

NEURO SZEKRECIÓS RENDSZEREK HOLOMET ABÓLA ÉS HEMIMET ABÓLA FEJLŐDÉSÜ ÍZELTLÁBÚ
MODELLÁLLATOKBAN

Herbert Zsófia

PhD értekezés tézisei

Pécs, 2003

1. BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉS

A neuropeptidok, mint átvivőanyagok fontos szerepet játszanak az állati és az emberi szervezetben. A rovarokban azonosított neuropeptidok száma mára elérte a 300-at. Ezen neuropeptidok nagy része az izomaktivitást befolyásoló miotropinok közé tartozik.

A központi idegrendszer területén termelt neuropeptidok keringésbe juttatását legnagyobb részben a dúcidegrendszerhez kapcsolódó neurohemális szervek teszik lehetővé. A fejben, az agy közelében helyezkedik el a retrocerebrális komplex, melyet a -különböző eredetű corpora cardiaca (CC) és corpora allata (CA) alkotnak. A thorakális- és abdominális ganglionok neuroszekréción sejtjeinek felszabadulási helyei a periszimpatikus szervek (PSO).

A szegmensenként megjelenő neurohemális szervek funkciójáról sokáig azt feltételezték, hogy a hormonok egyenletes elosztásában kompenzálják a szervezet fejletlen keringési rendszerét. Amerikai csótányban (*Periplaneta americana*, Blattidae) figyelték meg először, hogy az abdominális PSO-kból nyert peptidextrakciók nem mutatnak aktivitást azokon az izmokon, amelyeken a retrocerebrális komplexből nyert peptidextrakciók miotrop aktivitásúak. Biokémiai és immuncitokémiai módszerek segítségével feltárták, hogy az amerikai csótány testtáj-specifikus eloszlású neuroszekréción rendszerrel rendelkezik. Ez a rendszer két mioaktív peptidcsaládot (periviscerokininek és pirokininek) és két, más peptidokkal strukturális alapon rokonságot nem mutató, peptidet (Pea-VEAacid és Pea-SKNacid) tartalmaz. A pirokininek közül a Pea-PK-1-4 és a Pea-PK-6-7 kizárólag a retrocerebrális komplexen keresztül jut a hemolinfába, míg a Pea-PK-5 az abdominális PSOkon át. A periviscerokininek (Pea-PVKI-2), továbbá a Pea-VEAacid és Pea-SKNacid csak az abdominális neurohemális szervekben mutathatók ki.

Az abdominális neurohemális szerveken keresztül felszabaduló neuropeptidok az abdominális ganglionokban kizárólag neuroszekréción sejtekben termelődnek, és a mediális idegen keresztül szállítódnak a ganglionhoz kapcsolódó PSO-hoz. A thorakális ganglionokban és az agydúcban ezek a peptidok csak intemeuronokban termelődnek. A vizsgált öt peptid teljes kolokalizációt mutat a dúcok területén. Megelőző biokémiai vizsgálatok a rendszerben további peptidok jelenlétére utalnak.

Ezek alapján munkánkban célul tűztük ki

a feltehetően az abdominális rendszerhez tartozó, nemrég azonosított neuropeptidnek, a Pea-YLSamid eloszlásának és a többi abdominális-peptiddel való kolokalizációjának a vizsgálatát;

az abdominális neuropeptidok lokalizációjának és kolokalizációjának sejten belüli feltárását;

az abdominális neuroszekréción rendszer morfológiai jellemzőinek megfigyelését az egyedfejlődés alatt, a lárvák kokonból való kikelésétől az imaginális vedlésig.

A neuropeptidok testtáj-specifikus felszabadulását a neurohemális szervekből, több hemimetabóla egyedfejlődésű fajban is leírták. Neuropeptidok eloszlásának hasonló szempontú vizsgálatával azonban nem találkozhatunk holometabóla egyedfejlődésű faj esetében.

A dohányiszender (*Manduca sexta*, Sphingidae) kedvelt modellállata volt az elmúlt évek neuropeptid kutatásainak. Idegrendszeréből számos peptid strukturáját és eloszlását tárták fel. A kardioakcelerátoros hatású Man-CAP2b aminosav összetétele több helyen szekvencia-azonosságot mutat a csótányokban megismert PVK peptidcsalád tagjaival. Ez a felismerés, strukturális alapon a két peptid azonos peptidcsaládba való tartozását veti

fel.

Ezek alapján a neuroszekréciós rendszerek alaposabb megismeréséhez az alábbi vizsgálatok elvégzését tartottuk szükségesnek:

A holometabóla fejlődésű *M sexta* különböző testtájaiban a neurohemális szervek peptidösszetételének megismerése és összehasonlítása.

A Man-CAP2b eloszlásának a feltérképezése az abdominális ganglionokban.

Az abdominális peptidrendszer összetételének és morfológiájának a megfigyelése az egyedfejlődés alatt.

A két vizsgált faj neuroszekréciós rendszerének az összehasonlítása morfológiai-, biokémiai- és törzsfejlődéstani szempontok alapján.

II. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

1. Kísérleti állatok

Kísérleteinkben két ízeltlábú fajt, a hemimetabóla egyedfejlődésű amerikai csótányt (*Periplaneta americana* L., Blattidea, Insecta) és a holometabóla egyedfejlődésű dohányszendert (*Manduca sexta*, L., Sphingidea, Insecta) használtuk fel. Az állatokat mesterséges, optimalizált körülmények között tartottuk. A csótányok esetén a lárvális fejlődés hét stádiumból áll, míg a dohányszender esetén öt lárvastádium különíthető el egymástól. Az egyes stádiumok megkülönböztetésének referenciapontjaként a kokonból/petéből való kibújás, illetve a vedlések szolgáltak.

2. Immuncitokémiai vizsgálatok fénymikroszkópra

A tömegspektrometriával azonosított neuropeptidek eloszlását indirekt immuncitokémiai módszerekkel, totálpreparátumokon, illetve kifejlett amerikai csótányban részben szeletpreparátumokon vizsgáltuk. A peroxidáz antiperoxidáz (PAP) módszer mellett (Stemberger, 1986), a kettős, illetve többes jelölésekhez fluorescens technikákat használtunk. A jelöléseket mindkét faj, minden lárvastádiumában, minden vizsgált peptid esetén legalább 15 egyeden elvégeztük.

2.1. A szövetminták rögzítése

A két faj abdominális idegrendszerének rögzítése azonos módon történt. Peroxidáz immuncitokémiához a preparátumokat Bouin-oldatban (pikrinsav-formaldehid-ecetsav; IS-51 vlvlv) fixáltuk; immunfluorescens jelölésekhez 4% parformaldehid (PF A) oldatban rögzítettük.

2.2. Immuncitokémiai jelölések PAP módszerrel

Amerikai csótány abdominális idegrendszerén a következő jelöléseket hajtottuk végre:

Kifejlett egyed: Pea- YLSamid

Lárva: Pea-PVK-1, Pea-PVK-2, Pea-PK-5, Pea-YLS, Pea-VEAcid, Pea-SKNacid

Imágó és lárvális dohányszender abdominális idegrendszerén a következő jelöléseket hajtottuk végre:

Man-CAP2b, Man-CAP2a1Cama-CCAP

Ajelölések vizualizálására diamino-benzidint (DAB) használtunk.

2.3. Immunfluorescens kettős- és hármas jelölések

A kettős- és hármas- immunfluorescens jelölések, csótányból készült whole-mount preparátumokon, direkt módszerrel történtek. A primer antiszérumok IgG frakciójához Cy2 és Cy3, illetve Alexa Fluor 350 fluorescens festéket kapcsolunk.

A kettős- és hármas-jelölésekhez a következő kombinációkban alkalmaztuk az antitesteket:

. a YLS-Alexa fluor 350 - aPVK-I-Cy2 - aPK-5-Cy3

. aPVK-I-Cy2 - aPVK-2-Cy3

. aPVK-I-Cy3 - aVEA-Cy2 - aSKN-Alexa fluor 350

. aVEA-Cy2 - aYLS-Alexa fluor 350

. a YLS-Cy2 - aPK-5-Cy3

Dohányszenderben a kettős jelölések, az előbbiekhöz képest módosított eljárással történtek. Az anti Mas-CAP2a/Cama-CCAP-t Cy2-kötött antitest segítségével tettük láthatóvá, majd a szövetet anti Mas-CAP2bIpea-PVK-2-Cy3 komplex oldatában inkubáltuk.

2.4. Eredményfeldolgozása

A preparátumokat Olympus-Vanox AH3-RFCA mikroszkóp és digitális kamera segítségével dolgoztuk fel. A digitális analízishez anlySIS Doku 3.0 szoftvert használtunk.

3. Tömegspektrometriai vizsgálatok

A periszimpatikus szervek peptidtartalmát tömeg-spektrometriai mérésekkel határoztuk meg. *M sexta* idegrendszerében, az öt lárvastádium és a kifejlett állat összes abdominális neurohemális szervét megvizsgáltuk. *P. americana* aPSO-nek peptidösszetételét az első-, a második-, a harmadik- és a hatodik lárvastádiumban vizsgáltuk.

3.1. Az aPSO-k disszekciója és extrakciója

A PSO-k peptidtartalmának kivonásához methanol-dH₂O- TF A (tri-fluor-ecetsav, 90-9-1) vagy 0,25% TF A extrakciós oldatot használtunk.

3.2. Az aPSO extrakciók peptidtartalmának izolálása, és koncentrációja

Az extrakciós elegyek peptidtartalmának koncentrálásához és a tömegspektrometriai méréseket zavaró sók és lipidek kivonásához ZipTip@ pipettahegyeket használtunk.

3.3. A minta előkészítése a matrix assisted laser desorption ionisation time of flight (MALDI-TOF) lemezen

A PSO-k magas peptidkoncentrációja lehetővé tette, hogy a méréseket natív tisztítatlan szövetdarabokon is

elvégezzük. A kiemelt aPSO-t a MALDI-TOF lemezre helyeztük, majd mátrix oldatot (a-ciano-4-hidroxifahéjsav telített metanolos oldata) pumpáltunk a szervre. Előzetesen tisztított minták esetén, a minta felvitele a lemezre szendvics módszerrel történt.

3.4. Tömegspektrometriai mérések

Vizsgálatainkhoz MALDI-TOF típusú tömegspektrométert használtunk. 600-2200 Da tömegintervallumban vizsgáltunk pozitív-ion spektrumokat, a műszer alábbi, standard beállítása mellett: 150 nsec késleltetési idő, 20 kV gyorsító feszültség, 75% grid feszültség és 0,01% vezetési feszültség.

A spektrumokat II Voyager DE Biospectrometry Workstation szoftver segítségével rögzítettük és kalibráltuk.

4. Elektronmikroszkópos vizsgálatok

Egyes és többes immunarany-jelöléseket hajtottunk végre a Pea-PVK-1, Pea-PVK-2, Pea

PK-5, Pea-VEAcid, Pea-SKNacid és a Pea-YLSamid peptidek vezikulaszíntű eloszlásának és kolokalizációjának vizsgálatához. A primer antitesteket különböző méretű (6, 12, 18 nm) kolloidális aranyhoz kötött szekunder antitestek segítségével vizualizáltuk.

4.1. A szövetminták rögzítése és beágyazása

A szövetdarabokat 0,1M PBS-ben oldott 4% PFA és 0,5% glutaraldehid keverékében rögzítettük; ozmifikáltuk, majd Durcupán ACM epoxy gyantába ágyaztuk be.

III. EREDMÉNYEK ÉS KÖVETKEZTETÉSEK

1. A *P. americana* abdominális neuroszekréciós rendszere

Az Pea- YLSamid IR neuronok eloszlása az abdominális- és thorakális ganglionokban, illetve az agydúcban az abdominális peptidrendszer tagjainak IR mintázatához nagyon hasonló volt. Immunreaktivitás az abdominális ganglionokban mediális helyzetű NS sejtekben, az idegrendszer többi ganglionjában pedig intemeuronokban volt megfigyelhető. A többi peptiddel történt különböző kombinációjú kettős- és hármas jelölések megerősítették a feltételezést, hogy a Pea- YLSamid minden jelölődött sejtben kolokalizál a másik öt peptiddel, tehát az abdominális neuro szekréciós rendszer hatodik tagja.

A peptidek aPSO-n belüli lokalizációjának feltárásához immunarany-jelöléseket használtunk. Eredményeink alapján a peptidek nem csak azonos idegvégződéseken, hanem azonos vezikulákban lokalizálódnak, amiből funkcionális szempontból a peptidek közös felszabadulására utal.

A peptidek térbeli és időbeli szempontból közös expressziója, szoros funkcionális kapcsolatra és/vagy közös génen való lokalizációra utal. Ez utóbbi feltételezésünket megerősítette, hogy a *Drosophila* genómban a potenciális PVK-gén (CG 15520) két periviscerokinint és egy pyrokinint is tartalmaz.

Az abdominális peptidrendszer peptidjeit tartalmazó rostok a PSO-k centrális rostjaiban figyelhetők meg a szerv területén. A szervektől disztálisan a transzverzális ideg hipemeurális iwmmal érintkező szakaszán azonban a peptidek excitózisára utaló struktúrákat figyelhetünk meg.

2. A *P. americana* abdominális neuro szekréción rendszerének változásai az egyedfejlődés során

Az abdominális neuro szekréción rendszer változását tömegspektrometriai és immuncitokémiai módszerekkel tanulmányoztuk a lárvális fejlődés során. A vizsgált faj az embrionális fejlődés végén már működő, teljes abdominális neuroszekréción rendszerrel rendelkezik. Erre utal, hogy az aPSO-k, a rovar lárvális fejlődésének kezdetén, mind a hat antiszérum felhasználásával erősen festődnek és a tömegspektrometriai vizsgálatok mind a hat peptidet kimutatták.

A lárv fejlődése során a jelölődött sejtek számának és méretének a növekedése figyelhető meg, mintegy a test növekedésével párhuzamosan. A peptidek időszakos expressziója egyik lárvastádiumban sem volt tapasztalható.

Az immunreaktív sejtek száma és mérete az abdominális ganglionokban egy gradiens szerinti eloszlást mutat. A sejtszám a negyedik lárvastádiumig, a sejt méret pedig a teljes fejlődés alatt, az abdominális idegrendszerben anterior irányból, poszterior irányba csökken. Ezek az eredmények a neuroszekréción rendszer antero-posterior irányú fejlődésére utalnak, mely összefüggésbe hozható a testszervek fejlődési tendenciájával, végleges méretével. Neuropeptidek egyedfejlődés alatti eloszlásának vizsgálata esetén hasonló jelenséget eddig nem írtak le.

Figyelemre méltó eredmény volt a hat peptid kolokalizációja a neuroszekréción rendszerben a teljes fejlődés alatt. A peptidek szoros koexpressziója a teljes fejlődés alatt szintén a közös génen való lokalizációjukat és közös szabályozásukat támasztja alá

3. A kifejlett *M sexta* abdominális neuro szekréción rendszerének jellemzői

Tömegspektrometriai vizsgálatokkal az imágó dohányszender aPSO-iban összesen tizenegy peptidet mutattunk ki (a vizsgált tömegintervallumban). A faj idegrendszerében, korábban számos neuropeptid struktúráját feltárták, a detektált peptidek közül azonban csak hármat (Cama-CCAP/Mas-CAP2a, a Mas-CAP2b és a Mas-AT) tudunk ismert peptiddel azonosítani.

Az imágó dohányszender abdominális PSO-inak peptidösszetétele eltér a thorakális és agyi neurohemális szervektől. Tömegspektrometriai eredményeink bizonyítják, hogy a vizsgált intervallumban az első négy aPSO peptidkészlete teljesen azonos. Az ötödik szervben alacsony szignálintenzitást, és kisebb peptidszámot, detektáltunk, mely alacsonyabb raktározott peptidmennyiségre utal. A négy peptid sikertelen észlelését tömegspektrometriai módszerekkel azonban az alacsony koncentrációban való jelenlétük is okozhatja; a peptidek hiányát a szervben nem mondhatjuk ki egyértelműen.

Az abdominális neurohemális szervekben azonosított peptid a Mas-CAP2b. A peptid izolálásakor és struktúrájának feltárásakor a peptid- és protein-adatbankok nem azonosítottak szekvencia-hasonlóságot egyetlen eddig ismert peptiddel sem. A PVK-ek és a Mas-CAP2b strukturális kapcsolatának felismerését a PVK peptidcsalád strukturális feltárásának kellett megelőznie. A szekvencia-összehasonlító vizsgálatok a peptidcsalád tagjainak N-terminális homológiáját mutatják, míg a peptidek C-terminális szekvenciája eltérő. A legtöbb peptidcsaládot konzervatív C-terminálissal, és variábilis N-terminussal rendelkező peptidek alkotják, ez a jelenség magyarázza a PVK-ek és a Mas-CAP2b peptidek N-terminális homológiájának kései/jelen felismerését.

Nemcsak a két peptid szekvencia-homológiája, hanem eloszlási mintázatuk is alátámasztja azt a feltevést, hogy a Mas-CAP2b a PVK peptidcsalád tagja. Az abdominális ganglionokban megjelenő két IR sejtet az NS-M4

neuronokkal azonosítottuk. A mediális idegen át az aPSO-kba projiciáló sejtek azonosak a mas-CAP2a/cama-CCAP IR neuroszekréción neuronokkal, amit kettős jelöléseink is alátámasztottak. A sejtek axonja speciális hurokformát képezve projiciál az aPSO-ba a mediális idegen keresztül. IR neuroszekréción sejteket csak az abdominális ganglionokban figyeltünk meg. Az IR struktúrák eloszlása az idegrendszer területén, a sejtek axonlefutási mintázata és a ventrális diafragmán/hypemaurális izmon megfigyelt peptid-felszabadulási hely, a peptidcsalád eloszlási mintázatának evolúciós konzervativizmusára utal.

4. *M sexta* lárvális idegrendszerének abdominális neuropeptid-rendszere

M sexta lárvális idegrendszere kevésbé koncentrált, mint a kifejlett egyedé. A 2-5. aPSO-k peptidösszetétele megegyezik. Az első szabad aPSO-ban és a hatodik aPSO-ban, a vizsgált tömeg-intervallumban nem detektáltunk peptideket. Eredményeink arra utalnak, hogy az alacsony mértékű, vagy hiányzó peptidexpresszió a lárva ekét ganglionjának neuroszekréción sejtjeiben, funkcionálisan megelőzi a dúcok morfológiai összeolvadását.

A lárvális fejlődés alatt az aPSO-k peptidösszetétele nem változik. A vizsgált tömeg-intervallumban öt peptidet detektáltunk, mely kevesebb mint a fele, az imágóban megfigyelteknek. A lárvális neuropeptidek mind megfigyelhetők az imágóban. A lárvális peptidek között csak egyetlen ismert struktúrájú peptidet, a mas-CAP2b-t tudtuk azonosítani. A peptidet a lárvális ganglionban a mediális helyzetű NS-M4 neuronokon kívül még egy neuroszekréción sejt pár expresszálja. A CAP2b-CAP2a kettős jelölések ezeket a sejteket az NS-LI neuronpárral azonosították, melyek projekciója nem a mediális idegen keresztül fut a rSa-ba. Az eddig vizsgált hemimetabóla fajokban, PVK-ek termelődése laterális helyzetű neuroszekréción sejtekben és interneuronokban az abdominális ganglionok területén nem

ismert.

5. *P. americana* és *M sexta* neuroszekréción rendszerének összehasonlítása az abdominális ganglionokban

A két faj abdominális neuroszekréción rendszerének hasonlóságát és különbségét a következő pontokban foglalhatjuk össze:

A *P. americana* testájspecifikus abdominális neurohemális rendszerében a teljes fejlődés alatt hat neuropeptid jelenlétét figyeltük meg. A lárvális *M sexta* abdominális rendszerében öt neuropeptid detektáltunk; a kifejlett állatban ennek több mint a kétszeresét.

A *P. americana* neuroszekréción rendszerének IR sejtjeinek száma az egyedfejlődés alatt egyenletesen növekedik. A *M sexta* abdominális rendszerének fejlődését, sejtek tranziens megjelenése is jellemzi.

Az abdominális neuropeptidek *P. americana* mediális helyzetű neuroszekréción sejtekben termelődnek, melyek kivétel nélkül a mediális idegen keresztül projiciálnak az aPSO-kba. *M sexta* abdominális neuropeptideit interneuronokban is azonosítottuk az abdominális ganglionok területén. A Man-CAP2b IR mediális neuroszekréción sejt axonlefutási mintázata és helyzete hasonlóságot mutat a Pea-PVK-ekkel.

A *P. americana* abdominális neuropeptidei kolokalizálnak az abdominális ganglionokban a teljes fejlődés alatt. *M sexta* abdominális neurohemális szerveiben a peptidek struktúrája és eloszlása legnagyobb részben nem ismert.

IV. PUBLIKÁCIÓK

A: A disszertáció alapjául szolgáló tanulmányok:

Eckert, M., Herbert, Zs., PoHák, E., Molnár, L. and Predel, R. (2002) Identical cellular distribution of ali abundant neuropeptides in the major abdominal neurohemal system of an insect (*Periplaneta americana*). 1. Camp. Neurol. 452(3): 264-75.

Wegener, C., Herbert, Zs., Eckert, M. and Predel, R. (2002) The periviscerokininiCAP2b peptide family in insects. Peptides. 23: 605-611.

Herbert, Zs., Eckert, M. and Predel, R.: Neuropeptides in the abdominal nervous system of *Manduca sexta*: Changes during the development. (peptides, előkészületben)

B: A disszertáció alapjául szolgáló konferenciaszereplések:

Herbert, Zs., Predel R., Eckert M. (200 1) The distribution pattern of neurohormones in the abdominal nervous system of *Periplaneta americana* during the embryonal and larval development. Proc. 28th Göttingen Neurobiology Conference, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, VoU!.: 794.

Herbert, Zs., Eckert, M., Predel, R. (2001) Neuropeptides in abdominal perisymphatic organs of the hawkmoth *Manduca sexta* - comparison of peptide profiles in larvae and adults. Central European Conference of Neurobiology. Krakow, Poland. Abstract: 92.

C: Egyéb tanulmányok:

Pollák, E., Molnár, L., Hunyadi, Zs., Herbert, Zs. (2002) Histochemically identified extrinsic and intrinsic neural structures in the hindgut of the isopod *Porcellio scaber*. Crustaceana. (In Press.)

Herbert, Zs., Molnár, L., Pollák, E., Eckert, M. (2001) Proctolin-immunoreactive neurons in the central nervous system of *Porcellio scaber*. Neurobiol., 9(1): 41-42.

Herbert, Zs., Sauer, B., Jirikowski, G. F. (2001) Sexual dimorphism in rat oxytocinergic hypothalamic regions. Eur. J. Anatomy 5(3): 139-143.

E: Egyéb konferenciaszereplések:

Molnár, L., **Herbert, Zs., Szilágyi, A (1998):** Morphological and chemical changes of chloragosomes in paraquat-toxicated *Eisenia fetida*. 6th International Symposium on Earthworm Ecology, 31. August -4. September, Viga, Spain. Abstract: 64.

Molnár, L., **Herbert, Zs., Szilágyi, A (1998):** The elemental composition of various chloragosome type identified in arsenic toxicated *Eisenia fetida*. 6th International Symposium on Earthworm Ecology, 31. August - 4\ September , Viga, Spain. Abstract: 64.

Herbert, Zs. (1999) Distribution pattern of some neuropeptides in the fused mass of the eighth thoracic and terminal ganglion

of *Porcellio scaber* (Crustacea, Isopoda) 2nd International Conference of PhD Students, 9-15 August, Miskolc, Hungary. Section Proceedings (Natural Sciences), 127-131.

Herbert, Zs., Pollák, E., Hunyadi Zs., and Molnár, L. (1999): Innervation of the hindgut in *Porcellio scaber*: neuroanatomical and neurochemical features. Proc. 27th Göttingen Neurobiology Conference, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, Vol. II. 612.

Herbert, Zs., Agricola, H. and Molnár, L. (2000) Invertebrate neuropeptides in the central nervous system of *Porcellio scaber*: Crustacean cardioactive peptide. 7th Annual Meeting of Hungarian Neuroscience Society, Budapest. Abstract: Neurobiol. 8 (3-4), 331.

Herbert, Zs., Agricola, H. and Molnár, L. (2000) Invertebrate neuropeptides in the central nervous system of *Porcellio scaber*: Structures with allatostatin-like immunoreactivity. *ih* Annual Meeting of Hungarian Neuroscience Society, Budapest. Abstract: Neurobiol. 8 (34), 331-32.

Molnár, L., Pollák, E., Ferecskó, AS., Kovács, K, **Herbert, Zs.** and Jónás, I. (2001) Anatomical, histological and histochemical organisation of the central nervous system in *Porcellio scaber*. 5th International Symposium on the Biology of Terrestrial Isopods. Irakleo, Greece. Abstract: 15.

Molnár, I., Pollák, E., **Herbert, Zs.** and Hunyadi, Zs. (2001) Neural regulation of the functioning of the hindgut in *Porcellio scaber*. 5th International Symposium on the Biology of Terrestrial Isopods. Irakleo, Greece. Abstract: 14-15.

Jirikowski, G. F., **Herbert, Zs.** and Caldwell, I. D. (2002) Characterization and localization of sex hormone binding globulin in rat hypothalamus and pituitary. 32nd Annual Meeting of the Society for Neuroscience. Orlando, USA. Abstract: 73.14.