

JOANNA MICHALIK
Instytut Biochemii i Biofizyki PAN
Warszawa

NEUROPEPTYDY OWADÓW I PERSPEKTYWY ICH PRAKTYCZNEGO ZASTOSOWANIA DO KONTROLI POPULACJI SZKODNIKÓW OWADZICH

Wszystkie procesy życiowe u owadów, a więc rozwój, metamorfoza i rozmnażanie są kontrolowane hormonalnie przez trzy główne klasy hormonów: ekdysterydy, hormony juwenilne o charakterze seskwiterpenów oraz neurohormony.

Dwie pierwsze grupy związków badano dosyć szczegółowo od wielu lat. Znana jest ich struktura, opisano miejsca syntezy w wyspecjalizowanych gruczołach, poza obrębem układu nerwowego a efekty fizjologiczne ich działania opisano w dziesiątkach prac (C y m b o r o w s k i 1984, M i c h a l i k 1991, L a f o n t 1992).

Neurohormony, stanowiące trzecią kategorię hormonów owadzich są peptydami o znacznie większym zróżnicowaniu budowy w porównaniu z hormonami juwenilnymi czy ekdystteroidami. Niewiele jednak spośród nich wyizolowano i scharakteryzowano od strony chemicznej. Wiadomo, że podobnie jak ma to miejsce u zwierząt wyższych, również u owadów są one naczelnymi regulatorami procesów fizjologicznych, włącznie z syntezą i wydzielaniem dwóch pozostałych hormonów owadzich — hormonu juwenilnego i ekdyzonu (tab. 1), (K e e l e y i H a y e s 1987).

Neuropeptydy są syntetyzowane u owadów w różnych obszarach układu nerwowego, głównie w tkance mózgowej. Rozmieszczenie komórek neurosekrecyjnych w obrębie mózgu zależy od gatunku owada, ale u wszystkich badanych owadów są charakterystyczne 4 grupy komórek występujące w protocerebrum. Dwie z nich w części środkowej mózgu (*pars intercerebralis*) oraz dwie po bokach (komórki lateralne). Neurosekret przemieszcza się wzdłuż aksonów komórek neurosekrecyjnych i gromadzi się w *corpora cardiaca* — najważniejszym organie neurohemalnym owada, a następnie uwalniany do hemolimfy dociera do tkanek docelowych (rys.1).

PEPTYDY O DZIAŁANIU MIOTROPOWYM

Obserwacje K o p c i a (K o p e ć 1917, 1922) o udziale substancji pochodzenia mózgowego w metamorfozie *Lymantria dispar* pochodziły z lat 1917–1922,

natomiast pierwszy neuropeptyd owadzi scharakteryzowano dopiero 50 lat później. Była to proktolina (Brown i Starratt 1975) wyizolowana z przewodu

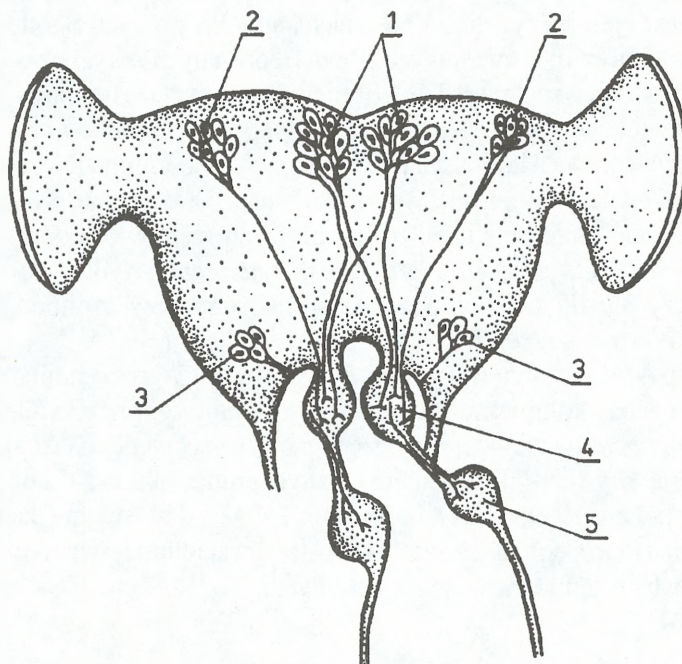
Tabela 1

Procesy fizjologiczne regulowane przez neurohormony o znanej sekwencji aminokwasów z podaniem gatunku owada, z którego wyodrębniono i oczyszczono hormon po raz pierwszy

WZROST I ROZWÓJ	
Hormon protorakotropowy, PTTH (<i>Bombyx mori</i>)	Uwalnianie ekdyzonu przez komórki protorakalne
Allatotropina (<i>Manduca sexta</i>)	uwalnianie JH z <i>corpora allata</i> (CA)
Allatostatyna (<i>Diploptera punctata</i>)	hamowanie uwalniania JH z CA
Hormon wylinkowy (<i>Bombyx mori</i>)	twardnienie i ciemnienie kutikuli
REPRODUKcja	
PBAN (<i>Heliotis zea</i> , <i>Bombyx mori</i>)	synteza feromonów
METABOLIZM I HOMEOSTAZA	
Hormon adypokinetyczny (<i>Periplaneta americana</i>)	metabolizm lipidów i węglowodanów
Hormon diuretyczny/antydiuretyczny (<i>Manduca sexta</i>)	gospodarka wodna
Hormon diapauzy (<i>Bombyx mori</i>)	utrzymanie stanu spoczynkowego
Proktolina (<i>Periplaneta americana</i>)	skurcz mięśni
Hormon melanotropowy (RPCH) (<i>Bombyx mori</i>)	metabolizm barwników (ciemnienie)
Bombyksyna (<i>Bombyx mori</i>)	funkcja u <i>Bombyx mori</i> nieznana

pokarmowego karaczana — *Periplaneta americana*. Jest to pentapeptyd o sekwencji aminokwasów H-Arg-Tyr-Leu-Pro-Thr-OH. Proktolina ma właściwości miotropowe, polegające na stymulowaniu skurczów mięśni gładkich i szkieletowych, jak również mięśnia sercowego. Liczne prace nad aktywnością biologiczną analogów proktoliny miały na celu wykazanie roli poszczególnych reszt aminokwasów w zachowaniu właściwości miotropowych u owadów. Stwierdzono, że aktywność miotropowa proktoliny zależy od obecności podstawnika para-pierścienia aromatycznego w pozycji 2 łańcucha peptydowego (Konopińska i współaut. 1990). Z innych neuropeptydów o działaniu miotropowym opisano w latach 1986–1987 grupę ośmiu leukopyrokinin (L-I — L-VIII), oktapeptydów wyizolowanych z ekstraktów głów *Leucophaea maderae* (Holman i współaut. 1986a,

b, 1987a, b). Wszystkie te leukopyrokininy mają zachowaną homologię w trzech pozycjach łańcucha peptydowego, występują w bardzo małych ilościach: 0,09



Rys. 1. Rozmieszczenie komórek neurosekrecyjnych w mózgu owada: 1 — medialne komórki neurosekrecyjne, 2 — lateralne komórki sekrecyjne, 3 — tritocerebralne komórki neurosekrecyjne, 4 — *corpus cardiacum*, 5 — *corpus allatum* (według C y m b o r o w s k i e g o 1984).

(L-VII) i 0,06 (L-VIII) pikomola/ ekwiwalent głowy owada. Również ich minimalne stężenia, wywołujące reakcję miotropową, są bardzo niskie i wynoszą odpowiednio $1,3 \times 10^{-10}$ M dla L-VII oraz $2,8 \times 10^{-11}$ M dla L-VIII (H o l m a n i współaut. 1987b). Do neuropeptydów miotropowych należą leukosulfakininy LSK-I i LSK-II (N a c h m a n i współaut. 1986) z charakterystyczną sekwencją heksapeptydu: Tyr(SO₃H)-Gly-His-Met-Arg-Phe-NH₂ na C-końcu wyizolowane z *Leucophaea maderae* oraz innych źródeł sulfaluminy — Pea-SK z *Periplaneta americana* oraz Drm-SK I i Drm-SK II z *Drosophila melanogaster* (K o n o p i ń s k a i współaut. 1992).

ALLATOTROPINA, ALLATOSTATYNY

Regulacja szybkości syntezy i uwalniania hormonu juvenilnego z *corpora allata* zachodzi przy udziale allatotropin (stymulacja) i allatostatyn (hamowanie). Zainteresowanie tymi neuropeptydami regulującymi poziom hormonu juvenilnego w ciele owada a w konsekwencji jego metamorfozę, dojrzałość płciową,

wreszcie reprodukcję jest tak duże, że stanowi jeden z kluczowych problemów badawczych endokrynologii owadów od szeregu lat.

Allatotropina wyizolowana z ekstraktów mózgowych dorosłych owadów *Manduca sexta* jest peptydem o 13 resztach aminokwasowych z brakiem homologii do sekwencji aminokwasowych innych opisanych dotychczas neuropeptydów (K a t a o k a i współaut. 1989). Stymuluje ona syntezę hormonu juwenilnego u dorosłych dwóch przedstawicieli *Lepidoptera* — *Manduca sexta* i *Heliothis virescens*, nie wpływa natomiast na szybkość syntezy hormonu juwenilnego u larw i poczwerek. Allatotropina nie wpływa również na aktywność *corpora allata* dorosłych samic, przedstawicieli trzech niższych rzędów owadów — *Tenebrio molitor*, *Schistocerca gregaria* i *Periplaneta americana*. Wydaje się więc, że rola jej ogranicza się do oddziaływania na szybkość syntezy hormonu juwenilnego u dorosłych owadów rzędu *Lepidoptera*.

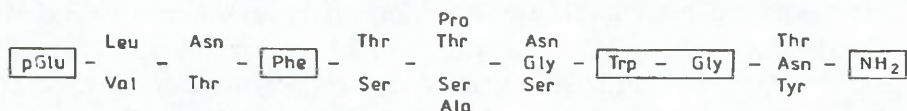
Rodzina 4 allatostatyn o długości 8-, 9-, 10- i 13- reszt aminokwasowych, wyizolowanych z kompleksu mózg-*corpora allata*-*corpora cardiaca* karalucha *Diploptera punctata* charakteryzuje się identyczną sekwencją 3 reszt aminokwasowych: -Phe-Gly-Leu-NH₂ na zablokowanym grupą amidową C końcu (W o o d h e a d i współaut. 1989, P r a t t i współaut. 1989). Allatostatyny hamują syntezę JH w *corpora allata* dorosłych samic i w ostatnim stadium larwalnym *D. punctata* oraz u dorosłych samic *Periplaneta americana*.

HORMONY ADYPOKINETYCZNE

Najliczniejsze i najdokładniej zbadane od 1976 roku są hormony adypokinetyczne (G a d e 1990), regulujące metabolizm węglowodanów i lipidów oraz syntezę białek w ciele tłuszczowym przypominające budową hormon melanizujący krewetki. Pierwszym scharakteryzowanym neuropeptydem tej rodziny był hormon adypokinetyczny AKH-I wyizolowany z *corpora cardiaca* dwóch gatunków szarańczy: *Locusta migratoria* i *Schistocerca gregaria* (S t o n e i współaut. 1976). AKH-I wpływa na uwalnianie dwuglicerydów a także cukrów prostych — trehalozy i glukozy do hemolimfy, gdzie związki te są wykorzystywane jako źródło energii podczas lotu owada. AKH-I działając na ciało tłuszczowe uwalnia magazynowane w tej tkance trójglicerydy i glikogen zarówno w układzie *in vivo*, jak *in vitro* (S t o n e i współaut. 1976, G a d e 1986, 1989, R o s i ń s k i i G a d e 1988). Spośród innych funkcji AKH-I wymienić należy hamowanie syntezy białka w ciele tłuszczowym *Locusta migratoria* (M o s h i t z k y i współaut. 1987, M o s h i t z k y i A p p l e b a u m 1990) związane z wygaszaniem procesu witellogenety w końcowym okresie dojrzewania jaj. Hormon adypokinetyczny z *Acheta domestica* hamuje znacząco syntezę białek hemolimfy w warunkach *in vivo* zarówno u *Acheta*, jak i *Locusta* (C u s i n a t o i współaut. 1991). Ten sam hormon wykazuje także działanie miotropowe, polegające na przyspieszeniu akcji serca wielu gatunków owadów (S c a r b o r o u g h i współaut. 1984). Dalsze badania nad hormonami

adypokinetycznymi oraz hiper- i hypotrehalozemicznymi u kilkudziesięciu przedstawicieli różnych rzędów owadów pozwoliły na określenie podobieństw i różnic budowy, obszarów cząsteczki decydujących o aktywności biologicznej, wreszcie specyficzności gatunkowej.

Rodzina hormonów adypokinetycznych składa się z okta- nona- i dekapeptydów o podobnym działaniu fizjologicznym z identycznymi (silnie zakonserwowanymi) obszarami sekwencji aminokwasów (rys. 2). Charakterystyczne dla wszy-



Rys. 2. Zakonserwowane (w ramkach) i zmienne reszty aminokwasów w rodzinie hormonów adypokinetycznych.

skich peptydów tej grupy są zablokowane końce w postaci kwasu pyroglutaminowego na końcu N i C-koniec w postaci amidu. Wszystkie peptydy tej grupy zawierają fenyloalaninę w pozycji 4 oraz tryptofan w pozycji 8, a w dłuższych łańcuchach glicynę w pozycji 9. Największa zmienność występuje w pozycji 7 i 10, gdzie reszty asparaginy i treoniny mogą być zastąpione przez dwie różne reszty aminokwasowe (G a d e 1990). Badania wpływu struktury łańcucha peptydowego na aktywność biologiczną AKH-I przeprowadzono z użyciem serii skracanych łańcuchów peptydowych od C- i N-końca cząsteczki (S t o n e i współaut., 1978). Aktywność biologiczną zachowują peptydy zawierające co najmniej osiem reszt aminokwasowych w łańcuchu peptydowym. Istotna dla zachowania aktywności adypokinetycznej jest struktura pierwszorzędowa AKH-I, o czym świadczy aktywność adypokinetyczna hormonu melanotropowego (RPCH) wyizolowanego z krewetki *Pandalus borealis* i wykazującego znaczne podobieństwo strukturalne do hormonów adypokinetycznych (F e r n l u n d 1976, F e r n l u n d i J o s e f s s o n 1972, G a d e 1988), (rys. 3).

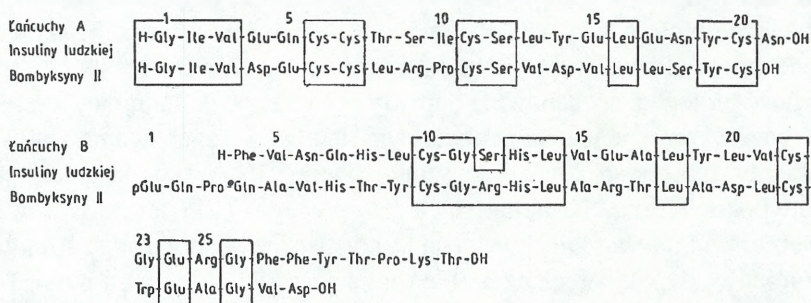
RPCH (<i>Pandatus borealis</i>)	pGlu-Leu-Asn-Phe-Ser-Pro-Gly-Trp-NH ₂
Tem HrTH	pGlu-Leu-Asn-Phe-Ser-Pro-Asn-Trp-NH ₂
Lom AKH I	pGlu-Leu-Asn-Phe-Thr-Pro-Asn-Trp-Gly-Thr-NH ₂
Lom AKH II	pGlu-Leu-Asn-Phe-Ser-Ala-Gly-Trp-NH ₂
Mas AKH	pGlu-Leu-Thr-Phe-Thr-Ser-Ser-Trp-Gly-NH ₂
M I	pGlu-Val-Asn-Phe-Ser-Pro-Asn-Trp-NH ₂
M II	pGlu-Leu-Thr-Phe-Thr-Pro-Asn-Trp-NH ₂
Pht HrTH	pGlu-Leu-Thr-Phe-Ser-Pro-Asp-Trp-NH ₂

Rys. 3. Struktura pierwszorzędowa hormonu melanizującego krewetki (RPCH) i niektórych peptydów z rodziny hormonów adypokinetycznych: Tem Hr TH — *Tenebrio molitor*, Lom — AKH I/KK *Locusta migratoria*, Mas — AKH *Manduca sexta*, M I/M II — *Periplaneta americana*.

HORMON PROTORAKOTROPOWY I BOMBYKSyna

Główną trudnością w lepszym poznaniu neurohormonów owadów są mikroilości w jakich związki te występują w organizmie owadów a czasem również ich niestabilność. Japończycy odnotowali w tej dziedzinie znaczące sukcesy, dysponując materiałem wyjściowym rzędu 250 tysięcy–1 miliona mózgów owadów.

Bardzo dobrze jest scharakteryzowany hormon protorakotropowy z *Bombyx mori* aktywujący syntezę ekdyzonu. Mózg oprócz hormonu protorakotropowego o ciężarze cząsteczkowym 22 kD wytwarza mniejszy peptyd o ciężarze cząsteczkowym 4 kD nazwany bombyksyną (N a g a s a w a i współaut. 1988). Bombyksyna izolowana z 650 000 mózgów w 15-stopniowym procesie oczyszczania jest mieszaniną nieidentycznych łańcuchów A i B połączonych mostkami S-S. Łańcuch A zawiera 20 aminokwasów, łańcuch B jest mieszaniną 4 heterogennych peptydów, z których dwa zawierają 28 a dwa pozostałe 26 aminokwasów. Bombyksyna wykazuje zadziwiająco wysoki stopień identyczności (homologii) z insuliną kręgowców, szczególnie w łańcuchu A, gdzie 50% sekwencji aminokwasów w obu peptydach jest homologicznych. W łańcuchu B obserwuje się 40% homologii (rys. 4). Lokalizacja 6 reszt cysteiny w łańcuchu bombyksyny i insuliny jest identyczna



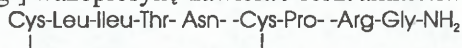
Rys. 4. Pełna sekwencja aminokwasowa bombyksyny II oraz łańcuchów A i B insuliny ludzkiej. Sekwencje homologiczne umieszczono w ramach.

co sugeruje podobną strukturę trzeciorzędową. Wykorzystując homologie w strukturze pierwszo- i trzeciorzędowej zlokalizowano miejsce syntezy bombyksyny w mózgu owada za pomocą przeciwciał dla insuliny kręgowców (I s h i z a k i i S u z u k i 1988).

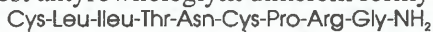
HORMON WYLINKOWY, DIURETYCZNY I NEUROPARSYNY

Hormon wylinkowy, syntetyzowany w mózgu owada stymuluje przejście do kolejnych stadiów larwalnych (larwa–larwa) oraz przejście do stadium poczwarkowego (larwa–poczwarka), odgrywa również istotną rolę przy zrzucaniu starej kutikuli przy kolejnych linieniach (N a g a s a w a 1992). Hormon wylinkowy z

Manduca sexta (K a t a o k a i współaut. 1987, M a r t i i współaut. 1987) zbudowany z 62 reszt aminokwasowych wykazuje 80% homologii do grupy czterech hormonów wylinkowych pochodzących z dorosłych owadów *Bombyx mori* (K o n o i współaut. 1987) Bom EH-EH-4 zbudowane z 61 aminokwasów, których strukturę drugorzędową wyznacza obecność sześciu mostków dwusiarczkowych S-S. Hormon diuretyczny jest neurohormonem kontrolującym prawidłową gospodarkę wodną i równowagę jonową. W tym samym roku (1987) co hormon wylinkowy scharakteryzowano dwa hormony diuretyczne wyizolowane ze zwoju podprzetykowego *Locusta migratoria* (P r o u x i współaut. 1987) dwa peptydy wazopresynopodobne F₁ i F₂. Peptyd F₂ występujący bardziej obficie niż F₁ przypominający [Arg⁸] wazopresynę zawiera 9 reszt aminokwasowych o sekwencji:



natomiast peptyd F₂ jest antyrównoległym dimerem formy F₁:



Rola czynnika F₁ nie jest znana, natomiast F₂ działa jak hormon diuretyczny, poprzez cykliczny AMP. Przyjmuje się, że hormon diuretyczny stymuluje wydzielanie moczu przez cewki Malpighiego, lecz może również oddziaływać na resorpcję płynów w jelicie tylnym owada.

Opisany przez Kataokę (K a t a o k a i współaut. 1989) hormon diuretyczny wyizolowany z głów *Manduca sexta* jest peptydowym monomerem o długości 41 reszt aminokwasowych, stymulującym *in vivo* wydzielanie płynu u dwóch gatunków *Lepidoptera*, wykazującym 43%–50% homologii w strukturze pierwszorzędowej do hormonu diuretycznego z *Locusta migratoria* (O t a i współaut. 1991, Lehmberg i współaut. 1991).

Neuroparsyny A (NPA) i B (NPB) są dwoma dimerycznymi hormonami wyizolowanymi z *corpora cardiaca* *Locusta migratoria* (G i r a r d i e i współaut. 1985). Są to wielofunkcyjne hormony wpływające na gospodarkę wodną, poziom lipidów i węglowodanów oraz wzrost oocyty (G i r a r d i e i współaut. 1989). Opracowanie pełnej struktury pierwszorzędowej NPA (G i r a r d i e 1990) wykazało, że jest to mieszanina 4 heterogennych na końcu N peptydów występujących w proporcjach 70%, 20%, 5%, 5%, o masie około 8760 daltonów i jest przekształcana w wyniku obróbki proteolitycznej w neuroparsynę B.

PBAN/MRCH I HORMON DIURETYCZNY

Neuropeptyd aktywujący biosyntezę feromonów — PBAN (pheromone biosynthesis activating neuropeptide) jest wytwarzany w zwoju podprzetykowym samic oraz samców motyli. Wydzielany do hemolimfy stymuluje gruczoł feromonalny do syntezy feromonu(ów), przyciągających osobniki przeciwnej płci (R a i n a i K l u n 1984, R a i n a i współaut. 1987, 1989, K i t a m u r a i współaut.

1989). PBAN scharakteryzowano u dwóch gatunków motyli — *Heliothis zea* i *Bombyx mori*. Dwie formy hormonu *B. mori* PBAN-I i PBAN-II są liniowymi peptydami zbudowanymi z 33 i 34 reszt aminokwasowych. PBAN-I wykazuje 82% homologii z PBAN *Heliothis* (Matsumoto i współaut. 1990). Badania nad wpływem struktury na aktywność PBAN-I wykazały, że reszty metioniny w pozycjach 5, 14 i 22 decydują o zachowaniu aktywności, bowiem ich modyfikacja powoduje dramatyczny spadek aktywności peptydu. Najmniejszą częścią, zachowującą aktywność biologiczną był pentapeptyd o sekwencji charakterystycznej dla obszaru końca karboksylowego cząsteczki (Matsumoto i współaut. 1990).

Hormony melanizujące MRCH-I, -II, -III *Bombyx mori*, z których tylko pierwszy jest zsekwencjonowany całkowicie, są identyczne z PBAN *Bombyx mori*. Obydwa peptydy zarówno w formie natywnej, jak i syntetycznej wykazują aktywność biologiczną w obu procesach: melanizacji i syntezie feromonów.

Hormon diapauzy występuje w embrionalnym stadium rozwojowym. Jest syntetyzowany w zwoju podprzelykowym samicy i indukuje diapauzę embrionalną. Neuropeptyd ten jest zbudowany z 24 reszt aminokwasowych z zablokowanym końcem C w postaci amidu, decydującym o jego aktywności. Hormon diapauzy wykazuje homologię sekwencji z hormonami PBAN/MRCH i hormonami miotropowymi w obszarze karboksylowego końca cząsteczki.

Analiza podobieństw i różnic między neuropeptydami owadów i kręgowców wskazuje na brak homologii sekwencji z peptydami kręgowców w następujących hormonach: hormon protorakotropowy (PTTH), wylinkowy i diapauzy. Wszystkie wymienione wyżej hormony są związane z procesami charakterystycznymi dla rozwoju owada, jak linienie, metamorfoza czy diapauza. Niektóre z nich wykazują pewne podobieństwo do neuropeptydów innych owadów czy skorupiaków, na przykład hormon diapauzy i PBAN/MRCH w części karboksylowej cząsteczki do peptydów miotropowych, także hormony adypokinetyczne z hormonem melanizującym krewetki i fragmentami cząsteczki glukagonu i sekretyny (rys. 5).

Badania immunohistochemiczne przy użyciu przeciwciał dla hormonów kręgowców wykazały liczne reakcje pozytywne w tkankach owadów. Pierwsze peptydy kręgowco-podobne, rozpoznawane przez przeciwciała dla insuliny i glukagonu, opisano w 1976 roku (Tager i współaut. 1976). Jak wspomniano wyżej, bombyksyna wykazuje 40%–50% homologii do insuliny ludzkiej tak, że przeciwciało dla insuliny może rozpoznawać obszary cząsteczki o wysokiej homologii. Z kolei hormon hiperglikemiczny z *Periplaneta* (CAH-II) o aktywności kardiotropowej ma sekwencję aminokwasową podobną do obszaru N-końca cząsteczki glukagonu (Scarborough i współaut. 1984). Opisano także pozytywne reakcje z przeciwciałami dla gastryny/cholecystokininy (Kramer i współaut. 1977, Duvet i Thrope 1981).

Leukosulfakinina, mająca 55% homologii z gastryną II (Nachman i współaut. 1986) jest rozpoznawana przez przeciwciała dla gastryny/cholecysto-

kininy, podobnie jak locustatachykininy (Loc-TK-I-IV) wykazujące 20%–45% homologii do tacliykinin kręgowców (Schoofs i współaut. 1990a i b).

Peptyd	Sekwencja	Występowanie
Bradykinina	R - P - P - G - F - S - P - F - R	Ssaki
RPCH	pQ - L - N - F - S - P - G - W · NH ₂	Skorupiaki
AKH II-L	pQ - L - N - F - S - A - G - W · NH ₂	Locusta
AKH II-S	pQ - L - N - F - S - T - G - W · NH ₂	Schistocerca
AKH-G=Ro II	pQ - V - N - F - S - T - G - W · NH ₂	Gryllus, Romalea
H. Hypertrehalosemiczny	pQ - V - N - F - S - P - G - W - G - T · NH ₂	Blaberus, Nauphoeta
Neurohormon D	pQ - V - N - F - S - P - N - W · NH ₂	Periplaneta
Ro I	pQ - V - N - F - T - P - N - W - G - T · NH ₂	Romalea
AKH I	pQ - L - N - F - T - P - N - W - G - T · NH ₂	Locusta, Schistocerca
H. Hypertrehalosemiczny I	pQ - L - T - F - T - P - N - W - G - T · NH ₂	Carausius
M II	pQ - L - T - F - T - P - N - W · NH ₂	Periplaneta
H-AKH=M-AKH	pQ - L - T - F - T - S - S - W - G · NH ₂	Heliothis, Manduca
Glukagon	H - S - Q - G - T - F - T - S - D - Y - S - ... (29)	Ssaki
Sekretyna	H - S - D - G - T - F - T - S - E - L - S - ... (27)	Ssaki
Leukopyrokinina	pQ - T - S - F - T - P - R - L · NH ₂	Periplaneta

Rys. 5. Homologia sekwencji aminokwasowych peptydów rodziny hormomów melanizujących/adypokinetycznych (RPCH/AKH) i innych neuropeptydów.

Skróty literowe oznaczają: A — alanina, D — kwas asparaginowy, E — kwas glutaminowy, F — fenyloalanina, G — glicyna, H — histydyna, L — leucyna, N — asparagina, P — prolina, Q — glutamina, R — arginina, S — seryna, T — treonina, V — walina, W — tryptofan, Y — tyrozyna.

Znaczenie silnie zakonserwowanych sekwencji u tak odległych organizmów jest być może związane z regulacją podobnych procesów fizjologicznych, jak w przypadku procesu trawienia udział gastryny/cholecystokininy i leukosulfakiny (rys. 6).

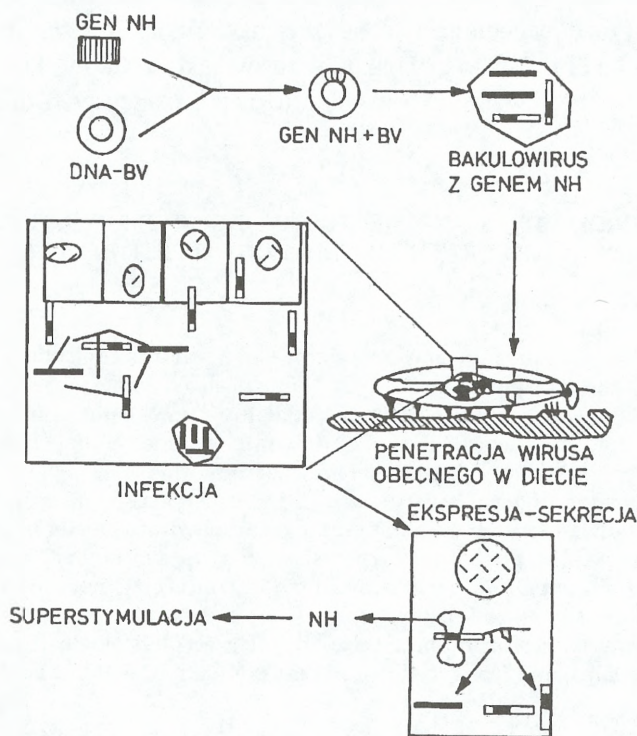
O dynamicznym rozwoju badań nad strukturą i funkcją neuropeptydów u owadów świadczy najlepiej fakt, że do roku 1984 opisano budowę jedynie czterech z nich, a obecnie poznano już sekwencje ponad 50 peptydów biologicznie czynnych, wyizolowanych z tkanek neurohemalnych owadów.

ZASTOSOWANIE NEUROHORMONÓW DO KONTROLI POPULACJI SZKODNIKÓW

Poznanie budowy neuropeptydów i ich udziału w kontroli procesu rozwoju i reprodukcji stanowi podstawę praktycznego wykorzystania tej wiedzy do regulowania liczebności populacji szkodników owadzych. Tradycyjne insektycydy, skutecznie eliminujące szkodniki, działają jednak ubocznie na owady pożyteczne a także kumulują się w środowisku, zaburzając równowagę ekologiczną. W poszukiwaniu naturalnych patogenów owadzych rozwinięto badania nad bakteriami i wirusami atakującymi owady.

nie przed szkodliwymi czynnikami środowiska stanowi otoczka polihedrynowa, która musi ulec rozpuszczeniu w jelicie środkowym owada w silnie alkalicznym pH rzędu 9,5–11, aby mogła nastąpić infekcja. Szybkość działania bakulowirusa jako insektycydu może być podniesiona przez włączenie do genomu wirusa obcych genów kodujących enzymy (B o n n i n g i wspólat. 1992, hormony (M a e d a 1989) czy toksyny owadów (T o m a l s k i i Miller 1991). Przyjmuje się obecnie, że najlepszą strategią w kontroli populacji szkodników owadzych będzie wykorzystanie bakulowirusa jako nośnika genów, kodujących neurohormony owadów.

Neurohormony, będące głównymi regulatorami wszystkich procesów życiowych u owadów, specyficzne gatunkowo, ze względu na swój peptydowy charakter nie mogą być aplikowane w tradycyjny sposób. Nie przenikają one bowiem przez kutikulę, a podawane z dietą zostaną strawione przez enzymy proteolityczne układu pokarmowego owada. Jedyną formą wprowadzenia neuropeptydu do organizmu owada jest transformacja genomu bakulowirusa, który będzie zawierał sekwencje kodujące hormon (rys. 7). Infekcja takim bakulowirusem prowadzi do



Rys. 7. Proponowana strategia zastosowania bakulowirusa do kontroli populacji larw *Lepidoptera*.

1 — Skonstruowanie bakulowirusa z obcym genem, istotnym dla kontroli procesów metabolicznych u owada.
2 — Bakulowirus wprowadza do organizmu owada sekwencję genu kodującego neurohormon.
3 — Superstymulacja, czyli nadprodukcja peptydu biologicznie czynnego prowadzi do zaburzenia równowagi hormonalnej w organizmie owada poprzez aktywowanie lub hamowanie procesów metabolicznych kontrolowanych przez NH.

Użyte skróty: gen NH — gen kodujący neurohormon; DNA BV — DNA bakulowirusa.

nadprodukcji konkretnego neurohormonu i zaburzenia równowagi metabolicznej u owada.

Dobrym wirusem do utworzenia takiej konstrukcji jest bakulowirus niosący sekwencję dla hormonu diuretycznego/antydiuretycznego.

Wszystkie gąsienice *Lepidoptera*, do których zalicza się wiele szkodników upraw rolnych (bielinek kapustnik, owocówka jabłkóweczka) i lasów (brudnica nieparka, brudnica mniszka, barczatka sosnówka) mają miękką powłokę ciała i są bardzo wrażliwe na równowagę w gospodarce wodnej organizmu.

Nadmierne wydalenie wody prowadzi do utraty sprężystości i możliwości poruszania się, z kolei zatrzymywanie nadmiaru wody hamuje pobieranie pokarmu i powoduje zaprzestanie żerowania. Dokładniejsze informacje o strukturze neurohormonów i oddziaływaniu ich miejsc aktywnych z receptorami pozwoliłoby na syntezę związków będących antagonistami lub superagonistami właściwych neurohormonów. W tym przypadku również rola bakulowirusa we wprowadzeniu tych związków do organizmu owada jest kluczowa. Liczba doniesień literaturowych w okresie ostatnich 4 lat świadczy o tendencji odchodzenia od stosowania tradycyjnych insektycydów chemicznych na rzecz bakterii, jak *Bacillus thuringiensis* (English i Slatin 1992) czy bakulowirusów jako środków skuteczniejszych, działających bardziej wybiórczo a przez to bezpieczniejszych dla środowiska naturalnego.

INSECT NEUROPEPTIDES AND PERSPECTIVES OF THEIR PRACTICAL USE IN CONTROLLING THE POPULATION OF PEST INSECTS

Summary

Neuropeptides are the most important group of hormones controlling development, metamorphosis and reproduction of insects. They can also regulate the level of two typical insect hormones — the juvenile hormone (allatostatins, allatotropin) and ecdysone (prothoracicotropic hormone). During the last ten years numerous data has been reported on the structure, synthesis and function of insect neurohormones.

The knowledge of primary structure of these very powerful agents influencing mitotropic functions the metabolism of lipids and carbohydrates, water balance, diapause and eclosion as well as pheromone synthesis in insects, can be very useful. By using baculovirus as a vector, the genetic information concerning neurohormones can be introduced quite easily into insect organisms.

The overproduction of an important regulator of insect physiological functions changes the very fine balance and leads to death of pest population, without application of any chemicals.

LITERATURA

- Bonning B. C., Hirst M., Possee R. D., Hammock B. D., 1992. *Further development of a recombinant baculovirus insecticide expressing the enzyme juvenile hormone esterase from Heliothis virescens*. Insect Biochem. Molec. Biol. 22 (5), 453–458.

- Brown B. E., Starratt A. N., 1975. Isolation of proctolin, a myotropic peptide, from *Periplaneta americana*. *J. Insect Physiol.* 21, 1879–1881.
- Cusinato O., Wheeler C. H., Goldsworthy G. J., 1991. The identity and physiological actions of an adipokinetic hormone in *Acheta domestica*. *J. Insect Physiol.* 37, (6), 461–469.
- Cymborowski B., 1984. *Endokrynologia owadów*. PWN, Warszawa.
- De Loof A., Schoofs L., 1990. Homologies between the amino acid sequences of some vertebrate peptide hormones and peptides isolated from invertebrate sources. *Comp. Biochem. Physiol.* 95B, 459–468.
- Duve H., Thrope A., 1981. Gastrin/cholecystokinin (CCK)-like immunoreactive neurones in the brain of the blowfly. *Calliphora erythrocephala* (Diptera). *Gen. comp. Endocrinol.* 43, 381–391.
- English L., Slatin S. L., 1992. Mode of action of delta-endotoxins from *Bacillus thuringiensis*: a comparison with other bacterial toxins. *Insect Biochem. Molec. Biol.* 22 (1), 1–7.
- Entwistle P. F., Evans M. F. 1985. *Viral control* [W:] G. A. Kerkut i L. J. Gilbert (red.). *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Physiology*, Pergamon Press, 7, 348–412.
- Fernlund P., 1976. Structure of a light-adapting hormone from the shrimp, *Pandalus borealis*. *Biochim. Biophys. Acta* 439, 17–25.
- Fernlund P., Josefsson L., 1972. Crustacean color-change hormone: Amino acid sequences and chemical synthesis. *Science* 177, 173–174.
- Gade G., 1986. Relative hypertrehalosemic activities peptides from the American cockroach. *Z. Naturforsch.* 40c, 670–676.
- Gade G., 1988. New structures of insect neuropeptides. *Endocrinological frontiers in physiological insect ecology*, tom II.
- Gade G., 1989. Characterisation of neuropeptides of the AKH/RPCH-family from corpora cardiaca of Coleoptera. *J. Comp. Physiol. B* 159, 589–596.
- Gade G., 1990. The adipokinetic hormone/red pigment-concentrating hormone peptide family: structures, interrelationships and functions. *J. Insect. Physiol.* 36, (1), 1–12.
- Girardie J., Faddoul A., Girardie A., 1985. Characterization of three neurosecretory proteins from the A median neurosecretory cells of *Locusta migratoria* by coupled chromatographic, electrophoretic and isoelectrofocusing methods. *Insect Biochem.* 15, (1), 85–92.
- Girardie J., Girardie A., Huet J.-C., Pernollet J.-C., 1989. Amino acid sequence of locust neuroparsins. *FEBS Lett.* 245, (1, 2), (4, 8).
- Girardie J., Huet J.-C., Pernollet J.-C., 1990. The locust neuroparsin A: sequence and similarities with vertebrate and insect polypeptide hormones. *Insect Biochem.* 20, (7), 659–666.
- Holman G. M., Cook B. J., Nachman R. J., 1986a. Isolation, primary structure and synthesis of two neuropeptides from *Leucophaea maderae*: Members of a new family of cephalomyotropins. *Comp. Biochem. Physiol.* 84C, 205–211.
- Holman G. M., Cook B. J., Nachman R. J., 1986b. Primary structure and synthesis of two additional neuropeptides from *Leucophaea maderae*: Members of a new family of cephalomyotropins. *Comp. Biochem. Physiol., C*; 84C, (2), 271–276.
- Holman G. M., Cook B. J., Nachman R. J., 1987a. Isolation, primary structure, and synthesis of leucokinins V and VI: Myotropic peptides of *Leucophaea maderae*. *Comp. Biochem. Physiol., C*; 88C, (1), 27–30.
- Holman G. M., Cook B. J., Nachman R. J., 1987b. Isolation, primary structure and synthesis of leucokinins VII and VIII: The final members of this new family of cephalomyotropic peptides isolated from head extracts of *Leucophaea maderae*. *Comp. Biochem. Physiol., C*; 88C, (1), 31–34.
- Ishizaki H., Suzuki A., 1988. An insect brain peptide as a member of insulin family. *Horm. metabol. Res.* 20, 426–429.
- Kataoka H., Troeschler R. G., Kramer S. J., Cesarin B. J., Schooley D. A., 1987. Isolation and primary structure of the eclosion hormone of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 146, (2), 746–750.

- Kataoka H., Toschi A., Li J. P., Carney R. L., Schooley D. A., Kramer S. J., 1989. *Identification of an allatotropin from adult Manduca sexta*. Science 243, 1481–1483.
- Kataoka H., Troetschler R. G., Kramer S. J., Carney R. L., Schooley D. A., 1989. *Isolation and identification of a diuretic hormone from the tobacco hornworm, Manduca sexta*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86, 2976–2980.
- Keeley L. L., Hayes T. K., 1987. *Speculations on biotechnology applications for insect neuroendocrine research*. Insect Biochem. 17, (5), 639–651.
- Kitamura A., Nagasawa H., Kataoka J., Inoue T., Matsumoto S., 1989. *Amino acid sequence of pheromone-synthesis-activating neuropeptide (PBAN) of the silkworm, Bombyx mori*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 163, 520–526.
- Kono T., Nagasawa H., Isogai A., Fugo H., Suzuki A., 1987. *Amino acid sequence of eclosion hormone of the silkworm, Bombyx mori*. Agric. Biol. Chem. 51, 2307–2308.
- Konopińska D., Rosiński G., Sobótka W., 1990. *Hormony peptydowe owadów*. Wiadomości chemiczne 44, 773.
- Konopińska D., Rosiński G., Sobótka W., 1992. *Insect peptide hormones, an overview of the present literature*. Int. J. Peptide Protein Res. 39, 1–11.
- Kopeć S., 1917. *Experiments on metamorphosis of insects*. Bull. int. Acad. Sci. Cracovie (B) 57–60.
- Kopeć S., 1922. *Studies on the necessity of the brain for the inception of insect metamorphosis*. Biol. Bull. 42, 322–342.
- Kramer J. K., Spiers R. D., Childs C. N., 1977. *Immunochemical evidence for a gastrin-like in insect neuroendocrine system*. Gen. comp. Endocrinol. 32, 423–426.
- Lafont R., 1991. *Reverse endocrinology, or „hormones” seeking functions*. Insect Biochem. 21, (7), 697–721.
- Lehmerg E., Ota R. B., Furuya K., King D. S., Applebaum S. W., Ferenz H. J., Schooley D. A., 1991. *Identification of diuretic hormone of Locusta migratoria*. Biochem. Biophys. Res. Commun., 179, 1036–1041.
- Licari P., Bailey J. E., 1992. *Modeling the population dynamics of baculovirus-infected insect cells: Optimizing infection strategies for enhanced recombinant protein yields*. Biotechnol. Bioeng. 39, (4), 432–441.
- Luckow V. A., Summers M. D., 1988. *Signals important for high-level expression of foreign genes in Autographa californica nuclear polyhedrosis virus expression vectors*. Virology 167, 56–71.
- Maeda S., 1989. *Increased insecticidal effect by a recombinant baculovirus carrying a synthetic diuretic hormone gene*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 165, (3), 1177–1183.
- Marti T., Takio K., Walsh K. A., Terzi G., Truman J. W., 1987. *Microanalysis of the amino acid sequence of the eclosion hormone from the tobacco hornworm Manduca sexta*. FEBS Lett. 219, (2), 415–418.
- Matsumoto S., Isogai A., Suzuki A., 1985. *N-Terminal amino acid sequence of an insect neurohormone, melanization and reddish colouration hormone (MRCH): heterogeneity and sequence homology with human insulin-like factor II*. FEBS Lett. 189, 115–118.
- Matsumoto S., Kitamura A., Nagasawa H., Kataoka H., Orikasa C., Mitsui T., Suzuki A., 1990. *Functional diversity of a neurohormone produced by the suboesophageal ganglion: molecular identity of melanization and reddish colouration hormone and pheromone biosynthesis activating neuropeptide*. J. Insect Physiol. 36, 427–432.
- Michalik J., 1991. *Owadzi hormon juvenilny. Synteza, degradacja oraz oddziaływanie na poziomie komórkowym i tkankowym*. Postępy biochemii 37, 172–178.
- Moshitzky P., Henzel W. J., Rafaeli A., Ramachandran J., Applebaum S. W., 1987. *Synthesis of adipokinetic hormone (AKH-I) in the locust brain*. Insect Biochem. 17, (8), 1133–1137.
- Moshitzky P., Applebaum S. W., 1990. *The role of adipokinetic hormone in the control of vitellogenesis in locusts*. Insect Biochem. 20, (3), 319–323.

- Nachman R. J., Holman G. M., Haddon W. F., Ling N., 1986. *Leucosulfakinin, a sulfated insect neuropeptide with homology to gastrin and cholecystokinin*. Science 234, 71–73.
- Nagasawa H., Maruyama K., Sato B., Hietter H., Kataoka H., Isogai A., Tamura S., Ishizaki H., Semba T., Suzuki A., 1987. *Structure and synthesis of Bombyxin from the silkworm, Bombyx mori*. [W:] T. Shiba, S. Sakakibara (red.). *Peptide Chemistry*. Protein Research Foundation, Osaka, 1988
- Nagasawa H., 1992. *Neuropeptides of the silkworm, Bombyx mori*. Experientia 48, 425–429.
- Ota R. B., Furuya K., King D. S., Applebaum S. W., Ferenz H.-J., Schooley D. A., 1991. *Identification of a diuretic hormone of Locusta migratoria*. Biochemical and biophysical communications 179, (2), 1036–1041.
- Pratt G. E., Farnsworth D. E., Siegel N. R., Fok K. F., Feyereisen R., 1989. *Identification of an allatostatin from adult Diptera punctata* G. Biochem. Biophys. Res. Commun. 163, (3), 1243–1247.
- Proux J. P., Miller C. A., Li J. P., Carney R. L., Girardie A., Delaage M., Schooley D. A., 1987. *Identification of an arginine vasopressin-like diuretic hormone from Locusta migratoria*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 30, 180–186.
- Raina A. K., Jaffe H., Klun J. A., Ridgway R. L., Hayes D. K., 1987. *Characteristics of a neurohormone that controls sex pheromone production in Heliothis zea*. J. Insect Physiol. 33, (11), 809–814.
- Raina A. K., Jaffe H., Kempe T. G., Keim P., Blacher R. W., Fales H. M., Riley C. T., Klun J. A., Ridgway R. L., Hayes D. K., 1989. *Identification of a neuropeptide that regulates sex pheromone production in female moths*. Science 244, 796–798.
- Raina A. K., Klun J. A., 1984. *Brain factor control of sex pheromone production in the female corn earworm moth*. Science 225, 531–533.
- Rosiński G., Gade G., 1988. *Hyperglycaemic and myoactive factors in the corpora cardiaca of the mealworm, Tenebrio molitor*. J. Insect. Physiol. 34, (11), 1035–1042.
- Scarborough R. M., Jamieson G. C., Kalish F., Kramer S. J., McEnroe G. A., Miller C. A., Schooley D. A., 1984. *Isolation and primary structure of two peptides with cardioacceleratory and hyperglycemic activity from the corpora cardiaca of Periplaneta americana*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81, 5575–5579.
- Schoofs L., Holman G. M., Hayes T. K., Kochansky J. P., Nachman R. J., DeLoof A., 1990a. *Locustatachykinin III and IV: two additional insect neuropeptides with homology to peptides of the vertebrate tachykinin family*. Regul. Pept. 31, 199–212.
- Schoofs L., Holman G. M., Hayes T. K., Nachman R. J., DeLoof A., 1990b. *Locustatachykinin I and II, two novel insect neuropeptides with homology to peptides of the vertebrate tachykinin family*. FEBS Lett. 261, (2), 397–401.
- Steinhaus, E. A. 1946. *Insect Microbiology*. Cornstock, New York.
- Stone J. V., Mordue W., Batley K. E., Morris H. R., 1976. *Structure of locust adipokinetic hormone, a neurohormone that regulates lipid utilisation during flight*. Nature 263.
- Stone J. V., Mordue W., Broomfield C., Hardy P. M., 1978. *Structure-activity relationships for the lipid-mobilising action of locust adipokinetic hormone*. Eur. J. Biochem. 89, 195–202.
- Tager H. S., Markese J., Kramer K. J., Spiers R. D., Childs C. N., 1976. *Glukagon-like hormones in the insect neurosecretory system*. Biochem. J. 156, 515–520.
- Tomalski M. D., Miller L. K., 1991. *Insect paralysis by baculovirus - mediated expression of a mite neurotoxin gene*. Nature 352, 82–85.
- Woodhead A. P., Stay B., Seidels L., Khan M. A., Tobe S. S., 1989. *Primary structure of four allatostatins: Neuropeptide inhibitors of juvenile hormone synthesis*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86, 5997–6001.
- Zelazny B., Lolong A., Pattang B., 1992. *Oryctes rhinoceros (Coleoptera: Scarabaeidae) population suppressed by a baculovirus*. J. Invertebr. Pathol. 59 (1), 61–68.