, LINDERMAN RJ, ROE RM. Toxicity of novel aromatic and aliphatic organic acid and ester analogs of trypsin modulating oostatic factor to larvae of the northern house mosquito, *Culex pipiens* complex, and the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Pestic Biochem Physiol* 2005; **81**: 71-84.
- [86] VEENSTRA JA, COSTES L. Isolation and identification of a peptide and its cDNA from the mosquito *Aedes aegypti* related to *Manduca sexta* allatotropin. *Peptides* 1999; **20**: 1145-1151.
- [87] VILAPLANA L, MAESTRO JL, PIULACHS MD, BELLÉS X. Determination of allatostatin levels in relation to the gonadotropic cycle in the female of *Blattella germanica* (L.) (Dipteroptera, Blattellidae). *Physiol Entomol* 1999; **24**: 213-219.
- [88] WASIELEWSKI O, KUCZER M, GRODECKI S, ROSIŃSKI G, KONOPIŃSKA D. Effect of insect oostatic and gonadotropic peptides on oviposition and egg hatchability of *Tenebrio molitor*. *Pestycydy/Pesticides* 2004; **3-4**: 51-56.
- [89] WASIELEWSKI O, ROSIŃSKI G. Gonadoinhibitory effects of *Neb*-colloostatin and *Neb*-TMOF on ovarian development in the mealworm, *Tenebrio molitor* L. *Arch Insect Biochem Physiol* 2007; **64**: 131-141.
- [90] WIGGLESWORTH VB. Historical perspectives. W: Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology. W: Kerkut GA, Gilbert GI [red] Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology. Oxford, New York, Pergamon Press 1985; **7**: 1-24.
- [91] WILSON TG. Genetic evidence that mutants of the *methoprene-tolerant* gene of *Drosophila melanogaster* are null mutants. *Arch Insect Biochem Physiol* 1996; **32**: 641-649.
- [92] WOODHEAD AP, STAY B., SEIDEL SL, KHAN MA, TOBE SS. Primary structure of four allatostatins: neuropeptides inhibitors of juvenile hormone biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; **86**: 5997-6001.
- [93] ZHOU X, COLL M, APPELBAUM SW. Effect of temperature and photoperiod on juvenile hormone biosynthesis and sexual maturation in the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera*: implications for life history traits. *Insect Biochem Mol Biol* 2000; **30**: 863-868.
- [94] ZHU W, VANDINGENEN A, HUYBRECHTS R, VERCAMMEN T, BAGGERMANN G, DE LOOF A, POULOS CP, VALENTZA A, BREUER M. *In vitro* degradation of the *Neb*-Trypsin Modulating Oostatic Factor (*Neb*-TMOF) in gut luminal content and hemolymph of the grey fleshfly, *Neobellieria bulata*. *Insect Biochem Mol Biol* 2001; **31**: 87-95.

Redaktor prowadzący – Barbara Płytycz

Otrzymano: 03.06.2013

Przyjęto: 15.06.2013

Elżbieta Czarniewska

Zakład Fizjologii i Biologii Rozwoju Zwierząt

Wydział Biologii UAM

ul. Umultowska 89

61-614 Poznań

tel.: 618295922

email: czarniew@amu.edu.pl

