

PEPTYDOMIMETYKI – NOWA KLASA BIOINSEKTYCYDÓW

PEPTIDOMIMETICS – A NEW CLASS OF BIOINSECTICIDES

Karolina WALKOWIAK, Marta SPOCHACZ, Grzegorz ROSIŃSKI

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

Streszczenie: W walce ze szkodliwymi owadami najczęściej stosowane są syntetyczne insektycydy. Klasyczne insektycydy wykazują jednak niską selektywność działania nie tylko w stosunku do szkodliwych owadów, ale także oddziałują toksycznie na gatunki neutralne lub pożyteczne dla działalności człowieka. Dlatego ostatnio prowadzone są intensywne badania nad opracowaniem nowej klasy bioinsektycydów, stanowiących alternatywę dla stosowanych syntetycznych insektycydów. Takimi związkami mogą być peptydomimetyki, odpowiednio zmodyfikowane chemicznie analogi neuropeptydów i hormonów peptydowych, charakteryzujące się zwiększoną odpornością na działanie enzymów proteolitycznych i/lub zdolnościami do przenikania przez kutikulę owada. Dotychczas zsyntetyzowano szereg mimetyków, będących agonistami lub antagonistami neuropeptydów z grupy allatostatyn, kinin, pirokinin, sulfakinin, tachykinin, miosupresyn oraz hormonów gonadotropowych, wykazujących aktywność fizjologiczną w różnych biotestach *in vivo* lub *in vitro*. Uzyskano stabilne mimetyki o aktywności allatotropowej, miotropowej, diuretycznej, feromonotropowej oraz gonadotropowej, oddziałujące po aplikacji topikalnej lub podaniu owadom *per os*. Wykazywanie przez szereg mimetyków wysokiej selektywności gatunkowej i specyfiki narządowej działania oraz aktywności fizjologicznej w zakresie stężeń nano- mikromolowych, wskazuje na realne możliwości zastosowania tych związków, jako skutecznych bioinsektycydów. W pracy przedstawiono aktualny stan wiedzy na temat struktury chemicznej i aktywności fizjologicznej mimetyków z kilku grup neuropeptydów i hormonów peptydowych owadów.

Słowa kluczowe: owady, neuropeptydy, hormony peptydowe, peptydomimetyki, bioinsektycydy, aktywność fizjologiczna

Summary: In the fight against insect pests, synthetic insecticides are most commonly used. However, classic insecticides present low level of action selectivity – they affect not only the insect pests but also insect species neutral or beneficial for human activity. Therefore, intensive researches on development of new bioinsecticides class as alternative for synthetic insecticides are recently conducted. Nowadays,

peptidomimetics are distinguish as promising group of the new bioinsecticides. These analogues of respectively chemically modified neuropeptides or peptide hormones are most resistant to proteolytic degradation and possess increased ability to penetrate through cuticle. Up to now, a series of mimetics displaying agonistic or antagonistic properties for the neuropeptides from groups like allatostatins, kinins, pyrokinins, sulfakinins, tachykinins, myosuppressins and gonadotropic hormones were synthesized. The obtained stable mimetics affect after topical or *per os* application presenting allatotropic, myotropic, diuretic, pheromonotropic or gonadotropic activity. Through high species- and organ-specific mode of action and nano-micromole concentrations required to induce physiological response, mimetics can be used as efficient bioinsecticides. In this paper, the current state of knowledge about chemical structure and physiological activity of mimetics belonging to several insects neuropeptides and peptide hormone groups is presented.

Key words: insects, neuropeptides, peptide hormones, peptidomimetics, bioinsecticides, physiological activity

WSTĘP

Owady stanowią najliczniejszą grupę zwierząt na Ziemi i są znakomicie przystosowane do panujących warunków środowiska. Szereg gatunków odgrywa pożyteczną rolę w gospodarce człowieka, jak owady zapylające, czy gatunki wykorzystywane w przemyśle jedwabniczym. Jednak wiele gatunków owadów z różnych rzędów wykazuje szkodliwe działanie w odniesieniu do człowieka. Mogą być wektorami patogenów poważnych chorób (np. pluskwiak *Rhodnius prolixus* przenosi świdrowca *Trypanosoma cruzi* wywołującego chorobę Chagasa), a także powodować ogromne szkody w leśnictwie (chrząszcz *Hylobius abietis* w lasach iglastych), rolnictwie (motyl *Ostrinia nubilalis*), ogrodnictwie (kilka gatunków mszyc) oraz magazynach zbożowych (chrząszcz *Tribolium castaneum*) [2, 61, 62].

Obecnie najczęściej stosowanym sposobem zwalczania szkodliwych owadów są opryski syntetycznymi insektycydami, oddziałującymi w systemie nerwowym na receptory cholinergiczne nikotynowe, kanały sodowe bramkowane napięciem, receptory kwasu gamma-aminomasłowego, receptory glutaminianowe (NMDA) lub aktywność acetylocholinesterazy [2, 18, 58]. Jednak ponad 500 gatunków szkodliwych owadów wytworzyło zwiększoną odporność na stosowane dotychczas insektycydy, z których wiele jest trudno biodegradowalnych i przedostając się na różne poziomy troficzne ekosystemu może się akumulować w tkankach innych organizmów. Poza tym szereg danych z ostatnich lat wskazuje, że walka ze szkodliwymi owadami odpornymi na stosowane insektycydy generuje coraz większe koszty. Przykładowo, tylko na zwalczanie larw komarów corocznie wydatkowanych jest około 2 miliardów dolarów, nie licząc już ogromnych kosztów związanych z leczeniem ludzi [9, 23, 90]. Poznanie szeregu negatywnych skutków działania syntetycznych pestycydów stymulowało badaczy do opracowywania alternatyw-

nych metod kontroli szkodników owadzych i poszukiwania nowych, bardziej bezpiecznych związków, oddziałujących na określone procesy fizjologiczne oraz struktury komórkowe i molekularne [4, 9, 33, 55, 86, 90].

Grupą takich związków, tworzących nową klasę bioinsektycydów, mogą być peptydomimetyki, odpowiednio zmodyfikowane chemicznie analogi syntetyzowane na bazie neuropeptydów i hormonów peptydowych, wykazujące gatunkowo specyficzne i narządowo selektywne, ukierunkowane działanie fizjologiczne w konkretnym stadium rozwojowym owada. W dotychczasowych badaniach otrzymano już szereg obiecujących wyników pokazujących różnego rodzaju zaburzenia procesów fizjologicznych powodowane przez peptydomimetyki u niektórych gatunków mszyc, komarów, much [48, 78], karaczanów [32, 48, 65], chrząszczy [93], szarańczy [81] oraz ciem [16, 75, 95].

NEUROPEPTYDY I HORMONY PEPTYDOWE OWADÓW

W 1917 roku polski fizjolog Stefan Kopeć zaproponował hipotezę o istnieniu substancji wydzielanych przez mózg, które kontrolują proces metamorfozy owadów [35]. Obecność komórek zaangażowanych w produkcję i wydzielanie substancji neurosekrecyjnych u owadów wykryto jednak dwie dekady później [71], a dopiero wyizolowanie przez Starratta i Browna [80] w 1975 roku pierwszego neuropeptydu owadziego – proktoliny, zapoczątkowało rozwój badań neuroendokrynowych u tych zwierząt. W kolejnych latach zidentyfikowano szereg neuropeptydów i obecnie wiadomo, że stanowią one najliczniejszą grupę związków zaangażowanych w regulację większości procesów fizjologicznych owadów [21, 24, 38, 56, 72, 96]. Aktualnie w bazach NCBI (ang. *National Center for Biotechnology Information*) znajdują się sekwencje aminokwasowe ponad 400 neuropeptydów, które mogą pełnić rolę klasycznych hormonów, neurotransmiterów lub neuromodulatorów.

Neurohormony peptydowe w większości produkowane są przez mózg i połączony z nim kompleks gruczołów neurohemalnych *corpora cardiaca/corpora allata* (CC/CA), komórki zwoju podprzetykowego, frontalnego oraz zwojów brzuszego łańcuszka nerwowego. Poza strukturami neurosekrecyjnymi hormony peptydowe produkowane są także przez gruczoły epitachealne, komórki endokrynowe jelita i narządów rozrodczych [24, 39, 56].

Wśród dużej liczby zidentyfikowanych neuropeptydów owadów wyróżniono szereg grup hormonów wykazujących zróżnicowanie pod względem struktury i pełnionych funkcji. Najliczniej reprezentowane są neuropeptydy z rodziny hormonów adypokinetycznych/koncentrujących czerwony barwnik (AKH/RPCH), pirokinin, tachykinin, miosupresyn, sulfakinin, allatostatyn, pochodnych FMRFamidu, periwiscerokinin oraz peptydów pokrewnych do CAP_{2b} [8, 24, 36, 37, 57, 63, 64, 67,

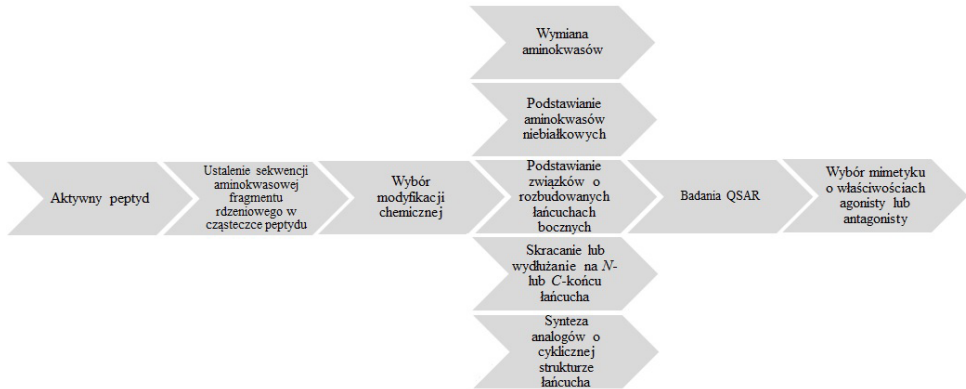
74]. Duża liczba zidentyfikowanych neuropeptydów i hormonów peptydowych, poznanie szeregu regulowanych przez nie procesów fizjologicznych oraz specyfiki gatunkowej i narządowej ich działania stanowią solidną podstawę wiedzy do podjęcia dalszych badań w kierunku możliwości praktycznego wykorzystania tych związków, zwłaszcza do walki ze szkodliwymi owadami.

CHARAKTERYSTYKA OGÓLNA PEPTYDOMIMETYKÓW I MIEJSC DOCELOWYCH ICH DZIAŁANIA

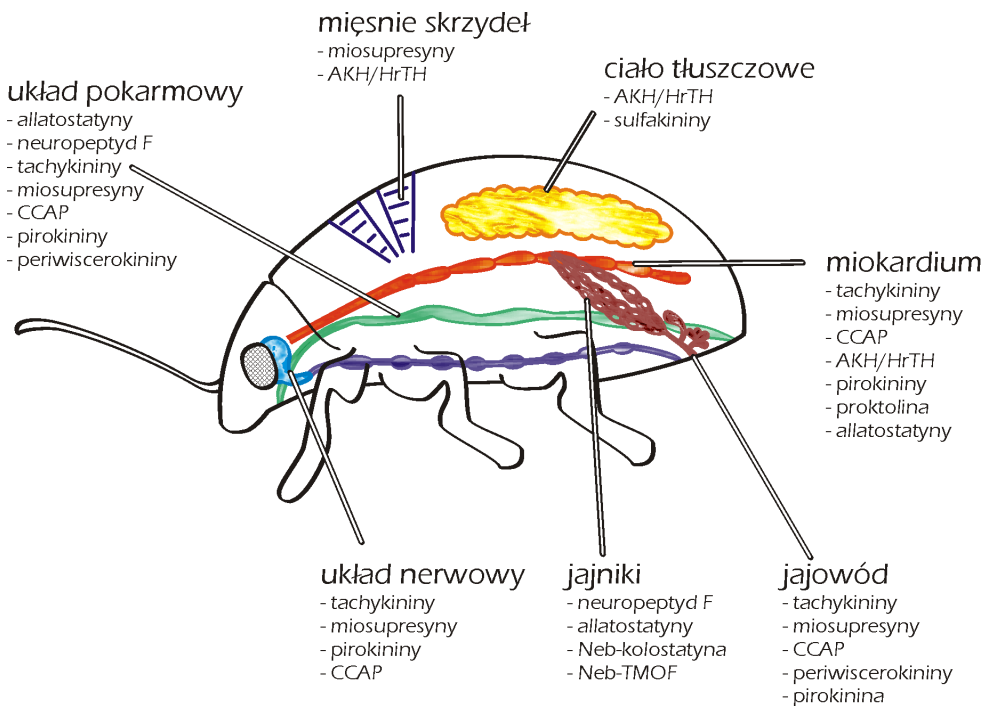
Ponieważ neuropeptydy i hormony peptydowe owadów w naturalnej formie są niestabilne pod względem fizyko-chemicznym i większość z ligandów peptydowych wykazuje słabe właściwości farmakokinetyczne, nie mogą one być bezpośrednio stosowane w naturalnym środowisku, jako środki do zwalczania szkodliwych owadów. Jednak z uwagi na dużą liczbę odkrytych różnych grup peptydów oraz ważne i liczne pełnione przez nie funkcje fizjologiczne, podjęto badania w kierunku praktycznego wykorzystania tych związków. Jedną z możliwych strategii wykorzystania neuropeptydów i hormonów peptydowych, jako bioinsektycydów, oparta jest na racjonalnym projektowaniu peptydomimetów, które charakteryzowałyby się zwiększoną odpornością na działanie proteaz, wysokimi zdolnościami do przenikania przez bariery układowe (jelito – hemolimfa, kutikula – hemolimfa oraz hemolimfa – centralny system nerwowy) i wykazywałyby gatunkowo specyficzne i narządowo selektywne działanie [53-55, 72, 79, 91]. Poza tym syntetyzowane peptydomimetyki powinny przy aplikacji pokarmowej lub topikalnej zachowywać własności silnego agonisty lub antogonisty natywnego peptydu.

Podczas opracowywania peptydomimetyku w pierwszym etapie określana jest sekwencja rdzeniowa w strukturze natywnego peptydu, która warunkuje aktywność biologiczną i jest odpowiedzialna za interakcję z receptorem (ryc. 1). W następnych etapach przeprowadzane są różnego typu modyfikacje chemiczne w strukturze aminokwasowej fragmentu rdzeniowego, które zwiększają stabilność otrzymywanych analogów. Wykonywane są także analizy współzależności struktura – aktywność biologiczna (ang. *Quantitative Structure Activity Relationship*, QSAR), celem wyboru analogów o równej lub większej aktywności jako agonistów lub antagonistów w stosunku do peptydu natywnego. Uzyskane mimetyki o funkcji agonistów mogą stymulować dany proces fizjologiczny w większym stopniu niż peptyd natywny, natomiast te o funkcji antagonistów mogą działać odwrotnie [55, 72].

Układami docelowymi dla działania peptydomimetyków może być system neuro-endokrynowy, pokarmowy, wydalniczy, rozrodczy, a także serce, ciało tłuszczowe, cewki Malpighiego, czy mięśnie skrzydeł [5, 6, 20, 24, 26, 52]. Funkcjonowanie tych układów i narządów u owadów regulowane jest przez różne neuropeptydy



RYCINA 1. Procedura postępowania w racjonalnym projektowaniu i syntezie peptydomimetyków
FIGURE 1. Procedure in the rational design and synthesis of peptidomimetics



RYCINA 2. Schemat kompleksowej kontroli narządów i tkanek owadów przez neuropeptydy i hormony peptydowe

FIGURE 2. Scheme of complex control of organs and tissues in insects by neuropeptides and peptide hormones

i hormony peptydowe (ryc. 2). Dostępna aktualnie obszerna wiedza na temat regulacji procesów fizjologicznych u owadów przez neuropeptydy i hormony peptydowe pozwala nam już na bardziej precyzyjne projektowanie mimetyków o dużej selektywności działania tkankowego. Jednym z ważnych miejsc dla działania peptydomimetyków o aktywności neurotropowej może być układ retrocerebralny – kompleks *corpora cardiaca/corpora allata* (CC/CA). Gruczoły CC są miejscem syntezy i uwalniania neurohormonów o działaniu adypokinetycznym/hipertrehalozemicznym, miotropowym, aktywności kardiotropowej, czy właściwościach stymulujących czynności gruczołu prorakalnego – produkującego ekdyzon, który reguluje proces linienia owadów [24, 39, 56]. Natomiast mimetyki o funkcji allatotropowej, oddziałując na gruczoły *corpora allata* (CA) mogą regulować syntezę i uwalnianie hormonu juwenilnego (JH), odpowiedzialnego za rozwój, metamorfozę i procesy rozrodcze owadów [6]. Dzięki szerszemu poznaniu specyfiki oddziaływania miotropowego niektórych kinin, pirokinin, sulfakinin i miosupresyn opracowano dla tych grup neuropeptydów peptydomimetyki zaburzające m.in. czynność przewodu pokarmowego, cewek Malpighiego, serca i jajnika. Inną ważną grupą hormonów peptydowych o potencjalnych możliwościach aplikacyjnych jako peptydomimetyki, są hormony gonadotropowe, jak Aedae-TMOF lub Neobu-TMOF, kontrolujące procesy związane ze wzrostem i rozwojem oocytu oraz funkcje nabłonka folikularnego w jajniku [14, 17].

PEPTYDOMIMETYKI ALLATOSTATYN

Jedną z grup neurohormonów, dla których syntetyzowano aktywne mimetyki są allatostatyny. Dotychczas opisano 3 grupy neurohormonów należących do rodziny allatostatyn, określane skrótowo, jako FGLa/AST, PISCF/AST i MIP/AST [6, 37]. Zasadnicza funkcja allatostatyn polega na inhibicji syntezy i uwalniania hormonu juwenilnego z gruczołów neurosekrecyjnych CA. Ostatnie badania wskazują jednak, że neuropeptydy te posiadają plejotropową aktywność [24, 37, 56]. Stwierdzono, że szereg z tych peptydów wykazuje działanie mioinhibicyjne w stosunku do mięśni jelita przedniego, jajowodu i serca oraz wpływa hamująco na syntezę witelogenin w ciele tłuszczowym [5, 31, 32, 40]. Xie i wsp. [91] badając analogi allatostatyny Dippu-AST-1 (LYDFGLa) z grupy FGLa wykazali, że pentapeptydowy fragment YDFGLa z C-końca tego peptydu stanowi sekwencję rdzeniową decydującą o inhibicji syntezy i uwalniania hormonu juwenilnego z CA karaczana *Diploptera punctata*. Podstawienie w regionie YDF pentapeptydu różnych aromatycznych aminokwasów, kwasów tłuszczowych oraz kwasów dikarboksyłowych pozwoliło uzyskać analogi o wyższej aktywności allatoinhibicyjnej niż peptyd natywny. Według tych autorów silny mimetyk allatostatyn z grupy FGLa powi-

nien zawierać grupę aromatyczną, odpowiedniej długości łącznik oraz fragment FGLa. Funkcję łącznika może pełnić kwas bursztynowy podstawiony w miejscu glicyny [91]. Mimetyki allatostatyn posiadające takie modyfikacje strukturalne są odporne na działanie enzymów proteolitycznych z przewodu pokarmowego i wykazują zwiększone zdolności do przenika przez kutikulę. Poza tym wprowadzenie modyfikacji w sekwencji rdzeniowej przez podstawienie reszty cyklopropyloalaniny (Cpa) zamiast Gly i kwasu karboksylowego aminoindanu zamiast Phe zapewniały stabilność szkieletu rdzeniowego allatostatyn z grupy FGLa [91]. Mimetyki o aktywności allatoinhibicyjnej otrzymano także po podstawieniu Cpa zamiast Gly oraz wprowadzeniu ugrupowania hydrocynamyloвого na *N*-końcu sekwencji rdzeniowej [25, 49]. Jeszcze inny rodzaj modyfikacji, pozwalającej uzyskać analogi odporne na działanie proteaz, zastosowali Matthews i wsp. [40] podczas opracowywania mimetyków allatostatyn z grupy PISCF, podstawiając w cząsteczce bioanalogu Manse-AS (pEVRFRQCYFNPISCF) od ćmy *Manduca sexta* zamiast L-argininy w 3 i 5 pozycji jej izomer D. Analog ten w układzie biotestu heterologicznego podany drogą pokarmową larwom mszyc *Acyrtosiphon pisum* i *Myzus persicae* w ilości 0.35 µg/µl syntetycznej diety powodował zahamowanie rozwoju i przyrostu masy ciała larw oraz zwiększał ich śmiertelność po 6 dniach do 76%, a u dorosłych osobników zaburzał proces rozrodczy.

MIMETYKI KININ

Pierwsze w pełni scharakteryzowane kininy owadów izolowano z ekstraktyw z głowy karaczana *Leucophaea maderae* i nazwano je leukokininami. Dalsze neuropeptydy należące do rodziny kinin zidentyfikowano następnie u świerszcza *Acheta domesticus* [29], szarańczy *Locusta migratoria* [73], komarów *Culex salinarius* [28], *Aedes aegypti* [87], *Anopheles gambiae* [68], ćmy *Heliothis zea* [7], karaczana *Periplaneta americana* [66], much *Musca domestica* i *Drosophila melanogaster* [30, 84] oraz u wielu innych owadów, wykorzystując głównie technikę HPLC i biotest oparty na pomiarach kurczliwości jelita tylnego. Wszystkie kininy posiadają C-terminalny pentapeptyd FX1X2WG-amid. Kininy owadów są peptydami plejotropowymi, pełniącymi szeroki zakres funkcji. *In vivo* stymulują wydalanie wody przez cewki Malpighiego [19], redukują przyrost masy ciała i powodują zwiększoną śmiertelność larw [75], zwiększają wielkość pobieranego pokarmu przy równoczesnym zmniejszeniu częstości tego pobierania [1], a w warunkach *ex vivo* zmniejszają wydzielanie proteaz i amylaz w jelicie środkowym [27]. Peptydy te zaangażowane są w kontrolę wielu procesów fizjologicznych, i których zakłócenie może powodować poważne skutki dla szkodliwych owadów. Roberts i wsp. [69] wykazali, że fragment aminokwasowy FX1X2W tworzy β-zgięcie i wraz z C-koń-

cowym amidem stanowią aktywny rdzeń odpowiedzialny za interakcję z receptorem. Zastąpienie drugiej reszty aminokwasowej X2 w C-końcowym rdzeniu sterycznie ograniczającym podstawnikiem, jak kwas α -amino-izomasłowy (Aib), pozwala zachować lub zwiększyć aktywność biologiczną analogu. Taka modyfikacja zwiększa również odporność analogu na hydrolizę przez endopeptydazy [46, 47]. Usunięcie N-końcowej reszty Asn w natywnym peptydzie Musdo-K (NTVVLGK-KQRFHSWGa) muchy *M. domestica* nie zmienia skuteczności działania diuretycznego i miotropowego tej kininy, ale gdy usunięto resztę Thr2 obserwowano znaczny spadek aktywności analogu, co wskazywało na znaczenie tej reszty aminokwasowej dla pełnej aktywności biologicznej [20]. Ponadto stwierdzono, że analogi kinin zawierające Aib oraz dwie reszty piroglutaminianu są bardziej odporne na hydrolizę w hemolimfie owadów, silniej hamują przyrost masy ciała i wykazują większą aktywność diuretyczną [50]. Zastąpienie istotnych aminokwasów w aktywnej sekwencji rdzeniowej kinin owadów ich odpowiednikami β -aminokwasów pozwala zachować aktywność biologiczną i zwiększa odporność na działanie endopeptydaz [97]. Analogi kinin odporne na peptydazy powodowały zmniejszenie absorpcji płynu podczas podawania mszycom *Acyrtosiphon pisum* płynnej diety i takie działanie antyfidantne skutkowało znacznym zwiększeniem śmiertelności mszyc [79]. Badania te wykazały, że biostabilne analogi kinin w przyszłości mogą stanowić grupę użytecznych peptydomimetyków do zwalczania szkodników. Oczywiście, wymagane są szersze badania tych związków przed ich ewentualną komercjalizacją w charakterze środków ochrony przed szkodliwymi owadami.

MIMETYKI SULFAKININ

Pierwsze sulfakininy odkryto u karaczana *L. maderae* i nazwano je sulfakininą-1 i sulfakininą-2 [41]. Większość sulfakinin owadów posiada C-terminalny heptapeptyd Y(SO₃H)GHMRFa, który jest ważny dla biologicznej aktywności i wiązania się z receptorem [74]. Sulfakininy funkcjonują przede wszystkim, jako inhibitory pobierania pokarmu, a także modulują kurczliwość mięśni trzewnych i regulują uwalnianie enzymów trawiennych w jelicie [22, 27, 39, 41, 59, 60].

Nieliczne jeszcze badania współzależności struktura – aktywność przeprowadzone z serią analogów sulfakininy Drome-SK-1 [FDDY(SO₃H)GHMRFa] od *D. melanogaster* wykazały w heterologicznym układzie biotestu z dorosłym chrząszczem *T. castaneum*, że zarówno sulfonylowana i niesulfonylowana forma tego peptydu hamowały w 70% pobieranie pokarmu [93]. Stwierdzono także silne działanie analogów wyposażonych w reszty, które naśladowały kwasowy charakter Tyr(SO₃H), lecz nie posiadały fenylowego pierścienia Tyr, co wskazywało, że aromatyczność nie jest cechą krytyczną dla tej pozycji aminokwasowej w cząsteczce peptydu.

Wykryto poza tym znaczną tolerancję podstawienia Ser i Ala zamiast zasadowej Arg w 8 pozycji, a także zamianę Phe w 1 pozycji na Ser, ponieważ tak zmodyfikowane analogi zachowywały pełną aktywność hamującą pobieranie pokarmu u tego chrząszcza [93].

MIMETYKI PIROKININ/PBAN

Neuropeptydy z rodziny pirokinin/neuropeptydów stymulujących biosyntezę feromonów (ang. *Pheromone Biosynthesis Activating Neuropeptides*, PBAN) pełnią wielofunkcyjną rolę w fizjologii owadów. Od czasu odkrycia w 1986 roku pierwszego neuropeptydu z tej rodziny Leuma-PK-1 (pQTSFTPRLA) u karaczana *L. maderae* zidentyfikowano już ponad 100 peptydów z tej grupy [67]. Peptydy te posiadają na C-końcu łańcucha aminokwasowego konserwatywną sekwencję Phe-X-Pro-Arg-Leu-NH₂, gdzie w pozycji X może znajdować się seryna, treonina, glicyna lub walina [43, 67]. Pirokininy są neurohormonami o szerokim spektrum bioaktywności fizjologicznej, modulują kurczliwość mięśni narządów trzewnych, kontrolują biosyntezę neuropeptydów PBAN, regulujących syntezę feromonów, wpływają na procesy melanizacji i zabarwienia kutikuli oraz biorą udział w indukcji diapauzy [3, 67, 95]. Dotychczasowe badania dowodzą, że peptydy te nie wykazują specyfiki gatunkowej działania, wszystkie wymienione powyżej funkcje mogą być stymulowane przez więcej niż jeden peptyd [67], a C-końcowy pentapeptyd, wspólny dla pirokinin, zachowuje aktywność w każdej z tych odrębnych funkcji. Ponieważ pirokininy są hydrolizowane przez peptydazy tkankowe w najbardziej wrażliwym miejscu aktywnego fragmentu rdzeniowego pomiędzy proliną i argininą [50] zastosowano dwie procedury modyfikacji chemicznej zwiększające biostabilność tego fragmentu. W jednej z nich wprowadzono przestrzenne rozbudowane reszty w miejsca przylegające do podatnego na hydrolizę wiązania peptydowego. Innym sposobem było wprowadzenie biostabilnego, izosterycznego motywu zastępującego wrażliwe na hydrolizę wiązanie peptydowe [52, 54, 55]. Ostatnio opracowano również nową zintegrowaną metodę nazwaną **antagonistą opartym na szkielecie cyklicznego neuropeptydu** (BBB-NBA), w której racjonalnie są syntetyzowane biblioteki konformacyjne cyklicznych neuropeptydów w oparciu o szczegółowe badania QSAR natywnych pirokinin. Metoda cyklizacji szkieletu peptydowego zaowocowała odkryciem konformacyjnie stabilnych, bardzo silnych, metabolicznie stabilnych, biodostępnych i niedrogich selektywnych i nieselektywnych peptydomimetyków o funkcji agonistów lub antagonistów, aktywnych w ilościach nanomolowych [4, 76]. Stosując różne modyfikacje strukturalne syntetyzowano szereg mimetyków o funkcji agonistów i antagonistów natywnych bioanalogów z grupy pirokinin/PBAN.

Wydłużenie *N*-końcowego fragmentu rdzeniowego pentapeptydu (FSPRLa) w 24 aa cząsteczce Helze-PBAN od ćmy *Heliiothis zea* do heksapeptydu (YFSPRLa) lub też zamiana w tym fragmencie reszty L-tyrozyny bądź L-argininy na izomer D dawały w rezultacie hiperaktywne analogi o zwiększonym działaniu miostymulującym i feromonotropowym [94]. Podobnie podstawienie reszty fenyloalaniny w tej aktywnej sekwencji rdzeniowej kwasem hydrocynamonowym (Hca-Thr-Pro-Arg-Leu-NH₂), albo wprowadzenie kwasu 1-pirenomasłowego (Pba-Phe-Thr-Pro-Arg-Leu-NH₂) lub 9-fluorooctowego (Fla-Phe-Thr-Pro-Arg-Leu-NH₂) zwiększało aktywność feromonotropową takich mimetyków. Wprowadzenie do cząsteczki rdzeniowej kwasów tłuszczowych czy kwasów cholowych, jako dodatkowych podstawników, zwiększało zdolność mimetyków do przenikania przez kutikulę [83]. Tak samo wprowadzenie grupy karbonylowej w miejsce fenyloalaniny w fragmencie rdzeniowym pozwoliło uzyskać superagonistów o aktywności miotropowej i feromonotropowej działających po aplikacji topikanej [45]. Natomiast funkcjonalne mimetyki o zwiększonych właściwościach amfifilnych, działające po aplikacji tropikalnej aż do 24 godzin, otrzymano po umieszczeniu we fragmencie rdzeniowym dodatkowych grup fenylowych lub kwasów tłuszczowych [83].

MIMETYKI TACHYKININ

Tachykininy stanowią dużą i zróżnicowaną pod względem strukturalnym rodzinę neuropeptydów występujących zarówno u kręgowców i bezkręgowców. Wśród tachykinino-podobnych peptydów owadów wyróżniono grupę peptydów posiadających *C*-końcową sekwencję FXGLM-amidu oraz peptydy z *C*-końcem GFX1GX2R-amidu [57]. Peptydy te wykazują działanie plejotropowe, regulują kurczliwość mięśni narządów trzewnych, wpływają na proces diurezy oraz kontrolują uwalnianie hormonów adypokinetycznych z CC owadów [56]. Jedną ze strategii pozwalającą uzyskać biostabilne mimetyki tachykininy było zastosowanie modyfikacji chemicznej polegającej na wprowadzeniu pojedynczych lub wielokrotnych podstawień aminokwasów w łańcuchu kwasem α -amino-izomasłowym (Aib). Przeprowadzone biotesty z tachykininą Leuma-TRP-1 (Ala-Pro-Ser-Gly-Phe-Leu-Gly-Val-Arg-NH₂) od karaczana *L. maderae* wykazały, że podstawienie tylko jednej reszty glicyny w sekwencji rdzeniowej *C*-końcowego heksapeptydu daje analog (Ala-Pro-Ser-Gly-Phe-Leu-Aib-Val-Arg-NH₂), który jest odporny na hydrolizę przez dwie związane z błoną komórkową endopeptydazy, enzym konwertujący angiotensynę (ANCE) i neprylizynę (NEP) od *D. melanogaster* [48]. Analog ten, jak i dwa inne z wielokrotnymi podstawieniami (pEA[Aib]SGFL[Aib]VR-NH₂; EA[Aib]S[Aib]FL[Aib]VR-NH₂) podane drogą pokarmową wywoływały efekt antyfidantny u larw mszycy *Acyrtosiphon pisum*. Najbardziej aktywnym był analog z podwójnym podstawieniem Aib, który podany w ilości 0.0087 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ płynnej diety powodował już po półtora dnia

śmiertelność 50% larw i dorównywał aktywnością lub przewyższał siłę działania dostępnych komercyjnie aficydów pymetrozyny, flonikamidu i pyriproksyfeny. Te trzy aktywne i biostabilne mimetyki Leuma-TRP-1 pojedynczo lub w kombinacji z analogami innych klas neuropeptydów, które także regulują diurezę, trawienie, reprodukcję i/lub procesy rozwojowe, mogą stanowić potencjalnych liderów w rozwoju selektywnych, środowiskowo przyjaznych biopestycydów dla zwalczania mszyc.

MIMETYKI MIOSUPRESYN

Neuropeptydy z rodziny miosupresyn (bioanalogi FLRFamidu) izolowano z karaczanów, szarańczaków, chrząszczy, much i ciem [39]. Ta grupa neuropeptydów charakteryzuje się sekwencją X1-Asp-Val-X2-His-X3-Phe-Leu-Arg-Phe-NH₂, gdzie w pozycji X1 znajdować się może Pro, Thr lub Ala, w X2-Asp, Gly lub Val, a w X3-Val lub Ser [64]. Miosupresyny są silnymi inhibitorami skurczów mięśni narządów trzewnych, a ich C-terminalny heptapeptyd Asp-His-Val-Phe-Leu-Arg-Phe-NH₂ stanowi najmniejszy fragment zachowujący mioinhibitorowe własności natywnego peptydu. Mimo wywoływania odmiennej odpowiedzi w aktywności kurczliwej mięśni, miosupresyny posiadają resztę Asp, Arg i Phe w tych samych pozycjach w łańcuchu aminokwasowym jak sulfakininy [42]. Dotychczas jeszcze w małym stopniu poznano działanie fizjologiczne peptydomimetyków miosupresyn. W badaniach *in vitro* stwierdzono, że niepeptydowe mimetyki dla C-terminalnego heptapeptydu mające podstawiony chlorek benzetonioowy zamiast reszty Asp zachowują mioinhibicyjne własności w stosunku do jelita tylnego karaczana *L. maderae* [44] oraz jajowodu szarańczy *L. migratoria* [72]. Natomiast skrócony pseudoheksapeptyd His-Val-Phe-Cpa-Arg-Phe-NH₂, zawierający cyklopropyloalaninę (Cpa) zamiast leucyny oraz pseudotetrapeptyd Phe-Cpm-Arg-Phe-NH₂ z podstawioną cyklopropylometioniną (Cpm), kompletnie antagonizowały w stężeniu mikromolowym mioinhibicyjne działanie 100 nM HVFLRFamidu na jajowodzie szarańczy wędrowniej. Starratt i wsp. [81] stwierdzili natomiast, że zastąpienie histydyny w heksapeptydzie D-histydyną lub innymi aromatycznymi czy alifatycznymi aminokwasami daje mimetyki o aktywności stymulującej endogenne skurcze jajowodu szarańczy.

MIMETYKI PEPTYDÓW MODULUJĄCYCH BIOSYNTEZĘ TRYPSYNY

Większość samic komarów i kilku innych gatunków nieautogenicznych muchówek wymaga posiłku z krwi, jako źródła białka dla rozwoju i dojrzewania jaj [34]. Niezbędne do trawienia tego pokarmu w jelicie są aktywne proteazy, szczególnie

trypsyna, której synteza i uwalnianie po pobraniu krwi u nieautogenicznych owadów jest ściśle regulowana hormonalnie [14]. Peptydem oddziałującym na te procesy jest TMOF (ang. *Trypsin Modulating Oostatic Factor*), deka-peptyd (YDPAPPPPPP) bogaty w prolinę, który wyizolowano z jajników komara *Aedes aegypti*. Iniekcje tego peptydu powodują zahamowanie aktywności proteazy i dojrzewania jaj u kilku gatunków owadów [10, 89, 92]. Z jajników muchy *Neobellieria bullata* izolowano również oostatyczny heksapeptyd (NPTNLH) i nazwano go Neobu-TMOF, pomimo małego podobieństwa strukturalnego do Aedae-TMOF [17]. Badania ze znakowanym radioaktywnie Aedae-TMOF wykazały w nabłonku jelita środkowego *A. aegypti* obecność miejsc o wysokim powinowactwie do wiązania tego peptydu, których liczba zwiększa się po posiłku krwi [11]. Podanie komarom pokarmu z krwi wzbogaconej Aedae-TMOF hamuje rozwój jaj i biosyntezę trypsyny [12]. Podobnie karmienie larw zaadsorbowanym na cząsteczkach drożdży Aedae-TMOF powodowało zahamowanie w 90% biosyntezy trypsyny, co skutkowało deficytem aminokwasów i powstaniem skrajnych defektów we wzroście larw: larwy karmione dużą dawką tego peptydu nie rozwijały się poza pierwsze stadium i padały w ciągu 3-6 dni, a te karmione niską dawką nie rozwijały się poza trzecie stadium i padały po 8-10 dniach [15]. Karmienie larw komara różnymi analogami TMOF wykazało, że pełną aktywność biologiczną można już uzyskać z *N*-końcowym tetrapeptydem YDPA [15]. Podobne badania u muchy *N. bullata* ujawniły, że tetrapeptyd YDPA i pentapeptyd YDPAP wywierały najbardziej negatywny wpływ na oogenezę. W przeciwieństwie do występującego fenotypu zmian u komara, u którego oogeneza jest zaburzona brakiem aminokwasów w rezultacie niedoboru trypsyny, u muchy *N. bullata* ma miejsce bezpośrednie oddziaływanie tych peptydów na jajniki, polegające na stymulacji masowej proliferacji komórek folikularnych otaczających oocyty, która utrudnia wzrost oocytu i komórek odżywczych i powoduje w końcu resorbcję jaj [78]. Karmienie Aedae-TMOF różnych gatunków komarów wykazało różnice we wrażliwości na ten peptyd. Transport tego peptydu przez tkankę jelita może być zmieniony w sposób specyficzny dla gatunku i możliwe jest, że inne gatunki produkują swoje własne, specyficzne peptydy oostatyczne, które są bardziej aktywne niż Aedae-TMOF [15]. U chrząszcza *Tenebrio molitor* iniekcja drugiego peptydu, Neobu-TMOF wywoływała również spadek stężenia białek jajnika, hamowała rozwój oocytów oraz zmniejszała ilość składanych przez samice jaj [89]. Ponieważ stabilność Aedae-TMOF w hemolimfie może budzić obawy podczas dokonywania oceny jego działania jako bioinsektycydu, ważne jest opracowanie chemicznych analogów, które nie tylko przypominałyby trójwymiarową strukturę TMOF, ale byłyby także odporne na proteolizę i tym samym wykazywały zwiększone działanie owadobójcze. Kiedy karmiono dorosłe osobniki *A. aegypti* i larwy ćmy *Plutella xylostella* wieloma analogami Aedae-TMOF zawierającymi aromatyczne i alifatyczne kwasy oraz estry, to wykazywały one znaczące właściwo-

ści owadobójcze. Najbardziej aktywne związki powodowały do 96% śmiertelność u *P. xylostella* [16]. W ostatniej dekadzie wykonano szereg badań w celu poznania działania Aede-TMOF jako bioinsektycydu. W rezultacie tych prac stwierdzono, że podanie doustnie larwom *Heliothis virescens* liści transgenicznego tytoniu, a larwom komarów drożdży *Saccharomyces cerevisiae* lub glonu *Chlorella* sp. z ekspresją TMOF wywoływało zahamowanie przyrostu masy ciała u larw [86], a także powodowało efekty letalne i stanowiło pierwszą udaną próbę wdrożenia TMOF jako bioinsektycydu do aplikacji drogą *per os* [14]. Podobnie podanie komarom *Anopheles gambiae* i *A. aegypti* zarodników entomopatogenicznego grzyba *Beauveria bassiana* z ekspresją TMOF umożliwiło obniżenie dawki śmiertelnej zarodników tego grzyba, która dramatycznie redukowałą płodność i powodowała skrócenie okresu przeżycia dorosłych komarów [33].

TMOF okazał się bardzo silnym larwicydem w stosunku do larw komarów i innych owadów. Jednak nowe związki stosowane jako komercyjne bioinsektycydy muszą być testowane na innych zwierzętach. W przeprowadzonych dotąd badaniach w tym kierunku wykazano m.in., że dootrzewnowe iniekcje analogu YDPAP nie mają wpływu na reprodukcję u myszy, co może wynikać z braku właściwego receptora dla tego peptydu w oocytach myszy lub być rezultatem jego hydrolizy przez specyficzną dipeptydazę prolinową [77]. Ponadto nie obserwowano również toksycznych efektów gdy rekombinowany TMOF w drożdżach podano myszom, kaczkom, królikom i dafni *Daphnia pulex* [85]. Zatem Aede-TMOF i jego mimetyki dobrze rokują jako potencjalne bioinsektycydy nowej generacji szczególnie w stosunku do różnych gatunków komarów i much.

PERSPEKTYWY ZASTOSOWANIA PEPTYDOMIMETYKÓW JAKO BIOINSEKTYCYDÓW

W ostatnich latach nastąpił istotny postęp w zakresie wykorzystania nowoczesnych technik analitycznych (HPLC, MS), metod biologii molekularnej i bioinformatyki oraz procedur projektowania i syntezy peptydomimetyków (BBB-NBA) różnych grup neuropeptydów i hormonów peptydowych owadów [4, 32, 55]. Uzyskano szereg mimetyków liniowych i cyklicznych o funkcjach agonistów lub antagonistów natywnych peptydów, działających allatotropowo, feromonotropowo, miotropowo, diuretycznie i gonadotropowo po podaniu drogą pokarmową lub po aplikacji topikalnej [4, 26, 53, 55]. Należy się spodziewać, że postęp w tym zakresie będzie jeszcze bardziej intensywny w związku z podjętym w 2012 roku ambitnym projektem genomowym „i5k” (dostępny z <http://www.arthropodgenomes.org/wiki/i5K>), zwanym również „the Manhattan Project of Entomology”, mającym na celu sekwencję i analizę genomów 5000 gatunków owadów i innych stawonogów przed 2016 rokiem [70]. Zrealizowanie tego projektu będzie

osiągnięciem imponującym na tle obecnie znanych 20 genomów ekonomicznie i ekologicznie ważnych gatunków owadów (<https://www.vectorbase.org>). Ogromna ilość informacji uzyskana z wykonanych sekwencji tak dużej liczby genomów w ramach „i5k” zapewni możliwości odkrycia różnych nowych agonistów i antagonistów peptydowych oraz ich receptorów i będzie także stanowiła istotną pomoc przy projektowaniu gatunkowo specyficznych i narządowo selektywnych peptydomimetyków.

Choć dotychczas wykazano u owadów możliwość modyfikowania szeregu kluczowych procesów fizjologicznych przez peptydomimetyki, obecnie jednym ze szczególnie ważnych zadań badawczych jest szersze poznanie mechanizmów oddziaływania tych związków na różne struktury na poziomie komórkowym i molekularnym, zwłaszcza na określone receptory w systemie nerwowym i tkankach obwodowych, co będzie miało istotne znaczenie przy projektowaniu wysoce skutecznych i selektywnych mimetyków. Nadal też istnieje potrzeba uzyskania bardziej fundamentalnej wiedzy na temat działania już zsyntetyzowanych, jak i nowo projektowanych peptydomimetyków w warunkach *in vivo* z wykorzystaniem wysokowydajnych biotestów skринingowych w układach homologicznych, bowiem dotychczas dużą część z aktywnych mimetyków badano jedynie *in vitro* w układach heterologicznych [20, 32, 51, 88, 97]. Innym ważnym zadaniem podczas opracowywania praktycznego wykorzystania różnych peptydomimetyków jako biopestycydów będzie poznanie ich działania fizjologicznego w warunkach środowiskowych. W tym względzie, przed komercyjnym zastosowaniem tych związków, wymagane będą dalsze badania nad biostabilnością, okresem półtrwania, najbardziej korzystnym sposobem podania oraz siłą działania peptydomimetyków [9, 90].

PODZIĘKOWANIA

Praca częściowo finansowana z grantu Narodowego Centrum Nauki (NN 309 066739)

LITERATURA

- [1] AL-ANZI B, ARMAND E, NAGAMEI P, OLSZEWSKI M, SAPIN V, WATERS C, ZINN K, WYMAN RJ, BENZER S. The leucokinin pathway and its neurons regulate meal size in *Drosophila*. *Curr Biol*. 2010; **20**(11): 969-978.
- [2] ALFORD DV. *Pest and disease management handbook*. Oxford, UK: Blackwell Science 2000: 1-624.
- [3] ALTSTEIN M, BEN-AZIZ O, ZELTSEY I, BHARGAVA K, DAVIDOVITCH M, STREY A, PRYOR N, NACHMAN RJ. Inhibition of PK/PBAN-mediated functions in insects: discovery of selective and non-selective inhibitors. *Peptides*. 2007; **28**(3): 574-584.

- [4] ALTSTEIN M, NASSEL DR. Neuropeptide signaling in insects. *Adv Exp Med Biol.* 2010; **692**: 155-165.
- [5] AUDSLEY N, MATTHEWS HJ, PRICE NR, WEAVER RJ. Allatregulatory peptides in Lepidoptera, structures, distribution and functions. *J Insect Physiol.* 2008; **54**(6): 969-980.
- [6] BENDENA WG, TOBE SS. Families of allatregulator sequences: A 2011 perspective. *Can J Zool.* 2012; **90**(4): 521-544.
- [7] BLACKBURN MB, WAGNER RM, SHABANOWITZ J, KOCHANSKY JP, HUNT DF, RAINA AK. The isolation and identification of three diuretic kinins from the abdominal ventral nerve cord of adult *Helicoverpa zea*. *J Insect Physiol.* 1995; **41**(8): 723-730.
- [8] BOERJAN B, CARDOEN D, VERDONCK R, CAERS J, SCHOOF L. Insect omics research coming of age. *Can J Zool.* 2012; **90**(4): 440-455.
- [9] BONNING BC, CHOUGULE NP. Delivery of intrahemocoelic peptides for insect pest management. *Trends Biotechnol.* 2014; **32**(2): 91-98.
- [10] 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**(12): 3015-3020.
- [11] BOROVSKY D, POWELL CA, NAYAR JK, BLALOCK JE, HAYES TK. Characterization and localization of mosquito-gut receptors for trypsin modulating oostatic factor using a complementary peptide and immunocytochemistry. *FASEB J.* 1994; **8**(3): 350-355.
- [12] 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**(3): 273-281.
- [13] BOROVSKY D. Biosynthesis and control of mosquito gut proteases. *IUBMB Life.* 2003; **55**(8): 435-441.
- [14] BOROVSKY D. Trypsin-modulating oostatic factor: a potential new larvicide for mosquito control. *J Exp Biol.* 2003; **206**(Pt 21): 3869-3875.
- [15] BOROVSKY D, MEOLA SM. Biochemical and cytoimmunological evidence for the control of *Aedes aegypti* larval trypsin with *Aea*-TMOF. *Arch Insect Biochem Physiol.* 2004; **55**(3): 124-139.
- [16] BOROVSKY D, NAUEN R. Biological and biochemical effects of organo-synthetic analogues of trypsin modulating oostatic factor [TMOF] on *Aedes aegypti*, *Heliothis virescens* and *Plutella xylostella*. *Pestycydy.* 2007; **3-4**: 17-26.
- [17] 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 (Sarcophaga) bullata*. *Regul Pept.* 1994; **50**(1): 61-72.
- [18] CHOWAŃSKI S, KUDLEWSKA M, MARCINIAK P, ROSIŃSKI G. Synthetic insecticides – Is there an alternative? *Pol J Environ Stud.* 2014; **23**(2): 291-302.
- [19] COAST GM. Synergism between diuretic peptides controlling ion and fluid transport in insect malpighian tubules. *Regul Pept.* 1995; **57**(3): 283-296.
- [20] COAST GM, ZABROCKI J, NACHMAN RJ. Diuretic and myotropic activities of N-terminal truncated analogs of *Musca domestica* kinin neuropeptide. *Peptides.* 2002; **23**(4): 701-708.
- [21] COAST GM, SCHOOLEY DA. Toward a consensus nomenclature for insect neuropeptides and peptide hormones. *Peptides.* 2011; **32**(3): 620-631.
- [22] DOWNER KE, HASELTON AT, NACHMAN RJ, STOFFOLANO JG JR. Insect satiety: sulfakinin localization and the effect of drosulfakinin on protein and carbohydrate ingestion in the blow fly, *Phormia regina* (Diptera: Calliphoridae). *J Insect Physiol.* 2007; **53**(1): 106-112.
- [23] ENAYATI A, HEMINGWAY J. Malaria management: past, present, and future. *Annu Rev Entomol.* 2010; **55**: 569-591.
- [24] GADE G, GOLDSWORTHY GJ. Insect peptide hormones: a selective review of their physiology and potential application for pest control. *Pest Manag Sci.* 2003; **59**(10): 1063-1075.
- [25] GARSIDE CS, NACHMAN RJ, TOBE SS. Injection of Dip-allatostatin or Dip-allatostatin pseudopeptides into mated female *Diploptera punctata* inhibits endogenous rates of JH biosynthesis and basal oocyte growth. *Insect Biochem Mol Biol.* 2000; **30**(8-9): 703-710.

- [26] HARITON A, BEN-AZIZ O, DAVIDOVITCH M, ALTSTEIN M. Bioavailability of backbone cyclic PK/PBAN neuropeptide antagonists--inhibition of sex pheromone biosynthesis elicited by the natural mechanism in *Heliothis peltigera* females. *FEBS J.* 2010; **277**(4): 1035-1044.
- [27] HARSHINI S, NACHMAN RJ, SREEKUMAR S. Inhibition of digestive enzyme release by neuropeptides in larvae of *Opisina arenosella* (Lepidoptera: Cryptophasidae). *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* 2002; **132**(2): 353-358.
- [28] HAYES TK, HOLMAN GM, PANNABECKER TL, WRIGHT MS, STREY AA, NACHMAN RJ, HOEL DF, OLSON JK, BEYENBACH KW. Culekinin depolarizing peptide: a mosquito leucokinin-like peptide that influences insect Malpighian tubule ion transport. *Regul Pept.* 1994; **52**(3): 235-248.
- [29] HOLMAN GM, NACHMAN RJ, WRIGHT MS. A strategy for the isolation and structural characterization of certain insect myotropic peptides that modify the spontaneous contractions of the isolated cockroach hindgut. [w] MCCAFFERY AR [red.] *Chromatography and isolation of insect hormones and pheromones.* New York: Springer 1991: 195-204.
- [30] HOLMAN GM, NACHMAN RJ, COAST GM. Isolation, characterization and biological activity of a diuretic myokinin neuropeptide from the housefly, *Musca domestica*. *Peptides.* 1999; **20**(1): 1-10.
- [31] KAI ZP, HUANG J, XIE Y, TOBE SS, LING Y, ZHANG L, ZHAO YC, YANG XL. Synthesis, biological activity, and hologram quantitative structure-activity relationships of novel allatostatin analogues. *J Agric Food Chem.* 2010; **58**(5): 2652-2658.
- [32] KAI ZP, XIE Y, HUANG J, TOBE SS, ZHANG JR, LING Y, ZHANG L, ZHAO YC, YANG XL. Peptidomimetics in the discovery of new insect growth regulators: studies on the structure-activity relationships of the core pentapeptide region of allatostatins. *J Agric Food Chem.* 2011; **59**(6): 2478-2485.
- [33] KAMAREDDINE L, FAN Y, OSTA MA, KEYHANI NO. Expression of trypsin modulating oostatic factor (TMOF) in an entomopathogenic fungus increases its virulence towards *Anopheles gambiae* and reduces fecundity in the target mosquito. *Parasit Vectors.* 2013; **6**: 22.
- [34] KLOWDEN MJ. The endogenous regulation of mosquito reproductive behavior. *Experientia.* 1990; **46**(7): 660-670.
- [35] KOPEĆ S. Experiments on metamorphosis of insects. *Bull Int Acad Cracovie* 1917: 57-60.
- [36] LI B, PREDEL R, NEUPERT S, HAUSER F, TANAKA Y, CAZZAMALI G, WILLIAMSON M, ARAKANE Y, VERLEYEN P, SCHOofs L, SCHACHTNER J, GRIMMELIKHUIJZEN CJ, PARK Y. Genomics, transcriptomics, and peptidomics of neuropeptides and protein hormones in the red flour beetle *Tribolium castaneum*. *Genome Res.* 2008; **18**(1): 113-122.
- [37] LUBAWY J, CZARNIEWSKA E, KUCZER M, ROSIŃSKI G. Allatostatyny – plejotropowe neurohormony owadów. *Postępy Biologii Komórki.* 2013; **40**(3): 385-400.
- [38] MARCINIAK P, ROSIŃSKI G. Aktualny stan badań nad neuropeptydami miotropowymi owadów: tachykiny, sulfakininy i FMRFa-pokrewne peptydy. *Postępy Biologii Komórki.* 2007; **38**(1): 43-63.
- [39] MARCINIAK P, SZYMczAK M, ROSIŃSKI G. Hormony peptydowe owadów – przegląd najważniejszych rodzin. *Postępy Biologii Komórki* 2011; **38**(1): 43-63.
- [40] MATTHEWS HJ, DOWN RE, AUDSLEY N. Effects of *Manduca sexta* allatostatin and an analogue on the peach-potato aphid *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae) and degradation by enzymes in the aphid gut. *Arch Insect Biochem Physiol.* 2010; **75**(3): 139-157.
- [41] NACHMAN RJ, HOLMAN GM, HADDON WF, LING N. Leucosulfakinin, a sulfated insect neuropeptide with homology to gastrin and cholecystokinin. *Science.* 1986; **234**(4772): 71-73.
- [42] NACHMAN RJ, HOLMAN GM, HAYES TK, BEIER RC. Structure-activity relationships for inhibitory insect myosuppressins: contrast with the stimulatory sulfakinins. *Peptides.* 1993; **14**(4): 665-670.
- [43] NACHMAN RJ, KUNIYOSHI H, ROBERTS VA, HOLMAN GM, SUZUKI A. Active conformation of the pyrokinin/PBAN neuropeptide family for pheromone biosynthesis in the silkworm. *Biochem Biophys Res Commun.* 1993; **193**(2): 661-666.
- [44] NACHMAN RJ, OLENDER EH, ROBERTS VA, HOLMAN GM, YAMAMOTO D. A nonpeptidal peptidomimetic agonist of the insect FLRFamide myosuppressin family. *Peptides.* 1996; **17**(2): 313-320.
- [45] NACHMAN RJ, TEAL PE, RADEL PA, HOLMAN GM, ABERNATHY RL. Potent pheromonotropic/myotropic activity of a carboranyl pseudotetrapeptide analogue of the insect pyrokinin/PBAN neuropeptide family administered via injection or topical application. *Peptides.* 1996; **17**(5): 747-752.
- [46] NACHMAN RJ, ISAAC RE, COAST GM, HOLMAN GM. Aib-containing analogues of the insect kinin neuropeptide family demonstrate resistance to an insect angiotensin-converting enzyme and potent diuretic activity. *Peptides.* 1997; **18**(1): 53-57.

- [47] NACHMAN RJ, ISAAC RE, COAST GM, HOLMAN GM. Potent, AnCE endopeptidase-resistant, Aib-containing analogues of the diuretic insect kinin neuropeptides. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1997; **814**: 331-334.
- [48] NACHMAN RJ, MUREN JE, ISAAC RE, LUNDQUIST CT, KARLSSON A, NASSEL DR. An aminoisobutyric acid-containing analogue of the cockroach tachykinin-related peptide, LemTRP-1, with potent bioactivity and resistance to an insect angiotensin-converting enzyme. *Regul Pept*. 1998; **74**(1): 61-66.
- [49] NACHMAN RJ, GARSIDE CS, TOBE SS. Hemolymph and tissue-bound peptidase-resistant analogs of the insect allatostatins. *Peptides*. 1999; **20**(1): 23-29.
- [50] NACHMAN RJ, TEAL PE, STREY A. Enhanced oral availability/pheromonotropic activity of peptidase-resistant topical amphiphilic analogs of pyrokinin/PBAN insect neuropeptides. *Peptides*. 2002; **23**(11): 2035-2043.
- [51] NACHMAN RJ, ZABROCKI J, OLCZAK J, WILLIAMS HJ, MOYNA G, IAN SCOTT A, COAST GM. cis-peptide bond mimetic tetrazole analogs of the insect kinins identify the active conformation. *Peptides*. 2002; **23**(4): 709-716.
- [52] NACHMAN RJ, WANG XJ, ETZKORN FA, AZIZ OB, DAVIDOVITCH M, KACZMAREK K, ZABROCKI J, STREY A, PRYOR N, ALTSTEIN M. Evaluation of a PK/PBAN analog with an (E)-alkene, trans-Pro isostere identifies the Pro orientation for activity in four diverse PK/PBAN bioassays. *Peptides*. 2009; **30**(7): 1254-1259.
- [53] NACHMAN RJ, MAHDIAN K, NASSEL DR, ISAAC RE, PRYOR N, SMAGGHE G. Biostable multi-Aib analogs of tachykinin-related peptides demonstrate potent oral aphicidal activity in the pea aphid *Acyrtosiphon pisum* (Hemiptera: Aphidae). *Peptides*. 2011; **32**(3): 587-594.
- [54] NACHMAN RJ, HAMSHOU M, KACZMAREK K, ZABROCKI J, SMAGGHE G. Biostable and PEG polymer-conjugated insect pyrokinin analogs demonstrate antifeedant activity and induce high mortality in the pea aphid *Acyrtosiphon pisum* (Hemiptera: Aphidae). *Peptides*. 2012; **34**(1): 266-273.
- [55] NACHMAN RJ. Peptidomics applied: A new strategy for development of selective antagonists/agonists of insect pyrokinin (FXPRLamide) family using a novel conformational-mimetic motif. *EuPA Open Proteomics*. 2014; **3**: 138-142.
- [56] NASSEL DR. Neuropeptides in the nervous system of *Drosophila* and other insects: multiple roles as neuromodulators and neurohormones. *Prog Neurobiol*. 2002; **68**(1): 1-84.
- [57] NASSEL DR. Tachykinins and tachykinin-related peptides in invertebrates. [w] KASTIN AJ [red.] Handbook of biologically active peptides. Elsevier 2006: 171-176.
- [58] NAUEN R, EBBINGHAUS-KINTSCHER U, ELBERT A, JESCHKE P, TIETJEN K. Acetylcholine Receptors as Sites for Developing Neonicotinoid Insecticides. [w] ISHAAYA I [red.] Biochemical sites of insecticide action and resistance. Berlin, New York: Springer 2001: 77-105.
- [59] NICHOLS R, EGGLE JP, LANGAN NR, PALMER GC. The different effects of structurally related sulfakinins on *Drosophila melanogaster* odor preference and locomotion suggest involvement of distinct mechanisms. *Peptides*. 2008; **29**(12): 2128-2135.
- [60] NICHOLS R, MANOOGIAN B, WALLING E, MISPELON M. Plasticity in the effects of sulfated and nonsulfated sulfakinin on heart contractions. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2009; **14**: 4035-4043.
- [61] NICHOLSON GM. Fighting the global pest problem: preface to the special *Toxicon* issue on insecticidal toxins and their potential for insect pest control. *Toxicon*. 2007; **49**(4): 413-422.
- [62] OERKE EC, DEHNE HW. Safeguarding production – Losses in major crops and the role of crop protection. *Crop Protection*. 2004; **23**(4): 275-285.
- [63] ORCHARD I, LANGE AB, BENDENA WG. FMRFamide-related peptides: a multifunctional family of structurally related neuropeptides in insects. *Adv Insect Physiol*. 2001; **28**: 267-329.
- [64] ORCHARD I, LANGE AB. Insect myosuppressins/FMRFamides and FL/IRF amides/NPFs. [w] KASTIN AJ [red.] Handbook of biologically active peptides. Elsevier 2006.
- [65] PIULACHS MD, VILAPLANA L, BARTOLOME JM, CARRENO C, MARTIN D, GONZALEZ-MUNIZ R, HERRANZ R, GARCIA-LOPEZ MT, ANDREU D, BELLES X. Ketomethylene and methyleneamino pseudopeptide analogues of insect allatostatins inhibit juvenile hormone and vitellogenin production in the cockroach *Blattella germanica*. *Insect Biochem Mol Biol*. 1997; **27**(10): 851-858.
- [66] PREDEL R, KELLNER R, RAPUS J, PENZLIN H, GADE G. Isolation and structural elucidation of eight kinins from the retrocerebral complex of the American cockroach, *Periplaneta americana*. *Regul Pept*. 1997; **71**(3): 199-205.
- [67] PREDEL R, NACHMAN RJ. The FXPRLamide (pyrokinin/PBAN) peptide family. [w] KASTIN AJ [red.] Handbook of biologically active peptides. Elsevier 2006.

- [68] RADFORD JC, TERHZAZ S, CABRERO P, DAVIES SA, DOW JA. Functional characterisation of the Anopheles leucokinins and their cognate G-protein coupled receptor. *J Exp Biol.* 2004; **207**(Pt 26): 4573-4586.
- [69] ROBERTS VA, NACHMAN RJ, COAST GM, HARIHARAN M, CHUNG JS, HOLMAN GM, WILLIAMS H, TAINER JA. Consensus chemistry and beta-turn conformation of the active core of the insect kinin neuropeptide family. *Chem Biol.* 1997; **4**(2): 105-117.
- [70] ROBINSON GE, HACKETT KJ, PURCELL-MIRAMONTES M, BROWN SJ, EVANS JD, GOLDSMITH MR, LAWSON D, OKAMURO J, ROBERTSON HM, SCHNEIDER DJ. Creating a buzz about insect genomes. *Science.* 2011; **331**(6023): 1386.
- [71] SCHARRE B. Über sekretorisch tätige Nervenzellen bei wirbellosen Tieren. *Die Naturwissenschaften.* 1937; **25**(9): 131-138.
- [72] SCHERKENBECK J, ZDOBINSKY T. Insect neuropeptides: structures, chemical modifications and potential for insect control. *Bioorg Med Chem.* 2009; **17**(12): 4071-4084.
- [73] SCHOofs L, HOLMAN GM, PROOST P, VAN DAMME J, HAYES TK, DE LOOF A. Locustakinin, a novel myotropic peptide from *Locusta migratoria*, isolation, primary structure and synthesis. *Regul Pept.* 1992; **37**(1): 49-57.
- [74] SCHOofs L, NACHMAN RJ. Sulfakinins. [w] KASTIN AJ [red.] *Handbook of biologically active peptides.* Elsevier 2006: 193-199.
- [75] SEINSCH E, DYKER H, LOSEL P, BACKHAUS D, SCHERKENBECK J. Effect of helicokinins and ACE inhibitors on water balance and development of *Heliothis virescens* larvae. *J Insect Physiol.* 2000; **46**(11): 1423-1431.
- [76] SHALEV AH, ALTSTEIN M. Pheromonotropic and melanotropic PK/PBAN receptors: Differential ligand-receptor interactions. *Peptides.* 2014; **63C**: 81-89.
- [77] SLANINOVA J, BENNETTOVA B, HLAVACEK J, TYKVA R. Insect oostatic peptide: absence of effect on mice ovaries. *Chemosphere.* 2002; **48**(6): 591-595.
- [78] 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**(4): 263-273.
- [79] SMAGGHE G, MAHDIAN K, ZUBRZAK P, NACHMAN RJ. Antifeedant activity and high mortality in the pea aphid *Acyrtosiphon pisum* (Hemiptera: Aphidae) induced by biostable insect kinin analogs. *Peptides.* 2010; **31**(3): 498-505.
- [80] STARRATT AN, BROWN BE. Structure of the pentapeptide proctolin, a proposed neurotransmitter in insects. *Life Sci.* 1975; **17**(8): 1253-1256.
- [81] STARRATT AN, LANGE AB, ORCHARD I. N-terminal modified analogs of HVFLRFamide with inhibitory activity on the locust oviduct. *Peptides.* 2000; **21**(2): 197-203.
- [82] TANEJA-BAGESHWAR S, STREY A, ZUBRZAK P, WILLIAMS H, REYES-RANGEL G, JUARISTI E, PIETRANTONIO P, NACHMAN RJ. Identification of selective and non-selective, biostable beta-amino acid agonists of recombinant insect kinin receptors from the southern cattle tick *Boophilus microplus* and mosquito *Aedes aegypti*. *Peptides.* 2008; **29**(2): 302-309.
- [83] TEAL PE, MEREDITH JA, NACHMAN RJ. Development of amphiphilic mimics of insect neuropeptides for pest control. *Ann N Y Acad Sci.* 1999; **897**: 348-360.
- [84] TERHZAZ S, O'CONNELL FC, POLLOCK VP, KEAN L, DAVIES SA, VEENSTRA JA, DOW JA. Isolation and characterization of a leucokinin-like peptide of *Drosophila melanogaster*. *J Exp Biol.* 1999; **202**(Pt 24): 3667-3676.
- [85] THOMPSON DM, YOUNG HP, EDENS FW, OLMSTEAD AW, LEBLANC GA, HODGSON E, ROE RM. Non-target toxicology of a new mosquito larvicide, trypsin modulating oostatic factor. *Pest Biochem Physiol.* 2004; **80**(3): 131-142.
- [86] TORTIGLIONE C, FOGLIANO V, FERRACANE R, FANTI P, PENNACCHIO F, MONTI LM, RAO R. An insect peptide engineered into the tomato prosystemin gene is released in transgenic tobacco plants and exerts biological activity. *Plant Mol Biol.* 2003; **53**(6): 891-902.

- [87] VEENSTRA JA. Isolation and identification of three leucokinin from the mosquito *Aedes aegypti*. *Biochem Biophys Res Commun*. 1994; **202**(2): 715-719.
- [88] VERLINDEN H, VLEUGELS R, ZELS S, DILLEN S, LENAERTS C, CRABBÉ K, SPIT J, VANDEN BROECK J. Receptors for neuronal or endocrine signalling molecules as potential targets for the control of insect pests. *Adv Insect Physiol*. 2014; **46**: 167-303.
- [89] WASIELEWSKI O, ROSINSKI G. Gonadoinhibitory effects of Neb-colloostatin and Neb-TMOF on ovarian development in the mealworm, *Tenebrio molitor* L. *Arch Insect Biochem Physiol*. 2007; **64**(3): 131-141.
- [90] WHETSTONE PA, HAMMOCK BD. Delivery methods for peptide and protein toxins in insect control. *Toxicol*. 2007; **49**(4): 576-596.
- [91] XIE Y, KAI ZP, TOBE SS, DENG XL, LING Y, WU XQ, HUANG J, ZHANG L, YANG XL. Design, synthesis and biological activity of peptidomimetic analogs of insect allatostatins. *Peptides*. 2011; **32**(3): 581-586.
- [92] YAN XH, DE BONDT HL, POWELL CC, BULLOCK RC, BOROVSKY D. Sequencing and characterization of the citrus weevil, *Diaprepes abbreviatus*, trypsin cDNA. Effect of *Aedes trypsin* modulating oostatic factor on trypsin biosynthesis. *Eur J Biochem*. 1999; **262**(3): 627-636.
- [93] YU N, BENZI V, ZOTTI MJ, STALJANSSENS D, KACZMAREK K, ZABROCKI J, NACHMAN RJ, SMAGGHE G. Analogs of sulfakinin-related peptides demonstrate reduction in food intake in the red flour beetle, *Tribolium castaneum*, while putative antagonists increase consumption. *Peptides*. 2013; **41**: 107-112.
- [94] ZHANG Q, ZDAREK J, NACHMAN RJ, DENLINGER DL. Diapause hormone in the corn earworm, *Helicoverpa zea*: optimum temperature for activity, structure-activity relationships, and efficacy in accelerating flesh fly pupariation. *Peptides*. 2008; **29**(2): 196-205.
- [95] ZHANG Q, NACHMAN RJ, KACZMAREK K, ZABROCKI J, DENLINGER DL. Disruption of insect diapause using agonists and an antagonist of diapause hormone. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011; **108**(41): 16922-16926.
- [96] ZOEPHEL J, REIHER W, REXER KH, KAHNT J, WEGENER C. Peptidomics of the agriculturally damaging larval stage of the cabbage root fly *Delia radicum* (Diptera: Anthomyiidae). *PLoS One*. 2012; **7**(7): e41543.
- [97] ZUBRZAK P, WILLIAMS H, COAST GM, ISAAC RE, REYES-RANGEL G, JUARISTI E, ZABROCKI J, NACHMAN RJ. Beta-amino acid analogs of an insect neuropeptide feature potent bioactivity and resistance to peptidase hydrolysis. *Biopolymers*. 2007; **88**(1): 76-82.

Redaktor prowadzący – Michał Nowicki

Otrzymano: 17.12.2014

Przyjęto: 15.01.2015

Karolina Walkowiak

Zakład Fizjologii i Biologii Rozwoju Zwierząt, Instytut Biologii Eksperymentalnej

Wydział Biologii, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu

os. Polan 4/7, 61-253 Poznań

tel. 693-370-872

email: walkarola@gmail.com

