

INSTYTUT CHEMII ORGANICZNEJ, BIOCHEMII
I BIOTECHNOLOGII
POLITECHNIKI WROCŁAWSKIEJ

Raport Serii PREPRINTY Nr 2

BADANIA NAD INTERAKCJĄ HORMON
JUWENILNY - BIAŁKO WIĄŻĄCE
HORMON JUWENILNY Z HEMOLIMFY
MOLA WOSKOWEGO GALLERIA MELLO-
NELLA.

Elżbieta Wieczorek

Praca doktorska

Słowa kluczowe:

hormon juwenilny,
białko wiążące hormon
juwenilny, zmiana kon-
formacyjna, przekazywa-
nie sygnałów hormonal-
nych, Galleria mellonel-
la.

W r o c ł a w 1993

**BADANIA NAD INTERAKCJĄ HORMON JUWENILNY -
BIAŁKO WIĄŻĄCE HORMON JUWENILNY Z HEMOLIMFY
MOLA WOSKOWEGO *GALLERIA MELLONELLA*.**

Elżbieta Wieczorek

Praca Doktorska

wykonana w:

Instytucie Chemii Organicznej i Fizycznej
(obecnie Instytut Chemii Organicznej,
Biochemii i Biotechnologii)
Politechniki Wrocławskiej

pod kierunkiem
prof.dr hab. Mariana Kochmana

Wrocław, 1993

moim Rodzicom

Dziękuję mojemu promotorowi Panu Profesorowi **Marianowi Kochmanowi** nie tylko za pomoc i prowadzenie mojej pracy doktorskiej ale również za cierpliwość i gotowość na wszelką dyskusję.

Dziękuję dr **Tomkowi Żalowi** za pomoc w wykonaniu eksperymentów HPLC.

Dziękuję **koleżankom i kolegom z Zespołu Biochemii** za wytrwałą postawę koleżeńską, pomoc w rozwiązywaniu problemów, za cenne rady i uwagi, które pomagały mi w pracy.

Dziękuję tym wszystkim którzy chętnie służyli dobrym słowem, radą i pomocą w mojej pracy.

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

ADH	hormon antydiuretyczny
AKH	hormon adypokinetyczny
CA	<i>corpora allata</i>
CBG	białko transportujące kortykosterydy w surowicy
CC	<i>corpora cardiaca</i>
CP- α , CP- β	formy białka transportującego hormon juwenilny w hemolimfie <i>Manduca sexta</i>
DFP	diizopropylofluorofosforan
DH	hormon diuretyczny
DOPA	3,4-dihydroksyfenyloalanina
dpm	rozpady na minutę
EcdR	receptor ekdysterydowy
EGF	epidermalny czynnik wzrostu
EH	hormon wylinkowy
ELH	hormon składania jaj
ER	receptor estradiolowy
GABA	kwas γ -aminomasłowy
GR	receptor glukokortykoidowy
<i>hRAR</i>	gen ludzkiego receptora kwasu retinowego
hsp27, hsp90	białka szoku termicznego o masach cząsteczkowych 90 kDa i 27 kDa
<i>hsp</i>	gen białka szoku termicznego
5HT	5-hydroksytryptamina (serotonina)
HTF	hemolimfowy czynnik wzrostu
IGF	insulino-podobny czynnik wzrostu
IP ₃	inozytolo-1,4,5-trifosforan
JH	hormon juwenilny
JHB ₃	bisepoksydowy homolog hormonu juwenilnego
JHBP	białko wiążące hormon juwenilny
JHE	specyficzna esteraza hormonu juwenilnego
K _d	stała dysocjacji
LCP	białko kutikuli larwalnej
LDH	dehydrogenaza mleczanowa
<i>Manduca RAR</i>	gen z <i>Manduca sexta</i> o sekwencji homologicznej do genu ludzkiego receptora kwasu retinowego

MR	receptor mineralokortykoidowy
MRCH	hormon melanizacji i czerwonego zabarwienia
OVA	albumina z jaj kurzych
PBS	roztwór soli fizjologicznej
PMSF	fluorek kwasu <i>p</i> -toluenosulfonowego
PR	receptor progesteronowy
PTTH	hormon protorakotropowy
RAR	receptor kwasu retinowego
RXR	receptor kwasu 9- <i>cis</i> retinowego
SBP	białka transportujące hormony płciowe w surowicy
TR	receptor hormonu tyroidowego
usp	"ultraspiracle protein" – homolog receptora retinoidów
VDR	receptor witaminy D ₃
V-erbA	receptor białka wirusowego erbA
w/v	stosunek wagowo–objętościowy

Wszystkie pozostałe skróty zostały użyte zgodnie z zasadami obowiązującymi w European Journal of Biochemistry, "Informacje dla autorów " (1991).

SPIS TREŚCI	Strona
WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW	1
SPIS TREŚCI	3
STRESZCZENIE	6
WSTĘP	
1. PRZENOSZENIE SYGNAŁÓW HORMONALNYCH	8
1.1. Kręgowce	8
1.1.1. Przenoszenie hormonów do wnętrza komórek docelowych	8
1.1.1.1. Receptory wewnątrzkomórkowe-czynniki transkrypcji	9
1.1.1.2. Receptory transmembranowe o aktywności tyrozylowej kinazy białkowej	11
1.1.1.3. Receptory transmembranowe związane z systemem przekaźników informacji drugiego rzędu	11
1.1.1.4. Transmembranowe receptory o funkcji kanału jonowego regulowane wiązaniem ligandu	14
1.2. Owady	16
1.2.1. Rodzaje hormonów występujących u owadów	16
1.2.2. Przenoszenie sygnału hormonalnego u owadów	24
1.2.2.1. Owadzie receptory wewnątrzkomórkowe - czynniki transkrypcji	24
1.2.2.2. Owadzie receptory transmembranowe o aktywności tyrozylowej kinazy białkowej	26
1.2.2.3. Owadzie receptory transmembranowe związane z systemem przekaźników informacji drugiego rzędu	27
1.2.2.4. Owadzie transmembranowe receptory-kanały jonowe regulowane wiązaniem ligandu	28
2. HORMONY JUWENILNE	30
2.1. Struktura	30
2.2. Rola fizjologiczna	31
2.3. Stężenie w hemolimfie	32
2.4. Regulacja poziomu	33
2.4.1. Biosynteza	33
2.4.2. Degradacja	35
2.4.3. Regulacja biosyntezy	36
2.5. Transport	38
2.5.1. Specyficzne białka wiążące i transportujące hormony juwenilne w hemolimfie	39

3. CEL PRACY	43
CZĘŚĆ EKSPERYMENTALNA	
4. MATERIAŁY I METODY	44
4.1. Odczynniki	44
4.2. Hodowla owadów, zbieranie hemolimfy i ciała tłuszczowego	44
4.3. Przygotowywanie szkła laboratoryjnego używanego do pracy z hormonem juvenilnym	45
4.4. Pomiar aktywności białek: białka wiążącego hormon juvenilny, aldolazy i fosfatazy alkalicznej	45
4.5. Otrzymywanie białka wiążącego hormon juvenilny	46
4.6. Elektroforeza żelowa	46
4.7. Wirowanie w gradiencie gęstości sacharozy	47
4.8. Sieciowanie białek aldehydem glutarowym	47
4.8.1. Sieciowanie aldolazy	47
4.8.2. Sieciowanie białka wiążącego hormon juvenilny i białek kontrolnych	48
4.9. Trawienie enzymami proteolitycznymi	48
4.9.1. Trawienie białka wiążącego hormon juvenilny	48
4.9.2. Trawienie aldolazy	49
4.10. Otrzymywanie frakcji membranowej z ciała tłuszczowego	49
4.11. Jodowanie białka wiążącego hormon juvenilny	50
4.12. Wiązanie znakowanego białka wiążącego hormon juvenilny do frakcji membranowej	50
4.13. Oznaczanie stężenia białka	50
4.14. Western blotting	51
4.15. HPLC	51
4.16. Degradacja i oznaczanie metabolitów hormonu juvenilnego	51
5. WYNIKI	53
5.1. Wpływ ligandu na właściwości białka wiążącego hormon juvenilny	54
5.1.1. Wpływ na ruchliwość elektroforetyczną	54
5.1.2. Wpływ na właściwości hydrodynamiczne	56
5.1.3. Poszukiwanie form oligomerycznych	58
5.2. Poszukiwanie enzymu umożliwiającego ograniczoną proteolizę białka wiążącego hormon juvenilny	60
5.3. Trawienie subtylizyną	62
5.3.1. Inaktywacja białka wiążącego hormon juvenilny przez subtylizynę	62
5.3.2. Wpływ trawienia subtylizyną na integralność cząsteczki białka wiążącego hormon juvenilny	64

5.3.3.	Określenie zdolności wiązania hormonu juvenilnego przez produkty trawienia białka wiążącego subtylizyną	67
5.4.	Poszukiwanie receptora membranowego dla białka wiążącego hormon juvenilny	70
5.4.1.	Określenie degradacji hormonu przez frakcję membranową otrzymaną z ciała tłuszczowego	70
5.4.2.	Właściwości jodowanego białka wiążącego hormon juvenilny	71
5.4.3.	Czasowa zależność wiązania jodowanego białka wiążącego hormon juvenilny do frakcji membranowej z ciała tłuszczowego	72
6.	DYSKUSJA	74
6.1.	Zmiana konformacyjna białka wiążącego hormon juvenilny indukowana wiązaniem ligandu	74
6.2.	Molekularny mechanizm działania hormonu juvenilego	77
6.3.	Czy istnieje receptor membranowy dla białka wiążącego hormon juvenilny - analogia do receptorów białek transportujących hormony sterydowe kręgowców?	78
7.	LITERATURA	81
8.	SPIS RYSUNKÓW	111
9.	SPIS TABEL	113

STRESZCZENIE

Potwierdzono, że homogenne białko wiążące hormon juwenilny (JHBP) z hemolimfy larw *Galleria mellonella*, izolowane według procedury OŻYHARA i KOCHMANA (1987) i używane do doświadczeń, jest niezdegradowane. Przeciwciała monoklonalne wytworzone do oczyszczonego JHBP rozpoznają w hemolimfie białko o takiej samej ruchliwości elektroforetycznej.

Stwierdzono, że hormon juwenilny (JH) zmniejsza ruchliwość elektroforetyczną JHBP, w warunkach nie-denaturujących. Efekt ten jest specyficzny, gdyż JH nie wpływa na ruchliwość elektroforetyczną innych białek.

Za pomocą techniki wirowania w gradiencie gęstości sacharozy, pokazano, że wiązanie hormonu juwenilnego do JHBP zmienia współczynnik sedymentacji z wartości 2.3 S dla wolnego białka do wartości 2.71 S dla kompleksu JHBP-JH.

Wyniki sieciowania aldehydem glutarowym wykazują, że wiązanie hormonu nie prowadzi do oligomeryzacji JHBP.

Wyniki trawienia JHBP wybranymi enzymami proteolitycznymi świadczą, że jest ono odporne na proteolizę. Trypsyna, chymotrypsyna, karboksypeptydaza A, oraz karboksypeptydaza Y nie obniżają aktywności JHBP. Jedynie trawienie subtylizyną i pepsyną prowadzi do inaktywacji białka wiążącego JH. W wyniku działania pepsyny obserwuje się bardzo szybką utratę zdolności wiązania hormonu przez JHBP, podczas gdy trawienie subtylizyną zachodzi wolno: po 16 godzinach trawienia w temperaturze 25 °C białko zachowuje 30% aktywności początkowej. Pokazano, że hormon juwenilny chroni JHBP przed inaktywacją przez subtylizynę: po 16 godzinach trawienia białka wiążącego JH, w obecności ligandu, w 25°C, aktywność początkowa jest zachowywana w 70%. Pseudo-pierwszorzędowe stałe degradacji JHBP wynoszą $6.5 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ w nieobecności hormonu i $2.7 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ w obecności hormonu. Efekt ochronny wywierany przez JH jest specyficzny dla JHBP.

W wyniku degradacji JHBP przez subtylizynę powstaje jeden główny produkt o masie cząsteczkowej około 30 kDa oraz kilka polipeptydów o masie 20–25 kDa, które są szybko degradowane do mniejszych fragmentów. Główny produkt trawienia JHBP subtylizyną zachowuje zdolność do wiązania hormonu. Wyznaczone za pomocą analizy Scatcharda stałe dysocjacji JH I dla tego produktu i dla natywnego JHBP wynoszą odpowiednio 207 nM i 86 nM.

Na podstawie powyższych rezultatów można wnosić, że JHBP po związaniu hormonu juvenilnego zmienia swoją konformację. W poszukiwaniu znaczenia zmiany konformacyjnej (istnienia receptora membranowego) wyznaczono krzywą czasową wiązania [125]JHBP, w obecności lub nieobecności hormonu, do frakcji membranowej otrzymanej z ciała tłuszczowego *Galleria mellonella*.

WSTEP

1. PRZENOSZENIE SYGNAŁÓW HORMONALNYCH

Sir Vincent Wigglesworth napisał: "The universality of the basic framework of living matter, whether this be thought of in terms of fine structure of the cell or of the chemical processes that go forward within it, is I suppose among the major discoveries of this century" (WIGGLESWORTH, 1965). Wiele badań poświęconych poznaniu strukturalnych i molekularnych podstaw działania hormonów potwierdza myśl wyrażoną przez tego badacza. We wstępie niniejszej pracy, oprócz hormonu juvenilnego, przedstawiono przykłady hormonów znalezionych dotychczas u owadów i opisano ich działanie. Omówiono także podstawowe mechanizmy przenoszenia sygnału hormonalnego u kręgowców i u owadów, w nadziei, że taki układ pozwoli na stworzenie bardziej przejrzystego obrazu molekularnych mechanizmów hormonalnych kierujących rozwojem ontogenetycznym owadów.

1.1. Kręgowce

1.1.1. Przenoszenie hormonów do wnętrza komórek docelowych

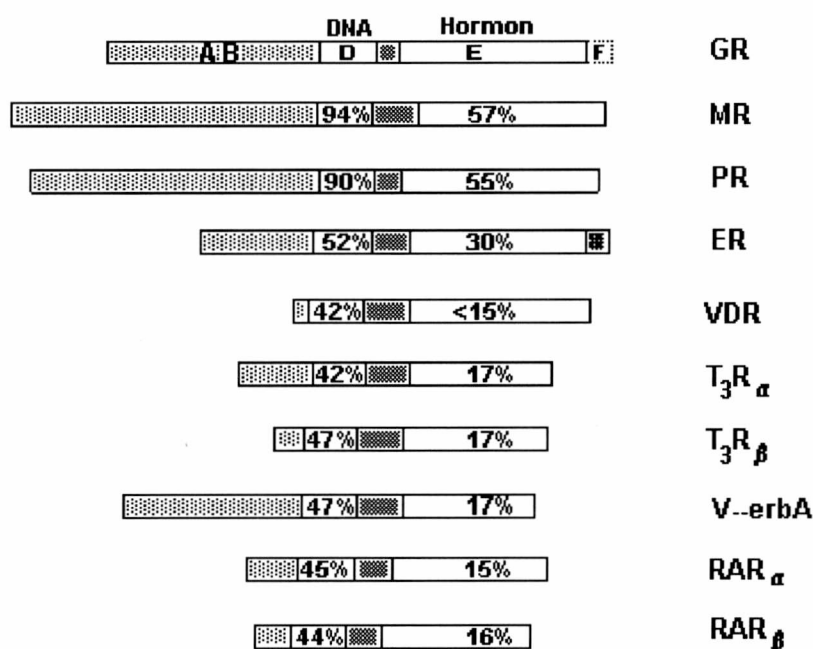
Znane są cztery mechanizmy przenoszenia sygnału hormonalnego przez błonę komórkową. Obejmują one:

- wolną lub ułatwioną dyfuzję hormonu przez błonę i wiązanie do wewnątrzkomórkowego receptora,
- receptor transmembranowy, z wewnętrzną, allosteryczną aktywnością kinazową, (enzymatyczną) regulowaną wiązaniem hormonu,
- receptor transmembranowy uruchamiający, poprzez białko G, system przekazników informacji drugiego rzędu, w odpowiedzi na wiązanie hormonu,
- transmembranowy kanał jonowy regulowany wiązaniem hormonu.

We wszystkich opisanych powyżej mechanizmach zmiana konformacyjna receptora indukowana ligandem jest krytycznym zdarzeniem, pośredniczącym w przemianie informacji hormonalnej w biologiczną odpowiedź komórki.

1.1.1.1. Receptory wewnątrzkomórkowe–czynniki transkrypcji

W komórkach docelowych dla hormonów płciowych, glukokortykoidów, mineralokortykoidów, witaminy D₃, retinoidów i tyroidów znaleziono specyficzne receptory, które w odpowiedzi na wiązanie ligandu regulują aktywność transkrypcji genów będących pod kontrolą hormonu (PIKE, 1991; PETKOVICH, 1992; CHAN i wsp., 1989). Badania strukturalne i funkcjonalne wykazały, że receptory wymienionych hormonów należą do jednej rodziny i posiadają podobną organizację struktur domenowych (Rys.1).



Rysunek 1

Schematyczne porównanie organizacji strukturalnej białek należących do rodziny receptorów hormonów sterydowych. Według PIKE'A (1991).

GR, receptor glukokortykoidowy; MR, receptor mineralokortykoidowy; PR, receptor progesteronowy; ER, receptor estrogenowy; VDR, receptor witaminy D₃; T₃R_α i T₃R_β, receptory hormonu tyroidowego; V-erbA, receptor białka wirusowego erb A; RAR_α i RAR_β, receptory kwasu retinowego; A/B, D,E,F, symboliczne oznaczenia domen funkcjonalnych.

Domenę F, występującą w receptorze estrogenowym, oznaczono linią przerywaną.

Cyfry oznaczają procent homologii sekwencji w stosunku do receptora glukokortykoidowego.

Strukturę domeny wiążącej DNA (domeny D) w receptorze estrogenowym badano przy pomocy techniki dwuwymiarowego NMR (SCHWABE i wsp., 1990). Ten zasadowy rejon cząsteczki zawiera dwa motywy sekwencyjne Cys₂–Cys₂ (w obrębie tzw. palców cynkowych), z których każdy jest stabilizowany przez jeden atom cynku. Domena wiążąca DNA wykazuje bardzo dużą homologię wśród białek receptorowych, spokrewnionych z czynnikami transkrypcji. C–końcowy fragment cząsteczki receptora zajmuje rozległą i bardziej złożoną, o mniejszej homologii sekwencji, domena wiążąca hormon (domena E) (PIKE, 1991). N–końcowa domena (A/B) jest najprawdopodobniej niezbędna do aktywacji transkrypcji (TORA i wsp., 1988).

W nieobecności ligandu receptory hormonów sterydowych pozostają w jądrze w nieaktywnym heterokompleksie, którego rdzeniem jest 1 cząsteczka receptora i 2 cząsteczki białka szoku termicznego - hsp90 (PRATT, 1990). Przykładowo, nieaktywowany receptor glukokortykoidowy jest heterotetramerem zbudowanym z białka zdolnego do wiązania hormonu i DNA (receptora), dwóch cząsteczek hsp90 i jednej cząsteczki białka o masie 59 kDa (REXIN i wsp., 1992). Pokazano, że hsp90 odpowiada za utrzymanie niefunkcjonalnego stanu receptora glukokortykoidowego (CADEPONT i wsp., 1991).

Wiązanie progesteronu prowadzi do zmiany konformacyjnej receptora zlokalizowanej w domenie wiążącej hormon (FRITSCH i wsp., 1992). Konsekwencją jest zwolnienie hsp90 z kompleksu i dimeryzacja receptora (DE MARZO i wsp., 1991). Aktywacja zależna od hormonu (w znaczeniu nabycia lub zwiększenia zdolności wiązania do DNA) wydaje się być złożonym procesem, który w przypadku receptorów sterydowych może obejmować procesy fosforylacji/defosforylacji (RANGARAJAN i wsp., 1992; MOUDGIL, 1990) i/lub dysocjacji białka będącego składnikiem kompleksu przed aktywacją.

Aktywowany receptor wiąże się specyficznie do fragmentów DNA tzw. sekwencji wzmacniających ("hormone response elements") i reguluje transkrypcję genów będących pod kontrolą hormonu (BRÖNEGARD i wsp., 1987; CHAN i wsp., 1989). Stabilne wiązanie receptorów kwasu retinowego, witaminy D₃ i hormonu tyroidowego do DNA wymaga ich heterodimeryzacji z czynnikiem jądrowym, którym jest receptor kwasu 9-*cis* retinowego (RXR), co różni je od receptorów hormonów sterydowych (BUGGE i wsp., 1992; DURAND i wsp., 1992).

1.1.1.2. Receptory transmembranowe o aktywności tyrozylowej kinazy białkowej

Działanie insuliny, epidermalnego czynnika wzrostu (EGF) oraz innych polipeptydowych czynników tropowych jest oparte o ich wiązanie do specyficznych receptorów transmembranowych, zdolnych do prowadzenia reakcji fosforylacji lub do aktywacji zasocjowanych z nimi kinaz białkowych, w odpowiedzi na sygnał hormonalny (NISSLEY i wsp., 1985; GAMMELTOFT i OBBERGHEN, 1986; STAROS i wsp., 1985; SCHINDLER i wsp., 1992). Receptory transmembranowe o aktywności tyrozylowej kinazy białkowej należą do większej rodziny kinaz białkowych, do których zalicza się także nie-receptorowe kinazy oraz produkty wirusowych onkogenów (TAYLOR, 1989).

Badania YARDEN i SCHLESSINGER (1987) pozwoliły na stwierdzenie odwracalnej oligomeryzacji receptora EGF zachodzącej pod wpływem wiązania ligandu. Elektroforeza oczyszczonego receptora, inkubowanego z hormonem, przeprowadzona w warunkach nie-denaturujących, wykazała obecność, różniących się ruchliwością elektroforetyczną, dwóch form receptora: monomeru o dużej ruchliwości (170 kDa) i dimeru o małej ruchliwości.

Sieciowanie receptorowej domeny wiążącej EGF wykazało, że wiązanie hormonu prowadzi poprzez zmianę konformacyjną i dimeryzację do zwiększenia powinowactwa receptora do ligandu (HURWITZ i wsp., 1991). Wynikiem wiązania EGF jest także stymulacja aktywności kinazowej receptora i w konsekwencji autofosforylacja reszt tyrozylowych (SASAKI i wsp., 1985). Po autofosforylacji wzrasta aktywność kinazowa receptora w stosunku do egzogennych substratów (YU i CZECH, 1986; BERTICS i GILL, 1985). Sieciowanie [125 I]EGF związanego z receptorem, trawienie kompleksu trypsyną, i mikrosekwencjonowanie rozdzielonych peptydów pokazało, że w wiązaniu hormonu uczestniczą: N-końcowa domena receptora i reszta tyrozyny-101 w cząsteczce EGF (WOLTJER i wsp., 1992).

1.1.1.3. Receptory transmembranowe związane z systemem przekazników informacji drugiego rzędu

Jest to najlepiej poznany system przenoszenia sygnału hormonalnego przez błonę komórkową. Wiele hormonów wykorzystuje przekazniki informacji drugiego rzędu takie jak: cAMP, jony Ca^{2+} , czy fosforany inozytolu. Ten system przenoszenia sygnału obejmuje trzy elementy:

- receptor transmembranowy, który w wyniku wiązania ligandu oddziałuje z drugim składnikiem systemu; białkiem G - wiążącym GTP ,
- białko G, które w odpowiedzi na sygnał receptora aktywuje trzeci składnik systemu; element efektorowy, najczęściej enzym lub kanał jonowy,
- element efektorowy zmieniający stężenie wewnątrzkomórkowego przekaźnika informacji drugiego rzędu.

Grupa receptorów związanych z białkami G obejmuje wszystkie podtypy muskarynowych receptorów amin adrenergicznych, receptory serotoniny i wielu hormonów peptydowych, a nawet receptory opsyny – membranowego białka siatkówki, biorącego udział w przekazywaniu impulsu świetlnego w procesie widzenia (NEER i CLAPHAM, 1988). Receptory te, pomimo różnej specyficzności, są strukturalnie podobne. Wszystkie, oczyszczone dotąd, należą do grupy glikoproteidów transmembranowych. Transmembranowy segment o siedmiu α -helisach oddziela zewnątrzkomórkową, N-kończową część receptora od C-końcowego cytoplazmatycznego fragmentu cząsteczki (BIRNBAUMER i wsp., 1990). Wśród spokrewnionych białek receptorowych stopień homologii sekwencji jest największy w obrębie transmembranowej części cząsteczki i cytoplazmatycznej C-końcowej pętli (BIRNBAUMER i wsp., 1990). LEFKOWITZ i CARON (1988) podają model strukturalny receptorów adrenergicznych, według którego transmembranowe α -helisy receptora uczestniczą w tworzeniu hydrofobowej kieszeni - miejsca wiązania hormonu.

Wywołana związaniem ligandu zmiana konformacyjna jest przenoszona przez segment transmembranowy do cytoplazmatycznej, C-końcowej części cząsteczki receptora. Badania wpływu punktowych mutacji na aktywację muskarynowego receptora acetylocholinowego pokazały, że dwie reszty tyrozylowe zlokalizowane w obrębie domeny transmembranowej odgrywają ważną rolę w indukowanej ligandem aktywacji receptora (WESS i wsp., 1992). C-końcowa pętla receptora jest odpowiedzialna za aktywację odpowiedniego dla danego typu efektora białka G, zasocjowanego z membraną po cytoplazmatycznej stronie komórki (LEFKOWITZ i CARON, 1988). Białko G jest heterotrimerem, zbudowanym z podjednostek α , β i γ . Związanie hormonu powoduje dysocjację kompleksu na dwa składniki: podjednostkę α , o aktywności GTPazy, związaną z GTP i dimer $\beta\gamma$ (BIRNBAUMER i wsp., 1990).

Rodzina białek G obejmuje 6 podrodzin pośredniczących w regulacji systemów efektorowych (Tabela 1).

Tabela 1

Klasy białek G, ich receptory i systemy efektorowe. Według KATZUNGA (1992).

Białka G	Receptory dla:	Efektor/Droga sygnału
G_s	Amin β -adrenergicznych, glukagonu, histaminy, serotoniny i wielu innych.	Cyklaza adenylova/cAMP
G_i	Amin α_2 -adrenergicznych, opioidów, acetylocholiny (receptorów muskarynowych), serotoniny i wielu innych.	Wiele obejmujących: cyklazę adenylova/cAMP, otwarcie kanałów K ⁺ /zwolnienie akcji serca, fosfolipazę C/IP ₃ , Ca ²⁺ , diacyloglicerol.
G_{off}	Odorantów (nabłonek węchowy).	Cyklaza adenylova/cAMP.
G_o	Neurotransmitterów mózgowych.	Jeszcze nie znane.
G_q	Bombezyny, serotoniny, (receptory 5HT _{1c}) i wielu innych.	Fosfolipaza C/IP ₃ , Ca ²⁺ , diacyloglicerol.
G_t	Fotonów (rodopsyna).	Fosfodiesteraza cGMP/cGMP

Sklonowano i określono sekwencje aminokwasów dla dwunastu różnych podjednostek α kręgowców (BIRNBAUMER i wsp., 1990). Wszystkie one zawierają zestawy sekwencji homologicznych do sekwencji bakteryjnego czynnika elongacji TU zaangażowanych w wiązanie i hydrolizę GTP. Mniej heterogenne podjednostki β i γ mogą tworzyć cztery typy dimerów: $\beta_{36}\gamma_a$, $\beta_{36}\gamma_b$, $\beta_{35}\gamma_a$, $\beta_{35}\gamma_b$. Zarówno podjednostki α jak i dimery $\beta\gamma$ są zaangażowane w aktywację efektorów (BIRNBAUMER i wsp., 1990).

Systemy efektorowe i działanie poszczególnych przekazników informacji drugiego rzędu są od siebie zależne. Przykład może stanowić wzajemna regulacja kinazy C i stężenia jonów wapnia. Aktywność tej kinazy jest regulowana przez Ca²⁺, fosfolipidy i diacyloglicerol (HINCKE, 1988; MOLLEYRES i RANDO, 1988). Badania w systemie

in vitro (odwrócone pęcherzyki otrzymane z erytrocytów) pokazały, że z kolei kinaza C bezpośrednio stymuluje aktywność membranowej pompy wapniowej, a więc reguluje stężenie Ca^{2+} (SMALLWOOD i wsp., 1988).

Fosforylacja jest jednym z najważniejszych sposobów regulacji i działania wielu przekazników informacji drugiego rzędu (FUKADA i wsp., 1990; HANSSON i wsp., 1988). Odgrywa ona kluczową rolę w takich procesach jak: odczulenie receptorów, czy modyfikacja aktywności białek np. receptorowych kinaz tyrozylowych (PALCZEWSKI i wsp., 1989; SCHWORER i wsp., 1986; COCHET i wsp., 1984).

Białko G_q aktywując fosfolipazę C wyzwała hydrolizę fosfatydyloinozytolo-4,5-bisfosforanu do przekazników informacji drugiego rzędu; diacyloglicerolu i inozytolo-1,4,5,-trifosforanu. Pierwszy z nich aktywuje lub wzmacnia aktywację białkowej kinazy C (MOLLEYRES i RANDO, 1988; SEIFERT i wsp., 1987), drugi uwalnia Ca^{2+} z magazynów wewnątrzkomórkowych. Przy podwyższonym poziomie Ca^{2+} wzrasta jego ilość związana z kalmoduliną, białkowym aktywatorem enzymów m.in. Ca^{2+} -zależnych kinaz białkowych. Najprostszym i najlepiej poznanym białkiem należącym do rodziny kinaz białkowych jest kinaza zależna od cAMP. Wiązanie cAMP do podjednostki regulatorowej enzymu wywołuje zmiany konformacyjne prowadzące do dysocjacji, a tym samym do aktywacji podjednostki katalitycznej kinazy (TAYLOR, 1989).

1.1.1.4. Transmembranowe receptory o funkcji kanału jonowego regulowane wiązaniem ligandu

Na membranach komórek docelowych dla acetylocholin, kwasu γ -aminomasłowego (GABA), aminokwasów: glicyny, asparagianu glutaminianu, innych neurotransmiterów i hormonów znajdują się receptory – kanały jonowe ("ligand-gated channels") (GASIC i HEINEMANN, 1991).

Związaniu ligandu towarzyszy otwarcie kanału, dla określonego jonu, co powoduje selektywny przepływ ok. 10^4 anionów lub kationów w ciągu milisekundy i prowadzi do zmiany membranowego potencjału spoczynkowego komórki wzbudzeniowej (GASIC i HEINEMANN, 1991). Generalnie, kanały aktywowane przez acetylocholinę lub glutaminian powodują pobudzenie, natomiast aktywowane przez glicynę i GABA powodują wygaszenie, stanu wzbudzenia komórki (GASIC i HEINEMANN, 1991). Istnieją dwa główne mechanizmy modulacji przepuszczalności kanałów jonowych: oddziaływanie kanału z białkami wiążącymi GTP (białkami G) i/lub fosforylacja białek kanału lub białek z nim zasocjowanych (REUTER i SIGEL, 1991). Nikotynowy receptor

dla acetylocholiny jest najprawdopodobniej najlepiej poznany receptorem membranowym dla neurotransmiterów (HUCHO, 1989). Jest on pentamerem zbudowanym z 2 podjednostek alfa i po jednej beta, gamma i delta, które tworzą pseudosymetryczną, cylindryczną strukturę transmembranowego kanału kationowego o średnicy 8 nm. Każda z tych podjednostek zawiera cztery segmenty transmembranowe, których oba końce (aminowy i karboksylowy) znajdują się po cytoplazmatycznej stronie membrany (IMOTO i wsp., 1988). Wiązanie acetylocholiny do podjednostek α wywołuje zmianę konformacyjną receptora powodując otwarcie centralnego kanału, przez który jony sodu dostają się do wnętrza komórki (HUCHO, 1986). Badania mutagenetyczne i modyfikacje kowalencyjne pozwoliły na identyfikację reszt aminokwasowych wyścielających wewnętrzną powierzchnię kanału i na określenie struktury kanału zamkniętego i otwartego (AKABAS i wsp., 1992). Obiecującym dokonaniem jest funkcjonalna rekonstrukcja receptora w sztucznych membranach lipidowych (SCHÜRHOFF i wsp., 1992), która pozwoli na jego szczegółową charakterystykę.

1.2. Owady

1.2.1. Rodzaje hormonów występujących u owadów

Hormony znalezione u owadów, z wyjątkiem hormonu juvenilnego, można zaliczyć do analogicznych klas strukturalnych występujących u kręgowców: hormonów sterydowych, polipeptydowych, pochodnych aminokwasów i kwasów tłuszczowych. Tabela 2 podaje przykłady hormonów owadzych.

Tabela 2
Przykłady wybranych hormonów owadzych i ich działanie.

Klasa/Nazwa hormonu	Działanie
Hormony polipeptydowe	
Hormon adypokinetyczny AKH	Stymuluje uwalnianie lipidów w ciele tłuszczowym.
Hormon protorakotropowy PTTH	Aktywuje gruczoły protorakalne.
Hormon wylinkowy EH	Wywołuje zachowanie wylinkowe.
Bursykon	Odpowiedzialny za twardnienie i ciemnienie kutikuli.
Hormon melanizacji i czerwonego zabarwienia MRCH	Odpowiedzialny za melanizację i pigmentację kutikuli.
Hormon diuretyczny DH	Zwiększa wydalanie wody.
Hormon antydiuretyczny ADH	Hamuje wydalanie wody.
Neuroparsyna	Działanie przeciw-juwenilne i przeciw-diuretyczne..
Hormon składania jaj ELH	Indukuje wydzielanie jaj.
Hemolimfowy czynnik wzrostu HTF	Stymuluje tworzenie kutikuli.
Allatotropina	Aktywuje syntezę i wydzielanie JH.
Allatostatyna	Hamuje syntezę i wydzielanie JH.
Hormony sterydowe	
20-Hydroksyekdyzon (hormon linienia)	Synchronizuje procesy rozwojowe – przyspiesza rozwój.

Pochodne aminokwasów	
Katecholaminy	Zaangażowane w ciemnienie kutikuli.
Serotonina i oktopamina	Indukują wydzielanie hormonów peptydowych.
Kwas γ-aminomasłowy, L-asparaginian i L-glutaminian	Wywołują skurcze mięśni.
Pochodne kwasów tłuszczowych	
Prostaglandyny	Indukują proces składania jaj, pośredniczą w odpowiedzi na infekcję bakteryjną.
Hormon juwenilny*	Synchronizuje procesy rozwojowe- opóźnia rozwój, stymuluje dojrzewanie jaj.

*nie należy do żadnej z hormonalnych grup kręgowców

Jednym z najintensywniej badanych i dzięki temu najlepiej poznanych hormonów peptydowych owadów, jest **hormon adypokinetyczny (AKH)** syntetyzowany i wydzielany przez *corpora cardiaca* (CC). Wśród wyizolowanych dotychczas AKH, pochodzących z różnych źródeł, przeważają dwie formy: dziesięciopeptyd - AKH I (STONE i wsp., 1976) i ośmiopeptyd - AKH II (SIEGERT i wsp., 1985). Wyjątek stanowią dziewięciopeptydy znalezione u *Manduca sexta* i *Heliothis zea* (KONOPIŃSKA i wsp., 1992). Wszystkie znane AKH mają zablokowane oba końce: aminowy - kwasem L-pirolglutaminowym, karboksylowy - grupą amidową (KONOPIŃSKA i wsp., 1992). Tkankami docelowymi dla AKH są: ciało tłuszczowe i mięśnie (MORDUE i STONE, 1979). Główną funkcją fizjologiczną AKH jest aktywacja glikogenolizy w ciele tłuszczowym (VAN MARREWIJK i wsp., 1980) oraz ciągu reakcji prowadzących do zwiększenia ilości dostarczanych lipidów i szybkości uwalniania kwasów tłuszczowych w mięśniach owadów podczas lotu (MORDUE i STONE, 1979). W ciele tłuszczowym hormon adypokinetyczny stymuluje aktywność fosforylasy glikogenowej w sposób zależny od jonów wapnia (VAN MARREWIJK i wsp., 1991). W tej samej tkance działanie hormonu adypokinetycznego prowadzi do hydrolizy triglicerydów do diglicerydów, przez mechanizm obejmujący cAMP i prawdopodobnie lipazę

lipoproteidową. Diglicerydy, w formie lipoproteidów, są transportowane przez hemolimfę do mięśni, gdzie następuje uwolnienie kwasów tłuszczowych i ich utlenienie. W hemolimfie efektem działania AKH jest interkonwersja lipoproteidów. Proces ten pokazano *in vivo* obserwując, po wstrzyknięciu hormonu, przemianę lipoproteidów o dużej gęstości w lipoproteidy o małej gęstości (VAN DER HORST i wsp., 1981; VAN DER HORST i wsp., 1984). Zmniejszenie gęstości lipoproteidów następuje na skutek przyłączenia dużej ilości diglicerydów, które jest możliwe dzięki wiązaniu apolipoporyny III do zmieniającego swą gęstość białka (SURHOLT i wsp., 1988; STROBEL i wsp., 1990).

W układzie *in vitro* zbadano degradację AKH (RAYNE i O'SHEA, 1992). Znakowany radioaktywnie hormon inkubowano z ciałem tłuszczowym, mięśniami lub cewkami Malpighiego lub frakcjami membranowymi otrzymanymi z tych tkanek. Stwierdzono, że AKH krążący w hemolimfie jest degradowany przez endopeptydazę i aminopeptydazy zasocjowane z membraną tkanek omywanych hemolimfą.

Hormon protorakotropowy (PTTH), produkowany i wydzielany przez komórki lateralne mózgu (AGUI i wsp., 1979), aktywuje gruczoły protorakalne do produkcji hormonu linienia – ekdyzonu. Synteza i/lub wydzielanie PTTH są kontrolowane przez czynniki środowiskowe (DOANE, 1972; CYMBOROWSKI i BOGUŚ, 1976; CYMBOROWSKI, 1977; CYMBOROWSKI, 1984), a także przez hormon juwenilny (HIRUMA, 1986) oraz biogenne aminy (MUSZYŃSKA-PYTEL i CYMBOROWSKI, 1978a).

Podobnie jak inne owadzie neurohormony, hormon protorakotropowy występuje w kilku formach molekularnych. Dwie formy PTTH, znalezione u dorosłych *Bombyx mori* są polipeptydami o masie cząsteczkowej 4400 Da i 22 000 Da (BOLLENBACHER i wsp., 1984; NAGASAWA i wsp., 1984). Względne stężenia obu form ulegają zmianie w czasie rozwoju osobniczego *B.mori* (O'BRIEN i wsp., 1986). NAGASAWA i wsp. (1984) stwierdzili, że PTTH o niższej masie cząsteczkowej stanowi heterogeny układ trzech homologicznych polipeptydów różniących się sekwencją aminokwasową. PTTH o wyższej masie cząsteczkowej składa się z dwóch identycznych łańcuchów polipeptydowych, z których każdy zbudowany jest ze 109 reszt aminokwasowych (HOFFMANN i JOOSSE, 1991). Działanie wysokocząsteczkowej formy PTTH prowadzi do specyficznej, zależnej od cAMP fosforylacji 34 kDa białka gruczołów protorakalnych (ROUNTREE i wsp., 1992).

W szczytowym momencie metamorfozy organy neurohemalne mózgu (kompleks *corpora cardiaca-corpora allata* uwalniają neurohormon, który wywołuje zachowanie pozwalające na wydostanie się owada dorosłego z kutikuli poczwarkowej (COPENHAVER i TRUMAN, 1986), i który aktywuje proces syntezy bursykonu (REYNOLDS i wsp., 1979). Jest to **hormon wylinkowy (EH)**, którego czas uwalniania jest precyzyjnie regulowany przez dwa czynniki: obniżenie stężenia ekdyzonu hamującego wydzielanie EH do czasu osiągnięcia pełnego rozwoju imaginalnego i impuls mózgowy, który na sygnał zegara biologicznego aktywuje neurony do produkcji i wydzielania hormonu wylinkowego (COPENHAVER i TRUMAN, 1986). Z głów dorosłych owadów *Bombyx mori* wyizolowano cztery formy EH i określono ich strukturę pierwszorzędową (KONO i wsp., 1991). U *Manduca sexta* znaleziono tylko jedną formę hormonu wylinkowego – kwaśny polipeptyd o 62 resztach aminokwasowych (TERZI i wsp., 1988). cDNA hormonu wylinkowego z *Manduca sexta* zostało sklonowane i ekspresjonowane w owadziej linii komórkowej za pomocą wektora opartego o bakulowirusa (ELDRIDGE i wsp., 1991). Badania TRUMANA i wsp. (1980) wskazują, że istotnym krokiem w działaniu EH może być wzrost stężenia cGMP. Hormon wylinkowy znaleziono u wszystkich dotychczas badanych owadów (HOFFMANN i JOOSSE, 1991).

Za ciemnienie i twardnienie nowej kutikuli owadów dorosłych odpowiedzialny jest **bursykon**, polipeptydowy hormon (40 kDa), uwalniany z komórek neurosekrecyjnych zwojów odwłokowych (TRUMAN, 1973). Wydaje się, że działa on na metabolizm i/lub wychwytywanie przez komórki epidermy i hemocyty tyrozyny i dopaminy (REYNOLDS, 1983), związków, których pochodne są czynnikami utwardzającymi i nadającymi zabarwienie kutikuli (ANDERSEN, 1985; KRAMER i wsp., 1989). Wyniki doświadczeń, w których pokazano, że wstrzyknięcie bursykonu powoduje wzrost stężenia cAMP w epidermie (DELCHAMBRE i wsp., 1979) oraz fakt, że cAMP naśladuje działanie bursykonu w bio-testach (VON KNORRE i wsp., 1972), mogą świadczyć o tym, że cAMP pośredniczy w działaniu bursykonu. Stwierdzono jednak również, że puromycyna i aktynomycyna D hamują zdolność bursykonu do stymulacji syntezy kutikuli (FOGAL i FRENKEL, 1969), co wskazywałoby, że długofalowe działanie bursykonu obejmuje regulację transkrypcji i/lub translacji.

Innym hormonem odpowiedzialnym za zabarwienie kutikuli jest **hormon melanizacji i czerwonego zabarwienia (MRCH)**. Jest to neuropeptyd, o masie cząsteczkowej 6400–8000 Da, zaangażowany w gromadzenie melaniny w kutikuli i

omochromu w epidermie niektórych gatunków *Lepidoptera* (np. u *Leucania separata*) (MATSUMOTO i wsp., 1981). Trzy formy molekularne tego hormonu, różniące się sekwencją aminokwasową, wyizolowano z ekstraktów mózgowych dorosłych owadów *Bombyx mori* (MATSUMOTO i wsp., 1985).

Diureza u owadów jest kontrolowana przez dwa rodzaje hormonów o przeciwnym działaniu: **hormon diuretyczny (DH)** i **antydiuretyczny (ADH)**. Funkcją tych neuropeptydów jest zapewnienie równowagi jonowej i wodnej. Hormon diuretyczny wyizolowany z mózgu *Manduca sexta* jest polipeptydem o 41 resztach aminokwasowych (KATAOKA i wsp., 1989b). Jest on wydzielany przez kompleks mózg - *corpora cardiaca* - *corpora allata* i powoduje wydalenie płynów przez cewki Malpighiego oraz hamowanie resorpcji przez jelito proste. Badania prowadzone *in vitro* nad rolą cAMP w działaniu hormonu diuretycznego u *Locusta migratoria* pokazały, że DH stymuluje cyklazę adenylową i sugerowały istnienie dwóch odrębnych miejsc receptorowych dla tego hormonu w cewkach Malpighiego (MORGAN i MORDUE, 1985). Badania *in vivo* (TROETSCHLER i KRAMER, 1992) wykazały, że pod wpływem hormonu diuretycznego w jelicie prostym osobników dorosłych oraz w ciele tłuszczowym i cewkach Malpighiego larw *Manduca sexta* następuje wzrost stężenia cAMP. Hormon antydiuretyczny, który jest wydzielany przez CC podwyższa resorpcję płynów przez jelito tylne oraz może w sposób bezpośredni hamować wydalenie płynów przez cewki Malpighiego (SPRING i wsp., 1988).

Neuroparsyna A - dominujący neurohormon u *Locusta migratoria* - jest produkowana przez medialne komórki neurosekrecyjne, a następnie transportowana do *corpora cardiaca* i stąd wydzielana do hemolimfy (GIRARDIE i wsp., 1985). Jest to bogaty w cysteinę polipeptyd, o 83 resztach aminokwasowych, spięty sześcioma mostkami disiarczkowymi (GIRARDIE i wsp., 1990; HIETTER i wsp., 1991). W ekstraktach *corpora cardiaca* znaleziono wiele izo-form neuroparsyny o różnej długości N-końca (GIRARDIE i wsp., 1990). Mózgi larw i osobników dorosłych produkują znaczne ilości transkryptów kodujących 107 aminokwasowy prekursor neuroparsyny. Procesowanie prekursora polega najprawdopodobniej na odcięciu od N-końca kolejno dwóch peptydów: peptydu sygnałowego o 22 resztach aminokwasowych i dipeptydu (LAGUEUX i wsp., 1992). Neuroparsyna wykazuje działanie przeciw-diuretyczne i przeciw-juwenilne. Pokazano (GIRARDIE i wsp., 1987), że usunięcie neuroparsyny, przez injekcję surowicy skierowanej przeciwko temu neurohormonowi, indukuje powstawanie form przejściowych owada lub jego przedwczesne dojrzewanie. Badania CC

Locusta migratoria prowadzone *in vitro* sugerują, że neuroparsyna nie wpływa na szybkość biosyntezy hormonu juwenilnego ale najprawdopodobniej na jego degradację (GIRARDIE i wsp., 1987).

Hormon składania jaj (ELH), syntetyzowany i wydzielany przez neurony sekrecyjne, działa jako związek endokrynnny powodując uwalnianie jaj. Jednocześnie pokazano, że ELH indukuje, zależny od różnicy potencjałów, wolny przepływ jonów Na^+ wykazując działanie neurotransmitera (KIRK i SCHELLER, 1986).

Hemolimfowy czynnik wzrostu (HTF), który został wyizolowany z hemolimfy larw ostatniego stadium *Manduca sexta* (WIELGUS, 1983) najprawdopodobniej zwiększa szybkość odkładania kutikuli. Jest on oligomerem składającym się z dwóch rodzajów podjednostek o masach cząsteczkowych 69 kDa i 74 kDa.

Działanie ekdysterydów – hormonów linienia, wbrew swojej nazwie, obejmuje nie tylko jeden, szczególny proces w rozwoju, ale jest istotne dla całego życia owada. Ekdysterydy, tak jak hormony juwenilne, wykazują działanie morfogenetyczne, we wczesnych okresach rozwoju i gonadotropowe, w późniejszych. Działanie morfogenetyczne obejmuje biochemiczne i fizjologiczne zmiany związane z promocją procesów linienia i wzrostu (KOOLMAN, 1990), a działanie gonadotropowe kontrolę syntezy witelogenin u samic należących do *Diptera* (DeLOOF i wsp., 1984) oraz prawdopodobnie wzrost szybkości spermatogenezy u samców (HAGEDORN, 1989).

Ekdyzon – klasyczny hormon ekdysterydowy - jest pierwszym z hormonów bezkręgowców, który został otrzymany w czystej formie (BUTENANDT i KARLSON, 1954). Do dnia dzisiejszego poznano wiele ekdysterydów i związków ekdysterydopochodnych (KOOLMAN, 1990). Ekdyzon jest syntetyzowany z cholesterolu przez gruczoły protorakalne, w których zdaje się funkcjonować zegar biologiczny regulujący wydzielanie ekdyzonu w rytmie dobowym (CYMBOROWSKI i wsp., 1991). Aktywność gruczołów protorakalnych znajduje się pod kontrolą hormonu protorakotropowego, ekdyzonu działającego przez sprzężenie zwrotne (SAKURAI i WILLIAMS, 1989) oraz pod bezpośrednią lub pośrednią kontrolą hormonu juwenilnego (SAKURAI i wsp., 1989; SAKURAI i IMOKAWA, 1988; WATSON i wsp., 1988). Źródłem cholesterolu jest dieta, gdyż owady nie są zdolne do jego syntezy (CLAYTON, 1964). W hemolimfie ekdyzon jest przekształcany w 20-hydroksyekdyzon, który dla większości owadów stanowi formę aktywną hormonu w stadiach larwalnych. Pomimo, że stwierdzono istnienie specyficznych i niespecyficznych białek transportujących

ekdysterydy w hemolimfie niektórych owadów, aktywną formę stanowi wolny hormon (WHITEHEAD, 1989). Powszechnie przyjmuje się, że ekdysterydy "wchodzą" do wnętrza komórki przez wolną dyfuzję. Hamowanie, przez jony potasu oraz inhibitory Na^+/K^+ -ATPazy, wnikanie ekdysterydów do wnętrza komórek sugeruje jednak możliwość istnienia aktywnego transportu tych hormonów (SPINDLER i SPINDLER-BARTH, 1989).

Katecholaminy pełnią u owadów dwie zasadnicze funkcje: działają jako neurotransmitery, oraz są czynnikami sieciującymi w procesie tworzenia kutikuli (EVANS, 1980; BRUNET, 1980). FREEMAN (1966) pokazał, że dopamina obniża amplitudę i częstotliwość skurczów jelita, a adrenalina i noradrenalina wywołują przeciwny efekt. W mózgu owadów znaleziono dihydroksyfenyloalaninę (DOPA), dopaminę, noradrenalinę (FRONTALI i HAGGENDAL, 1969; KRUEGER i wsp., 1990; MACFARLANE i wsp., 1980) i adrenalinę (OSTLUND, 1954). Katecholaminy lub ich pochodne znaleziono również we włóknach nerwowych jelita przedniego, cewkach Malpighiego, w epidermie i w ciele tłuszczowym (KLEMM, 1972; STOLEY i DOWNER, 1987). Syntezę L-DOPA w izolowanych zwojach mózgowych *Periplaneta americana* śledzili OWEN i BOUQUILLON (1992). Pokazali oni, że L-DOPA powstaje przez hydroksylację L-tyrozyny. Podwyższanie poziomu DOPA przez inhibitory dekarboksylazy sugeruje, że jest ona metabolizowana do dopaminy. Wyniki tych badań wskazują, że metabolizm L-DOPA u owadów jest podobny do metabolizmu u kręgowców. Profil rozwojowy zmian stężenia DOPA i dopaminy wyznaczono w całym ciele dla *Drosophila melanogaster* za pomocą chromatografii (HPLC) połączonej z detekcją elektrochemiczną (MARTINEZ-RAMIREZ i wsp., 1992). Stężenie DOPA rośnie do osiągnięcia maksymalnej wartości w trzecim stadium larwalnym, obniża się przed linieniem poczwarkowym i dalej pozostaje stałe. Stężenie dopaminy rośnie równolegle do każdego linienia: larwa-larwa, larwa-poczwarka i poczwarka-owad dorosły.

Serotonina (5-hydroksytryptamina) została znaleziona w mózgu, nerwie brzusznym i *corpora cardiaca* wielu owadów (KUSCH, 1975; CANTERA i CARLBERG, 1988; MACFARLANE i wsp., 1990; MUSZYŃSKA-PYTEL i CYMBOROWSKI, 1978a,b). Tak jak inne biologicznie aktywne aminy serotonina działa jako neurotransmitter i/lub neuromodulator w systemie nerwowym owadów (EVANS, 1980). Stężenie serotoniny i jej metabolitu kwasu 5-hydroksyindoleoctowego podlega działaniu cyklicznego zegara biologicznego ("circadian rhythms") (MUSZYŃSKA-

PYTEL i CYMBOROWSKI, 1978b; JAGOTA i HABIBULLA, 1992). Serotonina stymuluje lub wzmacnia skurcze jajowodów (CHALAYE, 1974), a u *Calliphora erythrocephalla* w bardzo niskich stężeniach (10^{-9} M) indukuje aktywność wydzielniczą gruczołów ślinowych (BERRIDGE i PATEL, 1968). Serotonina reguluje zmiany dobowe aktywności ruchowej (MUSZYŃSKA-PYTEL i CYMBOROWSKI, 1978a,b), a także wywiera znaczny wpływ na funkcjonowanie organów trzewiowych i serca u owadów; może np. powodować rytmiczne skurcze jelita przedniego (BROWN, 1965), serca (COLLINS i MILLER, 1977), lub cewek Malpighiego (CROWDER i SHANKLAND, 1972). W tej ostatniej tkance działanie serotoniny jest bardzo podobne do efektu wywołwanego przez hormon diuretyczny (MADDRELL i wsp., 1969) - serotonina stymuluje wydzielanie płynów, jednakże stymulacja ta nie zależy od cAMP (MORGAN i MORDUE, 1984). Obecność receptorów serotoniny stwierdzono w sercu (COLLINS i MILLER, 1977) i w mięśniach cewek Malpighiego (CROWDER i SHANKLAND, 1972).

W systemie nerwowym karaluchów znaleziono znaczne ilości **glutaminianu**, **asparaginianu** i **GABA** (RAY, 1965). Działanie GABA, neurotransmitera hamującego, polega na zwiększeniu przepuszczalności membran dla jonów chlorkowych w centralnym systemie nerwowym. L-glutaminian w stężeniu 10^{-9} g/l indukuje zmianę potencjału nerwowego wywołującego skurcze mięśni. W mięśniach szkieletowych szarańczy jest on 1000 razy efektywniejszy w działaniu niż L-asparaginian lub jakikolwiek inny aminokwas (USHERWOOD i MACHILI, 1968). W systemie nerwowym *Periplaneta americana* istnieje system aktywnego transportu dla GABA i glutaminianu (BERMUDEZ i wsp., 1988).

Poza wymienionymi, występującymi u kręgowców, neurotransmiterami znaleziono u owadów **unikalne aminy biogenne**. OSTLUND (1954) stwierdził obecność u wielu gatunków owadów substancji ("catechol-4") różnej od adrenaliny, noradrenaliny czy dopaminy. Inna biogenna amina; czynnik S, wyizolowana z *Periplaneta americana* i *Leucophaea maderae*, w niskich stężeniach pobudza neurony i powoduje odpowiedź mięśni na stymulację nerwową (COOK, 1967).

Obecność wielonienasyconych kwasów tłuszczowych i ich pochodnych (eikozanoidów) stwierdzono u wielu gatunków owadów (STANLEY-SAMUELSON, i wsp., 1986; OGG i wsp., 1991; BLOMQUIST i wsp., 1991; OGG i wsp., 1993). Owady

są zdolne do syntezy wielonienasyconych kwasów tłuszczowych, gdyż posiadają Δ^{12} -desaturazę, która przekształca kwas olejowy do kwasu linolowego (BLOMQUIST i wsp., 1991). Głównym prekursorem eikozanoidów jest kwas arachidonowy, ale u owadów substratami mogą być również kwasy homo-linolenowy czy eikozapentenowy. Syntezę **prostaglandyn** typu E i F pokazano u *Musca domestica* (WAKAYAMA i wsp., 1986). Najlepiej poznaną i udokumentowaną funkcją prostaglandyn jest indukcja procesu składania jaj u samic (LOHER i wsp., 1981). Stwierdzono, że dwa enzymy drogi biosyntetycznej prostaglandyn lub aktywnych biologicznie związków podobnych do prostaglandyn; syntetaza i lipoksygenaza są przenoszone z samca do samicy podczas kopulacji (LANGE, 1984; RAGAB i wsp., 1987; RAGAB i wsp., 1991). Badania OGG i wsp. (1991) pokazały obecność prekursorów prostaglandyn w hemocytach i pozwoliły na postawienie hipotezy o uczestniczeniu eikozanoidów w odpowiedzi humoralnej i komórkowej owada na infekcję bakteryjną. STANLEY-SAMUELSON i wsp. (1991) pokazali, że zahamowanie biosyntezy eikozanoidów w stadium larwalnym *Manduca sexta* prowadzi do osłabienia zdolności larw do usuwania bakterii z hemolimfy, a stopień osłabienia zależy od stężenia specyficznych inhibitorów trzech enzymów: fosfolipazy A₂, cyklooksygenazy i lipoksygenazy.

1.2.2. Przenoszenie sygnału hormonalnego u owadów

Owady, podobnie jak kręgowce, "posługują się" czterema systemami przenoszenia sygnału hormonalnego.

1.2.2.1. Owadzie receptory wewnątrzkomórkowe –czynniki transkrypcji

Nie zawsze pamięta się, że pierwszym hormonem sterydowym, dla którego zaproponowano model działania obejmujący tworzenie kompleksu hormon–receptor i regulację aktywności genów przez wiązanie do DNA, był ekdyzon (CLEVER i KARLSON, 1960). Badania prowadzone *in vitro* na śliniankach *Drosophila melanogaster* pozwoliły na zaproponowanie modelu genetycznej kontroli tworzenia pufów na chromosomach politenicznych pod wpływem działania ekdyzonu (ASHBURNER i wsp., 1974). Według tego modelu kompleks ekdyzon – receptor hamuje grupę genów zwanych późnymi i aktywuje grupę genów wczesnych. Produkty genów wczesnych aktywują geny późne, a jednocześnie znoszą aktywację genów wczesnych. Kompleks ekdystrydu z receptorem (EcdR) wiąże się do specyficznych miejsc DNA tzw.

"ecdysteroid-responsive elements" i reguluje transkrypcję genu będącego pod kontrolą hormonu. Badania oddziaływania receptora ekdysterydowego *Drosophila melanogaster* z sekwencją promotorową *hsp27* (gen białka szoku termicznego *hsp27*) pokazały, że receptor wiąże się do DNA w formie dimeru o masie cząsteczkowej 270 kDa (OŻYHAR i wsp., 1991). Rozpoznawany przez receptor fragment DNA posiada sekwencję palindromową, która wykazuje duże podobieństwo do sekwencji rozpoznawanych przez receptory sterydowe kręgowców. Ostatnie badania pokazały, że niewielkie białko o nazwie "usp", będące homologiem receptora RXR kręgowców, indukuje wiązanie receptora ekdysterydowego do miejsca promotorowego *hsp27*, co potwierdzałoby hipotezę działania receptora w heterokompleksie z białkiem usp (YAO i wsp., 1992).

Receptor ekdysterydowy z *Drosophila melanogaster* został sklonowany i scharakteryzowany (KOELLE i wsp., 1991). Zachowane są w nim dwie domeny charakterystyczne dla białek należących do rodziny hormonów sterydowych: domena wiążąca DNA i domena wiążąca hormon. Porównanie sekwencji EcdR z sekwencjami innych białek z rodziny receptorów hormonów sterydowych pozwoliło na umieszczenie receptora w podrodzinie, do której należą ludzki receptor tyroidowy, ludzki receptor witaminy D₃ i ludzki receptor kwasu retinowego.

CHANG i wsp. (1980) pokazali istnienie w komórkach Kc *Drosophila melanogaster* cytosolowego białka (masa cząsteczkowa = 80 kDa) wiążącego specyficznie i z dużym powinowactwem ($K_d \sim 10^{-8}$ M) hormon juwenilny i posiadającego właściwości receptora cytoplazmatycznego. W innych tkankach docelowych dla JH (gruczoł przędny i integument z *Galleria mellonella*) także znaleziono cytosolowe białka, o dużym powinowactwie do hormonu (WIŚNIEWSKI i wsp., 1988; WIŚNIEWSKI i KOCHMAN, 1984). W komórkach Kc *Drosophila*, zidentyfikowano białko, o masie cząsteczkowej ok. 49 kDa, wiążące fotoznacznik – analog JH (CHANG i wsp., 1985). Białko to zbudowane jest z dwóch podjednostek i wiąże się z DNA–celulozą. Po zaznakowaniu techniką foto–powinowactwa białko to zostało oczyszczone (WANG i wsp., 1989). Białka, o właściwościach receptora JH, znaleziono też w ciele tłuszczowym *Drosophila melanogaster* (SHEMSHEDINI i wsp., 1990) i *Leucophaea maderae* (ENGELMAN i wsp., 1987). Obecne u *Drosophila melanogaster* białko wykazuje cechy klasycznego receptora: wiąże JH specyficznie i z dużym powinowactwem ($K_d = 6.7$ nM), wiązanie JH jest wysycalne, a obecność białka tkankowo-specyficzna i skorelowana z biologiczną aktywnością hormonu.

Najlepiej poznanym receptorem hormonu juwenilnego jest białko z epidermy *Manduca sexta*. W tej tkance znaleziono dwa typy jądrowych miejsc wiążących, specyficznych dla

JH I ($K_d = 7$ i 33 nM) i dla analogu JH - [125 I] jodowinylometoprenu ($K_d = 4$ i 59 nM) (OSIR i RIDDIFORD, 1988). Stwierdzono, że przynajmniej jedno z dwóch 29 kDa białek ekstrahowanych z jądra 0.4 M KCl oraz obecnych w cytosolu epidermy i ciała tłuszczowego, wiąże naturalne homologi JH (PALLI i wsp., 1990). Badania pokazały również, że ekstrakt jądrowy, zawierający 29 kDa białko wiążące JH, zawiera też 29 kDa białko, które wiąże się do genu będącego pod kontrolą JH i kodującego białkowy składnik kutikuli larwalnej (LCP 14) (PALLI i wsp., 1990). Eksperymenty elektroforetyczne ("gel retardation studies") pozwoliły na stwierdzenie, że gen LCP 14 zawiera dwa rejony do których wiąże się białko jądrowe: -241 do -491 od 5' końca i $+209$ do $+409$ w pierwszym intronie LCP14. Powyższe eksperymenty wydają się świadczyć, że 29 kDa białko jest receptorem hormonu juvenilnego.

Ponieważ stwierdzono, że dwa retinoidy wykazują niewielki efekt juvenilny, cDNA ludzkiego receptora kwasu retinowego (*hRAR*) zastosowano jako sondę do znalezienia u *Manduca sexta* genu o sekwencji DNA homologicznej do *hRAR* (*Manduca RAR*) (PALLI i wsp., 1991). 13 z 14 aminokwasów C-końcowego palca cynkowego jest identycznych w obu białkach; ludzkim i owadziim kodowanych przez geny *RAR*. Pokazano, że transkrypcja *Manduca RAR* jest pod pozytywną kontrolą 20-hydroksyekdyzonu. Hormon juvenilny opóźnia szybkość indukcji transkrypcji wywołaną 20-hydroksyekdyzonem. Według autorów białko genu *Manduca RAR* nie jest wcześniej znalezionym 29 kDa jądrowym receptorem lecz czynnikiem transkrypcji, którego stężenie jest modulowane przez JH.

1.2.2.2. Owadzie receptory transmembranowe o aktywności tyrozylowej kinazy białkowej

Niektóre z hormonów owadów wykazują podobieństwa strukturalne i/lub funkcjonalne do hormonów polipeptydowych kręgowców działających w oparciu o system przekazników informacji drugiego rzędu. MATSUMOTO i wsp. (1985) stwierdzili, że N-końcowe sekwencje formy I i III hormonu melanizacji i czerwonego zabarwienia (MRCH I i MRCH III) oraz ludzkiego IGF-2 są podobne. Za pomocą immunizowanych surowic w hemolimfie *Manduca sexta* znaleziono peptydy podobne do insuliny i glukagonu kręgowców (KRAMER i wsp., 1980), a w ekstraktach otrzymanych z jelita środkowego 15 kDa peptyd podobny do glukagonu (TAGER i KRAMER, 1980). Niskocząsteczkową formę PTTH (4400 Da), nazwaną bombyksyną, ze względu na homologię sekwencji do insuliny kręgowców, zakwalifikowano do rodziny peptydów

insulinowych (ADACHI i wsp., 1989). Bombyksyna jest zbudowana z dwóch łańcuchów A i B połączonych mostkami disiarczkowymi. Znalezione wiele form molekularnych tego hormonu, różniących się jednym lub kilkoma aminokwasami, a także różne cDNA dla prekursora bombyksyny (ADACHI i wsp., 1989; IWAMI i wsp., 1990; LAGUEUX i wsp., 1990). Badania znalezionych cDNA pokazały, że organizacja domenowa preprobombyksyny jest taka sama jak u preproinsuliny, co sugeruje, że struktura trzeciorzędowa i modyfikacje posttranslacyjne tych hormonów są takie same.

Znana jest struktura i specyficzność receptora insulinowego owadów (FERNANDEZ-ALMONACID i ROSEN, 1987). Z genomu *Drosophila melanogaster* wyizolowano DNA kodujące domenę kinazową tego receptora (PETRUZZELLI i wsp., 1986). Za pomocą przeciwciał wykazano jej homologię do domeny kinazowej ludzkiego receptora insulinowego i pokazano istnienie formy ufosforylowanej.

1.2.2.3. Owadzie receptory transmembranowe związane z systemem przekazników informacji drugiego rzędu

System przekazników informacji drugiego rzędu jest powszechnym systemem przenoszenia sygnału hormonalnego, również u owadów. Pokazano (WANG i wsp., 1990), że w ciele tłuszczowym *Locusta migratoria* oktopamina i AKH, podobnie jak forskolina (roślinny diterpen) indukują wzrost poziomu cAMP i diacyloglicerolu, a działanie oktopaminy w utlenianiu lipidów podczas lotu owadów powoduje wzrost cAMP i jonów wapnia (PIMPLEY, 1985). Stwierdzono, że hormon diuretyczny wywołuje zmiany w poziomie cAMP w cewkach Malpighiego (MORGAN i MORDUE, 1985). cAMP pośredniczy w działaniu czynników hipertrehalosemicznych (MORDUE i STONE, 1979), a poziom trehalozy może być stymulowany przez Ca^{2+} (McCLURE i STEELE, 1981). W gruczołach ślinowych *Amblyomma americanum* inozytolotrifosforan powoduje uwalnianie Ca^{2+} z mikrosomalnych magazynów wewnątrzkomórkowych (RODDY i wsp., 1990). Produkty hydrolizy inozytolotrifosforanu mogą stymulować wychwytywanie jonów wapnia przez poza-mitochondrialny składnik gruczołów ślinowych.

Badania farmakologiczne, wiązania w mózgu karaluchów; pifluthixolu, związku o działaniu antagonistycznym w stosunku do dopaminy, pozwoliły na identyfikację receptora dopaminy i stwierdzenie jego podobieństwa do podtypu D-1 (stymulujących cyklazę adenylową) receptorów dopaminy z mózgu ssaków (NOTMAN i DOWNER, 1987). Indukowany przez wiązanie dopaminy wzrost produkcji cAMP jest zależny od GTP i soli jednowartościowych kationów. Reszta anionowa hamuje efekt wzrostu

produkcji cAMP indukowany hormonalnie, a jednocześnie stymuluje podstawową syntezę cAMP (ORR i wsp., 1988).

Owadzia linia komórkowa Sf9 została wybrana jako model do badania związanych z cyklazą adenylową owadzych receptorów oktopaminy (ORR i wsp., 1992). Kompleks receptora z enzymem jest zasocjowany z membraną, wymaga GTP i jest wrażliwy na forskolinę. Receptor jest specyficzny dla oktopaminy i nie powoduje wzrostu stężenia cAMP w odpowiedzi na serotoninę lub dopaminę. Stężenie oktopaminy potrzebne do osiągnięcia 50% maksymalnego wzrostu syntezy cAMP wynosi 3.5 μM . Związki o działaniu agonistycznym w stosunku do receptora oktopaminy powodują specyficznie odczulenie aktywowanego receptora (obniżenie produkcji cAMP) (ORR i HOLLINGWORTH, 1990).

Badania nad wpływem oktopaminy i cAMP na włączanie radioaktywnego fosforanu do białek w homogenatach i w nienaruszonych preparatach zwojów mózgowych *Schistocerca gregaria* pokazały, że fizjologiczne działanie oktopaminy może obejmować fosforylację białek, w której pośredniczy cAMP (ROTONDO i wsp., 1987). U owadów znaleziono wiele kinaz, których aktywność jest regulowana przez przekąźniki informacji drugiego rzędu. Z tkanki nerwowej *Apis mellifera* oczyszczono dwie kinazy zależne od cAMP (ALTFELDER i MÜLLER, 1991). Pierwsza kinaza o masie cząsteczkowej 180 kDa posiada strukturę tetrameryczną z dwoma podjednostkami katalitycznymi i dwoma regulatorowymi, które dysocjują po przyłączeniu cAMP. Druga kinaza o masie cząsteczkowej 80 kDa jest dimerem o jednej podjednostce katalitycznej i jednej regulatorowej. Podjednostki regulatorowe obu kinaz występują w formie ufosforylowanej lub defosforylowanej. W tkance nerwowej *Apis mellifera* obecne są również kinazy, zależne od Ca^{2+} i fosfolipidów (ALTFELDER i wsp., 1991). Kinazy C wykryto w cytosolu i we frakcji nierozpuszczalnej mózgu *Manduca sexta* (QIU i wsp., 1990a, b).

1.2.2.4. Owadzie transmembranowe receptory–kanały jonowe regulowane wiązaniem ligandu

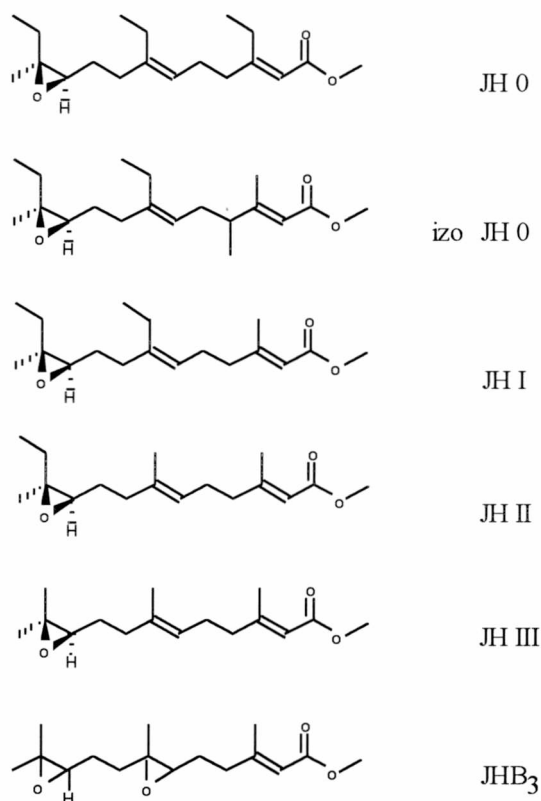
W tkance nerwowej owadów znaleziono nikotynowy receptor acetylocholinowy (DUDAI, 1978). Oczyszczony receptor, podobnie jak u kręgowców, jest pentamerycznym kanałem jonowym zbudowanym z czterech typów podjednostek. Właściwości kanału badano rekonstruując receptor w sztucznych, płaskich błonach lipidowych (HANKE i BREER, 1986). Stwierdzono, że cholinergiczne związki o działaniu agonistycznym aktywują otwarcie kanału dla jonów oraz, że jego właściwości są

podobne do właściwości receptora acetylocholinowego u kręgowców. α -Bungarotoksyna z jadu żmii jest zasadowym, krótkim polipeptydem często stosowanym do lokalizacji i badania nikotynowych receptorów acetylocholiny u kręgowców. Przy pomocy α -bungarotoksyny zlokalizowano i scharakteryzowano nikotynowe miejsca wiązania acetylocholiny w mózgu karaluchów (ORR i wsp., 1990). Analiza Scatcharda wykazała obecność jednej klasy miejsc wiążących o stałej dysocjacji 1.09 nM i pojemności 8926 fmola/mg białka. BENKE i BREER (1989) wyizolowali endogenne, niskocząsteczkowe inhibitory cholinergiczných miejsc wiążących w tkance nerwowej *Locusta migratoria* i pokazali, że mogą one *in vivo* pełnić funkcję endogennych, specyficznych modulatorów receptorów acetylocholinowych u owadów.

2. HORMONY JUWENILNE

2.1. Struktura

Nazwa "hormon juwenilny" (JH) obejmuje grupę homologów seskwiterpenoidowych (Rys.2); w tym pięć monoepoksydów (BERGOT i wsp., 1981; TOBE i FEYEREISEN, 1983), oraz jeden bisepoksyd (JHB₃) (RICHARD i wsp., 1989).



Rysunek 2

Wzory strukturalne naturalnych enancjomerów homologów hormonu juwenilnego. Według TOBE i FEYEREISENA (1983); RICHARDA i wsp., (1989).

Rysunek przedstawia enancjomery (10R,11S) homologów JH 0, izo-JH 0, JH I i JH II oraz homolog (10R) JH III. Konfiguracja naturalnego JHB₃ nie jest znana.

2.2. Rola fizjologiczna

Hormon juwenilny, obok ekdyzonu, jest jednym z głównych czynników niezbędnych do prawidłowego rozwoju owada. Generalnie, działanie JH prowadzi do hamowania rozwoju, we wczesnych stadiach (larwa, poczwarka) i do aktywacji procesów związanych z rozmnażaniem, w stadium owada dorosłego (KUMARAN, 1990). Dotychczasowe badania pokazały, że hormon juwenilny wywiera wpływ na wszystkie etapy życia owada; reguluje embriogenezę (KUMARAN, 1990), hamuje zmiany związane z metamorfozą (TANO i wsp., 1988), stymuluje procesy związane z reprodukcją i zachowaniem migracyjnym (KUMARAN, 1990), inicjuje zachowanie wabiące i/lub produkcję feromonów w stadium imago (CUSSON i McNEIL, 1989), pośredniczy w zakończeniu diapauzy (LEFEVERE, 1989; DE KORT i wsp., 1987). JH hamuje swoją biosyntezę przez nieklasyczne sprzężenie zwrotne, w którym uczestniczy centralny system nerwowy (TOBE i STAY, 1979). Hormon juwenilny moduluje także syntezę i działanie ekdyzonu (HIRUMA, 1986; SAKURAI i wsp., 1989; WATSON i wsp., 1988). Obecność JH jest niezbędna do syntezy i wydzielania PTTH, a tym samym do produkcji ekdyzonu w przedostatnim stadium larwalnym *Bombyx mori* (HIRUMA, 1986). Na początku ostatniego stadium larwalnego JH blokuje aktywność i wrażliwość gruczołów protorakalnych na PTTH (SAKURAI i wsp., 1989).

Hormon juwenilny współdziała w regulacji rozwoju owadów z innymi hormonami, z których szczególne znaczenie odgrywa ekdyzon. Jedynie w obecności ekdyzonu przejawia się morfogenetyczna aktywność JH (KUMARAN, 1990). Przykładem współdziałania obu hormonów może być regulacja ekspresji genów larwalnych (MEMMEL i KUMARAN, 1988) lub kontrola realizacji programu genetycznego komórek epidermalnych (RIDDIFORD, 1975). Oba hormony są niezbędne do produkcji witelogenin, lipoproteidów niezbędnych do dojrzewania jaj, gdzie jedną z funkcji JH jest zwiększenie wrażliwości tkanek produkujących witelogeniny na ekdyzon (ADAMS i FILIPI, 1988). Podczas cyklu rozrodczego u samic karaluchów *Blaberus discoidalis* hormon juwenilny współdziała również z neurohormonami, które wzmacniają stymulację syntezy białek wywoływaną przez JH (KEELEY i wsp., 1988).

U podłoża funkcji fizjologicznych JH leży wiele procesów biochemicznych. Jednym z nich jest regulacja (indukcja lub hamowanie) syntezy białek larwalnych. Hormon juwenilny jest odpowiedzialny m.in. za indukcję w ciele tłuszczowym *Dendroides canadensis* (XU i DUMAN, 1991) i *Tenebrio molitor* (XU i wsp., 1992) białek przeciwdziałających zamarzaniu, za hamowanie syntezy dwóch głównych

białkowych substancji zapasowych (LHP49 i LHP46) hemolimfy *Corcyra cephalonica* (ISMAIL i DUTTA-GUPTA, 1988) lub hamowanie syntezy jednego z hemolimfowych białek larwalnych (masa cząsteczkowa = 76 kDa i pI=5.8) *Trichoplusia ni* (JONES i wsp., 1988). Pokazano, że podłożem molekularnym tych procesów jest regulacja przez JH ekspresji genów kodujących białka, których synteza jest pod kontrolą hormonu (RIDDIFORD, 1986; BOSQUET i CALVEZ, 1985; JONES i wsp., 1988; MEMMEL i KUMARAN, 1988; DITTMANN i wsp., 1989). Istnieje wiele doniesień na temat stymulacji syntezy witelogenin przez JH (HATAKEYAMA i OISHI, 1990; KEELEY i wsp., 1988; IBANEZ i wsp., 1987). GOLD i DAVEY (1989) donoszą, że JH stymuluje również gromadzenie białek w dodatkowych gruczołach płciowych samców *Rhodnius prolixus*. Hormon juwenilny wpływa na okresowe funkcje organizmu owadów tj. melanizacja kutikuli (HIRUMA i RIDDIFORD, 1988), a także na funkcje ogólne. STEPIEN i wsp. (1988) pokazali, że traktowanie komórek Kc *Drosophila melanogaster* hormonem juwenilnym w stężeniu 10^{-12} – 10^{-9} M prowadzi najpierw do zwiększenia syntezy białek mitochondrialnych, a następnie do wzrostu aktywności mitochondrialnej oksydazy cytochromowej. Autorzy stwierdzili, że w działaniu JH na mitochondria pośredniczy jądro, gdyż nie obserwowano odpowiedzi na hormon w eksperymentach prowadzonych na izolowanych organellach. Co więcej, analiza białek mitochondrialnych w dwuwymiarowej elektroforezie pokazała zmianę ruchliwości dwóch białek kodowanych przez DNA jądrowe.

Aby pełnić tak rozmaite i często pozornie rozbieżne funkcje, stężenie JH musi być precyzyjnie kontrolowane podczas cyklu życia owada.

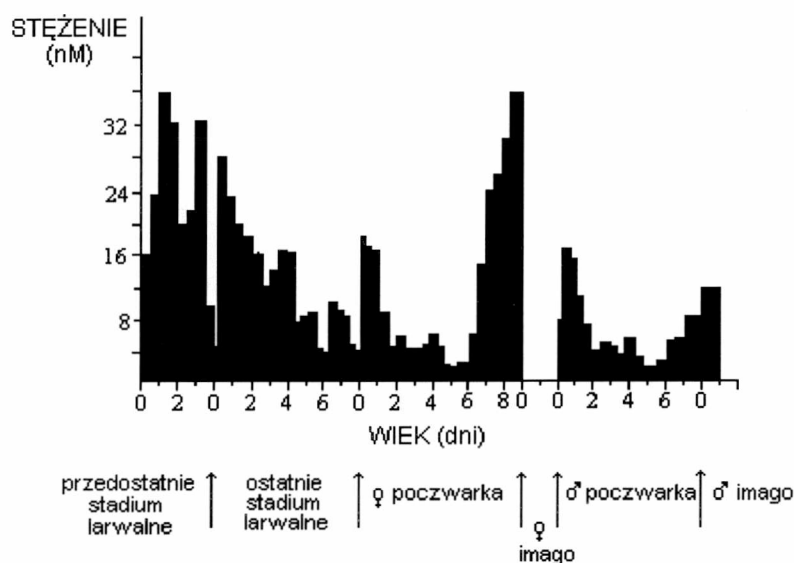
2.3. Stężenie w hemolimfie

Profil zmian stężenia hormonu juwenilnego w hemolimfie, od przedostatniego stadium larwalnego do stadium imago *Galleria mellonella*, wyznaczony przez PLANTEVIN i wsp. (1984), przedstawia Rys.3. Stężenie hormonu określano metodą radioimmunologiczną (RIA) po konwersji JH, obecnego w badanej próbce hemolimfy, do JH diolu.

Stężenie hormonu podczas stadiów larwalnych jest wysokie (maksimum 35 nM jest obserwowane w drugim dniu przedostatniego stadium). Podczas linienia larwa–larwa, larwa–poczwarka stężenie JH jest bardzo niskie (nie więcej niż 4 nM). Poziom hormonu jest niewysoki u poczwarek (średnie stężenie ok. 8 nM), ale bardzo wzrasta pod koniec tego stadium, co jest szczególnie widoczne u samic (36 nM w ostatnim dniu). U dorosłych

samic nie znaleziono JH podczas gdy u dorosłych samców jest on obecny, a pierwszego dnia jego stężenie wynosi 12 nM. Zmiany stężenia JH w hemolimfie larw dwóch ostatnich stadiów *Manduca sexta* wykazują podobne prawidłowości do znalezionych u *Galleria mellonella* (RIDDIFORD, 1980).

Opisane powyżej zmiany stężenia hormonu juwenilnego w czasie życia owada są wynikiem działania dwóch przeciwstawnych procesów: biosyntezy i degradacji.



Rysunek 3

Profil zmian rozwojowych stężenia JH w hemolimfie *Galleria mellonella*. Według PLANTEVIN i wsp. (1984).

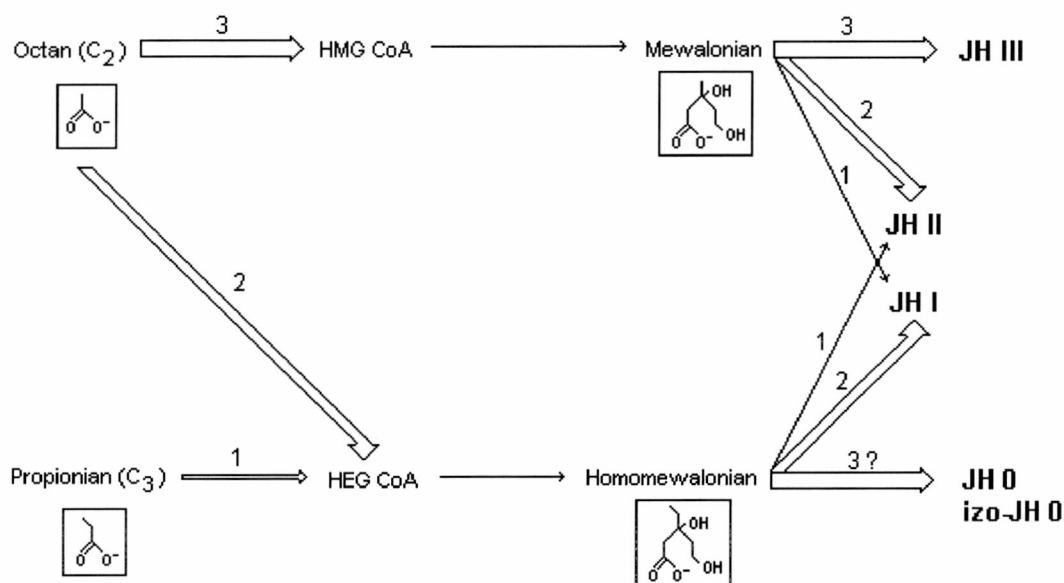
Stężenia JH wyznaczono metodą radioimmunologiczną.

2.4. Regulacja poziomu

2.4.1. Biosynteza

Poszukiwania dróg biosyntezy homologów hormonu juwenilnego rozpoczęto od sprawdzenia klasycznego szlaku syntezy związków terpenoidowych. Badania nad włączaniem *in vitro* przez *corpora allata* (CA) *Manduca sexta* prekursorów znakowanych ^{14}C pokazały, że biosynteza szkieletu węglowego JH III prowadzi od

octanu do pirofosforanu izopentynyłu według drogi biosyntezy cholesterolu (SCHOOLEY i wsp., 1973; TOBE i FEYEREISEN, 1983). Prekursorami wyższych homologów JH są octan i pirogronian (Rys.4), a klasyczna droga biosyntezy prowadzi do odpowiedniego pirofosforanu homoizopentynyłu. Pirofosforany izopentynyłu i homoizopentynyłu są następnie izomeryzowane do pirofosforanów dwumetyloallilu i *cis*-3-metylopentynyl-2-en-1-ylu odpowiednio, jak pokazano dla homogenatów CA z *Manduca sexta* (BAKER i wsp., 1981). Końcowe etapy biosyntezy są wspólne dla wszystkich monoepoksydowych homologów JH. Pirofosforan farnezyłu jest przekształcany w farnezoł, utleniany do kwasu farnezylowego, a następnie epoksydowany do JH III kwasu w obecności NADPH i tlenu atomowego, a w końcu metylowany do JH III (REIBSTEIN i wsp., 1976).



Rysunek 4

Prekursory i biosynteza homologów monoepoksydowych hormonu juwenilnego. Według TOBE i FEYEREISENA (1983).

HMG CoA, hydroksymetyloglutarylo CoA; HEG CoA, hydroksyetyloglutarylo CoA. Cyfry podają ilość cząsteczek substratu.

Wydaje się, że dwa ostatnie etapy biosyntezy JH różnią się kolejnością w zależności od rzędu. U *Dictyoptera* i *Orthoptera*, gdzie JH III jest jedynym znalezionym homologiem, kwas farnezylowy jest metylowany przez O-metylotransferazę do farnezylanu metylu, a następnie epoksydowany do JH III (PRATT i wsp., 1975; HAMNETT i PRATT, 1978). U *Lepidoptera*, gdzie występują wyższe homologe JH, kwasy farnezylowe są najpierw epoksydowane do JH-kwasów przez 10,11-epoksydazę, a później metylowane do odpowiedniego homologu hormonu juvenilnego (REIBSTEIN i wsp., 1976). Donorem reszty metylowej jest S-adenozylometionina (SCHOOLEY i wsp., 1976; METZLER i wsp. 1971; FEYEREISEN i FARNSWORTH, 1987a).

Biosynteza wyższych homologów, która zachodzi u *Lepidoptera* (SCHOOLEY i wsp., 1984), wydaje się być wynikiem zdolności CA tych owadów do katabolizmu aminokwasów o rozgałęzionych łańcuchach bocznych, takich jak izoleucyna lub walina do propionyl-CoA (BRINDLE i wsp., 1988). Według BRINDLE'A i wsp. (1992) CA owadów nie należących do *Lepidoptera*, które nie posiadają transaminazy rozgałęzionych aminokwasów nie są zdolne do wykorzystania ich w biosyntezie hormonu i w konsekwencji do syntezy wyższych homologów JH.

2.4.2. Degradacja

W hemolimfie pierwszą, zasadniczą reakcją, prowadzącą do inaktywacji hormonu juvenilnego jest hydroliza wiązania estrowego (SLADE i ZIBITT, 1972). W innych tkankach drogą degradacji (w zależności od tkanki) może być: hydroliza wiązania estrowego, hydratacja pierścienia epoksydowego lub utlenienie wiązania podwójnego (HAMMOCK i QUISTAD, 1976; WIŚNIEWSKI i wsp., 1986). Nieaktywne produkty tych reakcji są dalej metabolizowane, najczęściej do JH-kwasu-diolu (MEYER i LANZREIN, 1989), a następnie wydalone po koniugacji z siarczanami lub glukozą (ROE i VENKATESH, 1990).

W hemolimfie *Lepidoptera* znaleziono dwie klasy esteraz hormonu juvenilnego (SANBURG i wsp., 1975). Specyficzne sterazy JH (JHE), o niskiej stałej Michaelisa i dużej prędkości maksymalnej (ABDEL-AAL i HAMMOCK, 1988), są odporne na hamowanie przez diizopropylodifluorofosforan (DFP) (SANBURG i wsp., 1975). Esterazy ogólne, o szerokim spektrum substratów, są hamowane przez DFP (SANBURG i wsp., 1975). W hemolimfie larw ostatniego stadium, u 11 gatunków *Lepidoptera*, stężenie esteraz JH osiąga maksimum dwukrotnie: w okresie larwy wędrującej i u świeżo wyklutej przedpoczwarki (JONES i wsp., 1982). Przypuszcza się, że u *Manduca sexta* pierwszy

szczyt jest indukowany przez czynnik neurosekrecyjny (JONES i wsp., 1981), drugi przez hormon juwenilny (HAMMOCK, 1985).

Specyficzne esterazy JH zostały oczyszczone z hemolimfy tylko kilku gatunków owadów. JHE z hemolimfy *Manduca sexta* oczyszczono do homogenności (1700 razy) (COUDRON i wsp., 1981). Białko to zbudowane jest z jednego łańcucha polipeptydowego o masie cząsteczkowej 68 kDa i wykazuje odmienne stałe szybkości hydrolizy dla różnych homologów JH. Specyficzna esteraza JH z hemolimfy larw *Galleria mellonella* została oczyszczona 2630 razy (RUDNICKA i KOCHMAN, 1984). Stała Michaelisa dla tego enzymu jest niska i wynosi 2.1×10^{-8} M. Esteraza z *G. mellonella*, podobnie jak wyizolowana przez chromatografię powinowactwa JHE z hemolimfy *Trichoplusia ni* (HANZLIK i HAMMOCK, 1987) jest białkiem występującym w kilku formach molekularnych różniących się punktem izoelektrycznym. System ekspresji esterazy JH z *Heliothis virescens* w komórkach *Spodoptera frugiperda*, który opracowano w oparciu o wektor bakulowirusa (HAMMOCK i wsp., 1990), pozwoli na otrzymanie JHE w ilości wystarczającej do prowadzenia szczegółowych badań biochemicznych i fizjologicznych.

Wydaje się, że JHE w hemolimfie i innych tkankach (ciało tłuszczowe, gruczoł przędny, integument) jest enzymem cytoplazmatycznym (HANZLIK i HAMMOCK, 1988; WIŚNIEWSKI i wsp., 1986). Hydrolaza epoksydowa JH może występować w tkankach w obu formach; cytoplazmatycznej i związanej z membraną (WIŚNIEWSKI i wsp., 1986). WING i wsp. (1981) stwierdzili, że u *Trichoplusia ni* JHE z ciała tłuszczowego i hemolimfowa są nierozróżnialne pod względem punktu izoelektrycznego i specyficzności hamowania. Jest to zgodne z hipotezą, że ciało tłuszczowe jest miejscem biosyntezy i wydzielania esterazy JH do hemolimfy (WHITMORE i wsp., 1974; HAMMOCK i wsp., 1975; WING i wsp., 1981).

2.4.3. Regulacja biosyntezy

Aktywność biosyntetyczna *corpora allata* jest ściśle regulowana, zarówno podczas metamorfozy jak i reprodukcji (TOBE i STAY, 1985; ACLE i wsp., 1990). Czynniki wpływającymi na aktywność biosyntetyczną CA są: hormon juwenilny (TOBE i STAY, 1979), czynniki środowiskowe (DE KORT i KHAN, 1984; LESSMAN i HERMAN, 1983; BOGUŚ i CYMBOROWSKI, 1981), a także ekdyzon (WHISENTON i wsp., 1985). Czynniki te wywierają wpływ na aktywność CA przez impulsy nerwowe (GOODMAN, 1990; SZIBBO i TOBE, 1983) i/lub poprzez peptynergiczne substancje

transportowane aksonami bezpośrednio do CA lub uwalniane do krwi (SCHARRER, 1987). Neuropeptydy mogą wpływać na *corpora allata* stymulująco (allatotropiny) (GRANGER i SEHNAL, 1974; MUSZYŃSKA-PYTEL, 1987; UNNI i wsp., 1991; BOGUŚ i CYMBOROWSKI, 1984) lub hamująco (allatostatyny) (WILLIAMS, 1976; SZIBBO i TOBE, 1983; PAULSON i STAY, 1985).

Ogromnego postępu dokonano ostatnio w dziedzinie oczyszczania i określania pierwszorzędowej struktury neuropeptydów regulujących aktywność CA (WOODHEAD i wsp., 1989; PRATT i wsp., 1989; PRATT i wsp., 1991). KATAOKA i wsp. (1989a) oczyszczili trzynastopeptyd z ekstraktów mózgowych *Manduca sexta*, który odwracalnie stymuluje szybkość syntezy JH w CA świeżo wyklutych samic. Badania prowadzone przez UNNI i wsp. (1991) wskazują, że stymulacja dotyczy wczesnych etapów biosyntezy, a nie wpływa na dwa ostatnie: epoksydację i metylację. Z głów nie wyklutych jeszcze samic *Manduca sexta* oczyszczono (KRAMER i wsp., 1991) piętnastopeptyd–allatostatynę, która w sposób odwracalny silnie hamuje aktywność CA u larw ostatniego stadium i u dorosłych samic. BHASKARAN i wsp. (1990) pokazali, że CA larw ostatniego stadium *Manduca sexta* są hamowane nieodwracalnie. Na skutek tej inhibicji gruczoły, w ostatnim stadium *M. sexta* mogą produkować tylko JH-kwas.

Uwalnianie JH-kwasu do hemolimfy przez CA w ostatnim stadium larwalnym stwierdzono już wcześniej (BHASKARAN i wsp., 1987; WIŚNIEWSKI i wsp., 1987). U *Manduca sexta* przyczyną tego zjawiska jest utrata aktywności metylotransferazy JH-kwasu (BHASKARAN i wsp., 1987), u *Galleria mellonella* przewaga degradacji nad syntezą hormonu (WIŚNIEWSKI i wsp., 1987). JH-kwas jest produkowany jedynie w stadium przedpoczwarkowym, później jego synteza ustaje (BHASKARAN i wsp., 1987). Wydzielany do hemolimfy JH-kwas jest wychwytywany i metylowany do hormonu przez dodatkowe gruczoły płciowe samców (DAHM i wsp., 1981) i dyski imaginalne (BHASKARAN i wsp., 1986; WIŚNIEWSKI i wsp., 1987), w których stwierdzono znaczący poziom metylotransferazy JH-kwasu (SPARGANA i wsp., 1985). Tak więc JH-kwas wydaje się pełnić rolę prohormonu w stadium przedpoczwarkowym, a CA przechodzi z syntezy hormonu na syntezę prohormonu podczas linienia z larwy do poczwarki (BHASKARAN i wsp., 1986).

U podłoża regulacji biosyntetycznej CA leżą najprawdopodobniej procesy związane z systemem przekazników informacji drugiego rzędu, które obejmują kinazę C, cykliczne nukleotydy, neuromodulatory i wapń (TOBE, 1990). FEYEREISEN i FARNSWORTH (1987b) pokazali, że estry forbolu hamują biosyntezę JH w izolowanych CA z *Diploptera punctata*, implikując zaangażowanie kinazy C w regulację aktywności gruczołów. W tym

samym układzie badawczym stwierdzono, że biosynteza i uwalnianie JH zależy od stężenia Ca^{2+} w medium inkubacyjnym; 3-5 mM stężenie jest potrzebne do osiągnięcia przez CA maksymalnej aktywności biosyntetycznej (KIKUKAWA i wsp., 1987).

2.5. Transport

BARBER i wsp. (1981) pokazali, że hormon juvenilny obniża kooperatywność przejścia fazowego liposomów, zbudowanych z dipalmitoilofosfatydylocholiny, z fazy żelu do fazy ciekło–krystalicznej. JH wykazuje więc zdolność do perturbacji membran fosfolipidowych, która jest konsekwencją jego lipofilowości. Stwierdzono (MAYER i BURKE, 1976), że JH i jego analogi wiążą się niespecyficznie do takich białek jak albumina wołowa i wątrobowy, mikrosomalny cytochrom P₄₅₀, a u wielu gatunków owadów znaleziono w hemolimfie białka (należące do klasy lipoproteidów), które niespecyficznie i słabo, za to z dużą pojemnością wiążą JH (GILBERT i wsp., 1976; WHITMORE i GILBERT, 1972). Nie dziwi więc fakt, że chociaż stężenie JH w hemolimfie jest niższe od krytycznego stężenia micelnego (KRAMER i wsp., 1976a), owady posiadają specyficzne hemolimfowe białka transportujące o wysokim powinowactwie do hormonu (JHBP).

Za kryterium powinowactwa białek wiążących JH przyjęto stałą dysocjacji o wartości 10^{-6} M (GOODMAN i CHANG, 1985), która dzieli je na dwie grupy:

- JHBP, dla których K_d jest mniejsza od 10^{-6} M,
- białka o niskim powinowactwie, o K_d większej niż 10^{-6} M.

Białka należące do pierwszej grupy posiadają jedno miejsce dla hormonu w cząsteczce i charakteryzują się dużą specyficznością wiązania, cząsteczki białek drugiej grupy posiadają wiele miejsc wiążących o małej specyficzności (GILBERT i wsp., 1976).

JHBP zapobiega przed adsorpcją JH na lipofilowych powierzchniach tkanek (HAMMOCK i wsp., 1975; GILBERT i wsp., 1976), a także stanowi ochronę przed degradacją hormonu przez niespecyficzne esterazy (SANBURG i wsp., 1975). Białko nie chroni jednak hormonu przed degradacją przez JHE. Badania porównawcze kinetyki hydrolizy i wiązania JH II ABDEL–AALA i HAMMOCKA (1988) pokazały, że jedynym ograniczeniem degradacji JH II przez specyficzną esterazę JH, w czasie pojawiania się jej w hemolimfie, jest stała dysocjacji kompleksu JHBP-JH.

Maksymalna pojemność miejsc wiążących JH w hemolimfie larw ostatniego stadium *Galleria mellonella* jest równa 2×10^{-5} M (OŻYHAR i wsp., 1983). Dla larw *Manduca sexta* stężenie miejsc wiążących JH jest w przybliżeniu stałe we wcześniejszych

stadiach, a na początku i na końcu ostatniego stadium larwalnego wynosi 1.5×10^{-7} M (GOODMAN i GILBERT, 1978). Pomimo istotnych różnic w wartościach bezwzględnych profile zmian stężenia JHBP w hemolimfie *G.mellonella* i *M.sexta* są podobne do profilu wszystkich białek hemolimfowych, nie zaś do profilu stężenia hormonu juwenilnego (GOODMAN i GILBERT, 1978; OŻYHAR i wsp., 1983, GOODMAN, 1985).

2.5.1. Specyficzne białka wiążące i transportujące hormony juwenilne w hemolimfie

Do dnia dzisiejszego zidentyfikowano wiele specyficznych, hemolimfowych JHBP. Pod względem właściwości molekularnych stanowią one heterogenną grupę białek, którą można podzielić na cztery podgrupy (TROWELL, 1992):

- wysokocząsteczkowe lipoforyny (glikolipoproteidy) o dwóch podjednostkach białkowych (200-250 kDa i 70-85 kDa), zaangażowane w transport diglicerydów,
- lipoproteidy występujące u *Orthoptera*,
- niskocząsteczkowe białka *Lepidoptera*, zbudowane z jednego łańcucha polipeptydowego,
- wysokocząsteczkowe glikolipoproteidy, zbudowane z dwóch łańcuchów polipeptydowych (88 kDa i 79 kDa), występujące u diapauzujących *Lepidoptera*.

Tabela 3 podaje cechy znanych JHBP.

Tabela 3
Wybrane informacje o specyficznych hemolimfowych JHBP.

Źródło	masa [kDa]	pl	homon	stadium	K _d [M]	odnośnik
lipoforyny						
<i>Apis mellifera</i>	~450	--	JH III	d	3.4×10^{-8}	DE KORT i wsp., 1984
<i>Chironomus thummi</i>	~400	--	10R JH III	l	1.97×10^{-8}	WIŚNIEWSKI i STEUERNAGEL, 1990
<i>Diploptera punctata</i>	680	--	10R JH III	d	2.71×10^{-9}	KING i TOBE, 1988
<i>Drosophila melanogaster</i>	400	--	JH III	l	1.5×10^{-9}	SHEMSHEDINI i WILSON, 1988
<i>Leptinotarsa decemlineata</i>			10R JH III	d	9.0×10^{-9}	DE KORT i KOPMANSCHAP, 1987b

	574	--	10R JH III	d	1.2×10^{-8}	DE KORT i KOOPMANSCHAP, 1987a
			10S JH III	d	5.0×10^{-8}	DE KORT i KOOPMANSCHAP, 1987b
	~450	--	JH III	d	1.7×10^{-7}	DE KORT i wsp., 1984
<i>Leucophaea maderae</i>	220	--	JH III	d	1.5×10^{-8}	KOEPPE i wsp., 1988
			JH III	d	2.04×10^{-8}	KOVALICK i KOEPPE, 1983
			JH III	d		KOEPPE i wsp., 1984a
<i>Periplaneta americana</i>	~450		JH III	d	3.0×10^{-8}	DE KORT i wsp., 1984
			JH III	d	3.0×10^{-8}	DE KORT i KOOPMANSCHAP, 1989

lipoproteidy *Orthoptera*

<i>Gomphocerus rufus</i>	220	6.8	JH	d	5.0×10^{-8}	HARTMANN, 1978
<i>Locusta migratoria</i>	566	--	10R JH III		3.7×10^{-9}	KOOPMANSCHAP i DE KORT, 1988
	~450	--	JH III	l	6.8×10^{-9}	DE KORT i wsp., 1984
			10S JH III	l	2.4×10^{-8}	DE KORT i KOOPMANSCHAP, 1987b
			10R JH III	l	2.9×10^{-8}	DE KORT i KOOPMANSCHAP, 1987b
	~240	--	JH III	e	$\sim 10^{-8}$	HARTMANN i wsp., 1987
	575	--				DE BRUJIN i wsp., 1986
	220	--	JH I	d		EMMERICH i HARTMANN, 1973

niskocząsteczkowe białka *Lepidoptera*

<i>Anagasta kuehniella</i>	30	--	JH I	l	5.5×10^{-8}	KRAMER i CHILDS, 1977
<i>Cadra cautella</i>	30	--	JH I	l	1.4×10^{-8}	KRAMER i CHILDS, 1977
<i>Chironomus thummi</i>	~30	--	10R JH III	l	1.0×10^{-9}	WIŚNIEWSKI i STEUERNAGEL, 1990
<i>Diatraea grandiosella</i>			JH II	l	1.0×10^{-7}	LENZ i wsp., 1986
	29	6	JH I	l	1.3×10^{-7}	LENZ i wsp., 1986
			JH III	l	1.8×10^{-7}	LENZ i wsp., 1986
	30	4.8	JH I	l	3.1×10^{-7}	TURUNEN i CHIPPENDALE, 1981
<i>Diatraea saccharalis</i>			JH II	l	0.8×10^{-7}	LENZ i wsp., 1986
			JH III	l	1.2×10^{-7}	LENZ i wsp., 1986
	29	4.4;	JH I	l	1.3×10^{-7}	LENZ i wsp., 1986
<i>Galleria mellonella</i>			JH II	l	7.2×10^{-8}	OŻYHAR i KOCHMAN, 1987
	32	8.6	JH I	l	8.5×10^{-8}	OŻYHAR i KOCHMAN, 1987
			JH III	l	4.7×10^{-7}	OŻYHAR i KOCHMAN, 1987
<i>Homoeosoma electellum</i>	29	4.7	JH I	l	1.5×10^{-7}	LENZ i wsp., 1986
			JH III	l	1.6×10^{-7}	LENZ i wsp., 1986
			JH II	l	2.7×10^{-7}	LENZ i wsp., 1986
<i>Manduca sexta</i>	28	5.0	JH I	l iv	8.3×10^{-7}	GOODMAN i wsp., 1978a
	32	--	JH I	l iv	8.8×10^{-8}	KOEPPE i wsp., 1984b
			10RJH I	l iv	8×10^{-8}	PRESTWICH i wsp., 1988
	34	--	JH I	l v	3.0×10^{-7}	KRAMER i wsp., 1974
	28	--	JH I	l v	4.4×10^{-7}	KRAMER i wsp., 1976b

		JH III	1	1.3×10^{-7}	LENZ i wsp., 1986
30	--	JH I	1	2.0×10^{-7}	KRAMER i CHILDS, 1977
		JH II	1	2.7×10^{-7}	LENZ i wsp., 1986
29	--	JH I	1	2.8×10^{-7}	LENZ i wsp., 1986
<i>M. quinquemaculata</i>	30	JH I	1	9.0×10^{-8}	KRAMER i CHILDS, 1977
<i>Ostrinia nubilalis</i>		JH II	1	1.2×10^{-7}	LENZ i wsp., 1986
	31 5.0	JH I	1	1.3×10^{-7}	LENZ i wsp., 1986
		JH III	1	1.8×10^{-7}	LENZ i wsp., 1986
<i>Paramyelais transitiella</i>	30	JH I	1	2.2×10^{-7}	KRAMER i CHILDS, 1977
<i>Plodia interpunctella</i>	30	JH I	1	1.3×10^{-8}	KRAMER i CHILDS, 1977

białka diapauzujących *Lepidoptera*

<i>Busseola fuscata</i>	~500	10RJH I	--	1.2×10^{-7}	OSIR i wsp., 1991
-------------------------	------	---------	----	----------------------	-------------------

I, larwa; e, embrion; d, owad dorosły; IV, czwarte stadium; V, piąte stadium.

Badania immunochemiczne, przeprowadzone wśród larw *Lepidoptera* należących do kilku rodzin (GOODMAN i wsp., 1991), wykazały duże różnice strukturalne pomiędzy JHBP pochodzącymi z różnych źródeł. Spośród 6 monoklonalnych przeciwciał (rozpoznających różne epitopy) skierowanych do JHBP z hemolimfy *Manduca sexta*, tylko jedno rozpoznawało JHBP pochodzące z gatunków z poza tej rodziny.

Ze znanych dotychczas hemolimfowych JHBP wciąż niewiele zostało oczyszczonych (TROWELL, 1992). Wśród nich znajduje się kilka niskocząsteczkowych JHBP (KRAMER i wsp., 1976b; OŻYHAR i KOCHMAN, 1987; PRESTWICH i ATKINSON, 1990). Tylko dla jednego białka - larwalnego JHBP z *Manduca sexta* znana jest sekwencja aminokwasowa (LERRO i PRESTWICH, 1990). cDNA tego białka zostało oczyszczone, sekwencjonowane i ekspresjonowane w owadziej linii komórkowej Sf9. Dla dwóch innych, hemolimfowych białek wiążących JH: z larw *Galleria mellonella* i *Platyrepia virginialis* znany jest jedynie fragment sekwencji (ok. 30 aminokwasów) od N-końca (PRESTWICH i ATKINSON, 1990).

Od dawna interesowano się specyficznością i budową miejsca wiązania hormonu w JHBP. Chociaż przeprowadzono wiele badań, dotyczących specyficzności wiązania homologów i enancjomerów JH (GOODMAN i wsp., 1978b; PETERSON i wsp., 1977; PRESTWICH i wsp., 1987; Tabela 3) wciąż niewiele wiadomo na temat budowy miejsca

wiążącego hormon w cząsteczce JHBP. Autorzy pracy (GOODMAN i wsp., 1978b) poświęconej specyficzności hemolimfowego JHBP z *Manduca sexta*, na podstawie wyników badań kompetycyjnych, pokusili się o przedstawienie hipotetycznego modelu miejsca wiązania JH. Zaproponowali model bruzdy, położonej na powierzchni cząsteczki białka, w której oddziaływania pomiędzy JHBP a hormonem obejmują wszystkie części cząsteczki JH: grupę estrową, pierścień epoksydowy, łańcuchy boczne i łańcuch główny. Mapowanie miejsca wiążącego w białku *Manduca sexta* pokazało, że w wiązanie hormonu zaangażowane są dwa rejony: Asp 1–Glu 34 i Ala 184–Asn 226 (TOUHARA i PRESTWICH, 1992). Rejon Ala 184–Asn 226, o przewidywanej hydrofobowej strukturze β bierze prawdopodobnie udział w rozpoznaniu hydrofobowego łańcucha głównego JH. Ponieważ 5 z 6 cystein znalaziono w rejonach kontaktowych, autorzy (TOUHARA i PRESTWICH, 1992) przypuszczają, że mostki disiarczkowe łączą oba rejony tworząc rodzaj kieszeni dla hormonu.

Badania immunoelektroforetyczne i immunoprecypitacyjne przeprowadzone na larwach *Manduca sexta* pokazały, że źródłem JHBP jest ciało tłuszczowe, które szybko uwalnia syntetyzowane białko bez jego magazynowania (NOWOCK i wsp., 1975). Pokazano również (KOEPE i wsp., 1988), że ciało tłuszczowe osobników dorosłych *Leucophaea madere* syntetyzuje prekursor hemolimfowego 220 kDa JHBP – białko o masie 275 kDa. Mechanizm procesowania i/lub modyfikacji prekursora nie jest znany. Dwie obserwacje wskazywałyby na proteolityczny charakter procesu. Pierwszą jest hamujący wpływ jaki wywiera PMSF na tworzenie się form molekularnych JHBP z hemolimfy larw *Galleria mellonella* (OŻYHAR i KOCHMAN, 1986). Drugą identyfikacja, w elektroforezie dwuwymiarowej, wielu białek z hemolimfy *Manduca sexta* rozpoznawanych przez przeciwciała skierowane do hemolimfowego JHBP z tego owada (GOODMAN i wsp., 1990).

3. CEL PRACY

Wśród wielu znanych hemolimfowych białek wiążących hormon juwenilny jedynie kilka zostało oczyszczonych. JHBP z *Galleria mellonella* oczyszczono do homogenności i wstępnie scharakteryzowano (OŻYHAR i KOCHMAN, 1987). Do tej pory badania nad relacją JH - specyficzne białka wiążące JH skupiały się na określeniu ich powinowactwa do stereoizomerów, homologów i analogów ligandu. Dotychczas, dla żadnego z tych białek, nie zbadano właściwości kompleksu jaki tworzy ono z hormonem juwenilnym.

Nie do końca poznana jest również funkcja jaką *in vivo* pełni JHBP. Oprócz powszechnie przyjętej hipotezy o chronieniu hormonu przez białko wiążące przed degradacją przez niespecyficzne esterazy i adsorpcją na lipofilowych powierzchniach tkanek, postawiona została już w latach siedemdziesiątych hipoteza według której JHBP uczestniczyłoby w rozpoznaniu hormonu przez tkanki docelowe (w Dyskusji przedstawiono wyniki badań popierających tę hipotezę).

Otwartym wciąż pozostaje pytanie czy istnieje u owadów system rozpoznający hormon związany z białkiem. Pierwszym krokiem w odpowiedzi na to pytanie powinno być określenie właściwości kompleksu JHBP-JH i porównanie ich z właściwościami wolnego białka co stanowiło cel niniejszej pracy.

Większość wyników przedstawionych w niniejszej rozprawie doktorskiej została zaprezentowana w następujących doniesieniach:

Publikacje:

- 1.E. WIECZOREK i M. KOCHMAN (1991) Conformational change of the haemolymph juvenile-hormone-binding protein from *Galleria mellonella*. *Eur. J. Biochem.* **201**, 347-353.
- 2.M. KOCHMAN i E. WIECZOREK (1991) Molecular mechanism of the juvenile hormone action. *Acta Biochim. Polon.* **38**, 393-405.

Komunikaty:

- 1.Ograniczona proteoliza białka transportującego hormon juvenilny. *XXV Konferencja Polskiego Towarzystwa Biochemicznego*, 1989 Toruń, Polska (poster).
- 2.The effect of juvenile hormone on molecular properties of juvenile hormone binding protein from the haemolymph of *Galleria mellonella* (L). *15th Conference of European Comparative Endocrinologists*, 1990 Leuven, Belgium (ustny komunikat) Abstrakt, Red. European Society for Comparative Endocrinology, str.48.

**CZĘŚĆ
EKSPERYMENTALNA**

4. MATERIAŁY I METODY

4.1. Odczynniki

Racemiczny $[10-^3\text{H}]$ hormon juwenilny I (*cis*-10,11-epoksy-7-etylo-3,11-dimetylo-*trans,trans*-2,6-[10- ^3H] tridekadienonian metylowy) o radioaktywności właściwej 15.5Ci/mmol pochodził z NEN Chemicals. $\text{Na}[^{125}\text{I}]$ zakupiono w firmie Pol-atom. (10R,11S) hormon juwenilny I (lot 29C-0011-1), subtylizynę **3.4.21.14** (typ VIII Carlsberga), chymotrypsynę **3.4.21.1** (traktowaną (-)-1-chloro-3-tozyloamido-4-fenilo-2-butanonem), trypsynę **3.4.21.4** (traktowaną chlorowodorkiem (-)-1-chloro-3-tozyloamido-7-amino-2-heptanonu), karboksypeptydazę A **3.4.17.1** (traktowaną diizopropylodifluorofosforanem), fluorek fenylometylosulfonowy (PMSF), *p*-nitrofenylofosforan, diaminobenzydynę *N,N'*-metyleno-*bis*-akrylamid, pepsynę A **3.4.23.1**, karboksypeptydazę Y, koniugat: anty-mysie IgG - peroksydaza zakupiono w Sigmie. Dehydrogenazę mleczanową **1.1.2.3** z mięśni króliczych otrzymano z Boehringer-Mannheim GmbH. Aldolaza fruktozobisfosforanowa **4.1.2.13** z mięśni królika, oczyszczona według PENHOETA i wsp. (1969) była ofiarowana przez mgr R. Michalczyka. Heterogenny preparat albuminy z jaj kurzych, *p*-nitrofenol, jodek sodu zakupiono w firmie Polskie Odczynniki Chemiczne. Czysty preparat albuminy z jaj kurzych, sacharoza, Serva Blau G (Coomassie brilliant blue G), β -merkaptotanol i żelatyna pochodziły z firmy Serva. Standardy niskocząsteczkowe, kolumny PD-10 zakupiono w firmie Pharmacia. Akrylamid, pirydyna, aldehyd glutarowy (1,5-pentadiol) pochodziły z firmy Merck. Jodogen (1,3,4,6-tetrachloro-3 α ,6 α -difenyloglikoluril) zakupiono w firmie Pierce. Nitroceluloza pochodziła z firmy Schleicher & Schuell. Mysie monoklonalne przeciwciała przeciwko JHBP były przygotowane przez dr J. Szkudlarkę z firmy Middle European Diagnostics.

4.2. Hodowla owadów, zbieranie hemolimfy i ciała tłuszczowego

Larwy *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) hodowano na pożywkę przygotowywanej według SEHNALA (1966), zawierającej wosk pszczelej (375g), mleko w proszku (250g), suszone drożdże (125g), kaszę kukurydzianą (500g), glicerol (250ml), mąkę pszenną (250g) i miód (ok.300g). Hodowlę prowadzono w ciemności przy wilgotności względnej 40–60% w temperaturze 28–30 °C. Larwy VII stadium 1 dnia rozpoznawano po ciemnym, prawie czarnym zabarwieniu kutikuli oraz po 2 mm szerokości kapsułce głowowej. Bezpośrednio przed zbieraniem hemolimfy lub ciała tłuszczowego larwy anestezjowano przez zanurzenie w wodzie destylowanej, następnie dwukrotnie płukano w wodzie destylowanej przed zbieraniem tkanki.

a) zbieranie hemolimfy:

Po odcięciu drugiej pary odnóży tułowiowych wypływającą hemolimfę (ok. 20 μ l) zbierano za pomocą pipety Pasteura i umieszczano w probówce polietylenowej zanurzonej w suchym lodzie. Hemolimfę przechowywano w temperaturze - 20 °C.

b) zbieranie ciała tłuszczowego:

Larwę umieszczano na szkiełku podstawowym pod binokulem. Po rozcięciu integumentu larwy wzdłuż, po stronie brzusznej, wycinano ciało tłuszczowe przez przecięcie ścięgien łączących je z innymi tkankami. Ciało tłuszczowe zbierano do probówki z buforem 5 mM Hepes, 130 mM NaCl, 5 mM KCl, 0.1 mM CaCl_2 , pH 8.5 zanurzonej w łaźni lodowej i przechowywano w temperaturze - 80°C (UENO i wsp., 1983).

4.3. Przygotowywanie szkła laboratoryjnego używanego do pracy z hormonem juvenilnym

Szkło, które było używane do pracy z roztworami wodnymi hormonu juvenilnego było wcześniej pokrywane glikolem polietylenowym. Szkło umieszczano na kilka godzin w 1% roztworze glikolu polietylenowego 20 000 (Calbiochem), płukano wodą destylowaną i suszono w 120 °C (KRAMER i wsp., 1976b).

4.4. Pomiar aktywności białek: białka wiążącego hormon juvenilny, aldolazy i fosfatazy alkalicznej

Wiązanie JH - **aktywność JHBP** - definiowano jako ilość nanomoli hormonu juvenilnego związanego z 1 miligramem białka (w warunkach testu) i mierzono metodą węglową (GOODMAN i wsp., 1976) w obecności 0.1% żelatyny, jak opisano w pracy OŻYHARA i KOCHMANA (1987). Do szklanej probówki, zawierającej 60 pmoli JH I (o radioaktywności właściwej 2.7×10^{14} dpm/mol), dodawano 20 μ l JHBP (około 1 μ g) i 180 μ l 0.1% żelatyny w buforze 10 mM Mops, 100 mM NaCl, pH 7.2 i mieszano (vortex). Aktywność prób JHBP trawionego proteazami w obecności nieznakowanego hormonu juvenilnego, określano po dodaniu [^3H] JH I o radioaktywności właściwej takiej by otrzymać końcowe stężenie i radioaktywność właściwą jak w próbach JHBP trawionego w nieobecności JH.

Pomiary radioaktywności próbek wykonywano w liczniku scyntylicyjnym LS 3801 firmy Beckman. Koktail scyntylicyjny zawierał: 500 ml 1,4-dioksanu, 100 ml toluenu, 26 g naftalenu, 4 g dwufenoksyksazonu oraz 80 mg *p*-bis(O-metylostyrylo) -O-benzenu.

Aktywność aldolazy fruktozobisfosforanowej oznaczano testem enzymatycznym w 25°C według BLOSTEIN i RUTTERA (1963), zastępując bufor glicylo–glicynowy buforem 100 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7.5. Reakcję rozpoczynano przez dodanie 20-50 µl odpowiednio rozcieńczonej aldolazy do kuwety z 1 ml mieszaniny reakcyjnej i rejestrowano spadek absorpcji przy 340 nm. Kuweta zawierała następujące odczynniki w stężeniach końcowych: 100 mM Tris, 1 mM EDTA, 2.5 mM fruktozo-1,6-bisfosforan, 0.15 mM NADH, ok. 15 jednostek/ml izomerazy fosfotriozowej i ok. 1 jednostkę/ml dehydrogenazy L-α-glicerolofosforanu.

Aktywność fosfatazy alkalicznej określano w 100 µl frakcji membranowej zawieszonej w buforze B (patrz 4.10.), do której dodawano 650 µl *p*-nitrofenylofosforanu o stężeniu końcowym 5 mM, w buforze 50 mM Tris, pH 10. Próby inkubowano przez 35 minut w 37 °C, po czym do każdej dodawano po 75 µl 1N NaOH. Próby mieszano (vortex) i mierzono absorpcję przy 440 nm. Ilość uwolnionego *p*-nitrofenolu określano według krzywej standardowej.

4.5. Otrzymywanie białka wiążącego hormon juvenilny

Homogenne białko wiążące hormon juvenilny (JHBP) otrzymywano z hemolimfy larw VII stadium, 4 dnia mola woskowego *Galleria mellonella* według OŽYHARA i KOCHMANA (1987).

4.6. Elektroforeza żelowa

Elektroforezę w warunkach nie-denaturujących prowadzono według DAVIESA (1964). Elektroforeza dyskowa (kolumnienki) była prowadzona w 10% żelu rozdzielającym. Płytkową elektroforezę prowadzono w gradiencie żelu rozdzielającego (10-20%) zawierającego równoległe gradient sacharozy (0-10%). Żele były barwione Coomassie brilliant blue G-250 według DIEZEL'A i wsp. (1972). Elektroforezę w obecności SDS prowadzono według LAEMMLI'EGO (1970) w dwóch rodzajach gradientu żelu rozdzielającego: 10-20% lub 10-27% zawierającego równoległe gradient sacharozy 0-10% jeśli nie zaznaczono inaczej. Żele były barwione srebrem według MORRISSEY'A (1981).

Aby określić szybkość trawienia JHBP subtylizyną w obecności lub nieobecności hormonu juvenilnego, reakcję w próbach JHBP trawionego subtylizyną przerywano za pomocą PMSF po odpowiednim czasie, próby zamrażano i po rozmrożeniu rozdzielano

elektroforetycznie na żelu w warunkach nie-denaturujących. Po wybarwieniu intensywność rozdzielonych pasm białkowych była mierzona za pomocą densytometru laserowego 2202 Ultrosan (LKB). Intensywność pasm odpowiadających niestrawionemu białku była użyta do oszacowania, za pomocą programu EUREKA 1.0 (BORLAND, 1985), pseudo-pierwszorzędowej stałej szybkości trawienia.

4.7. Wirowanie w gradiencie gęstości sacharozy

Próby 50 μ l JHBP (64 μ g białka/probówkę) nawarstwiano na powierzchnię roztworu o liniowym gradiencie (5–20%) gęstości sacharozy przygotowanym w buforze 10 mM Mops, 100 mM NaCl, pH 7.2 według STONE'A (1974) i wirowano w rotorze SW 50.1 (Beckman) przy 37 000 rpm (względna siła odśrodkowa 92 000 $\times$ g na szczycie próbki) przez 30 godzin w 5 °C. W eksperymencie przeprowadzonym w obecności hormonu juwenilnego gradient sacharozowy zawierał 5.2 μ M JH I (o radioaktywności właściwej równej 1.1×10^{13} dpm/mol). Jako standardu wewnętrznego użyto czystego preparatu albuminy z jaj kurzych. Po zakończeniu wirowania zbierano frakcje o objętości 100 μ l i mierzono: wiązanie hormonu juwenilnego, fluorescencję albuminy z jaj kurzych (wzbudzenie przy 295 nm, emisja przy 332 nm), współczynnik refrakcji i radioaktywność frakcji.

4.8. Sieciowanie białek aldehydem glutarowym

4.8.1. Sieciowanie aldolazy

Sieciowanie aldolazy fruktozobisfosforanowej z mięśni królika prowadzono według HERMANA i wsp. (1979) z modyfikacjami, przy zmieniającym się nadmiarze aldehydu glutarowego nad białkiem. Do 20 μ l próby aldolazy o stężeniu końcowym monomeru równym 2 μ M dodawano 1 μ l aldehydu glutarowego o stężeniu końcowym zmieniającym się od 0.66 mM do 42 mM (nadmiar aldehydu nad białkiem od 330 do 21000 razy) i inkubowano w temperaturze 20° C, w buforze 100 mM Mops, pH 8.2. Po 5 minutach reakcję przerywano przez dodanie do każdej próby 20 μ l 4% SDS w buforze 125 mM Tris, pH 6.8, zawierającym 20% sacharozę, 2% β -merkaptotanol i 0.02% błękit bromofenolowy i mieszano (vortex). Nieprzereagowany aldehyd glutarowy usuwano przez dodanie hydrazyny w stężeniu końcowym 10 krotnie wyższym niż stężenie aldehydu. Próbkę gotowano przez 10 minut i po 2 godzinach inkubacji w temperaturze pokojowej poddawano elektroforezie w obecności SDS.

4.8.2. Sieciowanie białka wiążącego hormon juvenilny i białek kontrolnych

Roztwory białkowe: JHBP, dehydrogenazy mleczanowej i albuminy z jaj kurzych, każdy o stężeniu końcowym monomeru $3.43 \mu\text{M}$ w buforze 200 mM Mops, 5 mM EDTA, inkubowano równolegle w nieobecności lub obecności $34 \mu\text{M}$ hormonu juvenilnego I w temperaturze 40°C przez 1 godzinę. Następnie próby sieciowano aldehydem glutarowym o stężeniu końcowym 17 mM (5000 krotny nadmiar) przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej. Pozostałe warunki zachowano jak wyżej.

4.9. Trawienie enzymami proteolitycznymi

4.9.1. Trawienie białka wiążącego hormon juvenilny

Trawienie trypsyną, chymotrypsyną lub pepsyną prowadzono przy stosunku wagowo-wagowym proteazy do JHBP równym 1:50, w temperaturze 25°C . Reakcję rozpoczynano przez dodanie 150 μl proteazy o stężeniu 80 nM ($1.6 \mu\text{g/ml}$, trypsyna), 64 nM ($1.6 \mu\text{g/ml}$, chymotrypsyna), 45 nM ($1.6 \mu\text{g/ml}$, pepsyna) w buforze 100 mM Mops, pH 8.4 (pH 2.0 w przypadku pepsyny) do takiej samej objętości JHBP o stężeniu $2.5 \mu\text{M}$ ($80 \mu\text{g/ml}$) w buforze 10 mM Mops, 100 mM NaCl, pH 7.2. Końcowe pH układu wynosiło 8.2 (pH 2.3 w przypadku próby JHBP z pepsyną). Po określonym czasie z mieszaniny reakcyjnej pobierano 100 μl próbki i przenoszono je do probówek zawierających 100 μl PMSF o stężeniu 2 mM w buforze 100 mM Mops, pH 8.4, mieszano (vortex) i inkubowano przez 15 minut w temperaturze 25°C , po czym oznaczano aktywność JHBP.

Trawienie karboksypeptydazą A prowadzono przy stosunku wagowo-wagowym proteazy do JHBP równym 1:200, w buforze 100 mM Mops, 100 mM NaCl, pH 7.5, zawierającym 1% LiCl (w/v), w temperaturze 25°C . Przed trawieniem 35 μl JHBP o stężeniu $25 \mu\text{M}$ ($800 \mu\text{g/ml}$) w buforze 10 mM Mops, 100 mM NaCl, pH 7.2 było inkubowane w nieobecności lub obecności JH I o stężeniu $30 \mu\text{M}$ przez 18 godzin w 5°C . Reakcję rozpoczynano przez dodanie 315 μl karboksypeptydazy A o stężeniu 12.8 nM ($0.44 \mu\text{g/ml}$) w buforze 100 mM Mops, 100 mM NaCl, pH 7.5, zawierającego 1.1 % (w/v) LiCl. Po określonym czasie z mieszaniny reakcyjnej pobierano 20 μl próbki i natychmiast mierzono aktywność JHBP.

Trawienie karboksypeptydazą Y prowadzono przy stosunku wagowo-wagowym proteazy do JHBP równym 1:100, w buforze 100 mM pirydyna/octan, pH 5.5 w temperaturze 25°C . Przed trawieniem próbka 35 μl JHBP o stężeniu $25 \mu\text{M}$ była inkubowana w obecności lub nieobecności JH I jak wyżej. Reakcję rozpoczynano przez dodanie 315 μl karboksypeptydazy Y o stężeniu 14.6 nM ($0.89 \mu\text{g/ml}$) w buforze 100

mM pirydyna/octan, pH 5.5. Po określonym czasie z mieszaniny reakcyjnej pobierano 20 μ l próbki i natychmiast mierzono aktywność JHBP.

Trawienie subtylizyną prowadzono przy stosunku wagowo-wagowym proteazy do JHBP równym 1:50 w temperaturze 25 °C. Przed trawieniem 380 μ l JHBP o stężeniu 10 μ M (320 μ g/ml) w buforze 10 mM Mops, 100 mM NaCl, pH 7.2 inkubowano w obecności lub nieobecności 12 μ M JH I przez 18 godzin w 5 °C. Reakcję rozpoczynano przez dodanie do próby JHBP takiej samej objętości subtylizyny o stężeniu 0.23 μ M (6.4 μ g/ml) w buforze 100 mM Hepes, pH 8.0. Końcowe pH układu wynosiło 7.8. Po określonym czasie z mieszaniny reakcyjnej pobierano próbki o objętości 100 μ l i przenoszono je do probówek zawierających 100 μ l 2 mM PMSF w buforze 100 mM Hepes, pH 8.0. Próby mieszano (vortex) i inkubowano przez 15 minut w temperaturze 25 °C. Następnie próby były dzielone na dwie części; pierwszą używano do określenia aktywności JHBP, drugą zamrażano i przechowywano w -20 °C do chwili wykonania elektroforezy.

4.9.2. Trawienie aldolazy

Trawienie aldolazy fruktozobisfosforanowej z mięśni królika karboksypeptydazą A prowadzono przy stosunku wagowo-wagowym karboksypeptydazy A do aldolazy równym 1:10 000. Trawienie aldolazy subtylizyną prowadzono przy stosunku wagowo-wagowym subtylizyny do aldolazy równym 1:2000. Pozostałe warunki trawienia zachowano jak dla trawienia JHBP tymi enzymami.

4.10. Otrzymywanie frakcji membranowej z ciała tłuszczowego

Frakcję membranową otrzymywano z ciała tłuszczowego larw VII stadium 4 dnia *Galleria mellonella* według UENO i wsp. (1983). Ciało tłuszczowe wycinano z larw pod binokulem i umieszczano w probówce zawierającej bufor: 5 mM Hepes, 130 mM NaCl, 5 mM KCl, 0.1 mM CaCl_2 , pH 8.5, umieszczonej w łaźni lodowej. Ciała tłuszczowe zebrane z 15 larw płukano trzykrotnie buforem A (50 mM Hepes, 0.1 mM CaCl_2 , 1 mg/ml albuminy z surowicy wołowej, pH 8.5) i homogenizowano w łaźni lodowej, w szklanym homogenizatorze, trzydziestoma przesunięciami teflonowego tłoka. Następnie homogenat wirowano przy 800 x g przez 10 minut w temperaturze 4°C. Otrzymany supernatant wirowano przy 10 000 x g przez 20 minut w temperaturze 4°C. Osad, zawierający membrany, płukano jeden raz buforem A i po ponownym wirowaniu zawieszano w 400 μ l buforu B (10 mM Hepes, 2 mM CaCl_2 , 1 mg/ml albuminy z surowicy wołowej, 10% sacharoza (w/v), pH 7.0) i przechowywano w temperaturze -80 °C jako frakcję membranową.

Stopień oczyszczenia frakcji membranowej określano na podstawie aktywności specyficznej fosfatazy alkalicznej.

4.11. Jodowanie białka wiążącego hormon juvenilny

JHBP znakowano jodem 125 lub jodem 127 według zmodyfikowanej procedury FRAKER i SPECKA (1978). Do probówki szklanej, opłaskanej 100 µg jodogenu rozpuszczonego w 100 µl chloroformu, po odparowaniu rozpuszczalnika, dodawano 50 µl JHBP o stężeniu 6.4 µM (0.32 nmola) w buforze 0.2 M fosforan, pH 6.5 i 50 µl NaI (0.375 nmola) o radioaktywności 0.25 MBq (dla jodu 125) w buforze jak wyżej. Reakcję prowadzono przez 10 minut w 0°C. Produkty reakcji rozdzielano przez natychmiastowe naniesienie mieszaniny reakcyjnej na kolumnę PD-10 wyrównowaną buforem 10 mM Mops, 100 mM NaCl, 1 mg/ml albuminy z surowicy wołowej, pH 7.2, w którym prowadzono też rozdział. Radioaktywne frakcje wysokocząsteczkowe zamrażano i przechowywano w temperaturze - 20 °C.

4.12. Wiązanie znakowanego białka wiążącego hormon juvenilny do frakcji membranowej

Test wiązania prowadzono w szklanych probówkach pokrytych glikolem polietylenowym. Do pustych probówek, w których oznaczano wiązanie w obecności hormonu, dodawano po 10-25 nmoli JH I w 1 µl heksanu. Standardowa mieszanina reakcyjna zawierała 50 µg frakcji membranowej (białko), 130 fmola [¹²⁵] JHBP (20 000 cpm) w 400 µl buforu C (5 mM Mes, 4 mM CaCl₂, 1 mg/ml albuminy z surowicy wołowej, 1 mg/ml żelatyny, pH 6.5). Wiązanie niespecyficzne oznaczano w obecności 1000-3000 krotnego nadmiaru nieznakowanego JHBP. Próby inkubowano w 5°C przez odpowiedni czas, po czym wirowano przy 4000 rpm przez 10 minut. Osad przemywano buforem C i po ponownym wirowaniu oznaczano radioaktywność osadu w liczniku promieniowania gamma 1612 firmy LKB.

4.13. Oznaczanie stężenia białka

Stężenie JHBP określano spektrofotometrycznie przy długości fali 280 nm, przyjmując wartość współczynnika absorpcji A^{1cm} 0.1 % roztworu równą 0.73 według OŻYHARA i KOCHMANA (1987). Stężenie białka we frakcji membranowej określano za pomocą metody BRADFORD (1976), stosując jako standard albuminę z surowicy wołowej.

4.14. Western blotting

Western blotting JHBP i hemolimfy prowadzono według zmodyfikowanej procedury TOWBINA i wsp. (1979). 9 µg czystego JHBP, 600 µg białek hemolimfy oraz mieszaninę tych dwóch prób rozdzielono elektroforetycznie w 12% żelu poliakrylamidowym w warunkach nie-denaturujących. Po zakończeniu elektroforezy żel podzielono na trzy takie same części i białka z każdej z nich przeniesiono na trzy kawałki nitrocelulozy przez elektroblotting prowadzony w buforze 15.6 mM Tris, 120 mM glicyna, pH 8.3, w temp. 4°C, przy natężeniu prądu 10 mA, przez 2 godziny. Następnie jeden kawałek nitrocelulozy wybarwiono czernią amidową, a dwa pozostałe poddano interakcji z przeciwciałami według następującego protokołu:

- **blokowanie** 2% roztworem żelatyny w PBS (10 mM fosforan sodu, 150 mM NaCl, pH 7.4; sól fizjologiczna) 30 minut
- **płukanie** 0.05% roztworem detergentu Tween w PBS 3x10 minut
- **inkubacja z roztworem mysich przeciwciał monoklonalnych skierowanych do JHBP w PBS (próba) lub inkubacja z PBS (kontrola)** 120 minut
- **płukanie** 0.05% roztworem detergentu Tween w PBS 3x10 minut
- **płukanie** PBS 10 minut
- **inkubacja z roztworem koniugatu anty-mysie IgG-peroksydaza w PBS (próba i kontrola)** 120 minut
- **wywoływanie** 1% roztworem (w/v) diaminobenzydyny zawierającym 0.1% H₂O₂ (objętościowo-objętościowy)
- **płukanie** wodą destylowaną

4.15. HPLC

Analizy HPLC prowadzono w systemie chromatograficznym firmy Waters wyposażonym w detektor fotodiodowy. Próbkę białkową o objętości 1.5 ml wyrównoważoną 0.4 mM buforem fosforanowym, 10 mM NaCl, pH 6.2 naniesiono na kolumnę CM-SW3 (Beckman). Rozdział prowadzono w 100% roztworze A (10 mM bufor fosforanowy, pH 5.7) przez pierwsze 3 minuty, a następnie w liniowym gradiencie 0-75% roztworu B (roztwór A zawierający 500 mM NaCl) przez 22.5 minuty, ze stałą prędkością przepływu równą 1 ml/minutę, w 20°C. Absorpcję monitorowano w sposób ciągły przy 280 nm.

4.16. Degradacja i oznaczanie metabolitów hormonu juvenilnego

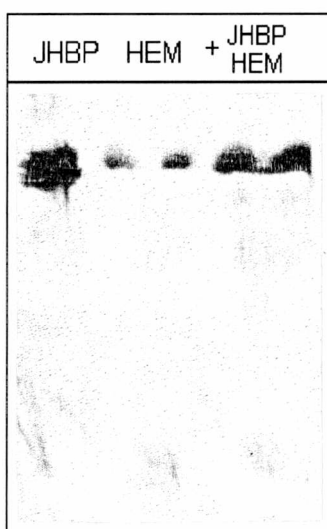
Do probówek zawierających [³H]JH I o radioaktywności właściwej 2.42x10¹³ dpm/mol (3.3 µM, 80 000 dpm) w 1 ml buforu 5 mM Mes, 4 mM CaCl₂, 1 mg/ml

albuminy z surowicy wołowej, 1 mg/ml żelatyny, pH 6.5 dodawano po 1 ml buforu 10 mM Mops, 100 mM NaCl, pH 7.2. Próby mieszano i pobierano z nich po 100 μ l na oznaczenie radioaktywności i po 100 μ l na oznaczenie metabolitów JH w próbie wyjściowej. Do pozostałych 1800 μ l dodawano po 50 μ l frakcji membranowej (50 μ g białka). Próby mieszano (vortex) i inkubowano w temperaturze pokojowej. Po określonym czasie każdą próbę wirowano przez 2 minuty przy 10 000 rpm i pobierano po 100 μ l do oznaczenia ilości metabolitów i pozostałego JH.

Metabolity oznaczano metodą podziałową według SHARE`A i ROE (1988). Do 100 μ l próby dodawano 400 μ l metanolu i 312 μ l izooktanu. Próbę mieszano (vortex) i wirowano przy 1000 x g przez 5 minut. Z rozdzielonych faz (górnej izooktanowej i dolnej metanolowo-wodnej) pobierano po 100 μ l do pomiaru radioaktywności w liczniku scyntylacyjnym. Współczynnik podziału dla JH I pomiędzy fazę izooktanową i metanolowo-wodną wynosił 71/29, a dla metabolitów JH I odpowiednio: 97/3 JH kwas, 97/3 JH diol i 99/1 JH kwas-diol.

5. WYNIKI

Aby upewnić się, że używane do doświadczeń białko wiążące JH jest nie-zdegradowane wykonano Western blotting hemolimfy i hemolimfowego JHBP, wyizolowanego z larw *Galleria mellonella* według procedury OŻYHARA i KOCHMANA (1987). Nitrocelulozę traktowaną kolejno (protokół, 4.14.): roztworem mysich przeciwciał monoklonalnych, skierowanych do JHBP, a następnie koniugatem anty-mysie IgG-peroksydaza i wybarwioną diaminobenzydyną w obecności H_2O_2 (próbę) pokazuje Rys.5. Jak widać, ruchliwość oczyszczonego JHBP odpowiada ruchliwości białka rozpoznawanego w hemolimfie przez przeciwciała monoklonalne skierowane do JHBP.



Rysunek 5

Western blotting hemolimfy i JHBP.

9 μ g czystego JHBP (JHBP), 600 μ g białek hemolimfy (HEM), oraz mieszaninę tych dwóch prób (JHBP+HEM) rozdzielono elektroforetycznie w 12% żelu poliakrylamidowym w warunkach nie-denaturujących. Po zakończeniu elektroforezy białka przeniesiono na nitrocelulozę przez elektroblotting i poddano interakcji najpierw z przeciwciałami skierowanymi do oczyszczonego JHBP, otrzymanymi w myszy, a następnie z koniugatem anty-mysie IgG-peroksydaza. Detekcję prowadzono za pomocą diaminobenzydyny w obecności H_2O_2 (MATERIAŁY i METODY).

W śladach zawierających hemolimfę (Rys.5, HEM lub HEM + JHBP), oprócz głównego pasma, odpowiadającego ruchliwości oczyszczonego JHBP, widoczne jest dodatkowo słabe, okrągłe pasmo białka o dużej ruchliwości, które jest najprawdopodobniej produktem degradacji JHBP w hemolimfie. Pasma tego nie widać w śladzie zawierającym tylko oczyszczone białko (Rys.5, JHBP). Próba kontrolna (nitroceluloza nie traktowana roztworem przeciwciał monoklonalnych, skierowanych do JHBP) wykazała, że ani oczyszczone JHBP ani żadne z białek hemolimfowych nie reagują niespecyficznym z odczynnikami stosowanymi w teście.

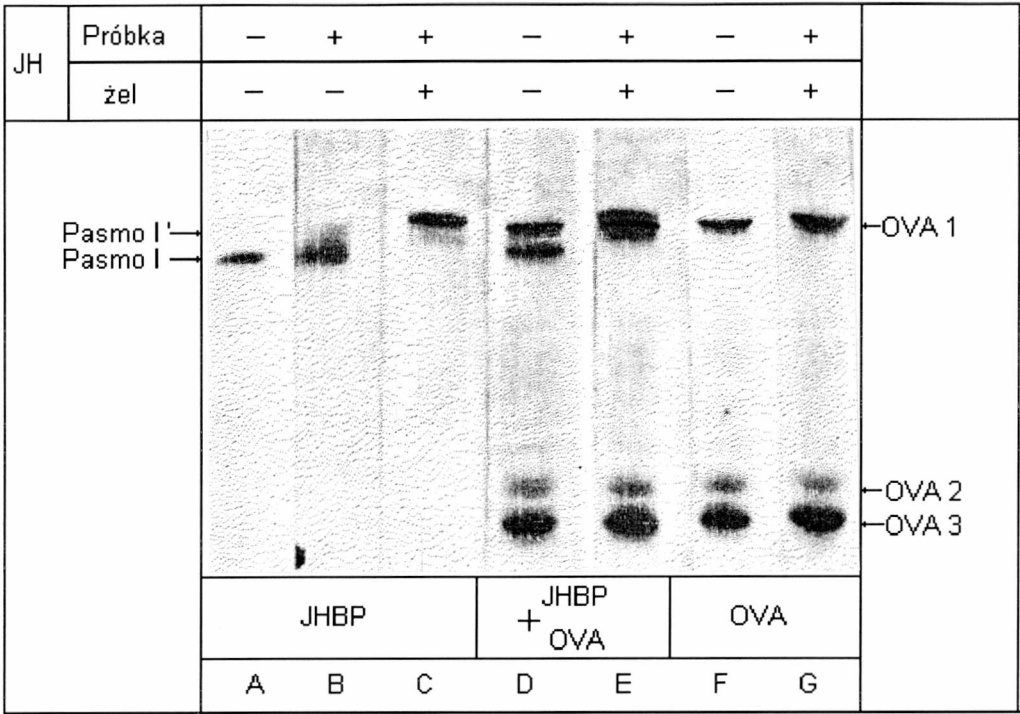
W warunkach fizjologicznych w hemolimfie *Galleria mellonella* 94% JHBP występuje w kompleksie z hormonem juvenilnym. Celowym i interesującym wydawało się poznanie właściwości kompleksu JHBP z hormonem, które nie były dotychczas badane.

5.1. Wpływ ligandu na właściwości białka wiążącego hormon juvenilny

We wszystkich doświadczeniach, w których badano właściwości kompleksu JHBP-JH stosowano takie stężenie hormonu aby ilość kompleksu była nie mniejsza niż 94% całkowitej ilości białka. W obliczeniach przyjmowano stałą dysocjacji dla JH I z *Galleria mellonella* wyznaczoną przez OŻYHARA i KOCHMANA (1987), równą 8.5×10^{-8} M.

5.1.1. Wpływ na ruchliwość elektroforetyczną

Wpływ hormonu juvenilnego na ruchliwość elektroforetyczną białek: JHBP i nieoczyszczonej albuminy z jaj kurzych, rozdzielonych w żelu poliakrylamidowym, w warunkach nie-denaturujących, przedstawia Rys.6. Porównując ślady A (nieobecność hormonu w próbce i w żelu) i C (hormon obecny w próbce i w żelu) można zauważyć, że w warunkach zapewniających prawie całkowite obsadzenie JHBP ligandem (~99% kompleksu JHBP-JH, ślad C) ruchliwość białka wiążącego JH jest mniejsza niż wtedy gdy wędruje ono w nieobecności ligandu (ślad A). Jeśli hormon znajduje się jedynie w próbce (ślad B) tylko bardzo nieznaczna część cząsteczek JHBP wędruje wolniej.



Rysunek 6

Wpływ hormonu juvenilnego na ruchliwość elektroforetyczną JHBP. Według WIECZOREK i KOCHMAN (1991).

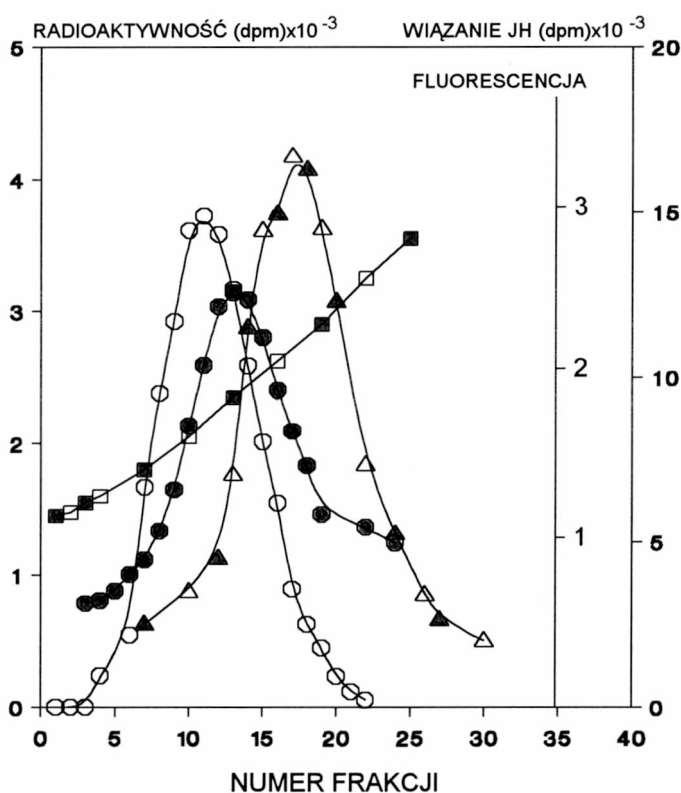
1 µg czystego JHBP (A-E) i/lub 10 µg nieoczyszczonego preparatu albuminy z jaj kurzych (D-G) nanoszono na żele (kolumnienki), w wodnym roztworze 20% sacharozy i 0.01% błękitu bromofenolowego. Elektroforezę prowadzono według DAVIESA (1964). Obecność 6 µM JH I w nanoszonych próbkach białkowych lub obecność 20 µM JH I w żelu jest zaznaczona powyżej każdego śladu (+). Białka barwiono Coomassie brilliant blue G-250. JHBP, białko wiążące hormon juvenilny; OVA 1, OVA 2, OVA 3, składniki nieoczyszczonego preparatu albuminy z jaj kurzych.

Zmniejszenie ruchliwości kompleksu w stosunku do nieobsadzonego białka jest szczególnie dobrze widoczne przy porównaniu śladów D i E, które oprócz JHBP zawierają nieoczyszczony preparat albuminy z jaj kurzych. W nieobecności hormonu białko wiążące JH wędruje w żelu wolniej niż najwolniejszy składnik heterogenego preparatu albuminy z jaj kurzych - OVA 1 (ślad D), podczas gdy przy wysycającym stężeniu JH ruchliwość JHBP jest mniejsza niż ruchliwość najwolniej wędrującego składnika albuminy (ślad E).

Doświadczenie to pokazuje również specyficzność wpływu hormonu na białko wiążące JH, gdyż ruchliwość żadnego ze składników albuminy z jaj kurzych (OVA 1, OVA 2, OVA 3) nie ulega zmianie w obecności hormonu (ślady F i G).

5.1.2. Wpływ na właściwości hydrodynamiczne

Aby określić wpływ wiązania hormonu juvenilnego na właściwości molekularne (kształt cząsteczki) JHBP, wykonano jego wirowanie w liniowym gradiencie gęstości sacharozy, w obecności lub nieobecności ligandu. Wyniki przedstawiono na Rys.7 (JHBP oznaczone kółkami). Jako standard wewnętrzny zastosowano czysty preparat albuminy z jaj kurzych (oznaczonej na Rys.7 trójkątami), przyjmując $s_{20,w}$ dla albuminy równy 3.55 S. Obliczono, że współczynnik sedymentacji JHBP w nieobecności hormonu juvenilnego, wynosi 2.30 S; tyle samo ile podają OŻYHAR i KOCHMAN (1987). Wiązanie hormonu zwiększa współczynnik sedymentacji JHBP do wartości 2.71 S, pozostając bez wpływu na stałą sedymentacji albuminy z jaj kurzych, co ponownie dowodzi specyficzności wpływu hormonu na kształt cząsteczki JHBP.

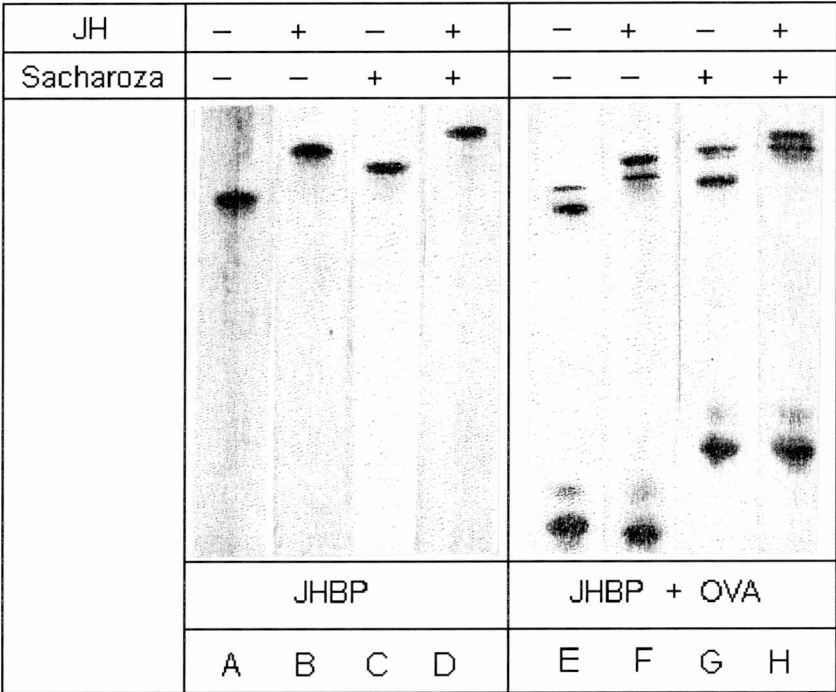


Rysunek 7

Wirowanie JHBP w gradiencie gęstości sacharozy. Według WIECZOREK i KOCHMAN (1991).

Dwie próbki JHBP (kółka) zawierające czystą albuminę z jaj kurzych (trójkąty) jako wewnętrzny standard były wirowane w gradiencie gęstości sacharozy 5-20%, jak opisano w MATERIAŁACH I METODACH. Znaki otwarte symbolizują wirowanie w nieobecności hormonu juvenilnego, znaki zamknięte wirowanie w obecności 5.2 μM JH i o radioaktywności właściwej równej 1.1×10^{13} dpm/mol. Po zakończeniu wirowania zbierano 100 μl frakcje, w których mierzono współczynnik refrakcji (■--□), fluorescencję albuminy (wzbudzenie przy 295 nm, emisja przy 332 nm; (▲--Δ) radioaktywność (●--●) i aktywność JHBP (o--o).

Aby upewnić się czy sacharoza nie wpływa specyficznie na właściwości sedymentacyjne JHBP i/lub kompleksu JHBP-JH porównano ruchliwość elektroforetyczną białek: JHBP i heterogennego preparatu albuminy z jaj kurzych (kontrola) wyznaczoną w żelach polimeryzowanych w nieobecności lub obecności JH i/lub 10% sacharozy. Wyniki elektroforezy przeprowadzonej w warunkach nie-denaturujących (Rys.8) pokazują, że obecność sacharozy zmniejsza ruchliwość wszystkich analizowanych prób, ale sacharoza nie wywiera specyficznego wpływu na cząsteczki JHBP ani na kompleks białka z hormonem.



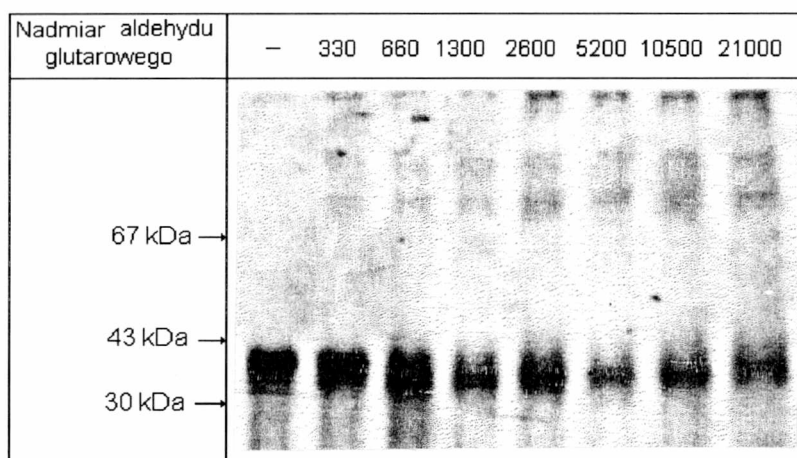
Rysunek 8

Wpływ sacharozy na efekt zmiany ruchliwości elektroforetycznej JHBP.

1 µg homogennego JHBP (A-H) i 10 µg nieoczyszczonego preparatu albuminy z jaj kurzych (E-H) nanoszono na żele (kolumnienki) w roztworze wodnym 20% sacharozy i 0.01% błękitu bromofenolowego. Elektroforezę prowadzono według DAVIESA (1964). Obecność 10 % sacharozy, 7.7×10^{-5} M JH I w nanoszonych próbkach białkowych i 2 µM JH I w żelu jest zaznaczona powyżej każdego śladu (+). Białka barwiono Coomassie brilliant blue G-250. JHBP, białko wiążące hormon juvenilny; OVA, nieoczyszczony preparat albuminy z jaj kurzych.

5.1.3. Poszukiwanie form oligomerycznych

Opisany wpływ wiązania hormonu juwenilnego na właściwości sedymentacyjne białka wiążącego JH można tłumaczyć wynikiem oligomeryzacji cząsteczek JHBP, zachodzącej pod wpływem wiązania ligandu. Aby stwierdzić czy taki proces ma miejsce przeprowadzono sieciowanie JHBP i białek kontrolnych w obecności lub nieobecności hormonu juwenilnego. Pierwszy etap obejmował dobranie czynnika sieciującego, warunków reakcji oraz białek stanowiących kontrolę skuteczności sieciowania i specyficzności efektu hormonalnego. Rys. 9 przedstawia elektroforezę, przeprowadzoną w obecności SDS, aldolazy sieciowanej aldehydem glutarowym przez 5 minut w temperaturze pokojowej. Ślady zawierają kolejno: kontrolę oraz produkty reakcji, w których nadmiar czynnika sieciującego nad aldolazą zmieniał się od 330 do 21000 razy. Tylko przy bardzo dużym nadmiarze aldehydu glutarowego obserwuje się nieznaczne ilości oligomerów aldolazy. Ponadto wraz ze wzrostem stężenia aldehydu ruchliwość elektroforetyczna monomeru ulega nieznacznemu zwiększeniu, najprawdopodobniej na skutek sieciowania wewnątrzcząsteczkowego.



Rysunek 9

Sieciowanie aldolazy aldehydem glutarowym - elektroforeza w obecności SDS.

Aldolazę (stężenie końcowe monomeru 2×10^{-6} M) sieciowano aldehydem glutarowym (stężenie końcowe 0.66 od mM do 42 mM) przez 5 min. w temp. 20 °C. Po tym czasie reakcję przerywano przez dodanie takiej samej objętości buforu 125 mM Tris, pH 6.8 zawierającego 4% SDS, 20% sacharozę, 2% β -merkaptioetanol i 0.02% błękit bromofenolowy. Po wymieszaniu i 5 min. inkubacji w temp. 20 °C nadmiar aldehydu glutarowego usuwano przez dodanie hydrazyny w stężeniu końcowym 10 krotnie wyższym niż stężenie aldehydu. Następnie próby nanoszono do studzienek żelowych. Elektroforezę prowadzono w homogenym 10% żelu w obecności SDS. Rozdzielone białka barwiono srebrem. Ślady zawierają kolejno: kontrolę - nie sieciowaną aldolazę (-); aldolazę sieciowaną aldehydem glutarowym w podanym nadmiarze reagenta nad białkiem.

W warunkach, w których dehydrogenaza mleczanowa ulega całkowitemu usieciowaniu, nie obserwowano oligomerów JHBP ani albuminy, niezależnie od obecności hormonu w mieszaninie reakcyjnej. Stwierdzono ponadto, że na skutek traktowania białka aldehydem glutarowym, ruchliwość elektroforetyczna JHBP zwiększyła się znacznie.

5.2. Poszukiwanie enzymu umożliwiającego ograniczoną proteolizę białka wiążącego hormon juvenilny

W celu znalezienia enzymu i określenia warunków, pozwalających na kontrolowane trawienie białka wiążącego JH, zbadano wpływ działania wybranych enzymów proteolitycznych na aktywność JHBP. Wyniki przedstawiono w Tabeli 4. Żaden z enzymów proteolitycznych o dużej specyficzności (trypsyna, chymotrypsyna, karboksypeptydaza A), a także karboksypeptydaza Y nie zmniejszają zdolności JHBP do wiązania hormonu. Jedynie dwa z użytych enzymów: subtylizyna i pepsyna powodują inaktywację JHBP.

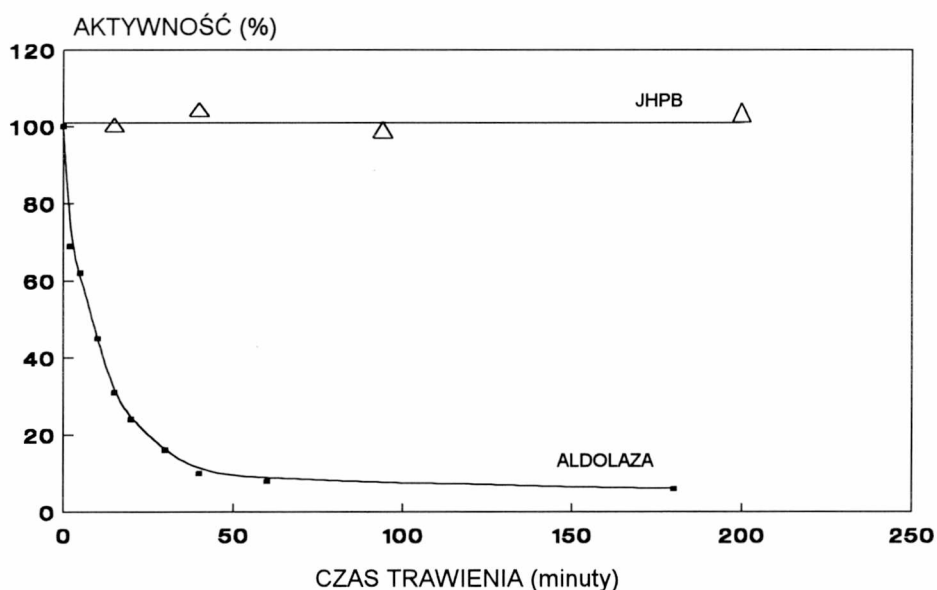
Tabela 4.
Wpływ enzymów proteolitycznych na aktywność JHBP.

Enzym	Czas trawienia (minuty)	Aktywność JHBP ^a (%)
Trypsyna (1:50) ^b	30; 120	90; 117
Chymotrypsyna (1:50) ^b	30; 120	104; 106
Pepsyna (1:50) ^b	30; 120	23; 7
Subtylizyna (1:50) ^b	60; 120	88; 73
Karboksypeptydaza A (1:200) ^b	90; 360	95; 104
Karboksypeptydaza Y (1:100) ^b	90; 180	107; 100

a, wyniki przedstawiono jako procent aktywności początkowej;
b, wagowo-wagowy stosunek proteazy do JHBP.

Trawienie pepsyną prowadzi do prawie całkowitej utraty aktywności i szybkiej fragmentacji łańcucha białkowego JHBP do niskocząsteczkowych produktów (wyniki nie pokazane). Ponadto reakcja, ze względu na optimum działania pepsyny, prowadzona jest w niskim pH, co pociąga za sobą zmianę struktury i częściową denaturację białka. Kontrolna, nie trawiona próba JHBP po 2 godzinnej inkubacji w buforze o pH 2.3, a następnie po 30 minutowej inkubacji w buforze o pH 7.2 wykazywała 84% aktywności początkowej. Z powyższych względów do dalszych badań wybrano subtylizynę, która w pH obojętnym pozwala na stosunkowo wolną proteolizę JHBP.

Aby porównać wrażliwość JHBP i aldolazy na działanie specyficznej egzoptydazy przeprowadzono trawienie obu białek karboksypeptydazą A. Krzywą czasową trawienia aldolazy i JHBP pokazuje Rys.11. Trawienie aldolazy przez 1 godzinę karboksypeptydazą A, w ilości 50 krotnie mniejszej niż użyta do trawienia JHBP, prowadzi do spadku aktywności aldolazowej o 90%, podczas gdy aktywność JHBP nie ulega zmianie.



Rysunek 11

Krzywa czasowa inaktywacji aldolazy i JHBP przez karboksypeptydazę A.

1 mg aldolazy (▪) trawiono karboksypeptydazą A w stosunku wagowo-wagowym proteazy do aldolazy równym 1:10 000. Po odpowiednim czasie 20 μ l mieszaniny reakcyjnej przenoszono do kuwety zawierającej enzymy i substraty aldolazy i mierzono spektrofotometrycznie jej aktywność.

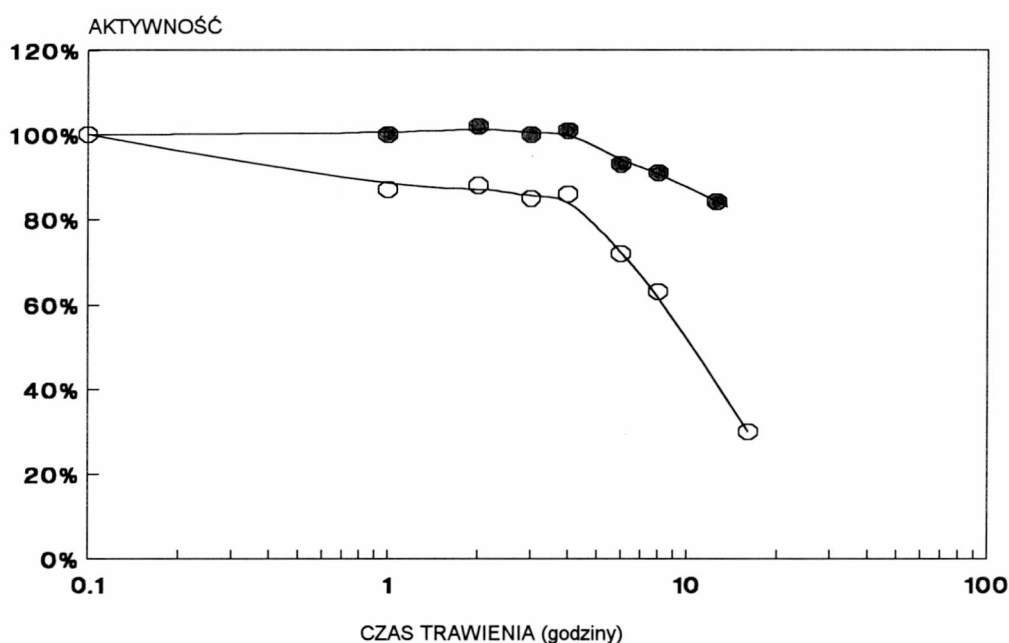
28 μ g JHBP (Δ) trawiono karboksypeptydazą A, w stosunku wagowo-wagowym proteazy do JHBP równym 1:200. Po odpowiednim czasie pobierano 20 μ l mieszaniny reakcyjnej i mierzono aktywność JHBP (MATERIAŁY I METODY).

Wyniki przedstawiono jako procent aktywności początkowej.

5.3. Trawienie subtylizyną

5.3.1. Inaktywacja białka wiążącego hormon juvenilny przez subtylizynę

Krzywą czasową trawienia JHBP przez subtylizynę w stosunku wagowo-wagowym proteazy do białka równym 1:50, w nieobecności lub obecności JH przedstawia Rys.12.



Rysunek 12

Krzywa czasowa inaktywacji JHBP przez subtylizynę - wpływ hormonu juvenilnego. Według WIECZOREK i KOCHMAN (1991).

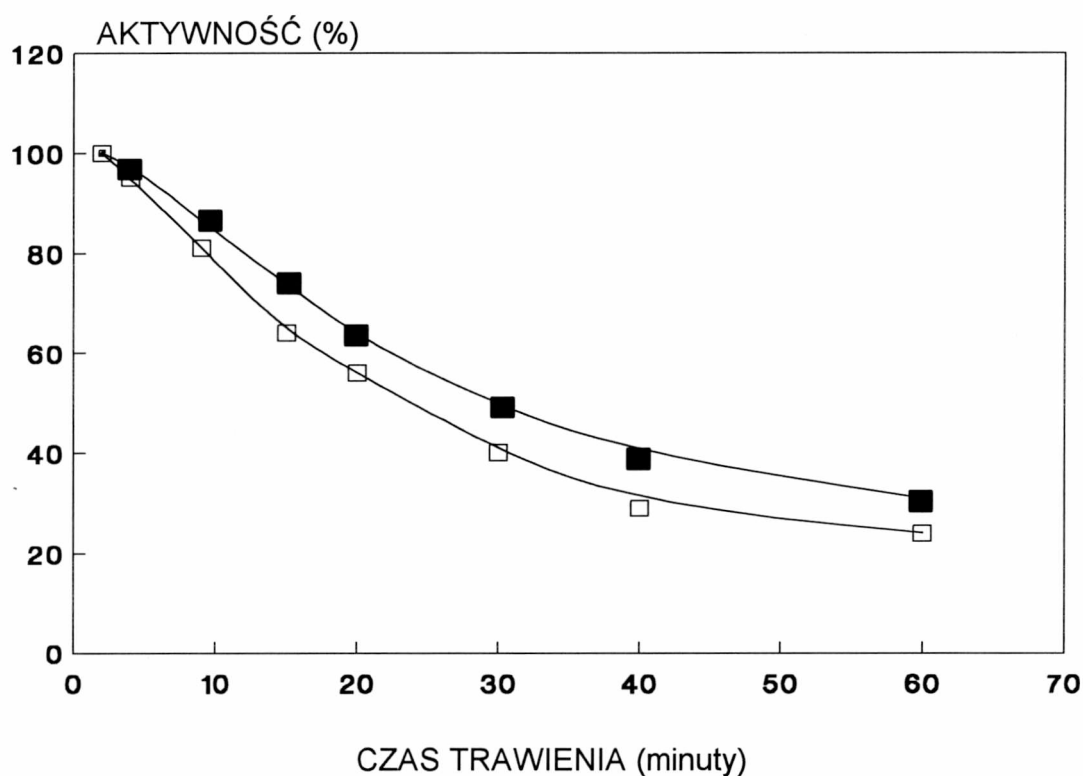
JHBP (5 μM) było trawione subtylizyną w stosunku wagowo-wagowym proteazy do białka równym 1:50 w nieobecności (o) lub obecności (●) 6 μM JH I jak opisano w MATERIAŁACH I METODACH.

Aktywność JHBP jest wyrażona jako procent aktywności początkowej.

Trawienie białka wiążącego JH przez subtylizynę prowadzi do stopniowej, wolnej utraty zdolności wiązania ligandu: po 16 godzinach trawienia następuje utrata 70% aktywności początkowej JHBP w próbie bez hormonu. Obecność JH chroni białko przed inaktywacją: po 16 godzinach reakcji aktywność białka ulega zmniejszeniu tylko o 15% w stosunku do wartości początkowej.

Kontrolne trawienie aldolazy z mięśni królika przez subtylizynę, w stosunku wagowo-wagowym równym 1:2000, w obecności lub nieobecności JH (Rys.13) prowadzi do prawie całkowitej inaktywacji aldolazy. Po 60 minutach reakcji aldolaza traci około 75% początkowej aktywności.

Powyższe wyniki świadczą o specyficzności ochronnego wpływu hormonu juvenilnego na trawienie JHBP oraz o tym, że hormon, w stężeniu użytym w doświadczeniu, nie wpływa w sposób istotny na aktywność subtylizyny.



Rysunek 13

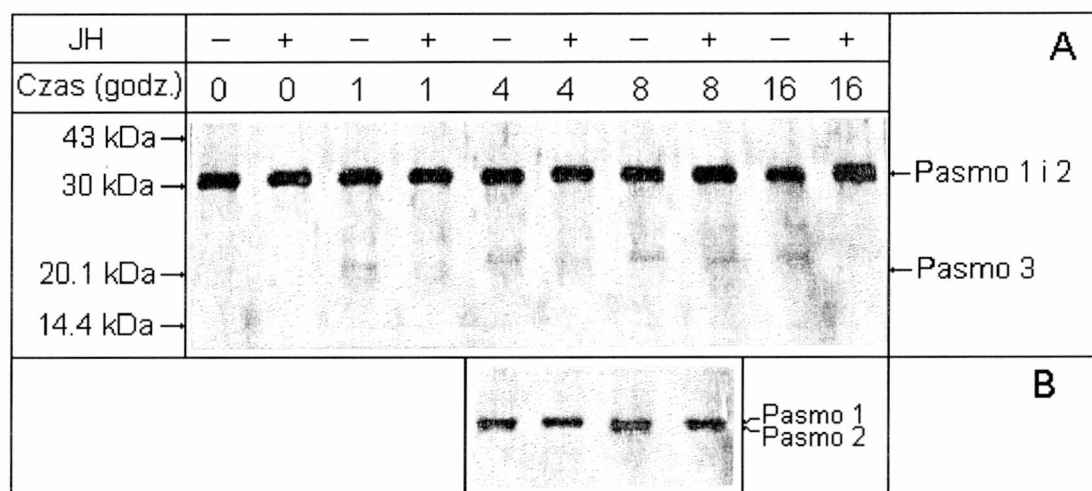
Krzywa czasowa inaktywacji aldolazy przez subtylizynę - wpływ hormonu juvenilnego.

Aldolazę z mięśni królika (16 µM) trawiono subtylizyną w stosunku wagowo-wagowym proteazy do aldolazy równym 1:2000 w nieobecności (■) lub obecności (□) 6 µM hormonu juvenilnego I jak opisano w MATERIAŁACH I METODACH.

Aktywność aldolazy jest wyrażona jako procent aktywności początkowej.

5.3.2. Wpływ trawienia subtylizyną na integralność cząsteczki białka wiążącego hormon juwenilny

Produkty trawienia JHBP subtylizyną badano za pomocą elektroforezy prowadzonej w obecności SDS oraz elektroforezy prowadzonej w warunkach nie-denaturujących. Próby JHBP nie trawionego (kontrola) lub trawionego subtylizyną przez określony czas, rozdzielone w dwóch rodzajach gradientu żelu poliakrylamidowego w warunkach denaturujących przedstawia Rys.14.



Rysunek 14

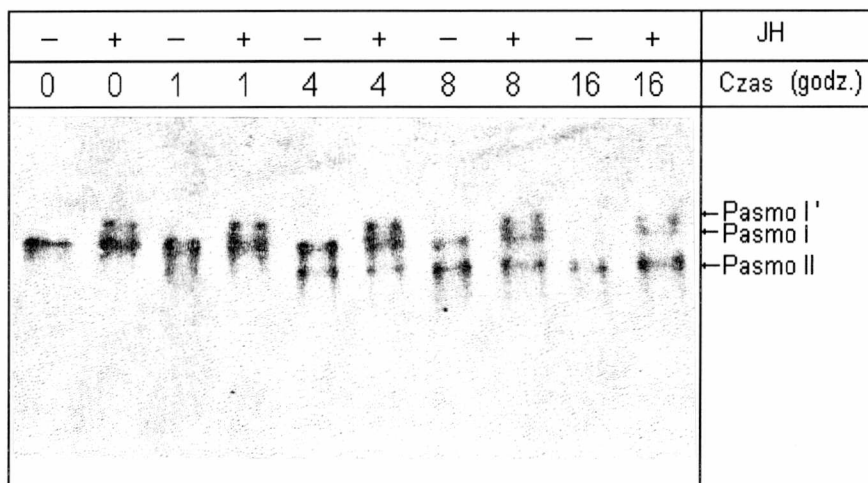
Identyfikacja produktów trawienia JHBP subtylizyną - elektroforeza w obecności SDS. Według WIECZOREK i KOCHMAN (1991).

Białko wiążące hormon juwenilny (5 μ M) trawiono subtylizyną w nieobecności (-) lub obecności (+) 6 μ M JH I. Po określonym czasie proteolizę przerywano przez przeniesienie 100 μ l mieszaniny reakcyjnej do 100 μ l 2 mM PMSF i inkubację przez 15 min. w temperaturze 25 $^{\circ}$ C. Następnie 10 μ l próbki (0.8 μ g JHBP) mieszano z 30 μ l wodnego roztworu zawierającego 20% sacharozę, 4% SDS, 2% β -merkaptotanol, 0.02% błękit bromofenolowy i gotowano przez 15 min. Do studzienek żelowych nanoszono po 10 μ l (200 ng białka). Elektroforezę płytkową prowadzono w gradiencie żelu rozdzielającego 10-20% przez 2.5 godz. (A) lub 10-27% przez 4 godz. (B). Rozdzielone białka barwiono srebrem jak opisano w MATERIAŁACH i METODACH.

Kontrolne JHBP (-0, +0) inkubowane w nieobecności lub obecności hormonu wędruje w elektroforezie, w obecności SDS, jako jedno pasmo białkowe o masie cząsteczkowej 32 kDa (Rys. 14 A). Podczas proteolizy obserwuje się bardzo nieznaczne zmniejszenie intensywności tego pasma w próbach JHBP poddanego trawieniu w

nieobecności hormonu w stosunku do prób białka trawionego w obecności JH. Jednocześnie, dwa lub trzy białka, o masie cząsteczkowej około 20-25 kDa, pojawiają się jako słabo widoczne pasma we wszystkich śladach zawierających trawione białko. Pasma niskocząsteczkowe są nieznacznie intensywniejsze w próbach JHBP trawionego w nieobecności JH (najbardziej intensywne z tych pasm oznaczono na Rys.14A jako pasmo 3). Białko, o masie cząsteczkowej odpowiadającej 32 kDa (Rys.14A pasmo 1 i 2), stanowi w rzeczywistości układ dwóch składników i może być rozdzielone przez przedłużoną elektroforezę, na dwa bardzo blisko siebie położone pasma (Rys.14B, pasmo 1 i pasmo 2). Jeden ze składników, o większej ruchliwości elektroforetycznej, (nadtrawione cząsteczki białka o masie cząsteczkowej około 30 kDa), staje się widoczny po 4 godzinach w próbach JHBP trawionego bez JH i dopiero po 8 godzinach w próbach białka trawionego w obecności hormonu.

Próby JHBP nie trawionego (kontrola) lub trawionego subtylizyną przez określony czas, rozdzielone w żelu poliakrylamidowym w warunkach nie-denaturujących przedstawia Rys.15.



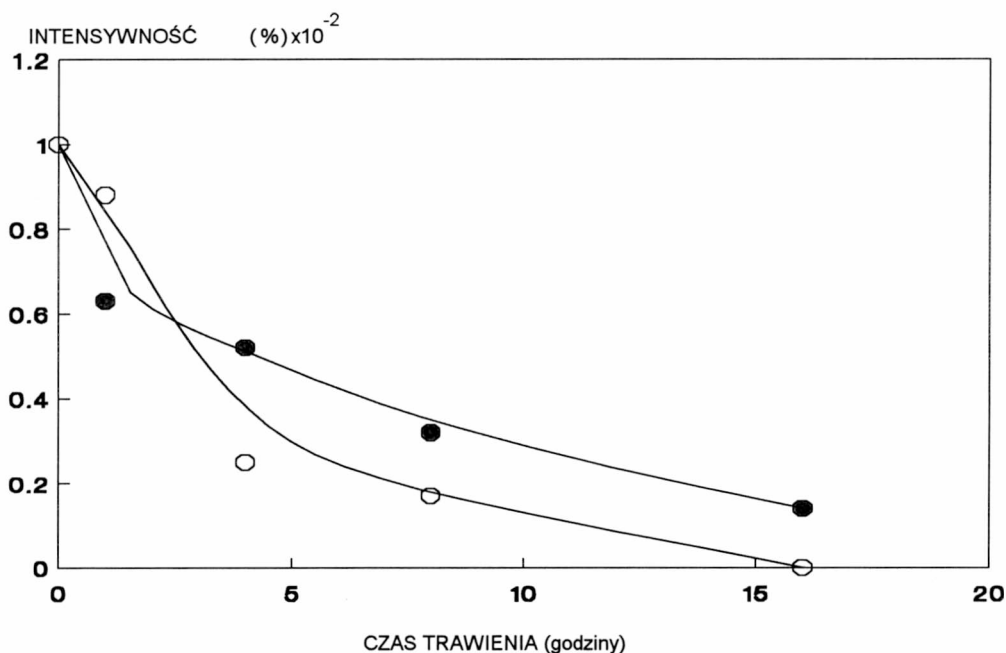
Rysunek 15

Identyfikacja produktów trawienia JHBP subtylizyną - elektroforeza w warunkach nie-denaturujących. Według WIECZOREK i KOCHMAN (1991).

Białko wiążące hormon juvenilny (5 μ M) trawiono subtylizyną w nieobecności (-) lub obecności (+) 6 μ M JH I. Po określonym czasie proteolizę przerywano przez przeniesienie 100 μ l mieszaniny reakcyjnej do 100 μ l 2 mM PMSF i inkubację przez 15 minut, w temperaturze 25 $^{\circ}$ C. Następnie 25 μ l próbki (2 μ g JHBP) mieszano z 10 μ l roztworu wodnego zawierającego 40% sacharozę i 0.02% błękit bromofenolowy i nanoszono do studzienek żelowych. Elektroforezę płytkową prowadzono w gradiencie 10-20% żelu rozdzielającego. Rozdzielone w żelu białka barwiono Coomassie brilliant blue G-250.

Zgodnie z oczekiwaniami w kontrolnej próbie białka, zawierającej hormon, oprócz pasma odpowiadającego wolnemu JHBP (Rys.15, pasmo I) obserwowano pasmo, o zmniejszonej ruchliwości elektroforetycznej, odpowiadające kompleksowi JHBP-JH (Rys.15, pasmo I'). Trawienie białka wiążącego powoduje zanikanie wolnego JHBP i kompleksu białka z hormonem przy jednoczesnym pojawianiu się nadtrawionych cząsteczek JHBP o większej ruchliwości (Rys.15, pasmo II). Proces ten jest szybszy dla prób białka trawionego w nieobecności JH.

Z pomiarów densytometrycznych wyznaczono szybkość ubywania natywnych (32 kDa) cząsteczek JHBP trawionego w nieobecności lub w obecności hormonu juwenilnego, oddzielonych od produktów trawienia przez elektroforezę w warunkach nie-denaturujących. Dane te, przedstawione na Rys.16, pozwoliły na oszacowanie pseudo-pierwszorzędowych stałych szybkości trawienia JHBP w nieobecności lub w obecności JH, które wynoszą odpowiednio $6.5 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ i $2.7 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$.



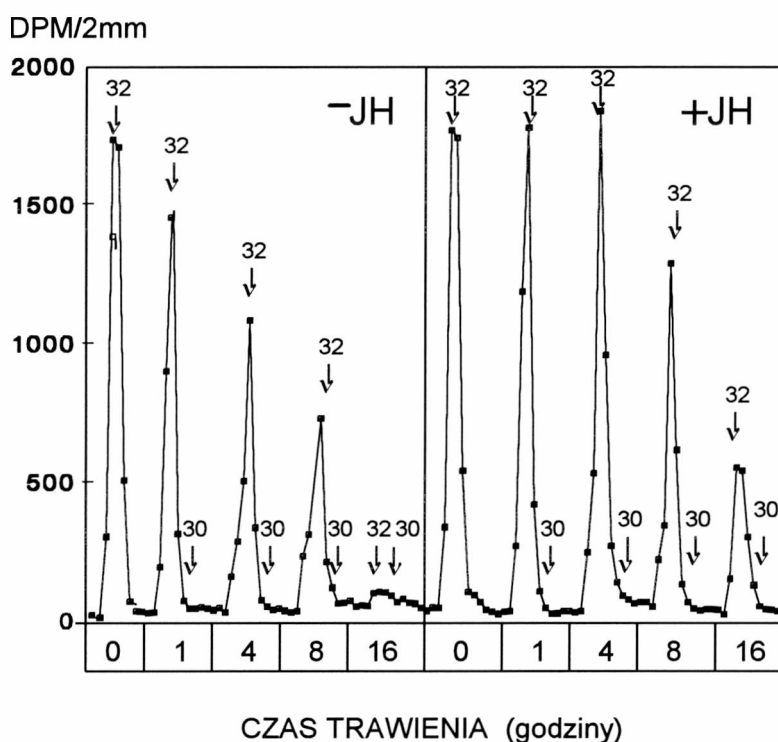
Rysunek 16

Krzywa czasowa zaniku formy natywnej JHBP trawionego subtilizyną.

JHBP trawiono subtilizyną w stosunku wagowo-wagowym proteazy do białka równym 1:50 w nieobecności (o) lub obecności (●) hormonu juwenilnego. Produkty trawienia rozdzielono elektroforetycznie w warunkach nie-denaturujących jak opisano w MATERIAŁACH I METODACH. Po wybarwieniu srebrem intensywność pasma odpowiadającego natywnemu JHBP mierzono za pomocą densytometru laserowego Ultrosan (LKB). Wyniki przedstawiono jako procent intensywności próby kontrolnej.

5.3.3. Określenie zdolności wiązania hormonu juwenilnego przez produkty trawienia białka wiążącego subtylizyną

Aby stwierdzić czy produkty trawienia JHBP subtylizyną (pasmo II, Rys.15) posiadają zdolność wiązania hormonu juwenilnego, wykonano elektroforezę prób JHBP trawionego w obecności lub nieobecności JH i inkubowanego po trawieniu ze znakowanym hormonem. Wyniki tego doświadczenia przedstawiono na Rys.17.



Rysunek 17

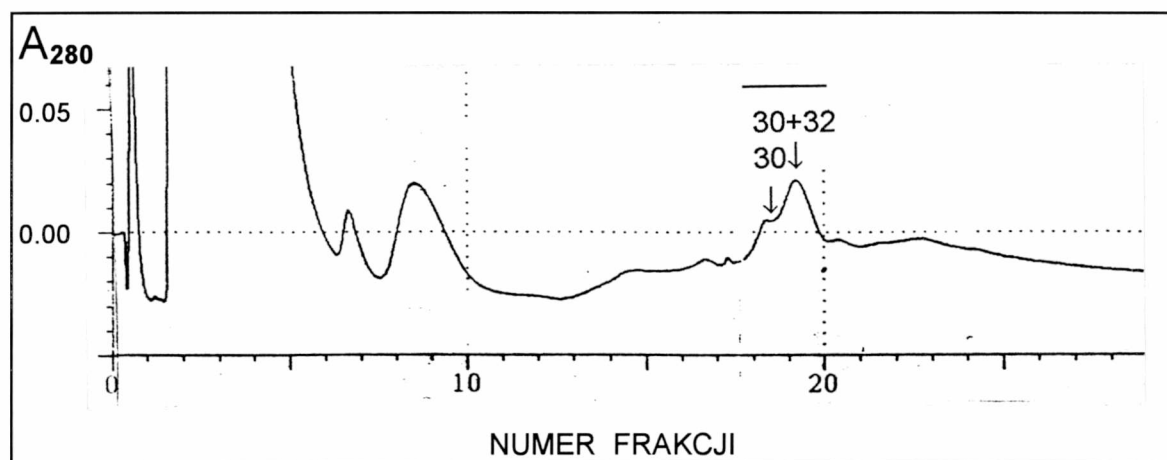
Określenie zdolności wiązania JH przez produkty trawienia JHBP subtylizyną.

JHBP trawiono subtylizyną w nieobecności i obecności $6 \mu\text{M}$ JH I. Po określonym czasie z mieszaniny reakcyjnej pobierano po $20 \mu\text{l}$ ($2.6 \mu\text{g}$ białka) i inkubowano z $20 \mu\text{l}$ PMSF aby zahamować aktywność proteazy. Następnie próby, które były trawione w nieobecności hormonu inkubowano w temp. 4°C z $6 \mu\text{M}$ JH I o radioaktywności właściwej 3×10^{14} dpm/mol ($36\,000$ dpm/próbę), a próby poddane trawieniu w obecności $6 \mu\text{M}$ JH (stężenie końcowe) inkubowano z JH I o radioaktywności właściwej 2×10^{17} dpm/mol ($36\,000$ dpm/próbę), aby stężenie JH I i jego radioaktywność właściwa we wszystkich próbach były takie same. Po 8 godzinach inkubacji próby rozdzielono w elektroforezie w gradiencie 10-20% żelu poliakrylamidowego, w warunkach nie-denaturujących. Po elektroforezie żel podzielono na ślady, a każdy ślad na 2 mm fragmenty, w których zmierzono radioaktywność.

Rysunek przedstawia profil radioaktywności żelu, uzyskany dla śladów zawierających JHBP trawione przez podany czas, w nieobecności (-JH) i obecności (+JH) hormonu juwenilnego. Strzałkami zaznaczono położenie spodziewanych szczytów radioaktywności: 32, dla natywnego 32 kDa JHBP; 30, dla produktu trawienia o masie cząsteczkowej 30 kDa.

Próby poddane trawieniu w nieobecności hormonu inkubowano przez 8 godzin w temperaturze 4°C z JH I o radioaktywności właściwej 3×10^{14} dpm/mol, próby poddane trawieniu w obecności hormonu inkubowano z JH I o radioaktywności właściwej równej 2×10^{17} dpm/mol, aby stężenie JH I i jego radioaktywność właściwa we wszystkich próbach były takie same. Po inkubacji próby rozdzielono elektroforetycznie w żelu poliakrylamidowym w warunkach nie-denaturujących. Po elektroforezie, żel podzielono na ślady, a każdy ślad na 2 mm fragmenty i zmierzono ich radioaktywność. Nie stwierdzono radioaktywności we fragmentach żelu, które odpowiadały położeniu 30 kDa produktu trawienia JHBP (Rys. 17, ↓30). Wyniki tego doświadczenia wykazują, więc że produkty trawienia JHBP nie wiążą JH i/lub, że stała szybkości dysocjacji nie pozwala na utrzymanie hormonu podczas elektroforezy (3 godziny).

Ponieważ powyższy eksperyment nie dał jednoznacznej odpowiedzi na pytanie czy produkty trawienia posiadają zdolność wiązania hormonu, próbę JHBP trawionego subtylizyną (8 godzin) rozdzielono za pomocą HPLC (Rys.18) i zmierzono wiązanie hormonu w otrzymanych frakcjach, identyfikując elektroforetycznie formy białka wiążącego JH.

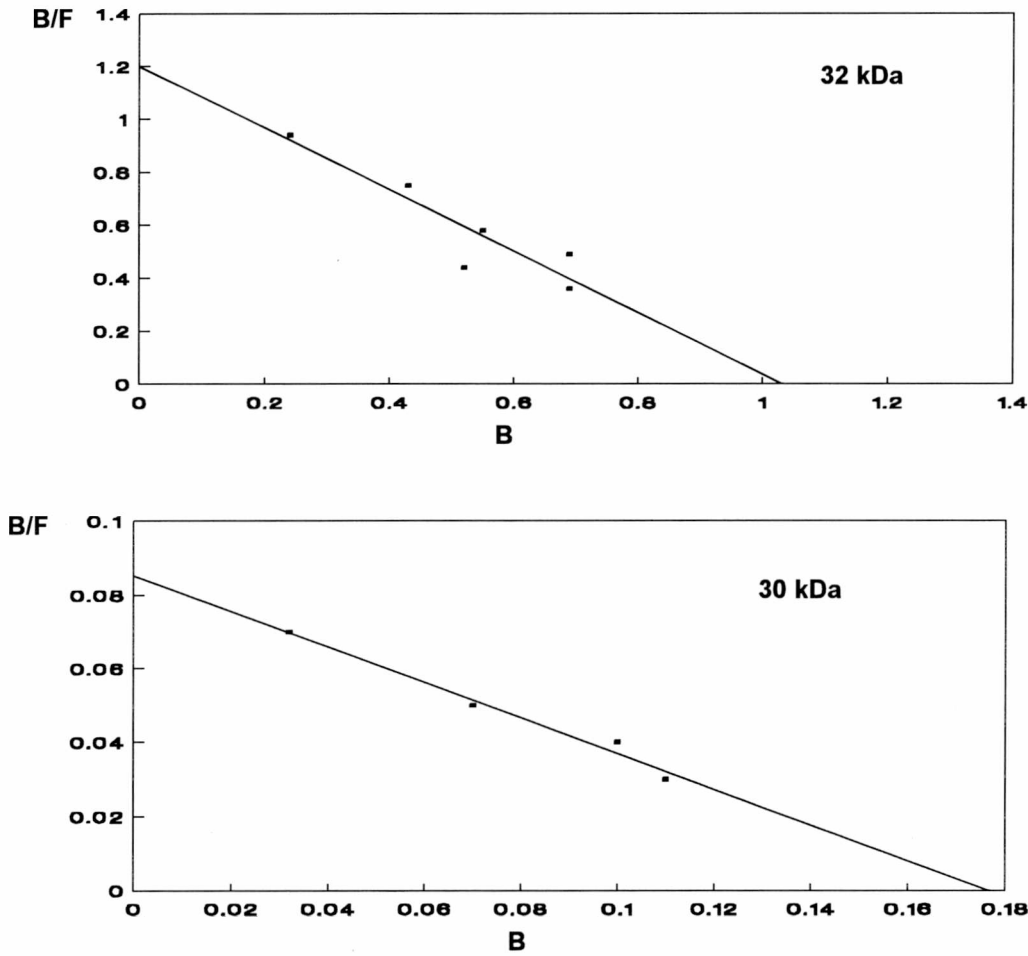


Rysunek 18

HPLC-rozdział produktów trawienia JHBP subtylizyną.

138 µg JHBP trawiono subtylizyną przez 8 godzin jak podano w MATERIAŁACH I METODACH. Po dializie do buforu 0.4 mM fosforan, 10 mM NaCl, pH 6.2 próbkę naniesiono na kolumnę jonowymienną CM-SW3 (Beckman). Rozdział prowadzono w systemie HPLC płuczając kolumnę buforem A (10 mM fosforan, pH 5.7) przez 3 min., a następnie liniowym gradientem 0-75% buforu B (bufor A zawierający 500 mM NaCl) przez 22.5 min. Absorbancję wypływającego z kolumny eluentu monitorowano w sposób ciągły przy 280 nm. Zbierano frakcje o objętości 1 ml, w których mierzono aktywność JHBP (frakcje posiadające aktywność zaznaczono u góry wykresu linią) oraz zbadano obecność produktów trawienia (elektroforeza w warunkach nie-denaturujących). Strzałki oznaczają frakcję zawierającą 30 kDa produkt trawienia JHBP (30) i frakcję zawierającą mieszaninę tego produktu i natywnego JHBP (30+ 32).

Za pomocą analizy SCATCHARDA (1949) wyznaczono stałe dysocjacji dla natywnego JHBP (Rys.19, 32 kDa) i dla głównego produktu trawienia JHBP subtylizyną (Rys.19, 30 kDa). Wyznaczone stałe wynoszą odpowiednio: 86 nM i 207 nM dla 32 kDa i 30 kDa formy JHBP.



Rysunek 19

Wykres SCATCHARDA (1949) wiązania JH I przez 32 kDa natywne JHBP i 30 kDa produkt trawienia JHBP subtylizyną. Według WIECZOREK i KOCHMAN (1991).

JHBP o masie cząsteczkowej 30 kDa otrzymano z natywnego JHBP (32 kDa) przez trawienie subtylizyną przez 8 godzin i rozdzielenie produktów reakcji na kolumnie jonowymiennej HPLC. Do oddzielenia wolnego (F) do związanego z białkiem (B) hormonu stosowano metodę węglową opisaną w MATERIAŁACH I METODACH. Stałą dysocjacji hormonu dla obu form JHBP wyznaczono korzystając z programu EUREKA 1.0 (BORLAND, 1985).

Przedstawione eksperymenty pokazały, że pod wpływem wiązania hormonu juwenilnego do JHBP właściwości tego białka ulegają zmianie:

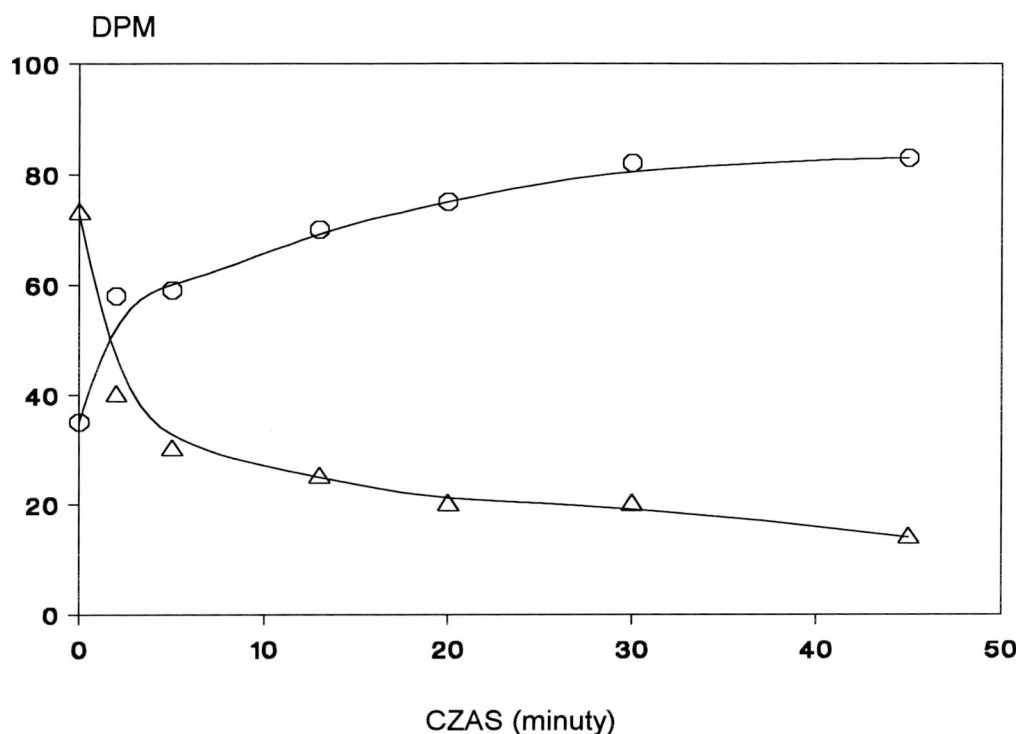
- zmniejsza się jego ruchliwość elektroforetyczna,
- zwiększa się współczynnik sedymentacji,
- ograniczona zostaje podatność JHBP na trawienie subtylizyną.

Obserwacje te sugerują indukowanie przez hormon juwenilny zmiany konformacyjnej w cząsteczce białka wiążącego JH. W poszukiwaniu funkcji takiej zmiany próbowano odpowiedzieć na pytanie czy istnieje receptor membranowy dla kompleksu JHBP-JH. Do poszukiwań wybrano ciało tłuszczowe, które jest jedną z tkanek docelowych dla hormonu juwenilnego, i które jednocześnie syntetyzuje JHBP.

5.4. Poszukiwanie receptora membranowego dla białka wiążącego hormon juwenilny

5.4.1. Określenie degradacji hormonu przez frakcję membranową otrzymaną z ciała tłuszczowego

Wiązanie JH do JHBP wymaga nienaruszonej struktury cząsteczki hormonu, który jest związkiem labilnym (ester) (KRAMER i wsp., 1976a). Ponieważ planowane doświadczenia wiązania JHBP do frakcji membranowej miały być prowadzone w obecności JH, zbadano szybkość degradacji hormonu przez frakcję membranową, którą uzyskano przez wirowanie różnicowe z ciała tłuszczowego larw VII stadium, 4 dnia *Galleria mellonella*. Stwierdzono, że szybkość degradacji JH przez jeden mg białka preparatu frakcji membranowej wynosi 0.14 nmola JH/minutę w temperaturze pokojowej (Rys.20). Otrzymaną wartość uwzględniano przy doborze stężenia hormonu juwenilnego w doświadczeniach wiązania JHBP (w obecności JH) do frakcji membranowej z ciała tłuszczowego.



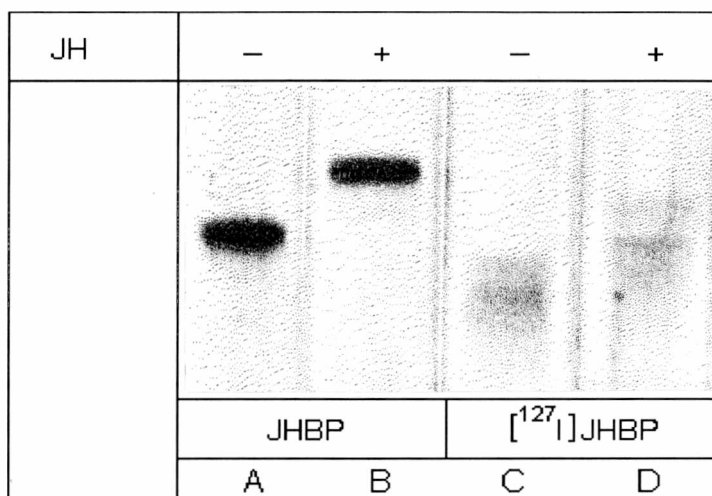
Rysunek 20

Krzywa czasowa degradacji JH przez frakcję membranową.

Do probówek zawierających [^3H]JH I o radioaktywności właściwej 2.42×10^{13} dpm/mol ($3.3 \mu\text{M}$, 80 000 dpm) w 1 ml buforu 5 mM Mes, 4 mM CaCl_2 , 1 mg/ml albuminy z surowicy wołowej, 1 mg/ml żelatyny, pH 6.5 dodawano po 1 ml buforu 10 mM Mops, 100 mM NaCl, pH 7.2. Próby mieszano i pobierano z nich po 100 μl na oznaczenie metabolitów JH w próbie wyjściowej metodą podziałową (MATERIAŁY I METODY). Do pozostałej objętości dodawano po 50 μl frakcji membranowej (50 μg białka). Próby mieszano (vortex) i inkubowano w temperaturze pokojowej. Po określonym czasie każdą próbę wirowano przez 2 min. przy 10 000 rpm i pobierano po 100 μl do oznaczenia ilości metabolitów JH (Δ); metabolity (o).

5.4.2. Właściwości jodowanego białka wiążącego hormon juvenilny

Procent znakowania JHBP (ilość atomów jodu związanych z 1 cząsteczką JHBP) metodą jodogenową wynosił ok 30% (0.3 atomu jodu/cząsteczkę białka). JHBP znakowane nie-radioaktywnym jodem (^{127}I), oddzielone od mieszaniny reakcyjnej na kolumnie PD-10 wiąże 97% JH w stosunku do kontrolnego, nie jodowanego JHBP. Przyłączenie atomu jodu zmniejsza jednak ruchliwość elektroforetyczną białka wiążącego JH. Rys.21 przedstawia wynik elektroforezy (warunki nie-denaturujące) [^{127}I]JHBP i natywnego JHBP.



Rysunek 21

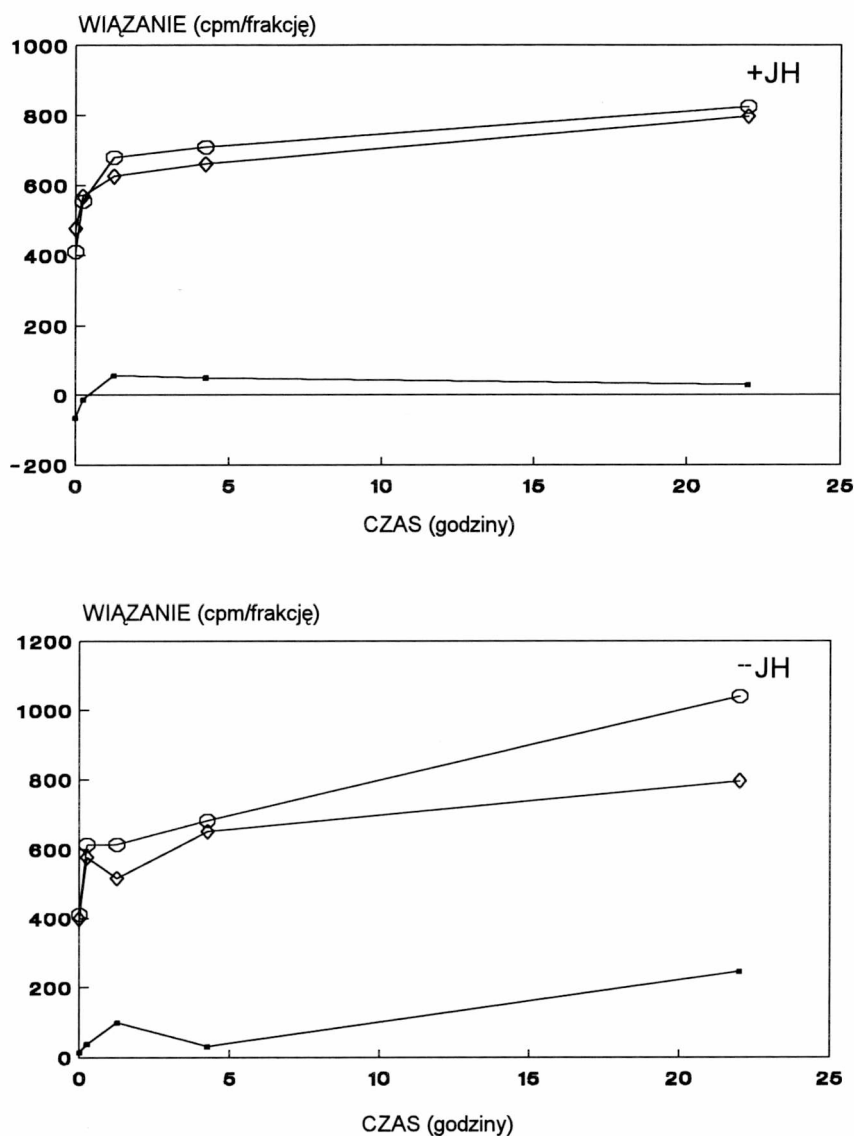
Sprawdzenie właściwości molekularnych JHBP po jodowaniu - elektroforeza w warunkach nie-denaturujących.

0.32 nmola JHBP (10.3 μg białka) jodowano 0.375 nmola $\text{Na}[^{127}\text{I}]$ metodą jodogenową (100 μg jodogenu) w 100 μl buforu fosforanowego 0.2 M, pH 6.5 (FRAKER i SPECK, 1978). Reakcję prowadzono przez 10 min w 0 $^{\circ}\text{C}$. Po tym czasie 35 μl (3.6 μg białka) mieszaniny reakcyjnej (C,D) i 35 μl (3.6 μg białka) kontroli (natywne JHBP; A,B) naniesiono na żele (kolumnienki): zawierające 4 μM JH I (ślady B i D) i nie zawierające JH I (ślady A i C) i poddano elektroforezie w warunkach nie-denaturujących. Białka wybarwiono Coomassie brilliant blue G-250.

Ruchliwość JHBP poddanego elektroforezie po jodowaniu jest większa niż ruchliwość białka natywnego a rozmycie pasm wskazuje na heterogenność powstałych produktów. Zmniejszenie ruchliwości w obecności hormonu wskazuje na zachowanie zdolności zmiany konformacyjnej przez jodowane JHBP.

5.4.3. Czasowa zależność wiązania jodowanego białka wiążącego hormon juvenilny do frakcji membranowej z ciała tłuszczowego

Krzywą czasową wiązania JHBP do frakcji membranowej w obecności (+JH) i w nieobecności (-JH) hormonu pokazuje Rys. 22. Niewielkie wiązanie specyficzne, oznaczane jako różnica pomiędzy wiązaniem totalnym (wiązanie mierzone w obecności $[^{125}\text{I}]$ JHBP) a wiązaniem niespecyficznym (wiązanie mierzone w obecności $[^{125}\text{I}]$ JHBP i 1000 krotnego nadmiaru natywnego JHBP) jest większe w próbach bez hormonu. Niestety na podstawie wyników tego doświadczenia nie można wnosić o istnieniu czy braku receptora membranowego dla kompleksu JHBP-JH.



Rysunek 22

Krzywa czasowa wiązania JHBP do frakcji membranowej.

50 μ l frakcji membranowej (50 μ g białka) inkubowano z 130 fmola (4.16 ng) [125 I]JHBP (20 000 cpm) w 400 μ l buforu C (5 mM Mes, 4 mM CaCl₂, 1 mg/ml albuminy z surowicy wołowej, 1 mg/ml żelatyny, pH 6.5). Wiązanie niespecyficzne oznaczano w obecności 1000-krotnego nadmiaru nieznakowanego JHBP. Próby, w których oznaczano wiązanie w obecności hormonu, zawierały po 10 nmoli JH I. Próby inkubowano przez określony czas, po czym wirowano przy 4000 rpm przez 10 min. Osad przemywano 200 μ l buforu C i po ponownym odwirowaniu oznaczano radioaktywność w osadzie. +JH: wiązanie w obecności hormonu; -JH: wiązanie w nieobecności hormonu. Wiązanie specyficzne (•) określano jako różnicę pomiędzy wiązaniem totalnym (o) a niespecyficznym (◊).

6. DYSKUSJA

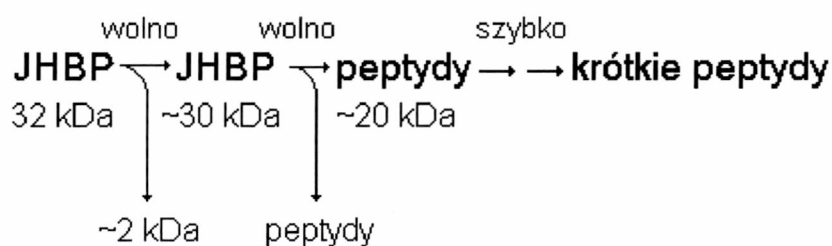
Już po zakończeniu pracy eksperymentalnej, której wyniki przedstawiono w niniejszej rozprawie ukazała się w publikacja dotycząca ekspresji hemolimfowego JHBP z larw *Manduca sexta* w owadziej linii komórkowej (TOHUARA i wsp., 1993). Autorzy tej pracy nie stwierdzili różnic w widmach CD, mierzonych w obecności i nieobecności JH, dla ekspresjonowanego, fuzyjnego JHBP, kodowanego przez jeden z dwóch znalezionych klonów.

6.1. Zmiana konformacyjna białka wiążącego hormon juwenilny indukowana wiązaniem ligandu

Kompleks JHBP-JH posiada mniejszą ruchliwość niż wolne białko, co pokazują wyniki elektroforezy przeprowadzonej w warunkach nie-denaturujących (5.1.1., Rys. 6). Zwiększenie ciężaru cząsteczkowego układu przez przyłączenie ligandu, o masie cząsteczkowej ponad 100 krotnie mniejszej niż masa białka, nie może tłumaczyć tego zjawiska. Efekt zmniejszenia ruchliwości elektroforetycznej jest specyficzny dla JHBP, gdyż hormon juwenilny nie wpływa na ruchliwość żadnego ze składników heterogennego preparatu albuminy z jaj kurzych. Przyczyną zmniejszenia ruchliwości elektroforetycznej JHBP, po związaniu ligandu, może być znaczna zmiana masy (oligomeryzacja), zmiana kształtu czy ładunku cząsteczki białka wiążącego JH lub kilka w/w zmian jednocześnie. Zjawisko zmiany punktu izoelektrycznego, zachodzącej pod wpływem wiązania hormonu, jest znane dla białka transportującego kortyzol w surowicy kręgowców (VAN BAELEN i wsp., 1972). W przypadku JHBP wiązanie hormonu prowadzi do zmiany właściwości sedymentacyjnych, a więc z całą pewnością do zmiany kształtu (wymiarów) cząsteczki. Wyniki wirowania w gradiencie gęstości sacharozy (5.1.2., Rys. 7) pokazują, że współczynnik sedymentacji rośnie z wartości 2.3 S dla wolnego białka do wartości 2.71 S dla kompleksu białka z hormonem, co świadczy o tym, że cząsteczka JHBP zmienia kształt na bardziej sferyczny. Również w tym przypadku wpływ JH jest specyficzny dla JHBP, gdyż hormon nie wpływa na współczynnik sedymentacji albuminy z jaj kurzych, zastosowanej jako standard wewnętrzny. Sacharoza nie zmienia właściwości JHBP, gdyż nie wpływa na ruchliwość elektroforetyczną JHBP i kompleksu JHBP-JH, co pokazały wyniki elektroforezy, przeprowadzonej w warunkach nie-denaturujących (5.1.2., Rys.8). Różnica 0.41 S pomiędzy współczynnikiem sedymentacji JHBP wolnego i będącego w kompleksie z hormonem świadczy o znacznej zmianie wymiarów cząsteczki białka. Taką zmianę mogłaby powodować oligomeryzacja JHBP, przy założeniu szybkich równowag monomer-oligomer. Aby stwierdzić czy w wyniku wiązania hormonu juwenilnego następuje oligomeryzacja JHBP przeprowadzono eksperyment sieciowania białek.

Wyniki sieciowania JHBP, w obecności lub nieobecności hormonu (5.1.3., Rys.10), nie pokazały jednakże tworzenia się oligomerów białka, chociaż zastosowane warunki były wystarczające do całkowitego usieciowania, użytej jako kontroli, tetramerycznej dehydrogenazy mleczanowej. Zaobserwowano, że nieoczekiwanie ruchliwość elektroforetyczna sieciowanego JHBP jest większa niż ruchliwość natywnego białka. Podobny efekt zaobserwowano także dla monomeru aldolazy. Oba białka; aldolaza i JHBP z hemolimfy *Galleria mellonella* są białkami zasadowymi. JHBP posiada 30 reszt lizynowych (OŻYHAR i KOCHMAN, 1987), z których przynajmniej część może znajdować się na tyle blisko siebie aby przy dużym nadmiarze aldehydu glutarowego utworzyły się wiązania wewnątrzcząsteczkowe.

Wiązanie hormonu juwenilnego powoduje również zmniejszenie szybkości inaktywacji JHBP przez subtylizynę (5.3.1., Rys.12). Stała szybkości degradacji JHBP w obecności hormonu jest 2.4 razy mniejsza niż w nieobecności JH (5.3.2., Rys.16). Efekt ochronny hormonu jest specyficzny dla JHBP i nie jest wynikiem hamowania aktywności subtylizyny przez JH, co pokazano przez trawienie aldolazy subtylizyną, w obecności lub nieobecności hormonu (5.3.1., Rys.13). W wyniku degradacji JHBP przez subtylizynę tworzy się jeden główny produkt białkowy o masie cząsteczkowej około 30 kDa (5.3.2., Rys.14 i Rys.15). Jest on wolno hydrolizowany do produktów o niższej masie cząsteczkowej (ok. 20-25 kDa), które są następnie szybko rozszczepiane do krótkich peptydów. Schemat degradacji JHBP, opracowany na podstawie otrzymanych wyników, przedstawia Rys.23.



Rysunek 23

Schemat degradacji JHBP przez subtylizynę. Według WIECZOREK i KOCHMAN (1991).

Fragment JHBP o masie cząsteczkowej 30 kDa słabiej wiąże hormon juwenilny niż natywne białko. Stała dysocjacji JH I dla tego fragmentu jest 2.4 razy wyższa niż dla natywnego JHBP (5.3.3., Rys. 19).

Jest interesujące, że niezależnie od obecności hormonu, podobny obraz produktów trawienia JHBP przez subtylizynę jest widoczny w elektroforezie w warunkach denaturujących (5.3.2. Rys.14). Jedynie ilość produktów trawienia otrzymanych w obecności JH jest nieco mniejsza niż ilość produktów otrzymanych w nieobecności hormonu. Jeśli wiązanie hormonu zmienia strukturę cząsteczki JHBP, to w przypadku hydrolizy kompleksu powinna zmieniać się również dostępność wiązań hydrolizowanych przez subtylizynę. Wydaje się więc, że w populacji cząsteczek zawierających kompleks JHBP-JH i nie związane z hormonem JHBP tylko wolne białko jest degradowane i dlatego produkty trawienia są takie same dla obu prób.

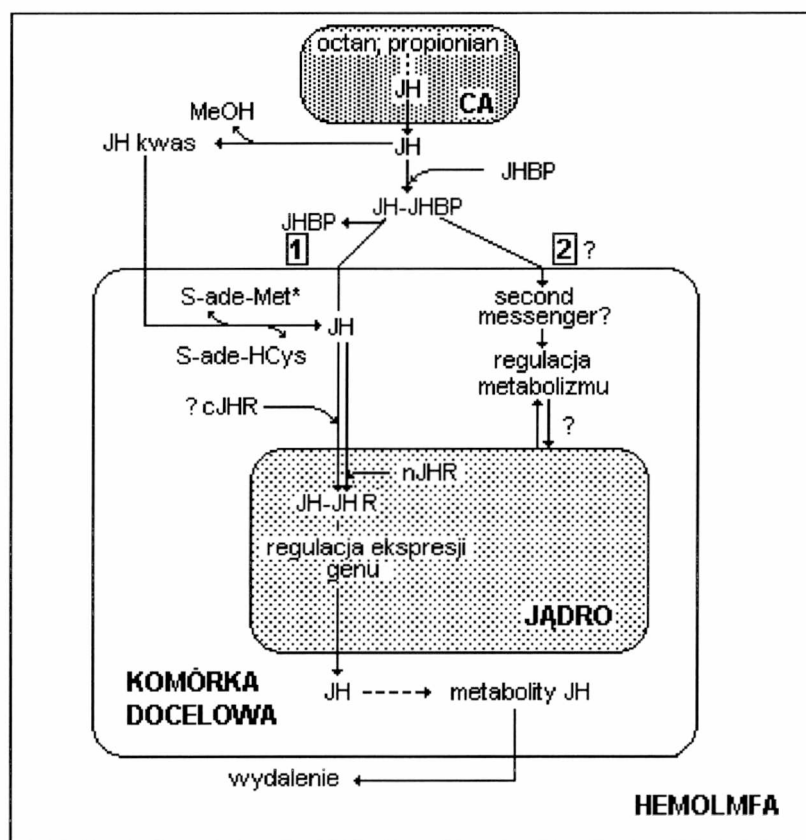
TOUHARA i wsp. (1993) sklonowali i ekspresjonowali fuzyjne JHBP z hemolimfy *Manduca sexta* w owadziej linii komórkowej Sf9. Widma CD otrzymane przez tych badaczy nie wykazały różnicy pomiędzy wolnym JHBP i kompleksem JHBP-JH. TOUHARA i wsp. (1993) otrzymali fuzyjne JHBP z jednego z dwóch znalezionych klonów kodujących białko 32 kDa, specyficznie wiążące fotoznacznik stosowany do rozpoznania JHBP. Oba klony różniły się sekwencją trzech aminokwasów.

U *Manduca sexta* występuje wiele form molekularnych JHBP. Podczas oczyszczania białka wiążącego JH z hemolimfy larw piątego (ostatniego) stadium *M.sexta* znaleziono dwie formy białka zdolne do wiązania hormonu: CP- α i CP- β , różniące się punktem izoelektrycznym (pI dla CP- α = 4.95; dla CP- β = 5.25) (KRAMER i wsp., 1976b). Autorzy stwierdzili, że masa cząsteczkowa dla obu form tego białka wynosi 28-29 kDa, a stała dysocjacji dla JH I jest równa 4.4×10^{-7} M. Z hemolimfy larw czwartego stadium wyizolowano JHBP, o podobnej masie cząsteczkowej do form z piątego stadium, lecz różniące się od nich punktem izoelektrycznym, stałą dysocjacji i składem aminokwasowym (GOODMAN i wsp., 1978a). Jest więc możliwe, że inna z form JHBP *Manduca sexta* jest wrażliwa na wiązanie hormonu.

Nie można również wykluczyć możliwości, że zmiana konformacyjna indukowana ligandem jest specyficzna dla JHBP z *Galleria mellonella*. Trzeba podkreślić, że JHBP z hemolimfy *Manduca sexta* różni się zasadniczo od hemolimfowego JHBP *Galleria mellonella*. Pierwsze jest białkiem kwaśnym (KRAMER i wsp., 1976b), drugie zasadowym (OŻYHAR i KOCHMAN, 1987). Powinowactwo JHBP z *Manduca sexta* maleje ze wzrostem polarności homologów JH (JH 0 > JH I > JH II > JH III > metabolity) (GOODMAN i wsp., 1976), w przeciwieństwie do JHBP z *Galleria mellonella*, dla którego zależność powinowactwa od polarności jest złamana (JH II > JH I > JH III) (OŻYHAR i KOCHMAN, 1987).

6.2. Molekularny mechanizm działania hormonu juvenilnego

Mechanizm działania hormonu juvenilnego na poziomie molekularnym nie jest jeszcze w pełni poznany. Jednakże wyniki dotychczasowych badań pozwalają na naszkicowanie schematu działania hormonu juvenilnego, który prezentuje Rys. 24.



Rysunek 24

Schemat działania hormonu juvenilnego. Według KOCHMAN i WIECZOREK (1991).

CA, *corpora allata*; MeOH, metanol; S-ade-Met, S-adenozylometionina; S-ade-HCys, S-adenozylhomocysteina; cJHR, cytosolowy receptor hormonu juvenilnego; nJHR, jądrowy receptor hormonu juvenilnego; *w dyskach imaginalnych.

Obecność receptorów wewnątrzkomórkowych dla JH (Rys. 24, droga 1) jest już udokumentowana (Wstęp, 1.2.2.1). Jednak niektóre doniesienia sugerują istnienie innej, niż działanie przez wewnątrzkomórkowy receptor, drogi przenoszenia sygnału przez

hormon juwenilny (Rys.24, droga 2). Badania prowadzone *in vitro* (YAMAMOTO i wsp., 1988) pokazały, że JH zwiększa syntezę białek w dodatkowych gruczołach płciowych samców *Drosophila*, oraz że aktywacja ta wymaga obecności Ca^{2+} w medium inkubacyjnym. Jednocześnie nie obserwowano wpływu hormonu na syntezę białek w dodatkowych gruczołach płciowych mutantów *Drosophila* pozbawionych aktywności kinazy C. Wydaje się więc, że w działaniu JH na gruczoły płciowe *Drosophila* pośredniczy system przekaźników informacji drugiego rzędu. Doświadczenia ILENCHUKA i DAVEY'A (1984) przeprowadzone na preparatach membranowych samic *Rhodnius prolixus*, u których hormon juwenilny powoduje zmianę objętości komórek folikularnych, wykazały, że JH stymuluje Na^+, K^+ -ATPazę komórek folikularnych i jajników. Autorzy pokazali, że hormon juwenilny, w sposób wysycalny, wiąże się do dwóch białkowych składników (43 i 150 kDa) pompy sodowo-potasowej z frakcji mikrosomalnej komórek folikularnych.

Postawiono też hipotezę, że JHBP może służyć w przeniesieniu sygnału hormonalnego do tkanek docelowych (SANBURG i wsp., 1975; OŻYHAR i KOCHMAN, 1987). SANBURG i wsp. (1975) stwierdzili, że *in vitro* JHBP z *Manduca sexta* synergistycznie zwiększa hamowanie przez JH metamorfozy dysków imaginalnych *Plodia interpunctella*. Za hipotezą zaangażowania JHBP w działanie JH przemawia fakt, że w warunkach fizjologicznych stężenie białka wiążącego JH w hemolimfie jest o dwa rzędy wyższe niż stężenie hormonu juwenilnego (OŻYHAR i wsp., 1983; PLANTEVIN i wsp., 1984), stąd prawie wszystek hormon juwenilny jest związany z białkiem (GOODMAN i GILBERT, 1978). Wolny hormon w hemolimfie jest natychmiast hydrolizowany (ABDEL-AAL i HAMMOCK, 1988). W takiej sytuacji istnienie cząsteczek JHBP w dwóch konformacjach mogłoby mieć fizjologiczne znaczenie. Zmieniona konformacja JHBP pozwalałaby receptorowi membranowemu na odróżnienie obsadzonego ligandem JHBP od wolnego białka. We wszystkich znanych systemach przenoszenia sygnału przez błonę komórkową zmiana konformacyjna białka (receptor) wiążącego ligand (hormon) jest kluczowym czynnikiem umożliwiającym przekazanie sygnału do wnętrza komórki.

6.3. Czy istnieje receptor membranowy dla białka wiążącego hormon juwenilny - analogia do receptorów białek transportujących hormony sterydowe kręgowców?

Jednoznaczną odpowiedzią na postawione pytanie byłoby znalezienie receptora membranowego dla JHBP. Takie usiłowania zostały wstępnie w tej pracy podjęte (5.4.3., Rys.22), jednak bez jednoznacznych wyników. Otrzymano wzbogaconą frakcję membranową z ciała tłuszczowego i zaznakowano jodem JHBP z zadowalającą

radioaktywnością właściwą. Stwierdzono, że zachowana została zdolność jodowanego JHBP do wiązania ligandu i do zmiany ruchliwości elektroforetycznej w obecności JH (4.3.2., Rys.21). Jednakże zwiększenie ruchliwości JHBP po jodowaniu i heterogenność powstałych produktów (4.3.2., Rys.21) świadczą, że na skutek działania czynnika utleniającego (jodogen) niektóre z reszt aminokwasowych białka mogły ulec modyfikacji podczas jodowania.

Zmierzono szybkość degradacji hormonu juwenilnego przez frakcję membranową z ciała tłuszczowego (5.4.1., Rys.20). Otrzymana wartość 0.14 nmola/min. x mg białka jest zgodna z wynikami WIŚNIEWSKIEGO i wsp. (1986), którzy podają, że szybkość degradacji JH przez homogenat ciała tłuszczowego *Galleria mellonella* wynosi ok. 1 nmola/min. x mg, a przez cytosol tej tkanki ok. 0.8 nmola/min. x mg. Różnica; 0.2 nmole/min. x mg przypada na frakcję mikrosomalną. W niniejszej pracy, w eksperymentach, w których badano wiązanie [125 I]JHBP do frakcji membranowej z ciała tłuszczowego w obecności JH, stężenie niezdegradowanego hormonu w próbach, po zakończeniu inkubacji, było większe 1000 krotnie od stężenia znakowanego JHBP.

Otrzymane w niniejszej pracy dane nie pozwalają na uzyskanie odpowiedzi na pytanie czy istnieje receptor membranowy dla JH. Dla kręgowców znane są dość nieliczne doniesienia, wskazujące na istnienie specyficznych receptorów membranowych na powierzchni komórek docelowych dla surowiczych białek transportujących hormony sterydowe. Najlepiej udokumentowane przykłady odnoszą się do receptorów membranowych dla białek transportujących kortykosterydy (CBG) (KUHN, 1988) i białek transportujących hormony płciowe (SBP). Receptory dla SBP znaleziono na membranach tkanek docelowych dla androgenów i estrogenów (FORTUNATI i wsp., 1991; FELDEN i wsp., 1992; PORTO i wsp., 1992). STREL'CHYONOK i wsp. (1984) pokazali, że membrany łożyska zawierają "system" rozpoznający kompleks estradiol - SBP. Stała dysocjacji tego kompleksu wynosi 3.5×10^{-12} M, a optymalne wiązanie jest zapewnione przez równomolarny stosunek hormonu do białka. Inną "sekwencję zdarzeń" w przenoszeniu sygnału hormonalnego przez błonę komórkową proponują HRYB i wsp. (1990), którzy badali wiązanie SBP do membran prostaty. Według zaproponowanego przez nich dwustopniowego modelu, w pierwszym etapie wolne SBP jest wiązane przez receptor membranowy ($K_d = 0.19$ nM), w drugim, do związanego z receptorem SBP przyłącza się hormon. W świetle badań tych autorów wiązanie hormonu do SPB blokuje oddziaływanie białka z receptorem. Wyniki FORTUNATI i wsp. (1992a,b) sugerują, że wpływ hormonu na wiązanie SBP do receptora membranowego zależy od rodzaju tkanki docelowej oraz od tego czy receptor występuje w formie rozpuszczalnej, czy związanej z membraną.

Ciekawym wydaje się fakt, że CBG i białko transportujące tyroksynę należą do rodziny

serpin, do której zaliczone zostały ze względu na homologię sekwencji do α_1 -antytrypsynowego inhibitora proteaz serynowych (HAMMOND i wsp., 1987; JARVIS i wsp., 1992). Pokazano (PEMBERTON i wsp., 1988), że chociaż żadne z tych białek nie posiada aktywności inhibitora proteaz to obydwa ulegają charakterystycznej dla serpin, modyfikacji proteolitycznej i towarzyszącej jej zmianie konformacyjnej. W wyniku proteolizy wzrasta termiczna stabilność obu białek, a stała wiązania hormonu do CBG maleje, co pozwala na łatwiejsze oddanie hormonu tkance objętej stanem zapalnym. Wiązanie białka transportującego do receptora może prowadzić do przeniesienia kompleksu do wnętrza komórki, lub do włączenia przekaźnika informacji drugiego rzędu. PORTO i wsp. (1991), pokazali, że surowicze białko wiążące sterydy jest przenoszony do wnętrza komórek MCF-7 przez endocytozę i jest umieszczany w endosomach i lizosomach. W tej samej linii komórkowej wiązanie CBG do receptora membranowego powoduje aktywację cykazy adenylowej i gromadzenie cAMP (NAKHLA i wsp., 1988).

Oprócz hormonów sterydowych także retinol posiada w surowicy białko transportujące, które prawdopodobnie bierze udział w rozpoznaniu retinolu przez receptor membranowy (RASK i PETERSON, 1976; MARAINI i wsp., 1977). Byłaby to inna droga działania witaminy A, gdyż obecność receptorów wewnątrzkomórkowych dla retinolu jest dobrze udokumentowana. Inna witamina - kobalamina (witamina B₁₂) jest transportowana do ludzkich fibroblastów w kompleksie z jej białkiem wiążącym - transkobalaminą (YOUNGDAHL-TUNER i wsp., 1979).

Jest zatem niezmiernie ciekawe czy zaobserwowana w niniejszej pracy bardzo nieznaczna różnica pomiędzy całkowitym a niespecyficznym wiązaniem JHBP do membran ciała tłuszczowego jest znacząca. Dalsze badania są jednak potrzebne dla uzyskania jednoznacznej odpowiedzi na to pytanie.

7. LITERATURA

- ABDEL-AAL Y.A.I. i HAMMOCK B.D. (1988) Kinetics of binding and hydrolysis of juvenile hormone II in the hemolymph of *Trichoplusia ni* (Hübner) *Insect Biochem.* **18**, 743-750.
- ACLE D., BROOKES V.J., PRATT G.E. i FEYEREISEN R. (1990) Activity of the corpora allata of adult female *Leucophaea maderae*: effects of mating and feeding. *Archs Insect Biochem. Physiol.* **14**, 121-129.
- ADACHI T., TOKIYA S., SUZUKI Y., IWAMI M., KAWAKAMI A., TAKAHASHI S.Y., ISHIZAKI H., NAGASAWA H. i SUZUKI A. (1989) cDNA structure and expression of bombyxin, an insulin-like brain secretory peptide of the silkworm *Bombyx mori*. *J. Biol. Chem.* **264**, 7681-7685.
- ADAMS T.S. i FILIPI P.A. (1988) Interaction between juvenile hormone, 20-hydroxyecdysone, the corpus cardiacum-allatum complex, and the ovaries in regulating vitellogenin levels in the housefly, *Musca domestica*. *J. Insect Physiol.* **34**, 11-19.
- AGUI N., GRANGER N.A., GILBERT L.I. i BOLLENBACHER W.E. (1979) Cellular localization of the insect prothoracicotropic hormone. *In vitro* assay of a single neurosecretory cell. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **76**, 5694-5698.
- AKABAS M.H., STAUFFER D.A., XU M. i KARLIN A. (1992) Acetylcholine receptor channel structure probed in cysteine-substitution mutants. *Science* **258**, 307-309.
- ALTFELDER K. i MÜLLER U. (1991) Cyclic nucleotide-dependent protein kinases in the neural tissue of the honeybee *Apis mellifera*. *Insect Biochem.* **21**, 487-494.
- ALTFELDER K., MÜLLER U. i MENZEL R. (1991) Ca^{2+} /calmodulin and Ca^{2+} /phospholipid-dependent protein kinases in the neural tissue of the honeybee *Apis mellifera*. *Insect Biochem.* **21**, 479-486.
- ANDERSEN S.O. (1985) Sclerotization and tanning of the cuticle. W: *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*. Red. Kerkut G.A. i Gilbert L.I., Pergamon Press, Oxford, str. 59-74.
- ASHBURNER M., CHIHARA C., MELTZER P. i RICHARDS G. (1974) Temporal control of puffing activity in polytene chromosomes. *Cold Spring Harbour Symp. Quant. Biol.* **38**, 655-662.

- BAKER F.C., LEE E., BERGOT B.J. i SCHOOLEY D.A. (1981) Isomerization of isopentenyl pyrophosphate and homoisopentenyl pyrophosphate by *Manduca sexta corpora cardiaca-corpora allata* homogenates. W: *Juvenile Hormone Biochemistry*. Red Pratt G.E. i Brooks G.T., Elsevier/North-Holland, str. 67-80.
- BARBER R.F., McKERSIE B.D., DOWNER R.G.H. i THOMPSON J.E. (1981) Perturbation of phospholipid membranes by juvenile hormone. *Biochim. Biophys. Acta* **643**, 593-600.
- BENKE D. i BREER H. (1989) Endogenous low molecular weight inhibitors of cholinergic binding sites. *Insect. Biochem.* **19**, 423-430.
- BERGOT B.J., BAKER F.C., CERF D.C., JAMIESON G. i SCHOOLEY D.A. (1981) Qualitative and quantitative aspects of juvenile hormone titers in developing embryos of several insect species: discovery of a new JH-like substance extracted from eggs of *Manduca sexta*. W: *Juvenile Hormone Biochemistry*. Red. Pratt G.E. i Brooks G.T., Elsevier/North-Holland, str. 33-45.
- BERMUDEZ I., BOTHAM R.P. i BEADLE D.J. (1988) High- and low-affinity uptake of amino acid transmitters in cultured neurones and muscle cells of the cockroach *Periplaneta americana*. *Insect Biochem.* **18**, 249-262.
- BERRIDGE M.J. i PATEL N.G. (1968) Insect salivary glands: Stimulation of fluid secretion by 5-hydroxytryptamine and adenosine-3',5'-monophosphate. *Science* **162**, 462-463.
- BERTICS P.J. i GILL G.N. (1985) Self-phosphorylation enhances the protein-tyrosine kinase activity of the epidermal growth factor receptor. *J. Biol. Chem.* **260**, 14642-14647.
- BHASKARAN G., SPARAGANA S.P., BARRERA P. i DAHM K.H. (1986) Change in corpus allatum function during metamorphosis of tobacco hornworm *Manduca sexta*: regulation at the terminal step in juvenile hormone biosynthesis. *Archs Insect Biochem. Physiol.* **3**, 321-338.
- BHASKARAN G., DAHM K.H., JONES G.L., PECK K. i FAUGHT S. (1987) Juvenile hormone acid synthesis and HMG-CoA reductase activity in *corpora allata* of *Manduca sexta* prepupae. *Insect Biochem.* **17**, 933-937.
- BHASKARAN G., DAHM K.H., BARRERA P., PACHECO J.L., PECK K. E. i MUSZYŃSKA-PYTEL M. (1990) Allatinihin, a neurohormonal inhibitor of juvenile hormone biosynthesis in *Manduca sexta*. *Gen. Comp. Biochem.* **78**, 123-136.
- BIRNBAUMER L., ABRAMOWITZ J. i BROWN A. M. (1990) Receptor-effector coupling by G proteins. *Biochim. Biophys. Acta* **1031**, 163-224.

- BLOMQUIST G.J., BORGESON C.E. i VUNDLA M. (1991) Polyunsaturated fatty acids and eicosanoids in insects. *Insect Biochem.* **21**, 99-106.
- BLOSTEIN R. i RATTER W.J. (1963) Comparative studies of liver and muscle aldolase. II Immunochemical and chromatographic differentiation. *J. Biol. Chem.* **238**, 6694-6699.
- BOGUŚ M. i CYMBOROWSKI B. (1981) Chilled *Galleria mellonella* larvae. Mechanism of supernumerary moultings. *Physiol. Entomol.* **6**, 343-348.
- BOGUŚ M.I. i CYMBOROWSKI B. (1984) Induction of supernumerary moults in *Galleria mellonella*: evidence for an allatotrophic function of the brain. *J. Insect Physiol.* **30**, 557-561.
- BOLLENBACHER W.E., KATAHIRA E.J., O'BRIEN M., GILBERT L. I. i THOMAS M.K. (1984) Insect prothoracicotropic hormone: evidence for two molecular forms. *Science* **224**, 1243-1245.
- BOSQUET G. i CALVEZ B. (1985) Juvenile hormone modifications of gene expression in the fat body and posterior silk glands of *Bombyx mori*. *J. Insect Physiol.* **31**, 601-610.
- BRADFORD M.M. (1976) A rapid, sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
- BRINDLE P.A., SCHOOLEY D.A., TSAI L.W. i BAKER F.C. (1988) Comparative metabolism of branched-chain amino acids to precursors of juvenile hormone biogenesis in *corpora allata* of lepidopterous *versus* nonlepidopterous insects. *J. Biol. Chem.* **263**, 10653-10657.
- BRINDLE P.A., BAKER F.C., TSAI L.W. i SCHOOLEY D.A. (1992) Comparative metabolism of isoleucine by *corpora allata* of nonlepidopteran insects *versus* lepidopteran insects, in relation to juvenile hormone biosynthesis. *Archs Insect Biochem. Physiol.* **19**, 1-15.
- BROWN B.E. (1965) Pharmacologically active constituents of the cockroach corpus cardiacum: resolution and some characteristics. *Gen. Comp. Endocrinol.* **5**, 387-401.
- BRÖNNEGARD M., POELLINGER L., OKRET S., WIKSTROM A.CH., BAKKE O. i GUSTAFSSON J.A. (1987) Characterization and sequence-specific binding to mouse mammary tumor virus DNA of purified activated human glucocorticoid receptor. *Biochemistry* **26**, 1697-1704.
- BRUNET P.C.J. (1980) The metabolism of the aromatic amino acids concerned in the cross-linking of insect cuticle. *Insect Biochem.* **10**, 467-500.

- BUGGE TH., POHL J., LONNOY O. i STUNNENBERG H. G. (1992) RXR α , a promiscuous partner of retinoic acid and thyroid hormone receptors. *EMBO* **11**, 1409-1418.
- BUTENANDT A. i KARLSON P. (1954) Über die Isolierung eines Metamorphose – Hormons der Insekten in kristallisierter Form. *Z. Naturforsch.* **9b**, 389-391.
- CADEPOND F., SHWEIZER-GROYER G., SEGARD-MAUREL I., JIBARD N., HOLLENBERG S.M., GIGUERE V., EVANS R.M. i BAULIEU E.E. (1991) Heat shock protein 90 as a critical factor in maintaining glucocorticosteroid receptor in a nonfunctional state. *J. Biol. Chem.* **266**, 5834-5841.
- CANTERA R. i CARLBERG M. (1988) Serotonin levels in the central nervous system of the blowfly *Calliphora erythrocephala* during postembryonic development. *Insect Biochem.* **18**, 507-509.
- CHALAYE D. (1974) Neurosecretions au niveau de la chaîne nerveuse ventrale de *Locusta migratoria migratorioides* (R. et F.): étude histologique, histochimique, ultrastructurale et expérimentale. *These Univ. Paris, No CNRS A.O.* 9450.
- CHAN L., JOHNSON M.P. i TINDALL D.D. (1989) Steroid hormone action. W: *Pediatric Endocrinology*. Red. Collu R., Durchame J.R. i Guyda H.J., Raven Press, Ltd., New York, str. 81-124.
- CHANG E.S., COUDRON T.A., BRUCE M.J., SAGE B.A., O'CONNOR J.D. i LAW J.H. (1980) Juvenile hormone-binding protein from the cytosol of *Drosophila* Kc cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**, 4657-4661.
- CHANG E.S., BRUCE M.J. i PRESTWICH G.D. (1985) Further characterization of the juvenile hormone binding protein from the cytosol of a *Drosophila* cell line. Use of a photoaffinity label. *Insect Biochem.* **15**, 197-204.
- CLAYTON R.B. (1964) The utilization of sterols by insects. *J. Lipid Res.* **5**, 3-19.
- CLEVER U. i KARLSON P. (1960) Induktion von Puff-Veränderungen in den Speicheldrüsenchromosomen von *Chironomus tentans* durch. *Ecdyson Exp. Cell Res.* **20**, 623-627.
- COCHET C., GILL G.N., MEISENHELDER J., COOPER J.A. i HUNTER T. (1984) C-kinase phosphorylates the epidermal growth factor receptor and reduces its epidermal growth factor-stimulated tyrosine protein kinase activity. *J. Biol. Chem.* **259**, 2553-2558.
- COOK B.J. (1967) An investigation of factor S, a neuromuscular excitatory substance from insects and crustacea. *Biol. Bull. (Woods Hole, Massachusetts)* **133**, 526-538.
- COLLINS C. i MILLER T. (1977) Studies on the action of biogenic amines on cockroach heart. *J. Exp. Biol.* **67**, 1-15.

- COPENHAVER P.F. i TRUMAN J.W. (1986) Control of neurosecretion in the moth *Manduca sexta*: physiological regulation of the eclosion hormone cells. *J. Comp. Physiol. A*. **158**, 445-455.
- COUDRON T.A., DUNN P.E., SEBALLOS H.L., WHAREN R.E., SANBURG L.L. i LAW J.H. (1981) Preparation of homogeneous juvenile hormone specific esterase from the haemolymph of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Insect Biochem.* **11**, 453-461.
- CROWDER L.A. i SHANKLAND D.L. (1972) Pharmacology of the Malpighian tubule muscle of the American cockroach *Periplaneta americana*. *J. Insect Physiol.* **18**, 929-936.
- CUSSON M. i McNEIL J.N. (1989) Involvement of juvenile hormone in the regulation of pheromone release activities in a moth. *Science* **243**, 210-212.
- CYMBOROWSKI B. (1977) Effect of lighting conditions on growth and developmental rhythms of singly reared *Dermestes vulpinus* (F). *Comp. Biochem. Physiol.* **58A**, 99-101.
- CYMBOROWSKI B. (1984) *Endokrynologia owadów*. PWN, Warszawa, str. 109-111.
- CYMBOROWSKI B. i BOGUŚ M. (1976) Juvenilizing effect cooling on *Galleria mellonella*. *J. Insect Physiol.* **22**, 669-672.
- CYMBOROWSKI B., MUSZYŃSKA-PYTEL M., PORCHERON P. i CASSIER P. (1991) Haemolymph ecdysteroids titres controlled by a circadian clock mechanism in larvae of the wax moth, *Galleria mellonella*. *J. Insect Physiol.* **37**, 35-40.
- DAHM K.H., BHASKARAN G., PETER M.G., SHIRK P.D., SESHAN K.R. i ROLLER H. (1981) The juvenile hormones of *Cecropia*. W: *Regulation of Insect Development and Behavior*. Red. Sehnał F., Zabża A., Menn J.J. i Cymborowski B., Technical University of Wrocław Press, Poland, str. 183-189.
- DAVIES M. (1964) Disc electrophoresis II. Method and application to human serum proteins. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **121**, 404-427.
- DE BRUIJN S.M., KOOPMANSCHAP A.B. i DE KORT C.A.D. (1986) High-molecular-weight serum proteins from *Locusta migratoria*: identification of a protein specifically binding juvenile hormone III. *Physiol. Entomology* **11**, 7-16.
- DE KORT C.A.D. i KHAN M.A. (1984) Environmentally controlled changes in juvenile hormone titer: the colorado potato beetle as a model system. W: *Biosynthesis. Metabolism and Mode of Action of Invertebrate Hormones*. Red. Hoffman J. i Porchet M., Springer-Verlag Berlin Heidelberg, str. 407-415.

- DE KORT C.A.D. i KOOPMANSCHAP A.B. (1987a) Molecular characteristics of lipophorin, the juvenile hormone-binding protein in the hemolymph of the colorado potato beetle. *Archs Insect Biochem. Physiol.* **5**, 255-269.
- DE KORT C.A.D. i KOOPMANSCHAP A.B. (1987b) Specificity of binding of juvenile hormone III to hemolymph proteins of *Leptinotarsa decemlineata* and *Locusta migratoria*. *Experientia* **43**, 904-905.
- DE KORT S. i KOOPMANSCHAP B. (1989) Binding of juvenile hormone III to lipophorin from the american cockroach *Periplaneta americana*. *Archs Insect Biochem. Physiol.* **11**, 159-172.
- DE KORT C.A.D., KOOPMANSCHAP A.B. i ERMENS A.A.M. (1984) A new class of juvenile hormone binding proteins in insect haemolymph. *Insect Biochem.* **14**, 619-623.
- DE KORT C.A.D., KHAN M.A. i KOOPMANSCHAP A.B. (1987) Juvenile hormone and the control of adult diapause in the colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*. *Insect Biochem.* **17**, 985-988.
- DELCHAMBRE J., DELBECQUE J.P., PROVANSAL A., GRILLOT J.P., DE REGGI M.L. i CAILLA H.L. (1979) Total and epidermal cyclic AMP levels related to the variations of ecdysteroids and bursicon during the metamorphosis of the mealworm *Tenebrio molitor* L. *Insect Biochem.* **9**, 95-99.
- DE LOOF A., BRIERS T. i HUYBRECHTS R. (1984) Presence and function of ecdysteroids in adult insects. *Comp. Biochem. Physiol.* **79B** 505-509.
- DeMARZO A.M., BECK C.A., ONATE S.A. i EDWARDS D.P. (1991) Dimerization of mammalian progesterone receptors occurs in the absence of DNA and is related to the release of the 90-kDa heat shock protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 72-76.
- DITTMANN F., KOGAN P.H. i HAGEDORN H.H. (1989) Ploidy levels and DNA synthesis in fat body cells of the adult mosquito, *Aedes aegypti*: the role of juvenile hormone. *Archs Insect Biochem. Physiol.* **12**, 133-143.
- DIEZEL W., KOPPERSCHLÄGER G. i HOFMANN E. (1972) An improved procedure for protein staining in polyacrylamide gels with a new type of Coomassie brilliant Blue. *Anal. Biochem.* **48**, 617-620.
- DOANE W.E. (1972) Role of hormones in insect development. W: *Insect Developmental systems*. Red. Counce S.J. i Haddington C.H., N. Y. Academic, str. 291-497.
- DUDAI Y. (1978) Properties of an α -bungarotoxin-binding cholinergic receptor from *Drosophila melanogaster*. *Biochim. Biophys. Acta.* **539**, 505-517.

- DURAND B., SAUNDERS M., LEROY P., LEID M. i CHAMBON P. (1992) All-*trans* and 9-*cis* retinoic acid induction of CRABP II transcription is mediated by RAR-RXR heterodimers bound to DR1 and DR2 repeated motifs. *Cell* **71**, 73-85.
- ELDRIDGE R., HORODYSKI F.M., MORTON D.B., O'REILLY D.R., TRUMAN J.W., RIDDIFORD L.M. i MILLER L.K. (1991) Expression of an eclosion hormone gene in insect cells using baculovirus vectors. *Insect Biochem.* **21**, 341-351.
- EMMERICH H. i HARTMANN R. (1973) A carrier lipoprotein for juvenile hormone in the haemolymph of *Locusta migratoria*. *J. Insect Physiol.* **19**, 1663-1675.
- ENGELMANN F., MALA J i TOBE S.S. (1987) Cytosolic and nuclear receptors for juvenile hormone in fat bodies of *Leucophaea maderae*. *Insect Biochem.* **17**, 1045-1052.
- EVANS P.D. (1980) Biogenic amines in the insect nervous system. *Adv. Insect Physiol.* **5**, 317-473.
- FELDEN F., LEHEUP B., FREMONT S., BOUGUERNE R., EGLOFF M., NICOLAS J.P., GRIGNON G. i GUEANT J.L. (1992) The plasma membrane of epididymal epithelial cell has a specific receptor which binds to androgen-binding protein and sex steroid-binding protein. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* **42**, 279-285.
- FERNANDEZ-ALMONACID R. i ROSEN O.M. (1987) Structure and ligand specificity of the *Drosophila melanogaster* insulin receptor. *Moll. Cell Biol.* **7**, 2718-2727.
- FEYEREISEN R. i FARNSWORTH D.E. (1987a) Inhibition of juvenile hormone III biosynthesis in cockroach *corpora allata* by interference with the S-adenosylmethionine-dependent transmethylation. *Archs Insect Biochem. Physiol.* **5**, 179-188.
- FEYEREISEN R. i FARNSWORTH D.E. (1987b) Inhibition of insect juvenile hormone synthesis by phorbol 12-myristate 13-acetate. *FEBS Lett.* **222**, 345-348.
- FOGAL W. i FRENKEL G. (1969) The role of bursicon in melanization and endocuticle formation in the adult fleshfly, *Sarcophaga bullata*. *J. Insect Physiol.* **15**, 1235-1247.
- FORTUNATI N., FISSORE F., FAZZARI A., BERTA L., GIUDICI M. i FRAIRIA R. (1991) Sex steroid-binding protein interacts with a specific receptor on human premenopausal endometrium membrane: modulating effect of estradiol. *Steroids* **56**, 341-346.

- FORTUNATI N., FRAIRIA R., FISSORE F., BERTA L., FAZZARI A. i GAIDANO G. (1992a) The receptor for human sex steroid binding protein (SBP) is expressed on membranes of neoplastic endometrium. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* **42**, 185-191.
- FORTUNATI N., FISSORE F., FAZZARI A., BERTA L., VARVELLO L. i FRAIRIA R. (1992b) Receptor for sex steroid-binding protein of endometrium membranes: solubilization, partial characterization, and role of estradiol in steroid-binding protein-soluble receptor interaction. *Steroids* **57**, 464-470.
- FRAKER P.J. i SPECK J.C. Jr. (1978) Protein and cell membrane iodinations with a sparingly soluble chloramide 1,3,4,6-tetrachloro-3 α ,6 α -diphenylglycoluril. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **80**, 849-857.
- FREEMAN M.A. (1966) The effect of drugs on alimentary canal of the African migratory locust *Locusta migratoria*. *Comp. Biochem. Physiol.* **17**, 755-764.
- FRITSCH M., LEARY C.M., FURLOW J.D., AHRENS H., SCHUH T.J. MUELLER G.C. i GORSKI J. (1992) A ligand-induced conformational change in the estrogen receptor is localized in the steroid binding domain. *Biochemistry* **31**, 5303-5311.
- FRONTALI N. i HAGGENDAL J. (1969) Noradrenaline and dopamine content in the brain of the cockroach *Periplaneta americana*. *Brain Res.* **14**, 540-542.
- FUKADA Y., KOKAME K., OKANO T., SHICHIDA Y., YOSHIZAWA T., McDOWELL J.H., HARGRAVE P.A. i PALCZEWSKI K. (1990) Phosphorylation of iodopsin, chicken red-sensitive cone visual pigment. *Biochemistry* **29**, 10102-10106.
- GAMMELTOFT S. i VAN OBBERGHEN E. (1986) Protein kinase activity of the insulin receptor. *Biochem. J.* **235**, 1-11.
- GASIC G.P. i HEINEMANN S. (1991) Receptors coupled to ionic channels: the glutamate receptor family. *Curr. Opinon Neurol.* **1**, 20-26.
- GILBERT L.I., GOODMAN W. i NOWOCK J. (1976) The possible roles of binding proteins in juvenile hormone metabolism and action. *Actualites sur les Hormones D'Invertebres. Colloques Internationaux C.N.R.S.*, No 251, Paris, str. 413-434.
- GIRARDIE J., FADDOUL A. i 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**, 85-92.
- GIRARDIE J., BOUREME D., COUILLAUD F., TAMARELLE M i GIRARDIE A. (1987) Anti-juvenile effect of neuroparsin A, a neuroprotein isolated from locust *corpora cardiaca*. *Insect Biochem.* **17**, 977-983.

- GIRARDIE J., HUET J-C. i PERNOLLET J-C. (1990) The locust neuroparsin A: sequence and similarities with vertebrate and insect polypeptide hormones. *Insect Biochem.* **20**, 659-666.
- GOLD S.M.W. i DAVEY K.G. (1989) The effect of juvenile hormone on protein synthesis in the transparent accessory gland of male *Rhodnius prolixus*. *Insect Biochem.* **19**, 139-143.
- GOODMAN W.G. (1985) Relative hemolymph juvenile hormone binding capacity during larval, pupal and adult development in *Manduca sexta*. *Insect Biochem.* **15**, 557-564.
- GOODMAN W.G. (1990) Biosynthesis, titer regulation and transport of juvenile hormones. W: *Morphogenetic Hormones of Arthropods*. Red. Gupta A.P., Rutgers University Press, New Brunswick and London, str. 83-124.
- GOODMAN W.G. i CHANG E.S. (1985) Juvenile hormone cellular and hemolymph binding proteins. W: *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry, and Pharmacology*. Red. Kerkut G.A. i Gilbert L.I., Pergamon Press, New York, str. 491-510.
- GOODMAN W. i GILBERT L.I. (1978) The hemolymph titer of juvenile hormone binding protein and binding sites during the fourth larval instar of *Manduca sexta*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **35**, 27-34.
- GOODMAN W.G., BOLLENBACHER W.E., ZVENKO H.L. i GILBERT L.I. (1976) A competitive binding protein assay for juvenile hormone. W: *The Juvenile Hormones*. Red. Gilbert L.I., Plenum Press, New York and London, str. 75-95.
- GOODMAN W., O'HERN P.A., ZAUGG R.H. i GILBERT L.I. (1978a) Purification and characterization of a juvenile hormone binding protein from the hemolymph of the fourth instar tobacco hornworm *Manduca sexta*. *Molec. Cell. Endocrinol.* **11**, 225-242.
- GOODMAN W., SCHOOLEY D.A. i GILBERT L.I. (1978b) Specificity of the juvenile hormone binding protein: the geometrical isomers of juvenile hormone I. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**, 185-189.
- GOODMAN W.G., PARK Y.CH. i JOHNSON J.A. (1990) Development and partial characterization of monoclonal antibodies to the hemolymph juvenile hormone binding protein of *Manduca sexta*. *Insect Biochem.* **20**, 611-618.
- GOODMAN W.G., MAXFIELD B. i PARK Y.C. (1991) Immunochemical similarities among the hemolymph juvenile hormone binding proteins of moths. *Experientia* **47**, 945-948.
- GRANGER N.A. i SEHNAL F. (1974) Regulation of larval *corpora allata* in *Galleria mellonella*. *Nature* **251**, 415-417.

- HAGEDORN H.H. (1989) Physiological roles of hemolymph ecdysteroids in the adult insects. W: *Ecdysone*. Red. Koolman J., Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, Thieme Medical Publishers, Inc., New York, str. 279-289.
- HAMMOCK B.D. (1985) Regulation of juvenile hormone titer: Degradation. W: *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry, and Pharmacology*. Red. Kerkut G.A. i Gilbert L.I., Pergamon Press, New York, str. 431-472.
- HAMMOCK B.D. i QUISTAD G.B. (1976) The degradative metabolism of juvenoids by insects. W: *The Juvenile Hormones*. Red. Gilbert L.I., Plenum Press, New York str. 374-393.
- HAMMOCK B., NOWOCK J., GOODMAN W., STAMOUDIS V. i GILBERT L. (1975) The influence of hemolymph-binding protein on juvenile hormone stability and distribution in *Manduca sexta* fat body and imaginal discs *in vitro*. *Molec. Cell. Endocrinol.* **3**, 167-184.
- HAMMOCK B.D., BONNING B.C., POSSEE R.D., HANZLIK T.N. i MAEDA S. (1990) Expression and effects of the juvenile hormone esterase in baculovirus vector. *Nature* **344**, 458-461.
- HAMMOND G.L., SMITH C.L., GOPING I.S., UNDERHILL D.A., HARLEY M.J., REVENTOS J., MUSTO N.A., GUNSALUS G.L. i BARDIN C.W. (1987) Primary structure of human corticosteroid binding globulin, deduced from hepatic and pulmonary cDNAs, exhibits homology with serine protease inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 5153-5157.
- HAMNETT A.F. i PRATT G.E. (1978) Use of automated capillary column radio gas chromatography in the identification of insect juvenile hormones. *J. Chromatogr.* **158**, 387-399.
- HANKE W. i BREER H. (1986) Channel properties of an insect neuronal acetylcholine receptor protein reconstituted in planar lipid bilayers. *Nature* **321**, 171-174.
- HANSSON A., SKOGLUND G., LASSING I., LINDBERG U. i INGELMAN-SUNDBERG M. (1988) Protein kinase C-dependent phosphorylation of profilin is specifically stimulated by phosphatidylinositol bisphosphate (PIP₂). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **150**, 526-531.
- HANZLIK T.N. i HAMMOCK B.D. (1987) Characterization of affinity-purified juvenile hormone esterase from *Trichoplusia ni*. *J. Biol. Chem.* **262**, 13584-13591.
- HANZLIK T.N. i HAMMOCK B.D. (1988) Characterization of juvenile hormone hydrolysis in early larval development of *Trichoplusia ni*. *Archs Insect Biochem. Physiol.* **9**, 135-156.
- HARTMANN R. (1978) The juvenile hormone-carrier in the haemolymph of the acridine grasshopper *Gomphocerus rufus* L.: blocking of the juvenile hormone's action by means of repeated injections of an antibody to the carrier. *Wilhelm Roux's Archives* **184**, 301-324.

- HARTMANN R., JENDRSCZOK C. i PETER M.G. (1987) The occurrence of a juvenile hormone binding protein and *in vitro* synthesis of juvenile hormone by the serosa of *Locusta migratoria* embryos. *Roux's Arch. Dev. Biol.*, **196**, 347-355.
- HATAKEYAMA M. i OISHI K. (1990) Induction of vitellogenin synthesis and maturation of transplanted previtellogenic eggs by juvenile hormone III in males of the sawfly, *Athalia rosae*. *J. Insect Physiol.* **36**, 791-797.
- HERMANN R., RUDOLPH. R. i JAENICKE R. (1979) Kinetics of *in vitro* reconstitution of oligomeric enzymes by cross-linking. *Nature* **277**, 243-245.
- HIETTER H., VAN DORSSELAER A. i LUU B. (1991) Characterization of three structurally-related 8-9 kDa monomeric peptides present in the *corpora cardiaca* of *Locusta*: a revised structure for the neuroparsins. *Insect Biochem.* **21**, 259-264.
- HINCKE M.T. (1988) Characterization of rat parotid protein kinase C. *Int. J. Biochem.* **20**, 303-307.
- HIRUMA K. (1986) Regulation of prothoracicotropic hormone release by juvenile hormone in the penultimate and last instar larvae of *Mamestra brassicae*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **63**, 201-211.
- HIRUMA K. i RIDDIFORD L.M. (1988) Granular phenoloxidase involved in cuticular melanization in the tobacco hornworm: regulation of its synthesis in the epidermis by juvenile hormone. *Develop. Biol.* **130**, 87-97.
- HOFFMANN J.A. i JOOSSE J. (1991) Chinless wonders. *The New Biologists* **3**, 336-340.
- HRYP D.J., KHAN M.S., ROMAS N.A. i ROSNER W. (1990) The control of the interaction of sex hormone-binding globulin with its receptor by steroid hormones. *J. Biol. Chem.* **265**, 6048-6054.
- HUCHO F. (1986) The nicotinic acetylcholine receptor and its ion channel. *Eur. J. Biochem.* **158**, 211-226.
- HURWITZ D.R., EMANUEL S.L., NATHAN M.H., SARVER N., ULRICH A., FELDER S., LAX I. i SCHLESSINGER J. (1991) EGF induces increased ligand binding affinity and dimerization of soluble epidermal growth factor (EGF) receptor extracellular domain. *J. Biol. Chem.* **266**, 22035-22043.
- IBANEZ P., GARCERA M.D., GAVARA A. i MARTINEZ R. (1987) Effect of JH and PII on the protein content of haemolymph and ovaries of *Spilostethus pandurus*. *Comp. Biochem. Physiol.* **88B**, 1157-1161.
- ILENCHUK T.T. i DAVEY K.G. (1984) The binding of juvenile hormone to membranes of follicle cells in the insect *Rhodnius prolixus*. *Can. J. Biochem. Cell Biol.* **63**, 102-106.

- IMOTO K. i wsp. (1988) *Nature* **335**, 645
- ISMAIL S.M. i DUTTA-GUPTA A. (1988) Juvenile hormone inhibits the synthesis of major larval haemolymph proteins in rice moth, *Corcyra cephalonica*. *Biochem. Int.* **17**, 1093-1098.
- IWAMI M., ADACHI T., KONDO H., KAWAKAMI A., SUZUKI Y., NAGASAWA H., SUZUKI A i ISHIZAKI H. (1990) A novel family C of the genes that encode bombyxin, an insulin-related brain secretory peptide of the silk moth *Bombyx mori*: isolation and characterization of gene C-1. *Insect Biochem.* **20**, 295-303.
- JAGOTA A. i HABIBULLA M. (1992) The frontal ganglionic system: cauterization effects on serotonin circadian rhythms of the cockroach *corpora allata* and *corpora cardiaca*. *Insect Biochem. Molec. Biol.* **22**, 747-755.
- JARVIS J.A., MUNRO S.L.A. i CRAIK D.J. (1992) Homology model of thyroxine binding globulin and elucidation of thyroid hormone binding site. *Prot. Engineering* **5**, 61-67.
- JONES G., WING K.D., JONES D. i HAMMOCK B.D. (1981) The source and action of head factors regulating juvenile hormone esterase in larvae of the cabbage looper, *Trichoplusia ni*. *J. Insect Physiol.* **27**, 85-91.
- JONES D., JONES G., WING K.D., RUDNICKA M. i HAMMOCK B.D. (1982) Juvenile hormone esterases of *Lepidoptera*. 1. Activity in the hemolymph during the last larval instar of 11 species. *J. Comp. Physiol.* **148**, 1-10.
- JONES G., HIREMATH S.T., HELLMANN G.M i RHOADS R.E. (1988) Juvenile hormone regulation of mRNA levels for a highly abundant hemolymph protein in larval *Trichoplusia ni*. *J. Biol. Chem.* **263**, 1089-1092.
- KATAOKA H., TOSCHI A., LI J.P., CARNEY R.L., SCHOOLEY D.A. i KRAMER S.J. (1989a) Identification of an allatotropin from adult *Manduca sexta*. *Science* **243**, 1481-1483.
- KATAOKA H., TROETSCHLER R.G., LI J.P., CARNEY R.L. i GOLDSWORTHY G.J. (1989b) Isolation and characterization of a diuretic hormone from the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 2976-2980.
- KATZUNG B.G. (1992) Signaling mechanisms and drug action. W: *Pharmacology*. Red. Katzung B.G., Appleton&Lange, Norwalk, Connecticut, str. 17-27.
- KEELEY L.L., SOWA S.M., HAYES T.K. i BRADFIELD J.Y. (1988) Neuroendocrine and juvenile hormone effects on fat body protein synthesis during the reproductive cycle in female *Blaberus discoidalis* cockroaches. *Gen. Comp. Endocrinol.* **72**, 364-373.

- KIKUKAWA S., TOBE S.S., SOLOWIEJ S., RANKIN S.M. i STAY B. (1987) Calcium as a regulator of juvenile hormone biosynthesis and release in the cockroach *Diploptera punctata*. *Insect Biochem.* **17**, 179-187.
- KING D.S. (1983) Chemistry and metabolism of the juvenile hormones. W: *Endocrinology of Insects*. Red. Downer R.G.H. i Laufer H., Alan R. Liss, Inc., New York, str. 57-64.
- KING L.E. i TOBE S.S. (1988) The identification of an enantioselective JH III binding protein from the haemolymph of the cockroach, *Diploptera punctata*. *Insect Biochem.* **18**, 793-805.
- KIRK M.D. i SCHELLER R.H. (1986) Egg-laying hormone of *Aplysia* induces a voltage-dependent slow inward current carried by Na^+ in an identified motoneuron. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 3017-3021.
- KLEMM N. (1972) Monoamine- containing nervous fibres in foregut and salivary gland of the desert locust *Schistocerca gregaria* Forskal. *Comp. Biochem. Physiol.* **43A**, 207-211.
- KOCHMAN M. i WIECZOREK E. (1991) Molecular mechanism of the juvenile hormone action. *Acta Biochim. Polon.* **38**, 393-405.
- KOELLE M.R., TALBOT W.S., SEGRAVES W.A., BENDER M.T., CHERBAS P. i HOGNESS D.S. (1991) The *Drosophila* EcR gene encodes an ecdysone receptor, a new member of the steroid receptor superfamily. *Cell* **67**, 59-77.
- KOEPPE J.K., KOVALICK G.A. i PRESTWICH G.D. (1984a) A specific photoaffinity label for hemolymph and ovarian juvenile hormone-binding proteins in *Leucophaea maderae*. *J. Biol. Chem.* **259**, 3219-3223.
- KOEPPE J.K., PRESTWICH G.D., BROWN J.J., GOODMAN W.G. KOVALICK G.E., BRIERS T., PAK M.D. i GILBERT L.I. (1984b) Photoaffinity labeling of the hemolymph juvenile hormone binding protein of *Manduca sexta*. *Biochemistry* **23**, 6674-6679.
- KOEPPE J.K., RAYNE R.C. SHEARIN M.D., CARVER D.J., WHITSEL E.A. i VOGIER R.C. (1988) Synthesis and secretion of a precursor hemolymph juvenile hormone-binding protein in the adult female cockroach *Leucophaea maderae*. *Insect Biochem.* **18**, 661-666.
- KONO T., NAGASAWA H., ISOGAI A., FUGO H. i SUZUKI A. (1991) Isolation and complete amino acid sequences of eclosion hormones of the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochem.* **21**, 185-195.
- KONOPIŃSKA D., ROSIŃSKI G. i SOBÓTKA W. (1992) Insect peptide hormones, an overview of the present literature. *Int. J. Peptide Res.* **39**, 1-11.
- KOOLMAN J. (1990) Ecdysteroids. *Zool. Sci.* **7**, 563-580.

- KOOPMANSCHAP A.B. i DE KORT C.A.D. (1988) Isolation and characterization of a high molecular weight JH-III transport protein in the hemolymph of *Locusta migratoria*. *Archs Insect Biochem. Physiol.* **7**, 105-118.
- KOVALICK G.E. i KOEPPE J.K. (1983) Assay and identification of juvenile hormone binding proteins in *Leucophaea maderae*. *Molec. Cell. Biol.* **31**, 271-286.
- KRAMER K.J. i CHILDS C.N. (1977) Interaction of juvenile hormone with carrier proteins and hydrolases from insect haemolymph. *Insect Biochem.* **7**, 397-403.
- KRAMER K.J., SANBURG L.L., KEZDY F.J. i LAW J.H. (1974) The juvenile hormone binding protein in the hemolymph of *Manduca sexta*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **71**, 493-497.
- KRAMER K.J., DUNN P.E., PETERSON R.C. i LAW J.H. (1976a) Interaction of juvenile hormone with binding proteins in insect hemolymph. W: *The Juvenile Hormones*. Red. Gilbert L.I., Plenum Press, New York, str. 327-341.
- KRAMER K.J., DUNN P.E., PETERSON R.C., SEBALLOS H.L., SANBURG L.L. i LAW J.H. (1976b) Purification and characterization of the carrier protein for juvenile hormone from the hemolymph of the tobacco hornworm *Manduca sexta* Johannson (*Lepidoptera: Sphingidae*). *J. Biol. Chem.* **251**, 4979-4985.
- KRAMER K.J., TAGER H.S. i CHILDS C.N. (1980) Insulin-like and glucagon-like peptides in insect hemolymph. *Insect Biochem.* **10**, 179-182.
- KRAMER K.J., MORGAN T.D., HOPKINS T.L., CHRISTEN A.M. i SCHAEFER J. (1989) Solid state ^{13}C -NMR and diphenol analyses of sclerotized cuticles from stored product *Coleoptera*. *Insect Biochem.* **19**, 753-757.
- KRAMER S.J., TOSCHI A., MILLER CH.A., KATAOKA H., QUISTAD G.B. LI J.P., CARNEY R.L. i SCHOOLEY D.A. (1991) Identification of an allatostatin from the tobacco hornworm *Manduca sexta*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 9458-9462.
- KRUEGER R.R., KRAMER K.J., HOPKINS T.L. i SPEIRS R.D. (1990) N- β -alanyldopamine and N-acetyldopamine occurrence and synthesis in the central nervous system of *Manduca sexta* (L.). *Insect Biochem.* **20**, 605-610.
- KUHN R.W. (1988) Corticosteroid-binding globulin interactions with target cells and plasma membranes. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **538**, 146-157.
- KUMARAN A. (1990) Modes of action of juvenile hormones at cellular and molecular levels. W: *Morphogenetic Hormones of Arthropods*. Red. Gupta A.P., Rutgers Univerity Press, New Brunswick and London, str. 182-227.
- KUSCH V.T. (1975) Der quantitative Gehalt von 5-hydroxytryptamine und dopamin im nervensystem von *Periplaneta americana* (L.). *Zool. Jb. Physiol.* **79**, 513-517.

- LAEMMLI U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- LAGUEUX M., LWOFF L., MEISTER M., GOLTZENE F. i HOFFMANN J.A (1990) cDNAs from neurosecretory cells of brains of *Locusta migratoria* (Insecta, Orthoptera) encoding a novel member of the superfamily of insulins. *Eur. J. Biochem.* **187**, 249-254.
- LAGUEUX M., KROMER E. i GIRARDIE J. (1992) Cloning of a *Locusta* cDNA encoding neuroparsin A. *Insect Biochem. Molec. Biol.* **22**, 511-516.
- LANGE A.B. (1984) The transfer of prostaglandin synthesising activity during mating in *Locusta migratoria*. *Insect Biochem.* **14**, 551-556.
- LEFEVERE K.S. (1989) Endocrine control of diapause termination in the adult female colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*. *J. Insect Physiol.* **35**, 197-203.
- LEFKOWITZ R.J. i CARON M.G. (1988) Adrenergic receptors. Models for the study of the receptors coupled to guanine nucleotide regulatory protein. *J. Biol. Chem.* **263**, 4993-4996.
- LENZ C.J., DILLWITH J.W. i CHIPPENDALE G.M. (1986) Comparison of some properties of the high affinity juvenile hormone binding protein from the larval hemolymph of pyralid moths. *Archs Insect Biochem. Physiol.* **3**, 61-73.
- LERRO K.A. i PRESTWICH G.D. (1990) Cloning and sequencing of a cDNA for the hemolymph juvenile hormone binding protein of larval *Manduca sexta*. *J. Biol. Chem.* **265**, 19800-19806.
- LESSMAN CH.A. i HERMAN W.S. (1983) Seasonal variation in hemolymph juvenile hormone of adult monarchs (*Danaus p. plexippus*: Lepidoptera). *Can. J. Zool.* **61**, 88-94.
- LOHER W., GAHJAN I., KUBO I., STANLEY-SAMUELSON D.W. i TOBE S.S. (1981) Prostaglandins: their role in egg-laying in the cricket, *Teleogryllus commodus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**, 7835-7838.
- MACFARLANE R.G., MIDGLEY J.M., WATSON D.G. i EVANS P.D. (1980) Biogenic amines in the insect nervous system. *Adv. Insect Physiol.* **5**, 317-473.
- MACFARLANE R.G., MIDGLEY J.M., WATSON D.G. i EVANS P.D. (1990) The analysis of biogenic amines in the thoracic nervous system of the locust, *Schistocerca gregaria*, by gas-chromatography negative ion chemical ionization mass spectrometry (GC-NICIMS). *Insect Biochem.* **20**, 305-311.
- MADDRELL S.H.P., PILCHER D.E.M. i GARDINER B.O.C. (1969) Stimulatory effect of 5-hydroxytryptamine (serotonin) on secretion by Malpighian tubules of insects. *Nature* **222**, 784-785.

- MARAINI G., OTTONELLO S., GOZZOLI F. i MERLI A. (1977) Identification of a membrane protein binding the retinol in retinal pigment epithelium. *Nature* **265**, 68-69.
- MARTINEZ-RAMIREZ A.C., FERRE J. i SIVA F.J. (1992) Catecholamines in *Drosophila melanogaster*: DOPA and dopamine accumulation during development. *Insect Biochem. Molec. Biol.* **22**, 491-494.
- MATSUMOTO S., ISOGAI A., SUZUKI A., OGURA N. i SONOBE H. (1981) Purification and properties of the melanization and reddish colouration hormone (MRCH) in the armyworm *Leucania separata* (Lepidoptera). *Insect Biochem.* **11**, 725-733.
- MATSUMOTO S., ISOGAI A. i SUZUKI A. (1985) N-terminal amino acid sequence of an insect neurohormone, melanization and reddish coloration hormone (MRCH): heterogeneity and sequence homology with human insulin-like growth factor II *FEBS Lett.* **189**, 115-118.
- MAYER R.T. i BURKE M.D. (1976) Albumin and cytochrome P₄₅₀ binding characteristics of juvenile hormone and its analogs. *Pest. Biochem. Physiol.* **6**, 377-385.
- McCLURE J.B. i STEELE J.E. (1981) The role of extracellular calcium in hormonal activation of glycogen phosphorylase in cockroach fat body. *Insect Biochem.* **11**, 605-613.
- MEMMEL N.A. i KUMARAN A.K. (1988) Role of ecdysteroids and juvenile hormone in regulation of larval haemolymph protein gene expression in *Galleria mellonella*: *J. Insect Physiol.* **34**, 585-591.
- METZLER M., DAHM H., MEYER D. i ROLLER H. (1971) On the biosynthesis of juvenile hormone in the adult cecropia moth. *Z. Naturforsch.* **26B**, 1270-1276.
- MEYER W.R. i LANZREIN B. (1989) Degradation of juvenile hormone and methylation of juvenile hormone acid by *corpora cardiaca-corpora allata* of the cockroach, *Nauphoeta cinerea*: I. biochemical aspects. *Archs Insect Biochem. Physiol.* **10**, 303-316.
- MOLLEYRES L.P. i RANDO R.R. (1988) Structural studies on the diglyceride-mediated activation of protein kinase C. *J. Biol. Chem.* **263**, 14832-14838.
- MORDUE W. i STONE J.V. (1979) Adipokinetic hormones. W: *Hormones and Evolution*. Vol. 1. Ed. Barrington E.J.W., Academic press, New York, San Francisco, London, str. 228-233.
- MORGAN P.J. i MORDUE W. (1984) 5-Hydroxytryptamine stimulates fluid secretion in locust Malpighian tubules independently of cAMP. *Comp. Biochem. Physiol.* **79C**, 305-310.

- MORGAN P.J. i MORDUE W. (1985) Cyclic AMP and Locust diuretic hormone action: hormone induced changes in cAMP levels offers a novel method for detecting biological activity of uncharacterized peptide. *Insect Biochem.* **15**, 247-257.
- MORRISSEY J.H. (1981) Silver stain for proteins in polyacrylamide gels: a modified procedure with enhanced uniform sensitivity. *Anal. Biochem.* **117**, 307-310.
- MOUDGIL V.K. (1990) Phosphorylation of steroid hormone receptors. *Biochim. Biophys. Acta* **1055**, 243-258.
- MUSZYŃSKA-PYTEL M. (1987) Allatotrophic activity of the median neurosecretory cells of *Galleria mellonella* (Lepidoptera) larval brain. *Experientia* **43**, 908-909.
- MUSZYŃSKA-PYTEL M. i CYMBOROWSKI B. (1978a) The role of serotonin in regulation of the circadian rhythms of locomotor activity in the cricket (*Acheta domesticus* (L.)) II. Distribution of serotonin and variation in different brain structure. *Comp. Biochem. Physiol.* **59C**, 17-20.
- MUSZYŃSKA-PYTEL M. i CYMBOROWSKI B. (1978b) The role of serotonin in regulation of the circadian rhythms of locomotor activity in the cricket (*Acheta domesticus* (L.)) I. Circadian variations in serotonin concentration in the brain and hemolymph. *Comp. Biochem. Physiol.* **59C**, 13-15.
- NAGASAWA H., KATAOKA H., ISOGAI A., TAMURA S., SUZUKI A., ISHIZAKI H., MIZOGUCHI A., FUJIWARA Y. i SUZUKI A. (1984) Amino-terminal amino acid sequence of the silkworm prothoracicotropic hormone: homology with insulin. *Science* **226**, 1344-1345.
- NAKHLA A.M., KHAN M.S. i ROSNER W. (1988) Induction of adenylate cyclase in a mammary carcinoma cell line by human corticosteroid-binding globulin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **153**, 1012-1018.
- NEER E.J. i CLAPHAM D.E. (1988) Roles of G protein subunits in transmembrane signalling. *Nature* **333**, 129-134.
- NISSLEY S.P., HASKELL J.F., SASAKI N., DE VROEDE M.A. i RECHLER M.M. (1985) Insulin-like growth factor receptors. *J. Cell. Sci. Suppl.* **3**, 39-51.
- NOTMAN H.J. i DOWNER R.G.H. (1987) Binding of [³H]pifluthixol, a dopamine antagonist, in the brain of the american cockroach, *Periplaneta americana*. *Insect Biochem.* **17**, 587-590.
- NOWOCK J., GOODMAN W., BOLLENBACHER W.E. i GILBERT L.I. (1975) Synthesis of juvenile hormone binding proteins by the fat body of *Manduca sexta*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **27**, 230-239.

- O'BRIEN M.A., GRANGER N.A., AGUI N., GILBERT L.I. i BOLLENBACHER W.E. (1986) Prothoracicotropic hormone in the developing brain of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*: relative amounts of two molecular forms. *J. Insect Physiol.* **32**, 719-725.
- OGG C.L., HOWARD R.W. i STANLEY-SAMUELSON D.W. (1991) Fatty acid composition and incorporation of arachidonic acid into phospholipids of hemocytes from the tobacco hornworm *Manduca sexta*. *Insect Biochem.* **21**, 809-814.
- OGG C.L., MEINKE L.J., HOWARD R.W. i STANLEY-SAMUELSON D.W. (1993) Phospholipid and triacylglycerol fatty acid compositions of five species of *Diabrotica* (Insecta: Coleoptera: Chrysomelidae). *Comp. Biochem. Physiol.* **105B**, 69-77.
- ORR C.L. i HOLLINGWORTH R.M. (1990) Agonist-induced desensitization of an octopamine receptor. *Insect Biochem.* **20**, 239-244.
- ORR G.L., GOLE J.W.D., NOTMAN H.J. i DOWNER R.G.H. (1988) The regulation of basal and dopamine-sensitive adenylate cyclase by salts of monovalent cations in brain of the american cockroach, *Periplaneta americana*. *Insect Biochem.* **18**, 79-86.
- ORR G.L., ORR N. i HOLLINGWORTH R.M. (1990) Localization and pharmacological characterization of nicotinic-cholinergic binding sites in cockroach brain using α - and neuronal bungarotoxin. *Insect Biochem.* **20**, 557-566.
- ORR N., ORR G.L. i HOLLINGWORTH R.T. (1992) The Sf9 cell line as a model for studying insect octopamine-receptors. *Insect Biochem. Molec. Biol.* **22**, 591-597.
- OSIR E.O. i RIDDIFORD L.M. (1988) Nuclear binding sites for juvenile hormone and its analogs in the epidermis of the tobacco hornworm. *J. Biol. Chem.* **263**, 13812-13818.
- OSIR E.O., UNNITHAN G.C. i PRESTWICH G.D. (1991) Juvenile hormone binding to a 500-K diapause-associated protein of the stem-borrrer, *Busseola fusca*. *Comp. Biochem. Physiol.* **99B**, 165-169.
- OSTLUND E. (1954) The distribution of catecholamines in lower animals and their effect on the heart. *Acta Physiol. Scand.* (Supl. 112) **31**, 1-67.
- OŻYHAR A. i KOCHMAN M. (1986) Generation of multiple molecular forms of juvenile hormone binding protein from *Galleria mellonella* hemolymph. *Experientia* **42**, 1276-1278.
- OŻYHAR A. i KOCHMAN M. (1987) Juvenile-hormone-binding protein from the hemolymph of *Galleria mellonella* (L). Isolation and characterization. *Eur. J. Biochem.* **162**, 675-682.

- OŻYHAR A., WIŚNIEWSKI R.J. SEHNAL F. i KOCHMAN M. (1983) Age dependent changes in the binding and hydrolysis of juvenile hormone in the haemolymph of last instar larvae of *Galleria mellonella*. *Insect Biochem.* **13**, 435-441.
- OŻYHAR A., STRANGMANN-DIEKMANN M., KILTZ H.H. i PONGS O. (1991) Characterization of a specific ecdysteroid receptor-DNA complex reveals common properties for invertebrate and vertebrate hormone-receptor/DNA interactions. *Eur. J. Biochem.* **200**, 329-335.
- OWEN M.D. i BOUQUILLON A.I. (1992) The synthesis of L-dihydroxyphenylalanine (L-dopa) in the cerebral ganglia of the cockroach, *Periplaneta americana* L. *Insect Biochem. Molec. Biol.* **22**, 193-198.
- PALCZEWSKI K., HARGRAVE P.A., McDOWELL J.H. i INGEBRITSEN TH.S. (1989) The catalytic subunit of phosphatase 2A dephosphorylates phosphopsin. *Biochemistry* **28**, 415-419.
- PALLI S.R., OSIR E.O., ENG W.S., BOEHM M.F. EDWARDS M., KULCSAR P., UJVARY I., HIRUMA K. i PRESTWICH G.D. (1990) Juvenile hormone receptors in larval insect epidermis: identification by photoaffinity labeling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 796-800.
- PALLI S.R., RIDDIFORD L.M. i HIRUMA K. (1991) Juvenile hormone and "retinoic acid" receptors in *Manduca* epidermis. *Insect Biochem.* **21**, 7-15.
- PAULSON C.R. i STAY B. (1985) Inhibition of the *corpora allata* of last-instar male larvae of the cockroach *Diploptera punctata*. *J. Insect Physiol.* **31**, 625-630.
- PEMBERTON P.A., STEIN P.E., PEPYS M.B., POTTER J.M. i CARRELL R.W. (1988) Hormone binding globulins undergo serpin conformational change in inflammation. *Nature* **336**, 257-258.
- PENHOET E.E., KOCHMAN M. i RUTTER W.J. (1969) Isolation of fructose diphosphate aldolases A, B and C. *Biochemistry* **8**, 4391-4395.
- PETERSON R.C., REICH M.F., DUNN P.E., LAW J.H. i KATZENELLENBOGEN J.A. (1977) Binding specificity of the juvenile hormone carrier protein from the hemolymph of the tobacco hornworm *Manduca sexta* Johannson (*Lepidoptera: Sphingidae*). *Biochemistry* **16**, 2305-2311.
- PETKOVICH M. (1992) Regulation of gene expression by vitamin A: the role of nuclear retinoid acid receptors. *Annu. Rev. Nutr.* **12**, 443-471.
- PETRUZZELLI L., HERRERA R., GARCIA-ARENAS R., FERNANDEZ R., BIRNBAUM M.J. i ROSEN O.M. (1986) Isolation of a *Drosophila* genomic sequence homologous to the kinase domain of the human insulin receptor and detection of the phosphorylated *Drosophila* receptor with an anti-peptide antibody. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 4710-4714.

- PIKE J.W. (1991) Vitamin D₃ receptors: structure and function in transcription. *Annu. Rev. Nutr.* **11**, 189-216.
- PIMPLEY R.W. (1985) Cyclic AMP and calcium mediate the regulation of fat cell activity by octopamine and peptide hormones in *Glossina morsitans*. *Insect Biochem.* **15**, 293-298.
- PLANTEVIN G., DE REGGI M. i NARDON CH. (1984) Changes in ecdysteroid and juvenile hormone titers in the hemolymph of *Galleria mellonella* larvae and pupae. *Gen. Comp. Endocrinol.* **56**, 218-230.
- PORTO C.S., GUNSALUS G.L., BARDIN C.W., PHILLIPS D.M. i MUSTO N.A. (1991) Receptor-mediated endocytosis of an extracellular steroid-binding protein (TeBG) in MCF-7 human breast cancer cells. *Endocrinology* **129**, 436-445.
- PORTO C.S., MUSTO N.A., BARDIN C.W. i GUNSALUS G.L. (1992) Binding of an extracellular steroid-binding globulin to membranes and soluble receptors from human breast cancer cells (MCF-7 cells). *Endocrinology* **130**, 2931-2936.
- PRATT W.B. (1990) Interaction of hsp90 with steroid receptors: organizing some diverse observations and presenting the newest concepts. *Molec. Cell. Endocrinol.* **74**, 69-76.
- PRATT G.E., TOBE S.S. i WEAVER R.J. (1975) Relative oxygenase activities in juvenile hormone biosynthesis of *corpora allata* of an African locust (*Schistocerca gregaria*) and American cockroach (*Periplaneta americana*). *Experientia* **31**, 120-122.
- PRATT G.E., FARNSWORTH D.E., SIEGEL N.R., FOK K.F. i FEYEREISEN R. (1989) Identification of an allatostatin from adult *Diploptera punctata*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **163**, 1243-1247.
- PRATT G.E., FARNSWORTH D.E., FOK K.F., SIEGEL N.R., McCORMACK A.L., SHABANOWITZ J., HUNT D.F. i FEYEREISEN R. (1991) Identity of a second type of allatostatin from cockroach brains: an octadecapeptide amide with a tyrosine-rich address sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 2412-2416.
- PRESTWICH G.D. i ATKINSON J.K. (1990) Rapid purification and N-terminal amino acid sequence of a photoaffinity-labeled juvenile hormone binding protein from an arctiid moth larva, *Platyrepia virginalis*. *Insect Biochem.* **20**, 801-807.
- PRESTWICH G.D., ROBLES S., WAWRZEŃCZYK CZ. i BÜHLER A. (1987) Hemolymph juvenile hormone binding proteins of lepidopterous larvae. Enantiomeric selectivity and photoaffinity labeling. *Insect Biochem.* **17**, 551-560.

- PRESTWICH G.D., ENG W., ROBLES S., VOGT R.G., WIŚNIEWSKI J.R. i WAWRZENCZYK C. (1988) Synthesis and binding affinity of an iodinated juvenile hormone. *J. Biol. Chem.* **263**, 1398-1404.
- QIU T.H., COMBEST W.L. i GILBERT L.I. (1990a) Characterization of a calcium and diacylglycerol-activated and phospholipid-dependent protein kinase in the pupal brain of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*: the cytosolic enzyme. *Insect Biochem.* **20**, 405-411.
- QIU T.H., COMBEST W.L. i GILBERT L.I. (1990b) Characterization of a calcium and diacylglycerol-activated and phospholipid-dependent protein kinase in the pupal brain of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*: the particulate associated enzyme. *Insect Biochem.* **20**, 413-420.
- RAGAB A., BITSCH C., THOMAS J.M.F., BITSCH J. i CHAP H. (1987) Lipoxygenase conversion of arachidonic acid in males and inseminated females of the firebrat, *Thermobia domestica* (Thysanura). *Insect Biochem.* **17**, 863-870.
- RAGAB A., DURAND J., BITSCH C., CHAP H. i RIGAUD M. (1991) The lipoxygenase pathway of arachidonic acid metabolism in reproductive tissues of the firebrat, *Thermobia domestica* (Thysanura). *Insect Biochem.* **21**, 321-326.
- RANGARAJAN P.N., UMESONO K. i EVANS R.M. (1992) Modulation of glucocorticoid receptor function by protein kinase A. *Molec. Endocrinol.* **6**, 1451-1457.
- RASK L. i PETERSON P.A. (1976) *In vitro* uptake of vitamin A from the retinol-binding plasma protein to mucosal epithelial cells from the monkey's small intestine. *J. Biol. Chem.* **251**, 6360-6366.
- RAY J.W. (1965) The free amino acid pool of the cockroach (*Periplaneta americana*) central nervous system. W: *The Physiology of the Insect Central Nervous System*. Red. Treherne J.E. i Beament J.W.L., Academic Press, New York, str. 31-38.
- RAYNE R.C. i O'SHEA M. (1992) Inactivation of neuropeptide hormones (AKH I and AKH II) studied *in vivo* and *in vitro*. *Insect Biochem. Molec. Biol.* **22**, 25-34.
- REIBSTEIN D., LAW J.H., BOWLUS S.B. i KATZENELLENBOGEN J.A. (1976) Enzymatic synthesis of juvenile hormone in *Manduca sexta*. W: *The Juvenile Hormones*. Red. Gilbert L.I., New York, Plenum Press, str. 131-146.
- REUTER H. i SIGEL E. (1991) Ionic channels: modulation by G proteins and by phosphorylation. *Curr. Opinion Neurol.* **1**, 27-31.
- REXIN M., BUSCH W., SEGELITZ B. i GEHRING U. (1992) Structure of the glucocorticoid receptor in intact cells in the absence of hormone. *J. Biol. Chem.* **267**, 9619-9621.

- REYNOLDS S.E. (1983) Bursicon. W: *Endocrinology of Insects*. Red. Downer R.G.H. i Laufer H., Alan R. Liss, Inc., New York, str. 235-248.
- REYNOLDS S.E., TAGHERT P.H. i TRUMAN J.W. (1979) Eclosion hormone and bursicon titres and the onset of hormonal responsiveness during the last day of adult development in *Manduca sexta*. *J. Exp. Biol.* **78**, 77-86.
- RICHARD D.S., APPLEBAUM S.W., SLITER T.J., BAKER F.C., SCHOOLEY D.A., REUTER C.C., HENRICH V.C. i GILBERT L.I. (1989) Juvenile hormone bisepoxide biosynthesis *in vitro* by the ring gland of *Drosophila melanogaster*: a putative juvenile hormone in the higher *Diptera*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 1421-1425.
- RIDDIFORD L.M. (1976) Hormonal control of insect epidermal cell commitment *in vitro*. *Nature* **259**, 115-117.
- RIDDIFORD L.M. (1980) Interaction of ecdysteroid and juvenile hormone in the regulation of larval growth and metamorphosis of the tobacco hornworm. W: *Progress in Ecdysone Research*. Red. Hoffmann J.A., Amsterdam, Elsevier/North-Holland, Biomedical Press, str. 409-430.
- RIDDIFORD L.M. (1986) Hormonal regulation of sequential larval cuticular gene expression. *Archs Insect Biochem. Physiol.* **2**, 75-86.
- RODDY C.W., McSWAIN J.L., KOCAN K.M., ESSENBERG R.C. i SAUER J.R. (1990) The role of inositol 1,4,5-trisphosphate in mobilizing calcium from intracellular stores in the salivary glands of *Amblyomma americanum* (L.). *Insect Biochem.* **20**, 83-89.
- ROE R.M. i VENEKATESH K. (1990) Metabolism of juvenile hormones: degradation and titer regulation. W: *Morphogenetic Hormones of Arthropods*. Red. Gupta A.P., Rutgers University Press, New Brunswick and London, str. 126-179.
- ROTONDO D., VAUGHAN P.F.T. i DONNELLAN J.F. (1987) Octopamine and cyclic AMP stimulate protein phosphorylation in the central nervous system of *Schistocerca gregaria*. *Insect Biochem.* **17**, 283-290.
- ROUNTREE D.B., COMBEST W.L. i GILBERT L.I. (1992) Prothoracicotropic hormone regulates the phosphorylation of a specific protein in the prothoracic glands of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Insect Biochem. Molec. Biol.* **22**, 353-362.
- RUDNICKA M. i KOCHMAN M. (1984) Purification of the juvenile hormone esterase from the hemolymph of the wax moth *Galleria mellonella* (Lepidoptera). *Insect Biochem.* **14**, 189-198.
- SAKURAI S. i IMOKAWA H. (1988) Developmental arrest induced by juvenile hormone in larvae of *Bombyx mori*. *Archs Insect Biochem. Physiol.* **8**, 219-228.

- SAKURAI S. i WILLIAMS C.M. (1989) Short-loop negative and positive feedback on ecdysone secretion by prothoracic gland in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **75**, 204-216.
- SAKURAI S., OKUDA M. i OHTAKI T. (1989) Juvenile hormone inhibits ecdysone secretion and responsiveness to prothoracicotrophic hormone in prothoracic glands of *Bombyx mori*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **75**, 222-230.
- SANBURG L.L., KRAMER K.J., KEZDY F.J., LAW J.H. i OBERLANDER H. (1975) Role of juvenile hormone esterases and carrier proteins in insect development. *Nature* **253**, 266-267.
- SASAKI N., REES-JONES R.W., ZICK Y., NISSLEY S.P. i RECHLER M.M. (1985) Characterization of insulin-like growth factor I-stimulated tyrosine kinase activity associated with the β -subunit of type I insulin-like growth factors receptors of rat liver cells. *J. Biol. Chem.* **260**, 9793-9804.
- SCATCHARD G. (1949) The attraction of proteins for small molecules. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **51**, 660-672.
- SCHARRER B. (1987) *Annu. Rev. Entomol.* **32**, 1-16.
- SCHINDLER CH., SHUAI K., PREZIOSO V.R. i DARNELL J.E. Jr. (1992) Interferon-dependent tyrosine phosphorylation of a latent cytoplasmic transcription factor. *Science* **257**, 809-813.
- SCHOOLEY D.A., JUDY K.J., BERGOT B.J., HALL M.S. i SIDDAL J.B. (1973) Biosynthesis of the juvenile hormones of *Manduca sexta*: labeling pattern from mevalonate, propionate, and acetate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **70**, 2921-2925.
- SCHOOLEY D.A., JUDY K.J., BERGOT B.J., HALL M.S. i JENNINGS R.C. (1976) Determination of the physiological levels of juvenile hormones in several insects and biosynthesis of the carbon skeletons of the juvenile hormones. W: *The Juvenile Hormones*. Red. Gilbert L.I., New York, Plenum Press, str. 101-117.
- SCHOOLEY D.A., BAKER F.C., TSAI L.W., MILLER C.A. i JAMIESON G.C. (1984) Juvenile hormones 0, I and II exist only in *Lepidoptera*. W: *Biosynthesis, Metabolism and Mode of Action of Invertebrate Hormones*. Red. Hoffmann J.A. Porchet M., Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 373-383.
- SCHÜRCHOLZ T., KEHNE J., GIESELMANN A. i NEUMANN E. (1992) Functional reconstitution of the nicotinic acetylcholine receptor by CHAPS dialysis depends on the concentrations of salt, lipid, and protein. *Biochemistry* **31**, 5067-5077.
- SCHWABE J.W.R., NEUHAUS D. i RHODES D. (1990) Solution structure of the DNA-binding domain of the oestrogen receptor. *Nature* **348**, 458-461.

- SCHWORER CH.M., COLBRAN R.J. i SODERLING TH.R. (1986) Reversible generation of a Ca^{2+} -independent form of Ca^{2+} (calmodulin)-dependent protein kinase II by an autophosphorylation mechanism. *J. Biol. Chem.* **261**, 8581-8584.
- SEHNAL F. (1966) Kritisches Studium der Bionomik und Biometrik der in verschiedenen lebensbedingungen gezüchteten Wachsmotte *Galleria mellonella* (L) *Lepidoptera*. *Z. Wiss. Zool.* **174**, 53-82.
- SEIFERT R., SCHÄCHTELE CH. i SCHULTZ G. (1987) Activation of protein kinase C by *cis*- and *trans*-octadecadienoic acids in intact human platelets and its potentiation by diacylglycerol. *Biochem Biophys. Res. Commun.* **149**, 762-768.
- SHARE M.R. i ROE R.M. (1988) A partition assay for the simultaneous determination of insect juvenile hormone esterase and epoxide hydrolase activity. *Anal. Biochem.* **169**, 81-88.
- SHEMSHEDINI L. i WILSON T.G. (1988) A high affinity, high molecular weight juvenile hormone binding protein in the hemolymph of *Drosophila melanogaster*. *Insect Biochem.* **18**, 681-689.
- SHEMSHEDINI L., LANOUE M i WILSON T.G. (1990) Evidence for a juvenile hormone receptor involved in protein synthesis in *Drosophila melanogaster*. *J. Biol. Chem.* **265**, 1913-1918.
- SIEGERT K.J., MORGAN P.J. i MORDUE W. (1985) Primary structures of Locust adipokinetic hormones II. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **365**, 723-727.
- SLADE M. i ZIBITT C.H. (1972) Metabolism of cecropia juvenile hormone in insects and in mammals. W: *Insect Juvenile Hormones: Chemistry and Action*. Red. Menn J.J. i Beroza M., New Academic, str. 155-176.
- SLOLEY B.D. i DOWNER R.G.H. (1987) Dopamine, N-acetyldopamine and dopamine-3-O-sulphate in tissues of newly ecdysed and fully tanned adult cockroaches (*Periplaneta americana*). *Insect Biochem.* **17**, 591-596.
- SMALLWOOD J.I., GÜGI B. i RASMUSSEN H. (1988) Regulation of erythrocyte Ca^{2+} pump activity by protein kinase C. *J. Biol. Chem.* **263**, 2195-2202.
- SPARAGANA S.P., BHASKARAN G. i BARRERA P. (1985) Juvenile hormone acid methyltransferase activity in imaginal discs of *Manduca sexta* prepupae. *Archs Insect Biochem. Physiol.* **2**, 191-202.
- SPINDLER K-D. i SPINDLER-BARTH M. (1989) Uptake of ecdysteroids W: *Ecdysone*. Red. Koolman J., Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, Thieme Medical Publishers, Inc., New York, str. 245-249.
- SPRING J.H., MORGAN A.M. i HAZELTON S.R. (1988) A novel target for antidiuretic hormone in insects. *Science* **241**, 1096-1098.

- STANLEY-SAMUELSON D.W., LOHER W. i BLOMQUIST G.J. (1986) Biosynthesis of polyunsaturated fatty acids by the Australian field cricket, *Teleogryllus commodus*. *Insect Biochem.* **16**, 387-393.
- STANLEY-SAMUELSON D.W., JENSEN E., NICKERSON K.W., TIEBEL K., OGG C.L. i HOWARD R.W. (1991) Insect immune response to bacterial infection is mediated by eicosanoids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 1064-1068.
- STAROS J.V., COHEN S. i RUSSO M.W. (1985) Epidermal growth factor receptor: characterization of its protein kinase activity. W: *Molecular mechanisms of transmembrane signalling*. Red. Cohen S. i Houslay, Elsevier Science Publishers B.V., str.253-277.
- STAPIEN G., RENAUD M., SAVRE I i DURAND R. (1988) Juvenile hormone increases mitochondrial activities in *Drosophila* cells. *Insect Biochem.* **18**, 313-321.
- STONE A.B. (1974) A simplified method for preparing sucrose gradients. *Biochem. J.* **137**, 117-118.
- STONE J.V., MORDUE W., BARTLEY K.E. i MORRIS H.R. (1976) Structure of locust adipokinetic hormone that regulates lipid utilisation during flight. *Nature* **263**, 207-211.
- STREL'CHYONOK O.A., AVVAKUMOV G.V. i SURVILO L.I. (1984) A recognition system for sex-hormone-binding protein-estradiol complex in human decidual endometrium plasma membranes. *Biochim. Biophys. Acta* **802**, 459-466.
- STROBEL L.M., KANOST M.R., ZIEGLER R. i WELLS M.A. (1990) Adipokinetic hormone causes formation of a low density lipophorin in the house cricket *Acheta domesticus*. *Insect Biochem.* **20**, 859-863.
- SURHOLT B., SCHULZ T.K.F., GOLDBERG J., VAN DER HORST D.J. i BEENAKKERS A.M.TH. (1988) Lipophorin conversions during flight in the death's head hawkmoth *Acherontia atropos*. *Insect Biochem.* **18**, 117-126.
- SZIBBO C.M. i TOBE S.S. (1983) Nervous and humoral inhibition of C16 juvenile hormone synthesis in last instar females of the viviparous cockroach *Diplotera punctata*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **49**, 437-445.
- TAGER H.S. i KRAMER K.J. (1980) Insect glucagon-like peptides: evidence for a high molecular weight form in midgut from *Manduca sexta* (L.). *Insect Biochem.* **10**, 617-619.
- TANO Y., FRANCOIS J. i NOIROT-TIMOTHEE C. (1988) Effects of a juvenile hormone analogue on the metamorphic changes of the foregut and midgut in *Tenebrio molitor* L. (*Insecta, Coleoptera*). *Can. J. Zool.* **66**, 421-426.

- TAYLOR S.S. (1989) cAMP-dependent protein kinase. Model for an enzyme family. *J. Biol. Chem.* **264**, 8443-8446.
- TERZI G., TRUMAN J.W. i REYNOLDS S.E. (1988) Purification and characterization of eclosion hormone from the moth, *Manduca sexta*. *Insect Biochem.* **18**, 701-707.
- TOBE S.S. (1990) Role of intracellular messengers in the regulation of juvenile hormone biosynthesis in the cockroach, *Diploptera punctata*. W: *Progress in Comparative Endocrinology*. Wiley-Liss, Inc., str. 174-179.
- TOBE S.S. i FEYEREISEN R. (1983) Juvenile hormone biosynthesis: regulation and assay. W: *Endocrinology of Insects*. Red. Downer R.G.H. i Laufer H., Alan R. Liss, Inc., New York, str. 161-168.
- TOBE S.S. i STAY B. (1979) Modulation of juvenile hormone synthesis by an analogue in the cockroach. *Nature* **281**, 481-482.
- TOBE S.S. i STAY B. (1985) Structure and regulation of the corpus allatum. *Adv. Insect Physiol.* **18**, 305-432.
- TOUHARA K. i PRESTWICH G.D. (1992) Binding site mapping of a photoaffinity-labeled juvenile hormone binding protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **182**, 466-473.
- TOUHARA K., LERRO K.A., BONNING B.C., HAMMOCK B.D. i PRESTWICH G.D. (1993) Ligand binding by a recombinant insect juvenile hormone binding protein. *Biochemistry* **32**, 2068-2075.
- TORA L., GRONEMEYER H., TURCOTT E.B., GLAUB M.P. i CHAMBON P. (1988) The N-terminal region of the chicken progesterone receptor specifies target gene activation. *Nature* **333**, 185-188.
- TURUNEN S. i CHIPPENDALE G.M. (1981) Binding of juvenile hormone, methoprene and hydroprene to haemolymph proteins of larvae of the southwestern corn borer, *Diatraea grandiosella*. *Insect Biochem.* **11**, 429-435.
- TOWBIN H., STAHELIN T. i GORDON J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 4350-4354.
- TROETSCHLER R.G. i KRAMER S.J. (1992) Mode of action studies on a *Manduca sexta* diuretic hormone. *Archs Insect Biochem. Physiol.* **20**, 35-47.
- TROWELL S.C. (1992) High affinity juvenile hormone carrier proteins in the haemolymph of insects. *Comp. Biochem. Physiol.* **103B**, 795-807.
- TRUMAN J.W. (1973) Physiology of insect ecdysis. III. Relationship between the hormonal control of eclosion and of tanning in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *J. Exp. Biol.* **58**, 821-829.

- TRUMAN J.W., MUMBY S.M. i WELCH S.K. (1980) Involvement of cyclic GMP in the release of stereotyped behaviour patterns in moths by a peptide hormone. *J. Exp. Biol.* **84**, 201-212.
- UENO K., OHSAWA F. i NATORI S. (1983) Identification and activation of storage protein receptor of *Sarcophaga peregrina* fat body by 20-hydroxyecdysone. *J. Biol. Chem.* **258**, 12210-12214.
- UNNI B.G., BHASKARAN G., DAHM K.H. i HAYES T.K. (1991) Stimulation of juvenile hormone biosynthesis by analogues of a *Manduca sexta* allatotropin: *in vitro* studies *Archs Insect Biochem. Physiol.* **17**, 129-142.
- USHERWOOD P.N.R. i MACHILI P. (1968) Pharmacological properties of excitatory neuromuscular synapses in the locust. *J. Exp. Biol.* **49**, 341-361.
- VAN BAELEN H., BECK M. i DE MOOR P. (1972) A cortisol-induced charge difference in desialylated human transcortin detected by isoelectric focusing. *J. Biol. Chem.* **247**, 2699-2703.
- VAN DER HORST D.J., VAN DORN J.M., DE KEIJZER A.N. i BEENAKKERS A.M.TH. (1981) Interconversions of diacylglycerol-transporting lipoproteins in the haemolymph of *Locusta migratoria*. *Insect Biochem.* **11**, 717-723.
- VAN DER HORST D.J., VAN DOORN J.M. i BEENAKKERS A.M.TH. (1984) Hormone-induced rearrangement of locust haemolymph lipoproteins. The involvement of glycoprotein C₂. *Insect Biochem.* **14**, 495-504.
- VAN MARREWIJK W.J.A., VAN DEN BROEK A. TH. M. i BEENAKKERS A.M.TH. (1980) Regulation of glycogenolysis in the locust fat body during flight. *Insect Biochem.* **10**, 675-679.
- VAN MARREWIJK W.J.A., VAN DER BROEK A.TH.M. i BEENAKKERS A.M.TH. (1991) Adipokinetic hormone is dependent on extracellular Ca²⁺ for its stimulatory action on the glycogenolytic pathway in locust fat body *in vitro*. *Insect Biochem.* **21**, 375-380.
- VON KNORRE D., GERSCH M. i KUSCH T. (1972) Zur Frage der Beeinflussung des "tanning"-Phänomens durch zyklisches 3',5'-AMP. *Zool. Jb. Physiol.* **Bd 76**, 434-440.
- WAKAYAMA E.J., DILLWITH J.W. i BLOMQUIST G.J. (1986) Occurrence and metabolism of prostaglandins in the housefly, *Musca domestica* (L.). *Insect Biochem.* **16**, 895-902.
- WANG X., CHANG E.S. i O'CONNOR J.D. (1989) Purification of the *Drosophila* Kc cell juvenile hormone binding protein. *Insect Biochem.* **19**, 327-335.
- WANG Z., HAYAKAWA Y. i DOWNER R.G.H. (1990) Factors influencing cyclic AMP and diacylglycerol levels in fat body of *Locusta migratoria*. *Insect Biochem.* **20**, 325-330.

- WATSON R.D., HAIRE M.E. i BOLLENBACHER W.E. (1988) Juvenile hormone regulates the titer of a hemolymph factor that enhances ecdysone synthesis by insect (*Manduca sexta*) prothoracic glands *in vitro*. *Archs Insect Biochem. Physiol.* **9**, 157-165.
- WESS J., MAGGIO R., PALMER J.R. i VOGEL Z. (1992) Role of conserved threonine and tyrosine residues in acetylcholine binding and muscarinic receptor activation: a study with m3 muscarinic receptor points mutants. *J. Biol. Chem.* **267**, 19313-19319.
- WHISENTON L.R., BOWEN M.F., GRANGER N.A., GILBERT L.I. i BOLLENBACHER W.E. (1985) Brain-mediated 20-hydroxyecdysone regulation of juvenile hormone synthesis by the *corpora allata* of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **58**, 311-318.
- WHITEHEAD D.L. (1989) Ecdysteroid carrier proteins. W: *Ecdysone*. Red. Koolman J., Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, Thieme Medical Publishers, Inc., New York, str. 232-244.
- WHITMORE E. i GILBERT L.I. (1972) Haemolymph lipoprotein transport of juvenile hormone. *J. Insect Physiol.* **18**, 1153-1167.
- WHITMORE D., GILBERT L.I. i ITTYCHERIAH P.I. (1974) The origin of hemolymph carboxylesterases 'induced' by the insect juvenile hormone. *Molec. Cell. Endocrinol.* **1**, 37-54.
- WIECZOREK E. i KOCHMAN M. (1991) Conformational change of the haemolymph juvenile-hormone-binding protein from *Galleria mellonella* (L.). *Eur. J. Biochem.* **201**, 347-353.
- WIELGUS J.J. (1983) Stimulation of intermoult cuticle deposition by a haemolymph trophic factor in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Insect Biochem.* **13**, 313-322.
- WIGGLESWORTH V. (1965) Chairman's introduction. W: *Aspects of Insect Biochemistry*. Academic Press, London and New York, str. XI-XII.
- WILLIAMS C.M. (1976) Juvenile hormone ... in retrospect and in prospect. W: *The Juvenile Hormones*. Red. Gilbert L.I., Plenum Press, New York, str. 1-14.
- WING K.D., SPARKS T.C., LOVELL V.M., LEVINSON S.O. i HAMMOCK B.D. (1981) The distribution of juvenile hormone esterase and its interrelationship with other proteins influencing juvenile hormone metabolism in the cabbage looper, *Trichoplusia ni*. *Insect Biochem.* **11**, 473-485.
- WIŚNIEWSKI J.R. i KOCHMAN M. (1984) Juvenile-hormone-binding protein from silk gland of *Galleria mellonella*. *FEBS Lett.* **171**, 127-130.

- WIŚNIEWSKI J.R. i STEUERNAGEL A. (1990) The hemolymph of the midge *Chironomus thummi* contains both a high and a low molecular weight juvenile hormone-binding protein. *Comp. Biochem. Physiol.* **95B**, 545-550.
- WIŚNIEWSKI J.R., RUDNICKA M. i KOCHMAN M. (1986) Tissue specific juvenile hormone degradation in *Galleria mellonella*. *Insect Biochem.* **16**, 843-849.
- WIŚNIEWSKI J.R., MUSZYŃSKA-PYTEL M., GRZELAK K. i KOCHMAN M. (1987) Biosynthesis and degradation of juvenile hormone in *corpora allata* and imaginal wing discs of *Galleria mellonella* (L.). *Insect Biochem.* **17**, 249-254.
- WIŚNIEWSKI J.R., WAWRZEŃCZYK CZ., PRESTWICH G.D. i KOCHMAN M. (1988) Juvenile hormone binding proteins from the epidermis of *Galleria mellonella*. *Insect Biochem.* **18**, 29-36.
- WOLTJER R.L., LUKAS T.J. i STAROS J.V. (1992) Direct identification of residues of the epidermal growth factor receptor in close proximity to the amino terminus of bound epidermal growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 7801-7805.
- WOODHEAD A.P., STAY B., SEIDEL S.L., KHAN M.A. i TOBE S.S. (1989) Primary structure of four allatostatins: neuropeptide inhibitors of juvenile hormone synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **86**, 5997-6001.
- XU L. i DUMAN J.G. (1991) Involvement of juvenile hormone in the induction of antifreeze protein production by the fat body of larvae of the beetle *Dendroides canadensis*. *J. Exp. Zool.* **258**, 288-293.
- XU L., DUMAN J.G., WU D.W. i GOODMAN W.G. (1992) A role for juvenile hormone in the induction of antifreeze protein production by the fat body in the beetle *Tenebrio molitor*. *Comp. Biochem. Physiol.* **101B**, 105-109.
- YAMAMOTO K., CHADAREVIAN A. i PELLEGRINI M. (1988) Juvenile hormone action mediated in male accessory glands of *Drosophila* by calcium and kinase C. *Science* **239**, 916-919.
- YAO T.P., SEGRAVES W.A. ORO A.E., McKEOWN M. i EVANS R.M. (1992) *Drosophila* ultraspiracle modulates ecdysone receptor function via heterodimer formation. *Cell* **71**, 63-72.
- YARDEN i SCHLESSINGER J. (1987) Epidermal growth factor induces rapid, reversible aggregation of the purified epidermal growth factor receptor. *Biochemistry* **26**, 1443-1451.
- YOUNGDAHL-TURNER P., MELLMAN I.S., ALLEN R.H. i ROSENBERG L.E. (1979) Protein mediated vitamin uptake. Adsorptive endocytosis of the transcobalamin II-cobalamin complex by cultured human fibroblasts. *Exp. Cell Res.* **118**, 127-134.

- YU K. i CZECH M.P. (1986) Tyrosine phosphorylation of insulin receptor β subunit activates the receptor tyrosine kinase in intact H-35 hepatoma cells. *J. Biol. Chem.* **261**, 4715-4722.

- Rysunek 18 HPLC-rozdzielanie produktów trawienia JHBP subtylizyną.
- Rysunek 19 Wykres SCATCHARDA (1949) wiązania JH I przez 32 kDa natywne JHBP i 30 kDa produkt trawienia JHBP subtylizyną.
- Rysunek 20 Krzywa czasowa degradacji JH przez frakcję membranową.
- Rysunek 21 Sprawdzenie właściwości molekularnych JHBP po jodowaniu-
elektroforeza w warunkach nie-denaturujących.
- Rysunek 22 Krzywa czasowa wiązania JHBP do frakcji membranowej.
- Rysunek 23 Schemat degradacji JHBP przez subtylizynę.
- Rysunek 24 Schemat działania hormonu juvenilnego.

8. SPIS RYSUNKÓW

- | | |
|------------|---|
| Rysunek 1 | Schematyczne porównanie organizacji strukturalnej białek należących do rodziny receptorów hormonów sterydowych. |
| Rysunek 2 | Wzory strukturalne naturalnych enancjomerów homologów hormonu juvenilnego. |
| Rysunek 3 | Profil zmian rozwojowych stężenia JH w hemolimfie <i>Galleria mellonella</i> . |
| Rysunek 4 | Prekursory i biosynteza monoepoksydowych homologów hormonu juvenilnego. |
| Rysunek 5 | Western blotting hemolimfy i JHBP. |
| Rysunek 6 | Wpływ hormonu juvenilnego na ruchliwość elektroforetyczną JHBP. |
| Rysunek 7 | Wirowanie JHBP w gradiencie gęstości sacharozy. |
| Rysunek 8 | Wpływ sacharozy na efekt zmiany ruchliwości elektroforetycznej JHBP. |
| Rysunek 9 | Sieciowanie aldolazy aldehydem glutarowym-elektroforeza w obecności SDS. |
| Rysunek 10 | Sieciowanie JHBP aldehydem glutarowym-elektroforeza w obecności SDS. |
| Rysunek 11 | Krzywa czasowa inaktywacji aldolazy i JHBP przez karboksypeptydazę A. |
| Rysunek 12 | Krzywa czasowa inaktywacji JHBP przez subtylizynę-wpływ hormonu juvenilnego. |
| Rysunek 13 | Krzywa czasowa inaktywacji aldolazy przez subtylizynę-wpływ hormonu juvenilnego. |
| Rysunek 14 | Identyfikacja produktów trawienia JHBP subtylizyną-elektroforeza w obecności SDS. |
| Rysunek 15 | Identyfikacja produktów trawienia JHBP subtylizyną-elektroforeza w warunkach nie-denaturujących. |
| Rysunek 16 | Krzywa czasowa zaniku formy natywnej JHBP trawionego subtylizyną. |
| Rysunek 17 | Określenie zdolności wiązania JH przez produkty trawienia JHBP subtylizyną. |

9. SPIS TABEL

Tabela 1	Klasy białek G, ich receptory i systemy efektorowe.
Tabela 2	Przykłady wybranych hormonów owadzich i ich działanie.
Tabela 3	Wybrane informacje o specyficznych hemolimfowych JHBP.
Tabela 4	Wpływ enzymów proteolitycznych na aktywność JHBP.

Studies on interaction of juvenile hormone with the juvenile hormone binding protein from the haemolymph of the wax moth, *Galleria mellonella*

The effect of juvenile hormone (JH) on the juvenile hormone binding protein (JHBP) from the haemolymph of *Galleria mellonella* was studied. It was found that JH decreases electrophoretic mobility of JHBP. It was shown that this effect is specific for JHBP since JH does not affect electrophoretic mobility of other proteins. It was observed that binding JH shifts the sedimentation coefficient of JHBP from 2.3 S (free JHBP) to 2.71 S (JHBP-JH complex). Cross-linking experiments showed that binding of JH does not result in oligomerization of JHBP. Limited proteolysis by selected proteases indicated that JHBP is resistant to degradation. Trypsin, chymotrypsin, carboxypeptidase A, and carboxypeptidase Y do not change activity of JHBP. As an effect of pepsin action, fast inactivation of JHBP is observed, whereas JHBP digestion with subtilisin is slow: after 16 hours 30% of initial JHBP activity remains. It was shown that JH protects JHBP against inactivation by subtilisin: after 16 hours of digestion in the presence of hormone, 70% of initial JHBP activity is retained. Pseudo-first-order constants of JHBP proteolysis are $6.5 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ and $2.7 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ in the presence and in the absence of JH, respectively. As a result of subtilisin degradation of 32 kDa JHBP, fragment with molecular mass of about 30 kDa is created. Small amounts of some other peptides with molecular mass of about 20-25 kDa, fast degraded to smaller fragments, are produced. The 30 kDa peptide retains its ability to bind JH. Dissociation constants for 32 kDa JHBP-JH and 30 kDa JHBP fragment-JH complexes are 86 nM and 207 nM, respectively. On a base of above results, it was postulated that JHBP undergoes a conformational transition upon JH binding. This transition leads to increased resistance of JHBP to proteolysis by subtilisin, to more spherical shape of JHBP molecule and to its shift in electrophoretic mobility.

JEDN. ARCHIWIZUJĄCA

ROK ARCH.

KOD ARCH.

NR ARCH.

RODZAJ

I 0 4

/ 9 3

P - 0 0 2

N

DONA

Zas

ChP

Roz

Pdd

Rok Zal.

Data zdokumentowania

N

P

V

N

1993

09 02

CPBR/GRANT

Nr Kierunku Badań

Nr Zlecenia

0 4 0 0 1

3 4 1 2 7 5

Kody Inst. (Kat. Zakt. ...)

Kody Wydziałów

Klasyfikacja APIN

I 0 4

V 0 3

0 4 1 2

Opis bibliograficzny

147637 Wieczorek, Elżbieta

Badania nad interakcją hormonu juvenilnego - białko wiążące hormon juvenilny z hemolimfą mola woskowego, *Galleria mellonella*.

Raporty Inst. Chem. Org. PWroc. 1993 Ser. PRE nr 2, 113 s. 24 rys. 4 tabl. bibliogr. 353 poz. maszyn. powiel.

Rozprawa doktorska

Politechnika Wrocławska, Instytut Chemii Organicznej, Biochemii i Biotechnologii, Wrocław

Promotor: prof. dr hab.

069155 Kochman, Marian

c.d. opis bibliograficzny (uwagi)

Analiza

Zbadano wpływ hormonu juvenilnego (JH) na właściwości białka wiążącego hormon juvenilny (JHBP) z hemolimfy *Galleria mellonella*. Stwierdzono, że JH zmniejsza ruchliwość elektroforetyczną i zwiększa współczynnik sedymentacji JHBP. Eksperymenty sieciowania pokazały, że wiązanie JH nie prowadzi do oligomeryzacji JHBP. Ograniczona proteoliza JHBP wybranymi proteazami wykazała, że JHBP jest odporne na degradację. Jedynie trawienie subtylizyną i pepsyną prowadzi do inaktywacji JHBP. Stwierdzono, że degradacja 32 kDa JHBP przebiega z wolnym powstawaniem fragmentu 30 kDa, który zachowuje zdolność wiązania JH. Na podstawie powyższych wyników wnioskowano, że JHBP pod wpływem wiązania JH przechodzi zmianę konformacyjną, zmieniającą własności białka.

AUTOR ANALIZY:

Elżbieta Wieczorek

PODPIS:

Słowa kluczowe

hormon juvenilny, białko wiążące hormon juvenilny,
zmiana konformacyjna, przekazywanie sygnałów hormonal-
nych, *Galleria mellonella*

Podpisy i potwierdzenia

WYPEŁNIA INSTYTUT		WYPEŁNIA BIBLIOTEKA GŁÓWNA I OINT	
Redaktor naukowy	Asyst. ds. badań nauk.	Zgłoszenie uzupełnień	Przyjęcie karty
WV [podpis]	[podpis]	[podpis]	[podpis]