

PÉCSI TUDOMÁNYEGYETEM

Biológiai és Sportbiológiai Doktori Iskola

**A puhatestűek neuroendokrin és reprodukciós rendszerének
funkcionális és evolúciós jellemzése a nagy mocsári csiga
(*Lymnaea stagnalis*), mint modellállat használatával**

Egyetemi doktori (PhD) értekezés

Fodor István



PÉCS, 2022

PÉCSI TUDOMÁNYEGYETEM

Biológiai és Sportbiológiai Doktori Iskola

A puhatestűek neuroendokrin és reprodukciós rendszerének funkcionális és evolúciós jellemzése a nagy mocsári csiga (*Lymnaea stagnalis*), mint modellállat használatával

Egyetemi doktori (PhD) értekezés

Fodor István

Témavezető:

Dr. Pirger Zsolt

PhD

.....
Dr. Pirger Zsolt

Témavezető

ELKH BLKI

.....
Dr. Gábrriel Róbert

Doktori Iskola vezető

PTE TTK

PÉCS, 2022

Tartalomjegyzék

1. BEVEZETÉS	7
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	8
2.1. A gerinces és puhatestű reprodukció neuroendokrin szabályozása.....	8
2.2. A gerinctelen GnRH/corazonin peptidcsalád	9
2.3. Gonadotropin hormonok a puhatestűekben.....	11
2.4. Szex szteroid szintézis a puhatestűekben	12
2.5. A puhatestűekben leírt szex szteroid receptorok.....	15
2.6. Gerinces szex szteroid indukálta hatások a puhatestűekben	17
2.7. A nagy mocsári csiga (<i>Lymnaea stagnalis</i>), mint gerinctelen modellállat a neurobiológiai és neuroendokrinológiai vizsgálatokban.....	18
3. CÉLKITŰZÉS.....	25
4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....	26
4.1. Kísérleti állatok	26
4.2. Neurális transzkriptom szekvenálás és bioinformatika	26
4.3. Filogenetikai elemzés	27
4.4. Az aktív ly-GnRH/CRZ neuropeptid extrakciója és tömegspektrometriai vizsgálata ..	27
4.5. A ly-GnRH/CRZ expressziójának reverz transzkripció-PCR elemzése.....	29
4.6. Immunhisztokémia	29
4.7. Neuronok retrográd jelölése nikkellizin töltéssel.....	32
4.8. Peptid szintézis és injektálás	33
4.9. Viselkedési tesztek	34
4.9.1. Táplálkozási ráta	34
4.9.2. Mozgási aktivitás.....	35
4.9.3. Peterakás.....	36
4.10. <i>L. stagnalis</i> egyedek kezelése jelölt szteroidokkal.....	36
4.11. Jelölt szteroidok extrakciója és elválasztása	38
4.12. A gerinces antitestek által jelölt proteinek azonosítása Western blot-al és tömegspektrometriával	38
4.13. Krónikus progesztogén kezelés	40
4.14. Összehasonlító neurális transzkriptom szekvenálás és bioinformatika.....	41
4.15. Statisztikai vizsgálatok	41
5. EREDMÉNYEK	43
5.1. A GnRH/CRZ preprohormon nukleotid szekvenciája	43
5.2. Az aktív ly-GnRH/CRZ peptid azonosítása a központi idegrendszerben	44
5.3. A ly-GnRH/CRZ peptid filogenetikai elemzése	44
5.4. A ly-GnRH/CRZ transzkript expressziója a központi és perifériás szövetekben	46

5.5. A ly-GnRH/CRZ peptid jelenléte a központi és perifériás szövetekben.....	47
5.6. A ly-GnRH/CRZ szerepe a viselkedési mintázatokban	53
5.7. A gerinces szex szteroid szintézisben és receptor-mediációban részt vevő gének homológjai a <i>L. stagnalis</i> -ban	56
5.8. Radioaktívan jelölt szteroidok felvétele	57
5.9. Jelölt szteroidok megoszlása a szövetekben a kiürülési periódus elején és végén.....	58
5.10. A gerinces antitestek által jelölt fehérjék azonosítása a központi idegrendszerben....	59
5.11. A reprodukcióban szerepet játszó neuropeptidek génexpressziója hormonkezelt csigákban	61
6. MEGBESZÉLÉS ÉS KÖVETKEZTETÉSEK	63
6.1. A ly-GnRH/CRZ neuropeptid azonosítása és funkcionális vizsgálata.....	63
6.2. Szex szteroid felvétel, szintézis és receptor-mediáció a <i>L. stagnalis</i> -ban.....	68
7. ÖSSZEFOGLALÁS	75
8. SUMMARY	78
9. KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS.....	81
10. HIVATKOZÁSOK	82
11. TUDOMÁNYOS TEVÉKENYSÉG ADATAI	97
11.1. Az értekezés témájához kapcsolódó közlemények	97
11.2. Az értekezés témájához nem kapcsolódó közlemények.....	98
11.3. Az értekezés témájához kapcsolódó konferencia szereplések	99
11.4. Az értekezés témájához nem kapcsolódó konferencia szereplések.....	101
12. Függelékek	104

Az értekezésben leggyakrabban használt rövidítések jegyzéke

P – progeszteron

T – tesztoszteron

E₂ – ösztradiol (estradiol)

HPG – hipotalamusz-hipofízis-gonád (hypothalamus-hypophysis-gonad)

GnRH – gonadotropin-fel szabadító hormon (gonadotropin-releasing hormone)

(n)ER – (nukleáris) ösztrogén receptor (estrogen receptor)

FSH – follikulusz-stimuláló hormon

LH – luteinizáló hormon

CNS – központi idegrendszer (central nervous system)

AKH – adipokinetikus hormon

CRZ – corazonin

ACP – AKH/CRZ-hez kapcsolódó peptidek

IHC – immunhisztokémia (immunohistochemistry)

EE₂ – etinilösztadiol (ethinylestradiol)

P5 – pregnenolon

HSD – hidroxiszteroid-dehidrogenáz

Ad – androsztendion

E₁ – ösztron (estrone)

DHT – dihidrotesztoszteron

CYP – citokróm P450 (cytochrome P450)

(n)AR – (nukleáris) androgén receptor

(n/m)PR – (nukleáris/membrán) progeszteron receptor

NR3 – nukleáris receptorok harmadik alcsaládja (nuclear receptor subfamily 3)

PGRMC – progeszteron receptor membrán komponens (progesterone receptor membrane component)

5-HT – szerotonin (5-hydroxytryptamine)

ly-GnRH/CRZ – lymnaea-GnRH/CRZ

HPLC – nagy teljesítményű folyadékkromatográfia (high performance liquid chromatography)

MS – tömegspektrometria (mass spectrometry)

MALDI-TOF – mátrix-asszisztált lézeres deszorpció/ionizációs repülési idő (Matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight)

NTC – negatív kontroll, amiben nincs templát (no template control)

RTØ – negatív kontroll, amiben nem volt reverz transzkripció (no reverse transcription)

PBS – foszfát puffer (phosphate buffer saline)
BSA – borjú szérum fehérje (bovine serum albumin)
TX – Triton-X
DPBS – Dubelco PBS
WB – Western blot
TBS – Tris puffer
T20 – Tween20
StAR - szteroidgenézist akután reguláló fehérje (steroidogenic acute regulatory protein)

Az értekezésben megjelenő neuronális elemek (idegdúcok, neuronok, neuron csoportok) rövidítési jegyzéke

(L/R)CG – (bal/jobb oldali) agydúc (left/right cerebral ganglion)
(L/R)BG – (bal/jobb oldali) pofadúc (left/right buccal ganglion)
(L/R)PeG – (bal/jobb oldali) lábdúc (left/right pedal ganglion)
(L/R)PIG – (bal/jobb oldali) köpenydúc (left/right pleural ganglion)
(L/R)PaG – (bal/jobb oldali) fali dúc (left/right parietal ganglion)
VG – zsigerdúc (visceral ganglion)
RN – gyűrűneuron (ring neuron; reprodukció szabályozása)
PeIb – lábdúc Ib neuron csoportja (pedal Ib cluster; reprodukció szabályozása)
CDC – kaudodorzális sejtek (caudodorsal cells; reprodukció szabályozása)
CGC - agyi óriás sejt (cerebral giant cell; a táplálkozási magatartást szabályozó neuronhálózat szerotonerg interneuronja)
RPeD1 - jobb oldali lábdúc dorzális 1 (right pedal dorsal 1; a szív működést szabályozó neurális hálózat modulációs, valamint a légzést szabályozó neuronhálózat dopaminerg CPG neuronja)
B1-B4 – pofadúc 1-4 (buccal 1-4; táplálkozási motoneuronok)
Acl – A-csoport (A cluster)
Ecl – E-csoport (E cluster)
LPeD1 - bal oldali lábdúc dorzális 1 (left pedal dorsal 1)
HIJK – HIJK neuron csoport (HIJK cells; zsigerdúc; a szív működést és légzést szabályozó neurális hálózatok motoneuronjai)
Mcl – M-csoport (M cluster)
Bcl – B-csoport (B cluster)
VD1 – zsigerdúc dorzális 1 (visceral dorsal 1)
RPD2 – jobb oldali fali dúc dorzális 2 (right parietal dorsal 2)

1. BEVEZETÉS

A progeszteront (P), tesztoszteront (T) és 17β -ösztradiolt (E_2) - mint a legfőbb gerinces szex szteroidokat - az 1920-30-as években fedezték fel (Corner és Allen, 1929; David és mtsai, 1935; Huffman és mtsai, 1940), majd az 1950-es évek végén számoltak be először ezeknek a szex szteroidoknak a jelenlétéről a puhatestűekben (Hagerman és Wellington, 1957). Akkoriban ésszerű volt a feltételezés, hogy ezek a szteroidok endogén eredetűek és ugyanolyan hormonális funkciót töltenek be a puhatestűekben, mint a gerincesekben - az első ezt leíró funkcionális tanulmányt már 1959-ben publikálták (Aubry, 1959). Ebben a hitben az elmúlt 70 évben a puhatestűek szaporodásának szabályozásával foglalkozó számos tanulmány fókuszált a gerinces hipotalamusz-hipofízis-gonád (HPG) tengely gerinctelen homológjaira, a szex szteroidokra, valamint a szintézisükkel és jeláltviteli mechanizmusukkal kapcsolatos fehérjékre. Analitikai, biokémiai, immunhisztokémiai (IHC), molekuláris biológiai és viselkedési méréseket használva több száz cikk arra a következtetésre jutott, hogy 1) a gerinces gonadotropin-felszabadító hormon (GnRH) puhatestű homológjának ugyanaz a funkciója, mint a gerincesekben; 2) a puhatestűek képesek a gerinces szex szteroidok *de novo* szintézisére; 3) a puhatestűekben megtalálhatóak funkcionális szex szteroid kötő receptorok és 4) a puhatestűek így vagy úgy reagálnak, ha gerinces szteroidoknak vannak kitéve.

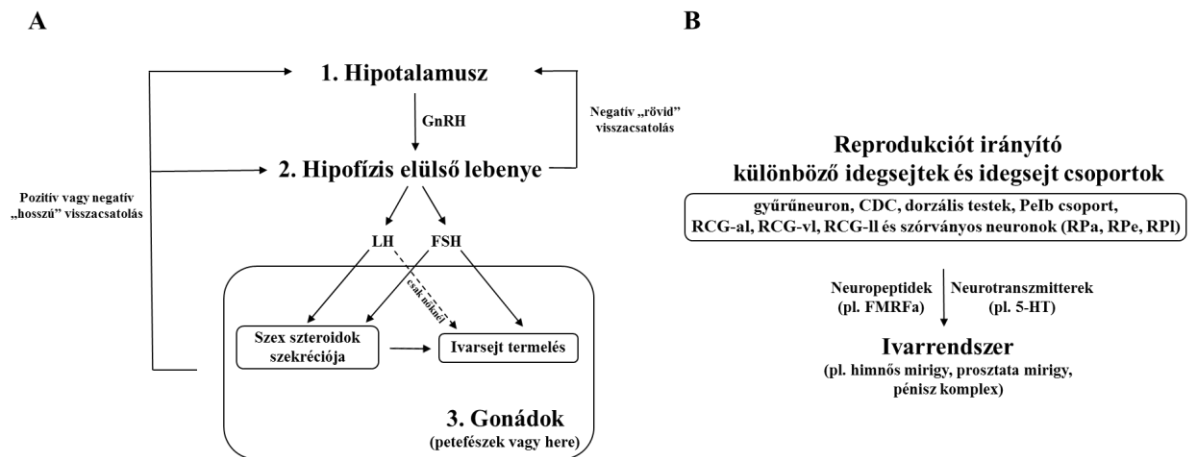
Azonban 2010-től kezdve kritikai összefoglalók kezdték megkérdőjelezni azt a hitet, hogy a puhatestűek endokrin rendszere hasonlít a jól jellemzett gerinces endokrin rendszerhez, valamint azt, hogy a szex szteroidoknak ugyanaz a funkciója a gerinctelenekben, mint a gerincesekben (Balbi és mtsai, 2019; Fernandes és mtsai, 2011; Fodor és mtsai, 2020a; Fodor és Pirger, 2022; Horiguchi és Ohta, 2020; Minakata és Tsutsui, 2016; Pirger és mtsai, 2018; Scott, 2012, 2013, 2018).

A puhatestű neuroendokrinológia vita tárgyát képező hipotézisei és megválaszolatlan kérdései alapján célul tűztük ki, hogy megvizsgáljuk a nagy mocsári csiga (*Lymnaea stagnalis*) gerinctelen modellállat neuroendokrin rendszerét, amely hozzájárulhat a puhatestűek neuroendokrin és reprodukciós rendszerének funkcionális és evolúciós megértéséhez.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. A gerinces és puhatestű reprodukció neuroendokrin szabályozása

A gerinces reprodukciónak és az azt szabályzó neuroendokrin rendszernek az alapja a HPG tengely (1A ábra) (Kaprara és Huhtaniemi, 2018). A hipotalamusz hipofizeotróp (parvocelluláris) neuronjaiból felszabadul a GnRH, amely a portális keringés révén eljut a hipofízis elülső lebenyébe és stimulálja a gonadotropin hormonok szekrécióját (Holland és Sower, 2010). Két gonadotropin hormon található a gerincesekben - a follikulus stimuláló hormon (FSH) és a luteinizáló hormon (LH) -, ezek a véráramon keresztül elérik a gonádokat, ahol közvetlen vagy közvetett módon stimulálják az ivarsejtek képződését és a szex szteroidok bioszintézisét (1A ábra). A puhatestűeknek szintén van reprodukciót irányító endokrin rendszere, ugyanakkor morfológiai szempontból nagyon különbözik a gerincesekétől és még igen kevésbé ismert („dark area”) (Di Cristo és Koene, 2017).



1. ábra: A reprodukció központi szabályozása a gerincesekben (A) és a *L. stagnalis*-ban (B). (A) A HPG tengely sematikus reprezentációja mindkét gonáddal. A szex szteroid (például P és T) szekréció (és ivarsejt termelés) szabályozásának három szintje van: 1) a hipotalamusz hipofizeotróp sejtjei (GnRH szintézis és szekréció), 2) a hipofízis elülső lebenyének gonadotropin sejtjei (FSH és LH szintézis és szekréció) és 3) a gonádok endokrin sejtjei (szteroid és peptidhormon szintézis és szekréció). A végső effektorok a szex szteroidok. A szintek között visszacsatolási hurkok vannak, így biztosítva a rendszer precíz szabályozását. (B) A *L. stagnalis* reprodukcióját irányító neuronok és neuron csoportok (részletezve a 6. ábrán és a 2. táblázatban). A szaporodás neuroendokrin szabályozása alapvetően számos neuropeptid (például FMRFa) és neurotranszmitter (például szerotonin [5-HT]) hatásának szinkronizálásával valósul meg. Rövidítések: CDC – kaudodorzális sejtek; PeIb – lábduc Ib neuron csoportja; RCG-al – jobb oldali agydúc anterior lebenye; RCG-vl – jobb oldali agydúc ventrális lebenye; RCG-ll – jobb oldali agydúc laterális lebenye; RPa – jobb oldali fali dúc; RPe – jobb oldali lábduc; RPl – jobb oldali köpenydúc

A puhatestűekben – beleértve a *L. stagnalis*-t, amelynek neuroendokrin és reprodukciós rendszerét vizsgálták legrészletesebben a puhatestű fajok közül (Benjamin, 2008; Benjamin és Kemenes, 2020; Di Cristo és Koene, 2017; Koene, 2010; Lagadic és mtsai, 2007; Pirger és mtsai, 2018 összefoglalók) – **nem található meg a gerinces HPG tengellyel homológ**

hierarchikus rendszer (1B ábra), a reprodukció irányításáért felelős neuronok és neuron csoportok szétszórva vannak a központi idegrendszer (CNS) idegdúcaiban (Di Cristo és Koene, 2017; Koene, 2010). Bár ezeknek a neuronoknak a nevezéktana eltér a különböző puhatestű fajokban, funkcionális szempontból viszonylag nagy konzerváltságot mutatnak. A csigákra különösen jellemző, hogy a reprodukció szabályozása alapvetően számos neuropeptid hatásának szinkronizációjával történik, amely végbemehet közvetlen innervációval, neuroendokrin, illetve lokális autokrin és parakrin módon (Di Cristo és Koene, 2017; Koene, 2010).

Kutatómunkám során többségében a GnRH szupercsalád, a gonadotropinok, a szex szteroidok szintézis és receptor-mediáció, valamint a gerinces szteroidok puhatestűekre gyakorolt hatásának vizsgálatával foglalkoztam, így a disszertációm további részeiben ezeknek a tárgyalására fókuszálok.

2.2. A gerinctelen GnRH/corazonin peptidcsalád

A GnRH egy ősi neuropeptid szupercsalád, melynek eredete megelőzi az ősszájú-újszájú szétválást (Hauser és Grimmelikhuijzen, 2014; Plachetzki és mtsai, 2016; Sakai és mtsai, 2017; Sakai és mtsai, 2020; Tsai, 2018). A szupercsalád első képviselőjét, a gerinces GnRH-t az 1970-es évek elején azonosította a Nobel-díjas Roger Guillemin és Andrew Schally (Burgus és mtsai, 1972; Matsuo és mtsai, 1971), majd ezután megkezdődött a homológ peptidek keresése a gerinctelen fajokban. A szupercsalád jelenleg 5 peptid családból áll: 1) gerinces GnRH; 2) adipokinetikus hormon (AKH); 3) corazonin (CRZ); 4) AKH/CRZ-hez kapcsolódó peptidek (ACP) és 5) gerinctelen GnRH/CRZ (korábbi nevén gerinctelen GnRH) (Tsai, 2018 összefoglaló). A kétoldalú szimmetriájú állatok 700 millió éves evolúciója alatt ezek a peptidek számos változáson mentek keresztül, amely során a gerinces GnRH a gerincesek reprodukciójának központi irányítójává vált (Tsai, 2018). A puhatestűekben a GnRH/CRZ és AKH családok találhatóak meg (Hauser és Grimmelikhuijzen, 2014; Tsai, 2018), a fejezet további részeiben csak a GnRH/CRZ családra fókuszálok.

Bár a puhatestűekben nem található homológ struktúra a gerinces hipotalamuszhoz, a gerinces GnRH homológjának jelenlétét már az 1990-es évek végén feltételezték ezekben a fajokban (Zhang és mtsai, 2000). Nem sokkal később az első peptidet – az octopus-GnRH-t (oct-GnRH) – 2002-ben azonosították a közönséges polipban (*Octopus vulgaris*) (Iwakoshi és mtsai, 2002). Az oct-GnRH elnevezésnek két oka volt: az aktív peptid szerkezetének hasonlósága a gerinces GnRH-hoz és az a megfigyelés, hogy a peptid stimulálta a gonádokban az LH felszabadulását (Iwakoshi és mtsai, 2002).

Mivel az oct-GnRH volt ez első leírt gerinctelen GnRH/CRZ peptid, nem volt más elérhető releváns szekvencia, amely filogenetikai betekintésre adott volna lehetőséget. Szerencsétlenségre, az oct-GnRH-nak nem tipikus C-terminális módosítása van, így az aktív peptid egy amidált glicin végű dodekapeptid (12 aminosav) és emiatt szerkezetileg hasonló a gerinces GnRH peptidekhez. Az aktív oct-GnRH-ról később kiderült, hogy szerkezetileg nagyon szokatlan, mivel a kagylók és csigák esetében az aktív GnRH/CRZ mindig undekapeptid (11 aminosav) (Roch és mtsai, 2014; Tsai, 2018). Ha az oct-GnRH egy tipikusabb 11 aminosavas GnRH/CRZ peptid lenne, akkor az első vizsgálatok során azt a következtetést vonták volna le, hogy a szekvencia hossza és konzerváltsága összességében ugyanolyan hasonlóná teszi a gerinces GnRH családhoz, mint a gerinctelen CRZ családhoz. A CRZ peptidet az amerikai csótányban (*Periplaneta americana*) írták le először és a szív működésre gyakorolt stimuláló hatása alapján nevezték el (Veenstra, 1989). A család tagjai multifunkcionális undekapeptidek az ízeltlábúakban (Hauser és Grimmelikhuijzen, 2014; Tsai, 2018). Valószínűleg a gerinces GnRH szerkezetéhez való hasonlóság miatt döntöttek úgy a szerzők, hogy megvizsgálják azt, hogy az oct-GnRH hatással van-e az LH szekréciójára. Érdekes megjegyezni, hogy az oct-GnRH-t akkor találták meg, amikor a szívfrekvenciát gyorsító peptideket vizsgálták az *O. vulgaris*-ban (Iwakoshi és mtsai, 2002), de a peptid mégsem ez alapján kapta a nevét. Mivel az oct-GnRH név arra utal, hogy a peptidnek ugyanaz, vagy hasonló funkciója van, mint a gerinces GnRH-nak, számos soron következő tanulmány – főleg a kagylók esetében – leginkább a reprodukció vizsgálatára fókuszált a peptidcsalád tagjainak vizsgálata során és folytatta a gerinctelen GnRH elnevezés használatát (Bigo et al., 2012; Iwakoshi-Ukena et al., 2004; Lindemans et al., 2011; Nagasawa et al., 2015c; Osada et al., 2013; Song et al., 2015; Stewart et al., 2016; Treen et al., 2012; Tsai et al., 2008; Tsai et al., 2010; Zhang et al., 2008).

A második GnRH/CRZ peptidet – az aplysia-GnRH-t (ap-GnRH) – a tengeri nyúlban (*Aplysia californica*) azonosították, a 11 aminosavas peptid elnevezése két kritériumon alapult: szerkezeti hasonlóság az oct-GnRH-hoz és egy limitált filogenetikai elemzés (Zhang et al., 2008). Mivel az oct-GnRH volt az egyetlen releváns peptid, amihez hasonlítani lehetett, az ap-GnRH nevezéktana gyakorlatilag ugyanazt az utat járta be. Ugyanígy, mivel az ap-GnRH filogenetikai vizsgálatához csak az oct-GnRH-t és a gerinces GnRH szekvenciákat lehetett használni, az elemzés csak annyit mutatott, hogy a gerinces GnRH család az oct-GnRH és az ap-GnRH testvér-csoportja.

A későbbi funkcionális tanulmányok eredményei ugyanakkor azt mutatták, hogy az azonosított **gerinctelen GnRH peptidek multifunkcionálisak és egyaránt felelősek**

reproduktív és nem reproduktív folyamatok szabályozásáért is, sőt nem minden puhatestű faj esetében vesznek részt a reprodukció irányításában (Iwakoshi-Ukena és mtsai, 2004; Jung és mtsai, 2014; Minakata és mtsai, 2009; Nagasawa és mtsai, 2015b; Tsai és mtsai, 2010). Továbbá az egyre szigorúbb, AKH, CRZ és ACP szekvenciákat is használó filogenetikai és filogenomikai elemzések demonstrálták, hogy a gerinctelen GnRH-nak elnevezett peptidek nincsenek szorosabb rokonságban a gerinces GnRH családdal, mint például a CRZ, AKH és ACP családokkal (Hauser és Grimmelikhuijzen, 2014; Plachetzki és mtsai, 2016; Roch és mtsai, 2014; Tsai, 2018). Az oct-GnRH és ap-GnRH receptorok azonosítását (Kanda és mtsai, 2006; Kavanaugh és Tsai, 2016) követő filogenetikai és filogenomikai elemzések pedig egyértelműen rávilágítottak arra, hogy a gerinctelen GnRH receptorok legközelebbi rokonai és ortológjai nem a gerinces GnRH receptorok, hanem a CRZ receptorok (Hauser és Grimmelikhuijzen, 2014; Kavanaugh és Tsai, 2016; Plachetzki és mtsai, 2016; Roch és mtsai, 2014; Tsai, 2018; Zandawala és mtsai, 2018).

Mindezek alapján, az eredetileg használt, reprodukcióban kiemelt szerepre utaló gerinctelen GnRH név nem megfelelő, mert nem tükrözi a peptidcsalád tagnainak funkcióját és evolúciós leszármazását. A jelenlegi konszenzus javaslat az, hogy **ezeket a peptideket a CRZ család tagjaiként kell azonosítani** (Tsai, 2018 összefoglaló).

2.3. Gonadotropin hormonok a puhatestűekben

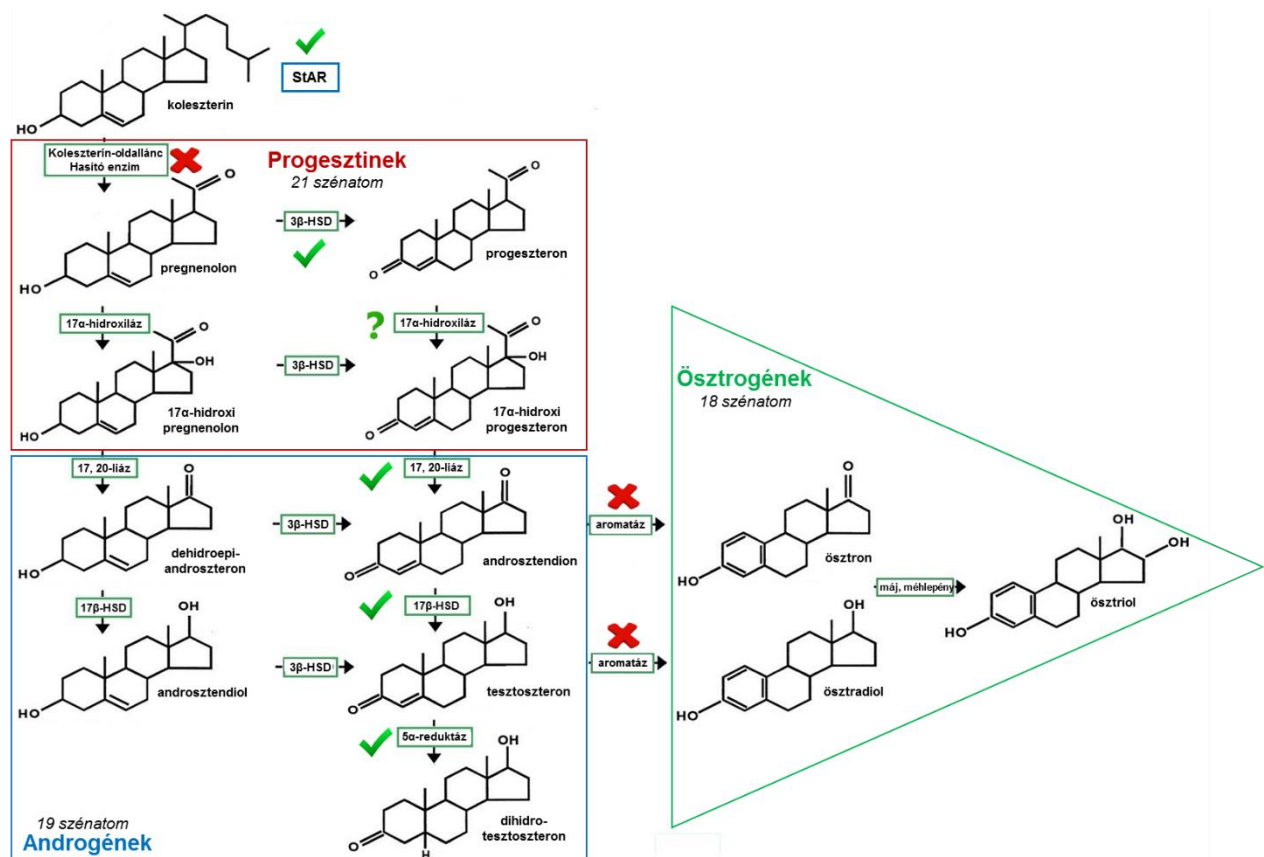
A puhatestűekben nincs homológ struktúra a gerinces hipofízishez, mivel az a gerinchúrosok fejlődése alatt történt genom duplikációkat követő neofunkcionalizálódás során alakulhatott ki (feltehetőleg ez vezetett a gerinces GnRH reprodukcióban betöltött központi szerepéhez is) (Roch és mtsai, 2011; Tsai és Zhang, 2008; Zhang és mtsai, 2018b). Továbbá, genomikai nézőpontból semmilyen bizonyítéka nincs annak, hogy a puhatestűeknek vannak gonadotropin hormonjai, mivel az FSH- és LH-specifikus alegységet kódoló gének a glikoprotein hormon család gerinces-specifikus tagjai (Dufour és mtsai, 2020). Mégis van néhány publikáció, ami azt állítja, hogy a gonadotropin hormonok jelen vannak a puhatestűekben, azonban ez a kijelentés pusztán anti-humán-FSH/LH antitesteket használó IHC vizsgálatokon alapszik (Nuurai és mtsai, 2020; Omran, 2012). Az IHC-t azonban rendkívül megbízhatatlan technikának tartják a fehérjék vizsgálatára (Baker, 2015b, 2015a; Bradbury és mtsai, 2015), különösen, ha gerinces fehérjék ellen készített antitesteket használnak a specifikus gerinctelen fehérjék azonosítására és/vagy lokalizációjának vizsgálatára. Összegezve, **nincs bizonyítéka annak, hogy endogén úton keletkező és funkcionálisan működő FSH és LH megtalálható a puhatestűekben.**

2.4. Szex szteroid szintézis a puhatestűekben

A gerincesekben a szex szteroidok (például P, T és E₂) a gonádokban szintetizálódnak. Bár ugyanolyan, vagy legalább hasonló karakterisztikájú endokrin sejtek nem találhatóak meg a puhatestűekben (Horiguchi és Ohta, 2020), a gerinces szex szteroidokat ki lehet mutatni bennük (Scott, 2012). Ugyanakkor számos, ha nem az összes szex szteroid endogén eredete erősen megkérdőjelezhető a puhatestűekben (Scott, 2012, 2018). Az állati szteroidok utolsó közös prekursora a koleszterin, ami egy 10 lépéses folyamat során épül fel a szkvalénből (Desmond és Gribaldo, 2009). A szintézisének eredete megelőzi az összajú-újszajú szévalást és széles körben elterjedt az eukarióta fajokban, csak néhány összajú (például rovarok, hengeresférgek) törzsben tűnt el másodlagos elvesztéssel az evolúció során (Markov és mtsai, 2017). A 27 szénatomos koleszterin az alapja a gerinces szex szteroidok szintézisének (2. ábra). A folyamat nagyon hasonló a katabolizmushoz és olyan termékeket („metabolitokat”) eredményez, amelyek 21 (progesztinek), majd 19 (androgének), majd 18 (ösztrogének) szénatomot tartalmaznak (2. ábra) (Payne és Hales, 2004). Ezeknek a szex szteroidoknak a jelenlétéről a kagyló, csiga és fejlábú szövetekben széles irodalom áll rendelkezésre (Fernandes és mtsai, 2011; Giusti és Joaquim-Justo, 2013; Janer és Porte, 2007; Scott, 2012, 2018). Ugyanakkor, a 2000-es évektől kezdve számos alkalommal igazolták, hogy 1) a környezet (beleértve a laboratóriumot is) több, mint elegendő felvehető szteroidot tartalmaz, 2) a puhatestűek nagyon könnyen fel tudják venni azokat a környezetből és 3) észterifikált formában hetekig-hónapokig is képesek tárolni őket (Scott, 2018). A szex szteroidok felvételének és raktározásának lehetőségét először csigákban írták le (Gooding és LeBlanc, 2001), majd ezt követően az elmúlt 20 évben számos alkalommal megerősítették különböző csiga és kagyló fajok vizsgálatával a megfigyelést (Dimastrogiovanni és mtsai, 2015; Giusti és Joaquim-Justo, 2013; Gooding és LeBlanc, 2001; Guercia és mtsai, 2017; Janer és mtsai, 2004; Janer és mtsai, 2005; Katsiadaki és mtsai, 2021; Labadie és mtsai, 2007; Le Curieux-Belfond és mtsai, 2005; Leblanc és mtsai, 2005; Peck és mtsai, 2007; Puinean és mtsai, 2006; Schwarz és mtsai, 2017a, 2017b, 2018). Továbbá azt is kimutatták, hogy a szintetikus etinil-ösztrodiol (EE₂) – ami egy tisztán ember alkotta termék és nagyon valószínűtlen, hogy az állatok meg tudják endogén úton szintetizálni – is kimérhető a környezetben gyűjtött csigák szöveteiben (Almeida és mtsai, 2020; Hallmann és mtsai, 2016; Lu és mtsai, 2001; Pojana és mtsai, 2007). Mindezek alapján, csak mert a szex szteroidok kimutathatóak a puhatestű szövetekben, nem lehet arra következtetni, hogy az állatok endogén úton maguknak szintetizálják azokat (Scott, 2018).

A koleszterin olyan mennyiségben van jelen a puhatestűekben, ami több, mint elég ahhoz, hogy prekuzorként szolgáljon a szteroidok szintéziséhez (Altelear és mtsai, 2005; Idler

és Wiseman, 1972; Scott, 2012). Arról viszont vita folyik, hogy melyik faj képes *de novo* szintetizálni a saját koleszterinjét, vagy azt szükséges a táplálkozás során megszereznie további felhasználásra (Scott, 2012), viszont ez a szteroid szintézis szempontjából lényegtelen, mivel mindkét forrásból származó koleszterin ugyanúgy felhasználható. Ugyanakkor nincs szilárd bizonyítéka annak, hogy a koleszterinből a gerincesekben leírt katabolikus módon szteroidok képződnek a puhatestűekben (Scott, 2012).



2. ábra: A gerinces szex szteroidok (progesztinek, androgének, ösztrogének) bioszintézis útvonala az egyes lépéseket katalizáló enzimekkel. Hat lépés/reakció – még ha néhány alacsony hatásfokkal is – úgy tűnik, hogy jelen van a puhatestűekben (zöld pipával és kérdőjellel jelölve). A koleszterin-oldallánc hasító enzim és az aromatáz génekét nem találták meg egyik puhatestű genomában sem (piros X-el jelölve). Rövidítések: HSD – hidroxiszteroid-dehidrogenáz.

A gerinces szex szteroidok szintézisében két típusú reakció vesz részt, az elsőnél két hidrogén atom beépülése, vagy eltávolítása történik (oxidoreduktáz reakciók), a második esetében oxigén atom beépülések vannak. Az első típusú reakció a pregnenolon (P5)-P átalakításnál (3β -hidroxiszteroid-dehidrogenáz [3β -HSD] katalizálja – két hidrogén atom eltávolítás a C-3 pozícióban lévő hidroxil csoportról), az androsztendion (Ad)-T, valamint az ösztron (E₁)-E₂ átalakításnál (17β -HSD – két hidrogén atom hozzáadás a C-17 pozícióban lévő oxo csoporthoz) és a T-dihidrotesztoszteron (DHT) átalakításnál (5α -reduktáz – két hidrogén atom hozzáadás a C-4 és C-5 közötti kettős kötés mindkét oldalához) fordul elő (2.

ábra). Az oxidoreduktáz reakciók viszonylag egyszerűek és könnyen demonstrálhatóak minden élőlényben és mindenféle vegyülettel (azaz nem csak a szteroidokkal). Az előfordulásukra a puhatestűekben szilárd bizonyíték van, az adott átalakítások számos fajban is kimutathatók (Scott, 2012) - például a P5-P az éti csigában (*Helix pomatia*), a *L. stagnalis*-ban és az *O. vulgaris*-ban (de Jong-Brink és mtsai, 1981; Di Cristo és mtsai, 2010; Krusch és mtsai, 1979), az Ad-T a pettyes éticsigában (*Helix aspersa*) (Le Guellec és mtsai, 1987), az E₁-E₂ és T-DHT az ehető kékkagylóban (*Mytilus edulis*) (Labadie és mtsai, 2007; Schwarz és mtsai, 2017b). Ugyanakkor - mivel a HSD enzimek részt vesznek más metabolikus útvonalakban is (például a lipidekében (Lima és mtsai, 2013)) - nincs arra bizonyíték, hogy ezek a reakciók egy olyan „specifikus” szteroid szintézis útvonal részét képezik, amely ekvivalens a gerincesekével. Ez azt jelenti, hogy bár azonosítottak homológokat a gerinces HSD enzimekhez a puhatestű genomokban, a szubsztrátjuk nem feltétlenül a szteroidok. Egy nemrég megjelent tanulmány például egyértelműen demonstrálta két csigafajban, hogy az 5 α -reduktáz farmakológiai gátlása jelentős rendellenességeket okozott a héj morfológiájában az embrionális fejlődés során (Baynes és mtsai, 2019).

A második típusú reakció viszonylag komplex, a katalizáló enzimek a citokróm P450 (CYP) családba tartoznak (Payne és Hales, 2004). A reakció a legegyszerűbb formájában egy oxigén atom közvetlen beépülését jelenti az adott szteroid vázába. A koleszterin-E₂ útvonalon azonban többszörös oxigén atom beépülések fordulnak elő, például a P5 szintézishez először egy-egy oxigén atomot kell rakni a C-20 és C-22 pozíciókra és aztán egy harmadik oxigén atom használatával elektrosztatikus repulzió során az első két oxigén atomot kell eltávolítani. A második típusú reakció a koleszterin P5 átalakításnál (koleszterin-oldallánc hasító enzim/CYP11A katalizálja), a P-Ad átalakításnál (17 α -hidroxiláz/17,20-liáz [CYP17]) és a T-E₂ átalakításnál (aromatáz/CYP19A) fordul elő (2. ábra). Jelenleg nincs bizonyíték arra, hogy a gerinctelenek képesek a koleszterin-oldallánc hasítására, illetve a CYP11A gént nem találták meg egyik gerinctelen genomban sem (Fodor és mtsai, 2020a; Fodor és Pirger, 2022; Markov és mtsai, 2009; Markov és mtsai, 2017; Scott, 2012). Mivel a rovarok vedlési hormonjának C-20 és C-22 pozíciójában található hidroxil csoport, lehetséges, hogy egy hasító enzim részben kifejlődhetett, amikor a rovar és gerinces vonal szétvált. Ez magyarázhatja azt, hogy miért írtak le egy „részleges fehérje egyezést” a CYP11A-hoz a *M. edulis*-ban (Blalock és mtsai, 2018). Ugyanakkor ez erősen spekulatív, mivel a növények szintén képesek hidroxil csoportot kialakítani ezekben a pozíciókban (Ohnishi, 2018). A P-Ad átalakításra úgy tűnik képesek a puhatestűek is (Fernandes és mtsai, 2011; Scott, 2012). Továbbá a CYP17 homológja is megtalálható a puhatestű genomokban (Goldstone és mtsai, 2015; Guo és mtsai, 2010; Guo és

mtsai, 2013; Thitiphuree és mtsai, 2019; Thongbuakaew és mtsai, 2016; Zanette és mtsai, 2010), de az aminosav szekvenciája nagyon eltér a gerinces CYP17-től és még nem vizsgálták, hogy képes-e 17α -hidroxilációra és az azt követő oldalánc hasításra. Több, kagylókon és csigákon végzett tanulmány alapján – habár igen alacsony hatásfokkal - képesek a puhatestűek a T-E₂ átalakításra („aromatáz aktivitás”) (Hallmann és mtsai, 2019; Le Curieux-Belfond és mtsai, 2001; Matsumoto és mtsai, 1997; Morcillo és Porte, 1999), ugyanakkor a gerinces CYP19A gén homológja nem található meg a puhatestű genomokban (Callard és mtsai, 2011; Castro és mtsai, 2005; Fodor és mtsai, 2020a; Fodor és Pirger, 2022; Markov és mtsai, 2017; Mizuta és Kubokawa, 2007; Scott, 2012). Ennek ellenére több tanulmány is arra a következtetésre jutott, hogy a CYP19A megtalálható a kagylók és csigák szöveteiben (Matsumoto és mtsai, 1997; Osada és mtsai, 2004; Prisco és mtsai, 2017; Rosati és mtsai, 2019), de ez csak anti-humán CYP19A antitesteket használó IHC vizsgálatokon alapszik, amelyek – ahogy az FSH és LH esetében is – erősen megkérdőjelezhető bizonyítékok. A CYP19A gén hiányának ellenére nyomokban kimutatható E₂ produkció valószínű magyarázata az enzim promiskuitás jelensége (Atkins, 2015; Lathe és mtsai, 2015). Ugyanúgy, ahogy a HSD-k egynél több szubsztrátot képesek felismerni (és ahogy az antitestek egynél több liganddal is keresztreakcióba léphetnek), nem kizárt, hogy egyik vagy másik (még azonosításra váró) puhatestű CYP enzim gyenge affinitással rendelkezik a T vagy Ad iránt, ami lehetővé teszi számukra, hogy végrehajtsák az E₂-vé alakítást. Hasonló „cross talk”-ot a gerinces CYP11A és CYP17 között is kimutattak már (Atkins, 2015; Lathe és mtsai, 2015).

Összefoglalva, az eddig vizsgált puhatestű fajokban kapott eredmények alapján a **gerinces szex szteroid szintézis útvonal három kulcsfontosságú lépése (koleszterin-oldallánc hatítás, 17α -hidroxiláció és aromatizáció) hiányzik, vagy nagyon gyenge aktivitással fordul csak elő a puhatestűekben. Továbbá, az első és harmadik reakciót katalizáló gerinces enzimek génjeinek homológja nem található meg a puhatestű genomokban.**

2.5. A puhatestűekben leírt szex szteroid receptorok

A szintetizált szex szteroidok mellett a receptorokra is szükség van a HPG tengely működéséhez (Kaprara és Huhtaniemi, 2018). A releváns fő gerinces receptorok az ER, az androgén (AR) és a progeszteron receptorok (PR), mindegyiknek van membrán (a teljes készlet kb. 5%-a; például mPR) és nukleáris (például nPR) formája (Levin és Hammes, 2016). A hatásukat genomi mechanizmusokon keresztül kifejtő nukleáris receptorokkal ellentétben a membrán típusúak sejtfelszíni receptorok és gyorsan fejtik ki hatásukat az intracelluláris

jelátviteli kaszkádok modulálásával. A nukleáris formák a nukleáris receptorok harmadik alcsaládjába (NR3) tartoznak és közös jellemzőjük, hogy 7 funkcionális domént (A-F) tartalmaznak – például a C domén felelős a DNS kötésért, az E domén pedig a ligandkötésért (Levin és Hammes, 2016).

A jelenlegi teória az, hogy az ősi szteroid receptorból egy gerinchúros-specifikus ősi génduplikációt követően alakultak ki az NR3A (nER) és NR3C (nPR, nAR) receptor családok a gerincesekben. Ez megmagyarázza, hogy miért nem találtak homológ szekvenciát a gerinctelenekben az nPR és nAR génekkel (1. táblázat). Számos puhatestűben leírtak azonban egy nukleáris receptor szekvenciát, amelynek C doménje nagy homológiát mutat a gerinces nER α génnel (Függelék 1.), így „puhatestű nER”-nek (NR3D) nevezték el (Thornton és mtsai, 2003). Ugyanakkor számos alkalommal demonstrálták a kagylókban, csigákban és polipokban, hogy a „puhatestű nER”-ek nem kötnek meg sem ösztrogént sem más szex szteroidot - azaz nem funkcionális nER-ek (Bannister és mtsai, 2013; Hultin és mtsai, 2014; Keay és mtsai, 2006; Ma és mtsai, 2019; Markov és mtsai, 2008; Markov és mtsai, 2009; Matsumoto és mtsai, 2007; Nagasawa és mtsai, 2015b; Pirger és mtsai, 2018; Simakov és mtsai, 2013; Stange és mtsai, 2012; Taubenheim és mtsai, 2021; Thornton és mtsai, 2003; Tran és mtsai, 2016).

1. táblázat. A gerinces szex szteroidok receptor-mediációjában részt vevő fehérjék homológjai a puhatestűekben. A membrán és membrán-asszociált receptorok közül csak a progeszteron percepcióhoz releváns fehérjéket tartalmazza a táblázat. Zöld szín jelzi a homológ szekvencia meglétét, piros szín a hiányát.

Gerinces receptor/fehérje	nER	nAR	nPR	mPR α	mPR β	mPR γ	mPR δ	mPR ϵ	PGMRC1	PGMRC2	neudesin	neuferricin
Puhatestű homológ	zöld	piros	piros	piros	zöld	zöld	piros	piros	zöld	piros	zöld	zöld

A membrán receptorok közül az mPR szekvenciák puhatestű homológjaival foglalkozó publikációk találhatóak meg az irodalomban. A gerinces mPR receptorok (mPR α , mPR β , mPR γ , mPR δ és mPR ϵ) a progesztin és adiponektin Q receptor családba tartoznak (Thomas és mtsai, 2007). Hosszú ideig úgy gondolták, hogy ezek a szekvenciák csak a gerinchúrosokban vannak meg (Thomas és mtsai, 2007). Azonban egy nem rég megjelent átfogó tanulmány szerint bár a puhatestűekben nem található mPR α homológ (ami a legtöbb mPR funkciót látja el a gerinces sejtekben), található bennük homológ szekvencia az mPR β és mPR γ génekhez (1. táblázat) – ezeket a szekvenciákat eddig kagylókban írták le (Ren és mtsai, 2019). Fontos megjegyezni, hogy ezeknek a puhatestű szekvenciáknak a progeszteron-kötő képességét még nem vizsgálták és a jelenlétük – hasonlóan a „puhatestű nER-hez” – nem feltétlenül jelenti ugyanazt a funkciót, mint a gerincesekben. Ez a jelenség – úgynevezett „nominatív

determinizmus” – egy nagy probléma a gerinctelen kutatásokban. Egyszerűen magyarázva, vannak DNS/fehérje szekvenciák a gerinctelenekben, amelyek homológok gerinces hormonokhoz, receptorokhoz és enzimekhez. Ezeknek a gerinctelen fehérjéknek mindig olyan neveket adnak, amelyek leírják a gerincesekben betöltött funkciójukat, és így azt sugallják a kutatóknak, hogy ha ennek a fehérjének „x” neve és funkciója van a gerincesekben, akkor az adott gerinctelen fajban is az „x” funkcióval kell rendelkeznie.

A gerincesekben van továbbá négy membrán-asszociált progeszteron receptor: a progeszteron receptor membrán komponens 1 (PGRMC1), PGRMC2, neudezin és neuffericin - háromnak van homológja a puhatestűekben (1. táblázat) (Ren és mtsai, 2019). Ezek közül a legvizsgáltabb a PGRMC1, de úgy tűnik a gerincesekben sem köt P-t, csak az mPR-ek „chaperon”-jaként funkcionál (Cahill és mtsai, 2016; Gonzalez és mtsai, 2020; Pang és mtsai, 2013; Ren és mtsai, 2019; Thomas és mtsai, 2007; Thomas és mtsai, 2014).

Több korábbi tanulmány a *Mytilus* fajok hemocitáinak vizsgálatával próbálta igazolni az ösztrogének membrán receptorokon keresztüli gyors (néhány másodperc – néhány perc) hatását a kagylókban (Balbi és mtsai, 2019). Ezek a munkák demonstrálták, hogy a hemocitákban az E₂ gyorsan lizoszomális membrán instabilitást indukált, intracelluláris reaktív oxigén származékok termelését okozta, valamint lizozim felszabadulást és nitrogén-oxid termelést okozott; az azonosított háttérmechanizmusok – amelyek hasonlóak voltak az emlős sejteken kapott eredményekhez – között volt a citoszolikus Ca²⁺felszabadulás, MAPK és PKC aktiválás, vagy a CREB foszforiláció (Canesi és mtsai, 2004; Canesi és mtsai, 2006; Canesi és mtsai, 2007a; Canesi és mtsai, 2007b). Ezen eredmények robusztusságának megítélése nélkül (például nem specifikus antitestek) szeretném kiemelni, hogy a lizoszomális membrán destabilizáló hatás az egyetlen amit eddig megfelelően validáltak. Ugyanakkor ez – ahogy a cikk szerzői is kiemelték – inkább egy klasszikus “immunválasz”, mintsem egy “endokrin válasz” (Balbi és mtsai, 2019). Jelenleg nincs arról információ, hogy a puhatestűekben az E₂ specifikus membrán receptor(ok)hoz kapcsolódik-e, vagy más molekulák receptoraihoz (keresztreakció), vagy van-e egyáltalán bármilyen receptor a folyamatban.

Mindezek alapján kijelenthető, hogy **nincs szilárd bizonyíték arra, hogy a puhatestű fajok rendelkeznek funkcionális nukleáris, vagy membrán szex szteroid receptorokkal.**

2.6. Gerinces szex szteroid indukálta hatások a puhatestűekben

A szex szteroid szintézisben és receptor-mediációban résztvevő több kulcsgén hiányának ellenére számos olyan tanulmányt publikáltak, amelyben leírták, hogy a gerinces szex szteroidoknak kitett puhatestűek különböző viselkedési-, morfológiai-, sejtes- és molekuláris

szintű változásokat mutatnak - tipikus példák a fekunditás, kikelési ráta, gonád méret és különböző biomarkerek (például vitellogenin) mennyiségi változása (Balbi és mtsai, 2019; Pirger és mtsai, 2018; Scott, 2013; Tran és mtsai, 2019). Ugyanakkor az ismétlések hiánya, a megkérdőjelezhető végpontok, a hatások alacsony mértéke, vagy a dózisfüggés hiánya miatt a legtöbb ilyen publikációban bemutatott adatok megbízhatósága megkérdőjelezhető (Scott, 2013). Felmerül a kérdés, hogy **mi a hatásmechanizmus** azokban az esetekben, amikor a publikációkban valós hatásokat írtak le. A fentiek alapján a puhatestűekben három lehetséges módja van a szex szteroidok indukálta viselkedési- és sejtes változásoknak: 1) specifikus hatás a membrán szex szteroid receptorokon keresztül; 2) aspecifikus ligand-receptor útvonal (más molekulák receptorain a tárgyalt promiszkuitás következtében); 3) a felvett szex szteroidok metabolizálásával járó biokémiai és fiziológias folyamatok anyag és energia re-allokációt igényelnek, ami különböző szintű változásokban megjelenhet.

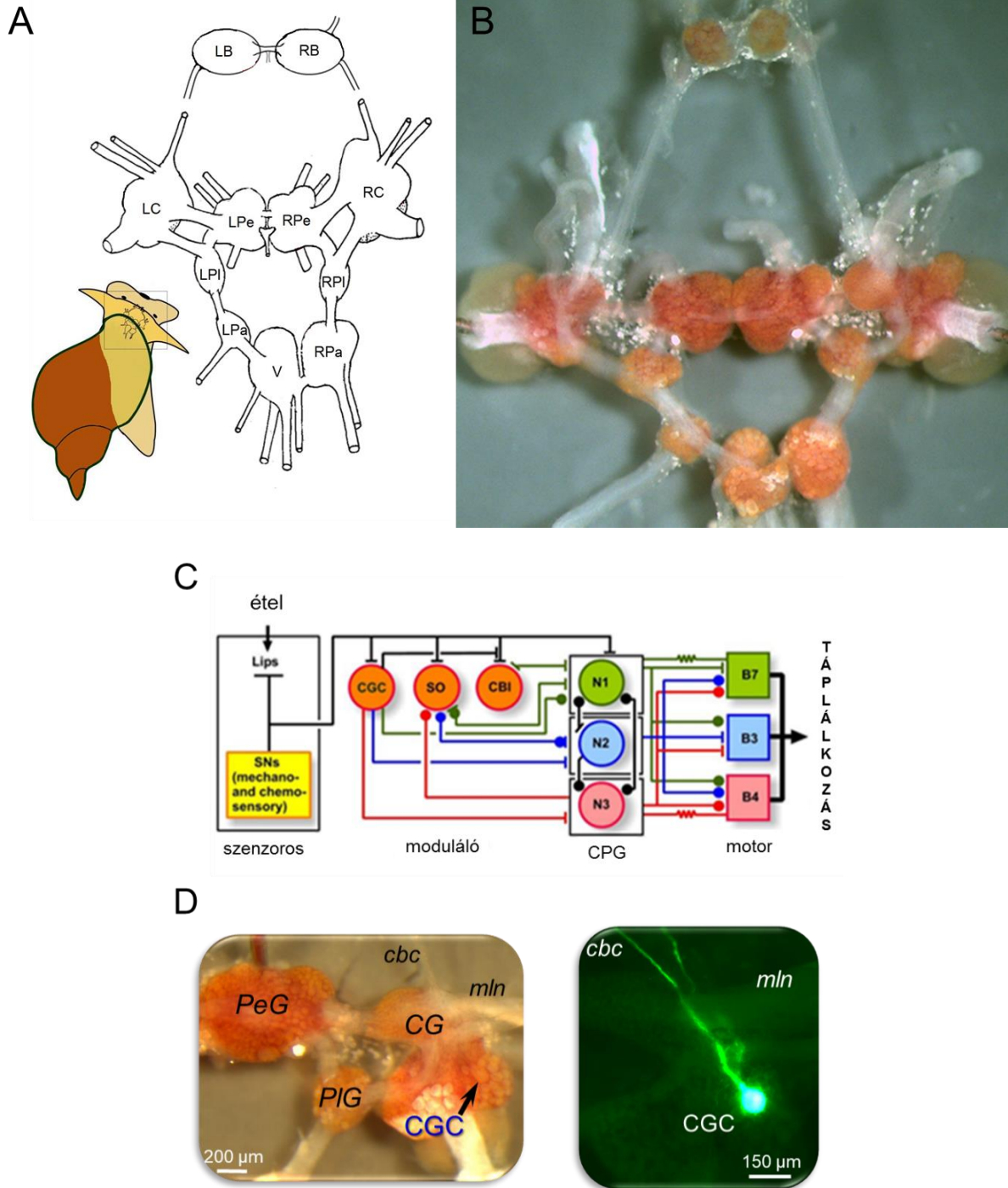
2.7. A nagy mocsári csiga (*Lymnaea stagnalis*), mint gerinctelen modellállat a neurobiológiai és neuroendokrinológiai vizsgálatokban

Az *A. californica* modellen végzett vizsgálatok során kapott eredményekre (Bailey és mtsai, 1996; Benjamin és mtsai, 2021; Kandel, 2001, 2016 összefoglalók) alapozva a nagy mocsári csigát (*L. stagnalis*) (3. ábra) az 1970-es évek óta széles körben használják neurobiológiai modellállatként az idegrendszer működésének megértéséhez (Fodor és mtsai, 2020b összefoglaló). Az elmúlt 50 évben igen kedvelt modellje volt például a különböző asszociatív paradigmák (például klasszikus jutalmazásos kondicionálás) által indukált tanulási folyamatok, a (kognitív) öregedés, valamint a neuroendokrinológiai (és releváns reprodukciós) folyamatok vizsgálatának (Benjamin és Kemenes, 2010; Benjamin és Crossley, 2020; Benjamin és mtsai, 2021; Di Cristo és Koene, 2017; Fodor és mtsai, 2020a; Fodor és mtsai, 2020b; Fodor és mtsai, 2021b; Koene, 2010; Nakai és mtsai, 2022; Rivi és mtsai, 2020; Rivi és mtsai, 2021). Ezenkívül olyan tudományterületeken is alkalmazzák, mint például az ökotoxikológia, fejlődésbiológia és evolúciobiológia (Abe és Kuroda, 2019; Amorim és mtsai, 2019; Davison és mtsai, 2016; Fodor és mtsai, 2020b; Hoffer és mtsai, 2017; Hohagen és Jackson, 2013; Ivashkin és mtsai, 2015; Kuroda, 2014, 2015; Svigruha és mtsai, 2021a; Vehovszky és mtsai, 2015). Ennélfogva a *L. stagnalis*-ről igen széleskörű ismeretanyag áll rendelkezésre a viselkedési mintázatokról a neurális hálózatokon át a kulcsmolekulák szintjéig, így a modellállaton végzett vizsgálatok nagyon jó lehetőséget adnak arra, hogy különböző biológiai szinteket integrálva vizsgáljunk egy adott biológiai problémát, kérdést és jelenséget.



3. ábra: Felnőtt nagy mocsári csiga (*Lymnaea stagnalis*).

A *L. stagnalis* a csigák osztályába (Gastropoda), a tüdőcsigák rendjébe (Pulmonata), és a Lymnaeidae családba tartozó széles körben elterjedt csigafaj (Benjamin, 2008; Fodor és mtsai, 2020b összefoglalók). Megtalálható Észak-Amerikában, Európában, valamint Ázsia és Ausztrália egyes részein (Amorim és mtsai, 2019; Atli és Grosell, 2016; Zhang és mtsai, 2018c). Még a növényzetben gazdag álló- és lassú folyású vizekben, folyókban és tavakban, táplálékaul szerves üledék, alga és növényi zöld, de olykor foszló állati tetem is szolgálhat, ragadozói pedig lehetnek a piócák, rákok és halak (Dalesman és Lukowiak, 2012; Lance és mtsai, 2006). A természetben az egyedek egész évben aktívak, de jellemzően tavasztól késő ősziig szaporodnak (Nakadera és mtsai, 2015). Nincs jól definiálható nappali-éjszakai ritmusuk, de alvásszerű viselkedést mutatnak (Stephenson és Lewis, 2011), valamint a petezsákokat általában napközben rakják le (Ter Maat és mtsai, 2012). Színük világos-sötétbarna, spirális meszes házuk hossza elérheti az 55 mm-t (Benjamin, 2008). Erősen oxigenizált vízben közvetlenül is képesek felvenni az oxigént a testüket kívülről borító bőrízomtömlőjükön keresztül, de amikor az oldott oxigénszint csökken, átállnak a pneumostomának nevezett légzőnyíláson keresztül a „tüdő” légzésre (Lukowiak és mtsai, 1996). Köztes gazdaként szolgál egyes parazitáknak, mint például laposférgeknek, amelyek olyan betegségekért felelősek, mint a *fascioliasis* (májmetyélféreg fertőzés) és a *cercarialis dermatitis* az emberek esetében (Adema és mtsai, 1994; Davison és Blaxter, 2005; Ferte és mtsai, 2005; Nunez és mtsai, 1994; Skala és mtsai, 2020).



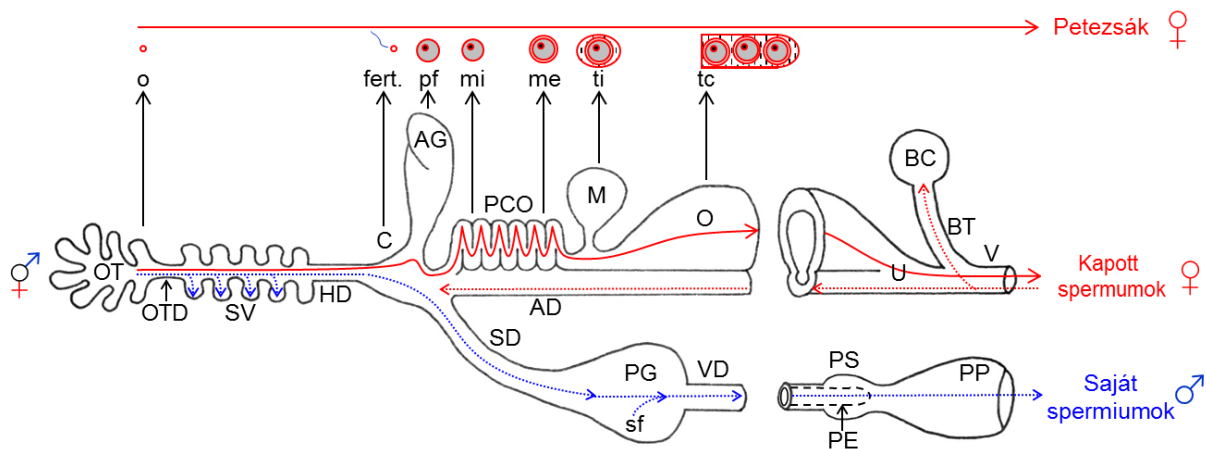
4. ábra: A *L. stagnalis* sematikus (dorzális nézet) (A) és kipreparált (B) CNS-e, amely a páros bal és jobb oldali pofa- (LB, RB), agyi- (LC, RC), láb- (LPe, RPe), köpeny- (LPI, RPI), fali- (LPa, RPa) és a páratlan zsiger- (V) dúcokból áll. A pigmentált, narancssárga színű neuronok az idegdúcok felszínén helyezkednek el. (C) A számbeli egyszerűség lehetővé teszi a gerincesekhez hasonló viselkedéseket irányító specifikus neurális hálózatok azonosítását, mint a táplálkozási hálózat. (D) Az idegsejtek többnyire könnyen elérhetőek és egyedileg azonosíthatóak, tipikus példa a táplálkozási hálózat agyi óriás interneurona (CGC). Rövidítések: CPG – központi mintázat generátor; agydúc-pofadúc konnektívum; mln - medián ajakideg (Benjamin, 2008; Fodor és mtsai, 2020b összefoglalók alapján, módosítva)

Összehasonlítva a neurobiológia gerinces és más gerinctelen modellállataival - például *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster*, *Mus musculus* -, a *L. stagnalis* CNS-e (4A, B ábra) viszonylag kisszámú neuront (~25000) tartalmaz (Benjamin, 2008; Fodor és mtsai, 2020b; Fodor és mtsai, 2021b; Kemenes és Benjamin, 2009; Wood és mtsai, 2021). Ez a számbeli egyszerűség lehetővé teszi a jól definiált, gerincesekhez hasonló viselkedéseket (például táplálkozás, légzés, kockázatvállalás, tanulás) irányító specifikus neurális hálózatok azonosítását (például táplálkozási neuronhálózat – 4C ábra) (Benjamin, 2008; Crossley és mtsai, 2018; Fodor és mtsai, 2020b; Kemenes és Benjamin, 2009; Pirger és mtsai, 2014; Pirger és mtsai, 2021; Syed és mtsai, 1990; Syed és Winlow, 1991). Továbbá, az említett modellekhez viszonyítva a *L. stagnalis* neuronjai többnyire nagy méretűek (átmérő: 30-150 μm) és a narancssárgás színű, világosan pigmentált sejttestük lokalizációja általában a 11 idegdúc felszínén jellemző (4B ábra) - így könnyen elérhetőek és egyedileg azonosíthatóak (tipikus példa az agyi óriás sejt [CGC] – 4D ábra) morfológiai, elektrofiziológiai és molekuláris vizsgálatokhoz (például (Crossley és mtsai, 2016, 2018; de Hoog és mtsai, 2019; El Filali és mtsai, 2015; Fodor és mtsai, 2020b; Harris és mtsai, 2012; Kemenes és mtsai, 2011; Pirger és mtsai, 2014; Pirger és mtsai, 2021; Samu és mtsai, 2012; Vehovszky és Elliott, 1995; Vehovszky és mtsai, 2000; Wagatsuma és mtsai, 2005; Wood és mtsai, 2021; Zhang és mtsai, 2018a). A CNS-ben számos neurotranszmittert (például szerotonin [5-HT], dopamin, hisztamin, glutamát) és több, mint 100 neuropeptidet (például APGWa, FMRFa, conopressin) azonosítottak és vizsgáltak (Benjamin és Kemenes, 2013, 2020; Croll és mtsai, 1999; Elekes és mtsai, 1991; Elekes és mtsai, 1993; Filla és mtsai, 2009; Fodor és mtsai, 2020b; Hatakeyama és mtsai, 2007; Hatakeyama és mtsai, 2010; Hegedus és mtsai, 2004; Kemenes és mtsai, 1989; Voronezhskaya és mtsai, 1999).

A *L. stagnalis* életciklusáról és szaporodási biológiájáról széles ismeretanyag áll rendelkezésre (Di Cristo és Koene, 2017; Ivashkin és mtsai, 2015; Koene, 2010; Mescheriakov, 1990; Morrill, 1982). Laboratóriumi körülmények között magas fekunditás jellemzi, az egyedek egész évben hetente 2-3 darab petezsákot képeznek, amelyek 100-150 megtermékenyített petét (zigótát) tartalmaznak az egyed korától, testméretétől és kondíciójától függően (Nakadera és mtsai, 2014). A természetes populációkra mérsékeltebb fekunditás jellemző (Nakadera és mtsai, 2017) és a legtöbb egyed a tavaszi és nyári időszakban születik (Nakadera és mtsai, 2015). A tartási kondícióktól függően az embriók 11-15 napig fejlődnek az átlátszó kapszulákban (tojás), amelyek az átlátszó, kocsonyás masszájú petezsákban vannak elhelyezve (Ivashkin és mtsai, 2015). Laboratóriumi körülmények között a kikelési ráta 90% fölött van (Hoffer és mtsai, 2017). Az egyedek körülbelül 2 hónap alatt érik el az ivarérettséget,

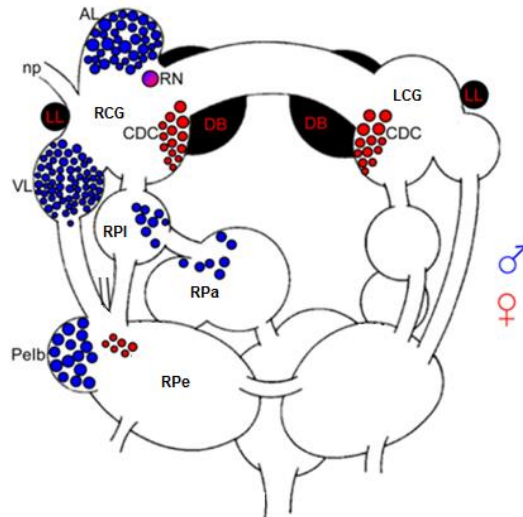
ennek pontos időpontja olyan külső környezeti tényezőktől is függ, mint a hőmérséklet, a fotoperiodicitás, az elérhető táplálék mennyisége, vagy az élőhely típusa (Fodor és mtsai, 2020b; Koene és Ter Maat, 2004; Koene, 2010). Egyes tanulmányok alapján az egyedek maximális várható élettartama egy év a természetben és két év a laboratóriumban (Janse és mtsai, 1988; Nakadera és mtsai, 2015), de más tanulmányok szerint több év is lehet a természetben (Berrie, 1965; Boag és Pearlstone, 1979) és 2,5 év a laboratóriumban (Hermann és mtsai, 2014; Watson és mtsai, 2013).

A *L. stagnalis* egy szimultán hermafrodita (hímnős), a szervezetében egyidejűleg jelen van egy funkcionális hím és egy funkcionális nőstény reprodukciós rendszer (5. ábra) (Koene, 2010 összefoglaló). Igazoltan képes az önmegtermékenyítésre is izolált körülmények között, de elsősorban más egyedekkel párosodik (Nakadera és mtsai, 2014). A két funkcionális nem ellenére az egyedek unilaterálisan párosodnak, azaz egy párzási esemény során az egyik egyed kizárólag hímként, a másik pedig kizárólag nőstényként viselkedik (Hoffer és mtsai, 2017). Nincs mindenképpen felcserélődés a nemi szerepekben, de ha mindkét egyed hímként motivált, akkor a nemi szerepek felcserélődhetnek egy második kopuláció során (Koene, 2010; Ter Maat és mtsai, 2012; Van Duivenboden és Ter Maat, 1985).



5. ábra: A *L. stagnalis* reproduktív rendszerének anatómiai felépítése. A kék szaggatott vonal az egyedek saját hímvarsejtjeinek útját, a piros szaggatott vonal a más egyedektől kapott hímvarsejtek sorsát, míg a piros folytonos vonal az egyedek petesejtjeinek útját jelzi. A nagy betűk a reproduktív rendszer szerveit, a kis betűk pedig a petezsák alkotóit reprezentálják. Rövidítések: OT – hímnős mirigy; OTD – hímnős mirigy vezetéke; SV – szeminális vezikulumok; HD – hermafrodita vezeték; C – megtermékenyítési kamra; SD – spermium vezeték; sf – szeminális folyadék; PG – prosztata mirigy; VD – vas deferens; PE – pénisz; PP – preputium; fert – megtermékenyítés; AG – albumin mirigy; pf – perivitellin folyadék; PCO – kanyarulat csatorna; mi – membrana interna; me – membrana externa; M - nyákelválasztó mirigy; ti - tunica interna; O - tojástok mirigy; tc - tunica capsulis; U – uterus; BC – közösülő tasak; V – vagina. (Koene, 2010 összefoglaló alapján, módosítva)

A hím és a nőstény reprodukciót szabályozó idegrendszeri elemek pontosan elkülönülnek az egyedek CNS-ében (6. ábra) (Koene, 2010). Ezekben összesen 13 olyan peptid/protein prekursor termelődik, amely részt vesz a reprodukció irányításában, a róluk keletkező 56 aktív peptidből 39-nek ismert a szerepe (2. táblázat) (Benjamin és Kemenes, 2013, 2020; Koene, 2010; Wood és mtsai, 2021 összefoglalók).



6. ábra: A *L. stagnalis* CNS-ének sematikus reprezentációja (Di Cristo és Koene, 2017; Koene, 2010 összefoglalók alapján, módosítva), csak a reprodukció szempontjából releváns idegdúcok, neuronok és neuron csoportok vannak feltüntetve. A kézzel jelölt neuronok felelősek a hím ivarrendszer, míg a pirossal jelölt neuronok/idegi elemek felelősek a nőstény ivarrendszer szabályozásáért. A szabályozás alapvetően számos neuropeptid hatásának szinkronizálásával valósul meg. Rövidítések: RCG – jobb oldali agydúc; LCG – bal oldali agydúc; RPI – jobb oldali köpenydúc; RPa – jobb oldali fali dúc; RPe – jobb oldali lábdúc; AL – anterior lebeny; VL – ventrális lebeny; LL – laterális lebeny; np – péniszideg; RN – gyűrűneuron; DB – dorzális testek; CDC – caudodorzális sejtek; Pelb – lábdúc Ib neuron csoportja

2. táblázat. A hím és nőstény reprodukció irányításában résztvevő peptid/protein prekursorok listája a róluk keletkező aktív peptidekkel és a hatásaikkal. Rövidítések: CG – agydúc; CDC – caudodorzális sejtek; LGC – „light green” sejtek; al – anterior lebeny; vl – ventrális lebeny; RN – gyűrűneuron; RPeG – jobb oldali lábdúc; RPIG – jobb oldali köpenydúc; RPaG – jobb oldali fali dúc; sz.n. – szörványos neuronok; ll – laterális lebeny (Koene, 2010 összefoglaló alapján)

Prekursor	Aktív peptid	Hatás	Termelő neuron/ neuron csoport
CDCH	Nt	ismeretlen	CG - CDC
	CDCH	ovuláció elindítása; RPeG motoneuronok gátlása; CDC autoexcitáció; perivitellin termelés stimulálása; gyűrűneuron gátlása	
	CaFI	Albumin mirigy működésének stimulálása	
	α -CDCP	CDC autoexcitáció; párzási viselkedést irányító motoneuronok stimulálása	
	β 1-CDCP	ismeretlen	
	β 2-CDCP	ismeretlen	
	β 3-CDCP	párzási viselkedést irányító motoneuronok stimulálása	
	γ -peptid	ismeretlen	
	δ -peptid	ismeretlen	
ε -peptid	ismeretlen		
CTP	ismeretlen		
Schistosomin	Schistosomin	LGC autoexcitációja	CG - LGC
APGwa	APGWamid	Preputium evertiója; pretúium retrakter izmának ellazítása; conopressin hatásának gátlása; CDC és LGC hiperpolarizáció	CG – al, vl, RN; RPeG - Ib
	CALP	ismeretlen	

GnRH/CRZ	GnRH/CRZ	pénisz komplex szabályozása; ovuláció indítása	CG – al, vl, CDC
Conopressin	Conopressin	CDC aktivitás gátlása; vas deferens kontrakció stimulálása	CG – al, vl
	Neurofizin	nincs szerepe a reprodukcióban	
Myomodulin	GLQMLRLa	preputium retraktor izmának ellazítása; retraktor izom kontrakció amplitúdójának modulálása	CG – vl
	QIPMLRLa		
	SMSMLRLa		
	SLSMLRLa		
	PMSMLRLa		
Pedal peptid	Pedal peptid	ismeretlen	CG – al, vl; RPIG és RPaG – sz.n.
Neuropeptid Y	Neuropeptid Y	peterakás gátlása; preputium retraktor izmának ellazítása	CG – al, vl; RPeG – Ib; RPIG és RPaG – sz.n.
	CTP		
FMRFa 1	FLRFamid	preputium retraktor izmának kontrakciója	CG – vl
	pQFYRIa	ismeretlen	
	SEEPLY	ismeretlen	
	FMRFa	Preputium everziója; preputium retraktor izmának kontrakciója	
	EFLRIa	ismeretlen	
FMRFa 2	SDPFLRFa	preputium retraktor izmának ellazítása	RPIG és RPaG – sz.n.
	GDPFLRFa	preputium retraktor izmának ellazítása	
	SDPYLRFa	ismeretlen	
	SKPYMRFa	ismeretlen	
	Acidic peptid	ismeretlen	
	P1	ismeretlen	
	P2	ismeretlen	
Gátló peptid	LIP-A	preputium retraktor izmának ellazítása; retraktor izom kontrakció amplitúdójának modulálása	CG – vl; RPIG és RPaG – sz.n.
	LIP-B		
	LIP-C		
LFRFa	NTLFRFa	CDC és LGC működésének gátlása	CG – II
	QGSFLRFa		
	GGSLFRFa		
	GTLLRFa		
	TLFRFa		
FVRI	ASSFVRIa	vas deferens kontrakció gátlása	CG – al; RPeG – Ib; RPIG és RPaG – sz.n.
	SPSSFVRIa		
	PNSFLRIa		
	YPMNRFIRIa		
	ASNFVRIa		
	LSSFVRIa		
	NPSSFVRIa		
	SSREGQSSFVRIa		
	MNKFLRIa		
	PSSFVRIa		
	GSAFVRIa		
	ASHFVRIa		
	IPSSAFVRIa		

A gerinces GnRH homológjának jelenlétét már korábban feltételezték a *L. stagnalis*-ban (Koene, 2010; Young és mtsai, 1999), de eddig nem volt olyan tanulmány, amely ezt megerősítette volna, vagy funkcionálisan vizsgálta volna a peptidet. Egy régebbi publikációban leírták a 3β -HSD enzim által katalizált P5-P átalakulást a modellállatban (de Jong-Brink és mtsai, 1981), de **mindeddig nem volt olyan (funkcionális) tanulmány, amely részletesen vizsgálta volna azt, hogy a *L. stagnalis* képes-e a szex szteroid szintézis útvonal adott lépéseire, illetve azt, hogy a szex szteroid szintézisben és receptor-mediációban résztvevő gének megtalálhatóak-e benne.** Több tanulmány is bemutatta, hogy a környezetben megtalálható **progesztogén típusú hatóanyagok (P és szintetikus analógjai) befolyásolják a *L. stagnalis* reprodukív és nem reprodukív folyamatait (Svigruha, 2021; Svigruha és mtsai, 2021a; Zrinyi és mtsai, 2017; Zrinyi, 2017), de a pontos hatásmechanizmus még nem tisztázott.**

3. CÉLKITŰZÉS

Az irodalmi áttekintésben bemutatott hipotézisek és megválaszolatlan kérdések alapján munkánk fő célja az volt, hogy kísérletes úton részletesen elemezzük a nagy mocsári csiga (*L. stagnalis*), mint puhatestű modellállat neuroendokrin rendszerét funkcionális és evolúciós szempontok alapján. Eredményeinkkel hozzá kívántunk járulni a puhatestűek neuroendokrin és reprodukciós rendszerének kialakulásának és szabályozó folyamatainak pontosabb megértéséhez, egyben alapokat nyújtani a neuroendokrin szabályozás egyes általános törvényszerűségeinek pontosabb megismeréséhez.

Vizsgálataink során az alábbi célokat tűztük ki:

- Azonosítjuk a *L. stagnalis* GnRH/CRZ (ly-GnRH/CRZ) peptidjének kódoló régióját
- Elemezzük a GnRH neuropeptid szuperfamilia evolúciós kapcsolatait
- Vizsgáljuk a ly-GnRH/CRZ transzkript és peptid eloszlását a központban és periférián
- Azonosítjuk az aktív ly-GnRH/CRZ peptidet és leírjuk annak fiziológiai szerepét
- Azonosítjuk a gerinces szex szteroid szintézisben és receptor-mediációban részt vevő gének homológjait a *L. stagnalis*-ban
- Vizsgáljuk a szteroidok felvételét, metabolizálódását és kiürülését
- Vizsgáljuk, hogy vajon változik-e a reprodukciót irányító neuropeptidek expressziója hosszútávú progesztogén kezelés hatására



4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

4.1. Kísérleti állatok

A kísérleteinkhez 4-5 hónapos, ivarérett (felnőtt) csigákat használtunk saját, parazitamentes tenyészetünkből (BLKI, Tihany). A többi, *L. stagnalis*-t használó kutatócsoport állattartási körülményeihez hasonlóan (Alvarez és mtsai, 2022; Baz és mtsai, 2022; Crossley és mtsai, 2016; Nakai és mtsai, 2020; Pirger és mtsai, 2021; Swart és mtsai, 2019; Totani és mtsai, 2020) az állatokat 20 L-es tartályokban tartottuk (denzitás: 100 állat/10 L) alacsony réz tartalmú, mesterséges „csigavízben” (összetétel mM-ban: 0,1309 NaHCO₃, 0,0378 K₂SO₄, 0,4013 CaCl₂·2H₂O, 0,0390 Mg(NO₃)₂·6H₂O; pH=7.6) közel állandó, 20 ± 1.5 °C hőmérsékleten, folyamatos levegőztetéssel, 12 órás fény – sötét ciklusban, hetente minimum három alkalommal salátával, és heti egy alkalommal zöldségalapú haltáppal (TETRA Werke Company, Németország) etetve őket. A mesterséges vizet heti egy alkalommal cseréltük a tenyészet tartályaiban. Az állatokon végzett kísérleteket a Balatoni Limnológiai Kutatóintézet Munkahelyi Állatjóléti Bizottsága által kidolgozott és engedélyezett eljárás szerint végeztük (VE-I-001/01890-10/2013).

4.2. Neurális transzkriptom szekvenálás és bioinformatika

Nukleotid szekvenáláshoz a csigák (n=15) teljes CNS-ét kiperaráltuk és homogenizáltuk TRI reagensben (#93289, Sigma-Aldrich) TissueLyser LT (QIAGEN) készülékkel. Az RNS-t a Direct-zolTM RNA MiniPrep kit (#R2050, Zymo Research) segítségével izoláltuk. A minták RNS tartalmát Qubit 3.0 készülék és Qubit BR RNA Kit (#Q10211, Thermo Fisher Scientific) használatával kvantifikáltuk, majd minőségi ellenőrzést is végeztünk Agilent Bioanalyzer 2100 készülékkel és RNA 6000 Nano Kit-el (#5067-1511, Agilent).

Nanopore szekvenálási módszert használtunk a ly-GnRH/CRZ neuropeptid, valamint a szex szteroid szintézis útvonalban és receptor-mediációban részt vevő molekulák kódoló régiójának azonosításához. A szekvenáláshoz szükséges könyvtárat a cDNA-PCR Kit (#SQK-PCS108, Oxford Nanopore Technologies) segítségével készítettük. A mintákat MinION készülékkel szekvenáltuk R9.4.1 típusú „flow cell” (#FLO-MIN106) segítségével. A szekvenálás során a „real-time basecalling”-ot a Guppy v3.2.2 szoftverrel végeztük. Az adaptereket, illetve olyan szekvenciákat, amelyek belső adaptert tartalmaztak (kiméra „read”), Porechop v9.0 (Wick és mtsai, 2018) szoftverrel távolítottuk el. A minőség és „read”-hossz alapú szűrést a NanoFlit szoftverrel csináltuk (De Coster és mtsai, 2018). A „read”-ek összeszerelése, a manuális korrekció és a konszenzus szekvenciák létrehozása a CLC

Genomimcs Workbench v12.0.3 software de novo pipeline (QIAGEN) használatával valósult meg. Az összeszerelt neurális transzkriptom és a releváns transzkriptomikás adatok (például BUSCO, GO és KEGG elemzések) publikálása folyamatban van. A homológ szekvenciák kereséséhez releváns gerinctelen és gerinces szekvenciákat használtunk „query”-ként az NCBI adatbázisból (Függelék 2.).

A kapott szekvencia eredményeket feldolgoztuk. A szekvencia korrekcióhoz a konszenzus szekvenciákat összehasonlítottuk a *L. stagnalis* előzetes genom adatokból származtatott virtuális cDNS szekvenciákkal (Illumina szekvenálással), amelyekhez konzorciumi partnerként hozzáférésünk van (a teljes genom publikáció folyamatban van). Az azonosított szekvenciákat (Függelék 3.) feltöltöttük az NCBI Nucleotide adatbázisba, majd konzervált domén keresést végeztünk az NCBI CDD/SPARCLE (Lu és mtsai, 2020; Marchler-Bauer és mtsai, 2017) szoftverrel, hogy ellenőrizzük azt, hogy a kulcsrégiók valóban megtalálhatóak-e a következtetett funkcionális fehérje szekvenciákban.

4.3. Filogenetikai elemzés

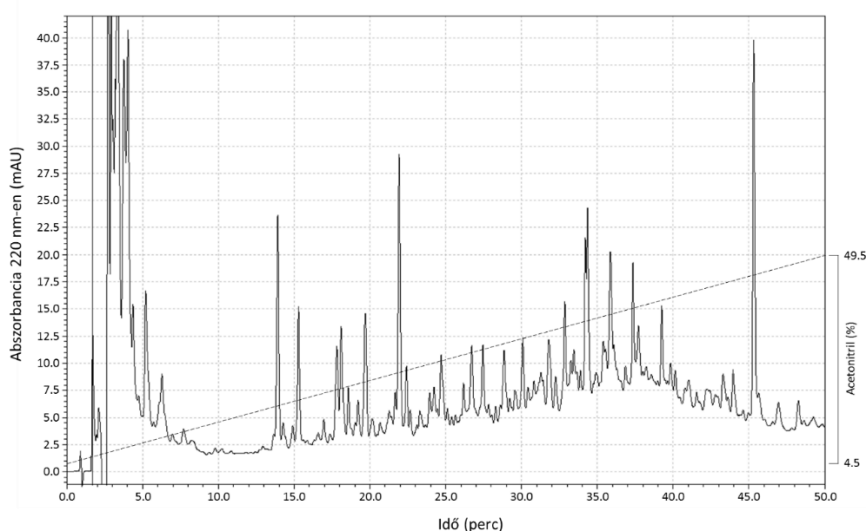
A ly-GnRH/CRZ neuropeptid molekuláris filogenetikai vizsgálata során a Maximum Likelihood módszert alkalmaztuk (Felsenstein, 1981). Ez a módszer karakter alapú, azaz nem számol távolságmátrixot, hanem közvetlenül a szekvenciák alapján keresi a filogenetikai fát. A filogenetikai fa megalkotásához szükséges szekvencia összehangolás („alignment”) elvégzéséhez a ly-GnRH/CRZ preprohormonja/prepropeptide mellett a GnRH neuropeptid szuperfamilia további, NCBI adatbázisban elérhető 56 preprohormonjának/prepropeptidének aminosav szekvenciáját használtuk (Függelék 4.). A szekvenciák összehangolását a Molecular Evolutionary Genetics Analysis v7 szoftver segítségével csináltuk a beépített ClustalW algoritmus és BLOSUM62 szubsztitúciós mátrix használatával (Kumar és mtsai, 2016). A kapott összehangolás további elemzése során az LG modellt (gamma eloszlásos rátákkal) állapítottuk meg a lehető legjobb illesztő modellnek a filogenetikai fa létrehozásához. A filogenetikai elemzés megbízhatóságát adó „bootstrapping” 1000 „bootstrap” replikációval lett készítve, a kiszámolt értékek %-ban lettek feltüntetve az elágazási pontokban.

4.4. Az aktív ly-GnRH/CRZ neuropeptid extrakciója és tömegspektrometriai vizsgálata

A aktív ly-GnRH/CRZ peptid CNS-ben való jelenlétének kimutatásához 35 állat teljes CNS-ét preparáltuk és „pool”-oztuk. Az extrakció során egy korábbi protokollt vettünk alapul (Nagasawa és mtsai, 2015a). A szöveteket folyékony nitrogén segítségével porítottuk, majd 7 percre forraltuk 10 mL desztillált vízben. Lehűtést követően ecetsavat adtunk a mintához (az

ecetsav végső koncentráció 5% volt) és Polytron PT 1200 homogenizátorral (Kinematica AG) 1-2 percig szakaszosan homogenizáltuk 4 °C-on. Ezt követően a homogenizátumot 30 percig centrifugáltuk (10,000×g; 4 °C), majd a kapott precipitátumot ismét homogenizáltuk 10 mL 5 % ecetsavat tartalmazó desztillált vízben és centrifugáltuk. A felülúszókat „pool”-oztuk és liofilizáltuk. A mintát 1 mL 0.1% trifluoecetsavat (TFA) tartalmazó desztillált vízben visszaoldottuk, a folyamat hatékonyságát szonikálás és vortexelés segítségével biztosítottuk. Ezt követően szilárd fázisú extrakcióval (SPE) koncentráltuk és tisztítottuk a mintákat az analitikai elemzéshez. Az SPE lépései a következők voltak: az eldobható, C18-as töltetű SPE oszlopot (100 mg/1 mL, #52602-U, Sigma-Aldrich) condicionáltuk 3 mL 0.1% TFA-t tartalmazó 60%-os acetonitril (ACN) oldattal, majd ekvilibráltuk 2 mL 0.1% TFA-t tartalmazó desztillált vízzel. Ezt követően a mintát tartalmazó oldatot áteresztettük az oszlopon, majd 2 mL 0,1% TFA-t tartalmazó desztillált vízzel mostuk, végül a töltet által megkötött anyagokat 1 mL 0,1% TFA-t tartalmazó 60%-os ACN oldattal eluáltuk.

Az eluált mintákat ezután nagy teljesítményű folyadékkromatográfiával (HPLC) kapcsolt tömegspektrometriai (MS) módszerrel vizsgáltuk. A HPLC rendszerben (Shimadzu Prominence LC-2030C) C18-as (reverz fázisú) oszlopot használtunk (ODS-80Ts 4,6 mm átmérőjű × 150 mm; Tosoh, Tokió, Japán). A kromatográfiás elválasztáshoz 0.1 % TFA-t tartalmazó 4.5-49.5% ACN oldat lineáris gradiensét használtuk 50 percig 1 mL/perc áramlási sebességgel, az eluált frakciókat egy percenként gyűjtöttük (7. ábra). Mindegyik frakciót mátrix-asszisztált lézeres deszorpciós/ionizációs repülési idő/repülési idő MS (MALDI-TOF/TOF MS) (rapifleX; Bruker Daltonics, Bréma, Németország) segítségével elemeztük.



7. ábra: Az oszlopra felvitt minta HPLC profilja. A mintát 0.1 % TFA-t tartalmazó 4.5-49.5% ACN oldat lineáris gradiensével eluáltuk 50 percig 1 mL/perc áramlási sebességgel és egy percenként gyűjtöttük a frakciókat.

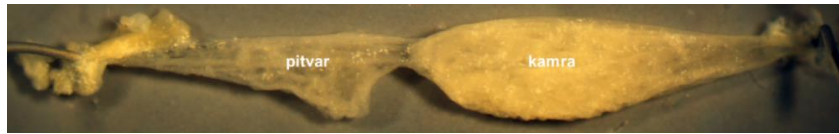
4.5. A ly-GnRH/CRZ expressziójának reverz transzkripció-PCR elemzése

Hogy vizsgáljuk a ly-GnRH/CRZ expresszióját a központi és perifériás szövetekben, 5 állatból kiperaráltuk a teljes CNS-t (a 11 idegdúcot minden CNS esetében egymástól szétválasztottuk, majd „pool”-oztuk), a szívet, a hímnős mirigyét és a szeminális vezikulumokat. A mintákból az Anyagok és módszerek fejezet 4.2. részében leírt módszerrel RNS-t izoláltunk. Annak érdekében, hogy a minták biztosan genomi DNS kontaminációtól mentesek legyenek, egy további DNáz kezelést is csináltunk a TURBO DNA-free™ Kit (#AM1907, Thermo Fisher Scientific) használatával. Az RT-t a RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit-el (#K1631, Thermo Fisher Scientific) csináltuk, minden esetben random hexamer primereket és 3 µL RNS mintát alkalmazva.

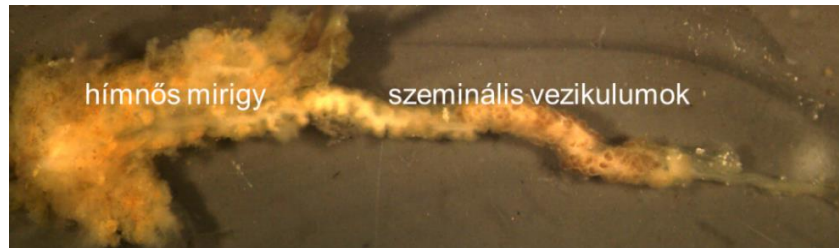
A PCR primerek a ly-GnRH/CRZ azonosított kódoló régiójára lettek tervezve SnapGene® Viewer szoftverrel (GSL Biotech, Chicago, IL, version 4.1.7). A tervezett primerek szekvenciája a következő volt: forward primer - 5'- CCT TGT CCT CCT GGC TGT AGT G - 3' és reverse primer - 5'- GAT GTG GCC GGT GTA CGA TGG - 3' (Integrated DNA Technologies, Leuven, Belgium). A minták RT-jának minőségi kontrolljaként actin-t amplifikáltunk a következő primerekkel: forward primer - 5'- TCC CTT GAG AAG AGC TAC GAG C - 3' és reverse primer - 5'- GAG TTG TAG GTG GTT TCG TGG - 3' (Integrated DNA Technologies, Leuven, Belgium). Mindegyik PCR reakcióelegy 20 µL volt, ami 10 µL 2X Master Mix-et (#K0171, Thermo Fisher Scientific), 8 µL desztillált vizet, 1 µL cDNS mintát és 1 µL primer párt (10 µM) tartalmazott, ami szelektíven amplifikálta a ly-GnRH/CRZ-t, vagy az actin-t. A PCR reakciókat T1 Thermocycler PCR készülékkel (Biometra®, Goettingen, Germany) végeztük a következő kondíciókkal: 95 °C 4 percig (kezdeti denaturáció), majd 35 ciklusban 95 °C 30 másodpercig (denaturáció), 55 °C 30 másodpercig („annealing”) és 72 °C 10 másodpercig („extension”). A PCR termékeket 2%-os agaróz gélen futtattuk, a sávok megfelelő nagyságát GeneRuler™ 100 bp Plus DNA ladder (#SM0328, Thermo Fisher Scientific) segítségével ellenőriztük. Két negatív kontrollt alkalmaztunk: az egyikben nem volt semmilyen templát (NTC), a másikban az actin amplifikálásához RNS templátot tettünk, hogy megvizsgáljuk van-e genomi DNS kontamináció a mintákban (RTØ). A kísérleteket 3 független ismétlésben végeztük.

4.6. Immunhisztokémia

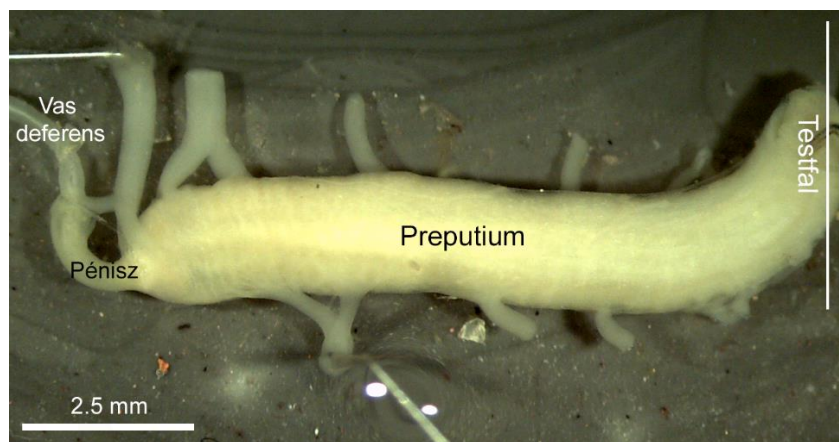
A teljes CNS-t (n=15), a szívet (n=5) (8. ábra) és a reprodukciós rendszert (n=5) kiperaráltuk az állatokból. A reprodukciós rendszerből a hímnős miriggyel, a szeminális vezikulumokkal (9. ábra) és a pénisz komplex-szel (10. ábra) dolgoztunk tovább.



8. ábra: A kipreparált szív *L. stagnalis*-ban



9. ábra: A kipreparált hímnős mirigy és szeminális vezikulumok *L. stagnalis*-ban



10. ábra: A kipreparált pénisz komplex a vas deferens-el *L. stagnalis*-ban

A mintákat kitűztük Sylgard-al kiöntött, 0.1 M-os foszfát pufferben (PBS, pH=7.4) oldott 4% paraformaldehidet tartalmazó Petri csészékben és fixáltuk egy éjszakán át 4°C-on. Fixálás után többszöri mosás következett PBS-ben, majd a mintákat 20%-os cukoroldatban tartottuk egy éjszakán át 4°C-on. Az inkubálást követően a mintákat kriomátrixba (#6769006, Thermo Fisher Scientific) ágyasztuk, majd 12-14 μm vastag kriosztát (Leica Jung 1800) sorozatmetszeteket készítettünk, amiket zselatinos tárgylemezre helyeztünk. Az IHC során kétlépéses indirekt immunofluoreszcens technikát alkalmaztunk. Ennek során a metszeteket többszöri PBS-sel való mosás után blokkolás céljából 0,25%-os borjú szérum albumint (BSA, Sigma-Aldrich) és 0.25% Triton-X 100-at (TX, Sigma-Aldrich) tartalmazó PBS-ben (PBS-TX-BSA) tartottuk egy órán át 4°C-on, majd azokat 24 órán keresztül PBS-TX-BSA-ban hígított különböző elsődleges antitestekkel inkubáltuk (3. táblázat). Mosást (3x15 perc PBS-el) követően a metszeteket PBS-TX-BSA-ban hígított másodlagos antitestekkel (3. táblázat) inkubáltuk 5 órán át 4°C-on. A mintákat módosított Dulbecco PBS-el (DPBS) mostuk, majd a CNS esetében Hoechst 33342 (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ DPBS-ben; #62249, Thermo Fisher Scientific)

segítségével 10 percig sejtmagfestést végeztünk. Végül a metszeteket DPBS-el mostuk és fluoreszcens médiummal (#S3023, Dako) fedtük. A megfestett szöveteket egy megfelelő hullámhossz-szűrő beállításokkal és transzmissziós detektorral (BioMarker Ltd, Magyarország) rendelkező TCS SP8 DMI konfokális lézer pásztázó mikroszkóppal (Leica Microsystems, Németország) értékeltük ki. A képfeldolgozást a LasX szoftverrel (Leica Microsystems, Németország) végeztük.

3. táblázat: Az IHC és Western blot (WB) kísérletek során használt antitestek. Tekintettel a releváns gének hiányára, illetve, hogy az immunogének nem mutattak, vagy nagyon alacsony homológiát mutattak amúgy nem-homológ *L. stagnalis* proteinekkal (Függelék 5.), a puhatestűek nézőpontjából a három gerinces antitest nem-specifikus antitestnek volt tekintve. Az anti-ly-GnRH/CRZ antitest és az anti-5-HT antitest specifikus antitestként van hivatkozva.

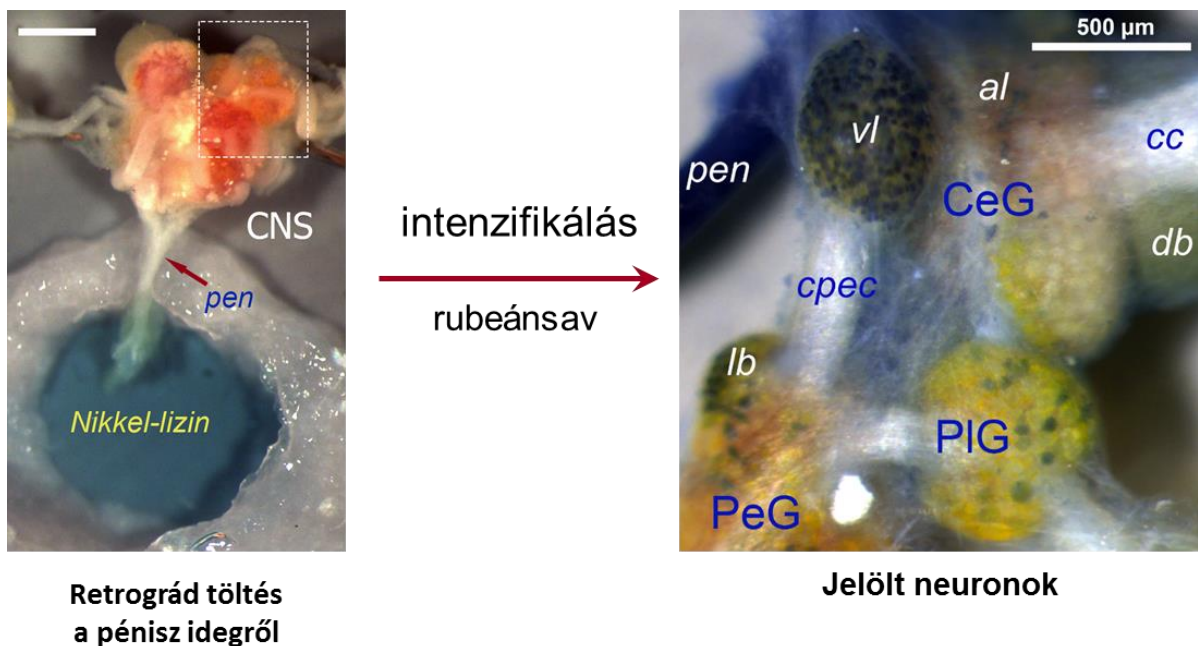
Elsődleges antitestek			
Szerv	Antitest	Gyártó	Hígítás
CNS, szív, hímnős mirigy, szeminális vezikulumok, pénisz komplex	nyúl anti-ly-GnRH/CRZ	#AS203-2, EZbiolab	1:1000
CNS	nyúl anti-humán GnRH	#G8294, Sigma-Aldrich	1:500
CNS	egér anti-humán nPR	#MA1-412, Thermo Fisher Scientific	1:200
CNS	nyúl anti-humán CYP19A	#SAB4500606, Merck	1:500
szív, pénisz komplex	egér anti-5-HT	#Mo75801-2, Dako	1:500
Másodlagos antitestek			
Szerv	Antitest	Gyártó	Hígítás
CNS, szív, hímnős mirigy, szeminális vezikulumok, pénisz komplex	szamár anti-egér IgG NorthernLights™ NL557-el konjugálva	#NL007, R&D System	1:200
CNS	szamár anti-nyúl IgG NorthernLights™ NL557-el konjugálva	#NL004, R&D System	1:200
szív, pénisz komplex	szamár anti-egér IgG FITC-el konjugálva	#A24507, Invitrogen	1:200

Mivel az anti-ly-GnRH/CRZ elsődleges antitest gyártásához készített szintetikus peptid tengeri pajzskopoltyús csiga hemocianin-al (KLH) volt konjugálva, az antitestet egy éjszakán át 4°C-on preadszorbáltuk KLH-val (#H7017, Sigma-Aldrich), hogy elkerüljük a keresztreakciót a *L. stagnalis* hemocianinjával. Néhány esetben az anti-ly-GnRH/CRZ és az anti-humán GnRH elsődleges antitesteket egy éjszakán át 4°C-on preadszorbáltuk a szintetikus peptidekkel (10 µM) mielőtt a mintákhoz adtuk őket, ezekben a kísérletekben az immunjel teljesen megszűnt (nincs mutatva). Az anti-humán CYP19A és anti-humán nPR esetében – tükrözve a releváns korábbi publikációkban elvégzett kísérletek módszerét (Di Cosmo és mtsai, 1998; Matsumoto és mtsai, 1997; Osada és mtsai, 2004; Prisco és mtsai, 2017; Rosati és mtsai,

2019) – nem végeztük preadszorpciós kontrollt, mivel nincsenek releváns, kereskedelmi forgalomban kapható fehérjék. A kísérleteket 3 független ismétlésben végeztük.

4.7. Neuronok retrográd jelölése nikkell-lizin töltéssel

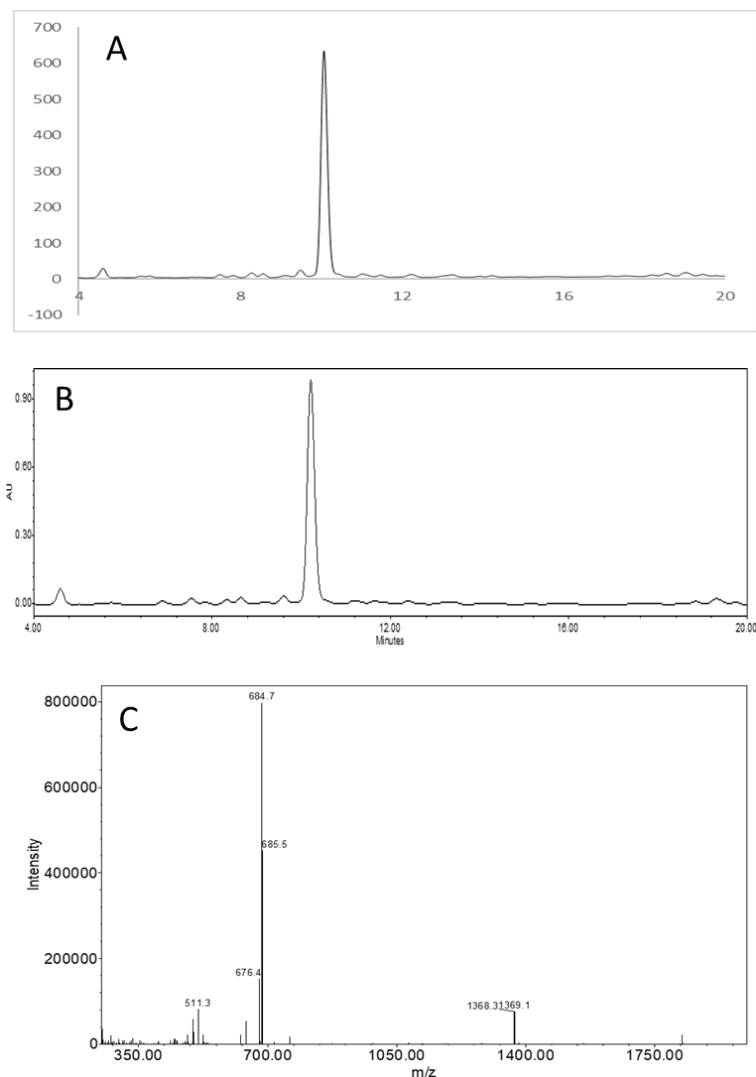
A jobb oldali agydúc anterior és ventrális lebenyében található neuronok visszatöltéséhez a teljes CNS-t (n=5) a hozzá tartozó pénisz ideggel együtt kiproparáltuk az állatokból és kitéztük Sylgard-al kiöntött, *Lymnaea* Ringer oldatot (50 mM NaCl, 2 mM KCl, 4 mM CaCl₂, 4 mM MgCl₂, 10 mM TRIS; pH = 7.5) tartalmazó Petri csészékben. A pénisz ideget 1-1.5 cm-esre vágtuk és a megvágott végét 20 másodpercig ozmotikusan sokkoltuk desztillált vízben. Az ideg megvágott végét egy nikkell-lizin oldatot (0.38 M NiSO₄·6H₂O és 1.2 M L-lizin, #L5501, Sigma-Aldrich) tartalmazó kamrába tettük és a teljes CNS-t szobahőmérsékleten inkubáltuk az éjszaka folyamán. Ezt követően a nikkelt 5-10 csepp rubeánsav szaturált alkoholos oldatával (ditiooxamid, #STBB5837, Sigma-Aldrich) precipitáltuk és szobahőmérsékleten inkubáltuk 30 percig (11. ábra). Az irodalmi adatokból (De Boer és mtsai, 1997; Koene, 2010) ismert minden releváns neuron és neuron csoport (például a jobb PeG Ib neuron csoportja) visszatöltődött. Ezután a mintákon IHC-t végeztük az Anyagok és módszerek fejezet 4.6. részében leírtak szerint. A kísérleteket 3 független ismétlésben végeztük.



11. ábra: Retrográd töltés a pénisz idegről (pen). A pénisz ideg egy nikkell-lizin oldatot tartalmazó kamrába helyeztük, majd egy éjszakán át tartó inkubálást követően a nikkelt rubeánsavval precipitáltuk (intenzifikálás). A bal oldali képen látható szaggatott vonalú négyzet a jobb oldali képen látható részt jelöli. Az irodalmi adatoknak megfelelően (De Boer és mtsai, 1997) a jobb oldali agydúc (CeG) anterior (al) és ventrális (vl) lebenyének neuronjai, a jobb oldali lábdúc (PeG) Ib csoportja (Ib), valamint szórványosan a jobb oldali köpenydúc (PIG) és jobb oldali fali dúc (nincs mutatva) néhány neuronja festődött. Rövidítések: CNS – központi idegrendszer; cpec – agydúc-lábdúc konnektívum; cc – agydúci kommissúra; db – dorzális test

4.8. Peptid szintézis és injektálás

Korábbi cikkekben leírt metodikát követve (Hernadi és mtsai, 2008; Pirger és mtsai, 2010b; Pirger és mtsai, 2010a), a ly-GnRH/CRZ aktív peptid szintézisét szilárd fázisú folyamattal végeztük Fmoc kémia alkalmazásával. A peptidláncokat Tentagel S-Ram gyantán (0,23 mmol/g) elongáltuk és a szintézist CEM Liberty Blue géppel végeztük. A peptidet a gyantáról egy 90% TFA-t, 4% desztillált vizet, 2% ditiotreitolt, 2% triizopropil-szilánt és 2% p-krezolt tartalmazó keverékkel választottuk le. A kapott nyers peptidet reverz fázisú HPLC-vel tisztítottuk Phenomenex Luna C18 (250x21,2 mm, 100 Å, 10 µm) oszlop használatával (12. ábra). A megfelelő frakciókat „pool”-oztuk, liofilizáltuk (tisztaság > 98%), és HPLC-MS analitikai módszerrel analizáltuk (12. ábra).



12. ábra: A nyers (A) és a tisztított (B) szintetikus aktív ly-GnRH/CRZ peptid kromatogramja, valamint a tisztított peptid MS-spektruma (C). 'A' oldószer: 0,1% TFA-t tartalmazó desztillált víz; 'B' oldószer: 0,1% TFA-t tartalmazó 80% acetonitril oldat; Grádiens: 25-45% 'B' oldószer az 'A' oldószerben 20 perc alatt.

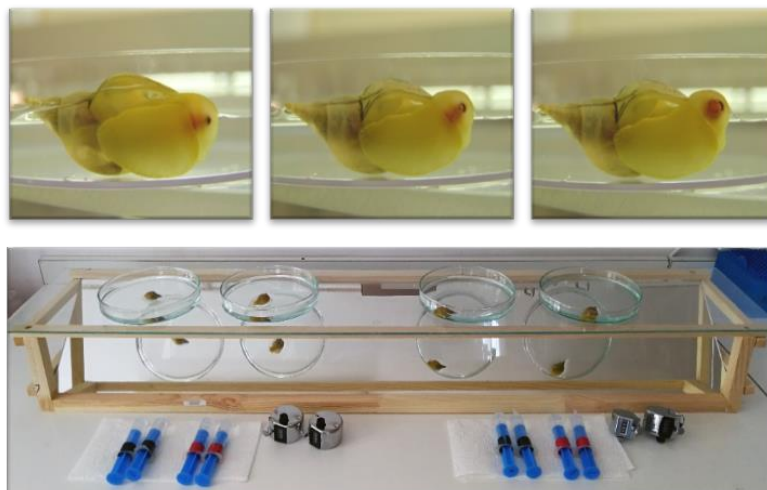
Ahhoz, hogy teszteljük a ly-GnRH/CRZ aktív peptid lehetséges szerepét a táplálkozásban, mozgási aktivitás és reprodukcióban, 500 µg szintetikus peptidet feloldottunk 25 µL dimetilszulfoxidban (DMSO), majd hígítottuk 475 µL *Lymnaea* Ringer-ben, az így kapott törzsoldat koncentrációja 1 mg/mL-es volt 5% DMSO-val. A törzsoldatot az injektáláshoz szükséges megfelelő koncentrációra tovább hígítottuk *Lymnaea* Ringer-ben (100 µg/mL és 0.5% DMSO). Az *A. californica* modellállaton kapott korábbi releváns eredményekre alapozva (Tsai és mtsai, 2010) a peptidet tartalmazó oldatból 100 µL-t injektáltunk közvetlenül az állatok testüregébe/hemolimfájába (10 µg peptid/állat; 0.05% DMSO). A kontroll csoport állataiba 100 µL *Lymnaea* Ringer-t (0.05% DMSO) injektáltunk.

4.9. Viselkedési tesztek

Az állatokat kontroll és ly-GnRH/CRZ injektált csoportokra osztottuk (n=10 állat/csoport; n=20 állat/ismétlés) és a viselkedési tesztek során vizsgáltuk a táplálkozási rátát, a mozgási aktivitást, valamint a peterakást. A kísérleteket 3 független ismétlésben végeztük.

4.9.1. Táplálkozási ráta

A táplálkozási ráta vizsgálata során a csigákat egyesével helyezzük ki 150 mL-es Petri csészékbe. A táplálkozási aktivitás a reszelő nyelv (radula) ritmikus öltögetésben nyilvánul meg (Kemenes és mtsai, 1986) (13. ábra), amely egy tükrös rendszer segítségével több állaton szimultán nyomon követhető és a harapások száma könnyen számolható (13. ábra). A kísérlet előtt az állatokat 2 napig éhezettjük a kellő motiváltság elérése érdekében.



13. ábra: A csigák ritmikus radula aktivitása (felső panel) és a táplálkozási ráta vizsgálatának kísérleti elrendezése (alsó panel)

Az első kísérleti napon (24 órával az injektálás előtt) 90 mL mesterséges „csigavizet” tartalmazó Petri csészékbe tettük a két kísérleti csoport állatait, majd 10 perc akklimatizáció után 5 mL „csigavizet” adtunk fecskendő segítségével az edényekbe és 2 percig számoltuk a harapások számát (spontán harapásszám vízben/víz által „indukált” harapásszám). Ezt követően 5 mL 20%-os cukoroldatot (erős kémiai inger, ami kiváltja a táplálkozási magatartást (Kemenes és mtsai, 1986)) adtunk a csigáknak és szintén 2 percig számoltuk a kiváltott harapások számát. A második kísérleti napon az állatokat az Anyagok és módszerek fejezet 4.8. részében leírtak alapján injektáltuk, majd az injektálás után 2 perccel, valamint 2 órával ismét vizsgáltuk a táplálkozási aktivitást. A cukorra kapott harapások számából kivontuk a vízre kapott harapások számát (háttér).

4.9.2. Mozgási aktivitás

A mozgási aktivitás vizsgálata során a csigákat hármassával helyezzük egy-egy kísérleti tartályba (10 x 20 x 5 cm, (Salanki és mtsai, 2003)), ahol az egyedek által megtett útvonal egy „white board” marker segítségével jelölhető (14. ábra). A kísérlet előtt az állatokat 2 napig éheztetjük a kellő motiváltság elérése érdekében.



14. ábra: A csigák mozgási aktivitásának nyomon követése (reprezentatív ábra)

Az első kísérleti napon (48 órával az injektálás előtt) 10 perc akklimatizációt követően 5 percig jelöltük a kísérleti állatok által megtett útvonalat. A második kísérleti napon az állatokat az Anyagok és módszerek fejezet 4.8. részében leírtak alapján injektáltuk, majd az injektálás után 2 perccel, 25 perccel, 40 perccel, 24 órával és 48 órával ismét vizsgáltuk a mozgási aktivitást. A tesztek befejezése után minden esetben digitális fényképeket készítettünk a megjelölt útvonalról egy Nikon D5100 kamera segítségével. A képek alapján az egyes állatok

által megtett utat Mousotron8.2 freeware szoftver segítségével, (BlackSun, www.techspot.com/download) cm-ben határoztuk meg.

4.9.3. Peterakás

A kontroll és ly-GnRH/CRZ injektált kísérleti csoportok állatait külön-külön tartályokba tettük (10 állat/tartály) és az injektálást követően 5 napig monitoroztuk a reprodukciós aktivitásukat. A vizsgálható paraméterek közül a lerakott petezsákok és peték számának megfigyelésére fókuszáltunk. Az állatok által lerakott petezsákokat naponta gyűjtöttük. Egy DFC3000G (Leica) digitális fényképezőgéppel felszerelt Leica M205c sztereo mikroszkóp segítségével számoltuk a petéket és értékeltük a peteszákok minőségét. Sérült reprodukcióra utaló paraméterek (például üres petezsák, túl zselatinos kocsonya, tojáson kívüli embriók) nem voltak megfigyelhetők az 5 nap alatt. Korábbi munkáink alapján egy petezsákot egészségesnek minősítettünk, ha nem volt benne megfigyelhető halott embrió, illetve poliembrióniás pete (Zrinyi és mtsai, 2017).

4.10. *L. stagnalis* egyedek kezelése jelölt szteroidokkal

A szteroidok felvételének, metabolizálódásának és kiürülésének vizsgálatát korábbi tanulmányok alapján terveztük meg (Katsiadaki és mtsai, 2021; Schwarz és mtsai, 2017a, 2017b, 2018), a kísérleti elrendezést a 4. táblázat tartalmazza. A kísérletekhez 17 β -[2,4,6,7,16,17-³H]-E₂, [1,2,6,7-³H]-T, [1,2,6,7-³H]-P és 17-[6,7-³H(N)]-EE₂ radioaktívan jelölt “standard”-eket használtunk (American Radiolabeled Chemicals, Inc.; USA).

4. táblázat: Kísérleti elrendezés és a kísérleti állatok alapvető adatai

Kísérlet	Víz mennyiség (L)	Állatszám	Ismétlések száma	A jel koncentrációja az első mintavételnél (μCi/L)	A jel koncentrációja az első mintavételnél (ng/L)	Kezelési idő (óra)	Víz mennyiség/állat (mL)	Szövet átlagos nedves tömege (g)
E ₂	0.3	2	5	2.6	5.9	8	150	0.96
EE ₂	0.3	2	5	2.7	17.2	8	150	1.00
T	0.3	2	5	3.5	7.1	8	150	1.16
P	0.3	2	5	2.7	9.1	8	150	1.03

A kísérlet folyamán az állatokat előre levegőztetett “csigavizet” tartalmazó tankokba tettük, hozzáadtuk az etanolban oldott jelölt szteroidokat (az oldószer végső koncentrációja mindig <0.01% volt). Hogy mérjük a radioaktivitás mennyiségét, kétóránként 1 mL vizet vettünk és azonnal 7 mL szcintillációs folyadékkal kevertük. Minden esetben 3 szorpciós kontroll tankból (radioaktívan jelölt szteroidokat igen, de csigákat nem tartalmazott) is kétóránként mintát vettünk, hogy meghatározzuk a szorpció miatti radioaktivitás veszteségét a tankokban. A szcintilláció számolása egy Tricarb 2910 szcintilláció számoló készülékkel (PerkinElmer) történt. A 8 órás kezelés után minden csoportból 5 állatot azonnal lefagyasztottuk (kiürülés 0. napja), a maradék 5 állatot 4 L tiszta “csigavízbe” tettük kiürülés céljából. A vizet folyamatosan levegőztettük és naponta cseréltük. Az állatokat a 10. napon lefagyasztottuk.

Minden egyes szteroid esetében kiszámítottuk a “clearance” rátát, ami definíció szerint az a ráta, amellyel az állatok egységnyi idő alatt (óra) egységnyi víztérfogatból (mL) képesek eltávolítani az összes radioaktívan jelölt szteroidot. Mértékegysége: mL állat⁻¹ óra⁻¹. A “clearance” ráta független a víztérfogattól. A kiszámítása egyezményesen az expozíció első 1.5 órájában történik (kezdeti „clearance” ráta) (Katsiadaki és mtsai, 2021; Schwarz és mtsai, 2017a, 2017b, 2018), amikor az állatok még frissek és a radioaktív jelöléseknek még nem volt sok ideje metabolizálódni és/vagy lebomlani:

$$\text{Kezdeti "clearance" ráta} = \frac{rV}{1.5n}$$

ahol r = az eltávolított radioaktivitás százalékos mennyisége az első 1.5 órában; V = teljes víztérfogat a tankban (mL); n = tankban lévő állatok száma

A “ V ” és az “ n ” érték adott, a számoláshoz az “ r ” értéket kell meghatározni. Ehhez első lépésben minden egyes kezelésben a tankokban maradt radioaktivitás százalékát korrigáltuk a szorpció miatti veszteséggel. A jel fogyásának korrigált adatait lineáris bomlási görbékre illesztettük a Sigmaplot szoftver (Inc, TW4 6JQ, London, UK) segítségével, az illesztett egyenesek egyenletét használtuk a vízből a 0 és 1.5 óra között eltávolított radioaktív jel százalékos mennyiségének kiszámításához (“ r ” érték).

4.11. Jelölt szteroidok extrakciója és elválasztása

Ahhoz, hogy extraháljuk a szövetekből a radioaktívan jelölt szteroidokat, a 8 órás kezelés után (0. nap), valamint a tisztítási periódus után (10. nap) lefagyasztott állatokat szobahőmérsékleten felolvasztottuk, a lágy szövetet kipreparáltuk, szárítottuk és lemértük a tömegüket. A szöveteket metanollal és etil acetáttal extraháltuk egy korábbi protokoll alapján (Schwarz és mtsai, 2017a). Az extraktumok végső térfogata 10 mL volt.

Hogy elválasszuk a szabad, vízdékony és észterifikált metabolitokat, mindegyik extraktumból 800 μ L-t bepároltunk és partíciónáltuk egy korábbi protokoll alapján (Schwarz és mtsai, 2017a). A mintákhoz 1.2 mL etanolt, 0.3 mL vizet és 3 mL heptánt adtunk és 5 percig ráztuk. Centrifugálást követően (2500 g, 10 perc) a felső heptán réteget eltávolítottuk és új csőbe tettük. A 80%-os etanol fázisthoz újabb 3 mL heptánt adtunk és 5 percig ráztuk, majd centrifugáltuk. A két heptán fázist „pool”-oztuk. Az elválasztás alapja az, hogy az erősen lipofil szteroid észterek a heptán fázisba partíciónálódnak, míg a 80%-os etanol fázis tartalmazza a szabad (nem konjugált) és vízdékony metabolitokat. Az etanol fázist bepároltuk, majd visszaoldottuk 100 μ L vízben és 4 mL dietil-éterben, majd 5 percig ráztuk és centrifugáltuk (2500 g, 10 perc). A szabad szteroidok preferenciálisan az éterben, míg a szulfát konjugált szteroidok a vízben oldódnak. A vizet folyékony nitrogénnel fagyasztottuk és dekantáltuk az éter fázist. Mindkét frakciót (Frakció 1 és Frakció 2) beszárítottuk és etanolban visszaoldottuk.

A heptán frakciót bepároltuk és visszaoldottuk 1.8 mL metanolban és 0.2 mL 3M-os kálium-hidroxidban. A mintát 40 percig 80°C-on inkubáltuk, majd a reakciót 40 μ L 2.5 M-os hidrogén-kloriddal. A szaponifikálási reakció során az észterifikált szteroidok felszabadultak (alkalikus hidrolízis). A hidrolizátumhoz 0.21 mL vizet és 4.5 mL heptánt adtunk, hogy elválasszuk a felszabadult jelölt szteroidokat bármilyen nem átalakított radioaktív jelöléstől. Az oldatot 5 percig vortex-eltük, centrifugáltuk (2500 g, 10 perc), majd a felső heptán frakciót (Frakció 3) új csőbe tettük. A mintaelőkészítés során kapott mindhárom frakcióból 500 μ L-t adtunk 7 mL szcintillációs folyadékhoz.

4.12. A gerinces antitestek által jelölt proteinek azonosítása Western blott-al és tömegspektrometriával

Ahhoz, hogy azonosítsuk az anti-humán GnRH, az anti-humán CYP19A és az anti-humán nPR antitestek által jelölt molekulákat, 15 állatból kipreparáltuk a teljes CNS-t és 500 μ L jéghideg lízis pufferben homogenizáltuk, ami 1M Tris-HCl-t (pH=6.8), 2% SDS-t, 10% glicerolt, 10% merkaptóetanolt és 10 % proteáz inhibitor koktélt (#P2714-1BTL, Sigma-Aldrich) tartalmazott. A homogenizátumot 5 percig centriugáltuk (16,000 \times g, 4°C), majd a felülúszót új csőbe tettük

és 5 percig 95%-on forraltuk 5X mintapufferben, ami 0.1 M Tris-t, 0.5 M DTT-t, 10% SDS-t, 50% glicerolt, 1 mM EDTA-t és 0.1% brómfenolkéket tartalmazott. A mintákat ezt követően futtattuk 10%-os SDS-PAGE gélben (Mini-PROTEAN II, Bio-Rad) és blottoltunk át PVDF membránra (#LC2002, Thermo Fisher Scientific) a „standard semi-dry blotting” módszert követve. A WB-re szánt gélben 5 µL mintákat, míg a további, MS vizsgálatához szükséges párhuzamos gélben 20 µL mintákat futtattunk. Markernek a ProSieve™ QuadColor™ Protein Marker-t (#00193837, Lonza) használtuk.

A membránt szobahőmérsékleten 3 órán át blokkoltuk (10% nem zsíros, száraz tejpórt és 6% BSA-t tartalmazó Tris pufferrel (TBS)), majd három részre vágtuk. A megfelelő részeket 4°C-on 24 órán keresztül TBS-Tween20 (T20)-BSA-ban hígított nyúl anti-humán GnRH antitesttel (1:1000), egér anti-humán nPR antitesttel (1:1000) és nyúl anti-humán CYP19A antitesttel (1:1000) inkubáltuk (3. táblázat). Mosást követően (3x5 perc TBS-T20-al és 3x5 perc TBS-el) a mintákat szobahőmérsékleten 3 órán át TBS-T20-BSA-ban hígított kecske anti-nyúl IgG HRP-vel konjugált (#172-1019, BioRad), vagy szamár anti-egér IgG HRP-vel konjugált (#170-6516, BioRad) másodlagos antitesttel (1:3000) inkubáltuk. Ezt követően a membránt háromszor mostuk (TBS-T20-al és TBS-el) és a kemilumineszcenciát a Western Blotting Luminol Reagent (#sc-2048, Santa Cruz Biotechnology) kit segítségével vizualizáltuk. A negatív kontroll esetében a mintákat csak a másodlagos antitesttel inkubáltuk (nem eredményezett sávot). Néhány esetben az anti-humán GnRH elsődleges antitestet egy éjszakán át 4°C-on preadszorbaluk a szintetikus peptidekkel (10 µM), ezekben a kísérletekben az immunjel teljesen megszűnt (nincs mutatva). Az anti-humán CYP19A és anti-humán nPR esetében – tükrözve a releváns korábbi publikációkban elvégzett kísérletek módszerét (Di Cosmo és mtsai, 1998; Prisco és mtsai, 2017; Rosati és mtsai, 2019) – nem végeztük preadszorpciós kontrollt, mivel nincsenek releváns, kereskedelmi forgalomban kapható fehérjék. A kísérleteket 3 független ismétlésben végeztük.

Az MS azonosításhoz a megfelelő sávokat kivágtuk a párhuzamos SDS-PAGE gélből, Eppendorf csőbe tettük, majd festékmentesítés és tisztítás után a gélen belüli emésztést Trypsin/Lys-C Mix (#V5072, Promega) használatával végeztük a gyártó által javasolt gyors emésztési protokollt követve. A peptideket 3 mL-es SPE csövekkel tisztítottuk (HLB 60 mg; Waters, Milford, USA), az eluátumot Eppendorf Concentrator plus készülékkel (Eppendorf, Hamburg, Germany) koncentráltuk, majd 100 µL 0.1% hangyasavat tartalmazó vízben oldottuk vissza. A proteomikai vizsgálat egy Bruker EASY-nLC-vel kapcsolt nano-ESI MS (Bruker Maxis 4G UHR-QTOF) készülék segítségével történt. Az elválasztás egy C18 analitikai oszlopon (3 µm, 75 µm x 150 mm) történt gradiens elúciót (A komponens: 0.1% hangyasavat

tartalmazó ultra tiszta víz; B komponens: 0.1% hangyasavat tartalmazó acetonitril) és 250 nL/perc áramlási sebességet használva. Minden mintából 3 µL-t injektáltunk. A szkennelési tartomány 250 – 2.800 m/z volt. A porlasztó gáz áramlása 0.6 bar-on 4 L/perc volt és a hőmérséklet 200°C-ra volt állítva. A kapilláris feszültsége 4.5 kV volt. A CID fragmentációs cellában a top 15 peptid volt fragmentálva. Az adatokat a Data Analysis 3.4 szoftverrel dolgoztuk fel. A fehérjék azonosításához a Mascot server V2.4.1-t, PEAKS Studio Xpro szoftvert és a Swiss-Prot adatbázist használtuk. A keresési paramétereket úgy állítottuk be, hogy lehetővé tegyenek egy kihagyott hasítási helyet, elfogadva 50 ppm tömeghibát az MS1, míg 0.3 Da-t az MS2 módban.

4.13. Krónikus progesztogén kezelés

A hormonkezelések során HPLC tisztaságú, gyógyszerári hatóanyagokat – progeszteron (#P0130), drospirenon (#SML0147), gesztodén (#L0551000) és levonorgesztrel (#L0551000) – használtunk (Sigma-Aldrich, Magyarország). A négy hatóanyagot külön-külön metanolban oldottuk fel, az így kapott négy törzsoldat koncentrációja 1 mg/mL volt, ezt tovább hígítottuk 10 µg/mL-es koncentrációra a kezelésekhez.

A kísérleti állatokat kontroll és hormonkezelt csoportra osztottuk (n=15 állat/csoport), az ismétlések száma csoportonként három volt (totál n=90 állat). Kutatócsoportunk korábbi munkáiban használt megközelítést (Svigruha, 2021; Svigruha és mtsai, 2021a; Zrinyi és mtsai, 2017; Zrinyi, 2017) követve a kezelt csoportok állatait 21 napig 8 L mesterséges „csigavízben” tartottuk, amely 10 ng/L progesztogén hormonkeveréket tartalmazott ekvivalens koncentrációban (10 µg/mL-es törzsoldatokból 8 µL-t tettünk a tankokba, az oldószer mennyisége <0.00001% volt). Az állatok azért kapták egyszerre a 4 hatóanyagot, mert a felszíni vizekben is kombinációban fordulnak elő. A 10 ng/L kezelési koncentráció tükrözi az átlagos globális környezeti koncentrációt (Svigruha és mtsai, 2021a), például a Balatonban és vízgyűjtőjében is hasonló koncentrációban fordulnak elő ezek a hatóanyagok (Avar és mtsai, 2016; Maasz és mtsai, 2019). Továbbá azért lett ugyanaz a megközelítés használva, hogy a korábbi munkákban viselkedési szinten kapott eredmények összevethetőek legyenek az ebben a kísérletben molekuláris szinten kapott eredményekkel (azaz a cél a viselkedési szinten látott eredmények háttérében lévő a neurális/neuroendokrin folyamatokat meghatározása volt). A kontroll csoport állatait 8 L mesterséges „csigavízben” tartottuk a kísérlet alatt, amelybe szintén 8 µL oldószert tettünk (az oldószer hatása nem volt kimutatható; a progesztogén expozícióval azonos közeg kialakítására törekedtünk). A kutatócsoportunk korábbi analitikai méréseire alapozva (Svigruha és mtsai, 2021b) a tankok vizét kétnaponta cseréltük a

hormonkezelt csoport tankjaiban és a kezelési koncentrációkat minden alkalommal újra beállítottuk a nagyjából folyamatos 10 ng/L-es kezelési koncentráció fenntartása érdekében. A kontroll csoport tankjaiban ennek megfelelően szintén kétnaponta cseréltük a vizet. A 21 napos expozíció során az állatokat hetente háromszor etettük egyenlő mennyiségű (átlagosan 3.5 g/egyed) salátával.

4.14. Összehasonlító neurális transzkriptom szekvenálás és bioinformatika

A 21 napos kezelés után véletlenszerűen kiválasztottunk 10-10 állatot a kontroll és kezelt csoportokból. Az egyedekből kipreparáltuk a teljes CNS-t, ismétlésenként „pool”-oztuk őket (3 „kontroll” és 3 „kezelt” mintát eredményezve), majd a mintákból az Anyagok és módszerek fejezet 4.2. részében leírt módszerrel RNS-t izoláltunk, illetve mennyiségi- és minőségi ellenőrzést végeztünk. A szekvenáláshoz szükséges könyvtárat a NEBNext Ultra II Directional RNA Library Prep Kit for Illumina (NEB, Ipswich, MA, USA) segítségével készítettük. A könyvtárhoz 400 ng mRNS-t izoláltunk a teljes RNS mintából a NEBNext Poly(A) mRNA Magnetic Isolation Module (NEB, Ipswich, MA, USA) használatával. Az mRNS-eket fragmentáltuk, a szálak végének alakítása („repair & A-tailing”) után ráligáltuk az adaptereket, majd amplifikáltuk a könyvtárat. Az elkészített könyvtárak minőségi ellenőrzését 4200 TapeStation System using D1000 Screen Tape, mennyiségi ellenőrzését pedig Qubit 3.0 készülékkel végeztük. A szekvenálás NovaSeq6000 készülékkel történt (Illumina, San Diego, CA, USA) 2×151 futtatási konfigurációt használva. A „read”-ek minőségét FastQC-vel vizualizáltuk és rCorrector-al elemeztük, ami egy k-mer-alapú módszer az Illumina platformon kapott RNS „read”-ek random szekvenálási hibáinak javítására, majd a Trinity *de novo* assembly program segítségével összeszereltük őket. A „read”-eket ezután a 13 reprodukciót irányító neuropeptid prekursor kódoló szekvenciájára térképeztük, megszámloltuk hány „read” esett egy célszekvenciára és normalizáltuk az értékeket. Megnéztük a minták korrelációját, hogy hogyan klasztereződnek és milyen a találati értékek eloszlása. Végül elvégeztük a géneexpressziós mérést, 1.2 „fold change” és 0.05 P értékeket használva szűrési paraméterként.

4.15. Statisztikai vizsgálatok

A kísérletek statisztikai elemzéseit az OriginPro 2018 (OriginLab Corp., Northampton, Massachusetts, USA) szoftver segítségével végeztük el. Az adatok normalitását Kolmogorov–Smirnov teszt alkalmazásával, a varianciák homogenitását pedig Levene statisztikával (F-próba) vizsgáltuk. A táplálkozási- és reprodukciós aktivitás esetében a csoportok közötti különbségeket kétmintás t-próbával elemeztük. A mozgási aktivitás esetében két-utas ismételt ANOVA-t

alkalmaztunk, hogy vizsgáljuk a vizsgálati idő, a peptid és azok interakcióinak hatását. Ezt az elemzést kétmintás t-próba követte, hogy azonosítsuk a csoportok közötti statisztikailag szignifikáns különbségeket egy adott időpontban. A különbségeket statisztikailag szignifikánsnak tekintettük $P < 0.05$ (*), $P < 0.01$ (**) és $P < 0.001$ (***) esetén.

5. EREDMÉNYEK

5.1. A GnRH/CRZ preprohormon nukleotid szekvenciája

A korábbi *in silico* vizsgálataink az *A. californica* GnRH/CRZ preprohormonjának kódoló szekvenciáját használva egy 272 bp hosszú találatot eredményeztek a *L. stagnalis* genom adatokban (Lsta_scaffold164). A szekvenciában 32 nukleotid (a feltételezett aktív peptidet kódoló rész) 100% egyezést mutatott a “query” szekvenciával, potenciálisan azonosítva a ly-GnRH/CRZ kódoló régióját. A *L. stagnalis* neurális transzkriptomjának szekvenálása és bioinformatikai elemzése után sikeresen meghatároztuk a kódoló szekvenciát, a teljes ly-GnRH/CRZ preprohormon nukleotid szekvenciája 1225 bp hosszú (15. ábra).

```
tttgacaagaaagtgtgctggtgtctttgtggttctggtggtgctgatattgctggggccg      60
tcaaaacttctttagtttagtccgaatacttttagactgatcaccttttggttttttttt      120
cgtttcgcctcacaccagcagaaggtcacagcaatcagcaacatgacgtccagcaatctg      180
                                     M T S S N L
atgtccactttactggtgcttatccttgtcctcctggctgtagtgacaccacaacagca      240
M S T L L V L I L V L L A V V H T T T A
caaaactaccacttcagcaacggctggtacgccggcaagaagcgctcttccccgctcgtac      300
Q N Y H F S N G W Y A G K K R S S P S Y
accggccacatcattggtgacagtagcagtgaggcggtgagaggcccaaggacggcagat      360
T G H I I G D S S S E A V R G P R T A D
gaggcttgcaatatcagaccggaggccggttctacttatcaacagaataatacaggaagaa      420
E A C N I R P E A V L L I N R I I Q E E
gtggcgcgagaatccaaaaagtgtgtactgctgagactccaagtggctgagggaaatcctc      480
V A R I Q K V C T A E T P S G L R E I L
gagaatgctgctacaagattggactcggagtcgaaatggtaaaacactccaagaggagag      540
E N A A T R L D S E S K W *
acgaagtgcgaggagaccttgacagggtagacagtttctcttgcataaggatatagcaaaa      600
gatattacgggcaaacagggaactaaagcagatagtgtgctgtccttaactcccgtgaat      660
tacaccatattttacgtaggtccaatcatcactcacggttctaagacagacattcaata      720
gacacagcactgaacttattttgtacgatgttctgaacagttctgaacgctgaatttatc      780
aatgtaaagaaatacgtaatttttgccagataaggactttgtgagagggggcacttgcac      840
gtctgtgtggtgagaatattgctgtgtgtagaggttctatttcaaaatgaaatgttaca      900
aaatgtatcagatctattggatctcatttagaatagtgaatctgcagctagagaactga      960
ggtttattaattttacatgtacgctttacccttgtgaaaaaaaagttttcccttagcacc      1020
tatacattagattgtagactcattggtagaattttggtagaatgtgtttaattttggcat      1080
agtctgtttcagcttaaaaatttactcttcgaaaactatttacaccaaaaatggaacaaa      1140
tgtgtattttctcgccttctgtcatcttctatagaaaattgcatgagaataaagtcagaac      1200
caccaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa      1225
```

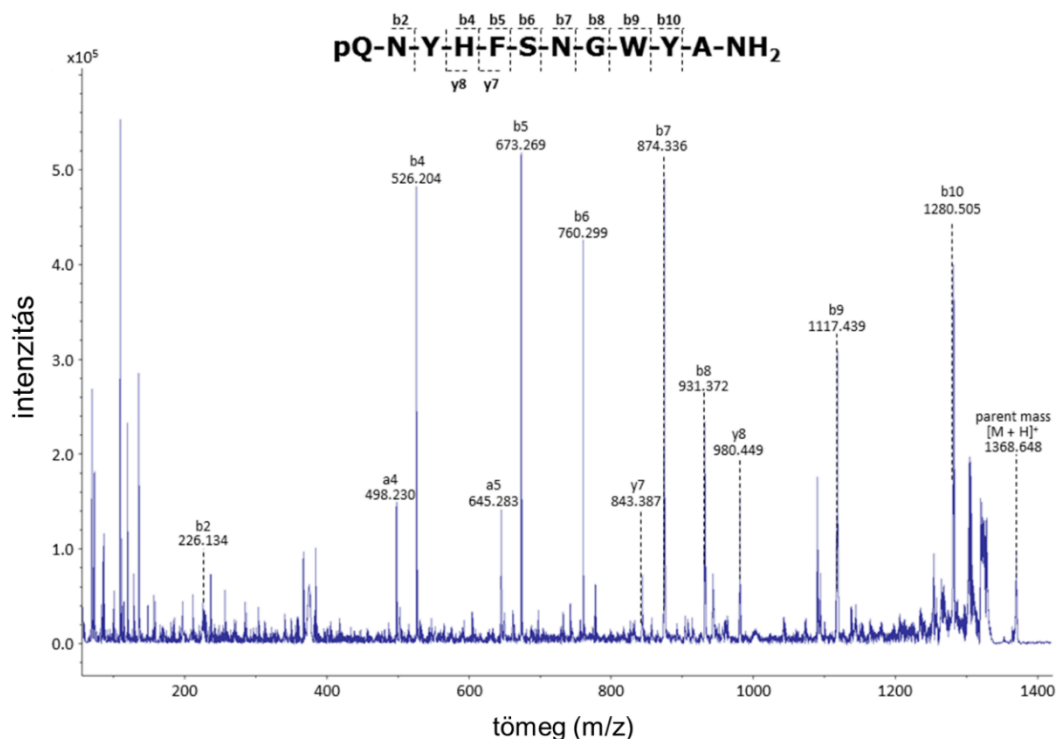
15. ábra: A ly-GnRH/CRZ preprohormonjának nukleotid (felső sorok) és következtetett fehérje (alsó sorok) szekvenciája (NCBI azonosító szám: #MN385595). A prediktált szignál peptid folytonos aláhúzással, az “érett” peptid (félkövér) az alfa amidációs hellyel (G) folytonos vonalú kerettel, a KKR tribázikus hasítóhely szürke színnel, míg ly-GnRH/CRZ-asszociált peptid szaggatott aláhúzással van jelölve. A csillag a STOP kodont jelöli. Az ATTAATA poliadenilációs szignál kettős vonallal van aláhúzva.

Az irodalmi adatok alapján (Iwakoshi és mtsai, 2002; Tsai és Zhang, 2008; Zhang és mtsai, 2008) azonosítottuk a szignál peptidet, az “érett” peptidet egy tribázikus hasító hellyel

és egy alfa amidációs szignállal (QNYHFSNGWYAGKKR), valamint ly-GnRH/CRZ-asszociált peptidet (15. ábra). Várakozásunknak megfelelően az “érett” peptid szekvenciája nagyon konzervált, míg a szignál peptid és a ly-GnRH/CRZ-asszociált peptid szekvenciája nagy variabilitást mutat (Függelék 6.).

5.2. Az aktív ly-GnRH/CRZ peptid azonosítása a központi idegrendszerben

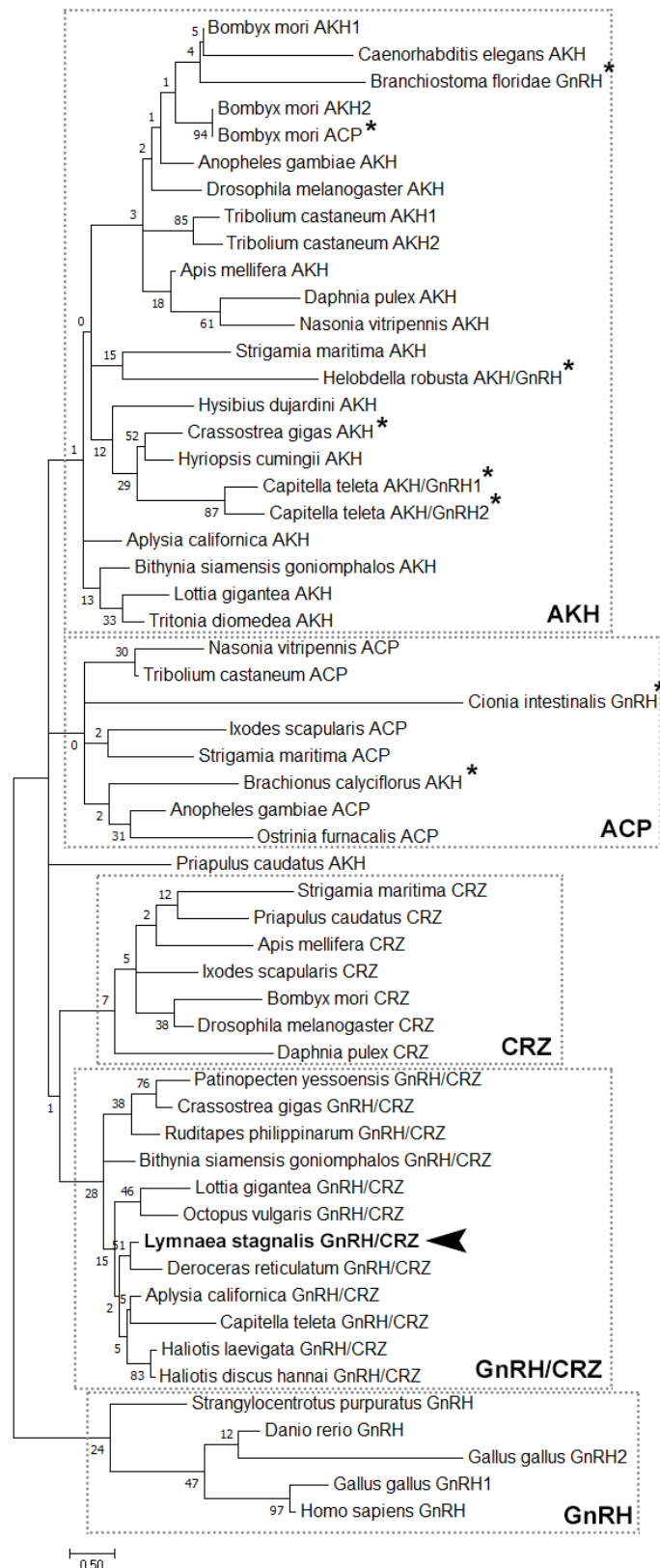
A CNS-ből származó peptid extraktum egyik, 31-32. perc elúciós idővel rendelkező frakciójában azonosítottunk egy csúcsot 1368.648 $[M+H]^+$ tömeggel, amely megfelelt a 11 aminosavból álló aktív ly-GnRH/CRZ peptid kiszámított tömegének. A tandem MS (MALDI-TOF/TOF MS/MS) vizsgálat megerősítette, hogy a peptid szekvencia pQNYHFSNGWYA-NH₂ volt (16. ábra), ami megegyezett az Eredmények fejezet 5.1. részében bemutatott 15. ábrán látható származtatott fehérje szekvenciával.



16. ábra: Az aktív ly-GnRH/CRZ peptid MALDI-TOF/TOF MS/MS spektruma és szekvenciája („1 letter version” ábrázolás). A tömegspektrumon a ly-GnRH/CRZ anyaiionja $[M + H]^+$, b-ionjai, y-ionjai és a-ionjai vannak feltüntetve.

5.3. A ly-GnRH/CRZ peptid filogenetikai elemzése

Hogy naprakésszé tegyük a GnRH neuropeptid szupercsalád evolúciós kapcsolatait az újonnan azonosított szekvenciákkal, beleértve a ly-GnRH/CRZ-t, filogenetikai vizsgálatot végeztünk. Ennek eredménye az 17. ábrán látható.



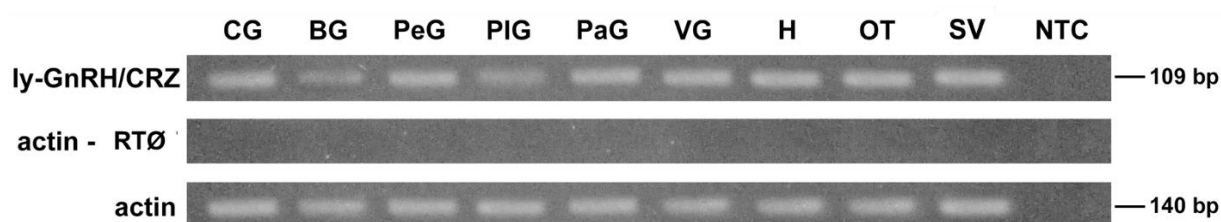
17. ábra: Az összajú (fonálférgek, gyűrűsférgek, puhatestűek és izeltlábúak) és újszájú (tüskésbőrűek és gerinchúrosok) fajokban azonosított CRZ, GnRH, GnRH/CRZ, AKH, és ACP preprohormon szekvenciák filogenetikai elemzése. A „bootstrap” értékek %-ban vannak kifejezve. A csillagok olyan szekvenciákat jelölnek, amelyek rosszul klasztereződnek és manuális korrekciót igényelnének (például a *Brachionus calyciflorus* AKH-nak konszenzus szekvenciája van az izeltlábú AKH csoportba, de az ACP klaszterbe került).

A szegregálódott klaszterek felülről lefelé a következők:

1. Két AKH klaszter a puhatestűekből, ízeltlábúakból, gyűrűsférgekből és fonálférgekből. Az irodalmi adatok alapján (Tsai, 2018) ezek “igazi” AKH peptidek.
2. Egy ízeltlábú ACP klaszter.
3. Egy ízeltlábú CRZ klaszter.
4. Egy GnRH/CRZ klaszter, amelynek szekvenciái GnRH és CRZ jellemzőkkel is bírnak. A klaszter tartalmazza az általunk újonnan azonosított ly-GnRH/CRZ peptidet (nyílhegy) és a korábban puhatestű GnRH-ként azonosított szekvenciákat
5. Egy gerinces GnRH klaszter, amely minden tüskésbőrű és gerinchúros szekvenciát tartalmaz.

5.4. A ly-GnRH/CRZ transzkript expressziója a központi és perifériás szövetekben

Az RT-PCR vizsgálataink azt mutatták, hogy a ly-GnRH/CRZ neuropeptid transzkriptje számos szövetben jelen van (18. ábra). Az amplifikálódott transzkriptet (109 bp) a CNS összes idegdúcában (páros agydúc [CG], páros pofadúc [BG], páros lábdúc [PeG], páros köpenydúc [PIG], páros fali dúc [PaG], páratlan zsigerdúc [VG]) és mindegyik vizsgált perifériás szövetben (szív [H], hímnős mirigy [OT] és szeminális vezikulumok [SV]) megtaláltuk (18. ábra, felső panel). Hogy megbizonyosodjunk arról, hogy a minták genomi DNS kontaminációtól mentesek, az aktin amplifikációját az RNS mintákról RT nélkül (RTØ) is elvégeztük (18. ábra, középső panel). A legalsó panel az amplifikálódott aktint (140 bp) mutatja a különböző szövetekben, ellenőrizve az RNS és az RT minőségét. A negatív kontrollok - RTØ (középső panel) és a templát nélküli kontroll (NTC, utolsó oszlop) - nem eredményeztek PCR terméket.



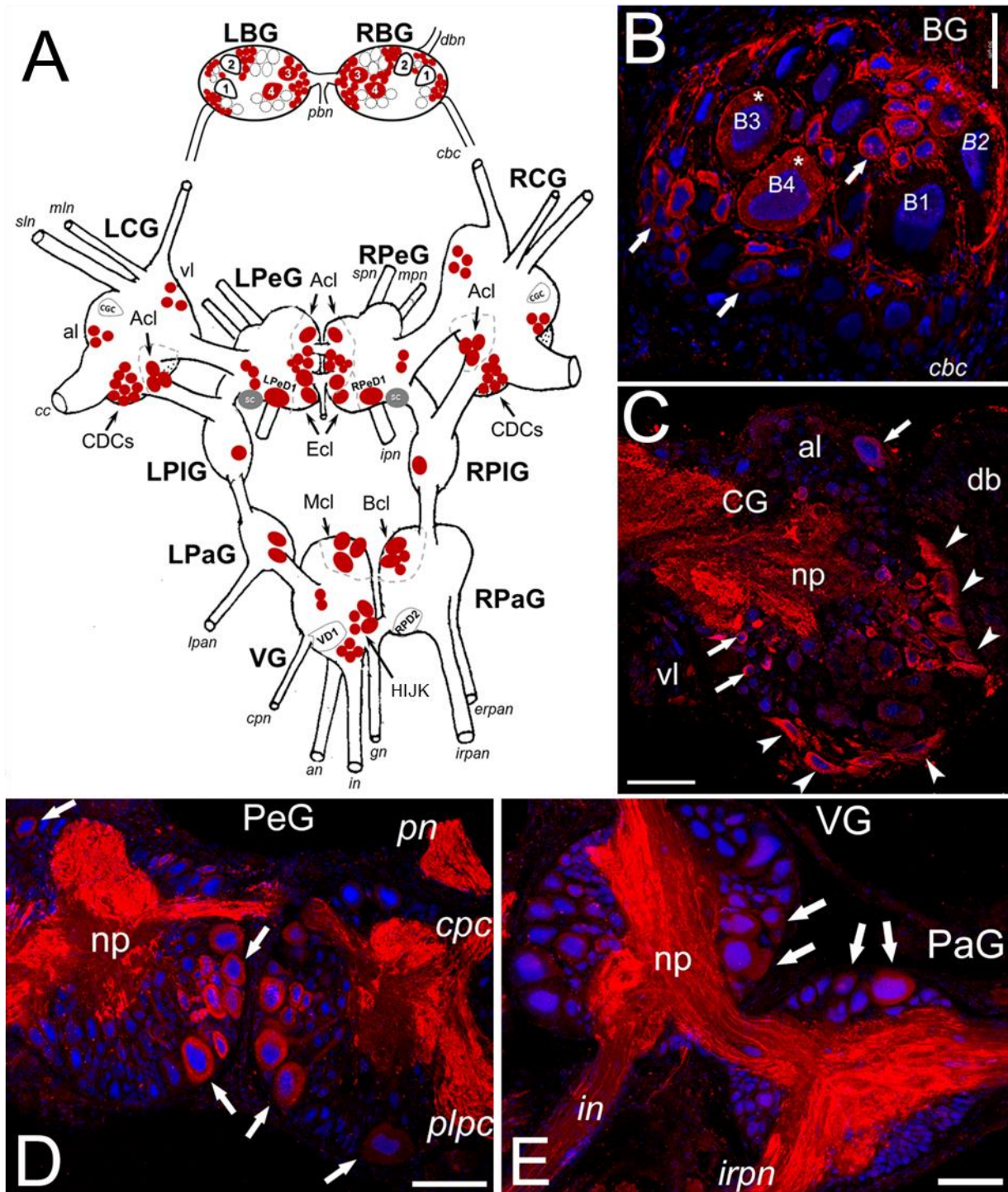
18. ábra: A CNS-ből (agydúc, pofadúc, lábdúc, köpenydúc, fali dúc, zsigerdúc), szívből, hímnős mirigyből és szeminális vezikulumokból készített cDNS minták PCR vizsgálata. Felső panel: ly-GnRH/CRZ amplifikálás. Középső panel: actin amplifikálás RNS templáttal (RTØ). Alsó panel: actin amplifikálás. A PCR termékek mérete jobb oldalon látható. Rövidítések: CG – agydúc; BG: pofadúc; PeG – lábdúc; PIG – köpenydúc; PaG – fali dúc; VG – zsigerdúc; H – szív; OT – hímnős mirigy; SV – szeminális vezikulumok; NTC – templát nélküli negatív kontroll; RTØ – nem volt RT

5.5. A ly-GnRH/CRZ peptid jelenléte a központi és perifériás szövetekben

A specifikus anti-ly-GnRH/CRZ antitestet alkalmazó IHC vizsgálataink azt mutatták, hogy a ly-GnRH/CRZ peptid jelen van a CNS minden idegdúcában (19. ábra). Óriás (100 μm), nagy- (50-80 μm), közepes- (30-50 μm) és kisméretű (10-30 μm) ly-GnRH/CRZ-immunpozitív (ip) neuronokat figyeltünk meg. A jelölődött neuronok eloszlása nagy variabilitást mutatott: míg a páros PiG-ben és PaG-ben csak kisszámú ly-GnRH/CRZ-ip neuron volt megfigyelhető, a peptid sokkal abundánsabb volt a páros BG-ben, CG-ben és PeG-ben (19A ábra).

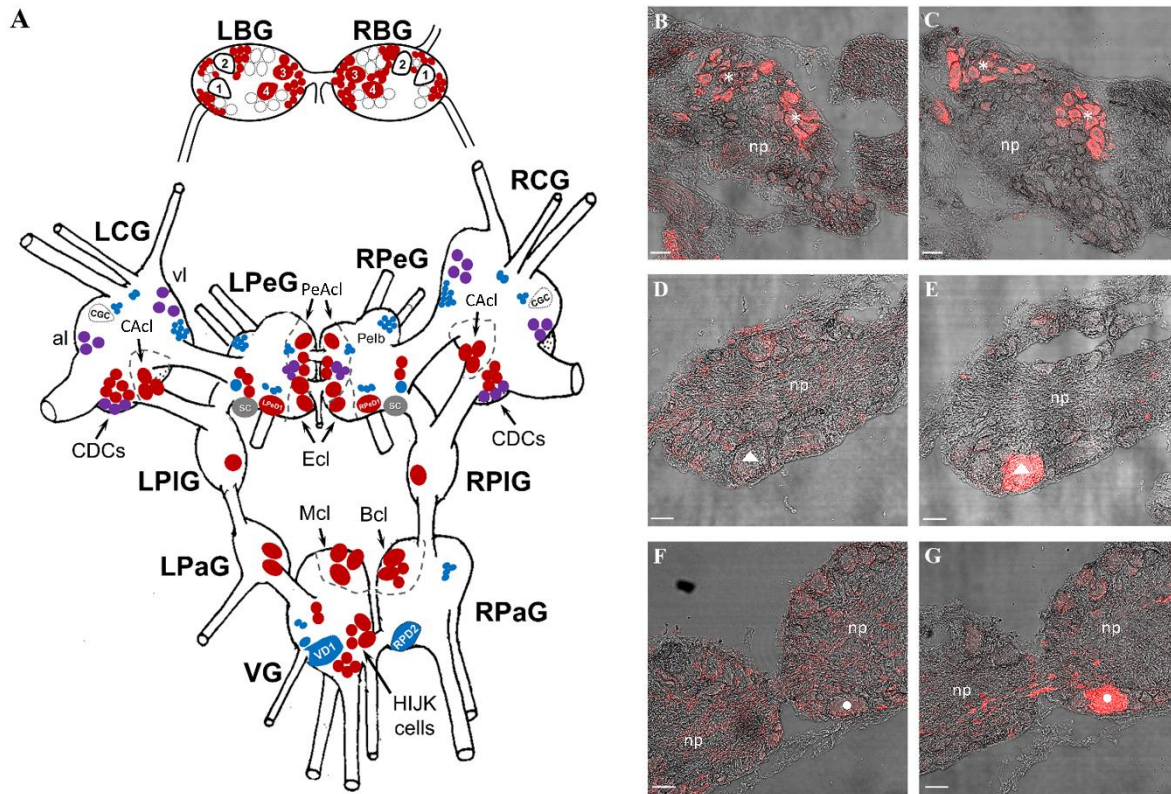
A BG számos, a jelöletlen B1 és B2 motoneuronok körül csoportosuló kis- és közepes méretű ly-GnRH/CRZ-ip neuront tartalmaztak, továbbá a nagyméretű B3 és B4 táplálkozási motoneuronok is jelölődtek (19A,B ábra). A CG-ben kisméretű neuronok jelölődtek a ventrális (vl) és anterior (al) lebenyben, valamint közepes méretű neuronok az A-csoportban (Acl). A kaudodorzális sejtek (CDC) szintén immunpozitívak voltak (19A,C ábra). A PeG-ben számos kis- és közepes méretű ly-GnRH/CRZ-ip neuront találtunk az A-csoportban (Acl) és E-csoportban (Ecl), valamint szerotonerg bal oldali lábdúc dorzális 1 (LPeD1) és a dopaminerg jobb oldali lábdúc dorzális 1 (RPeD1) óriás neuronok is jelölődtek (19A,D ábra). Végül, néhány közepes- és nagyméretű immunpozitív neuront láttunk a VG HIJK sejtjeiben és M-csoportjában (Mcl), valamint a PaG B-csoportjában (Bcl) (19A,E ábra).

A specifikus anti-ly-GnRH/CRZ (antigén: CNYHFSNGWYA-amide) antitest és a nem specifikus anti-humán-GnRH (antigén: pQHWSYGLRPG-amide) antitest jelölésének összehasonlítása során megállapítottuk, hogy mindkettő ad pozitív jelet a CNS-ben, de nagyon eltérő mintázattal (20. ábra). Voltak olyan neuronok, amelyeket mindkét antitest jelölt (például. CDC sejtek), valamint voltak olyan neuronok, amelyeket vagy csak a specifikus (például RPeD1), vagy csak a nem specifikus (például zsigerdúc dorzális 1 [VD1] és jobb oldali falidúc dorzális [RPD2]) antitest jelölt. Általánosan elmondható, hogy a specifikus antitest sokkal több neuront jelölt és minden idegdúcban adott immunpozitív jelet.



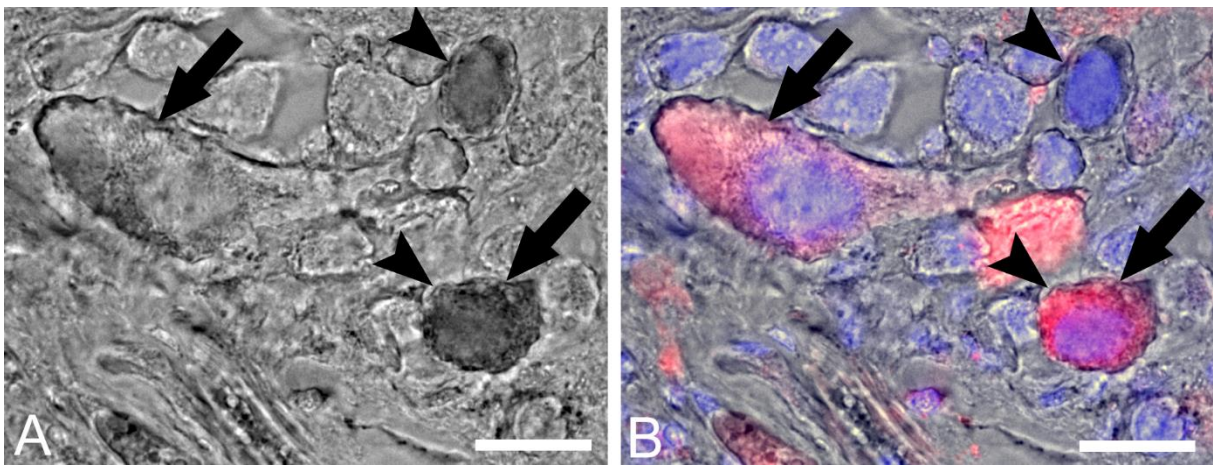
19. ábra: A ly-GnRH/CRZ-ip neuronok eloszlása a CNS-ben. (A) A sematikus CNS térkép (dorzális nézet) mutatja a jelölt sejteket (piros körök) a bal (L)- és jobb (R) oldali pofa- (BG), agyi- (CG), láb- (PeG), köpeny- (PIG), fali- (PaG) és zsigerdúcban (VG). A térképen a tájékozódást segítő jelöletlen sejtek (például CGC, VD1) is fel vannak tüntetve. (B-E) Reprezentatív, lézer konfokális mikroszkóppal készült képek. (B) A jobb BG-ben kis- és közepes méretű nem jelölődő sejtek (nyilak), valamint nagyméretű azonosított ly-GnRH/CRZ-ip sejtek (B3, B4 - *) figyelhetők meg. (C) A jobb CG-ben számos azonosított (CDC sejtek - nyílhegyek) és nem azonosított sejt (nyilak) mutatott immunjelet. (D, E) Számos kis- (10-30 μ m), közepes- (30-50 μ m) és nagyméretű (50-80 μ m) immunreaktív neuron (nyilak) látható a PeG-ben (E-csoport), a VG-ben (M-csoport) és a jobb PaG-ben (B-csoport). A neuropil, a konnektívumok és a perifériás idegek intenzív jelölést mutattak. A 'B-E' képek lézer konfokális mikroszkóppal készültek. Kék: Hoechts 33342 magfestés. Rövidítések: dbn – dorso-pofaideg; pbn –

poszt pofaideg; *cbc* – agydúc-pofadúc konnektívum; *mln* - medián ajakideg; *sln* - superior ajakideg; *vl* - ventrális lebeny; *al* - anterior lebeny; *cc* – agydúci kommissúra; *spn* - superior fali ideg; *mpn* - medián fali ideg; *ipn* - inferior fali ideg; *Acl* - A-csoport; *Ecl* - E-csoport; *SC* - statociszta; *lpan* - bal fali ideg - *cpn* - bőrideg; *an* - anális ideg; *in* - intesztinális ideg; *gn* - genitális ideg; *irpan* - internális jobb fali ideg; *erpan* - externális jobb fali ideg; *Mcl* - M-csoport; *Bcl* - B-csoport; *B1-B4* - azonosított táplálkozási motoneuronok; *db* - dorzális test; *np* - neuropil; *pn* - köpenyideg; *cpc* – agydúc-pofadúc konnektívum; *plpc* – köpenydúc-lábdúc konnektívum. Méretarány=50 μ m.



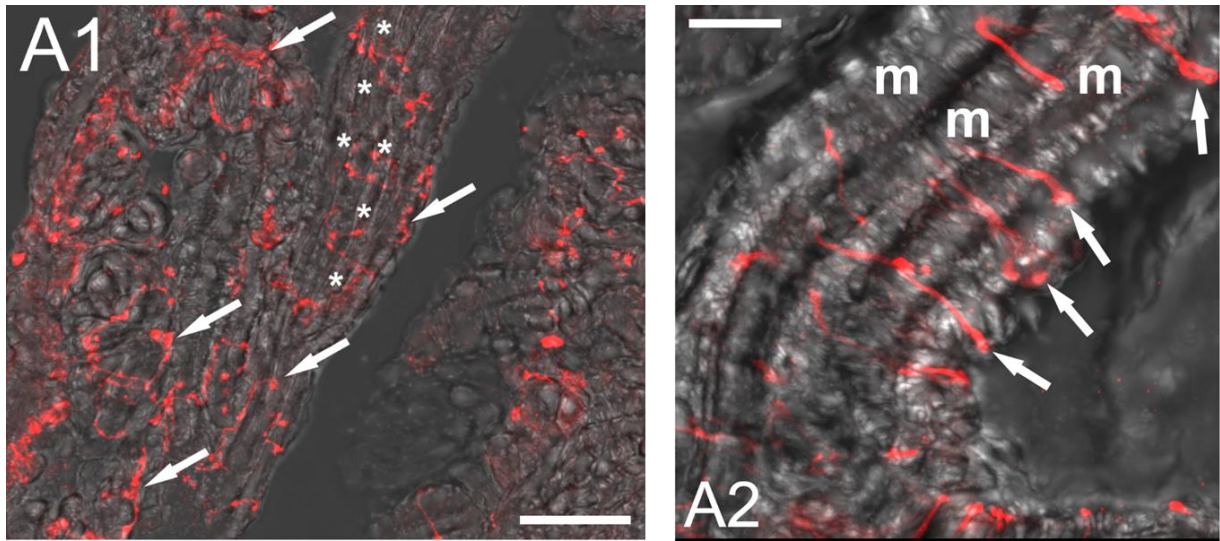
20. ábra: (A) Sematikus CNS térkép (dorzális nézet) a specifikus és nem specifikus antitestek által jelölt neuronok eloszlásával a bal (L)- és jobb (R) oldali pofa- (BG), agyi- (CG), láb- (PeG), köpeny- (PIG), fali- (PaG) és zsigerdúcban (VG). A specifikus antitest által jelölt neuronokat piros körök, a nem specifikus antitest által jelölt neuronokat kék körök, míg a mindkét antitest által jelölt neuronokat lila körök jelzik. A térképen a tájékozódást segítő jelöletlen sejtek (például CGC) is fel vannak tüntetve. (B-G) Reprezentatív, alternáló metszéssel és lézer konfokális mikroszkópiával készült képek. A jobb CG-ben (B-C) a specifikus (B) és a nem specifikus (C) antitest is adott jelölést, részben ugyanazok a neuronok jelölődtek (csillagok). A VG óriás VDI sejtjét (D-E, háromszög) és a jobb PaG óriás RPD2 sejtjét (F-G, kör) csak a nem specifikus antitest jelölte (E, G). Rövidítések: CDCs – kaudodorzális sejtek; CGC – agyi óriás sejt; LPeD1 – bal oldali lábdúc dorzális 1-es neuron; RPeD1 – job oldali lábdúc dorzális 1-es neuron; Acl - A-csoport; Ecl - E-csoport; SC - statociszta; Mcl - M-csoport; Bcl, B-csoport; B1-B4 – azonosított táplálkozási motoneuronok; VDI – zsigerdúc dorzális 1-es neuron; RPD2 – jobb oldali fali dúc dorzális 2-es neuron; al – anterior lebeny; vl – ventrális lebeny. Méretarány=50 μ m.

Hogy megállapítsuk, hogy a jobb CG ventrális és anterior lebenyeiben talált ly-GnRH/CRZ-ip neuronok vetülnek-e a pénisz komplex motoros beidegzéséért felelős pénisz idegbe, a CNS neuronjait retrográd visszatöltöttük a pénisz idegről, majd IHC-t csináltunk. Míg az anterior lebenyben detektáltunk kettősen jelölődő neuronokat, a ventrális lebenyben nem találtunk. Az anterior lebenyt reprezentáló 21. ábra egy kettősen jelölődő neuront mutat. Megfigyeltünk olyan ly-GnRH/CRZ-ip sejteket is, amelyek nem jelölődtek a nikkel-kloriddal, azaz nem mindegyik anterior lebenyben található ly-GnRH/CRZ-ip neuron projektál a pénisz idegbe.

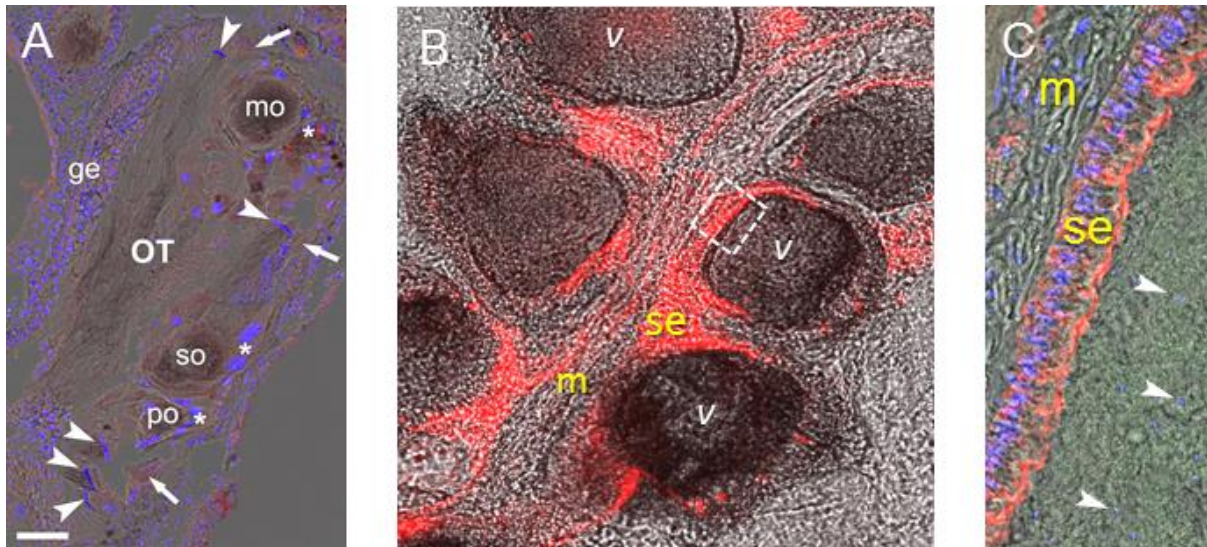


21. ábra: A jobb CG anterior lebenyében található ly-GnRH/CRZ-ip neuronok kettős jelölése IHC-vel és nikkel-lizin visszatöltéssel. Az 'A' és 'B' képek ugyanazt a metszetet jelölik. Vizualizálás retrográd töltés után IHC leképezés nélkül (A), illetve IHC leképezéssel (B). Piros: ly-GnRH/CRZ immunjelölés; kék: Hoechts 33342 sejtmagfestés; nyíl: ly-GnRH/CRZ-ip, de nem visszatöltődött neuron; nyílhegy: visszatöltődött, de nem ly-GnRH/CRZ-ip neuron; Nyíl+nyílhegy: kettősen jelölt neuron. Méretarány=25 μm

A perifériás szövetek közül vizsgáltuk a peptid jelenlétét a szívben, a hímnős mirigyben, és a szeménális vezikulumokban. Abundáns ly-GnRH/CRZ-ip axon rostokat találtunk a szívpitvar felszínén az izomrostok hossz tengelyére merőlegesen, maguk a szívizomrostok nem jelölődtek (22A1, A2 ábra). A hímnős mirigyben nem detektáltunk pozitív jelet (23A ábra), azonban a szeménális vezikulumok szeménális epitéliuma intenzív immunpozitivitást mutatott (23B, C ábra).

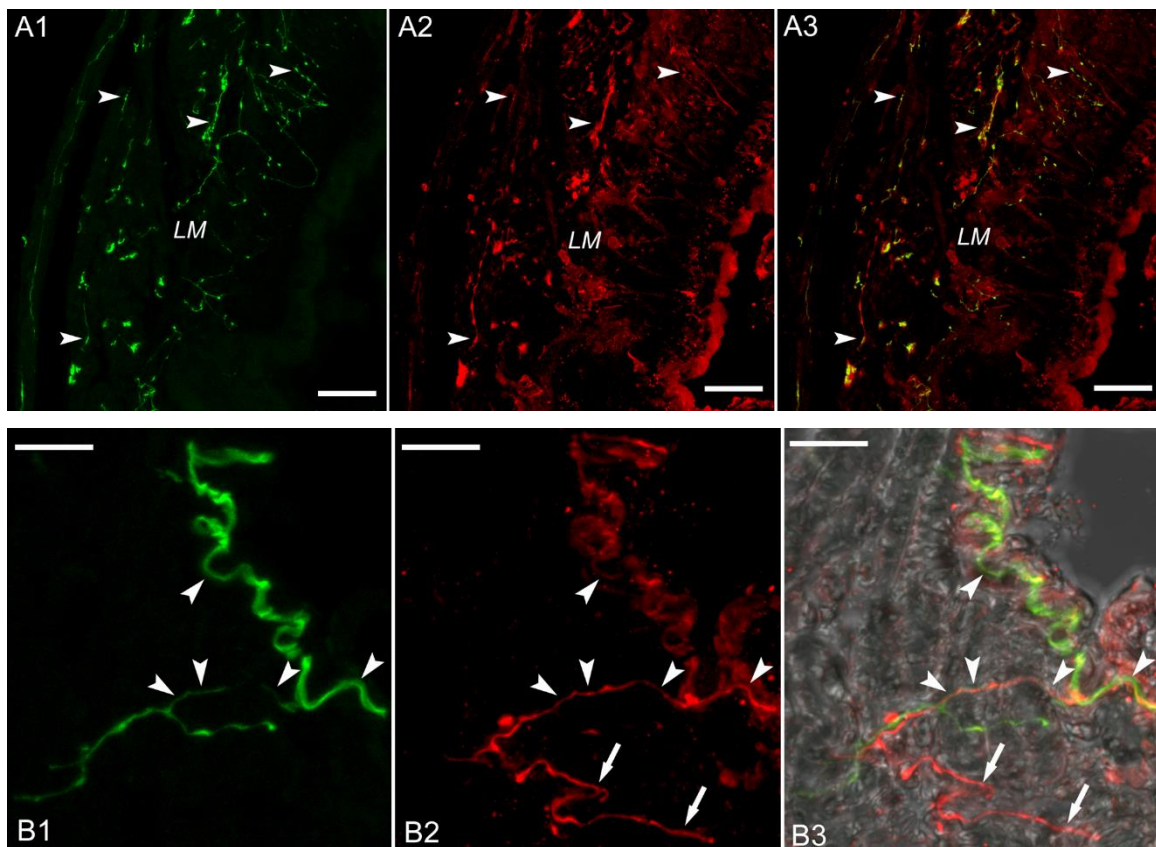


22. ábra: ly-GnRH/CRZ immunreaktív (piros) elemek a szívpitvarban. (A1) Gazdag ly-GnRH/CRZ-ip rostok (nyilak) láthatók a pitvari izomrostok transzverzális (csillagok) felszínén. (A2) A pitvari izom innervációja nagyobb nagyításban. Transzverzálisan futó immunpozitív axonok (nyilak) az izomrostok (m) mentén. Méretarány=25 μ m - A1; 10 μ m - A2.



23. ábra: ly-GnRH/CRZ immunjelölődés a hímnős mirigyben (A) és a szeminális vezikulumokban (B, C). A hímnős mirigyben (OT) nem detektáltunk immunpozitív jelet. A szeminális vezikulumok (V) szeminális epitéliumában (se) intenzív jelölést detektáltunk (piros). A 'B' képen látható szaggatott vonalú négyzet a 'C' képen látható területet jelöli nagyobb nagyításban. Kék: Hoechts 33342 sejtmagfestés. Rövidítések, jelölések: ge, germinális epitélium; po – elsődleges oocita; so – másodlagos oocita; mo – érett oocita; * - follikuláris sejtek; nyilak – Sertoli-sejtek; nyílhegy – spermium; m - izom

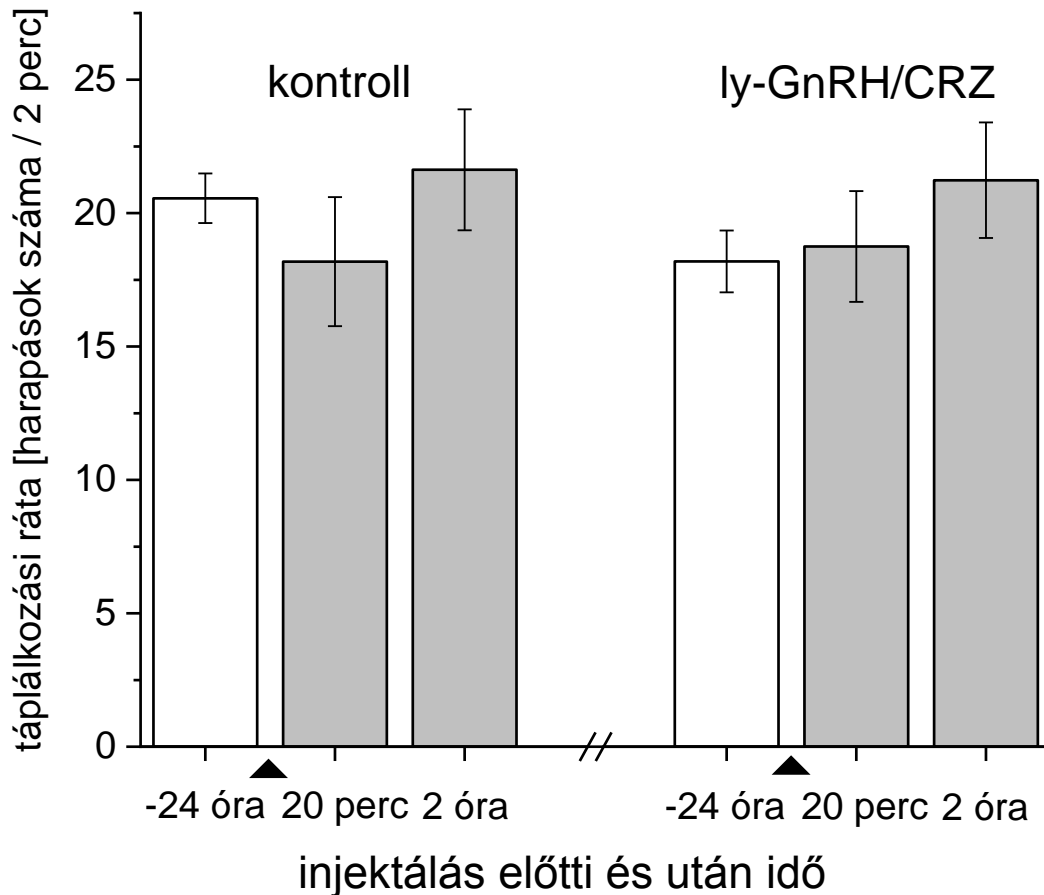
A periférián vizsgáltuk továbbá azt is, hogy a ly-GnRH/CRZ neuropeptid potenciálisan részt vesz-e a szív és a pénisz komplex szabályozásában/beidegzésében, amely alapvetően több kémiai hírvivő molekula (például 5-HT, acetilkolin, FMRFa) kombinációján alapszik (Benjamin, 2008; Benjamin és Kemenes, 2013, 2020; Koene, 2010 összefoglalók). A preputium longitudinális izmában (24A-B ábra) és a szívpitvar izomzatában (24D-F ábra) is olyan idegelemeket/axon rostokat figyeltünk meg, amelyekben a ly-GnRH/CRZ-immunreakció és az 5-HT- immunreakció kolokalizálót mutatott.



24. ábra: 5-HT (zöld) és ly-GnRH/CRZ (piros) immunjelölődés a preputiumban (A1-A3) és a szívpitvarban (B1-B3). A preputium hosszanti izmában (LM) és a pitvarizom felszínén számos olyan axon rost látható, amely 5-HT és ly-GnRH/CRZ kolokalizációt mutat (A3, B3 - nyílhegyek). Méretarány=40 μ m (A1-A3) és 10 μ m (B1-B3).

5.6. A ly-GnRH/CRZ szerepe a viselkedési mintázatokban

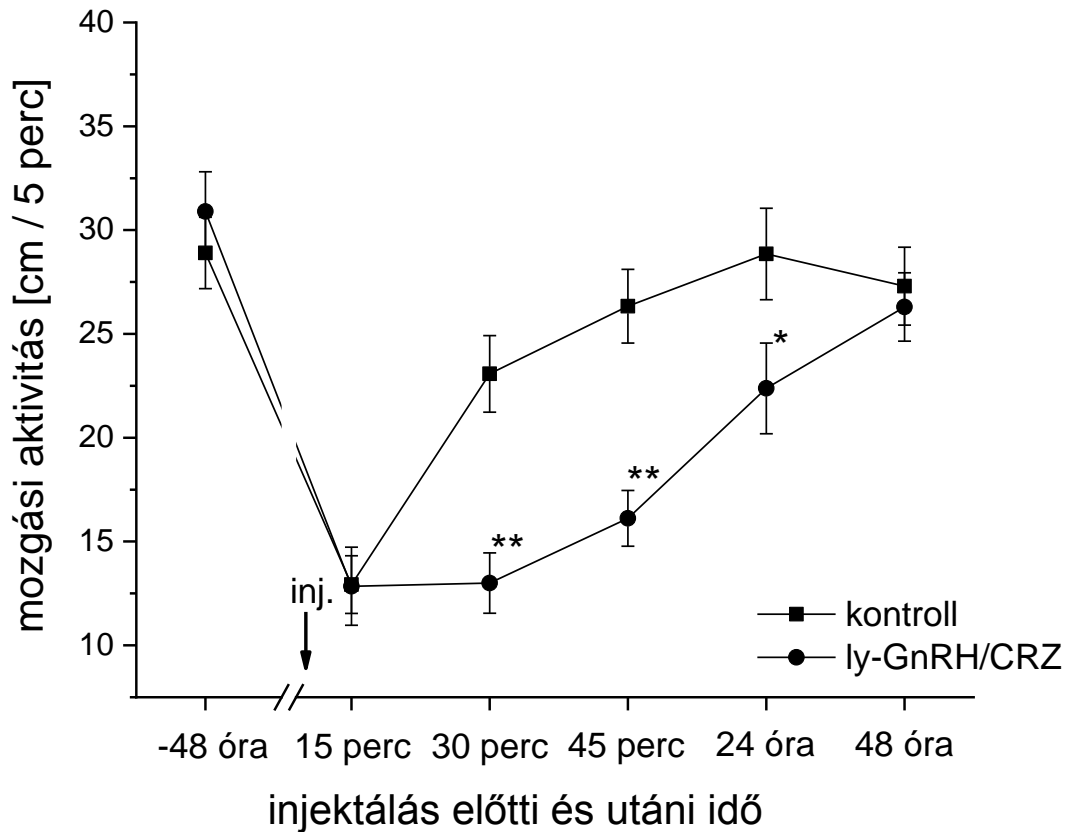
Megfigyeléseink alapján, a ly-GnRH/CRZ peptid nem okozott változást a táplálkozási rátában. A ly-GnRH/CRZ injektált csoportban sem 20 perccel sem 2 órával az injektálást követően nem változott szignifikánsan a cukorral kiváltott ritmikus reszelő nyelv (radula) öltögetések (harapások) száma a kontroll csoporthoz képest (25. ábra).



25. ábra: A kísérleti csoportok táplálkozási rátája (harapások száma/2 perc). Az injektálás előtti harapásszámot a fehér oszlopok, míg az injektálás utáni értékeket a szürke oszlopok jelzik. Mindegyik oszlop az átlagot \pm szórást mutatja ($n = 10$ állat/csoport/ismétlés). A háromszögek az injektálás időpontját jelzik. Nem volt szignifikáns különbség a kontroll és ly-GnRH/CRZ injektált csoportok között.

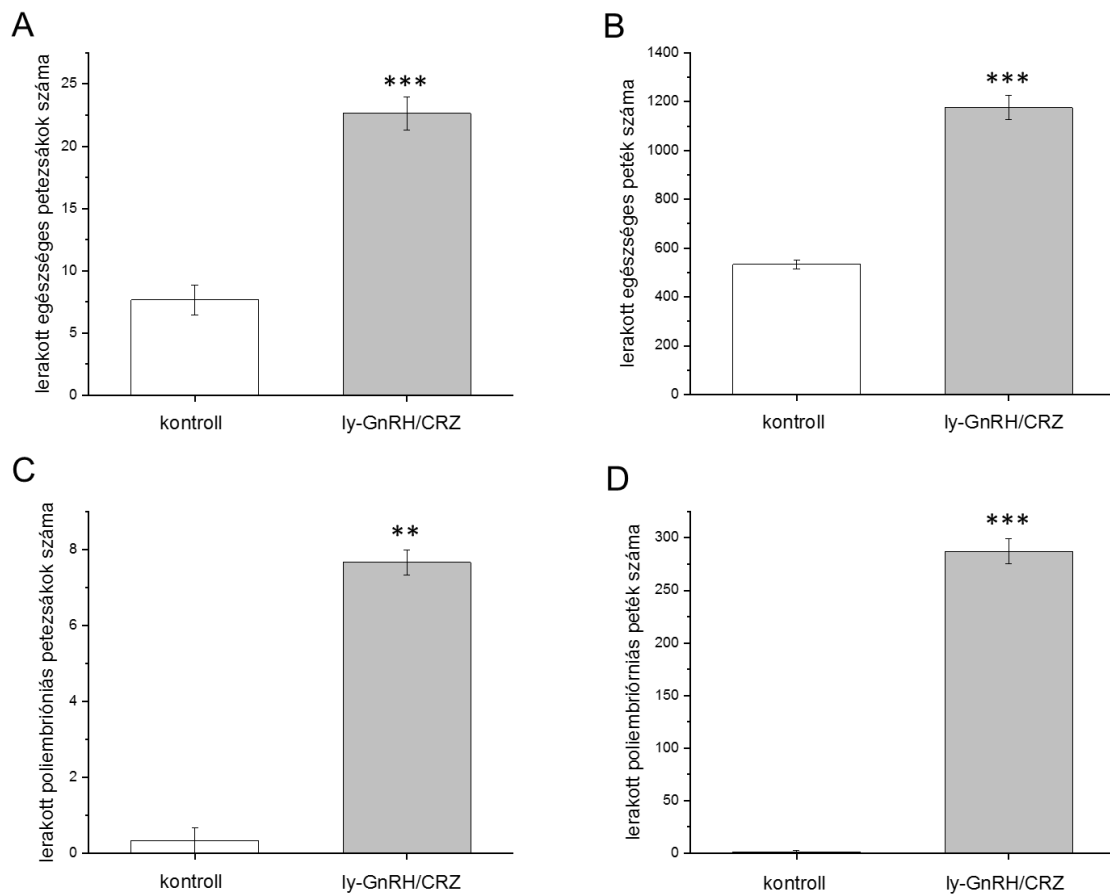
Ezzel ellentétben, a ly-GnRH/CRZ peptid jelentős változást indukált a mozgási aktivitásban, ezt az 26. ábra mutatja. A két-utas ismételt ANOVA elemzés szignifikáns eltéréseket mutatott az idő (megfigyelési pontok) [$F(5, 251) = 20.03, P < 0.05$], a kezelés (peptid injektálás) [$F(1, 251) = 7.96, P < 0.001$] és az idő-kezelés interakciójának [$F(5, 251) = 3.90, P < 0.01$] vizsgálata során. A további, egyes időpontokra elvégzett kétmintás t-próbák alapján a ly-GnRH/CRZ injektált állatok szignifikánsan alacsonyabb mozgási aktivitást kezdtek mutatni 25 perccel az injektálás után ($t(58) = 6.267; P < 0.001$), ez a jelenség még 24 órával később is

megfigyelhető volt ($t(58) = 4.57$; $P < 0,05$). Az injektálás után 48 órával már nem volt szignifikáns különbség a kontroll és ly-GnRH/CRZ injektált egyedek mozgási aktivitásában.

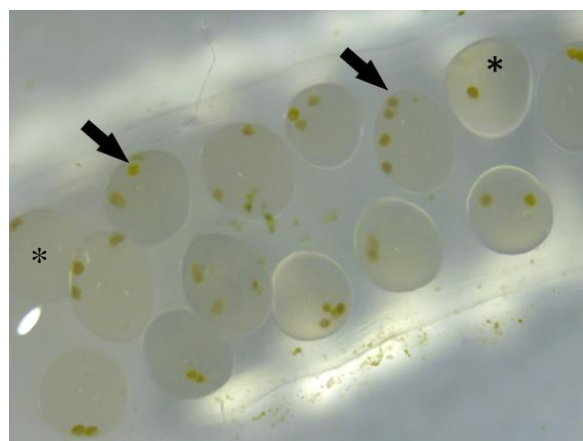


26. ábra: A kísérleti csoportok mozgási aktivitása (a csigák által megtett út centiméterben, 5 perc alatt). Mindegyik adatpont az átlagot \pm szórást mutatja ($n = 10$ állat/csoport/ismétlés). A kontroll és ly-GnRH/CRZ csoportok közti szignifikáns különbséget az adott időpontokban a csillagok jelzik (* $P < 0,05$ és *** $P < 0,001$).

A mozgási aktivitáshoz hasonlóan, a ly-GnRH/CRZ peptiddel injektált állatok reprodukciós aktivitása is jelentősen megváltozott (27. ábra). A kontroll csoport által lerakott egészséges petezsákok (7.66 ± 0.33) számához viszonyítva a ly-GnRH/CRZ injektált csoportban szignifikánsan megnőtt a lerakott egészséges petezsákok száma (22.66 ± 1.33 , $P < 0,001$) (27A ábra). Ezzel párhuzamosan, a ly-GnRH/CRZ injektált csoport egyedei által lerakott egészséges peték száma (1175 ± 49.65 , $P < 0,001$) szignifikánsan nagyobb volt a kontroll csoporthoz képest (533 ± 19.05) (27B ábra). Ugyanakkor, a ly-GnRH/CRZ injektált csoport petezsákjainak egy részében minőségi romlást figyeltünk meg, ami poliembrióniás petéket tartalmazó petezsákok megjelenésében nyilvánult meg (27C, D ábra; 28. ábra). Összegezve, a ly-GnRH/CRZ peptid megnövelte a lerakott petezsákok/peték számát, de egyben növelte is a poliembrióniás peték számát a kontrollhoz képest.



27. ábra: A kísérleti csoportok reprodukciós aktivitása. Mindegyik oszlop az átlagot \pm szórást mutatja ($n = 10$ állat/csoport/ismétlés). A fehér oszlopok a kontrollt, míg a szürke oszlopok a ly-GnRH/CRZ injektált csoportot jelölik. A kontroll és ly-GnRH/CRZ csoportok közti szignifikáns különbséget a csillagok jelzik (** $P < 0.01$ és *** $P < 0.001$)



28. ábra: Egészséges (csillag) és polliembrióniás (nyíl) petéket tartalmazó petezsák egy ly-GnRH/CRZ injektált felnőtt csigából.

5.7. A gerinces szex szteroid szintézisben és receptor-mediációban részt vevő gének homológjai a *L. stagnalis*-ban

A *L. stagnalis* neuronális transzkriptomjának szekvenálásával kapott adatokat, valamint a genom adatokat felhasználva sikeresen azonosítottuk több, a gerinces szex szteroid szintézis útvonalban és receptor-mediációban részt vevő gén homológját (5. táblázat).

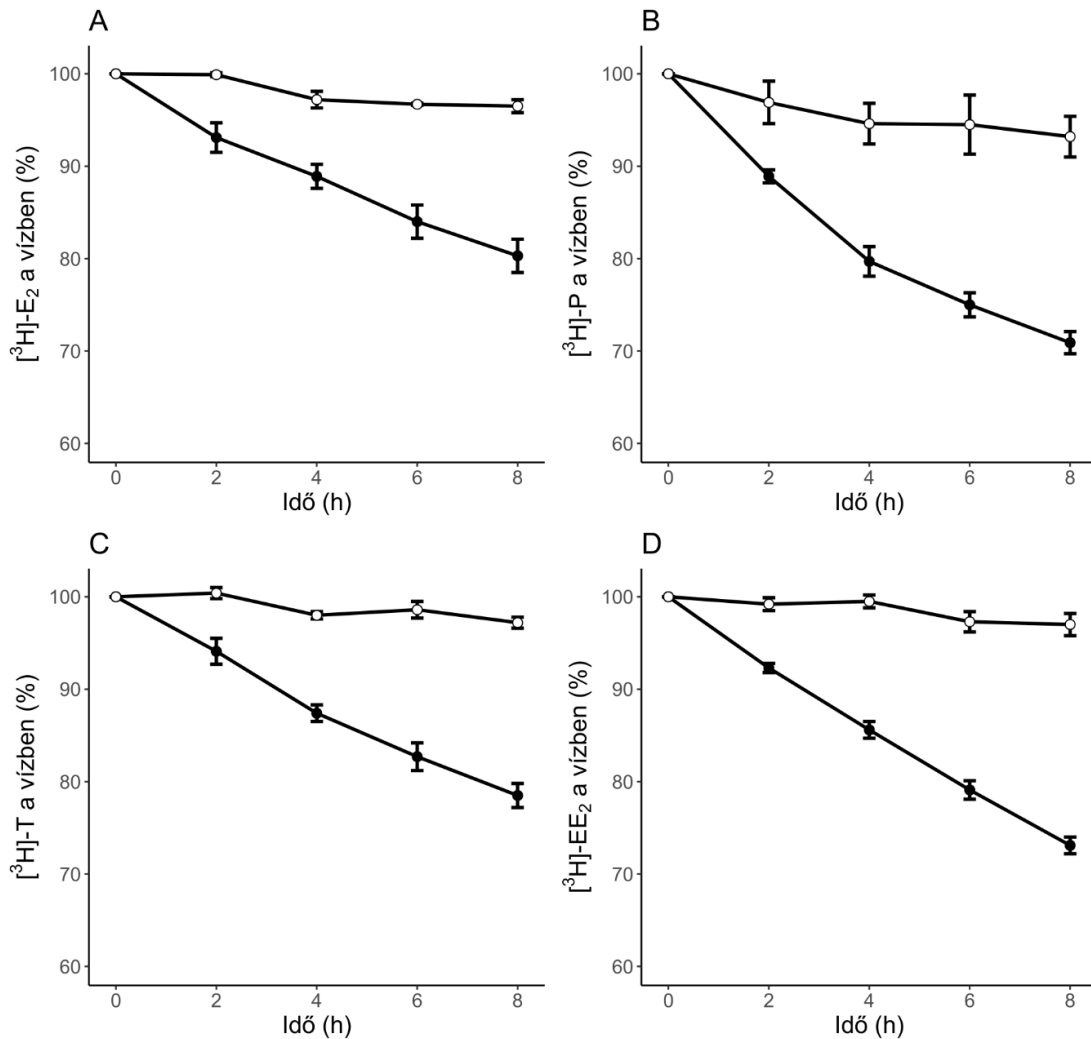
A szex szteroidok szintézisében szerepet játszó enzimek közül nem találtunk homológ szekvenciát a gerinces CYP11A, CYP19A és 3 α -HSD génekhez. Ezzel ellenétben sikeresen azonosítottuk a szteroidogenezist akutan reguláló fehérje (StAR), 3 β -HSD, CYP17, 17 β -HSD és 5 α -reduktáz gének homológjait. Nem találtunk homológ szekvenciát a receptor-mediációban szerepet játszó gerinces nPR, nAR, szex szteroid-kötő globulin (SSBG) és transzkortin (CBG) génekhez, azonban azonosítottuk a gerinces nER és PGRMC1 homológjait. Minden azonosított homológ esetében azonosítani tudtuk a rá jellemző konzervált domént is (például SRPBBC domén – StAR; P450 domén - CYP17) (Függelék 7.)

5. táblázat: A gerinces szex szteroid szintézisben és receptor-mediációban részt vevő gének homológjai a *L. stagnalis*-ban. Az azonosított fehérje szekvenciák reprezentatív homológia adatait a Függelék 8. tartalmazza.

Gerinces szex szteroid szintézisben és receptor-mediációban részt vevő gének	Rövidítések/ szinonímák	Homológ a <i>L. stagnalis</i> -ban	NCBI azonosító számok
Szteroidogenezist akutan reguláló fehérje	StAR, STARD1	van	MT655302
Koleszterin-oldallánc hasító enzim	CYP11A	nincs	-
3 α - hidroxiszteroid-dehidrogenáz	3 α -HSD	nincs	-
3 β -hidroxiszteroid-dehidrogenáz	3 β -HSD	van	MT655303
17 α -hidroxiláz/17,20-liáz	CYP17	van	MT655304
17 β - hidroxiszteroid-dehidrogenáz	17 β -HSD	van	MT643176; MT655305; MT655306; MT655307
5 α -reduktáz	-	van	MT643177; MT643178
Aromatáz	CYP19A	nincs	-
Nukleáris ösztrogén receptor alfa	nER α , NR3A1	van	MN989918
Nukleáris progeszteron receptor	nPR, NR3C3	nincs	-
Nukleáris androgén receptor	nAR, NR3C4	nincs	-
Progeszteron receptor membrán komponens 1	PGRMC1	van	MT178274
Szex szteroid-kötő globulin	SSBGs	nincs	-
Transzkortin	CBG	nincs	-

5.8. Radioaktívan jelölt szteroidok felvétele

A 29. ábra mutatja a radioaktívan jelölt E₂, P, T és EE₂ fogyását a csigákat tartalmazó kísérleti tankok vízből. Minden csigát tartalmazó tankban jelentős csökkenés volt a radioaktivitásban, a P felvétele volt a leggyorsabb. A vízben maradt radioaktivitás mennyisége 8 órát követően ~80% volt az E₂, ~70% volt a P, ~78% volt a T és ~75% volt EE₂ esetében. Az első 1.5 órára kiszámított felvételi ráta 3.7 mL állat⁻¹ óra⁻¹ (E₂) és 5.6 ml állat⁻¹ óra⁻¹ (P) között volt (6. táblázat).



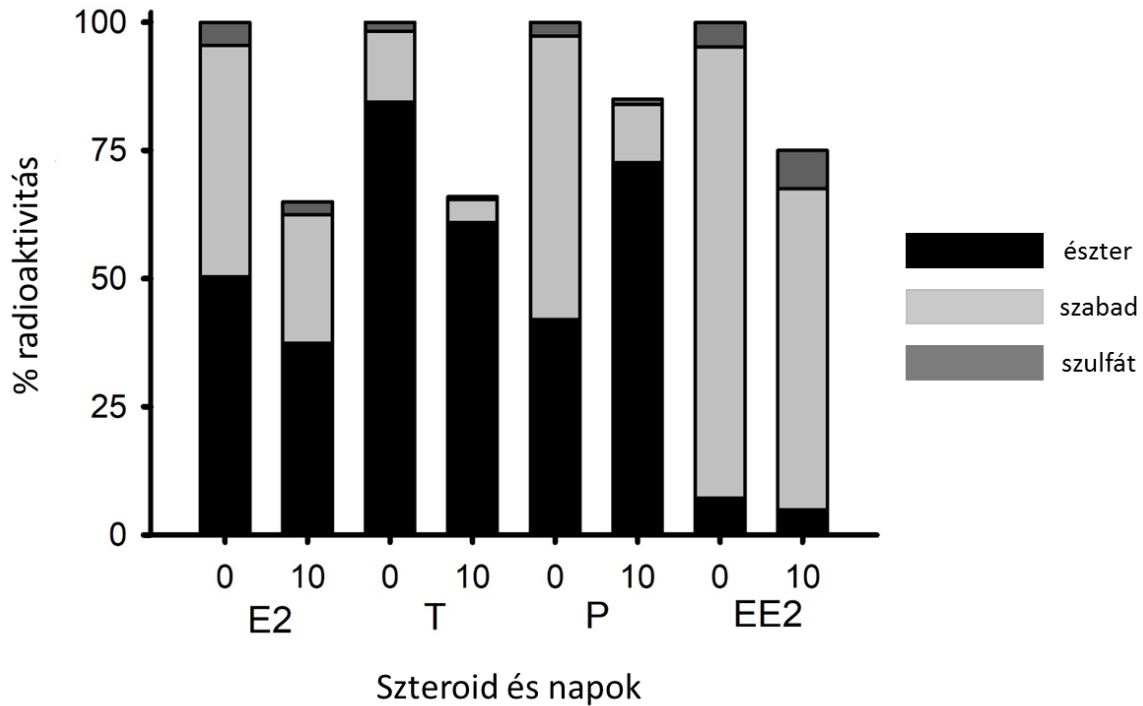
29. ábra: Radioaktívan jelölt szteroidok eltávolítása a vízből *L. stagnalis* egyedek által. A 8 órás kezelés során a kezdei koncentráció 2.6 $\mu\text{Ci/L}$ [³H]-E₂ (A), 2.7 $\mu\text{Ci/L}$ [³H]-P (B), 3.5 $\mu\text{Ci/L}$ [³H]-T (C), és 2.7 $\mu\text{Ci/L}$ [³H]-EE₂ (D) volt. Mindegyik pont a %-os átlag értéket \pm szórást mutatja a kezelési (●) és szorpciós kontroll (○) tankokban. ($n = 5$ kezelési tank és $n = 3$ kontroll tank, mindegyikben 2 állat)

6. táblázat: Felvételi ráták és a hozzátartozó adatok

Kísérlet	Eltávolítás a kísérlet végén (%)	Lináris görbe ($f = y_0 + a \cdot x$), konstansok		A bomlási görbékéből számolva:	
		konstans y_0	konstans a	Eltávolítás az első 1.5 órában (%)	Felvételi ráta (mL állat ⁻¹ óra ⁻¹)
E ₂	19.7	5714.6	-140.3	3.7	3.7
EE ₂	26.7	5857.9	-195.9	5.0	5.0
T	21.5	7686.5	-210.4	4.1	4.1
P	29.1	5864.0	-217.0	5.6	5.6

5.9. Jelölt szteroidok megoszlása a szövetekben a kiürülési periódus elején és végén

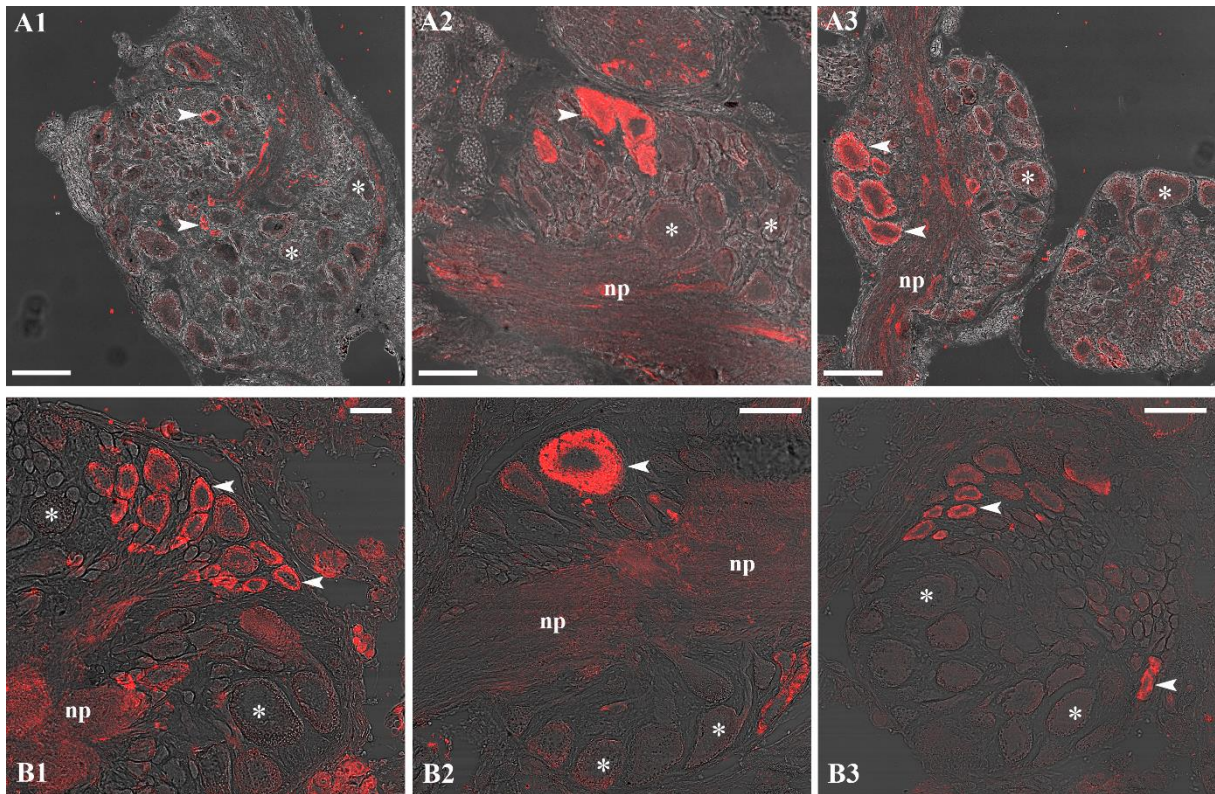
A szövetekben található metabolitok extrakcióját és fázis elválasztását követő vizsgálatok nagyarányú radioaktivitást mutattak a P (40%), E₂ (50 %) és T (85%) esetében a lipidben gazdag heptán frakcióban, ahol az észterifikált szteroidok akkumulációját vártuk (30. ábra). Ugyanakkor a várákosnak megfelelően, a potenciálisan észterifikálható EE₂ aránya sokkal alacsonyabb volt (8%). A maradék radioaktivitás nagy része a szabad szteroidokat tartalmazó 80%-os etanol frakcióban volt mérhető. A vízdékony frakcióban a radioaktivitásnak csak egy nagyon alacsony aránya volt kimutatható. Tíz nap kiürülési periódust követően a radioaktivitásnak ~70%-a még mindig jelen volt az állatokban (30. ábra). Az EE₂-t kivéve minden szteroid aránya magasabb volt az észter frakcióban, ami a szabad szteroidok preferenciális kiürülését jelenti.



30. ábra: A 4 szteroid radioaktivitásának megoszlása a *L. stagnalis* egyedek teljes szövetében a 0. (közvetlenül a 8 órás kezelés után) és a 10. (kiürüési periódus után) napokon. A 0. nap értékei vannak 100%-nak tekintve. A szteroidok aránya az észter (fekete), szabad (világos szürke) és vízoldékony (sötétszürke) frakciókban szintén fel van tüntetve az adott napokon. Az adatok a teljes radioaktivitás átlagos százalékaként vannak mutatva minden egyes extraktum esetében ($n=5$ /időpont).

5.10. A gerinces antitestek által jelölt fehérjék azonosítása a központi idegrendszerben

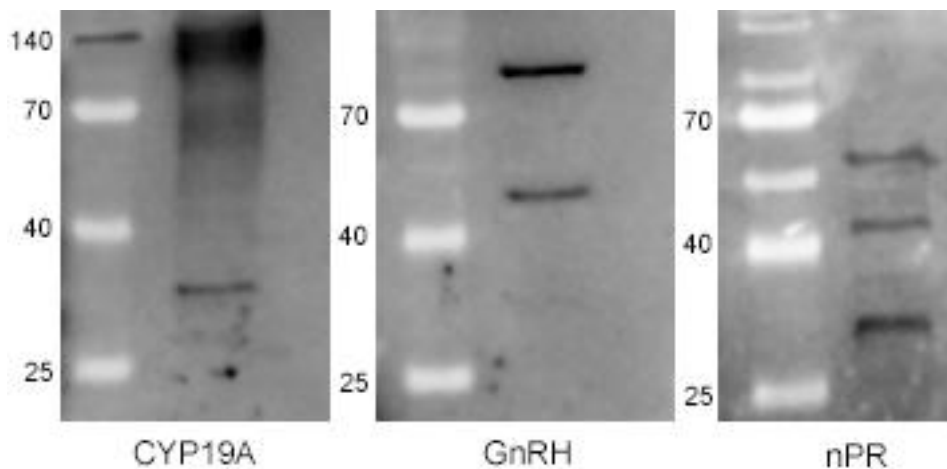
Habár a CYP19A és nPR gének nem találhatóak meg a *L. stagnalis*-ban, az anti-humán-CYP19A és az anti-humán-nPR antitesteket használó IHC vizsgálataink során immunpozitív jelet kaptunk a CNS-ben (31. ábra). Továbbá, ahogy a 20. ábrán bemutatásra került, az anti-humán-GnRH-ra készített antitest szintén jelölést adott.



31. ábra: Reprezentatív CYP19A (A1-A3) és nPR (B1-B3) immunjelölődés (piros) a CNS-ben. Az anti-CYP19A antitest például az RCG-ben (A1), az RPIG-ben (A2) és az RPaG-ben (A3), míg az anti-nPR antitest például a VG-ben (B1 és B3) és az RPeG-ben (B2) adott jelölődést. Nyílhegy: jelölt neuron(ok), csillag: jelületlen neuron(ok), np: neuropil. Méretarány=100 μ m (A1, A3, B1, B3) és 50 μ m (A2, B2).

Ahhoz, hogy azonosítsuk (vagy legalább részben jellemezzük), melyek azok a molekulák, amikhez az antitestek kötődnek és nem specifikus immunjelet eredményeznek, WB vizsgálatot csináltunk a teljes CNS homogenizátumából (32. ábra). A CYP19A antitest egy diszkrét (~30 kDa) és két amorf (~65 kDa és ~140 kDa) sávot eredményezett, illetve a 140 kDa-os „marker” sávot is jelölte. A GnRH antitest 2 diszkrét sávot (~50 kDa és ~100 kDa), az nPR antitest pedig 3 diszkrét sávot (~30 kDa, ~50 kDa és ~60 kDa) adott. A ~30 kDa-os sávot a CYP19A és az nPR antitest, míg az ~50 kDa-os sávot a GnRH és az nPR antitest is jelölte. A sávokat kivágtuk a párhuzamos SDS-PAGE gélből tömegspektrometriás vizsgálathoz. A „band”-ekben kapott fragmentek és a humán CYP19A, GnRH és nPR protein szekvenciák, illetve az *in silico* prediktált fragmentjeik összehasonlítása során megerősítettük a homológ szekvenciák hiányát. Bár az anti-humán nPR immunogénjével végzett homológ keresés a *L. stagnalis* szekvencia adataiban három találatot adott (Függlék 6.), ezek nem mutattak szignifikáns egyezést az ~50 kDa „band”-ben kapott fragmentekkel. A SWISS-Prot adabázist használva néhány fehérjét is tudtunk azonosítani a „band”-ekben, amelyeket az antitestek lehetségesen jelölnek (7. táblázat), de még további vizsgálatokra van szükség ahhoz, hogy meghatározzuk pontosan mit jelölnek meg a gerinces antitestek. Összességében, ezek az

eredmények alátámasztják azt a predikciót/hipotézist, hogy ezek a gerinces fehérjék nem jelennek meg a puhatestűekben.



32. ábra: Az anti-CYP19A, anti-GnRH és anti-nPR antitestek Western blot elemzése a CNS-ben. A CYP19A antitest egy diszkrét (~30 kDa) és két amorf (~65 kDa és ~140 kDa) sávot eredményezett, illetve a 140 kDa-os „marker” sávot is jelölte. A GnRH antitest 2 diszkrét sávot (~50 kDa és ~110 kDa), az nPR antitest pedig 3 diszkrét sávot (~30 kDa, ~45 kDa és ~60 kDa) adott.

7. táblázat: A „band”-ekben azonosított fehérjék

Minta	Találatok
CYP19A: ~30 kDa	Glicerinaldehyd-3-foszfát dehidrogenáz
CYP19A: ~65 kDa	-
CYP19A: ~140 kDa	-
Marker fehérje: ~140 kDa	Bifunkcionális glutamin-szintetáz adenililtranszferáz/adenilil eltávolító enzim
GnRH: ~50 kDa	51 kDa-os retrográd fehérje, tubulin
GnRH: ~110 kDa	Paramiosin
nPR: ~30 kDa	Glicerinaldehyd-3-foszfát dehidrogenáz
nPR: ~50 kDa	51 kDa-os retrográd fehérje, tubulin
nPR: ~60 kDa	-

5.11. A reprodukcióban szerepet játszó neuropeptidok génexpressziója hormonkezelt csigákban

Célkitűzéseink alapján vizsgáltuk, hogy a 10 ng/L-es progesztogén kezelés hatására megváltozik-e a felnőtt állatok CNS-ében a reprodukcióban szerepet játszó neuropeptidok expressziós szintje (8. táblázat). A génexpressziós elemzéseink azt mutatták, hogy a kontroll csoporthoz viszonyítva egyik neuropeptid expressziója sem változott szignifikánsan a kezelt csoportban.

8. táblázat: A reprodukciót irányító neuropeptidek expressziója nem változik progesztogén kezelés hatására

Neuropeptid prekursor	Szignifikáns génexpressziós változás (hormonkezelt vs kontroll)
CDCH	-
Schistosomin	-
Ovipostatin	-
APGWamid	-
Corazonin	-
Conopressin	-
Myomodulin	-
Pedal peptid	-
Neuropeptid Y	-
FMRFamid 1	-
FMRFamid 2	-
Inhibitory peptide	-
LFRFamid	-
FVRI	-

6. MEGBESZÉLÉS ÉS KÖVETKEZTETÉSEK

6.1. A ly-GnRH/CRZ neuropeptid azonosítása és funkcionális vizsgálata

A közelmúltban megjelent tanulmányok javasolták, hogy az eredetileg gerinctelen GnRH-nak elnevezett peptidek valószínűleg multifunkcionálisak és a peptidcsaládot helyesebb lenne CRZ-ként azonosítani (Hauser és Grimmelikhuijzen, 2014; Jung és mtsai, 2014; Minakata és mtsai, 2009; Plachetzki és mtsai, 2016; Tsai és mtsai, 2010; Tsai, 2018). Mivel a peptidcsalád funkciójáról és evolúciós leszármazási vonaláról szóló ismeretek meghatározó szerepet játszottak az elmúlt 25 évben a gerinces és gerinctelen endokrin rendszer működésének összehasonlításában, egyik fő célunk a ly-GnRH/CRZ azonosítása és funkcionális vizsgálata volt a jól ismert nagy mocsári csigában (*L. stagnalis*), mint gerinctelen modellben.

A nagy mocsári csiga (*L. stagnalis*) neuronális transzkriptomjának szekvenálása és bioinformatikai elemzése után azonosítottuk a ly-GnRH/CRZ preprohormon kódoló szekvenciáját, ami tartalmazta az "érett" peptidet egy tribázikus hasító hellyel és egy alfa amidációs szignállal (QNYHFSNGWYAGKKR). Bár az *O. vulgaris*-ban az MS vizsgálatok megerősítették, hogy a funkcionális/aktív oct-GnRH/CRZ egy amidált dodekapeptid (Iwakoshi és mtsai, 2002), a *Crassostrea gigas* és *Mizuhopecten yessoensis* kagylók CNS-ének MS és IHC elemzése azt találta, hogy a GnRH/CRZ prohormonból egy amidált aktív undekapeptid és egy nem amidált prekursor dodekapeptid is keletkezik (Bigot és mtsai, 2012; Nagasawa és mtsai, 2015a). Némileg szkeptikusak voltunk ezzel az irodalmi adattal kapcsolatban, mivel a glicin végű, prepeptidekből konvertáz által készült neuropeptideknek („peptid-G-OH”) gyakorlatilag azonnal megkezdődik az amidált formába való alakítása. A gerincesekben ezt a bifunkcionális peptidilglicin- α -amidáló mono-oxigenáz enzim végzi, míg a gerinctelenekben két, funkcionálisan egymásra épülő enzim - peptidilglicin- α -hidroxiláló mono-oxigenáz és peptidil- α -hidroxiglicin liáz - látja el ezt a feladatot (Sellami és mtsai, 2012). A prekursor forma csak akkor lehet jelen, ha az adott neuronból hiányzik az enzim, vagy gátolva van, vagy nincs elég Cu^{2+} -ion a működéséhez (Sellami és mtsai, 2012). Ezt szem előtt tartva, a prekursor GnRH/CRZ forma viszonylag széleskörű jelenléte a kagylók CNS-ében meglehetősen szokatlan. Különösen az furcsa, hogy IHC-vel kimutattak olyan neuronokat is, amelyeket a két peptid formára készített antitestek egyszerre jelöltek. Ennek ellenére nem zártuk ki, hogy a *L. stagnalis* CNS-ében is jelen lehet egy aktív (pQNYHFSNGWYA-NH₂) és egy prekursor (pQNYHFSNGWYA-OH) forma. Az MS vizsgálataink azonban csak az aktív forma jelenlétét erősítették meg az *L. stagnalis*-ban. Bár nem hasonlították össze a két forma bioaktivitását, a *Saccostrea glomerata* kagylófajban végzett *in vivo* kísérletek azt mutatták, hogy az amidált

undekapeptid ívást okoz (In és mtsai, 2016). Továbbá az amidált undekapeptid injektálása stimulálta a spermatogóniumok osztódását és maszkulinációját *M. yessoensis*-ben (Nagasawa és mtsai, 2015c; Nakamura és mtsai, 2007; Treen és mtsai, 2012), valamint ívást és ovulációt okozott a *Haliotis discus hannai*-ban (Funayama és mtsai, 2019). Az *A. californica*-ban mindkét forma fiziológiás hatását vizsgálták, azonban csak az amidált undekapeptidet találták biológiailag aktívnak (Tsai és mtsai, 2010). Ezen korábbi eredmények és a mi eredményeink alapján úgy gondoljuk, hogy az amidált undekapeptid használata, mint funkcionális/aktív GnRH/CRZ egy közös vonás a csigákban és kagylókban. Ugyanakkor, az *O. vulgaris*-ban talált szokatlan amidált dodekapeptid - mint funkcionális GnRH/CRZ - evolúciós jelentősége még továbbra sem tisztázott.

Hogy naprakésszé tegyük a GnRH neuropeptid szupercsalád evolúciós kapcsolatait az újonnan azonosított ly-GnRH/CRZ-vel (és egyéb közelmúltban azonosított szekvenciával), molekuláris filogenetikai vizsgálatot is végeztünk. Az elemzés során két kihívással néztünk szembe. Egyrészt a GnRH szupercsalád viszonylag rövid (58–219 AA) preprohormon szekvenciái alacsonyabb „bootstrap” értékeket okoznak. Másrészt a biológiai aktivitás (például receptorhoz kötődés) miatt adott módon konzerválódott érett peptid szekvenciák inkorrekt klasztereződést okozhatnak (Hauser és Grimmelikhuijzen, 2014). Például a *Capitella teleta* és *Helobdella robusta* AKH peptidek nem „igazi” AKH-k, valamint annak a *Brachionus calyciflorus* AKH az ACP klaszterbe esik annak ellenére, hogy konszenzus AKH szekvenciája van. Mindezek ellenére az elkészített filogenetikai fánk jól korrelált korábbi tanulmányok eredményeivel (Hauser és Grimmelikhuijzen, 2014; Plachetzki és mtsai, 2016; Tsai, 2018). A GnRH/CRZ elágazás egyértelműen mutatja, hogy az eredetileg puhatestű GnRH-nak nevezett peptidek nincsenek szorosabb rokonságban a gerinces GnRH családdal, mint a CRZ, AKH és ACP családokkal.

A ly-GnRH/CRZ azonosítása után vizsgáltuk a transzkript és a peptid jelenlétét/eloszlását a CNS-ben és különböző perifériás szövetekben (szív, himnős mirigy, szeminális vezikulumok). Az RT-PCR eredményeink azt mutatták, hogy a ly-GnRH/CRZ a CNS minden idegdúcában, valamint minden vizsgált perifériás szövetben expresszálódott. Ugyanakkor, az IHC vizsgálataink csak a CNS-ben és a szeminális vezikulumok szeminális epitéliumában mutatták ki a transzkript és a peptid szimultán jelenlétét. Azaz annak ellenére, hogy a transzkript jelen van a szívben és a himnős mirigyben is, a peptidet nem tudtuk IHC-vel kimutatni ezekben a szervekben/szövetekben. Korábbi tanulmányokban hasonló eltéréseket láttak az *O. vulgaris*, *A. californica* és gerinces fajok esetében is (Gray és mtsai, 2002; Iwakoshi-Ukena és mtsai, 2004; Jung és mtsai, 2014; Tsai és mtsai, 2010; Von Schalburg és

Sherwood, 1999). Egy korábbi tanulmány alapján (Jung és mtsai, 2014) a jelenségnek több lehetséges magyarázata is lehet: 1) túl alacsony mRNS szintek, amelyek nem tudnak sikeresen transzlálódni; 2) a túl gyors “peptidforgalom” miatt nem lehet detektálni; 3) túl gyors peptidtranszport a sejtestekből; 4) bizonyos helyeken olyan alternatív poszttranszlációs módosítások vannak, amelyek miatt az antitest nem tudja felismerni a peptidet; 5) a transzkripció és transzláció “cirkadián különbsége”. A pontos ok meghatározásához azonban még további vizsgálatokra van szükség.

Azt feltételezve, hogy a puhatestű és gerinces neuroendokrin rendszer működése nagyon hasonló és a gerinces GnRH peptid funkcionális homológia egy az egyben megtalálható a puhatestűekben, több korábbi tanulmány is anti-gerinces-GnRH (előgerinchúros, emlős, madár és hal) antitestet használt és kimutatott immunpozitív sejteket az *O. vulgaris*-ban és az *A. californica*-ban (Amano és mtsai, 2010; Di Cosmo és Di Cristo, 1998; Nakamura és mtsai, 2007; Tsai és mtsai, 2003; Zhang és mtsai, 2000). Munkánk során a specifikus anti-ly-GnRH/CRZ antitest és a nem specifikus anti-humán-GnRH antitest jelölésének összehasonlító vizsgálata során megerősítettük, hogy a nem specifikus antitest valóban ad jelet a CNS-ben. Ugyanakkor, a gerinces antitest nem jelölt meg számos „valódi” GnRH/CRZ-ip sejtet, ellenben számos, GnRH/CRZ-t nem tartalmazó neuront viszont megjelölt (fals pozitív jel). Bár nem zártuk ki, hogy a hasonló szekvencia miatt képes lehet a nem specifikus antitest felismerni a ly-GnRH/CRZ peptidet és így néhány esetben ugyanazokat az neuronokat jelölni, mint a specifikus antitest, a jelenséget főleg keresztreakciónak/”mátrix hatásnak” tulajdonítottuk. A WB vizsgálataink során egy ~50 kD-os és egy ~100 kDa-os diszkrét sávot kaptunk az ~1.3 kDa helyett, ez és a MS vizsgálataink megerősítették az aspecifikusságot. Ez egyértelműen rávilágít arra, hogy a hibás peptid nevezéktan miatti nem specifikus antitestek használata az IHC vizsgálatok során nem megfelelő (nem specifikus) eredményekhez és - mivel egy peptid eloszlásából és termelődési helyeiből lehet következtetni a funkcióira - hibás következtetésekhez vezethet.

Az IHC vizsgálataink szerint a ly-GnRH/CRZ peptid jelen van a CNS összes idegdúcában. Mivel a *L. stagnalis*-ban számos neuron/neuron csoport anatómiailag és funkcionálisan azonosított (diszkrét funkcióhoz van párosítva) (Benjamin, 2008; Benjamin és Kemenes, 2020; Benjamin és Crossley, 2020; Fodor és mtsai, 2020b), a peptid eloszlása irányadható lehet a funkcióira és alapot adhat a fiziológiás kísérleteknek. Tekintettel arra, hogy a táplálkozási magatartás elindításáért felelős azonosított (~7-10 μm átmérőjű) CV interneuronok a CG-ben, valamint a táplálkozási CPG által generált ritmust követő és a táplálkozást végrehajtó pofaizmokat beidegző (~80-100 μm átmérőjű) B3 és B4 motoneuronok

a BG-ben (Benjamin, 2008; Benjamin és Crossley, 2020; Brierley és mtsai, 1997) immunpozitívak voltak, feltételeztük, hogy a ly-GnRH/CRZ szerepet játszhat a táplálkozási aktivitásban. Ugyanakkor, nem láttunk akut változást a táplálkozási rátában a szintetikus peptid injektálása után. Ez ellentétben áll az *A. californica*-ban kapott eredményekkel, miszerint az ap-GnRH/CRZ peptid injektálása után a táplálkozási aktivitás akut gátlása volt megfigyelhető (Tsai és mtsai, 2010). Lehetséges, hogy a használt peptid koncentráció (10 µg peptid/egyed) túl alacsony volt ahhoz, hogy hatással legyen a táplálkozási rátára. A talpon lévő csillók szabályozásában résztvevő A-csoport (McKenzie és mtsai, 1998) is ly-GnRH/CRZ-ip volt, utalva arra, hogy a peptid részt vehet a mozgási aktivitás irányításában. Ezt megerősítették a fiziológiás vizsgálataink, a ly-GnRH/CRZ peptid injektálása után a mozgási aktivitás szignifikánsan csökkent. Ez, és a korábbi, *A. californica* és *O. vulgaris* vizsgálatával kapott eredmények alapján a GnRH/CRZ szerepe a mozgási aktivitás irányításában univerzálisnak tűnik az eddig vizsgált fajok között. Ezt tovább erősíti az a megfigyelés, hogy a GnRH/CRZ részt vesz a láb mozgásának irányításában a *M. yessoensis* kagylóban (Nagasawa és mtsai, 2015a). A peterakás szabályozásában kulcsszerepet játszó (~30-50 µm átmérőjű) CDC sejtek a CG-ban szintén immunpozitívak voltak, ezért arra következtettünk, hogy a peptidnek szerepe lehet a reprodukcióban is. Korábbi tanulmányok ezt már prognosztizálták a *L. stagnalis* és a *Haliothis asinina* esetében (Koene, 2010; Young és mtsai, 1999). A ly-GnRH/CRZ peptid injektálását követően megfigyeltük, hogy a peterakási viselkedés szignifikánsan megváltozott, ami a lerakott petezsákok és peték számának növekedésében nyilvánult meg. Ez ellentétben áll az *A. californica*-ban tapasztaltakkal, ahol az ap-GnRH/CRZ peptid injektálása nem befolyásolta a peterakást és egyes reprodukciós paramétereket (Tsai és mtsai, 2010). Ugyanakkor, az *A. californica* peterakásáért felelős "bag" sejtek (Conn és Kaczmarek, 1989) nem voltak ap-GnRH/CRZ-ip-ak (Jung és mtsai, 2014; Zhang és mtsai, 2008). Érdekes megfigyelés, hogy a ly-GnRH/CRZ peptid injektálása hatással volt a poliembrióniás peték gyakoriságára is, de ennek az oka még nem tisztázott. A pénisz komplex szabályozásában részt vevő, RCG-ben található al és vl neuronok (De Boer és mtsai, 1997; De Lange és mtsai, 1998; Koene, 2010) között is láttunk ly-GnRH/CRZ-ip sejteket. A nikkkel-klorid felvétele az al ly-GnRH/CRZ-ip neuronjai által bizotnyítottta azt, hogy ly-GnRH/CRZ-ip neuronok rostokat küldenek a pénisz idegbe. A pénisz komplex szabályozása alapvetően számos neurotranszmitter – például konopresszin, FMRFa, 5-HT - szinkronizációjával történik, amelyek a CNS-ből érkeznek a pénisz idegen keresztül (De Lange és mtsai, 1998; Koene, 2010). Az IHC vizsgálataink kimutattak olyan idegelemeket a preputium hosszanti izmában, amelyekben a ly-GnRH/CRZ-immunjelődés és az 5-HT-immunjelődés kolokalizációt mutatott. Minthogy a

ly-GnRH/CRZ-ip neuronok axonokat küldenek a pénisz idegbe és a ly-GnRH/CRZ jelen van a pénisz komplexben, úgy véljük, hogy a ly-GnRH/CRZ közvetlenül modulálja ennek a perifériás szervnek a működését. Ugyanakkor ennek a megerősítéshez további fiziológiás/farmakológiai vizsgálatokra van szükség. A peptid jelenlétét nem tudtuk kimutatni a himnős mirigyben, ez egyértelműen arra utal, hogy a ly-GnRH/CRZ közvetlenül nem vesz részt az ivarsejtek termelésében. Ugyanakkor, a szemínális vezikulumok epitéliuma intenzív immunpozitivitást mutatott, így feltételezhető, hogy a ly-GnRH/CRZ részt vesz a spermiumok tárolásának/felszabadításának irányításában, noha ennek igazolására még további vizsgálatokra van szükség. Érdeemes megemlíteni, hogy korábbi, rovarokban végzett tanulmányok kimutatták, hogy a CRZ fontos szerepet játszik a spermiumok átadásában és a kopuláció idejének fenntartásában (Hou és mtsai, 2018; Tayler és mtsai, 2012). Mivel itt nem idegelemekben figyeltük a peptid jelölődését, valószínűnek tartjuk, hogy itt valamilyen lokális autokrin, vagy parakrin szekréció van. Az sem zárható ki, hogy a szemínális vezikulumokban termelődő peptid valamilyen indirekt módon (visszacsatolással) hatással lehet a gametogenezisre. Mindezek alapján úgy gondoljuk, hogy a ly-GnRH/CRZ peptid kulcsfontosságú a hím párosodási folyamatokban, különösen a megtermékenyítésben. Ahogy fentebb már említettük, a reprodukció vizsgálatára fókuszáló tanulmányok leírták, hogy a GnRH/CRZ stimulálta a spermatogóniumok osztódását és maszkulinációját, de gátolta a petesejtek növekedését a *M. yessoensis*-ben (Nagasawa és mtsai, 2015c; Treen és mtsai, 2012), oogónium és petesejt osztódást indukált a *H. asinine*-ben (Nuurai és mtsai, 2016), valamint fokozta az ovulációt, a spermatogóniumok és oogóniumok osztódását a *H. discus hannai*-ban (Funayama és mtsai, 2019; Sharker és mtsai, 2021). Mindezek alapján arra következtettünk, hogy bár a GnRH/CRZ számos puhatestű faj reprodukciójában részt vesz, de a gerinces GnRH-val ellentétben nem egy univerzális reprodukciót irányító peptid. Továbbá, a GnRH/CRZ peptidek szerepe a reprodukcióban erősen faj specifikusnak tűnik. Végül, mivel ly-GnRH/CRZ-ip rostokat láttunk a szív pitvarizomzatának felszínén, továbbá mivel a szív működést irányító neuronhálózat modulációs dopaminerg óriás (~100-150 µm átmérőjű) RPeD1 sejtje és motoros HIJK sejtek (Benjamin, 2008; Benjamin és Kemenes, 2013) is jelölődtek, feltételezzük, hogy a ly-GnRH/CRZ peptidnek szerepe lehet a szívverés szabályozásában is. Hasonlóan a pénisz komplexhez, a szív működés szabályozása szintén számos neurotranszmitter szinkronizációjával történik, ezek egyike "szív-serkentő motoneuronok" által termelt 5-HT (Benjamin és Kemenes, 2013; Buckett és mtsai, 1990). Az IHC vizsgálataink kimutattak olyan axon rostokat pitvar izomzatának felszínén, amelyekben a ly-GnRH/CRZ immunjelölődés és az 5-HT immunjelölődés kolokalizálódott. Ez egyrészt megerősíti a feltételezésünket, másrészt megegyezik az *O.*

vulgaris-ban kapott korábbi eredményekkel (Iwakoshi és mtsai, 2002; Iwakoshi-Ukena és mtsai, 2004), de a feltételezett funkció megerősítéshez további fiziológiai/farmakológiai vizsgálatokra van szükség. Eredményeink alapján úgy véljük, hogy a ly-GnRH/CRZ peptid leginkább a motoros működések, vagyis az izommozgás kontrolljában vesz részt. Továbbá, ahogy korábban erre következtettek már a rovarokban is (Veenstra, 2009), valószínűleg direkt stimulációval és neuromodulációval fejtheti ki a hatását.

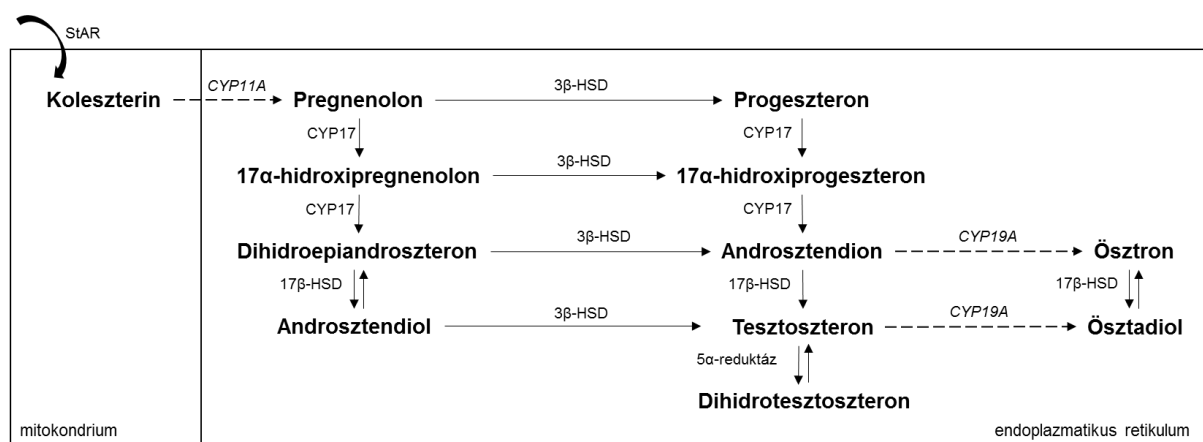
6.2. Szex szteroid felvétel, szintézis és receptor-mediáció a *L. stagnalis*-ban

A puhatestű fajok közül a *L. stagnalis*-nak vizsgálták legrészletesebben a neuroendokrin és reprodukciós rendszerét (Benjamin és Kemenes, 2013; Di Cristo és Koene, 2017; Fodor és mtsai, 2020b; Fodor és mtsai, 2021a; Koene, 2010; Lagadic és mtsai, 2007; Pirger és mtsai, 2018). Ugyanakkor, eddig még nem volt olyan tanulmány, ami vizsgálta volna azt, hogy a *L. stagnalis* fel tudja-e venni a gerinces szex szteroidokat a környezetből, vagy részletesen elemezte volna azt, hogy a szex szteroid szintézisben és receptor-mediációban részt vevő gének megtalálhatóak-e a modellállatban.

Habár a gerinces szex szteroidok kimutathatóak a puhatestű szövetekben, olyan könnyen fel tudják venni őket a környezetből és hosszú ideig tárolni azokat észterifikált formában, hogy a jelenlétük nem szükségszerűen bizonyíték az endogén szintézisükre (Scott, 2018). A folyamat pontos megismerése érdekében, radioaktívan jelölt gerinces szex szteroidokkal kezeltük a *L. stagnalis*-t és vizsgáltuk a szteroidok felvételét, metabolizmusát és kiürülését. Megerősítettük azt a feltételezést, hogy a csigák fel tudják venni a gerinces szteroidokat a környezetből. Összehasonlítva a *M. edulis*-al, aminek részleteiben vizsgálták a szteroid felvételét (Katsiadaki és mtsai, 2021; Schwarz és mtsai, 2017a, 2017b, 2018), a *L. stagnalis* esetében a felvételi ráta körülbelül négyszer lassabb volt. Valószínűsíthető, hogy a kagylók szűrőgető életmódja felelős a gyorsabb abszorpcióért. A kagylókban ugyanakkor nem csak a felvételi ráta volt gyorsabb, hanem a szteroidok vízből való eliminálódásának mintázata hiperbolikus, vagy exponenciális függvényt mutatott. Ezzel ellentétben, a *L. stagnalis* esetében ez a mintázat viszonylag lineáris volt (kivéve talán a P-t). Ugyanakkor nem zárható ki, hogy a különbséget a rövidebb kezelési idő (8 óra – 24, vagy 48 óra) és a lassabb felvételi ráta okozta. A szteroidok felvétele mellett azt is megfigyeltük, hogy a csigák képesek észterifikálni őket. Hasonlóan a korábbi, *M. edulis*-ban kapott eredményekhez (Katsiadaki és mtsai, 2021), az EE₂ tűnt a legkevésbé észterifikálhatónak, ennek az oka valószínűleg az, hogy a szteránváz 17-es szénatomjánál eredetileg lévő β-hidroxil csoport (ez kapcsolódik zsírsavhoz az észterformálás során) α-etinil csoportra van cserélve. Mivel a P nem tartalmaz észterifikálható hidroxil csoportot, a

radioaktivitás az észter frakcióban arra utal, hogy ez a szteroid metabolizálódik a felvétel után. Korábbi tanulmányok alapján (Dimastrogiovanni és mtsai, 2015; Schwarz és mtsai, 2018) a legvalószínűbb reakciók az A gyűrű 5 α redukciója, illetve a 3-as és 20-as szétatomokon található oxo-csoport cseréje β -hidroxil csoportra. Továbbá kimutattuk, hogy a szövetekből kinyerhető szteroid radioaktivitás viszonylag lassan tisztult ki (kb. 30% fogyás volt 10 nap alatt), ez arra utal, hogy minden szteroid esetében a féléletidő legalább két hét. Kapott eredményeink összevethetők és konzisztensek a korábban kagylókon kapott megfigyelésekkel.

A 33. ábrán látható, hogy bár több releváns gerinces gén homológja is megvan a *L. stagnalis*-ban, két kulcs enzim - CYP11A és CYP19A – homológ transzkriptje/génje hiányzik.



33. ábra: A klasszikus gerinces szex szteroidszintézis homológjának vélt útvonal a *L. stagnalis*-ban. Hat lépés (folytonos vonalú nyilak) – bár néhány nagyon alacsony aktivitással – és az azokat katalizáló enzimek génjei úgy tűnik, hogy jelen vannak a *L. stagnalis*-ban. Nem találtunk bizonyítékot arra, hogy a CYP11A és CYP19A (dőltlen jelezve) gének homológjai megtalálhatóak a genomban, vagy a neuronális transzkriptomban. Ez megerősíti a feltételezést, hogy a gerinces szteroid szintézis két kulcsfontosságú lépése – koleszterin-oldallánc hasítás és aromatizáció (szaggatott vonalú nyilak) – hiányzik a puhatestűekben

Az oxidoreduktáz reakciókkal kapcsolatban azonosítani tudtuk a 3 β -HSD, 17 β -HSD és 5 α -reduktáz gének homológját. Ezeket a szekvenciákat már több puhatestű fajban kimutatták, például a *Biomphalaria glabrata*-ban, *A. californica*-ban és *M. yessoensis*-ben (Adema és mtsai, 2017; Fodor és mtsai, 2020a; Scott, 2012; Thitiphuree és mtsai, 2019). A szekvenciák megléte mellett úgy tűnik, hogy ezek az enzimek által katalizált reakciók is végbemennek a *L. stagnalis*-ban - például egy korábbi, radioaktív jelölést és nyomon követést alkalmazó tanulmány kimutatta a P5-P átalakítást (de Jong-Brink és mtsai, 1981). Mivel a homológok megléte a puhatestűekben nem feltétlenül jelenti azt, hogy ugyanaz a funkciójuk is, mint a gerincesekben (a szubsztrátjuk nem feltétlenül a szteroidok), hangsúlyozni kell, hogy további funkcionális tanulmányok szükségesek annak megerősítéséhez, hogy ezek a reakciók valóban

egy olyan szex szteroid bioszintézis útvonal részét képezik, amely ekvivalens a gerincesekben megtalálhatóval. Ahogy már az Irodalmi áttekintésben említésre került, egy nemrég megjelent, két csigafajt vizsgáló tanulmány kimutatta, hogy például az 5α -reduktáz szubsztrátja(i) a ház morfológiájának fejlődésében játszanak kulcsszerepet (Baynes és mtsai, 2019), ellentétben a gerincesekben leírt funkciókkal.

A CYP enzimekkel kapcsolatban a vizsgálataink azt mutatták, hogy más puhatestű fajokhoz hasonlóan, a CYP17 megtalálható a *L. stagnalis*-ban is. Korábbi tanulmányok alapján úgy tűnik, hogy - bár a legtöbb vizsgált faj esetében alacsony hatásfokkal - a P-Ad átalakítás végbemegy a puhatestűekben (Fernandes és mtsai, 2011; Fodor és mtsai, 2020a; Scott, 2012). Ezzel ellentétben, nem találtunk homológ szekvenciát a CYP11A és CYP19A génekhez, ami végső soron nem is olyan meglepő. Ahogy már az Irodalmi áttekintés 2.4. fejezetében is említésre került, a puhatestűekben eddig csak egyetlen olyan fehérje szekvenciát azonosítottak, amely "részlegesen ekvivalens" a gerinces CYP11A-val (Blalock és mtsai, 2018). A prekursor koleszterin kétségtelenül jelen van a *L. stagnalis*-ban (Altelaar és mtsai, 2005) - mi is többször kimértük a CNS-ben azt - és azonosítani tudtuk a koleszterin mitokondrium belső membránjába történő szállításáért felelős StAR fehérje homológját, amely elengedhetetlen a P5 szintézishez (Stocco, 2000). Ez azt mutatja, hogy a koleszterin potenciálisan használható forrás a szex szteroid szintézishez a *L. stagnalis*-ban. Ugyanakkor, sem ennél a modelállatnál, sem általában a puhatestűeknél, legjobb tudásunk szerint nincs olyan tanulmány, amely bizonyította volna a koleszterin-oldallánc hasítási aktivitást. Fontos megjegyezni, hogy ennek a bizonyítása alapvetően nagyon nehéz, mert nem lehet nyomon követési módszert alkalmazni, mivel a sejtek/szövetek nem veszik fel a (radioaktívan) jelölt koleszterint. Továbbá, feltételezhető, hogy a többi szteroidhoz hasonlóan a puhatestűek képesek a P5-t „készen” felvenni a környezetből és P-vé alakítani, de ezt még nem vizsgálták. A CYP11A-hoz hasonlóan, nem találtunk homológ szekvenciát a CYP19A esetében sem. Ez megerősíti azt, hogy ez a két gén specifikus a gerincesekre, illetve közvetlen őseikre (Fodor és mtsai, 2020a; Scott, 2012) - a jelenlegi teória az, hogy a koleszterin-oldallánc hasítás megjelenése a korai gerincesekben volt a hajtóereje a kitüntetett aromázáló enzim (CYP19A) koevolúciójának (Markov és mtsai, 2017). A korábbi tanulmányokhoz hasonlóan a CYP19A gén homológjának hiánya ellenére az anti-humán-CYP19A antitestet használó IHC vizsgálataink fals pozitív immunjelet adtak a CNS-ben. Két cikkben csináltak WB elemzést a *M. edulis* gonádok homogenizátumában, ami során az anti-humán-CYP19A antitest egy diszkrét ~60 kDa-os „band”-et mutatott (egyezést mutatva az egereken kapott eredményekkel), ugyanakkor, további MS elemzést korábban nem csináltak. A WB vizsgálataink során egy diszkrét (~30 kDa) és két amorf (~65 kDa és ~140 kDa) sávot

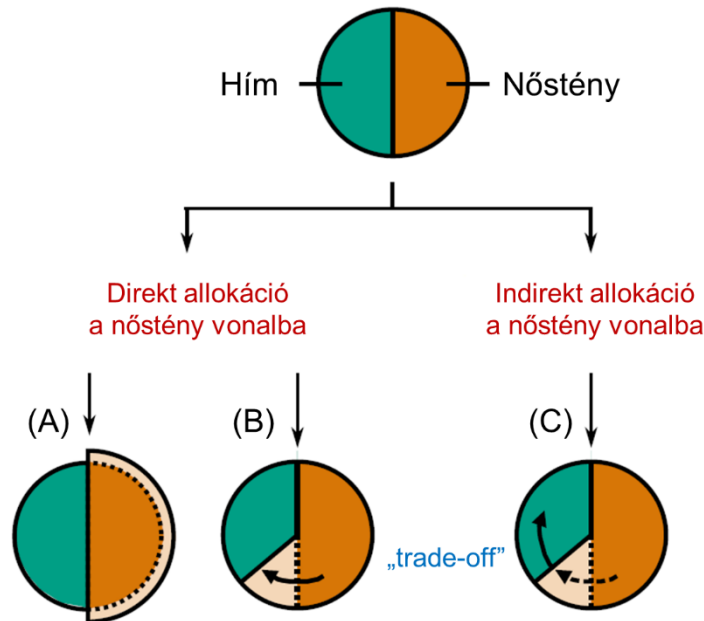
kaptunk, illetve az antitest a 140 kDa-os „marker” sávot is megjelölte, ugyanakkor ez és az ezt követő MS vizsgálatok egyértelműen megerősítették az aspecifikusságot. Ahogy már az Irodalmi áttekintésben is említésre került, habár mutattak ki aromataz aktivitást a puhatestűekben, például a *M. edulis*-ban (Hallmann és mtsai, 2019), a nagyon alacsony hatások miatt ez valószínűleg a tárgyalt enzim promiszkuitás jelensége miatt volt és nem egy specifikus „alternatív” aromataz-szerű enzim okán. Egy nemrég megjelent tanulmány szerint lehetséges, hogy két másik, puhatestűekben megtalálható CYP enzim - CYP10 és CYP3A – tölti be a CYP11A és CYP19A szerepét (Thitiphuree és mtsai, 2019) - ez azonban erősen spekulatív és meggyőzően nem bizonyított. Még ha ezeknek az enzimeknek meg is lenne a javasolt aktivitásuk (feltehetőleg szintén a promiszkuitás miatt), a hozamok valószínűleg túl alacsonyak lennének egy szteroid-alapú hormonrendszer fenntartásához a puhatestűekben. Ugyanakkor érdemes megjegyezni azt a tényt, hogy a CYP10 enzim kódoló szekvenciáját korábban már azonosították a *L. stagnalis*-ban (Teunissen és mtsai, 1992), és ennek jelenlétét a mi transzkriptom adataink is megerősítették, de pontos szerepét nem ismerjük jelenleg.

A receptor-mediáció kérdésének vizsgálata során eredményeink azt mutatták, hogy nincs homológ szekvencia a *L. stagnalis*-ban a gerinces nPR és nAR génekkel - ez megerősíti a jelenlegi nézetet, miszerint ezek a gének csak a késői gerincesekben jelentek meg (Fodor és mtsai, 2020a; Markov és mtsai, 2017; Scott, 2012; Thornton, 2001). Az nPR gén homológiájának hiánya ellenére az anti-humán-nPR antitesttel ismét fals pozitív immunjelet kaptunk a CNS-ben. *O. vulgaris*-on végzett hasonló vizsgálatban anti-csirke-nPR antitestet alkalmazva, a mi eredményeinkhez hasonlóan, feltehetően fals pozitív jelölődést figyeltek meg. (Di Cosmo és mtsai, 1998). A publikációban használt WB elemzés egy diszkrét ~70 kDa-os „band”-et mutatott, ugyanakkor, további megerősítő MS elemzést nem csináltak. Az általunk elvégzett WB vizsgálatok során három diszkrét (~30 kDa, ~50 kDa, ~60 kDa) immunpozitív sávot kaptunk, de az ezt követő MS vizsgálatok ismételten megerősítették az aspecifikusságot, a CYP19A-hoz hasonlóan. A CYP19A és nPR homológiájának kimutatását célzó IHC vizsgálataink alátámaszták azt a nézetet, hogy a gerinces fehérjék ellen készített antitesteket (különösen a poliklonálisakat) használó IHC vizsgálatok nagyon megbízhatatlanok a gerinctelenek (specifikus) fehérjeinek azonosítására és lokalizációjának vizsgálatára (Baker, 2015b, 2015a; Fodor és mtsai, 2020a; Scott, 2012). A nPR és nAR génekkel ellentétben azonosítani tudtuk a gerinces nER homológ szekvenciáját. Tekintettel arra, hogy az összes eddig azonosított puhatestű nER esetében azt mutatták ki, hogy nem képesek E₂-t megkötni, úgy gondoljuk, hogy a ly-nER sem egy funkcionális ER és messzemenően egyetértünk azzal, hogy ezeket a „puhatestű nER” szekvenciákat más néven kellene klasszifikálni. A PGRMC1

fehérje homológ szekvenciáját is megtaláltuk a *L. stagnalis*-ban, de feltételezzük, hogy – a gerincesekhez hasonlóan - nem köti meg a P-t. A legtöbb gerincesben azt találták, hogy a plazmában keringő szteroid-kötő globulinok (Bobe és mtsai, 2010) nagy affinitással képesek kötődni a különböző szteroidokhoz (Scott, 2012). Mivel a kötő tulajdonságaik nagyon hasonlóak a nukleáris receptorokhoz, elméletileg potenciális „szteroid receptor” jelöltek lehetnének a puhatestűekben, azonban nem találtunk homológ szekvenciát a *L. stagnalis*-ban.

Jövőbeni tervek között szerepel az Irodalmi áttekintésben említett gerinces mPR β és mPR γ szekvenciák homológjainak azonosítása és deorfanzációja a *L. stagnalis*-ban, valamint a progesztogének lehetséges, membrán receptorokkal közvetített gyors hatásainak vizsgálata elektrofiziológiai és biokémiai mérésekkel. Mindezek alapján úgy véljük, hogy a *L. stagnalis*-ban – és általában a puhatestűekben – leírt progesztogén okozta viselkedési és sejtes változásoknak (Svigruha és mtsai, 2021a; Svigruha, 2021; Zrinyi és mtsai, 2017; Zrinyi, 2017) három lehetséges módja van: 1) specifikus ligand-receptor útvonal (mPR β és mPR γ receptorokon); 2) aspecifikus ligand-receptor útvonal (más molekulák receptorain, vagy ősi multifunkcionális receptoron - feltételezhetően NR1H vagy NR1I/J/K); 3) a felvett progesztogének metabolizálásával járó biokémiai és fiziológiai folyamatok anyag és energia re-allokációt igényelnek, ami különböző szintű változásokban megjelenhet. Jövőbeni tervek között szerepel továbbá a lehetséges membrán ER azonosítása és deorfanzációja a *L. stagnalis*-ban, valamint az ösztrogének lehetséges gyors hatásainak vizsgálata.

Kutatócsoportunk korábban kimutatta, hogy a 10 ng/L koncentrációt használó progesztogén kezelés hatására szignifikánsan megnő az egyedek utódszáma (lerakott peteszám), ugyanakkor a petezsákok egy részében minőségi romlása volt megfigyelhető (például poliembriónia) (Zrinyi és mtsai, 2017). Ezzel párhuzamosan kimutattuk, hogy lecsökkent az egyedek spermiumszáma (Zrinyi, 2017). Transzkriptomikai mérésekkel megállapítottuk, hogy a szintén 10 ng/L koncentrációt alkalmazó progesztogén kezelés során nem változik a reprodukciót irányító neuropeptidok expressziója a CNS-ben. Ez alapján úgy gondoljuk, hogy a csökkent hímivarsejtszám ellenére tapasztalt utódszám növekedés oka az, hogy a hormonkezelés hatására megváltozik a hermafrodita egyedek reprodukciós allokációja (34. ábra), ugyanakkor ez a változás nem a reprodukciót irányító neuropeptidok expressziójának szintjén jelenik meg.



34. ábra: A hormonkezelés során bekövetkező reprodukív allokáció lehetséges kimenetelei

A reprodukív allokáció változásának több lehetséges kimenetele lehet (34. ábra). Az első, hogy a nőstény reprodukív folyamatokra közvetlenül fordítódik az anyag- és energiamennyiség. Attól függően, hogy a források honnan származnak, a folyamat ezzel párhuzamosan, vagy nem eredményezi (A), vagy eredményezi (trade-off”) (B) a hím vonalra való allokáció csökkenését. A második, hogy a hím vonal funkciója változik meg és így a források re-allokációja a nőstény vonal irányába megy a reprodukív allokációs „trade-off” miatt (C). Természetesen még további vizsgálatokra van szükség annak a meghatározásához, hogy melyik típus megy végbe a progesztogén kezelés során. Jövőbeni tervek között szerepel ennek a tisztázása is. Korábbi cikkek alapján (például Hoffer és mtsai, 2012) a szex allokáció és a reprodukcióra fordított források reallokációjának vizsgálatának legjobb megközelítése az lehetne, hogy kvantifikáljuk mind a hím, mind a nőstény „investment”-et ugyanabban az egyedben a növekedéssel együtt. Ezt csinálhatjuk a hímnős mirigyben - kvantifikálva a petesejt és spermium termelést -, vagy kvantifikálhatjuk az úgynevezett „végső reprodukív termékeket”, tehát a petezsákokat és az ejakulátumokat (vagy a szeminális vezikulumokban raktározott érett spermiumokat). Ha a kapott értékeket standardizáljuk, akkor egy elég egyértelmű szex allokációs mérést kapunk.

További jövőbeni tervek között szerepel a szterolok puhatestűek endokrin folyamataiban betöltött potenciális szerepének vizsgálata is. Egy nemrég megjelent tanulmányban kimutatták, hogy a paraösztról A - ami egy aromatizált szterol (azaz egy olyan koleszterin metabolit, amely nem megy át oldallánc hasításon) – az ősi szteroid receptor

aktivátoraként viselkedett (Markov és mtsai, 2017). Nem feltételezzük, hogy a paraösztrolok a „hiányzó ösztrogének” a puhatestűekben, azonban úgy véljük, hogy potenciális hormonális szerepük van a puhatestű endokrin folyamatokban, habár nem feltétlenül a reprodukció kapcsán. Mivel aromatizált „hosszú-láncú” szteroidok igazoltan jelen vannak a szivacsokban és a csalánozóknakban (Wang és Crews, 1996; Yan és mtsai, 2011), feltételezzük, hogy egy paralóg CYP valószínűleg katalizálja a puhatestű szteroidok aromatizálását. Fontos megjegyezni, hogy már számos, reprodukcióval nem kapcsolatos szteroid (például epidioxiszteroidok) azonosítottak az *Aplysia* nemzetségben (Pereira és mtsai, 2016). A potenciális szerepüket tovább erősíti a már említett eredmény, hogy az 5 α -reduktáz – ami egy nagyon ősi enzim és ismert, hogy szubsztrátjai a szteroidok (valamint a T és Ad) – farmakológiai gátlása rendellenességeket okozott a héj morfológiájában az embrionális fejlődés során (Baynes és mtsai, 2019).

7. ÖSSZEFOGLALÁS

Noha a puhatestűek széles körben a biológiai kutatások modellállatai, egyes viselkedési mintázataik, mint például a reprodukció, celluláris és molekuláris szintű szabályozása, a (neuro)endokrin rendszer működése, beleértve a GnRH és a szex szteroidok szerepét is, a mai napig nem tisztázott. Ezeket a nyitott kérdéseket szem előtt tartva, doktori munkám célja volt funkcionális és evolúciós szempontból megvizsgálni a puhatestűek neuroendokrin rendszerét, melynek modellállata a nagy mocsári csiga (*Lymnaea stagnalis*) volt. Eredményeimet az alábbi pontokban foglalom össze a témában megjelent publikációk feltüntetésével.

- 1) Azonosítottuk a ly-GnRH/CRZ peptid kódoló régióját, valamint leírtuk az aktív peptid jelenlétét a CNS-ben. Eredményeink alátámasztják, hogy az amidált undekapeptid a funkcionális/aktív molekula a kagylók és csigák esetében. Molekuláris filogenetikai vizsgálataink megerősítették, hogy az eredetileg puhatestű GnRH-nak nevezett peptidek a CRZ családdal vannak rokonságban.

Fodor I, Zrinyi Z, Horváth R, Urbán P, Herczeg R, Büki G, Koene JM, Tsai PS, Pirger Z. Identification, presence, and possible multifunctional regulatory role of invertebrate gonadotropin-releasing hormone/corazonin molecule in the great pond snail (*Lymnaea stagnalis*). **General and Comparative Endocrinology**. 2020 299:113621. (Q1; IF₂₀₂₀: 2.822)

Fodor I, Svigruha R, Bozsó Z, Tóth G, Osugi T, Yamamoto T, Satake H, Pirger Z. Functional characterization and related evolutionary implications of invertebrate gonadotropin-releasing hormone/corazonin in a well-established model species. **Scientific Reports**. 2021 11:10028. (D1; IF₂₀₂₁: 4.996)

- 2) Az *in vitro* és *in vivo* kísérleteink azt mutatták, hogy a ly-GnRH/CRZ részt vesz a mozgási aktivitás és peterakás szabályozásában, valamint potenciális szerepe van a szívszabályozás modulálásában is, azaz egy multifunkcionális peptid. Nem találtunk kapcsolatot a táplálkozási rátával, de fontos megjegyezni, hogy csak egy peptid koncentrációt (10 µg peptid/egyed) használtunk az *in vivo* kísérleteinkben, így lehetséges, hogy ez túl alacsony volt ahhoz, hogy hatással legyen a táplálkozási rátára. A jövőbeni vizsgálatoknak további koncentráció(k) használatát is kell célozniuk. Habár még csak kevés funkcionális tanulmányt publikáltak a gerinctelen GnRH/CRZ kapcsán, eredményeink egyrészt megerősítik, hogy az eredetileg gerinctelen GnRH-nak elnevezett peptidek multifunkcionálisak és egyaránt felelősek reproduktív és nem-reproduktív funkciók szabályozásáért, másrészt támogatják azt a javaslatot, hogy a peptidcsaládot CRZ-ként kellene klasszifikálni.

Fodor I, Zrinyi Z, Horváth R, Urbán P, Herczeg R, Büki G, Koene JM, Tsai PS, Pirger Z. Identification, presence, and possible multifunctional regulatory role of invertebrate gonadotropin-

releasing hormone/corazonin molecule in the great pond snail (*Lymnaea stagnalis*). **General and Comparative Endocrinology**. 2020 299:113621. (Q1; IF₂₀₂₀: 2.822)

Fodor I, Svigruha R, Bozsó Z, Tóth G, Osugi T, Yamamoto T, Satake H, Pirger Z. Functional characterization and related evolutionary implications of invertebrate gonadotropin-releasing hormone/corazonin in a well-established model species. **Scientific Reports**. 2021 11:10028. (D1; IF₂₀₂₁: 4.996)

- 3) A neurális transzkriptom és genom adataink azt mutatták, hogy több, a szex szteroid szintézishez kulcsfontosságú gén (például CYP11A), valamint a funkcionális nukleáris szex szteroid receptorok (például nPR) nem található meg a *L. stagnalis*-ban. A meglévő gének és az enzimpromiszkuitás jelensége miatt nem zárjuk ki, hogy a *L. stagnalis* (és általában a puhatestűek) képesek a szintézis útvonal mindegyik lépésére, ugyanakkor a legtöbbet olyan alacsony hatásokkal valósítják, hogy a hozamok valószínűleg túl alacsonyak lennének egy szteroid-alapú hormonrendszer fenntartásához. Kétséggel fel kell tenni a kérdést, hogy a puhatestűek természetes szelekciója kedvezett-e egy szex szteroid alapú endokrin rendszer kialakulásának.

Fodor I, Urbán P, Scott AP, Pirger Z. A critical evaluation of some of the recent so-called 'evidence' for the involvement of vertebrate-type sex steroids in the reproduction of mollusks. **Molecular and Cellular Endocrinology**. 2020 516:110949. (Q1; IF₂₀₂₀: 4.102)

Fodor I, Koene JM, Pirger Z. Neuronal Transcriptome Analysis of a Widely Recognised Molluscan Model Organism Highlights the Absence of Key Proteins Involved in the De Novo Synthesis and Receptor-Mediation of Sex Steroids in Vertebrates. **Malacologia**. 2021 64(1):69-77. (Q4; IF₂₀₂₁: 0.88)

- 4) Megerősítettük, hogy a puhatestűek képesek a környezetből felvenni, metabolizálni, illetve hosszú ideig tárolni a szex szteroidokat. Ez alátámasztja azt, hogy a puhatestű szövetekben megtalálható/mérhető gerinces szteroidok nem feltétlenül endogén eredetűek.

Fodor I, Schwarz T, Kiss B, Tapodi A, Schmidt J, Cousins ARO, Katsiadaki I, Scott AP, Pirger Z. Studies on a widely-recognized snail model species (*Lymnaea stagnalis*) provide further evidence that vertebrate steroids do not have a hormonal role in the reproduction of mollusks. **Frontiers in Endocrinology**. 2022. 13:981564. (D1; IF₂₀₂₁: 6.055)

- 5) Az IHC vizsgálataink során fals pozitív immunjelet kaptunk a gerinces CYP19A és nPR ellen készített gerinces antitestek használatával. Mivel egyik gén sem található meg a puhatestű (és általában a gerinctelen) genomokban, eredményeink alátámasztják azt a nézetet, hogy a gerinces fehérjékre készített antitesteket használó IHC nagyon megbízhatatlan módszer a gerinctelenek fehérjeinek

azonosítására és lokalizációjának vizsgálatára. A WB és MS vizsgálatok során kapott eredmények alátámasztották ezt a kijelentesünket.

Fodor I, Schwarz T, Kiss B, Tapodi A, Schmidt J, Cousins ARO, Katsiadaki I, Scott AP, Pirger Z. Studies on a widely-recognized snail model species (*Lymnaea stagnalis*) provide further evidence that vertebrate steroids do not have a hormonal role in the reproduction of mollusks. **Frontiers in Endocrinology**. 2022. 13:981564. (D1; IF₂₀₂₁: 6.055)

- 6) Bár sem a *L. stagnalis*-ban sem általában a puhatestűekben nem található funkcionális nukleáris szex szteroid receptor, nem zárjuk ki, hogy a fiziológias működésük megváltozhat, ha gerinces szex szteroidoknak vannak kitéve. Ez végbemehet membrán szex szteroid receptorokon, más molekulák receptorain, vagy egyszerűen lehet a szteroidok metabolizálásával járó forrás re-allokáció következménye.

Fodor I, Urbán P, Scott AP, Pirger Z. A critical evaluation of some of the recent so-called 'evidence' for the involvement of vertebrate-type sex steroids in the reproduction of mollusks. **Molecular and Cellular Endocrinology**. 2020 516:110949. (Q1; IF₂₀₂₀: 4.102)

Fodor I and Pirger Z. From dark to light - an overview of over 70 years of endocrine disruption research on marine mollusks. **Frontiers in Endocrinology**. 2022 13:903575. (D1; IF₂₀₂₁: 6.055)

- 7) Kutatócsoportunk korábban több változást is kimutatott a *L. stagnalis* reprodukciójában krónikus progesztogén kezelések során, ugyanakkor nem mutattunk ki változást a reprodukciót irányító neuropeptidok expressziójában. Feltételezzük, hogy a hormonkezelés hatására megváltozik a hermafrodita egyedek reproductív allokációja, ugyanakkor ez a változás nem a reprodukciót irányító neuropeptidok expressziójának szintjén jelenik meg. A reproductív allokáció-változás pontos mechanizmusának megértéséhez még további kutatásokra van szükség.

Összefoglalva, eredményeink egyértelműen arra utalnak, hogy a puhatestűek neuroendokrin rendszere különbözik a gerincesek jól jellemzett neuroendokrin rendszerétől.

8. SUMMARY

Although molluscs have been used extensively as model species to investigate neuroendocrine processes regulating behaviours such as reproduction, there is a long-standing debate about their (neuro)endocrine system including the role of the GnRH peptide and the function of the sex steroid hormones. Keeping this in mind, my PhD work aimed to investigate the functionality and evolution of the neuroendocrine system of molluscs by investigating the well-established invertebrate model species, the great pond snail (*L. stagnalis*). My results are summarized in the points below with the relevant publications being highlighted.

- 1) We identified the coding sequence of ly-GnRH/CRZ and confirmed the presence of the active peptide in the CNS. Our findings suggest that utilization of the amidated undecapeptide as the functional invGnRH/CRZ molecule is a common feature in bivalves and gastropods. The molecular phylogenetic results supported the notion that sequences originally termed molluscan GnRHs are more related to CRZs

Fodor I, Zrinyi Z, Horváth R, Urbán P, Herczeg R, Büki G, Koene JM, Tsai PS, Pirger Z. Identification, presence, and possible multifunctional regulatory role of invertebrate gonadotropin-releasing hormone/corazonin molecule in the great pond snail (*Lymnaea stagnalis*). **General and Comparative Endocrinology**. 2020 299:113621. (Q1; IF₂₀₂₀: 2.822)

Fodor I, Svirgruha R, Bozsó Z, Tóth G, Osugi T, Yamamoto T, Satake H, Pirger Z. Functional characterization and related evolutionary implications of invertebrate gonadotropin-releasing hormone/corazonin in a well-established model species. **Scientific Reports**. 2021 11:10028. (D1; IF₂₀₂₁: 4.996)

- 2) Our *in vitro* and *in vivo* experiments demonstrated that ly-GnRH/CRZ is involved in the regulation of locomotion and reproduction and may play a role in the modulation of heart control. Interestingly, we did not find any link to the feeding. It should be noted that we used only one concentration (10 µg peptide/each animal) during the injection so it remains possible that this concentration was too low to cause any effect on feeding. Therefore, future physiological works should aim to use further peptide concentrations. Although there is still only a limited number of functional studies with invGnRH/CRZs, our findings add to a growing body of literature supporting invGnRH/CRZ peptides as being responsible for the regulation of both reproductive and non-reproductive functions. Moreover, our results support the proposal that the originally named invGnRHs should be classified as CRZs.

Fodor I, Zrinyi Z, Horváth R, Urbán P, Herczeg R, Büki G, Koene JM, Tsai PS, Pirger Z. Identification, presence, and possible multifunctional regulatory role of invertebrate gonadotropin-

releasing hormone/corazonin molecule in the great pond snail (*Lymnaea stagnalis*). **General and Comparative Endocrinology**. 2020 299:113621. (Q1; IF₂₀₂₀: 2.822)

Fodor I, Svigruha R, Bozsó Z, Tóth G, Osugi T, Yamamoto T, Satake H, Pirger Z. Functional characterization and related evolutionary implications of invertebrate gonadotropin-releasing hormone/corazonin in a well-established model species. **Scientific Reports**. 2021 11:10028. (D1; IF₂₀₂₁: 4.996)

- 3) Our neural transcriptome and genome data revealed the absence of several key sequences/genes that are essential to accomplish the classical vertebrate-type sex steroid synthesis, as well as the receptor-mediation of sex steroids. Given the presence of the identified genes and the phenomenon of enzyme promiscuity, we do not rule out that *L. stagnalis* (and molluscs in general) is able to perform all steps of the vertebrate sex steroid synthesis pathway, but the yields are likely to be far too low to maintain a sex steroid-based hormonal system. Clearly, one must question whether natural selection in molluscs would have likely favoured the evolution of a steroid-based endocrine system.

Fodor I, Urbán P, Scott AP, Pirger Z. A critical evaluation of some of the recent so-called 'evidence' for the involvement of vertebrate-type sex steroids in the reproduction of mollusks. **Molecular and Cellular Endocrinology**. 2020 516:110949. (Q1; IF₂₀₂₀: 4.102)

Fodor I, Koene JM, Pirger Z. Neuronal Transcriptome Analysis of a Widely Recognised Molluscan Model Organism Highlights the Absence of Key Proteins Involved in the De Novo Synthesis and Receptor-Mediation of Sex Steroids in Vertebrates. **Malacologia**. 2021 64(1):69-77. (Q4; IF₂₀₂₁: 0.88)

- 4) We confirmed that molluscs can absorb, metabolize, and accumulate vertebrate steroids. This questions how much (if any at all) of the vertebrate sex steroids found in molluscan tissues are of endogenous origin.

Fodor I, Schwarz T, Kiss B, Tapodi A, Schmidt J, Cousins ARO, Katsiadaki I, Scott AP, Pirger Z. Studies on a widely-recognized snail model species (*Lymnaea stagnalis*) provide further evidence that vertebrate steroids do not have a hormonal role in the reproduction of mollusks. **Frontiers in Endocrinology**. 2022. 13:981564. (D1; IF₂₀₂₁: 6.055)

- 5) Using antisera generated against the vertebrate CYP19A and nPR, our IHC revealed immunopositive signal in the CNS. Since neither genes can be found in *L. stagnalis* (and in invertebrates in general), this supports the idea that immunostaining using (especially polyclonal) antibodies generated against mammalian proteins is a highly unreliable procedure for identifying or localizing specific proteins in tissues when applied to invertebrates. The WB and MS results obtained also confirmed this.

Fodor I, Schwarz T, Kiss B, Tapodi A, Schmidt J, Cousins ARO, Katsiadaki I, Scott AP, Pirger Z. Studies on a widely-recognized snail model species (*Lymnaea stagnalis*) provide further evidence

that vertebrate steroids do not have a hormonal role in the reproduction of mollusks. **Frontiers in Endocrinology**. 2022. 13:981564. (D1; IF₂₀₂₁: 6.055)

- 6) Although no functional nuclear sex steroid receptor can be found in *L. stagnalis* or in molluscs in general, we do not rule out that molluscs do seem respond (i.e. their physiology is potentially affected) in one way or another when exposed to vertebrate sex steroids. This can happen via the identified membrane sex steroid receptors, or via non-specific receptors (i.e. receptors for other compounds), or simply as a result of source re-allocation caused by the metabolism of sex steroids.

Fodor I, Urbán P, Scott AP, Pirger Z. A critical evaluation of some of the recent so-called 'evidence' for the involvement of vertebrate-type sex steroids in the reproduction of mollusks. **Molecular and Cellular Endocrinology**. 2020 516:110949. (Q1; IF₂₀₂₀: 4.102)

Fodor I and Pirger Z. From dark to light - an overview of over 70 years of endocrine disruption research on marine mollusks. **Frontiers in Endocrinology**. 2022 13:903575. (D1; IF₂₀₂₁: 6.055)

- 7) Our research group previously demonstrated that *L. stagnalis*'s reproduction alters when the specimens are chronically exposed to progestogens. However, we did not detect any change in the expression of neuropeptides responsible for the regulation of the reproduction. We suppose that the reproductive allocation of the hermaphroditic specimen changes due to the hormone exposure and this is not manifested at the level of the expression of reproduction-related neuropeptides. The mechanisms underlying the reproductive allocation change requires further investigations.

In summary, our findings support the idea that molluscan endocrinology differs from the well-characterized vertebrate endocrine system.

9. KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS

A doktori tanulmányaim során elért tudományos eredmények nem csak az én érdemem. Nem tartanék most itt számos, számomra fontos ember nélkül, akik mindig bátorítottak, segítettek, inspiráltak és elviseltek. Ezúton szeretném köszönetemet még egyszer kifejezni Nekik:

- Mindenek előtt **témavezetőmnek, Dr. Pirger Zsoltnak**, a szakmai vezetésért, rengeteg segítségért és tanácsért, hogy megalapozta a kutatói pályámat, hogy soha nem mondott nemet az ötletemre és gondolatomra (bármilyen örültek is voltak néha), hogy elviselte a szeszélyeimet és hogy a laboron kívül is számtalan alkalommal segített.

- Az Ökofiziológiai és Környezettoxikológiai Kutatócsoport/Adaptációs Neuroetológiai Kutatócsoport volt és jelenlegi tagjainak – **Prof. Elekes Károlynak, Prof. Kiss Tibornak, Dr. Maász Gábornak, Dr. Molnár Évának, Nagyné Fekete Zsuzsannának** – a szakmai tanácsokért, biztatásért és a kísérletes munkában való segítségért. Külön köszönettel tartozom **Dr. Svigruha Rékának és László Zitának**, akik végig lelkesen támogattak és segítették a munkámat, és akik a számos, sokszor egész napos kísérletek kivitelezésében is végig kitartóak voltak.

- A külföldi kollaborációs partnereinknek – **Prof. Paul R. Benjamin-nak, Prof. George Kemenesnek, Prof. Ildikó Kemenesnek, Prof. Alexander P. Scott-nak, Prof. Pei-San Tsai-nak, Prof. Honoo Satake-nak, Dr. Joris M. Koene-nek, Dr. Tomohiro Osugi-nak** -, akiktől rengeteget tanultam a közös cikkírások során, és akik hozzájárultak a gerinctelen neurobiológiai és neuroendokrinológiai tudásom elmélyítéséhez, valamint a nyelv- és cikkíró tudásom fejlődéséhez.

- A hazai kollaborációs partnereinknek – **Dr. Tapodi Antalnak, Schmidt Jánosnak, Urbán Péternek, Gálik Bencének** - a szekvenálásban, bioinformatikában és biokémiai kísérletekben nyújtott munkájukért és segítségükért.

- Az egyetem alatt szerzett barátaimnak – **Szabó Marcellnek, Büki Gergelynek, Kiss Bencének, Dr. Sümeghy Dávidnak** -, akik végig támogattak és biztattak.

- És nem utolsó sorban szeretett családomnak – **Nagypapámnak, Nagymamámnak, Nagynénémnek és Keresztapámnak** -, akik mindig mellettem voltak, támogattak, szeretettel és türelemmel egyengették az utamat.

10. HIVATKOZÁSOK

- ¹**Abe M, Kuroda R.** The development of CRISPR for a mollusc establishes the formin *Lsdial* as the long-sought gene for snail dextral/sinistral coiling. *Development* (2019) 146, dev175976.
- ²**Adema CM, van Deutekom-Mulder EC, van der Knaap WP, Sminia T.** Schistosomicidal activities of *Lymnaea stagnalis* haemocytes: the role of oxygen radicals. *Parasitology* (1994) 109, 479-85.
- ³**Adema CM, Hillier LW, Jones CS, Loker ES, Knight M, Minx P, Oliveira G, Raghavan N, Shedlock A, Rodrigues do Amaral L, Arican-Goktas HD, Assis JG, Baba EH, Baron OL, Bayne CJ, et al.** Whole genome analysis of a schistosomiasis-transmitting freshwater snail. *Nat Comm* (2017) 8, 15451.
- ⁴**Almeida A, Silva MG, Soares A, Freitas R.** Concentrations levels and effects of 17alpha-ethinylestradiol in freshwater and marine waters and bivalves: A review. *Environ Res* (2020) 185, 109316.
- ⁵**Altelaar AF, van Minnen J, Jimenez CR, Heeren RM, Piersma SR.** Direct molecular imaging of *Lymnaea stagnalis* nervous tissue at subcellular spatial resolution by mass spectrometry. *Anal Chem* (2005) 77, 735-41.
- ⁶**Alvarez B, Koene JM, Hollis KL, Loy I.** Learning to anticipate mate presence shapes individual sex roles in the hermaphroditic pond snail, *Lymnaea stagnalis*. *Anim Cogn* (2022) <https://doi.org/10.1007/s10071-022-01623-7>.
- ⁷**Amano M, Moriyama S, Okubo K, Amiya N, Takahashi A, Oka Y.** Biochemical and immunohistochemical analyses of a GnRH-like peptide in the neural ganglia of the Pacific abalone *Haliotis discus hannai* (Gastropoda). *Zool Sci* (2010) 27, 656-61.
- ⁸**Amorim J, Abreu I, Rodrigues P, Peixoto D, Pinheiro C, Saraiva A, Carvalho AP, Guimaraes L, Oliva-Teles L.** *Lymnaea stagnalis* as a freshwater model invertebrate for ecotoxicological studies. *Sci Total Environ* (2019) 669, 11-28.
- ⁹**Atkins WM.** Biological messiness vs. biological genius: Mechanistic aspects and roles of protein promiscuity. *J Steroid Biochem Mol Biol* (2015) 151, 3-11.
- ¹⁰**Atli G, Grosell M.** Characterization and response of antioxidant systems in the tissues of the freshwater pond snail (*Lymnaea stagnalis*) during acute copper exposure. *Aquat Toxicol* (2016) 176, 38-44.
- ¹¹**Aubry R.** Effect of estradiol & progesterone on the gonads of Pulmonata. *C R Hebd Seances Acad Sci* (1959) 248, 1225-7.
- ¹²**Avar P, Maasz G, Takacs P, Lovas S, Zrinyi Z, Svigruha R, Takatsy A, Toth LG, Pirger Z.** HPLC-MS/MS analysis of steroid hormones in environmental water samples. *Drug Test Anal* (2016) 8, 123-7.
- ¹³**Bailey CH, Bartsch D, Kandel ER.** Toward a molecular definition of long-term memory storage. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1996) 93, 13445-52.
- ¹⁴**Baker M.** Reproducibility crisis: Blame it on the antibodies. *Nature* (2015a) 521, 274-6.
- ¹⁵**Baker M.** Antibody anarchy: A call to order. *Nature* (2015b) 527, 545-51.
- ¹⁶**Balbi T, Ciacci C, Canesi L.** Estrogenic compounds as exogenous modulators of physiological functions in molluscs: Signaling pathways and biological responses. *Comp Biochem Physiol C* (2019) 222, 135-144.
- ¹⁷**Bannister R, Beresford N, Granger DW, Pounds NA, Rand-Weaver M, White R, Jobling S, Routledge EJ.** No substantial changes in estrogen receptor and estrogen-related receptor orthologue gene transcription in *Marisa cornuarietis* exposed to estrogenic chemicals. *Aquat Toxicol* (2013) 140-141, 19-26.
- ¹⁸**Baynes A, Montagut Pino G, Duong GH, Lockyer AE, McDougall C, Jobling S, Routledge EJ.** Early embryonic exposure of freshwater gastropods to pharmaceutical 5-alpha-

reductase inhibitors results in a surprising open-coiled "banana-shaped" shell. *Sci Rep* (2019) 9, 16439.

¹⁹**Baz E, Hussein AAA, Vreeker EMT, Soliman MFM, Tadros MM, El-Shenawy NS, Koene JM.** Consequences of artificial light at night on behavior, reproduction, and development of *Lymnaea stagnalis*. *Environmental Pollution* (2022) 307.

²⁰**Benjamin PR.** *Lymnaea*. *Scholarpedia* (2008) 3, 4124.

²¹**Benjamin PR, Kemenes G.** *Lymnaea* learning and memory. *Scholarpedia* (2010) 5, 4247.

²²**Benjamin PR, Kemenes I.** *Lymnaea* neuropeptide genes. *Scholarpedia* (2013) 8, 11520.

²³**Benjamin PR, Crossley M.** Gastropod feeding systems: evolution of neural circuits that generate diverse behaviors. *Oxford Research Encyclopedia of Neuroscience* (2020).

²⁴**Benjamin PR, Kemenes I.** Peptidergic Systems in the Pond Snail *Lymnaea*: From Genes to Hormones and Behavior. in *Advances in Invertebrate (Neuro)Endocrinology* Vol. 1 (eds Saber Saleuddin, Angela B. Lange and I. Orchard), Apple Academic Press, 2020. ISBN: 9780429264450.

²⁵**Benjamin PR, Kemenes G, Staras K.** Molluscan Nervous Systems. in *Encyclopedia of Life Science* Vol. 2, John Wiley & Sons, Ltd., 2021.

²⁶**Berrie AD.** On the life cycle of *Lymnaea stagnalis* (L.) in the West of Scotland. *J Molluscan Stud* (1965) 36, 283–295.

²⁷**Bigot L, Zatylny-Gaudin C, Rodet F, Bernay B, Boudry P, Favrel P.** Characterization of GnRH-related peptides from the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Peptides* (2012) 34, 303-10.

²⁸**Blalock BJ, Robinson WE, Loguinov A, Vulpe CD, Krick KS, Poynton HC.** Transcriptomic and network analyses reveal mechanistic-based biomarkers of endocrine disruption in the marine mussel, *Mytilus edulis*. *Environ Sci Technol* (2018) 52, 9419–9430.

²⁹**Boag DA, Pearlstone PSM.** On the life cycle of *Lymnaea stagnalis* (Pulmonata: Gastropoda) in southwestern Alberta. *Can J Zool* (1979) 57, 353-362.

³⁰**Bobe J, Guiguen Y, Fostier A.** Diversity and biological significance of sex hormone-binding globulin in fish, an evolutionary perspective. *Mol Cell Endocrinol* (2010) 316, 66-78.

³¹**Bradbury A, Plückthun A, co-signatories.** Standardize antibodies used in research. *Nature* (2015) 518, 26-29.

³²**Brierley MJ, Staras K, Benjamin PR.** Behavioral function of glutamatergic interneurons in the feeding system of *Lymnaea*: Plateauing properties and synaptic connections with motor neurons. *J Neurophysiol* (1997) 78, 3386-3395.

³³**Buckett KJ, Dockray GJ, Osborne NN, Benjamin PR.** Pharmacology of the myogenic heart of the pond snail *Lymnaea stagnalis*. *J Neurophysiol* (1990) 63, 1413-25.

³⁴**Burgus R, Butcher M, Amoss M, Ling N, Monahan M, Rivier J, Fellows R, Blackwell R, Vale W, Guillemin R.** Primary structure of the ovine hypothalamic luteinizing hormone-releasing factor (LRF) (LH-hypothalamus-LRF-gas chromatography-mass spectrometry-decapeptide-Edman degradation). *Proc Natl Acad Sci U S A* (1972) 69, 278-82.

³⁵**Cahill MA, Jazayeri JA, Catalano SM, Toyokuni S, Kovacevic Z, Richardson DR.** The emerging role of progesterone receptor membrane component 1 (PGRMC1) in cancer biology. *Biochim Biophys Acta* (2016) 1866, 339-349.

³⁶**Callard GV, Tarrant AM, Novillo A, Yacci P, Ciaccia L, Vajda S, Chuang GY, Kozakov D, Greytak SR, Sawyer S, Hoover C, Cotter KA.** Evolutionary origins of the estrogen signaling system: insights from amphioxus. *J Steroid Biochem Mol Biol* (2011) 127, 176-88.

³⁷**Canesi L, Ciacci C, Betti M, Lorusso LC, Marchi B, Burattini S, Falcieri E, Gallo G.** Rapid effects of 17beta-estradiol on cell signaling and function of *Mytilus* hemocytes. *Gen Comp Endocrinol* (2004) 136, 58-71.

³⁸**Canesi L, Ciacci C, Lorusso LC, Betti M, Guarnieri T, Tavolari S, Gallo G.** Immunomodulation by 17beta-estradiol in bivalve hemocytes. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* (2006) 291, R664-73.

- ³⁹**Canesi L, Ciacci C, Lorusso LC, Betti M.** Effects of endocrine disrupting chemicals on the immune system of the edible bivalve mollusc *Mytilus*. in *The Endocrine Disruptors* (eds M. Marino and D. G. Mita), Transworld Research Network, 2007a. 8178952831.
- ⁴⁰**Canesi L, Lorusso LC, Ciacci C, Betti M, Rocchi M, Pojana G, Marcomini A.** Immunomodulation of *Mytilus* hemocytes by individual estrogenic chemicals and environmentally relevant mixtures of estrogens: in vitro and in vivo studies. *Aquat Toxicol* (2007b) 81, 36-44.
- ⁴¹**Castro LF, Santos MM, Reis-Henriques MA.** The genomic environment around the Aromatase gene: evolutionary insights. *BMC Evol Biol* (2005) 5, 43.
- ⁴²**Conn PJ, Kaczmarek LK.** The bag cell neurons of *Aplysia*. A model for the study of the molecular mechanisms involved in the control of prolonged animal behaviors. *Mol Neurobiol* (1989) 3, 237-73.
- ⁴³**Corner GW, Allen WM.** Physiology of the corpus luteum, II: production of a special uterine reaction (progestational proliferation) by extracts of the corpus luteum. *Am J Physiol* (1929) 88, 326-339.
- ⁴⁴**Croll RP, Voronezhskaya EE, Hiripi L, Elekes K.** Development of catecholaminergic neurons in the pond snail, *Lymnaea stagnalis*: II. Postembryonic development of central and peripheral cells. *J Comp Neurol* (1999) 404, 297-309.
- ⁴⁵**Crossley M, Staras K, Kemenes G.** A two-neuron system for adaptive goal-directed decision-making in *Lymnaea*. *Nat Comm* (2016) 7, 11793.
- ⁴⁶**Crossley M, Staras K, Kemenes G.** A central control circuit for encoding perceived food value. *Sci Adv*(2018) 4, eaau9180.
- ⁴⁷**Dalesman S, Lukowiak K.** How stress alters memory in 'smart' snails. *PLoS One* (2012) 7, e32334.
- ⁴⁸**David K, Dingemans E, Freud J, E. L.** Über krystallinisches männliches Hormon aus Hoden (Testosteron), wirksamer als aus Harn oder aus Cholesterin bereitetes Androsteron. *Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem* (1935) 233. 281
- ⁴⁹**Davison A, Blaxter ML.** An expressed sequence tag survey of gene expression in the pond snail *Lymnaea stagnalis*, an intermediate vector of trematodes. *Parasitology* (2005) 130, 539-52.
- ⁵⁰**Davison A, McDowell GS, Holden JM, Johnson HF, Koutsovoulos GD, Liu MM, Hulpiau P, Van Roy F, Wade CM, Banerjee R, Yang F, Chiba S, Davey JW, Jackson DJ, Levin M, et al.** Formin Is Associated with Left-Right Asymmetry in the Pond Snail and the Frog. *Curr Biol* (2016) 26, 654-60.
- ⁵¹**De Boer PA, Ter Maat A, Pieneman AW, Croll RP, Kurokawa M, Jansen RF.** Functional role of peptidergic anterior lobe neurons in male sexual behavior of the snail *Lymnaea stagnalis*. *J Neurophysiol* (1997) 78, 2823-33.
- ⁵²**De Coster W, D'Hert S, Schultz DT, Cruts M, Van Broeckhoven C.** NanoPack: visualizing and processing long-read sequencing data. *Bioinformatics* (2018) 34, 2666-2669.
- ⁵³**de Hoog E, Lukewich MK, Spencer GE.** Retinoid receptor-based signaling plays a role in voltage-dependent inhibition of invertebrate voltage-gated Ca²⁺ channels. *J Biol Chem* (2019) 294, 10076-10093.
- ⁵⁴**de Jong-Brink M, Schot LP, Schoenmakers HJ, Bergamin-Sassen MJ.** A biochemical and quantitative electron microscope study on steroidogenesis in ovotestis and digestive gland of the pulmonate snail *Lymnaea stagnalis*. *Gen Comp Endocrinol* (1981) 45, 30-8.
- ⁵⁵**De Lange RP, Joosse J, Van Minnen J.** Multi-messenger innervation of the male sexual system of *Lymnaea stagnalis*. *J Comp Neurol* (1998) 390, 564-77.
- ⁵⁶**Desmond E, Gribaldo S.** Phylogenomics of sterol synthesis: insights into the origin, evolution, and diversity of a key eukaryotic feature. *Genome Biol Evol* (2009) 1, 364-81.

- ⁵⁷**Di Cosmo A, Di Cristo C.** Neuropeptidergic control of the optic gland of *Octopus vulgaris*: FMRF-amide and GnRH immunoreactivity. *J Comp Neurol* (1998) 398, 1-12.
- ⁵⁸**Di Cosmo A, Paolucci M, Di Cristo C, Botte V, Ciarcia G.** Progesterone receptor in the reproductive system of the female of *Octopus vulgaris*: characterization and immunolocalization. *Mol Reprod Dev* (1998) 50, 451-60.
- ⁵⁹**Di Cristo C, Di Donato P, Palumbo A, d'Ischia M, Paolucci M, Di Cosmo A.** Steroidogenesis in the brain of *Sepia officinalis* and *Octopus vulgaris*. *Front Biosci* (2010) 2, 673-83.
- ⁶⁰**Di Cristo C, Koene JM.** Neurobiology of reproduction in mollusks: Mechanisms and evolution. in *The Oxford Handbook of Invertebrate Neurobiology* (eds J. H. Byrne), Oxford University Press, 2017. ISBN: 9780190456757.
- ⁶¹**Dimastrogiovanni G, Fernandes D, Bonastre M, Porte C.** Progesterone is actively metabolized to 5alpha-pregnane-3,20-dione and 3beta-hydroxy-5alpha-pregnan-20-one by the marine mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Aquat Toxicol* (2015) 165, 93-100.
- ⁶²**Dufour S, Querat B, Tostivint H, Pasqualini C, Vaudry H, Rousseau K.** Origin and evolution of the neuroendocrine control of reproduction in vertebrates, with special focus on genome and gene duplications. *Physiol Rev* (2020) 100, 869-943.
- ⁶³**El Filali Z, de Boer PA, Pieneman AW, de Lange RP, Jansen RF, Ter Maat A, van der Schors RC, Li KW, van Straalen NM, Koene JM.** Single-cell analysis of peptide expression and electrophysiology of right parietal neurons involved in male copulation behavior of a simultaneous hermaphrodite. *Invert Neurosci* (2015) 15, 7.
- ⁶⁴**Elekes K, Kemenes G, Hiripi L, Geffard M, Benjamin PR.** Dopamine-immunoreactive neurones in the central nervous system of the pond snail *Lymnaea stagnalis*. *J Comp Neurol* (1991) 307, 214-24.
- ⁶⁵**Elekes K, Eckert M, Rapus J.** Small sets of putative interneurons are octopamine-immunoreactive in the central nervous system of the pond snail, *Lymnaea stagnalis*. *Brain Res* (1993) 608, 191-7.
- ⁶⁶**Felsenstein J.** Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *J Mol Evol* (1981) 17, 368-76.
- ⁶⁷**Fernandes D, Loi B, Porte C.** Biosynthesis and metabolism of steroids in molluscs. *J Steroid Biochem Mol Biol* (2011) 127, 189-95.
- ⁶⁸**Ferte H, Depaquit J, Carre S, Villena I, Leger N.** Presence of *Trichobilharzia szidati* in *Lymnaea stagnalis* and *T. franki* in *Radix auricularia* in northeastern France: molecular evidence. *Parasitol Res* (2005) 95, 150-4.
- ⁶⁹**Filla A, Hiripi L, Elekes K.** Role of aminergic (serotonin and dopamine) systems in the embryogenesis and different embryonic behaviors of the pond snail, *Lymnaea stagnalis*. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* (2009) 149, 73-82.
- ⁷⁰**Fodor I, Urban P, Scott AP, Pirger Z.** A critical evaluation of some of the recent so-called 'evidence' for the involvement of vertebrate-type sex steroids in the reproduction of mollusks. *Mol Cell Endocrinol* (2020a) 516, 110949.
- ⁷¹**Fodor I, Hussein AA, Benjamin PR, Koene JM, Pirger Z.** The unlimited potential of the great pond snail, *Lymnaea stagnalis*. *eLife* (2020b) 9, e56962.
- ⁷²**Fodor I, Koene JM, Pirger Z.** Neuronal transcriptome analysis of a widely recognised molluscan model organism highlights the absence of key proteins involved in the *de novo* synthesis and receptor-mediation of sex steroids in vertebrates. *Malacologia* (2021a) 64, 69-77.
- ⁷³**Fodor I, Svigruha R, Kemenes G, Kemenes I, Pirger Z.** The great pond snail (*Lymnaea stagnalis*) as a model of ageing and age-related memory impairment: an overview. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* (2021b).
- ⁷⁴**Fodor I, Pirger Z.** From dark to light - an overview of over 70 years of endocrine disruption research on marine mollusks. *Front Endocrinol* (2022) 13, 903575.

- ⁷⁵**Funayama S, Kawashima Y, Saito T, Furukawa S, Kodera Y, Moriyama S.** Identification and Function of GnRH-like Peptide in the Pacific abalone, *Haliotis discus hannai*. *Zool Sci* (2019) 36, 339-347.
- ⁷⁶**Giusti A, Joaquim-Justo C.** Esterification of vertebrate like steroids in molluscs: a target of endocrine disruptors? *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* (2013) 158, 187-98.
- ⁷⁷**Goldstone JV, Sundaramoorthy M, Zhao B, Waterman MR, Stegeman JJ, Lamb DC.** Genetic and structural analyses of cytochrome P450 hydroxylases in sex hormone biosynthesis: Sequential origin and subsequent coevolution. *Mol Phyloget Evol* (2015) 94, 676-687.
- ⁷⁸**Gonzalez SL, Coronel MF, Raggio MC, Labombarda F.** Progesterone receptor-mediated actions and the treatment of central nervous system disorders: An up-date of the known and the challenge of the unknown. *Steroids* (2020) 153, 108525.
- ⁷⁹**Gooding MP, LeBlanc GA.** Biotransformation and disposition of testosterone in the eastern mud snail *Ilyanassa obsoleta*. *Gen Comp Endocrinol* (2001) 122, 172-80.
- ⁸⁰**Gray SL, Adams BA, Warby CM, Von Schalburg KR, Sherwood NM.** Transcription and translation of the salmon gonadotropin-releasing hormone genes in brain and gonads of sexually maturing rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Biol Reprod* (2002) 67, 1621-7.
- ⁸¹**Guercia C, Cianciullo P, Porte C.** Analysis of testosterone fatty acid esters in the digestive gland of mussels by liquid chromatography-high resolution mass spectrometry. *Steroids* (2017) 123, 67-72.
- ⁸²**Guo H, Bao Z, Du H, L. Z, Wang S, Sun L, Mou X, Hu X.** Identification of Cytochrome P450 (CYP) genes in Zhikong scallop (*Chlamys farreri*). *J Ocean Univ China* (2013) 12, 97-102.
- ⁸³**Guo X, Liu Y, Qiu X, Wang X.** Cloning and sequence analysis of a cDNA of P450 17 α -hydroxylase/17,20-lyase(CYP17) from *Strongylocentrotus nudus*, in: W. Weiguo Lu, L. Sun, X. Zhang and J. Sun (Eds.), 4th International Conference on Bioinformatics and Biomedical Engineering. IEEE Explore, June 18-20, 2010 Chengdu, China.
- ⁸⁴**Hagerman DD, Wellington FM.** Estrogens in marine invertebrates. *Biol Bull* (1957) 112, 180-183.
- ⁸⁵**Hallmann A, Smolarz K, Konieczna L, Zabrzanska S, Belka M, Baczek T.** LC-MS measurement of free steroids in mussels (*Mytilus trossulus*) from the southern Baltic Sea. *J Pharm Biomed Anal* (2016) 117, 311-5.
- ⁸⁶**Hallmann A, Konieczna L, Swiezak J, Milczarek R, Smolarz K.** Aromatisation of steroids in the bivalve *Mytilus trossulus*. *PeerJ* (2019) 7, e6953.
- ⁸⁷**Harris CA, Buckley CL, Nowotny T, Passaro PA, Seth AK, Kemenes G, O'Shea M.** Multi-neuronal refractory period adapts centrally generated behaviour to reward. *PLoS One* (2012) 7, e42493.
- ⁸⁸**Hatakeyama D, Aonuma H, Ito E, Elekes K.** Localization of glutamate-like immunoreactive neurons in the central and peripheral nervous system of the adult and developing pond snail, *Lymnaea stagnalis*. *Biol Bull* (2007) 213, 172-86.
- ⁸⁹**Hatakeyama D, Mita K, Kobayashi S, Sadamoto H, Fujito Y, Hiripi L, Elekes K, Ito E.** Glutamate transporters in the central nervous system of a pond snail. *J Neurosci Res* (2010) 88, 1374-86.
- ⁹⁰**Hauser F, Grimmelikhuijzen CJP.** Evolution of the AKH/corazonin/ACP/GnRH receptor superfamily and their ligands in the Protostomia. *Gen Comp Endocrinol* (2014) 209, 35-49.
- ⁹¹**Hegedus E, Kaslin J, Hiripi L, Kiss T, Panula P, Elekes K.** Histaminergic neurons in the central and peripheral nervous system of gastropods (*Helix*, *Lymnaea*): an immunocytochemical, biochemical, and electrophysiological approach. *J Comp Neurol* (2004) 475, 391-405.
- ⁹²**Hermann PM, Watson SN, Wildering WC.** Phospholipase A2 - nexus of aging, oxidative stress, neuronal excitability, and functional decline of the aging nervous system? Insights from

a snail model system of neuronal aging and age-associated memory impairment. *Front Genet* (2014) 5, 419.

⁹³**Hernadi L, Pirger Z, Kiss T, Nemeth J, Mark L, Kiss P, Tamas A, Lubics A, Toth G, Shioda S, Reglodi D.** The presence and distribution of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide and its receptor in the snail *Helix pomatia*. *Neuroscience* (2008) 155, 387-402.

⁹⁴**Hoffer JN, Marien J, Ellers J, Koene JM.** Sexual selection gradients change over time in a simultaneous hermaphrodite. *eLife* (2017) 6.

⁹⁵**Hoffer JNA, Schwegler D, Ellers J, Koene JM.** Mating rate influences female reproductive investment in a simultaneous hermaphrodite, *Lymnaea stagnalis*. *Anim Behav* (2012) 84, 523-529.

⁹⁶**Hohagen J, Jackson DJ.** An ancient process in a modern mollusc: early development of the shell in *Lymnaea stagnalis*. *BMC Dev Biol* (2013) 13, 27.

⁹⁷**Holland LZ, Sower SA.** "Insights of early chordate genomics: endocrinology and development in amphioxus, tunicates and lampreys": introduction to the symposium. *Integr Comp Biol* (2010) 50, 17-21.

⁹⁸**Horiguchi T, Ohta Y.** A critical review of sex steroid hormones and the induction mechanisms of imposex in gastropod mollusks. in *Advances in Invertebrate (Neuro)Endocrinology* (eds A. B. L. Saber Saleuddin, Ian Orchard), Apple Academic Press, 2020. ISBN: 9781003029854.

⁹⁹**Hou QL, Chen EH, Jiang HB, Yu SF, Yang PJ, Liu XQ, Park Y, Wang JJ, Smagghe G.** Corazonin signaling is required in the male for sperm transfer in the oriental fruit fly *Bactrocera dorsalis*. *Front Physiol* (2018) 9, 660.

¹⁰⁰**Huffman MN, Thayer SA, Doisy EA.** The isolation of a-dihydrotheelin from human placenta. *J Biol Chem* (1940) 133, 567-571.

¹⁰¹**Hultin CL, Hallgren P, Persson A, Hansson MC.** Identification of an estrogen receptor gene in the natural freshwater snail *Bithynia tentaculata*. *Gene* (2014) 540, 26-31.

¹⁰²**Idler DR, Wiseman P.** Molluscan sterols: a review. *J Fish Res Board Canada* (1972) 29, 385-98.

¹⁰³**In VV, Ntalamagka N, O'Connor W, Wang T, Powell D, Cummins SF, Elizur A.** Reproductive neuropeptides that stimulate spawning in the Sydney Rock Oyster (*Saccostrea glomerata*). *Peptides* (2016) 82, 109-119.

¹⁰⁴**Ivashkin E, Khabarova MY, Melnikova V, Nezlin LP, Kharchenko O, Voronezhskaya EE, Adameyko I.** Serotonin mediates maternal effects and directs developmental and behavioral changes in the progeny of snails. *Cell Rep* (2015) 12, 1144-58.

¹⁰⁵**Iwakoshi-Ukena E, Ukena K, Takuwa-Kuroda K, Kanda A, Tsutsui K, Minakata H.** Expression and distribution of octopus gonadotropin-releasing hormone in the central nervous system and peripheral organs of the octopus (*Octopus vulgaris*) by in situ hybridization and immunohistochemistry. *J Comp Neurol* (2004) 477, 310-23.

¹⁰⁶**Iwakoshi E, Takuwa-Kuroda K, Fujisawa Y, Hisada M, Ukena K, Tsutsui K, Minakata H.** Isolation and characterization of a GnRH-like peptide from *Octopus vulgaris*. *Biochem Biophys Res Commun* (2002) 291, 1187-93.

¹⁰⁷**Janer G, Mesia-Vela S, Porte C, Kauffman FC.** Esterification of vertebrate-type steroids in the Eastern oyster (*Crassostrea virginica*). *Steroids* (2004) 69, 129-36.

¹⁰⁸**Janer G, Sternberg RM, LeBlanc GA, Porte C.** Testosterone conjugating activities in invertebrates: are they targets for endocrine disruptors? *Aquat Toxicol* (2005) 71, 273-82.

¹⁰⁹**Janer G, Porte C.** Sex steroids and potential mechanisms of non-genomic endocrine disruption in invertebrates. *Ecotoxicology* (2007) 16, 145-60.

¹¹⁰**Janse C, Slob W, Popelier CM, Vogelaar JW.** Survival characteristics of the mollusc *Lymnaea stagnalis* under constant culture conditions: effects of aging and disease. *Mech Ageing Dev* (1988) 42, 263-74.

- ¹¹¹**Jung LH, Kavanaugh SI, Sun B, Tsai PS.** Localization of a molluscan gonadotropin-releasing hormone in *Aplysia californica* by *in situ* hybridization and immunocytochemistry. *Gen Comp Endocrinol* (2014) 195, 132-137.
- ¹¹²**Kanda A, Takahashi T, Satake H, Minakata H.** Molecular and functional characterization of a novel gonadotropin-releasing-hormone receptor isolated from the common octopus (*Octopus vulgaris*). *Biochem J* (2006) 395, 125-35.
- ¹¹³**Kandel ER.** The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses. *Science* (2001) 294, 1030-8.
- ¹¹⁴**Kandel ER.** in *The History of Neuroscience in Autobiography* Vol. 9 (eds T. D. Albright and L. R. Squire), Society for Neuroscience, 2016. ISBN: 978-0-916110-02-4.
- ¹¹⁵**Kaprara A, Huhtaniemi IT.** The hypothalamus-pituitary-gonad axis: Tales of mice and men. *Metabolism* (2018) 86, 3-17.
- ¹¹⁶**Katsiadaki I, Schwarz TI, Cousins ARO, Scott AP.** The Uptake of Ethinyl-Estradiol and Cortisol From Water by Mussels (*Mytilus* spp.). *Front Endocrinol* (2021) 12, 794623.
- ¹¹⁷**Kavanaugh SI, Tsai PS.** Functional authentication of a novel gastropod gonadotropin-releasing hormone receptor reveals unusual features and evolutionary insight. *PLoS One* (2016) 11, e0160292.
- ¹¹⁸**Keay J, Bridgham JT, Thornton JW.** The *Octopus vulgaris* estrogen receptor is a constitutive transcriptional activator: evolutionary and functional implications. *Endocrinology* (2006) 147, 3861-9.
- ¹¹⁹**Kemenes G, Elliott CJ, Benjamin PR.** Chemical and Tactile Inputs to the *Lymnaea* Feeding System: Effects on Behaviour and Neural Circuitry. *J Exp Biol* (1986) 122, 113-137.
- ¹²⁰**Kemenes G, Elekes K, Hiripi L, Benjamin PR.** A comparison of four techniques for mapping the distribution of serotonin and serotonin-containing neurons in fixed and living ganglia of the snail, *Lymnaea*. *J Neurocytol* (1989) 18, 193-208.
- ¹²¹**Kemenes G, Benjamin PR.** *Lymnaea*. *Curr Biol* (2009) 19, R9-11.
- ¹²²**Kemenes I, Marra V, Crossley M, Samu D, Staras K, Kemenes G, Nowotny T.** Dynamic clamp with StpC software. *Nat Protoc* (2011) 6, 405-17.
- ¹²³**Koene JM, Ter Maat A.** Energy budgets in the simultaneously hermaphroditic pond snail, *Lymnaea stagnalis*: a trade-off between growth and reproduction during development. *Belg J Zool* (2004) 134, 41-45.
- ¹²⁴**Koene JM.** Neuro-endocrine control of reproduction in hermaphroditic freshwater snails: mechanisms and evolution. *Front Behav Neurosci* (2010) 4, 167.
- ¹²⁵**Krusch B, Schoenmakers HJ, Voogt PA, Nolte A.** Steroid synthesizing capacity of the dorsal body of *Helix pomatia* L. (Gastropoda)—an *in vitro* study. *Comp Biochem Physiol B Comp Biochem* (1979) 64.
- ¹²⁶**Kumar S, Stecher G, Tamura K.** MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol Biol Evol* (2016) 33, 1870-4.
- ¹²⁷**Kuroda R.** How a single gene twists a snail. *Integr Comp Biol* (2014) 54, 677-87.
- ¹²⁸**Kuroda R.** A twisting story: how a single gene twists a snail? *Mechanogenetics*. *Q Rev Biophys* (2015) 48, 445-52.
- ¹²⁹**Labadie P, Peck M, Minier C, Hill EM.** Identification of the steroid fatty acid ester conjugates formed *in vivo* in *Mytilus edulis* as a result of exposure to estrogens. *Steroids* (2007) 72, 41-9.
- ¹³⁰**Lagadic L, Coutellec MA, Caquet T.** Endocrine disruption in aquatic pulmonate molluscs: few evidences, many challenges. *Ecotoxicology* (2007) 16, 45-59.
- ¹³¹**Lance E, Brient L, Bormans M, Gerard C.** Interactions between cyanobacteria and gastropods I. Ingestion of toxic *Planktothrix agardhii* by *Lymnaea stagnalis* and the kinetics of microcystin bioaccumulation and detoxification. *Aquat Toxicol* (2006) 79, 140-8.

- ¹³²**Lathe R, Kotelevtsev Y, Mason JI.** Steroid promiscuity: Diversity of enzyme action. Preface. *J Steroid Biochem Mol Biol* (2015) 151, 1-2.
- ¹³³**Le Curieux-Belfond O, Moslemi S, Mathieu M, Séralini GE.** Androgen metabolism in oyster *Crassostrea gigas*: evidence for 17 β -HSD activities and characterization of an aromatase-like activity inhibited by pharmacological compounds and a marine pollutant. *J Steroid Biochem Mol Biol* (2001) 78, 359-366.
- ¹³⁴**Le Curieux-Belfond O, Fievet B, Séralini GE, Mathieu M.** Short-term bioaccumulation, circulation and metabolism of estradiol-17 β in the oyster *Crassostrea gigas*. *J Exp Mar Biol Ecol* (2005) 325, 125-133.
- ¹³⁵**Le Guellec D, Thiard M-C, Remy-Martin JP, Deray A, Gomot L, Adessi GL.** *In vitro* metabolism of androstenedione and identification of endogenous steroids in *Helix aspersa*. *Gen Comp Endocrinol* (1987) 66, 425-433.
- ¹³⁶**Leblanc GA, Gooding MP, Sternberg RM.** Testosterone-Fatty Acid esterification: a unique target for the endocrine toxicity of tributyltin to gastropods. *Integr Comp Biol* (2005) 45, 81-7.
- ¹³⁷**Levin ER, Hammes SR.** Nuclear receptors outside the nucleus: extranuclear signalling by steroid receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol* (2016) 17, 783-797.
- ¹³⁸**Lima D, Machado A, Reis-Henriques MA, Rocha E, Santos MM, Castro LF.** Cloning and expression analysis of the 17 β hydroxysteroid dehydrogenase type 12 (HSD17B12) in the neogastropod *Nucella lapillus*. *J Steroid Biochem Mol Biol* (2013) 134, 8-14.
- ¹³⁹**Lindemans M, Janssen T, Beets I, Temmerman L, Meelkop E, Schoofs L.** Gonadotropin-releasing hormone and adipokinetic hormone signaling systems share a common evolutionary origin. *Front Endocrinol* (2011) 2, 16.
- ¹⁴⁰**Lu M, Horiguchi T, Shiraishi H, Shibata Y, Abo M, Okubo A, Yamazaki S.** Identification and quantitation of steroid hormones in marine gastropods by GC/MS. *Bunseki Kagaku* (2001) 50, 247-255.
- ¹⁴¹**Lu S, Wang J, Chitsaz F, Derbyshire MK, Geer RC, Gonzales NR, Gwadz M, Hurwitz DI, Marchler GH, Song JS, Thanki N, Yamashita RA, Yang M, Zhang D, Zheng C, et al.** CDD/SPARCLE: the conserved domain database in 2020. *Nucleic Acids Res* (2020) 48, D265-D268.
- ¹⁴²**Lukowiak K, Ringseis E, Spencer G, Wildering W, Syed N.** Operant conditioning of aerial respiratory behaviour in *Lymnaea stagnalis*. *J Exp Biol* (1996) 199, 683-91.
- ¹⁴³**Ma F, Han X, An L, Lei K, Qi H, LeBlanc GA.** Freshwater snail *Parafossarulus striatulus* estrogen receptor: Characteristics and expression profiles under lab and field exposure. *Chemosphere* (2019) 220, 611-619.
- ¹⁴⁴**Maasz G, Mayer M, Zrinyi Z, Molnar E, Kuzma M, Fodor I, Pirger Z, Takacs P.** Spatiotemporal variations of pharmacologically active compounds in surface waters of a summer holiday destination. *Sci Total Environ* (2019) 677, 545-555.
- ¹⁴⁵**Marchler-Bauer A, Bo Y, Han L, He J, Lanczycki CJ, Lu S, Chitsaz F, Derbyshire MK, Geer RC, Gonzales NR, Gwadz M, Hurwitz DI, Lu F, Marchler GH, Song JS, et al.** CDD/SPARCLE: functional classification of proteins via subfamily domain architectures. *Nucleic Acids Res* (2017) 45, D200-D203.
- ¹⁴⁶**Markov G, Lecointre G, Demeneix B, Laudet V.** The "street light syndrome", or how protein taxonomy can bias experimental manipulations. *Bioessays* (2008) 30, 349-57.
- ¹⁴⁷**Markov GV, Tavares R, Dauphin-Villemant C, Demeneix BA, Baker ME, Laudet V.** Independent elaboration of steroid hormone signaling pathways in metazoans. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2009) 106, 11913-8.
- ¹⁴⁸**Markov GV, Gutierrez-Mazariegos J, Pitrat D, Billas IML, Bonneton F, Moras D, Hasserodt J, Lecointre G, Laudet V.** Origin of an ancient hormone/receptor couple revealed by resurrection of an ancestral estrogen. *Sci Adv*(2017) 3, e1601778.

- ¹⁴⁹**Matsumoto T, Osada M, Osawa Y, Mori K.** Gonadal estrogen profile and immunohistochemical localization of steroidogenic enzymes in the oyster and scallop during sexual maturation. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* (1997) 118, 811-817.
- ¹⁵⁰**Matsumoto T, Nakamura AM, Mori K, Akiyama I, Hirose H, Takahashi Y.** Oyster estrogen receptor: cDNA cloning and immunolocalization. *Gen Comp Endocrinol* (2007) 151, 195-201.
- ¹⁵¹**Matsuo H, Baba Y, Nair RM, Arimura A, Schally AV.** Structure of the porcine LH- and FSH-releasing hormone. I. The proposed amino acid sequence. *Biochem Biophys Res Commun* (1971) 43, 1334-9.
- ¹⁵²**McKenzie JD, Counce M, Hetherington MS, Winlow W.** Serotonergic innervation of the foot of the pond snail *Lymnaea stagnalis* (L.). *J Neurocytol* (1998) 27, 459-70.
- ¹⁵³**Mescheriakov VN.** The common pond snail *Lymnaea stagnalis*. in *Animal Species for Developmental Studies*. (eds D. A. Detlaf and S. G. Vassetzky), Plenum Press, 1990.
- ¹⁵⁴**Minakata H, Shigeno S, Kano N, Haraguchi S, Osugi T, Tsutsui K.** Octopus gonadotrophin-releasing hormone: a multifunctional peptide in the endocrine and nervous systems of the cephalopod. *J Neuroendocrinol* (2009) 21, 322-6.
- ¹⁵⁵**Minakata H, Tsutsui K.** Oct-GnRH, the first protostomian gonadotropin-releasing hormone-like peptide and a critical mini-review of the presence of vertebrate sex steroids in molluscs. *Gen Comp Endocrinol* (2016) 227, 109-14.
- ¹⁵⁶**Mizuta T, Kubokawa K.** Presence of sex steroids and cytochrome P450 genes in amphioxus. *Endocrinology* (2007) 148, 3554-65.
- ¹⁵⁷**Morcillo Y, Porte C.** Evidence of endocrine disruption in the imposex-affected gastropod *Bolinus brandaris*. *Environmental Research Section A* (1999) 81, 349-354.
- ¹⁵⁸**Morrill JB.** Developmental Biology of the Freshwater Invertebrates in *Development of the pulmonate gastropod, Lymnaea*. (eds F. W. Harrison and R. R. Cowden), Alan R. Liss., 1982.
- ¹⁵⁹**Nagasawa K, Osugi T, Suzuki I, Itoh N, Takahashi KG, Satake H, Osada M.** Characterization of GnRH-like peptides from the nerve ganglia of Yesso scallop, *Patinopecten yessoensis*. *Peptides* (2015a) 71, 202-10.
- ¹⁶⁰**Nagasawa K, Treen N, Kondo R, Otoki Y, Itoh N, Rotchell JM, Osada M.** Molecular characterization of an estrogen receptor and estrogen-related receptor and their autoregulatory capabilities in two *Mytilus* species. *Gene* (2015b) 564, 153-159.
- ¹⁶¹**Nagasawa K, Oouchi H, Itoh N, Takahashi KG, Osada M.** In vivo administration of Scallop GnRH-like peptide influences on gonad development in the Yesso scallop, *Patinopecten yessoensis*. *PLoS One* (2015c) 10, e0129571.
- ¹⁶²**Nakadera Y, Blom C, Koene JM.** Duration of sperm storage in the simultaneous hermaphrodite *Lymnaea stagnalis*. *J Molluscan Stud* (2014) 80, 1-7.
- ¹⁶³**Nakadera Y, Swart EM, Maas JP, Montagne-Wajer K, Ter Maat A, Koene JM.** Effects of age, size, and mating history on sex role decision of a simultaneous hermaphrodite. *Behav Ecol* (2015) 26, 232-241.
- ¹⁶⁴**Nakadera Y, Marien J, Van Straalen NM, Koene JM.** Multiple mating in natural populations of a simultaneous hermaphrodite, *Lymnaea stagnalis*. *J Molluscan Stud* (2017) 83, 56-62.
- ¹⁶⁵**Nakai J, Totani Y, Kojima S, Sakakibara M, Ito E.** Features of behavioral changes underlying conditioned taste aversion in the pond snail *Lymnaea stagnalis*. *Invert Neurosci* (2020) 20, 8.
- ¹⁶⁶**Nakai J, Chikamoto N, Fujimoto K, Totani Y, Hatakeyama D, Dyakonova VE, Ito E.** Insulin and Memory in Invertebrates. *Front Behav Neurosci* (2022) 16, 882932.
- ¹⁶⁷**Nakamura S, Osada M, Kijima A.** Involvement of GnRH neuron in the spermatogonial proliferation of the scallop, *Patinopecten yessoensis*. *Mol Reprod Dev* (2007) 74, 108-15.

- ¹⁶⁸**Nunez PE, Adema CM, de Jong-Brink M.** Modulation of the bacterial clearance activity of haemocytes from the freshwater mollusc, *Lymnaea stagnalis*, by the avian schistosome, *Trichobilharzia ocellata*. *Parasitology* (1994) 109, 299-310.
- ¹⁶⁹**Nuurai P, Cummins SF, Botwright NA, Sobhon P.** Characterization of an abalone gonadotropin-releasing hormone and its effect on ovarian cell proliferation. *Aquaculture* (2016) 450, 116-122.
- ¹⁷⁰**Nuurai P, Wanichanon C, Wanichanon R.** Effect of gonadotropin releasing hormone on the expression of luteinizing hormone and estrogen in the nerve ganglia and ovary of a tropical abalone, *Haliotis asinina* Linnaeus. *Acta Histochem* (2020) 122, 151454.
- ¹⁷¹**Ohnishi T.** Recent advances in brassinosteroid biosynthetic pathway: insight into novel brassinosteroid shortcut pathway. *J Pestic Sci* (2018) 43, 159-167.
- ¹⁷²**Omran NE.** Testosterone, gonadotropins and androgen receptor during spermatogenesis of *Biomphalaria alexandrina* snails (Pulmonata: Basommatophora). *Reprod Biol* (2012) 12, 301-8.
- ¹⁷³**Osada M, Tawarayama H, Mori K.** Estrogen synthesis in relation to gonadal development of Japanese scallop, *Patinopecten yessoensis*: gonadal profile and immunolocalization of P450 aromatase and estrogen. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* (2004) 139, 123-128.
- ¹⁷⁴**Osada M, Treen N.** Molluscan GnRH associated with reproduction. *Gen Comp Endocrinol* (2013) 181, 254-8.
- ¹⁷⁵**Pang Y, Dong J, Thomas P.** Characterization, neurosteroid binding and brain distribution of human membrane progesterone receptors delta and epsilon (mPRdelta and mPREpsilon) and mPRdelta involvement in neurosteroid inhibition of apoptosis. *Endocrinology* (2013) 154, 283-95.
- ¹⁷⁶**Payne AH, Hales DB.** Overview of steroidogenic enzymes in the pathway from cholesterol to active steroid hormones. *Endocrine Reviews* (2004) 25, 947-970.
- ¹⁷⁷**Peck MR, Labadie P, Minier C, Hill EM.** Profiles of environmental and endogenous estrogens in the zebra mussel *Dreissena polymorpha*. *Chemosphere* (2007) 69, 1-8.
- ¹⁷⁸**Pereira RB, Andrade PB, Valentao P.** Chemical diversity and biological properties of secondary metabolites from sea hares of *Aplysia* genus. *Mar Drugs* (2016) 14.
- ¹⁷⁹**Pirger Z, Laszlo Z, Hiripi L, Hernadi L, Toth G, Lubics A, Reglodi D, Kemenes G, Mark L.** Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) and its receptors are present and biochemically active in the central nervous system of the pond snail *Lymnaea stagnalis*. *J Mol Neurosci* (2010a) 42, 464-71.
- ¹⁸⁰**Pirger Z, Laszlo Z, Kemenes I, Toth G, Reglodi D, Kemenes G.** A homolog of the vertebrate pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide is both necessary and instructive for the rapid formation of associative memory in an invertebrate. *J Neurosci* (2010b) 30, 13766-73.
- ¹⁸¹**Pirger Z, Crossley M, Laszlo Z, Naskar S, Kemenes G, O'Shea M, Benjamin PR, Kemenes I.** Interneuronal mechanism for Tinbergen's hierarchical model of behavioral choice. *Curr Biol* (2014) 24, 2018-24.
- ¹⁸²**Pirger Z, Zrinyi Z, Maasz G, Molnar E, Kiss T.** Pond snail reproduction as model in the environmental risk assesment: Reality and doubts. in *Biological Resources of Water* (eds S. Ray), IntechOpen, 2018. ISBN: 978-1-78923-081-9.
- ¹⁸³**Pirger Z, Laszlo Z, Naskar S, Crossley M, O'Shea M, Benjamin PR, Kemenes G, Kemenes I.** Interneuronal mechanisms for learning-induced switch in a sensory response that anticipates changes in behavioral outcomes. *Curr Biol* (2021) 31, 1754-1761 e3.
- ¹⁸⁴**Plachetzki DC, Tsai PS, Kavanaugh SI, Sower SA.** Ancient origins of metazoan gonadotropin-releasing hormone and their receptors revealed by phylogenomic analyses. *Gen Comp Endocrinol* (2016) 234, 10-9.

- ¹⁸⁵**Pojana G, Gomiero A, Jonkers N, Marcomini A.** Natural and synthetic endocrine disrupting compounds (EDCs) in water, sediment and biota of a coastal lagoon. *Environ Int* (2007) 33, 929-36.
- ¹⁸⁶**Prisco M, Agnese M, De Marino A, Andreuccetti P, Rosati L.** Spermatogenic cycle and steroidogenic control of spermatogenesis in *Mytilus galloprovincialis* collected in the Bay of Naples. *Anat Rec* (2017) 300, 1881-1894.
- ¹⁸⁷**Puinean A-M, Labadie P, Hill EM, Osada M, Kishida M, Nakao R, Novillo A, Callard I, Rotchell JM.** Laboratory exposure to 17 β -estradiol fails to induce vitellogenin and estrogen receptor gene expression in the marine invertebrate *Mytilus edulis*. *Aquat Toxicol* (2006) 79, 376-383.
- ¹⁸⁸**Ren J, Chung-Davidson YW, Jia L, Li W.** Genomic sequence analyses of classical and non-classical lamprey progesterone receptor genes and the inference of homologous gene evolution in metazoans. *BMC Evol Biol* (2019) 19, 136.
- ¹⁸⁹**Rivi V, Benatti C, Colliva C, Radighieri G, Brunello N, Tascadda F, Blom JMC.** *Lymnaea stagnalis* as model for translational neuroscience research: From pond to bench. *Neurosci Biobehav Rev* (2020) 108, 602-616.
- ¹⁹⁰**Rivi V, Benatti C, Lukowiak K, Colliva C, Alboni S, Tascadda F, Blom JMC.** What can we teach *Lymnaea* and what can *Lymnaea* teach us? *Biol Rev Camb Philos Soc* (2021) 96, 1590-1602.
- ¹⁹¹**Roch GJ, Busby ER, Sherwood NM.** Evolution of GnRH: diving deeper. *Gen Comp Endocrinol* (2011) 171, 1-16.
- ¹⁹²**Roch GJ, Busby ER, Sherwood NM.** GnRH receptors and peptides: skating backward. *Gen Comp Endocrinol* (2014) 209, 118-34.
- ¹⁹³**Rosati L, Agnese M, Abagnale L, Aniello F, Andreuccetti P, Prisco M.** The mussel *Mytilus galloprovincialis* in the bay of Naples: new insights on oogenic cycle and its hormonal control. *Anat Rec* (2019) 302, 1039-1049.
- ¹⁹⁴**Sakai T, Shiraishi A, Kawada T, Matsubara S, Aoyama M, Satake H.** Invertebrate gonadotropin-releasing hormone-related peptides and their receptors: an update. *Front Endocrinol* (2017) 8, 217.
- ¹⁹⁵**Sakai T, Yamamoto T, Matsubara S, Kawada T, Satake H.** Invertebrate gonadotropin-releasing hormone receptor signaling and its relevant biological actions. *Int J Mol Sci* (2020) 21, 8544.
- ¹⁹⁶**Salanki J, Farkas A, Kamardina T, Rozsa KS.** Molluscs in biological monitoring of water quality. *Toxicol Lett* (2003) 140-141, 403-10.
- ¹⁹⁷**Samu D, Marra V, Kemenes I, Crossley M, Kemenes G, Staras K, Nowotny T.** Single electrode dynamic clamp with StdpC. *J Neurosci Methods* (2012) 211, 11-21.
- ¹⁹⁸**Schwarz TI, Katsiadaki I, Maskrey BH, Scott AP.** Mussels (*Mytilus* spp.) display an ability for rapid and high capacity uptake of the vertebrate steroid, estradiol-17 β from water. *J Steroid Biochem Mol Biol* (2017a) 165, 407-420.
- ¹⁹⁹**Schwarz TI, Katsiadaki I, Maskrey BH, Scott AP.** Rapid uptake, biotransformation, esterification and lack of depuration of testosterone and its metabolites by the common mussel, *Mytilus* spp. *J Steroid Biochem Mol Biol* (2017b) 171, 54-65.
- ²⁰⁰**Schwarz TI, Katsiadaki I, Maskrey BH, Scott AP.** Uptake and metabolism of water-borne progesterone by the mussel, *Mytilus* spp. (Mollusca). *J Steroid Biochem Mol Biol* (2018) 178, 13-21.
- ²⁰¹**Scott AP.** Do mollusks use vertebrate sex steroids as reproductive hormones? Part I. Critical appraisal of the evidence for the presence, biosynthesis and uptake of steroids. *Steroids* (2012) 77, 1450-1468.
- ²⁰²**Scott AP.** Do mollusks use vertebrate sex steroids as reproductive hormones? II. Critical review of the evidence that steroids have biological effects. *Steroids* (2013) 78, 268-281.

- ²⁰³**Scott AP.** Is there any value in measuring vertebrate steroids in invertebrates? *Gen Comp Endocrinol* (2018) 265, 77-82.
- ²⁰⁴**Sellami A, Wegener C, Veenstra JA.** Functional significance of the copper transporter ATP7 in peptidergic neurons and endocrine cells in *Drosophila melanogaster*. *FEBS Lett* (2012) 586, 3633-8.
- ²⁰⁵**Sharker RM, Sukhan ZP, Kim SC, Hossen S, Cho Y, Choi CY, Kho KH.** *In vivo* effects of GnRH peptide on gonadal proliferation and related gene expression of Pacific abalone, *Haliotis discus hannai*. *Aquaculture* (2021) 531, 735911.
- ²⁰⁶**Simakov O, Marletaz F, Cho SJ, Edsinger-Gonzales E, Havlak P, Hellsten U, Kuo DH, Larsson T, Lv J, Arendt D, Savage R, Osoegawa K, de Jong P, Grimwood J, Chapman JA, et al.** Insights into bilaterian evolution from three spiralian genomes. *Nature* (2013) 493, 526-31.
- ²⁰⁷**Skala V, Walker AJ, Horak P.** Snail defence responses to parasite infection: The *Lymnaea stagnalis*-*Trichobilharzia szidati* model. *Dev Comp Immunol* (2020) 102, 103464.
- ²⁰⁸**Song Y, Miao J, Cai Y, Pan L.** Molecular cloning, characterization, and expression analysis of a gonadotropin-releasing hormone-like cDNA in the clam, *Ruditapes philippinarum*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* (2015) 189, 47-54.
- ²⁰⁹**Stange D, Sieatowicz A, Horres R, Oehlmann J.** Freshwater mudsnail (*Potamopyrgus antipodarum*) estrogen receptor: Identification and expression analysis under exposure to (xeno-) hormones. *Ecotoxicol Environ Saf* (2012) 75, 94-101.
- ²¹⁰**Stephenson R, Lewis V.** Behavioural evidence for a sleep-like quiescent state in a pulmonate mollusc, *Lymnaea stagnalis* (Linnaeus). *J Exp Biol* (2011) 214, 747-56.
- ²¹¹**Stewart MJ, Wang T, Harding BI, Bose U, Wyeth RC, Storey KB, Cummins SF.** Characterisation of reproduction-associated genes and peptides in the pest land snail, *Theba pisana*. *PLoS One* (2016) 11, e0162355.
- ²¹²**Stocco DM.** The role of the StAR protein in steroidogenesis: challenges for the future. *J Endocrinol* (2000) 164, 247-53.
- ²¹³**Svighruha R, Fodor I, Padisak J, Pirger Z.** Progesterone-induced alterations and their ecological relevance in different embryonic and adult behaviours of an invertebrate model species, the great pond snail (*Lymnaea stagnalis*). *Environ Sci Pollut Res Int* (2021a) 28, 59391-59402.
- ²¹⁴**Svighruha R.** A biomolekuláktól a viselkedésig: vízi modell állatok komplex válaszai progesztogén hatóanyagok hosszútávú terhelése során. *PhD disszertáció; Pannon Egyetem, ELKH Balatoni Limnológiai Kutatóintézet* (2021).
- ²¹⁵**Svighruha R, Fodor I, Gyori J, Schmidt J, Padisak J, Pirger Z.** Effects of chronic sublethal progesterone exposure on development, reproduction, and detoxification system of water flea, *Daphnia magna*. *Sci Total Environ* (2021b) 784, 147113.
- ²¹⁶**Swart EM, Davison A, Ellers J, Filangieri RR, Jackson DJ, Mariën J, van der Ouderaa IBC, Roelofs D, Koene JM.** Temporal expression profile of an accessory-gland protein that is transferred via the seminal fluid of the simultaneous hermaphrodite *Lymnaea stagnalis*. *J Moll Stud* (2019) 85, 177-183.
- ²¹⁷**Syed NI, Bulloch AG, Lukowiak K.** *In vitro* reconstruction of the respiratory central pattern generator of the mollusk *Lymnaea*. *Science* (1990) 250, 282-5.
- ²¹⁸**Syed NI, Winlow W.** Coordination of locomotor and cardiorespiratory networks of *Lymnaea stagnalis* by a pair of identified interneurons. *J Exp Biol* (1991) 158, 37-62.
- ²¹⁹**Taubenheim J, Kortmann C, Fraune S.** Function and evolution of nuclear receptors in environmental-dependent postembryonic development. *Front Cell Dev Biol* (2021) 9, 653792.
- ²²⁰**Taylor TD, Pacheco DA, Hergarden AC, Murthy M, Anderson DJ.** A neuropeptide circuit that coordinates sperm transfer and copulation duration in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2012) 109, 20697-702.

- ²²¹**Ter Maat A, Pieneman AW, Koene JM.** The effect of light on induced egg laying in the simultaneous hermaphrodite *Lymnaea stagnalis*. *J Moll Stud* (2012) 78, 262-267.
- ²²²**Teunissen Y, Geraerts WP, van Heerikhuizen H, Planta RJ, Joosse J.** Molecular cloning of a cDNA encoding a member of a novel cytochrome P450 family in the mollusc *Lymnaea stagnalis*. *J Biochem* (1992) 112, 249-52.
- ²²³**Thitiphuree T, Nagasawa K, Osada M.** Molecular identification of steroidogenesis-related genes in scallops and their potential roles in gametogenesis. *J Steroid Biochem Mol Biol* (2019) 186, 22-33.
- ²²⁴**Thomas P, Pang Y, Dong J, Groenen P, Kelder J, de Vlieg J, Zhu Y, Tubbs C.** Steroid and G protein binding characteristics of the seatrout and human progesterin membrane receptor alpha subtypes and their evolutionary origins. *Endocrinology* (2007) 148, 705-18.
- ²²⁵**Thomas P, Pang Y, Dong J.** Enhancement of cell surface expression and receptor functions of membrane progesterin receptor alpha (mPRalpha) by progesterone receptor membrane component 1 (PGRMC1): evidence for a role of PGRMC1 as an adaptor protein for steroid receptors. *Endocrinology* (2014) 155, 1107-19.
- ²²⁶**Thongbuakaew T, Siangcham T, Suwansa-ard, Elizur A, Cummins SF, Sobhon P, Sretaruga P.** Steroids and genes related to steroid biosynthesis in the female giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Steroids* (2016) 107, 149-160.
- ²²⁷**Thornton JW.** Evolution of vertebrate steroid receptors from an ancestral estrogen receptor by ligand exploitation and serial genome expansions. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2001) 98, 5671-6.
- ²²⁸**Thornton JW, Need E, Crews D.** Resurrecting the ancestral steroid receptor: ancient origin of estrogen signaling. *Science* (2003) 301, 1714-7.
- ²²⁹**Totani Y, Nakai J, Dyakonova VE, Lukowiak K, Sakakibara M, Ito E.** Induction of LTM following an Insulin Injection. *eNeuro* (2020) 7.
- ²³⁰**Tran TKA, MacFarlane GR, Kong RYC, O'Connor WA, Yu RMK.** Potential mechanisms underlying estrogen-induced expression of the molluscan estrogen receptor (ER) gene. *Aquat Toxicol* (2016) 179, 82-94.
- ²³¹**Tran TKA, Yu RMK, Islam R, Nguyen THT, Bui TLH, Kong RYC, O'Connor WA, Leusch FDL, Andrew-Priestley M, MacFarlane GR.** The utility of vitellogenin as a biomarker of estrogenic endocrine disrupting chemicals in molluscs. *Environmental Pollution* (2019) 248, 1067-1078.
- ²³²**Treen N, Itoh N, Miura H, Kikuchi I, Ueda T, Takahashi KG, Ubuka T, Yamamoto K, Sharp PJ, Tsutsui K, Osada M.** Mollusc gonadotropin-releasing hormone directly regulates gonadal functions: a primitive endocrine system controlling reproduction. *Gen Comp Endocrinol* (2012) 176, 167-72.
- ²³³**Tsai PS, Maldonado TA, Lunden JB.** Localization of gonadotropin-releasing hormone in the central nervous system and a peripheral chemosensory organ of *Aplysia californica*. *Gen Comp Endocrinol* (2003) 130, 20-8.
- ²³⁴**Tsai PS, Zhang L.** The emergence and loss of gonadotropin-releasing hormone in protostomes: orthology, phylogeny, structure, and function. *Biol Reprod* (2008) 79, 798-805.
- ²³⁵**Tsai PS, Sun B, Rochester JR, Wayne NL.** Gonadotropin-releasing hormone-like molecule is not an acute reproductive activator in the gastropod, *Aplysia californica*. *Gen Comp Endocrinol* (2010) 166, 280-8.
- ²³⁶**Tsai PS.** Gonadotropin-releasing hormone by any other name would smell as sweet. *Gen Comp Endocrinol* (2018) 264, 58-63.
- ²³⁷**Van Duivenboden YA, Ter Maat A.** Masculinity and receptivity in the hermaphrodite pond snail, *Lymnaea stagnalis*. *Anim Behav* (1985) 33, 885-891.
- ²³⁸**Veenstra JA.** Isolation and structure of corazonin, a cardioactive peptide from the American cockroach. *FEBS Lett* (1989) 250, 231-4.

- ²³⁹**Veenstra JA.** Does corazonin signal nutritional stress in insects? *Insect Biochem Mol Biol* (2009) 39, 755-62.
- ²⁴⁰**Vehovszky A, Elliott CJ.** The hybrid modulatory/pattern generating NIL interneuron in the buccal feeding system of *Lymnaea* is cholinergic. *Invert Neurosci* (1995) 1, 67-74.
- ²⁴¹**Vehovszky A, Hiripi L, Elliott CJ.** Octopamine is the synaptic transmitter between identified neurons in the buccal feeding network of the pond snail *Lymnaea stagnalis*. *Brain Res* (2000) 867, 188-99.
- ²⁴²**Vehovszky A, Farkas A, Acs A, Stoliar O, Szekacs A, Mortl M, Gyori J.** Neonicotinoid insecticides inhibit cholinergic neurotransmission in a molluscan (*Lymnaea stagnalis*) nervous system. *Aquat Toxicol* (2015) 167, 172-9.
- ²⁴³**Von Schalburg KR, Sherwood NM.** Regulation and expression of gonadotropin-releasing hormone gene differs in brain and gonads in rainbow trout. *Endocrinology* (1999) 140, 3012-24.
- ²⁴⁴**Voronezhskaya EE, Hiripi L, Elekes K, Croll RP.** Development of catecholaminergic neurons in the pond snail, *Lymnaea stagnalis*: I. Embryonic development of dopamine-containing neurons and dopamine-dependent behaviors. *J Comp Neurol* (1999) 404, 285-96.
- ²⁴⁵**Wagatsuma A, Sadamoto H, Kitahashi T, Lukowiak K, Urano A, Ito E.** Determination of the exact copy numbers of particular mRNAs in a single cell by quantitative real-time RT-PCR. *J Exp Biol* (2005) 208, 2389-98.
- ²⁴⁶**Wang G-Y-S, Crews P.** Geodisterol, a novel polyoxygenated sterol with an aromatic A ring from the tropical marine sponge *Geodia* sp. *Tetrahedron Letters* (1996) 37, 8145-8146.
- ²⁴⁷**Watson SN, Wright N, Hermann PM, Wildering WC.** Phospholipase A(2): the key to reversing long-term memory impairment in a gastropod model of aging. *Neurobiol Aging* (2013) 34, 610-20.
- ²⁴⁸**Wick RR, Judd LM, Holt KE.** Deepbiner: Demultiplexing barcoded Oxford Nanopore reads with deep convolutional neural networks. *PLoS Comput Biol* (2018) 14, e1006583.
- ²⁴⁹**Wood EA, Stopka SA, Zhang L, Mattson S, Maasz G, Pirger Z, Vertes A.** Neuropeptide localization in *Lymnaea stagnalis*: from the central nervous system to subcellular compartments. *Front Mol Neurosci* (2021) 14, 670303.
- ²⁵⁰**Yan XH, Liu HL, Huang H, Li XB, Guo YW.** Steroids with aromatic A-rings from the Hainan soft coral *Dendronephthya studeri* Ridley. *J Nat Prod* (2011) 74, 175-80.
- ²⁵¹**Young KG, Chang JP, Goldberg JI.** Gonadotropin-releasing hormone neuronal system of the freshwater snails *Helisoma trivolvis* and *Lymnaea stagnalis*: possible involvement in reproduction. *J Comp Neurol* (1999) 404, 427-37.
- ²⁵²**Zandawala M, Tian S, Elphick MR.** The evolution and nomenclature of GnRH-type and corazonin-type neuropeptide signaling systems. *Gen Comp Endocrinol* (2018) 264, 64-77.
- ²⁵³**Zanette J, Goldstone JV, Bains ACD, Stegeman JJ.** Identification of CYP genes in *Mytilus* (mussel) and *Crassostrea* (oyster) species: First approach to the full complement of cytochrome P450 genes in bivalves. *Mar Environ Res* (2010) 69, S1-S3.
- ²⁵⁴**Zhang L, Wayne NL, Sherwood NM, Postigo HR, Tsai PS.** Biological and immunological characterization of multiple GnRH in an opisthobranch mollusk, *Aplysia californica*. *Gen Comp Endocrinol* (2000) 118, 77-89.
- ²⁵⁵**Zhang L, Tello JA, Zhang W, Tsai PS.** Molecular cloning, expression pattern, and immunocytochemical localization of a gonadotropin-releasing hormone-like molecule in the gastropod mollusk, *Aplysia californica*. *Gen Comp Endocrinol* (2008) 156, 201-9.
- ²⁵⁶**Zhang L, Khattar N, Kemenes I, Kemenes G, Zrinyi Z, Pirger Z, Vertes A.** Subcellular peptide localization in single identified neurons by capillary microsampling mass spectrometry. *Sci Rep* (2018a) 8, 12227.

- ²⁵⁷**Zhang M, Wang Y, Li Y, Li W, Li R, Xie X, Wang S, Hu X, Zhang L, Bao Z.** Identification and characterization of neuropeptides by transcriptome and proteome analyses in a bivalve mollusc *Patinopecten yessoensis*. *Front Genet* (2018b) 9, 197.
- ²⁵⁸**Zhang P, Blonk BA, van der Berg RF, Bakker ES.** The effect of temperature on herbivory by the omnivorous ectotherm snail *Lymnaea stagnalis*. *Hydrobiologia* (2018c) 812, 147–155.
- ²⁵⁹**Zrinyi Z, Maasz G, Zhang L, Vertes A, Lovas S, Kiss T, Elekes K, Pirger Z.** Effect of progesterone and its synthetic analogs on reproduction and embryonic development of a freshwater invertebrate model. *Aquat Toxicol* (2017) 190, 94-103.
- ²⁶⁰**Zrinyi Z.** Fogamzásgátló hatóanyag- maradványok által kiváltott szomatikus és molekuláris változások gerinctelen és gerinces vízi testállatokon. *PhD disszertáció; Pécsi Tudományegyetem; ÖK Balatoni Limnológiai Intézet* (2017).

11. TUDOMÁNYOS TEVÉKENYSÉG ADATAI

11.1. Az értekezés témájához kapcsolódó közlemények

Fodor I, Schwarz T, Kiss B, Tapodi A, Schmidt J, Cousins ARO, Katsiadaki I, Scott AP, Pirger Z. Studies on a widely-recognized snail model species (*Lymnaea stagnalis*) provide further evidence that vertebrate steroids do not have a hormonal role in the reproduction of mollusks. **Frontiers in Endocrinology**. 2022. 13:981564. (D1; IF₂₀₂₁: 6.055)

Fodor I and Pirger Z. From dark to light - an overview of over 70 years of endocrine disruption research on marine mollusks. **Frontiers in Endocrinology**. 2022 13:903575. (D1; IF₂₀₂₁: 6.055)

Fodor I, Koene JM, Pirger Z. Neuronal Transcriptome Analysis of a Widely Recognised Molluscan Model Organism Highlights the Absence of Key Proteins Involved in the De Novo Synthesis and Receptor-Mediation of Sex Steroids in Vertebrates. **Malacologia**. 2021 64(1):69-77. (Q4; IF₂₀₂₁: 0.88)

Fodor I, Svigruha R, Bozsó Z, Tóth G, Osugi T, Yamamoto T, Satake H, Pirger Z. Functional characterization and related evolutionary implications of invertebrate gonadotropin-releasing hormone/corazonin in a well-established model species. **Scientific Reports**. 2021 11:10028. (D1; IF₂₀₂₁: 4.996)

Fodor I, Zrinyi Z, Horváth R, Urbán P, Herczeg R, Büki G, Koene JM, Tsai PS, Pirger Z. Identification, presence, and possible multifunctional regulatory role of invertebrate gonadotropin-releasing hormone/corazonin molecule in the great pond snail (*Lymnaea stagnalis*). **General and Comparative Endocrinology**. 2020 299:113621. (Q1; IF₂₀₂₀: 2.822)

Fodor I, Urbán P, Scott AP, Pirger Z. A critical evaluation of some of the recent so-called 'evidence' for the involvement of vertebrate-type sex steroids in the reproduction of mollusks. **Molecular and Cellular Endocrinology**. 2020 516:110949. (Q1; IF₂₀₂₀: 4.102)

11.2. Az értekezés témájához nem kapcsolódó közlemények

Svigruha R, **Fodor I**, Győri J, Schmidt J, Padisák J, Pirger Z. Effects of chronic sublethal progestogen exposure on development, reproduction, and detoxification system of water flea, *Daphnia magna*. **Science of the Total Environment**. 2021 784:147113. (D1; IF₂₀₂₁: 10.753)

Molnar E, **Fodor I**, Svigruha R, Pirger Z. Issues, challenges, directives, and limitations concerning the improvement of environmental risk assessment of pharmaceutically active compounds. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. 2021 216:112212. (D1; IF₂₀₂₁: 7.129)

Fodor I, Svigruha R, Kemenes G, Kemenes I, Pirger Z. The great pond snail (*Lymnaea stagnalis*) as a model of ageing and age-related memory impairment: an overview. **Journal of Gerontology A**. 2021 76(6):975-982. (D1; IF₂₀₂₁: 6.591)

Hussein AAA, Bloem E, **Fodor I**, Baz ES, Tadros MM, Soliman MFM, El-Shenawy NS, Koene JM. Slowly seeing the light: an integrative review on ecological light pollution as a potential threat for mollusks. **Environmental Science and Pollution Research**. 2021 28(5):5036-5048. (Q1; IF₂₀₂₁: 5.19)

Svigruha R, **Fodor I**, Padisak J, Pirger Z. Progestogen-induced alterations and their ecological relevance in different embryonic and adult behaviours of an invertebrate model species, the great pond snail (*Lymnaea stagnalis*). **Environmental Science and Pollution Research**. 2021 28(42):59391-59402. (Q1; IF₂₀₂₁: 5.19)

Maasz G, Zrínyi Z, **Fodor I**, Boross N, Vitál Z, Kánainé Sipos DI, Kovács B, Melegh S, Takács P. Testing the Applicability of MALDI-TOF MS as an Alternative Stock Identification Method in a Cryptic Species Complex. **Molecules**. 2020 25(14):3214. (Q1; IF₂₀₂₀: 4.411)

Fodor I, Hussein AA, Benjamin PR, Koene JM, Pirger Z. The unlimited potential of the great pond snail, *Lymnaea stagnalis*. **eLife**. 2020 9:e56962. (D1; IF₂₀₂₀: 8.14)

Fodor I, Urbán P, Kemenes G, Koene JM, Pirger Z. Aging and disease-relevant gene products in the neuronal transcriptome of the great pond snail (*Lymnaea stagnalis*): a potential model of aging, age-related memory loss, and neurodegenerative diseases. **Invertebrate Neuroscience**. 2020 20(3):9. (Q4; IF₂₀₂₀: 0.5)

Maasz G, Mayer M, Zrinyi Z, Molnar E, Kuzma M, **Fodor I**, Pirger Z, Takács P. Spatiotemporal variations of pharmacologically active compounds in surface waters of a summer holiday destination. **Science of the Total Environment**. 2019 677:545-555. (D1; IF₂₀₁₉: 6.55)

Maasz G, Zrinyi Z, Takacs P, Lovas S, **Fodor I**, Kiss T, Pirger Z. Complex molecular changes induced by chronic progestogens exposure in roach, *Rutilus rutilus*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. 2017 139:9-17. (Q1; IF₂₀₁₇: 3.24)

Fodor I, Valasek A, Urbán P, Kovács M, Fekete C, Kerepesi I. A comparative study on optimisation of protein extraction methods for *Saccharomonospora azurea*. **Acta Biologica Szegediensis**. 2017 61(1):45-50. (Q3; IF₂₀₁₇: 0.2)

Valasek A, Kiss ÍÉ, **Fodor I**, Kovács M, Urbán P, Jámbor É, Fekete C, Kerepesi I. Proteomic insight into the primycin fermentation process of *Saccharomonospora azurea*. **Acta Biologica Hungarica**. 2016 67(4):424-430. (Q3; IF₂₀₁₆: 0.5)

11.3. Az értekezés témájához kapcsolódó konferencia szereplések

1. **Fodor I**, Sviruha R, Urbán P, Tóth G, Koene JM, Tsai PS, Satake H, Pirger Zs: Characterization of invertebrate gonadotropin-releasing hormone/corazonin in the well-established molluscan model species *Lymnaea stagnalis*: evolutionary and functional implications. 30th CECE & 9th ISFE, Faro, Portugal, 2022. 09. 04-08. (online előadás)
2. **Fodor I**, Schwarz T, Kiss B, Tapodi A, Schmidt J, Katsiadaki I, Scott AP, Pirger Zs: Studies on the great pond snail highlight weaknesses in two lines of evidence that vertebrate steroids have a hormonal role in the reproduction of mollusks. 30th CECE & 9th ISFE, Faro, Portugal, 2022. 09. 04-08. (poszter)
3. **Fodor I**, Sviruha R, Tóth G, Pirger Zs: Progesztogén indukálta sejtes és molekuláris hatások a nagy mocsári csiga (*Lymnaea stagnalis*) neuroendokrin és reprodukciós rendszerében. XI. Ökotoxikológiai konferencia, 2021.11.26. (online előadás)
4. Pirger Zs, Sviruha R, Urbán P, Tsai PS, Koene JM, **Fodor I**: Identification, presence, and possible multifunctional regulatory role of invertebrate GnRH/CRZ molecule in the great pond snail (*Lymnaea stagnalis*). FENS2020 Virtual Forum, 2020.07.11-15. (poszter)

5. **Fodor I**, Zrínyi Z, Svigruha R, Urbán P, Tsai PS, Koene JM, Pirger Zs: Effects of progestogens on the neuroendocrine system of an invertebrate model species (*Lymnaea stagnalis*). *Scientific day of VU, Amsterdam, the Netherlands. 2020.02.18* (előadás)
6. **Fodor I**, Zrínyi Z, Svigruha R, Urbán P, Tsai PS, Koene JM, Pirger Zs: Effects of progestogens on the neuroendocrine system of an invertebrate model species (*Lymnaea stagnalis*). *NAEM, Lunteren, the Netherlands, 2020.02.11-12.* (poszter)
7. **Fodor I**, Zrínyi Z, Svigruha R, Molnár É, Urbán P, Tsai PS, Koene JM, Pirger Zs: Effects of progestogens on the neuroendocrine system of an invertebrate model species (*Lymnaea stagnalis*). *IBRO2020 Workshop, Szeged, Hungary, 2020.01.29-30.* (poszter)
8. **Fodor I**, Svigruha R, Molnár É, Urbán P, Koene JM, Pirger Zs: Progesztogén indukálta hatások a nagy mocsári csiga (*Lymnaea stagnalis*) neuroendokrin és reprodukciós rendszerében. *X. Ökotoxikológiai konferencia, 2020.12.04.* (online előadás)
9. **Fodor I**: Progesztogén indukálta hatások a nagy mocsári csiga (*Lymnaea stagnalis*) neuroendokrin és reprodukciós rendszerében. *Pannon Tudományos Nap, 2020.11.16-17.* (online előadás)
10. **Fodor I**, Zrínyi Z, Maász G, Urbán P, Koene JM, Pirger Zs: Progesztogén indukálta hatások a nagy mocsári csiga (*Lymnaea stagnalis*) neuroendokrin rendszerében. *IX. Ökotoxikológiai konferencia, Budapest, Magyarország, 2019.11.22.* (poszter)
11. **Fodor I**, Zrínyi Z, Urbán P, Tsai PS, Koene JM, Pirger Zs: Progestogens-induced changes on the neuroendocrine system of freshwater pond snail (*Lymnaea stagnalis*). *1st Symposium on Invertebrate Neuroscience, Tihany, Hungary, 2019.08.13-17.* (előadás)
12. **Fodor I**, Zrínyi Z, Urbán P, Tsai PS, Koene JM, Pirger Zs: Gonadotropin releasing hormone (GnRH) or corazonin (CRZ) - two faces of the same neuropeptide. *1st Symposium on Invertebrate Neuroscience, Tihany, Hungary, 2019.08.13-17.* (poszter)
13. **Fodor I**: Gonadotropin-felszabadító hormon (GnRH) expresszió vizsgálata progesztogén kezelt nagy mocsári csiga (*Lymnaea stagnalis*) központi idegrendszerében. *I. Régiós Környezettoxikológiai PhD Konferencia, Veszprém, Magyarország, 2018.12.12.* (előadás)
14. **Fodor I**, Svigruha R, Zrínyi Z, Büki G, Urbán P, Pirger Zs: Gonadotropin-felszabadító hormon (GnRH) expresszió vizsgálata progesztogén kezelt nagy mocsári csiga (*Lymnaea stagnalis*) központi idegrendszerében. *VIII. Ökotoxikológiai konferencia, Budapest, Magyarország, 2018.11.23.* (poszter)

11.4. Az értekezés témájához nem kapcsolódó konferencia szereplések

1. **Fodor I**, Svigruha R, Urbán P, Gálik B, Kemenes G, Kemenes I, Pirger Zs: Cellular and molecular mechanisms of age-related changes in a defined neuronal network encoding associative memory. 25. *Tavaszi Szél konferencia, Pécs, Magyarország, 2022.05.06-08.* (poszter)
2. Svigruha R, **Fodor I**, Schmidt J, Győri J, Padisák J, Pirger Zs: A progesztogén hatóanyagok hosszú távú terhelése során megfigyelhető egyed- és molekuláris szintű változások a nagy vízibolha (*Daphnia magna*) egyedeiben. 25. *Tavaszi Szél konferencia, Pécs, Magyarország, 2022.05.06-08.* (poszter)
3. **Fodor I**, Svigruha R, Urbán P, Gálik B, Kemenes G, Kemenes I, Pirger Zs: Cellular and molecular mechanisms of age-related changes in a defined neuronal network encoding associative memory. *IBRO2022 Workshop, Budapest, Magyarország, 2022.01.27-28* (poszter)
4. Svigruha R, **Fodor I**, Schmidt J, Győri J, Padisák J, Pirger Zs: A progesztogén hatóanyagok hosszú távú terhelése során megfigyelhető egyed- és molekuláris szintű változások a nagy vízibolha (*Daphnia magna*) egyedeiben. *XI. Ökotoxikológiai konferencia, 2021.11.26.* (online előadás)
5. Farkas A, Svigruha R, **Fodor I**, Somogyvári D, Győri J: Neonikotinoidok és emelkedő hőmérséklet interaktív hatásainak vizsgálata a nagy vízibolha (*Daphnia magna*) modellen. *XI. Ökotoxikológiai konferencia, 2021.11.26.* (online előadás)
6. Svigruha R, **Fodor I**, Padisák J, Pirger Zs: Progesztogének okozta változások és azok ökológiai vonatkozásai egy vízi gerinctelen modellállat (*Lymnaea stagnalis*) embrióiban és felnőtt egyedeiben. *X. Ökotoxikológiai konferencia, 2020.12.04.* (online előadás)
7. Maász G, **Fodor I**, Molnár É, Zrínyi Z, Svigruha R, Kiss T, Pirger Zs: A környezetből kimutatható pszichoaktív hatóanyag-szennyezések felmérése és az általuk indukált változások vizsgálata a nagy mocsári csiga (*Lymnaea stagnalis*) központi idegrendszerében. *IX. Ökotoxikológiai konferencia, Budapest, Magyarország, 2019.11.22.* (poszter)
8. Pirger Zs, **Fodor I**, Svigruha R, Molnár É, Zrínyi Z, Kiss T, Maász G: Környezeti kockázatbecslés alapján beállított gyógyszer-szennyezések élettani hatásai nagy mocsári csigán (*Lymnaea stagnalis*). *IX. Ökotoxikológiai konferencia, Budapest, Magyarország, 2019.11.22.* (előadás)
9. Molnár É, **Fodor I**, Pirger Zs, Maász G: Gyógyszerhatóanyag-koncentrációk környezeti kockázati elemzése a Balatonban. *IX. Ökotoxikológiai konferencia, Budapest, Magyarország, 2019.11.22.* (előadás)

10. Svigruha R, **Fodor I**, Maász G, Szoboszlay S, Bordós G, Pirger Zs: Jelölt mikroműanyag-partikulumok mozgása a nagy vízibolha nemzedékei között. *IX. Ökotoxikológiai konferencia, Budapest, Magyarország, 2019.11.22.* (poszter)
11. Maász G, **Fodor I**, Molnar E, Zrínyi Z, Svigruha R, Udvardi R, Laszlo Z, Kiss T, Pirger Zs: Monitoring of environmental psychoactive drug contaminations and investigation of the induced neuronal changes. *1st Symposium on Invertebrate Neuroscience, Tihany, Hungary, 2019.08.13-17.* (előadás)
12. Svigruha R, Zrínyi Z, **Fodor I**, Maasz G, Pirger Zs: Impact of progestogen contaminations on the general physiological state of *Lymnaea stagnalis*. *1st Symposium on Invertebrate Neuroscience, Tihany, Hungary, 2019.08.13-17.* (poszter)
13. Molnar E, Hahn J, **Fodor I**, Zrinyi Z, Szoboszlay S, Pirger Zs, Maasz G: Environmental risk assessment of pharmaceuticals in the largest shallow lake in Central Europe. *17th International Conference on Chemistry and Environment, Thessaloniki, Greece, 2019.06.16-20.* (poszter)
14. Maász G, Máyer M, Zrínyi Z, Molnár É, Kuzma M, **Fodor I**, Pirger Zs, Takács P: Gyógyszerhatóanyag maradványok vízminőségi és ökológiai kockázatának vizsgálata. *20. Kolozsvári Biológus Napok, Kolozsvár, Románia, 2019.04.12-14.* (előadás)
15. Molnár É, **Fodor I**, Takács P, Zrínyi Z, Kuzma M, Mayer M, Pirger Zs, Maász G: Gyógyszerhatóanyag-koncentrációk felmérése a Balatonban és annak vízgyűjtő területén a szezonális hatások figyelembevételével. *VIII. Ökotoxikológiai konferencia, Budapest, Magyarország, 2018.11.23.* (előadás)
16. Svigruha R, Zrínyi Z, **Fodor I**, Kardos V, G-Tóth L, Pirger Zs: Gerinctelen vízi modellállatokban megfigyelhető változások progesztogén hatóanyagok hosszú távú terhelése során. *VIII. Ökotoxikológiai konferencia, Budapest, Magyarország, 2018.11.23.* (poszter)
17. Maász G, Molnár É, Kuzma M, Mayer M, Zrínyi Z, **Fodor I**, Takács P, Pirger Zs: „Tisztább, mint az átlag” - folytatódnak a gyógyszermaradvány felmérések a Balatonban. *Fiatal Analitikusok XXVI. Előadóülése, Budapest, Magyarország, 2018.11.12.* (előadás)
18. Molnár E, **Fodor I**, Takács P, Zrinyi Z, Kuzma M, Mayer M, Pirger Zs, Maász G: The environmental impact of summer social events on the largest shallow lake in Central. *40th International Conference on Environmental & Food Monitoring, Santiago de Compostela, Spain, 2018.06.19-22.* (poszter)
19. Molnár É, **Fodor I**, Takács P, Zrínyi Z, Mayer M, Pirger Zs, Maász G: Analytical measurement of active pharmaceutical ingredients in Lake Balaton and its catchment area.

Környezettoxikológiai Munkabizottság előadóiülése, MTA VEAB székház (Veszprém), 2018.05.30. (előadás)

20. **Fodor I**, Valasek A, Urbán P, Pirger Zs, Fekete Cs, Kerepesi I: A comparative study on optimisation of protein extraction method for *Saccharomonospora azurea*. *10th Central and Eastern European Proteomic Conference, Budapest, Hungary, 2016.10.11-14.* (poszter)
21. Maász G, Zrínyi Z, Takács P, Lovas S, **Fodor I**, Pirger Zs: Krónikus progesztogén terhelés indukálta molekuláris, szövettani és szomatikus index változások az őshonos búzaszemű keszegezen (*Rutilus rutilus*). *Magyar Farmakológiai, Anatómus, Mikrocirkulációs és Élettani Társaságok Közös Tudományos Konferenciája (FAMÉ), Pécs, Magyarország, 2016.06.01-04.* (poszter)
22. Maasz G, Lovas S, Zrinyi Z, **Fodor I**, Kiss T, Pirger Zs: Electrophysiology-LC-MS online system. *34th IMMS, Fiera di Primiero, Italy, 2016.05.15-18.* (poszter)
23. Lovas S, **Fodor I**, Kiss T, Pirger Zs: Changes of electrical characteristics induces by priority pollutant hormones in *Lymnaea* identified neurons. *IBRO2016 Workshop, Budapest, Magyarország, 2016.01.21-22.* (poszter)
24. Valasek A, **Fodor I**, Kiss I, Kovacs M, Toth Zs, Urbán P, Jambor E, Laszlo M, Fekete Cs, Kerepesi I: From genomics to proteomics in the field on antibiotic research. *Hungarian Molecular Life Sciences, Eger, Hungary, 2015.03.27-29.* (poszter)

12. Függelékek

Függelék 1: A humán nERα (#P03372) és az *A. californica*-ban azonosított „nER” (#NP_001191648) fehérje szekvenciájának összehasonlítása, bemutatva a homológiát, amely a „puhatestű nER” elnevezéshez vezetett. A folytonos vonalú keret a DNS-kötő domént (C domén/DBD), míg a szaggatott vonalú keret a ligand-kötő domént (E domén/LBD) mutatja. A P-box pirossal, a D-box kékkel, míg az AF2 motívum zölddel van jelölve.

Human_ER alfa	1	MTMTLHTKASGMALLHQIQGNELEPLNRPQLKIPLERPLGEVYLDSSKPA	50
Aplysia_ER	1	-----	0
Human_ER alfa	51	VYNYPEGAAYEFNAAAAANAQVYGQTGLPYGPGSEAAAFSGNGLGGFPPL	100
Aplysia_ER	1	-----	0
Human_ER alfa	101	NSVSPSPMLLLHPPQQL-----SPFLQPHGQVPPYLENE-PSGYT . . .:.:.:	140
Aplysia_ER	1	-MVSFSPCMPVLPVLSGAGGGEGTAGSAHLQAATSTTPEAGSGLPHNLF	49
Human_ER alfa	141	VREAGPPAFYRPNSDNRRQGRERLASTNDKGSMMESAKETRYCAVCND	190
Aplysia_ER	50	MDVHGPGTGLGASPSHMKQ-----EVGGAVPGSSTQAKLCQVCS	89
Human_ER alfa	191	YASGYHYGVWS P-box CEGCKA D-box CPATNQCITIDKNRRKSCQAC	240
Aplysia_ER	90	NASGFHYGVWS CEGCKA FFKRSIQGPVDYI CPATNTC TIDKHRRKSCQAC	139
Human_ER alfa	241	RLRRCYEVGMMKGGIRKDRRG---RMLKHKRQRDDGEGRGEVGSAGDMR	287
Aplysia_ER	140	RLRRCYEVGMNKGSRKEKRN S GN T SSLK G KRCRADSSD-----S	179
Human_ER alfa	288	AANLWSPMLIKRSKKNLSLADQ M V S ALLD A EP P ILYSEYD P TR F	337
Aplysia_ER	180	AVNSTNGASSKSSKRSRSASI---LEALQKADLPV M DSY H HN L PA	224
Human_ER alfa	338	SEASMMGLLTNLADREL V H M IN W AK R VP G F V DL T L H D Q V H LE C AW L E I L	387
Aplysia_ER	225	TRVHLLNTLIK L ADREL V Y L IN W AK H VP G Y T CL T L G D Q V H LE I EC C W M EL L	274
Human_ER alfa	388	MIGLVWRSMEHPGK-LLFAPNLLDR N Q G K C VE G M V E I FD M LL A T S S R FR	436
Aplysia_ER	275	LLNCAF R SMEHE G RTL V F A PD F HL R EQ W -AL T GM G D V LE Q V S AV S EQ M L	323
Human_ER alfa	437	MMNLQGE F V C L K S I ILL N SG V Y T FL S ST L K S LE E K D H I R V LD K IT D T L	486
Aplysia_ER	324	LHGLN K E L LL L L Q AT V LV N A E VR P -L D S F L K I Q EM R Q L IL D V-----	364
Human_ER alfa	487	IHLMA K AG L T L Q Q Q H Q-----R L A Q LL L IL S H I R H MS N K G ME H LY S M K C	530
Aplysia_ER	365	--F M E V AG-----R H Q G F G N R H A PS I LL L L T H I R Q A G E R G I T Y F Q K L K M	407
Human_ER alfa	531	KN V V P LY D L L L E M I D A H RL H A P T S R G G A S V E E T D Q S -----	566
Aplysia_ER	408	EG C V T F C D L L T E M I D A H N S S G E R R L Q Q Q Q Q P Q Q Q S H A H H H H PP P LP H	457
Human_ER alfa	567	-HL A T A G S T S S H S L Q Y Y I T G E A E G F P A T V 595 .:.:. : .:. .:. .	
Aplysia_ER	458	HH H H S T Q S S P Q H S R A F P Y H H----- 477	

Függelék 2: A *L. stagnalis* homológ szekvenciáinak (például a GnRH/CRZ neuropeptid kódoló régiója) kereséséhez és azonosításához használt releváns gerinctelen és gerinces szekvenciák

“query” szekvencia	Faj	NCBI azonosító szám
Gonadotropin-fel szabató hormon/corazonin (GnRH/CRZ)	<i>Octopus vulgaris</i>	BAB86782.1
Gonadotropin-fel szabató hormon/corazonin (GnRH/CRZ)	<i>Aplysia californica</i>	AHE78444.1
Gonadotropin-fel szabató hormon/corazonin (GnRH/CRZ)	<i>Mizuhopecten yessoensis</i>	BAH47639.1
Gonadotropin-fel szabató hormon/corazonin (GnRH/CRZ)	<i>Crassostrea gigas</i>	ADZ17180.1
Follikulus stimuláló hormon (FSH)	<i>Homo sapiens</i>	AAA52476.1
Follikulus stimuláló hormon (FSH)	<i>Mus musculus</i>	AAB60705.1
Follikulus stimuláló hormon (FSH)	<i>Danio rerio</i>	AAR84282.1
Luteinizáló hormon (LH)	<i>Homo sapiens</i>	CCP37870.1
Luteinizáló hormon (LH)	<i>Mus musculus</i>	AAC52249.1
Luteinizáló hormon (LH)	<i>Danio rerio</i>	AAR84283.1
StAR-related lipid transzfer fehérje 3 (StAR3)	<i>Aplysia californica</i>	XP_005099198.1
StAR-related lipid transzfer fehérje 3 (StAR3)	<i>Mizuhopecten yessoensis</i>	AXY92157.1
StAR-related lipid transzfer fehérje 3 (StAR3)	<i>Crassostrea gigas</i>	XP_011434195.2
StAR-related lipid transzfer fehérje 3 (StAR3)	<i>Rattus norvegicus</i>	NP_001014251.1
3 α -hidroxisztreoid dehidrogenáz (3 α -HSD)	<i>Rattus norvegicus</i>	P23457.1
3 β -hidroxisztreoid dehidrogenáz (3 β -HSD)	<i>Mizuhopecten yessoensis</i>	AXY92162.1
3 β -hidroxisztreoid dehidrogenáz (3 β -HSD)	<i>Crassostrea gigas</i>	XP_011433629.1
3 β -hidroxisztreoid dehidrogenáz (3 β -HSD)	<i>Rattus norvegicus</i>	NP_001007720.3
17 α -hidroxiláz/17,20-liáz (CYP17)	<i>Aplysia californica</i>	XP_012941324.1
17 α -hidroxiláz/17,20-liáz (CYP17)	<i>Mizuhopecten yessoensis</i>	AXY92158.1
17 α -hidroxiláz/17,20-liáz (CYP17)	<i>Crassostrea gigas</i>	NP_001292231.1
17 α -hidroxiláz/17,20-liáz (CYP17)	<i>Rattus norvegicus</i>	NP_036885.1
17 β -hidroxisztreoid dehidrogenáz 8 (17 β -HSD8)	<i>Aplysia californica</i>	XP_005103566.1
17 β -hidroxisztreoid dehidrogenáz 8 (17 β -HSD8)	<i>Mizuhopecten yessoensis</i>	MH040338.1
17 β -hidroxisztreoid dehidrogenáz 8 (17 β -HSD8)	<i>Crassostrea gigas</i>	XP_011430925.1
17 β -hidroxisztreoid dehidrogenáz 8 (17 β -HSD8)	<i>Rattus norvegicus</i>	NP_997694.1
17 β -hidroxisztreoid dehidrogenáz 11 (17 β -HSD11)	<i>Mizuhopecten yessoensis</i>	MH040339.1
17 β -hidroxisztreoid dehidrogenáz 11 (17 β -HSD11)	<i>Rattus norvegicus</i>	NP_001004209.1

17 β -hidroxisztreoid dehidrogenáz 11 (17 β -HSD11)	<i>Aplysia californica</i>	XP_012939218.1
17 β -hidroxisztreoid dehidrogenáz 14 (17 β -HSD14)	<i>Mizuhopecten yessoensis</i>	AXY92161.1
17 β -hidroxisztreoid dehidrogenáz 14 (17 β -HSD14)	<i>Crassostrea gigas</i>	XP_011423932.1
17 β -hidroxisztreoid dehidrogenáz 14 (17 β -HSD14)	<i>Rattus norvegicus</i>	NP_001178040.1
5 α -reduktáz 1	<i>Crassostrea gigas</i>	EKC36980.1
5 α -reduktáz 2	<i>Aplysia californica</i>	XP_005112214.1
5 α -reduktáz 1	<i>Homo sapiens</i>	NP_001038.1
Aromatáz (CYP19A)	<i>Mus musculus</i>	NP_001335102.1
Aromatáz (CYP19A)	<i>Gallus gallus</i>	NP_001351628.1
Aromatáz (CYP19A)	<i>Danio rerio</i>	NP_571229.3
Nukleáris ösztrogén receptor (nER)	<i>Homo sapiens</i>	AAA52399.1
Nukleáris ösztrogén receptor (nER)	<i>Mus musculus</i>	AAA37580.1
Nukleáris ösztrogén receptor (nER)	<i>Gallus gallus</i>	NP_990514.1
Nukleáris ösztrogén receptor (nER)	<i>Danio rerio</i>	NP_694491.1
Nukleáris ösztrogén receptor (nER)	<i>Octopus vulgaris</i>	ABG00286
Nukleáris ösztrogén receptor (nER)	<i>Aplysia californica</i>	NP_001191648
Nukleáris ösztrogén receptor (nER)	<i>Lottia gigantea</i>	XP_009064842
Nukleáris androgén receptor (nAR)	<i>Homo sapiens</i>	P10275.3
Nukleáris androgén receptor (nAR)	<i>Mus musculus</i>	P19091.1
Nukleáris androgén receptor (nAR)	<i>Gallus gallus</i>	NP_001035179.1
Nukleáris androgén receptor (nAR)	<i>Danio rerio</i>	NP_001076592.1
Nukleáris progeszteron receptor (nPR)	<i>Homo sapiens</i>	P06401.4
Nukleáris progeszteron receptor (nPR)	<i>Mus musculus</i>	Q00175.2
Nukleáris progeszteron receptor (nPR)	<i>Gallus gallus</i>	NP_990593.1
Nukleáris progeszteron receptor (nPR)	<i>Danio rerio</i>	NP_001159807.1
Transzkortin/Kortikoszteroid-kötő globulin (CBG)	<i>Mus musculus</i>	NP_031644.1
Szex hormon-kötő globulin (SHBG)/szex szteroid-kötő globulin (SSBG)	<i>Mus musculus</i>	P97497.1

Függelék 3: A gerinces szex szteroid szintézis útvonalban és receptor-mediációban részt vevő gének *L. stagnalis*-ban azonosított homológjainak nukleotid és következtetett fehérje szekvenciái

>*Lymnaea stagnalis*_StAR-related lipid transzfer fehérje 3_mRNS

```
GGATTTTTAAATGTTACTGTGTGTGACAAGATGTTACTAAGGCGTTCATAGCATTGCTATTTGTTGCAGACGACA
TACACAATAGAAAGCATTCTGAGATTATCTCCCGTTTTCTAGTAATCTTGTGGATTCTACTTCTACCACCTTGGG
CACTTGTGAATACTGCTTTATGAATACTGTTGTTGTTGTTAATGATGCTAATTGTTATGCCGTCGCTTGGCTTAC
AATGATGGTCTCCGTGACGGCAACAACACACAGTGCGATTTCAGCACGGACACAATGAACACTGGACGGAGGAACG
CCATTCTGTAGACTTTAGTTTTTAGCCGTTGCACCAACACATCGGGTTCGTGCCTGATATCAACAGTCAGGATCGT
AAGTTCCATTTGAGACAAACGTGTGTTTTGCGTGCCGTCAAGTCCCCCCCCCTTTCCCCTAATAGATCCAGTTAT
ACGGTGGACCGCGTGTGTGCATCCTGGGCTGACGATGATGATGATGGTGGTGGTGATACAAACATGGCGCACATCA
GTAAGATCTACACCATGGGACCCAATCACCACCCGAGCGTCACTTTTGTCCGGCAGATCAGCGATGTAGCCGTGG
TGGAGTCAGACCGGGACAACCAGGCCAAGCAGGCCGCCATCTCATCTACAGCAGCATAACATGGTGACGGCAGCA
GCAGCTCGTTGATACCAGCTCTGCAATCTTCTACTGACTCCTACTCTGGTCCGATGCCCCCTCCGGCCATCAATC
```

CAGCTCTCAACAGCAGCATGGAGAGAGCCGGCTCCCTGGGTGAGGGCCGGATGTCATCCGTGAGGCGGACATTTT
GTCTGCTGGTTTTGTTTATCTTATTCTCATGTTTATCCTGTGGGTGATCTACACTCAGCTGATCGGTGACACGG
GTTTTCAAAGCTTTTGATAAGCAAGTCATCAATTACGATTTCAAGACATCTCTCTTTGATTGCGGTGATGCTGTCA
CGTCTAGATTCACACTTCTGCTGTTGGCCTATGCTTTGTTTGAATCCAGCACTGGTGGATGATTGCTCTCTGCA
CTGCTGCCTCCTGTGCCGTTCTCATCGCCAAGATCTTCAATTTTTGATTTTGAAGGCACCAAGAGCAGCAACAACC
CCCTGAGTTACTGCCTCATCATTATATCCTTTGTGCTGGCTTGGGCCGAGACCTGGTTCCTGGACTTCAAAGTTT
TACCGCAGGAGCAAAAGGCTCTTGAAGACTCCGCCTTACAGCACCCCAACTATGGCTCGATCTATGTCCCA
TCAGGCCAGGTCCATGGTCGGAGATGACATGCAGTCCATTATCACAGAGGACAACAATCAGTTTACTCACCTG
TTGAGTACCAGCGAGTCAGACACAGAGGAGGAACTCATGCACAGGGAGTTGGGGACAGGACCAGCGTGTACC
GCAGTGTTCCTGTCAAAGGTCACAACACGCCAGGCAAGCCAAGCATCTATTAACACACTAGCCTTAGAGGAGA
ATGATTACATCCGGCTGGCCAAGCATTCTGGGAGGTCCTGTGGACATACTACACCAGTCCAGAATCTGACTGGA
AGCTGGAGACGGGGAACAATGAGATGACGGGGTTCGTTACAGCAAAAAGGTCAAGAGTGTGCGAAAAGGTGTTCC
GATTAAGGGGTATTGTAGACATGCCAGCCAAAGAGCTGTATGAGGAGATGACATTCAAACCAGAAGTGCAGTCCG
CATGGAATAAAGCCATCAAAGAATCTAGGGTTTTACAAGTTGTGGATGATCACACGGACGTCCTCTACAACGTTG
CTGCGGAGATCGCCGGCGGTGTGATCACCAGTCGAGACTTTGTGAGTTTACGCACCTGGGGTCAACGGGACGGCG
TTTACATTGGTTCTGGTATGGGCGTCAATCATCTGACATGCCACCGCAGAAAAATTTATGTCAGAGGCACAAATG
GAGCTGGTGGCTGGGTGTATAGACCTTGCCCGGAGACGCTAGTAAACTTTATTTTTCTGGTTCATGAATACAG
ACATCAAGGGCTGGTTTTCTCAGTCCCTGATTGACGCCAACATGGCCAAAGTCCCTCATGGATTCATTCAAGACC
TGCGCGTCCATGTCAAAGTATAACACACTCCTAGCCAGCCCCTTACATGAACCTTAGAGCAAACGTTACTTCAAT
TACCACACGAACCGTCTACGTTTGTATCAGATGCCAACCTGTGGAGACAGAGAGAGAGATAGCGGTATACGTTTG
TATCAGATGCCAACCTGTGGAGAGAGAGAGAGAAAAGCTAGCTGTCCACCCATCAAGACTTTCATAAGGCAACTTG
AGGTTTTATGGTGTAAAGCGTCTTTCAGAGGGGCTGCACTTTCATGGCGATGCCATTTTAGTAACCTGACCGTGTACG
GACAGTGTGTTTTGTTGTGACCAATGTGATGCTGTGTACACAACAGGAGATTCCAGCTCAGATATTTCTGTGA
GCAGAGGACCAACATTTAAAATGTAACAACGGGCTCAATGCGGTGAGAACCATCCTAACAGATGTTTGCGTTAGT
TTGGTACTGCGGTTGCCATACTCACCAGGTGGTTACGTGTATGTGTGTTTTCTTATAGATGTTTGGCTATGGTT
GCCATACTCACCAGTGGTTACGTGTGTGTCGCTGTTTCTTATAGATATTTGTTGGCTACTACGGTTGC
TGTGCTCACCAGTTGATTTGGTCTACAATATAATATTTGTTCAATATTTATGATTCAACTGTGAAGATTTATGAC
TTGATTTTAGGATTACTCTAAGATGCCAATATCAAATGTGCAGTCACAAATGTCTTGGTGGCCTGCAAAGTCAT
GAGCGTTAGATGAGTATTGAAAGGAAATAGAAGGAAATGCTACGGCATTGCTGTGCTCATCTTCATCAGACTGAT
ATCGTACTTAGTTGAAAACAGTAAGTTTACCATGTGCATGACGTGGGGAAAAGGGGG

>Lymnaea stagnalis_StAR-related lipid transzfer fehérje 3_ fehérje

MAHISKIYTMGPNHHSVTFVRQISDVAVVESDRDNQAKQAGHLIYSSIHGDGSSSSSLIPALQSSTDSYSGPMP
PAINPALNSSMERAGSLGQGRMSSVRRTFCLLVLFDLILMFILWVIYTLQIGDTGFKAFDKQVINYDFKTSLFDS
VMLSASRFTLLLLLALFRIQHWMIALCTAASCAVLIKIFIFDFEGTKSSNNPLSYCLIIISFVLAWAETWFL
DFKVLPEQKALERLRHLHSTPNYGSYVPIRPRSMVGDMDQSIITEDNNQFYSPVESPAESDTEEGTHAQVVGDR
TSVYRSVPVSKVTTROASQASINTLLEENDYIRLAKHSWEVLWYTYTSPESDWKLETGNNEMTGTVHSHKVKVSV
GKVFRLRGIVDMPAKELYEEMTFKPELQSAWNKAIKESRVLQVVDHDTDVLYNVAEIAAGGVITSRDFVSLRTWG
QRDGVYIGSGMGNHPPQKNYVRGTNGAGGWVYRCPGDASKTLFFWFMNTDIKGFPPQSLIDANMAKVLMD
FIQDLRVHVKSIH*

>Lymnaea stagnalis_3β-hidroxiszteroid dehidrogenáz_mRNS

AGTGTTATCTTGTGCGGGCCACGAAACGACTCATCGCCTCGGGCTACAACAACACAGTGACACGGCTGCTGAGC
ACACGACTGTGTCGCCAAGCTCCAGGTGTGCTGTGCTGCTGCTGCGAGGTGCCAAGGCCACCAGTGGTTTTGCTT
TACGTGAGTAGGAGCTTACGGGTGACGCCCCACAACGAATCCACCAAGAGGGGGCCGTACGGAGACCCCAAGACC
ACGATGGATTCGGGAAAATCCCCAACCCCTTCGACAATCACTCGGGCGGTAGGCGGGAAAAGAAACCGGTTTC
GGTCAGGTTCTCCTAGAAGGGGGCCTTTTCGGGTGACAAGGGATGTGGTGTATCCATCACAGGTGACCGCCCTTGAA
GTCGAGGGCGCGATAAACGACGAGAATTCGGGAAACGCGTTCGGCTGAGAATTCGCCCGCGGACGCCGGGCATGGT
GACGTCACATCGCTTGAGAATCGGAGTTCGTGACCCGGAATGTGAGTCCGATTGCAGACTTTGAATCTCAGCAG
ACCGGACCCGTGGACGGCGATACGGGAAACCAACCGCAAGATTCGGAAAACCGAACCCGCCACCGGGTGAATC
TCAACAAAATTCAGATATCAACTTAAGACATCGCCACGAATGCAGACACAACCCAGAATCGGACCGGAAGCGAT
ATTCACACACTGACCGAGAATTTAAGGACAAGTTTCGGGGACAACCTTCGGAATGTTTAAATGTCCGTTCTCCGAC
CAAGCCCTTCGGACAGCCGATGAGAAATCCGAACGGGCGCTGATTCGGGGAGGATCAGCTCGAACTCGGGGACG
GTCTCAGAAATTTCCGAAACACCGCCTCACAACACCTGCGGCGCAACAGAAACAAGATAATTCATCGGGAACGAGC
CTGGTGGGGTGGGTGCTCATGAGCTTTAGAAAGCAAGATGGCCGCGGACTCCGCTTCCGACAAAAGTTGGCGC
AATGGAGATGGAGATATCGTAGTCGTGACCGGCGGTAACGGGTTTTTCGGTCAGCATATTTGTCAAGATGCTTCAC
CTGCGGGCCCCCATGTGAGCGAGATCTGGGTTCTGGACATCGCACCATTTGAGCAAAAACCTAGACTATCAACCA
ACCAAGAAGGTCAAATCGATCATCGGCGATGTAACCTGACGCAAGGTTACGGCCTACTTACTGCGGGGGCGACC
TCAGTCATTCACGTGGCCGGAATCATGAGTTGGGGAACGTTTTCCAGACATGGACGGCATGAAAAGGTCAACGTC
AAAGGGACCCTGAACGTGCTGAACGCTTGCCCTCAAGAACAGCGTCAAGCGGCTCGTATACTGCAGCACCGTCCGAC

GTGGCCGTAGGCAGCCAGCCAATCAGAGGAGGGGACGAAACGAACACGCGCGTGCCCGACAAGTTCCTGTTCCCG
GGTTATCCCGACACGAAGTATCACGGGGAGAGACTCATCTGGGGTCCGGGCGCCCGAAGAGAGCCGACGGGGGC
CAACTGCAGACGGCGGTCTCCGCGCCAACGTGTGTTATGGAGAGCTTGACCAATCCTATGTGACCAACGCTTTG
CGGATGGCTGAACAGAACAAGGGAGTGTCTACCAGGTCCGGAGATGGCTCTGCCATGTTCCAGCAGGCTTACGTG
GGCAACACAGCCTGGGCGTTCGTGTGTGCCGATTCCGCGATGAGGGAGAACCAGAGCTCAGCAATGAAATCTTC
TACATCCCAGACAACACCCCATCCAGAACAGCTTCAACTTATAAGGCCCTACCTGGAGGCCCGGGGGTTCAG
CTCTCACCTAGACCCATCAACTTCTCTCTGCTCCACGGAGCGGTGTCACTGGCTGAGGTCTTCGTGAAAGGGCTG
TCTCCGCTCGTAAGGCTGAGTCTGCCTTTCCAGTCATACACCCTCGCTTACATCAACACAGATCTCTACTTTAAT
GGTCCAAGGCCAGGAGGGTGTGAATTTTGGAGCTATTTATTTCCCAACGAGGCCAGGGCGGCATCGATGATT
TACTATAAAACCCTTGAATTTAGACGGAGGCTCTACAACGTGAAGAAATTCAAATTTAACATGTGACTACTTGGTG
GTTTGTAAAGAGATGCCCGCTACTGCTGTCTTTAAGTCGGATTACTTATTGTTAACAGACTGCATGATTTTGGC
TCCTGTCTCAGCATTGATGTTATTTCTTGCATATTTAAAGAAAAAAAAAATTTATTATATGTCGGCCTTTGAATT
TTGTTCTTCCATTTAAAAATCTATAACCATTTTTTATATTAGCCAGTACACCCGGCATTGCTCTGGTCTGTAGT
TGAAAAAACAGCCAAAGGGTTTTTCAGCCTCTCAAAGTACCAATCAAATTTAAAAATGTTCTCTTTT

>*Lymnaea stagnalis* **β -hidroxiszteroid dehidrogenáz_ fehérje**

MDSGKSPPTTSTITRAVGGKETGFGQVLLLEGLSGDKGCDPSQVTALEVEGAINDENSGNASAENSPADAGHGD
VTSLAESEFVTVSPIADSFESQQTGPVDGDTGNQTDSENRTPPPGEISTKFRYQLKTSPTNADTTQNRGSDI
HTLTENLRTSFGDNFNGMFKCPSDQALRTADEKSERALIPGRISSNSGTVSEISETPPHNTCGATEQDNSSGTSL
VGVGRHELSESKMAADSASDKGWRNGDGDIVVVTGGNGFFGQHVIVKMLHLRAPHVSEIWWLDIAPFEQKLDYQPT
KKVKSIIIGDVTARFTAYLLRGATSVIHVAGIMSWGTFPDMGMEKVNKGLTNVNLACLKNSVKRLVYCSTVDV
AVGSQPIRGGDETNRVDPKFLFPGYPDTKYHGERLILGSRPKRADGGQLQTAVLRANVCYGELDQSYVTNALR
MAEQNKGVLYQVGDGSAMFQQAYVGNATAWAFVCDASAMRENPELSNEIFYIPDNTPIQNSFNIRPYLEARGFQL
SPRPINFSLHLGAVSLAEVFKGLSPLVRLSLPFQSYTLAYINTDLYFNKARRVLNFEPIYSPNEARAASMIY
YKTVDLDDGGPTT*

>*Lymnaea stagnalis* **17α -hidroxiláz/ $17,20$ -liáz_mRNS**

ACAGTAAACGGGAAAGGAATAAAAGTTTCAAGTTGTTTACTCGACAGACTGCGAGAGAAACAATCGTTATGAACTTTC
TCGTTACACTTCTGACGGGCGGCATAACACTGTGGCATTGTGGGCTGATATCCTCCGGATGAGCATCATTTGCC
ACGGACAACACGAATCGGTTTTCAGAGTGTCTTAGTTTGGCCCTACTTTCTGAAGTTAGAGTTCCTATCTGAAGAA
ACACCACCCCCCAAGCCCAACCCCAACCCGACGTCACGATGTTTCAAGTACATCATCCCCGGGCTGACACGGC
CGTCTGCTAGTGATCACCGCGTCTTAGGTGCTGTTGTTTACCCTGTTGACCAGGAAGAAGCTCCGGTTGCC
TCCCTCTCCAGAACTTGGCCGTTGCTAGGCAACATGTTGGATTTCAAAGACACAACGCTGACCAAAAAGTCTTT
GGAGTGGCAAGAACAGTACGGGCCCCGTCGTGATGTTTTACTCGGGGCTCCGCCCATGATCCCTTCCCTTAGACCT
CGAGAGCCTTACAGAGGCGTACGTCCAGCGGGGAACGACTTCGCCAACAAGCCCATGATCCCTTCCCTTAGACCT
GATGAGCATGGGGGTCGAGACATCGCATTCGCCCTTACGGTCCGGACCTTAAGTACAGGAGGAAGATATGTTT
TCAGGCGATGCGTCACTACCTGACGGGCGACCAGCACACGAGACGAGTCCACCAGATCGTCGCGGAGGCCGTCGA
GGCGATGCTGCAGGAGCCGGGGCCCTTCAACCCCCACGCCACTTCTCCCTGATCATCTTCAACATCTGCACGC
CGCGTGTTCGGCAGCACCGTGGCCATGGACGACCCCATCTACCAGGATTATCTCAAAGTCTTCGACTCCGAGTC
CGGGAAGGTCACGGGATACTGGGAGGACATTTTCCCATCCTCACCCACTGTCCACGCCGGCGTTCGCAAGGC
CAAGCGAGGACTCGAGGCCTTCGTTGCTTACATCCACCGGCACATTTCTGAACGGAGGTCCACCTTCGACGAGAG
CAAGATGGAGACGCTGGTGGACAACATCCTCCTGACGGAGAGACAGCTGAGAGACGAAGACGCCGGCGGACGCC
CGACATCACTGACGTCCACTTCTCCCTCATCATCTCGGACACGTTTATCGGCGGCACGGACACGACCAGGAACAC
GATGGACTGGATATTTCTGACCCTGGTGGCCGACGCCAAAGTTTCAAGCGGAGGGTCCATGACGAGATTCACCGGT
CGTTGGAAATGGAGTCCCAGGTAAGAACACAGACAAGGTCTGGCCTACACCGAGGCAGTGATACAAGAGGTGAT
GAGGCTCTACCCCGTGGTACCGATGGGGCTGCCTCACGAGACACTTTGCGACACACAGGTTTGTGGGTTCGACGT
GCCAGCAAAGACGGTGGTTCGTACGAACGTGTACGCCATCCATCGCGACCCGCGACACTGGGAGCACCCCGATAG
CTTCATCCCTGAACGCTTCATTGACAAGGACAGCGGAGCCCTCATCGCGCGCCCCAAGAGTTGGATCCCTTTCAA
CATCGGACCTCGAACTGCGTGGGCGAGAACCTGGGACAGACAAGCTGCTGTACACCGTGGTCTGCTTGCTGCA
GAAACTTCAGTTTTCTTAAAGTCTGTCGGCGAAGACGACAGATGGTCCCGCAGGATACTGGTTTACGCTCGT
GCCAAAACCTTACGAAGTTGTCGTCAAACCACGTGATTAGGACAGGCGATGTCACACGAGGAGGAACCTCAAGA
CTGTTACAGAAATGAGTGTAGTAATTTCCCGTTTTCTTTTGTGTTTCTTTGTAAGTGGACACATTTGGCTACACGC
TACAGTTTCAAGTTTATAACAACACTCGCAGTGTCCCTCATGAGTTTTGGTTGTGCCACTCTTGTAAAAAGAGCTA
AAGAATTAATTTTGTACATTTTTTTTTCTCCTAAACTATGCCATTCAAACTTTAACCAGACTCAGCCAAATTTGTG
TGCTCTGGACACGTCCCATGAACGCAGTGTGTCAATGAACTGACAGCCAAAATGGTGTACACAGAACCTATTTGA
CGGGATTTTCAATTTAGTCAATTTTTTAAATATTAATCAATGCAACATTTGTTTATTGTTCTGCTCCTTCGATTTGG
GAGATGGCCAGGGCAATATTCGACTCGAGTAGTAGCCTTGACATGAACTGTATTTTGTGTTAAAGTAAGGTAGAGT
TGCTCAGCTCGGAAGCCTCACTCTCTGTCCTTGCCATTTGATCCACAGTCAAGACTTAGTCAAGACGGCTGGA
GATAGACAAGAATGCAGTAGGTGACCAGGAGTGTCTTGTTCACGTCGAGGAGTGTTCGGAAGTTTCACTGT

GACAATGTCATACCGCCACGGGACTCCATCTCCAGGGTTAGATTTTCAGAGTTCGCTTTGTCTTAGATGAGTTGC
CATCCAAGGTTAACAAGTCTACCCCCCCCCACCCCTGGGTGCTGGTGATGATTTTTTCTTTAGCTGGGGATTG
AACTGAAGACTACTATATTTATAGCTGAGGATTGATTTCAGTTTAGGGTGTACATATTTTGATACACATTCACCTT
CAGTCAGAAATGAGAAATTAATTAATTCGTTTTATTTAATCTGGTGATATAAATATTTAATGTTGACAATGTA
AGTATTTCAAATAAAAAAAAAAAGGAAATAATTTATGTTTAAATTTGCCAGAGTCTTTGCCAGAGTTGTTCTTCA
TCATGCCGACAGGTGCAATATAACGTGTTATTTTCAGTTTATATCTATATTTTCATGAATGTGTTTTAGTCATTTTA
AAGAATGGAGAGTGGTGCATATGAATACATTGTAATAATTATACATTACGGATAACTGCAACCAAGGACAGTG
TTACCAGGGATTTTGTCTATTAATAAAAAAAAAAATATAAAGTTTCATGATATCTTGACTTTTTAGTGTTTTTCTT
CATCGCCAACCTTCTGGTCGATAAAAACTAAACGTTTATTGACTTACAAAATACGAGTGTGTAAGTTCTGTCTT
GGTGAAGCCTGTACCGGCACAGCTGGCTCGGAAAAGGCTACTCTGTCTGGTGGCTCTCTGTCTGGTGGCAGC
CTGCTACGTTGACAGCCTGCAGTGGATATACTGCTATGCTTGGTGGCACCCCTGTTTCATATTTTGAACCTGACTTG
AGCGAACATTGTCAAAGTTGCAATTAACCCCCACGTTGAAGAGCAA

>Lymnaea stagnalis_17 α -hidroxiláz/17,20-liáz_fehérje

MFSDII PRADTAVLLVI TAVLGA VVYRLLTRKRLRPPSPRTWPLLLGNMLDFKDTTLTKKSLEWQEYQYGPVVMFY
SGLRPWVILGSI ESLTEAYVQRGNDFANKPMI PSLDLMSMGGRI AFAPYGPDLKYRRKICFQAMRHYLTGDQHT
RRVHQIVAEAVQAMLQEPGFNPHAHFSLIIFNLIHAACFGSTVAMDDPIYQDYLVKVFDSSESGKVTGYWEDIFPI
LTHCPTPAFRKAKRGL EAFVAYIHRHISERRSTFDESKMETLVDNILLTERQLRDEDAGGRPDI TDVHFSLIISD
TFIGGTDTRNTMDWIFLTLVADAKVQRRVHDEIHRVVGNGVPGKEHRQGLAYTEAVIQEVMRLYPVVPMLPHE
TLCDTQVCGFDVPAKTVVVTNVYAIHRDPRHWEHPDSFIPERFIDKDSGALIARPKSWIPFNI GPRNCVGENLGR
QNLLYTVVCLLQKLQFSLSPVGEDVDMVPQDTWFTLVPKPYEVVVKPRD*

>Lymnaea stagnalis_17 β -hidroxiszteroid dehidrogenáz 8_mRNS

GCTAAGGTTTTAAGTGCAAAGGGGGAGCACAACCATGGCCTCTACTTTACAACCTGGCTGGACGTCTTGCTTTAGTT
ACCGGTGGTGAAGTGAATCGGTAGAGCTGTTTGCCTACTTCTTGCAAGAGAAGGTGCAAAGGTGGCTGTTGTT
GACATAAAAAAGTCCAGTGCACAAGAAACGGTATTATCTCTTTCACAATCATCTCAACATGAATCATTTGAAACT
AATGTGTCTTCATCGTCAGAGGTGACAAAACCTTTTACAACAAGTAGAAGAAAAATTTAAGACTGCTCCTTCAATA
GCCATCCATGCAGCTGGCATCACCAAAGATAACTTTCTTCTGAAGCTGGATGAACAAAAGCTTTGATGATGTCATT
AATGTTAACCTGAAAGGAACATTCCTAATAAATCAAGCTGTAGGTAGAGCCATGCAGAAAAGCTAGGATGAAAAC
GGGTCGATTGTGAATATTTCAAGTATTGTTGGAAAGAATGGCAATGTTGGCCAAGCAAATATGCAGCATCTAAA
GCAGGAGTGATAGGACTCACAAAACCTGCTGCAAAGGAACCTTTCTAGGTACAACATACGAGTGAATGCTGTCTG
CTGGATTATCATCACCCCAATGACTGAGACAGTTCCTGATGATGATGCAGATGATCAAAGCAATGATTCCT
TTACAGAGATTTGGTCAACCAGAAGGTTGGCAGAGGATGTGCCTTCTTCCCTTCCCTCAGCAGTACACATA
ACAGGTCAAGCCATCGAGGTACAGGTGGGCTAAATTTTTAGAAGCAGCTTCAATCGTTAAATTTACCAAGTGC
AAAAATTGATTTTCTTATATATGTTATATTTTAAATATTATAATTATAATGGATAATTTAAAACTAATAAT
TATGGCTGTTTTTCAAGCTCATGGATTTATATAAATATTTCCAGGTCTTACATTTTCCCATAAAGCTTTGTGTGTA
ATTTTCATAATTAATATATATACCATTGCACCTTTTTTCTGAAAAAAAACCTGGATGAGGTTTTTCTCAGTACCG
TACTACTGATTGAGTAACTTTTCTGTACCGGACTGTAAAACGAAAAAAATCATTTTTGCAAGTAGTTTTAAT
GCTGGGTTATTTAAATTTCTTGTGGTTAAAGAGGTGAGTTTAGACTAGTTTTGTAATTATGTTGTATAAAAAAT
TATTTTTTCCAGGTAATTTAAAAATAAAACATATTCATGTGCAAATGAAAATATGAATTTAAGGAGCCATTCTA
TAGCCATATTATATCAGAAATTTTGTATACCAAGAATAGTGATGTTTCATTGTATATAGCTCATATTTATTTATA
ATTCTATACACTCGGTAGTTATTGAAATTTTCATCTGTGCCTGTTGATAATTGTCTTTTTTAAATGCTTTATCACT
GTATACAGCTGCAATATTTTTTGTTTTTTACAAATAAATGTGTTGTTATATTTTCCCTTTGTTTTGCAATTTCTT
GAACTTGAATCAAGATATATTTCTATTTCAAATTTGTAACCTGACTTGCAAGAGAAATGATTTTTAATGTATTTTCA
AAATATTTTAAATCAAGAAAGAAATCATTTAAAAAAAACCTTCTGTGATAATATTTTGTTTTTAAGCTTGTT
GTTTGAAACTTAAATGTTAAAAATGTAAAATTTATCATATAAGTATTTCAAAAAAGTTATAATACAAATTTATAA
CACTACAATTACAATATGATTTGATACTTGTGGCAGAATCAATAGTTATCCTTAATTATGCAAGATGATGTGAA
AAAGATTATTCTAGCCTTACATTTGTAATTATTCAAATTCATAGTCTTATTTTCAATAGGTCTTCAAAAAATTT
GATTTTTAAAGAAATATTTAGTTTGCAAATCTTTGATATTAGAAGCATAGATATAGAATAGTGCCGTTGTGATGC
TATTGCCAAATATTTCTGACTATTTTGAATACTTTTCAATAAAGCTAACCATATAAATCATCAGCTTTTCAA
ATTGCACCTTATCAATTTAGTCTGGTTGCCCTATTTTAAAAACAATTTTTTATTCTTATTATTAAAGTATCTTA
TAAAACATAACACATCACGAATTAAGTGTAAAAAATAAATTTAAAAATTTTTTACATTGTGCAACATTGTCTC
TTTCTCTTATGGACTTTATTTTAAAGCATATTCTAGTTATAACATACACAGGTGATTGATGACAAGTTATATTT
GATTGTTGAAAAAAATTTTTAAGTTTTAAGGCAAATAAATGCAACATATTTTTTATGGCAATGATAACATGT
GTTTGTGTTAGTTTTATTTGTTTTTTTTATGATACAATATTTAAAA

>Lymnaea stagnalis_17 β -hidroxiszteroid dehidrogenáz 8_fehérje

MASTLQLAGRLALVTGGGSGIGRAVCTILAREGAKVA VVDIKKSSAQETVLSLSQSSQHESFETNVSSSS
EVTKLLQVVEEKFKTAPSI AHAAGITKDNFLLKLDEQSFDDVINVNLKGTFLINQAVGRAMQKARIENG

SIVNISSIVGKNGNVGQANYAASKAGVIGLTKTAAKELSRYNIRVNAVLPGFITPMTETVPDHVMQMIK
AMIPLQRFGQPEEVAEVC AFLASPRSSYITGQAI EVTGGLNF*

>Lymnaea stagnalis_17β-hidroxiszteroid dehidrogenáz 9_mRNS

GCTTTTCACTGGCTGT CAGTTCCTTGGTTCTCACTCAGGGCGTAGCGAATTTCCCTTGCCTTTATCCTAACGGAAAT
AAAAGTGAATTTTGAGTTCAGAGTATTTAATGCCTTTTTTCATTGACTTCAATGAAGTCTTCATATTACTATTAG
TATTAGGTTGGATAACAGTCAAGCCTTTATGAAAAATGGTGGCATTGTTTTTTGAATTTCTACTGACTTTTAAGA
ATCTAATAACTGCATTTGTACTGTCTGGATTCACTTCTTTATACCCCCAATTTCTAAATGTGTGAGAGAAGAAA
TCGTGTTAATAACAGGGGCAGGCCATGGCTTGGGCCAAGGCATGTCTGTGGAGTTTGCGAAACATGGTGCAGTCA
CAGTTTTGTGGGATATCAATGCAGTTGGACTTGCTGACACTGTAAGAAAGATTGAAGCTGTTGGTGGCAAATGCT
ACCCCTATGTGTGTGATGTCAGGGACAGAAGGCAAGTCAAGAAAGTGGGAGATAAGGTTGGCACTGAGGTGGGCC
ACGTGACCATCCTCGTCAATAACGCCGGCATCGTCAACGGGAAGAAGCTGCTCGAGCTGGAGGACGAGGAGATAG
AGGACACGTTCAAGCTCAACCTGCTGGCTCAGATATGGACAACAAAACAATTTTTACCCCTATGCTGGAGAACA
ACCATGGCCACATTGTCAACATGGGAAGTTCATGTGGACATATAGGATTAACCCACCTAGTGGATTATAGTGCCT
CCAAGTTTTGGTGTGACAGTTTTCACTCAGACATTAATAATTACGAACTTCATTTTTCTGGCCACGATGGCGTCCACA
CAACTCTGGTCAGTCTTCTACACCAAGACCACAATGTTTAAAGGGTGTCAAATGGCATATCCAGCATTCTTTC
CAGCGCTGGAGGTTGAGGCAACAGTTCAGAGAATTATGCAGGCAATTTCCACCAATCAAAATGAAGTTTGCATCC
CACGTATGGTCTACTTTATGACAGCACTGAAACACATGTTGCCTGTGTGAGCCATGCATGAAATCATAAGATTCT
TCCGTGCTGACAAATTCATGACAACTTTTGCTGGAGGCCAGCGATATTACAACACTTTAAATACAGAAGAGTGAT
CTTGACATCTGATGTTTTGTTTGGCCTGCATACATTCTTACTGTAACGAAGCACTTTGATAATATTTTTCTTAAAA
GGGAAAAAAGAATTACTTTATATACTCATTCAATTAGCCACCCCTTAGTTTTGGCCGGGTGAAGCCGCTGCAA
AGTGTTTAACCCAATCTTAAGACCACCCCATAAAATAATATACCAGTAGAAATAATTGAAGCAATACGGTACTAA
ATTTTTAAAAATATATAGTTTTTATCCAAAACATAATGAACAAAACAATTTTTTATAACAGACACTCACTATG
TTTGTCTGCAGGCATATAAAGAAACCATACGGAACATTTACCTTGGCAATCTACTTTGTTTTGATGTAGGTA
TGATAGCCTATCGCGGAAGTCAAAAATGAGCACAAAATGAGTTTCCATTTTGCACACTGCCAATTTTTCCCTTG
GCTCTGTTGAATCTGCTGATTACATTGCTTTCTATGATAGAATCAATGCACCTGGGGAATATTATACACAAAATCT
CCCATTACCTGATCATAAGCCAACCACCCCACTAACTCCCATGAAATATTTTTCAAAAAAGTCCATTTTTGAATGA
GTATTTATGGTCAGTGCAGAAATTTTAAAGGAATGAGGATGACAAAATCTGTCTCTGTGCATAAATTTGTTGAGCAT
TTACAGTGGTCTTTTATTCAATTTCTATTTCTGTTACCTACTGGATTTGAGTACAGCATTATTTTCAGTTTTATGT
GAACCTTTCAAGTGCAGATTTAACACATTCATTGTTGATGTTGTTTCAATTTAATGTACATGTAACATAAGCTTGTATG
TGTTCAATTTAATGTACATGTAACATAAGTTTGTATGTTGTTTATTTATTATACATGTAACATAAGCTTGTATGTT
TTAGTTTTATTATACATGTAACATAAGTTTTTATATTTTCAATTTAATGTTTCAATGTTTAAATTTGTTTTATGTT
TCATTTAATGTATGTGTAACATAAGTTTTATTTGTTTCCATTTGAATGTATATATCTTTTTATTATGTGAGG
TCACAAAGGTCAAGATGGACTAAATAATCTATTTAATGAACAATGTTTGTATTTATTTATATGTCTGCATGGTGA
TGTGCTATTATTTGCCCTCATATTTTTTATACATCCTGTATTATAATTTGCTGTTTTCCATGTACAGTAGCCAGCA
ATATTTAAATGCATTTCAACCAAGCATTCTTGTACCTGGAAACCAGAATTGAACTAGTCAAAATTGCCAGTAATA
GAATACCAATCTTATAAAGACAAAAAATTCAAATTTTGTGAGTCTTTTGAAGGGAAAAATGGATGAGTTCT
TGCATTTGAAATCAGCAATAAACAAGAGAAAATGTATGAATTATTATTGAATAGCAGCAACATAGAAGATTAA
ATTTACCATTTTGTGTTGTTGACCCGTCCTTAAAAAATTTTACCTCGTTTTTCCACCAACGTCAA
GGCCACTGTTCTGATCACACAATGAAAGATTACAATAAATAAGAATCTCTAAACAAAGATATGTTGATTTAACAA
TTTTAATTTGAGGATATTCATTGGTCTAGCAATTTTTTTTTTAATCTATTGTTCTGATTTTTATAAAATATTTTTCT
TCATGTGCGGTTTATGGGTTTGGGGCCATCCATGAATGACAAAAGGCGTCTATGATAGAGGAGGGTCAAAAAATG
TTGTCGATGTGTGATTAGTATCTTTTCTTTTATGACATATTAATTGAGGATGTTGTTGGGTTG

>Lymnaea stagnalis_17β-hidroxiszteroid dehidrogenáz 9_fehérje

MVALFFEFLLTFKNLITAFVLSWIHFPIPIISKVREEIVLITGAGHGLGQMSVEFAKHGAVTVLWDINAVGLA
DTRKIEI AVGGKCYPYVCDVDRRQVKVGDVGVTEVGHVITILVNNAGIVNGKKLLELEDEEIEDTF SVNLLAQI
WTTKQFLPSMLENNHGHIVNMGSSCGHIGLTHLVDYSASKFVGTGFTQTLNYELHFSGHDGVHTTLVSPSYTKTT
MFKGCQMAPSILPALEVEATVQRIMQAILTNQNEVCIPRMVYFMTALKHMLPV SAMHEIIRFFRADKFMTTFAG
GQRYNTLNTEE*

>Lymnaea stagnalis_17β- hidroxiszteroid dehidrogenáz 11_mRNS

AGAGCCGCACTCAGGTCGTTAAAAAGCCGGGATATGCCACCATTGTCCGTAGTCATAGTATTGAGGCCAGGTCC
TATGGACATCCCCTGAAATGCTGTACTTTGCTCTTCACTTTTTCAGAGCTTACACATGTTACTTCTTAAGTCTATA
GACCACTTAAAGTCTCAAAGTGGTCCATAGGTCTGGGTTACATTATACGACCTTATTATGACCCATCTGCCGTAT
CTCACTTTCTTTGTCTTTTCAAGAAAATTTGAACTAAATATTTCCAATAACTGGGAAAGGTAATTTTTTTTTTTA
AATTGCTGGAACAGCCTAGTTTTCAAACAGTAAACATTGTTACCCTGGTAATTCAGCAACTATGGGAGCCTTA
AAAGTCATTCTTGATCTTTTTCAAATCTTTTTTCTCATCATCTATCATTACATTGTTGCTGCATTTAAAGTCTTA

GTCCCACCAAAGAGGAAGTCAATTGAAGGTGAGATAGCTCTAGTCACAGGTGCTGGCCATGGTATTGGCAGGGAG
CTCGCCTTGGAACTCTCCAAACTGGGAGCCACAGTGGTGTGGGGATGTCAACAAGGAAAAACAATGAAAAA
GCAAAGGACATCAAGGCTGCTGGGGGAAAAGCTTTTGCATATACTTGTGATATCACAAAGCTCTTCAAAAA
AGTGTGGCAAACGAAGTGAGAAGTAATGTAGGGGAGGTCACTATCCTGGTCAACAATGCTGGCATCATCAAT
GGCCCTTTCTTTGAGCTGACGGAGCCGGACATTAGAAGGACGTTTGAAGTGAATACCCTCTCACATTTCT
ATGAAAGAGTTTGTACCTCCATGATTGCCAACAAACATGGCCATGTCCTAAATGTCATCTCCATGGCTGCT
ACAGGTGCCACCATGATGACAGACTACTGTGCATCAAAGCACGGAGCCTATGGCTTATTTGTATCCCTGAG
GAGCTGCGACGAGACGGCCATTCAGAGTACATCAAGATGACGGCCCTGTGTCCAATGTTTGTGATACAGGC
ATCAAGAATCCACACTGACACATGGACGTGTTTTGACTGCCAATGAAACTGCAGTACTGGTATTGATGGGAT
CTGAGAAACTATGAACTCGTCTCTGTACCATCTTGGATTGTTTATTTTGGCAGGATATCTCAGAGCATCTCC
CGAATGCTGGACTGGAATTGGCCAAAAAATCTGGAATCAAGGTGGAGTCCCAGTACAAGAAGCAAAGTTAGACA
ACTCTTGATTACTTTATTTGTGAAATTTGCAAAACTATTTTTGATGAATTTTTTTTTTTTTTAAATTGAACTTTGCT
ACCTATTTCCCTTATTTCTACTCTCAAAGTTACAATTTTTTATATTTTTTTTACTAATTGAAAGTCACTTGCAGCG
TGTATTTTTTAAAGAAATGATTTCCAATTTAAAGAATGTATCAAAAAATAAAAAATTTGTAACAATTTGGATATGC
TAAAATTATATGAGCATTAAATATTTTATATGTAGTAAGCTAAGATTTGTGTTGCATTTACCTATTTATCATAAT
CAGTATTTTCTTGTCTAGTTACTTAACTGTCTAATGACAATCACAAATTTTACTGCTTCAAATTTGATGTGTGTA
TATTATATGCAATTACTTTTTAACAGAAACATTTTGCTTATATTTGCACTCAAATTCATAGCATACATTTGTGA
ACAAGAGGTGTGTTGTTGAAGCTTCAGTGTGTTTATAAAATTTGTAAGCTTTATTGTTATTGTTAACTTATTGTTG
ACTGGTTACTTACAAGTTCAAATTACCAAATATGGTACTATTGTGATGTATAGAAAGTATTAATAGAAGAAATTTG
GTACCAAATTTCTATAAAATATATACATTAAGTAGGTAGTCCAAACCAAACTTTTTTTTAGAATTTAGACTTTT
AAGGACACGTACTTGTAGAACTTTTAAATACAAGAAAATTTGGCTATTTTTTCATTTTGACAAACCATCCATTTTT
GTTGAACCATGACTACTAACTAATAATCCTAGAAGTCCCAAATTTGGTCTACTTGGCTCAAAACTTTACATATCT
AAAGCCCAATTTTTTTCAGGCATCTATAACCAACTATTAAGAAAGTTATAAGCTTAAAAAAGACACAAAAAAGTG
TTTTTCTGACTTTTTTTTATTTTGCGCCATGTTGAAAGCAAATTTCAACTAAATTTATTCATAAAAAATCTTATAA
TTAECTTACAGAGACATATTATACATCAAATTAAGAGTTTTTTAACTGCTCATAATAATATGATAATAAACTG
AATCAAAAATACAATTAATATTGAAAAGGACATTTAGATAAGAACTTACTATATGTAATAATAAGAAATATTTTG
ACATATTTCCATAGGAAAAAAGAAACAATTTAGATATGAAATTTTATAGGAAAGTAATAAACCACCAAAACATTT
TACAAAAAATATTAATAAATGGATCATTGATGAAGTAATCAATTGATGTCAACACATAACTACAGTTTCAAAG
ACTTATGCAATCTTGTCAATTTATTTTTCAATATTTATTATATATACATTAATAACTTATTGCTCATTAGGAA
GGACGGGTGGCATCATTTATTATTACGAAAAACAATTTTTTAAAGATTTGACCATGAATTTCTAGAGATCCAAAT
TCAATTTGTTTGTGCCCTTTTAAATTAAAAAAATAACTAATTTCAATTTTAAATGCTTCTAAAAATAAGTTAGCTGA
TAGTTTTTTATGTCCTACATCTATCTAATAAATCATCCACATCTTAAATAGACTTGCACGGCCCGCCATGTTTCC
TAACTTTTTAATGATAATTCAGAATTTCTAATAATAGAAGTAGAAGACTTTATTCTGTCTTAATTTTTGTGATTT
TCAACAAACGTCTCCCAACATTTTGTCTTAACTGTTTCTTCAAATCAATACTTTCTTTTTTCAAATTTATGTGCAC
GTTTTCTAGCAAATTTGAAACAGCATTGCTTAGAGGTTGCAGACTTTTTGTTAATAAATGACAATGTTTTGTTC
GTTTGACGTGTAAGGATGTTCTATTGAACATGGAACAATTTCTTCTCTATTTAAATCAAATCATAATCTCCAA
AAGCACTCCCGCAATTTAGGTTTATGAGAGGACAGTGTCTAAGAGATTCTGACACATCTTCATCAAAAAAAGAAA
ATGTACCCCATTTTTAAAAATCTGATAGTTGCCAGGTACATACCATCTTGGTTTTCTCTGCCATGGTAGAGATTA
TTTTTAAACAGAAGTTGTTTATCAGTGTGTTATTTTTCAATAAACTTTATCACAGAATGAAGAGCACTGGAGTCA
ATGGACCATTAGTACCAAAACTGATAAAGAGATGTTCTCCAAATTTTACCAGGCTCATCAAGCGAGATTTGG
AAACATTTAGCCATGGACTTTACATAGTAGTGAATTCAGAATAAGTACATTTTTTATTGGTGACAATGTTCCAA
TAAGGTTAAAAACTTTGAACAAAAAAGAGCGCCACAGCTCGAACAAAGGTCAATCCATAAGTCACTTCTACATCC
AGCGCCACACTCTGAATTTTCGAGTTTCTATCAGAACCTGTATGCCGATGAAAAAATAACTTCAATTTGTCTC
TGTGAAATATAATGGCTAAAGCAGCTTTGAACCGTTATTTTTGAAGCAGGGAATAGATGAACATTTACAAAAA
CAAGCAATTTCTGTCTACATCCATTTTTTGGTCCCTCTTGGGCCAAGAATGTCACAGCAGCATCTGATAACTC
TCTTTGTGGCACTTTTCAAGATCTTTTGGTACCGGATTTTTCTTAAAGTGGGCATTTTCACTCTTACCCAACTTC
TACCAGTGCATTATCTTATATCTTTCTCGGCTAATAGCTCTTCTCTTCAATAGCAATGCCCTAATAAAAAAGTG
GATTGCAAAAGAGAAAGTGAATTTTTATGTCAGAACTACAGATCACCATAACTTTCTGAAAGTCTGTGCGCTAAT
TGTGATGTCTAATAAAGTATTGGCATTTTTTTATGTTGGTCTCTAGATGTGCCATCACAGTGCATTTATTTCACTGAAT
TACCAGTATGGCATGCTTTTTCAACTTTTTGAGGCGCTAACAGTTGCTCCAGATTTTTTTTTTTTTTTTCAATGAAGCA
ACTTTGATGGTTGAGTCAAAAAGCTATTACTATTACCACATTAAGATACCCTTAACTTAAATGCAACCAGTGAAGT
ATCCCTTTGAAACCCATGCACAGTAGCATCGCGAACCCCTCTGAAACATAGGAGCCAGAATGATCAATTCATTGA
TCGTGGGCCCTAAAAATAAAAAAAGAAGAAGATTTTTATCACCAGTATGAAAGCAAGGGAATATTTATTGCAC
CGGTGATGTTTCAATAGCACTAAGTCATGCCTCTCAAGACGGATTACAAAAGCATTGGACTGTGATGAAGCTACTG
AGTAGATTAATGAGAAATACAAATTTTTGTAATTAACAACAGATGTCAAGCTTTAATTTATGCTTAGACAAAA
TCCAAATTCAAAAGGTTTTCAGCACATTTCAATGCAACAAAATACATTAACATAATTTAAATTTAAATTTTTGCA
TAATATATGTATATCATACTAACAAAAAACAATTAAGAAAGATCAGGAGTTAAGCAATATAAGATAAATTTAT
CTTAAATCTCAAGACTCAAATGTGAAAACATGATTTTTAGAAACATGGCAAAATGGCTGAATTTCTGATAAAATTT
AGTTCATTTTTTCTTTCCCAATCATAATAATTTGTTATGTTATACCTATAAAAAAAGGTACATTTTATTTGTGC
TTTTTACTAAATAGTAGCAGTTTATACAAATTTCTTGCATCAGGCCCTAAGCATGGTCAAAGGGACCAATTA

ATGATTTACCATTTGTATTTAAACAATGTATTCTAGGGGAAATACATTTTCAATCCAAGCATTTTCCATATGTGT
AAATTTACTATGATAAAATTGCAGCGACTGTGAATGTGCCAATCCAATATTTCTGGAGTTACAGGCCATTTGTG
TAAAAATTGGATTATTGCATGTTACAGGACAAATAGATAGATATTCAAAAGAGTAACCTGATCTCTTCATCCCTG
TATATGTTTCGATCATAACACATGCTTTGAAAACCCCTTATTACTAGCTTATTTGTTTTGCTACTGCAGGCCCAAA
TTATTATTACTTATAAATTTAAAAAAGAACTGTGATAGATCAACATTGAGTGAGGAGAAAAAGAGCATGA
TGAAATAAGCATCAGTTATGACTTGGTAATTGGTTTATATTATAGTTCACTAACTATGCAGACACAAGTATGCAC
CCATAATTTTCTTGTATCAACTGTTATCTGAATGAGACTATAGACTAGATAACTCTTCAGTGTATCAGTTCA
AAATATGTAACATGTTGAATAAGTGATAAAAAAATATTTGTATTACATTTTACTATATAAATTTAAAAATTA
ATACTTTTAAATTTATATTTATCATAGAAATTTATGTGATTATTATATACTACTATAAGACTGCCAATATATTT
TATTCTTTTAAATTTATTTGAGTAAATCTTGCTCTCACTCTCATTTACCTATATATTTAATTTACCAGCCTT
CTGGTCGTGGCCATAGCTGTTAAAAATAGTCTTTGCCCTGTGAGAAATGTATAAATTTATCAGGTGTACCTGCCAT
TGACAATGCCTGGACAAAATTGGAATTTGTAAGAAATGGCTACAAAACAAAATGATAAATTCATTTCAAAAATTT
AACAAAATTGTTTCTTACAAGGGTGTATTTTTTTTATGGTAGAGTGTTTTTTTTTTAATGGCAAGTTAACCATACC
GAAATCTTGTAGATTATAATATATGCATTACTGAAATGTATTTTCATGGCTCAAATAAATCGCTACTATTTTTAA
GA

>Lymnaea stagnalis_17β-hidroxiszteroid dehidrogenáz 11_fehérje

MGALKVILDLFQIFFLIIYHYIVAFAFKVLVPPKRKSI EGEI ALVTGAGHGIGRELAL ELSKLGATVVLWDVNKEN
NEKTAKDIKAAGGKAFAYTCDITSSSKIASVANEVRSNVGEVITILVNNAGI INCGPFFELTEPDIRRTFEVNTLS
HFWMKKEFVTSMIANKHGHVNLNVI SMAAFTGATMMTDY CASKHGAYGLFVSLRDELRRDGHSEYIKMTALCPMFV
DTGLIKNFTLTHGRVLTANETALAGIDGMLRNYELVSVPSWIVYFARISQSILPRNAGLELAKKSGIKVESQYKK
QS*

>Lymnaea stagnalis_17β-hidroxiszteroid dehidrogenáz 14_mRNS

TCAGTTAGTCTGATCATGTGATTTTTAAAATCCTGCAAAATGGCGACATTATTGCGTTATAAAGATAGAGTTGTTG
TAGTTACAGGTGGTGCATCTGGGATCGGTCTTGGAGCAGTTAAAACCTTTGTTGAAAATGGTTCAAAAAGTTGTAT
TCTGTGATATAACAAGATAATGAAGGGAAGTCTATTGAATCCTCTCTGAATGCACAAGGTCCTGGTGAATGTA
TTGTTGTATGTGATGTCAGCAAAGAAGACCAAGTGAACATATGATTAGCACAGCAGTGGAACTTATGGAAAAC
TTGATTGTCTGGTCAACAATGCTGGAGCACATCCACCTCACAAACCTATTGATGATTTCTCATCAGAAGAGTTCA
GACGACTATATGAAATTAATGTACTTGGTTTTCTTAAATGCCTCAAAAATTTGCCTTGCCACACTTAAGGAAGACTC
AGGGTAATATCATTAAATAACGGCAGTCTAGTTGCATACATTGGACAACCTGGGGCTGTTACCTATGCAGTACAA
AGGGTGCAATTATATCCATGACTAGAGCTCTAGCAATAGATGAAGCCAAGTACAATGTCAGAGTGAATTCATTC
CACCTGGAAATATTTTTACACCACTATGGGAAAAGGCAGCGCTTGACTCACCTGACTATGACAAGTGCATTCAAA
CAGGCAAAGATGCTCAGCTCCTTGGAAAGATTCCGAACTGTTGAAGAGTGTGGTTTTAGTGTGTTTTGTTTCTGGCAG
CAGATGCAACTTTCTGCCTGGTATTAACATCAATGTAAGTGGTGGTGCTGAGCTGGATTATGGCTACAAAAACA
AACTTGTAGTCTTAGCTTCATCAGAGTAGCCACATCAGCATTACTGATGAGGCTGTGTTCTCATAAGTTAAGATT
TTTTTCTATTCTTTGTTCAAAATTTCAATGTTTGAACACTGCCTGGATATCTAAAGCATAATTTTTTATTAATCA
GAACCTTAAACAAAATGTGCCATAATAATTTAATTGACAAAACCAAGATTGAGGTGTGTAGGATGAACATTTTT
TTATATTTATATTTTTCTACATTTATGGTAATCATGGGATTTGTTTTATTTTCCCCATCAATAATGATTTGATC
CTAACCCATAATCCAATGATATTAATATACATTTGATTTTTTTGTGCCCCATAAAAATCTACAATTTGTTTGT
GTGTATTAGTGTAAATGTAACAAAAGTTTTATTTTTAAAGAAATCCGTTTACAGAAGCCTAATATACCAGTATTC
AAAATGATCATGATTCCAAACCTATTCTGAAAAGGATCCCTACAGTTGAAGAGGTTCAATGAATATTCATCCTT
CTCTTTTCATGACCTAAAATTTGTTTACATTATTTGATGTAGAAAAGAAGCAGTTAATTAAGAATTCAACTTTCTCA
AACTTTTCAAGAATGCCAGATTTTTTTTTAACATTAGGTTATAAATCACATTCTAGAATGCATAAAAACACAGTGT
AAAATTGTTAAAACAAGACGTCTTTATTTTGTATCTACCCTTTACACAGATTTTTTAAAGTAATTTTTTATAAAC
TTGCCATAAATCTTTCAATTATGCCATAATAACCTTTACACAGACTTTATTGTTATGTACAGTATATACAAGTTAA
ATATATTTGTGCTTTTCTTGTATAGCATTACTTCTAGCTATGAAAACCTATTCAGGGTATTGTTTGAAGTATA
CCGGTGTAAAAGCATTTTTTCAACATCATGGAAATGTTTACTTTTGTAGTTTTTAAAGCCTAGCTCAAATTAATTT
TATGTTTGTCTGTAATAAAAAAAGTATTTGCTCTTAGCTACACTATTTACCAAGAAAATGTCATTACTCTAGTCA
TAATTTATGTGAACATTTTAAACAAACTTTTTTTTTATTTGACATGTACAACCTTTCAGCTATCCCTACTATTCCTT
GTTATAGGGTATCTCATTATATGTATTATGGATATATCACTTTCTTCCCCATAGAAAATTCGTATTAGCGATGAG
ACAATTATACATATCTATATATAAATATTATCAACAAAATGAGAATTTTGTCCACAATGTAATTTGCAGTTTAA
AAGTAAAGAGTTAATACTCATGTATGAGCCACAGCCTTAATAATATTGAACTTAATTAATAGTACTAAATCAT
TTTTCAAACACCAGGTGAACCTTGTATCAGCCCTGCTGTACAAGAATTGCATGTAGGTTGGTGGTCAATGTGATAAAA
ATATTAATCCAAAGTCACTCTGGTTTCTAAATTTATTTTCTAATAAAGTTCAAAAAGCAATCTGATGGGATATG
TTAGGTAATTTGTTTTAAAAAATAACAACATTTTTTATGTGTAATTTTTAAAAATTAATAGAAATTTGAAAAT
TTAAAAACATATTTAAGCACTCAACAGAATTTTTTATCTTTCCCTTAAATTTAATAGGCAAAATGTATGATGAACCTTA
TGCGTAATGCACAAAAGCTTCAATAATTTTTTAAAAATAAATTTATTTCTTCTGTGATCTTTTCTTTCTTTT
AACATCTTAAAATTTTTTATATGAGGGGGCATTAAAATAAATTAGGCATATAAATTTGATGCAGCTTTTTTGTGCTA

TTTTATATAGTGATGTGCAAGGAGTTTACGATAACAAACATATTTCAACTTTTACAAGTTTGTCTTTTTTAAAAAAA
CTTTCTATATGCAAACCTTAAAACATTTTTGATATCTACCATATTTTACGGACTATAAGACACACTTTTTCTTCGGA
AAAATTGCCTCCAAAATTCAGGTGCGTCTTATACTGGAAATTAATATAAAAAATAGTATAAAAAATAAATTTTTTT
TAATTGCTTAAAAATTAAGGTGCATCCTATAGTCTGTAGCATCTTATGGTCAGTAAAAATACGATAATAATTTAAT
GAACAAAAAACATCAACTGAATATTACAAGAAAAATTTAAATCATTTGATTTTTTAATTTTACAAAACAACA
ATGACCTTATAAATGTGGTTTTAATAAATTAAGAGGTTTGGTCCAATCCATAGGACACAACAAAAGGCATAGGAA
ACAAATTGACCACCATGGACACCACATCTTGTGTCTTAATACAGTGACCAAAACATGAGAAACCTACTTTGTT
GTTGTCCACTTGAGATAAAACGTGAGATCATGTTTCTTTATCTTCAGAAACCTCCTCATCAGGGGCACACTGAAA
AAGAAAAATAATCGTTATGTTATTGTTTTGGAGATAACCCCTCACTATCGCTACCGTGTTTTGATAAAAAGTTTCA
ATCCACAAAATACTTACAAAATACTCCACAAAGCAAATCTGATTCTCCTCATCCTCAACATGTACTGTAGAGAC
AGAAACCTCGGCTGTGAGTTCTTATAGAAATCCTGGTGGACAGTGTCAAGGCTTTCAGTGTGGCTTTAGGAGA
CTGATTTTTATATCTGGGGGAAAGTAACCAATTGTGAAAAGATTTGTTCAAAGATTTTACAAAAGAAGTATTTTTT
GTTTTTAATAATTTGACAGCTTTTGAAGGCATATCTTTATGGAAAAAAAATGTAAAAACTTTAAATTTAAGTTAT
TAGATGAGTAGAAGAGACTTAAACAGACATGAAGCAAAAATAAAGCTTTTTTTTTTCTTCCGTTTACTAAAATGTAT
AATGATAATATGATCTTTTTTAAATTCACAGAGGTTGATTAACATTTGCCATTTCATCCATTGCAATCAACCAAC
CACTAATAATAATATTTGCAACCATGAAAATAGAAAAACTATTATCACAGTGAACTCTTCTGAATTACCAGAAC
ATTTTTGTTTTCTTGCTTACCGATTTGTTTGTGTCTGTGTGCACTGGAATGACTCTACCATTCTGAATCTTTGG
GGAATGACGACTGCAAAGAAAACAAAATTATGAAATTTAAAAGTATCTGTAACATAAACAGAGTGTTTTTTTTAAA
GTATTTTTTAAAAAGTATTTATTATTTCAAGATGGACATGGATCAGTTTAGGGTCCACGCAAGGAGATCAAAGAA
AGTTTCATGAACACGGTCCAAGTGAAGGATGTGGTGTGGGGTGGCCAGAGCCCTTCGTGGGCTGCAGAGCCCAT
GATGAATTAAGTTTAAAGTCAACATCAAGACTGCTGTTTTTAAAAAATGTAATGCTAAAAATCATAATTTAAAA
TTATATTTTTTTAATACCATTGTTACCGGCATGTAAGACAACCTTAACCCATAAAAAATCTGTTCAAAGTCCGGGG
CTGTCTTATGAGCTGGTATACAGCATGCTGAAACTTCAGGGACATGTGCCCTCTAGTTCAGTTTGGTTGATAGC
TTAGAAAACAAACAGCATGGCAGCTCCCAATGGGTTTATTGGTTTATCCTTCTTTAGCTTTAGAGTGAATTAG
AAAAAGTTTAAATCCACTTGCCTGTTTTATGTTTACATGTTTGTATGACATGTTAGATGACTAACAGCCTTATGTT
TATAAGTGAAGTTATCATAAGCATTTGAATTTAAATTTACCATATTGAAATCAAA

>*Lymnaea stagnalis*_17 β -hidroxiszteroid dehidrogenáz 14_fehérje

MATLLRYKDRVVVVVVGASGIGLGAVKTFVENGSKVVFCDIQDNEGKSI ESSLNAQGPGECKFVVCVSKEDQVK
HMI STAVETYGKLDCLVNNAGAHPPHKPIDDFSSEEFRRLYE INVLGFFNASKFALPHLRKTQGN I INNGSLVAY
IGQP GAVTYAATKGAI I SMTRALAI DEAKYNVRVNSFSPGNI FTPLWEKAALDSPDYDKCIQTGKDAQLLGRFGT
VEECGLVCLFLAADATFCTGININVS GGAELDYGYKNKLVVLASSE*

>*Lymnaea stagnalis*_5 α -reduktáz 1_mRNS

GTCTACGATACGGGAGTTAACGGGAGGTCATTAACCTTATTGTCCGCTTCTGTGGCAACACGTTAGCTAAAACCATG
GCTGTGAGTTTTACAGACAAAATATTGTCTGTTTTATTTGAAAATGAGAAAACAACTTTGTGTTATTTGTGCGTAT
TTGTTCTTCTTTTGGGGCGCATCGGTTTTAATTTCACTACTGTAACAGCACCGTATGGTCGTTATTTCTCGA
AGTGGTTGGGTTTTTTCTGTCGCGGAAAATTTGCCTGGTTAGTGCAAGAATTACCATCATTGTTTGTCTCTTA
CTGTTTTTATTTTACTCTGATTCACCAAAATCAACGAATTTCTGAAATATATTTGCAGTGAATTTCTTCTCT
CATTATTTTCAAAGAACCTTCATTTTTCCCTTCTTGAATAAGAGGTTGAAAACCCACACCATGATTCCTTTCTG
ATGGCACTGATCTTTTGTATACTAAATGGCTATATGCAAGGGCTTATATACTGAAGTTTGCAGATCTGCAGTGG
ACACCCGGCACTTCACTAAGGATTATAGCAGGTACAGCCATCTTCTTACAGGCTTGTGATCAACCTTCATTCG
GATCATATTCTAAGAAACCTCAGAAAAGTCTGGAGAAACTGGATATAAAAATTCATATGGTGGTATGTTCAACTAC
ATTTCTGGGGCAACTTCTTTGGTGAGATGGTGAATGGTTTGGCTTTGCTATCCTCAACTGGACACTACCAACA
ATGGCATTTCAGTTTTACCCTGTGTAATGTTGGACCCCGAGCATTCCAGCACCACAGGTGGTACAAGGAAAAG
TTTGATGACTACCCTAGAAATAGAAAAGCCCTGATTCATTTGTGCTGTAATGAGCGTCAGTTGTCTCCCCTCCC
AATAGAAAGGAAAGACATGGAATGATCAAATGAATGGATGTCAAAGGTCAACCAACCTGCTCCACTCTCCACACC
TTAGTTTTTATTTAATTTGAGCAACTTGAATGGTGTAGTTTACAAATGAAAGATTGCTGTTTCAACATCTGATCT
ATCATGCCAGTCGACAGCTGTTTGCAGCGCTGGTCTATCACATCAATTGACATCTGTTTCAACGGCTAGTCTGTC
ATATCAATGGACTGCTGATTTTACAGCCTGAGTAATTATGTCAACTTGTGGATAGCCTCATCTCAAGCAACTAA
AGATTTAGCTAGAAATTTATTTTATACATTTTTTACTGAGCTGCATTTATTTATAAATATTAGTGTACAAATGAG
GACAATTTCTTTTGTCTTCTGCAAATGTGAAATGCACAAAGCTTTAAGTAGTAAGTCTAGTTTCCAGCCATCTTT
TAGAGAATGGGGCTGGAAATAAAAACTCGACTCTAATTAATGAAAAAAAATCATACAACTTGCATGATGGTCA
CAAATTTCACTAATCCATTCCAAGCACTCATCTCCCTCATACTCCATGATGGCATGGTCTGTTAACAGCTTCC
ACAGAGGTGAGAGCTAAGACATTTATAACTGAAACAATGTCTGATTTCTGCCATTGTTAGGTACTTTGTACTAA
CTAAAAAAGAAAAGACTGGGATGGGTTGTATGAGAAAACAATATTTTATGGCTGATTTAATTAAGTGAATGATTA
TATTGTTGTTAATAACTCTATACACTTAATTTGCTTAAGTTAATGTTAAGCAATTTTGAATTTGAATGTTTGTG
ACAGAATACAATTTTTATACACTTAAAAGGGGCATAATCCACTCACATTTTAAAAATTTGATTTGGCATAAATTA
TTGTTGATTTTATTTCTGCATAATGTAATTTCTATACTTAAAGTAAACATGATGATTTCTATACTTAACTTGAAG

TAGACATGATGTGTTTCTATACTTGAAGTAGACATGATGTGTTCAATACTAAATTGTGGTTTAAAAAGATAATAA
TAATAATTTATTTGTAAAACAAAATTTTTAATTTAAAAAAGGAACCTAATAAAACTTGATCAAAATGAATGTTAT
AAAAGTGTTCACACTTTCTGACTATTCATCATTTTTATAATTCGGTGATTAATTCATAGGAGATATCAAAATTTA
AAGGTATTTGTGAAAACAAAACCTTTTTAAATTTTGTTCATAAATTGTAAAAAAGTTGTTTTTTAAAAATGT
ATTTGAAACATCCAATCTATGAATTAGAGATTAGAAAAGATTTGAGGATTTAGAAAAACTTTAATGCAGTAAAAAA
AATCTTGGTACACTGTATATTAATTTCTATAGCTCACAATTTGAATCCACTTGCTCTTGTATTTAAAAATAAATAT
TTTCTCCTTGACCTTTTGACATTTATATCCATCAGAAGCATTAAATTTGATCTCCAGACAATGTTTCATTTTTTT
GACTTCCTTGTGAACCTTAGTTTAGCATTAAACTACTGAACAACGTTTACAGCTTATCCAAACATTTGAAACAGA
ATTCACCATTTTTTTTTAAAAACACTTAGTAGAGATGGTTAGAAAATACATTTACAAAATCTAGCTTCTCCTTCATTA
CAAATTAATTTTTTAAATCAAGCACAGAAGGGAAGAACTTTTTAAAAATGATGCAATTTCTACTTTTTATTTTTTA
TGATATTCATGTCGTTTAAACATATCGCTGCTTCCAGAGTTTGTATATTATGTTTAGTTTCTTTTAAATCTCC
ACACAAAGTGATATACCGGCTCATTGAACTTTGATGTCAACATTTCTGTGCTTGGAGTATCCTGATTTTACAC
ATTATTCTAACAAATTTGTAATGTTTATTTCTTTTCTATGACTGAGTTTTAGAGAAGCTTTCACACATTTTTGCACA
AATTAGCAAATCATTCTGTTTTTTAATTTGTTTCTATGTTTTTGAACCTATCCATGTCTTAAATTTTATTATTTTT
TTTCTGTTGTCTAAAATGTTAATTTTCTGCAATGATATTATCTGCTGTATAGACTTGGCTCTAGCTGACTTTGTT
TGTACTTGCATGGTTTACTATTGATTGCCATAGTTTTGTTACCGAACTAACATTATCTGTAAGCTTAGAGACTG
AACATTGTGTTTTTCTTTCTACCAAATTTGCATTTATCATAATTATTAATTAAGATGGAAAAAAATTTATTTAAA
AGGAGGGAATATATGTTTATGGACATTTTTGGGTGGATTCAATTTTTTTTTTAAATGCAAATTTCAATTAAAAAAA
AAATAAACTGCTACTGAAATATTATAAATCATCTTTTAAACAGACTGTAAGAATAACCGTGGCATGTAACAGTTT
TCATTTTCAATTTAAAATTTATTTTCTCCACTTCTCCAACACCCACAATAGTACCTCAATATAAAAAACTTAGT
TTTTAAAAGAACTTATGATATTTTGGAGTATAAAAAATAAGGATAACTGTTTACTTTGCTATTTGTCAATTTGGAA
AAAAATATGTTTATTTTGTGATATGTTAACTTTTTACTGCTAAAATGTAATTTAAAAATAATTTTGTGATTAAA
ATCTATGACTTTTGTTTAACCCTTTATTTCTGTTTATTTACTGTTCAATTTAAAAATATTTTCAACATTTATCAG
AACCTTAACACAATTTTTATTTGCTTGTAAAAACTTGAGAAAAGGAAATGTGCATCAATGTTATAAACTGTAA
AAAGATTGATTGCATTCAGTATTTGCATCCAATATTAGCTGGTTCAATCAATAACTTACCCCAAGAGTCATTG
GGGCTAGACATGGCAGTGTTCAGTGAATCAGATATTGCTGGCTTTCAGTTCATCCGAAGCTTATCTTTTTCATT
GAGTTTTAAAATTTTTCTTGTGATATTCAGTATTGCTGCATTAATTTTTTTGAATTACTTTTGTGT

>Lymnaea stagnalis_5α-reduktáz 1_fehérje

MAVSFTDKILSVLFENEKQTLCYLSYLFVFWGASVLIISLLTVPYGRYSRSGWGFVVPKFAWLQELPSFVCP
LLVLFYSDSPKSNFLNIFALSFLHLYFQRTFIFPFLIRGGKPTPLIPFLMALIFCILNGYMQGAYILKFDLQ
WTPGTSRLRIAGTAIFFTGLLINLHSDHILRNLKSGETGYKIPYGGMFNYISGANFFGEMVEWVGFALINWTLF
TMAFSVFTLCNVGPRAFQHRWYKEKFDYPRNRKALIPFVL*

>Lymnaea stagnalis_5α-reductase 2_mRNS

GTTAACATGGCGAAACTATAATTTGCTACATGAAGTTATTACAATCTAGTATCCCTTTTCGCACTTTCCCTCTACT
GACTCCCTAATGTGGATAACATTACTTTTCGAGTATCGTTATCGGATGCTTTTCAAAACTTGTTAAAAAGGGTTGA
ATTTTATTTTTAGTTATTAATATTTATTTTTAATCACATCTTCATAATGCTTTTTCGAGCCTATTCCTTATACCTT
TTATGAGCCTGGAACAACATACTTTTGGGTCCACTTTGGACTTATTATCCTAGGATTCATTGTTGCCTTGGCTAC
ATTAATTGGACAGTGGATAAATCCAGCCCTTATGGAACAATGAGAGAAATGATGTTAATTGGGGTCCAATGAT
TCCACAGCGGCTTGGACACATATTATCAGATGCTGTGCCCGGTGTTTTGATGTTTTCTTTGGTATTTTTTTTATA
CAGCCCAAATGAGAGTAAAAAGGGCCAATCAACTATGTTTTTTTTTGGCTTGTCTTATTACTACTATACACAG
GGGTATTATACACCCACTGACCATGAGATACAAGAATCCTAAAAGTTGCTTTAGGAATAACACTTGGTGGTGGCAT
TCCAAATGTTTTATATCACTGGCTGAATGCAAACCACATTGGTGTGGCCGGGTACCACAGCACGTATTATTATGA
TCCCAGGTTTTATTTAGGTCTACTGGTCTTTGTGCTTGGTTTTCAATTATCAACAGACAGGCAGATTGGAAGCTGCG
TTCCCTGAGACACATTAAGGTACAGCACCACACATTTTATTAGGGTGATGGCAGCAAGGGCTACTACATACC
CTATGGGGACTGTATGAATTCATCTCATGCCAACTACTTTGGAGAATTTATTAGTGGACAGGATGGACTCT
AGTACTTGGTCATTAGCAGGATTTGTCTGGACCTGCTTTTCTGCTGCCACATTTTTTGTAGATCTCGCCATAA
CCATCAATGGTACAAGATCAGTTTCAGGACTATCCCCAAACAGAAGAGCTCTGATACCGTTCATATCTAAAA
TGTATTTTAAATCAATGATGCTCAGGGTATTTAAACAAAATACATGTTTCAATTTTCTGTTCCAGGAAGGCTGTG
GAATGGTTTTATTAATGATTAATGATGATTTTCACTGTTATGTAAGTAAGGGTTGTAACCTCACTAAATATCA
TGATTCCAAATGTTTAAATGTTATTGCGCAGCTAAATTTGTTAAACTTAATAAGGAAAATTTTTTTAATTTCTTT
TTCTCTGACATATTTTTCCCTTGCTCAACTTTAAAAAAAATTAATTTTTAAAATTTATCTGTACATTAATTTATTTG
TTATTGATTCAGTTTCTGATGTCTTGTGTTGCGCATACTAAAAGTCAATTATAACTTGTATTTCTATGCTAAAAAT
ACATCTTATTTAAATTAATCAATGTAAGTTTAAAATCATATTGTTATAAACTTTTATAGATATTAATAAATTC
AAAATACCCAGAGCTGTGTTGTACGTATAACAATACTGTATTACATACATCCGTGCTAACTTTATTTATTTAGCCC
TACTTAAAATATTGGTAATGTTAAAGCTCCGACATGTCAGCTGTGGACCATTTTGTCTAGAAGTGAATATACTC
ATTGATTTATTTTATGCTTTTGTGCCTCAAATGTTTGAAGAGATTTACTGTTTTTTGTAACCTTACTTTTACTAT
GTTTATTTCTGTGAGACATCGAATTATTAACATAAAAAATGTATCTTATTTATCTTAA

>Lymnaea stagnalis_5α-reduktáz 2_fehérje

MLFEPIPYTFYEPGTTYFVWFHGLIILGFIVALATLIGQWINPAPYGKHERNDVNWGPMIPQRLGHILSDAVPGV
LMFSLVFFLYSPNESEKGPINIVFFGLFLIHTIHRGIIHPLTMRYKNPKVALGITLGGGIPNVLYHWNLANHIGV
AGYHSTYYYDPRFILGLLVFVLGFIINRQADWKLRLSLRHIIKGHSTTHFIQGDGSKGYYI PYGGLYEFISCPNYFG
ELIQWTGWTLATWSLAGFVWTCFSAATFFARSRHNHQWYKQDQDYPPNRRALIPFIF*

>Lymnaea stagnalis_nER (NR3D) receptor_mRNS

ATGGTTTCTCCAAGCTCCTGCATGCAAGTCCTCCCTTTGGGAGGCTCAGGGGAGGTTGGTGCGGCACACCTCCAG
GCAGCCACCTCTACCACACCAGAGTCAGGATCTGGTCCCCTTCTCATAACTTCCTTATGGAAGTGCATGGTGGA
ATGGGGACAAGTCCCTCCCTCACATATGAAACAAGAAATAGGAGGGGCGATTTCCTGGCAGCAGCATCCAAGCTAAA
TTGTGCCAGGTTTGCAATGACAATGCTTCAGGCTTTCACATATGGTGTGTGGTCTTGTGAAGGATGTAAAGCTTTC
TTCAAGAGGAGTATACAAGGACCTGTTGATTATATATGTCCAGCCACCAATACATGTACTATAGATAAACATAGG
CGTAAAAGCTGCCAAGCTTGTAGATTACGGCGGTGCTATGAAGTTGGCATGAATAAAGGAAGTCAACGGAAAAGAA
AGAAAAAGTAGTGCTAACACAAGTGGCCTGAAGGGCAAAAGATGTGGGCAGATTCTTCAGATTCTGCTATTAAT
TCTACTAACAAATGGAGCATCTTCATCAAAAGTATATTTTTCTTTTTCTCAGGCAGCCAAAAGGTCGAGAAGTGCA
TCCATCTTAGAAGCTCTTCAAAAAGCTGATCTTCTGTTCTAGAGAGCTACCACAATCATAGTTTACCAGCAACT
CGTGTTTCATCTTCTTAATACATTGATTAAATTAGCGGACAGAGAACTTGTGTATCTCATCAATTGGGCCAAAACAT
GTACCAGGTTATACATGTCTGACCTTGAGTGACCAGGTCCACCTTATAGAGTGCTGCTGGATGGAGTTGCTCTTA
CTCAATTGTGCTTTCAGATCCATGGAGCATGAAGGACGAATACTTGTTTTTGCTCCTGACTTCCATCTAGAAAAGG
CATCAGTGGGGTCTCACAGGGATGGGGGACGTGTTAGAGCAGGTGGCTGCTGTGTGTCAGAGCAAAATGGTTTTGTAC
AACCTGAACAAGGAAGAGCTGCTGCTTCTGCAGGCTACAGTATTAGTAAATGCAGAAGTACGGCGATTGGACAGC
TTTGTGAAAATACAGGAGATGCGTCAAGTTATTCTCGATGTATTTATGGAAGTGGCTGGGCGTCATCAGGGTTAT
GGTAGCTGGCGACACGCACCGTCCATCCTTCTTTTTGCTGACACATATTCGCCAAGCTGGGGAAAAGAGGCATTTCA
TACTTCCAGCGGCTAAAGATGGAGGGTTGTGTGACCTTCTGTGACCTCCTTACAGAGATGCTTGATGCACATAAT
TCATCTGGTGAAGGCGGAGGCTGCAACAACAGCAGCACCACCACCAGCAGTCTCAACAGCAACAACAACAGCAT
CATCCAACCTCAACACCACCAGCACCAACAGCATCCAATGGCACCAGAATGA

>Lymnaea stagnalis_nER (NR3D) receptor_fehérje

MVSPSSCMQVLPPLGGSGEVGAAHLQAATSTTPESGSGPLPHNFMVHGGMGTSPPSHMKQEIGGAVPGSSIQAK
LCQVCNDNASGFHYGVWSCEGCKAFFKRSIQGPVDYICPATNTCTIDKHRRKSCQACRLRRCYEVGMNKGSRKE
RKSSANTSGLKGRKRADSSDSAINSTNNGASSSKVYFVSFSQAAKRSRSASILEALQKADLPVLESYHNHSLPAT
RVHLLNNTLIKLABRELVLINWAKHVPGYTCLTSLDQVHLIECCWMELLLLLNCAFRSMEHEGRILVFPDFHLER
HQWGLTGMGDVLEQVAAVSEQMVLYNLNKEELLLLQATVLVNAEVRRLDSFVKIQEMRQVILLDFMEVAGRHOQY
GSRHAPSILLLLTHIRQAGERGISYFQRLKMEGCVTFCDLLTEMLDAHNSGERRRLQQQQHHHQSSQQQQQQH
HPTQHHQHQQHPMAPE*

>Lymnaea stagnalis_PGRMC1_mRNS

CCTTGACCCATGTATTTTTTTTATTATCACACGTCACGTTACAGGCTCAGGAAACATGGCCGACAATGATACACCA
CAAAGCGAGGAACAAACTGGAAGCCGACTAATAATGCGGATAGTTTTCAGAATTATTTGGAAGTCCACTAAATCTT
GGATTGCTTGGTATTTGTGGTTTCCTTATTTATAAAATTATTTCTAGCAGACGGTCGACAGATTCCACACCAGTC
AAAGAGCCAGAGCTTCCCTCCGTTAAAAAACAAGACTTTACATTGGAGCAGTTAAGGGAATATGATGGAAAAGGA
TCCGATGGTTCGTGACTAATTGCTGTTAATGGAAAAGTCTTCGATGTCACCAGAGGGGAAACGATTCTATGGTCCA
GGTGGCCCTTATGGGTTATTTGCAGGTCATGATGCCTCTAGAGCCTTAGCCACTTCTCACTAGGAGAGGACGCC
TTGAAGAATGAATATGATGATCTAAGTGACCTCAACAGTCTTCAAATGGAAAAGTATCAGGGAAATGGGAAAATGCAG
TTCCAAGAGAAGTATGTGTATGTTGGAAAAGCTGCTGAAGCCAGGAGAACAGCCCACAGACTACAGTGACACAGAG
GATGATGAAAAGACAGAAAACAGAGAAGAAAGTTGAATAAAGTATTACAAATGATAGACGTGGGATGCATGGGTTT
AAATTATGTTGTAAGCCAGTGTGAAAGGACAATACTAAAAGCCAGGTTGAATCACTGTGAGTTTGGTGATGGAAG
GAGACGCATCTGTTGACTGATCGTGAAACATTAAGTTTCTGTAATACTGATCGTGGAACATTAATTTCTTGAAA
TCATATCTGCAACGCTGTTTTTCCAAAACAGAACTTTCCACATTTTGTGATTATTTCTTTGTTAATCTCTAG
AGCTGTCGGATTGCCACAACCTAAGATAAAGTGTGAAGAATAAGATTATTATTCTTTTTAAAGCTATTTTCTTTTT
GGTCATCTGAAAATGTTTTATTTAAAGTCAGCGTGAACGTCAGAATGAATATTCTTTTCATATTATAACTTTCAATT
TATTCAGAAGTAAAAGTGAGTGAACCTTTAAAATACATTACAGTATTAGAGTATAGTTTAGGCCTGTGCTCCTCAA
GAGATATAATTATTCCCAATTAATGTTTTTATAAAATTTACATACCCCCCCCCCCCCCTATAATTTTAATAGC
GTAAAGGTTAGCAGTTGTGATAAAAGTGTGTCGTGAAAATTTACATACCCCCCCCCCCCCCTATAATTTTA
ATAGCGTAAAGGTTAGCAGTTGTGATAAAAGTGTGTCGTGAGTGGTTTTCCATTTTTTTTCCCTTCTTCTATTGGGC
CTCACATGTGTTGCCACCAACATTTTCAATTAAGAAATATCTTCAACAAAGGACATAGCACAAAGAACTTAGCATTT
CAATTTTTTTTTTTTTTAAATAGCTATGTAATCTTCCATTAATTAGTTAAAATTTCTCTGTTTTAGCCATTCATT
CATGTCTCACTTTATGAGAACCCTGGCATAGGATGTAAGTTATTTTATAACTTATGGAATGACTTGAACGTGAT

TTCTTCTGCCGCGTGTAGCTGATTTATTTTAAATTGTATCAAATGTGAAAAATTGATCTTCTTAAAAGACTGCCAT
CAGTGAAGTATGATATATATTTGATGAAAATACTACAAATTTGTTTTTCTTTCTAAAATACATTTATTCAT
GCTATAAATAAGAGGAAGCTGAATTTTCGGCTGTTTAAATTCAGCAATGATAGAATCAGAACAAGTGGTACAACAA
CATGTCATCAGACAGTTCTAGGATTGATGCTATGCTTTTTTTTTAAATTACATTTTACTTTTTCTACAAATATTTGTC
TTCATTAACAGGAATTCAGGCTATAAGTTATATCTACTATTTAAAAGAAGATGAAACTGTGTGCATTGTTCCAT
AGTGCTAATTTGATCACCACACTAATATAGTAATTGAATTTCAATTCATTTTATTTTACTGCTTTCTTGTCT
TTTTTTTGGTCATCTTTGTCTGAAATATTGCAAATATAAATTGTGTGATAACCTAGAAGCACAGACACATAATAA
CCTGCAGTTTAACTGTAAAAGGCTGGGTCTCTTTTAAATAAAAATGTGTTAATAAAAAGCTTGGGCAGGAGTAAA
ATGATGAAGAGAATGACTTGAGAGATAAGTGTATTATTCAAGGCCAATAACCTGTGACATTCAGGCCAATAA
CCTGTGGCATTCAAGTTGATTTACCCATGGCATTGCTTGTACAAAGTTTACTGTATGGCTCTATAAAAAATTTAT
TTAACAGACTTTCTTGTATTGCAGAGACCACAATATTATTATACAGAAAAATTTTAAAGATAGGCTTTGATTATT
GTTTTGTTATCTTGTCCATATTTGTACATATGGTGACCTGTTGCCAATAATTAATGCTTTAAAAATGTTTATAGA
AACATAAATGAGAAAAGAAAAAAAATTCAACTCAAATGTTTATGTTCATTGTCTTTGTATCCAAACATTCAGTA
ATAAATGATCTTATAGAAAAC

>Lymnaea stagnalis_PGRMC1_fehérje

MADNDTPQSEEQTGSRLIMRIVSELFGSPLNLGLLIGCGFLIYKIISSRRSTDSTPVKEPELPLKQDFTLEQL
REYDGKSGDGRVLIIVNGKVFVDVTRGKRFYGGPYGLFAGHDASRALATFSLGEDALKNEYDDLSDLNSLQMES
IREWEMQFQEKYVYVVGKLLKPGEQPTDYSDEDEKTEKTEKKVE*

Függelék 4: A GnRH neuropeptid szupercsalád filogenetikai fájának megalkotásához használt preprohormonok/prepeptidek aminosav szekvenciái az NCBI azonosító számokkal. A vélt szignál peptidek (SignalP szoftverrel prediktálva) aláhúzással, a vélt aktív peptidek sárga színnel, az amidációra használt glicin (G) kékkel, míg az aktív peptid utáni hasító hely (KR/KKR/RKR) zölddel van jelölve.

>Anopheles_gambiae_AKH (XP_563757)

MDTVKLFVTLVLLICASLMLITEA~~QLTFTPAWGKR~~SQGAMGINPLGSTFGQDACKTPVDSLVIYRMIQAEAQKIVD
CSQK

>Apis_mellifera_AKH (AEW68342.1)

MHRKLRPSFFAFSIIILLCLILNTGVEA~~QLNFSTGWGKR~~SQRIGVVEWGVVTECATQAKPSVEQLLSVYHLIQIE
ARKMLDCRKLNE

>Bombyx_mori_AKH1 (NP_001104825.1)

MYKFTILFLVLACFIMAEA~~QLTFTSSWGGKR~~AAIAGTVSCRNDESLASIKLIQNEAEKLLLCQKP

>Bombyx_mori_AKH2 (NP_001124365.1)

MGRALVVLVLIISAALLVCEA~~QLTFTPGWQGGKR~~SEATDYRNDGCSSSEDSVYTIYKLIKNEAEKFLACRS

>Daphnia_pulex_AKH (EFX68649.1)

MANHRILILITLLMIGLASA~~QVNFSTSWGKR~~SPSTSTKAAEPPSAPSQRNFHSHKVEPGTLETLPNNQHLPESEF
TVSSTIYDDAEQRISSILPSPCLSLKSLLVNQIVEFKNSPLDGRMHRFKIENLFLPLNRTCRLYIRR

>Drosophila_melanogaster_AKH (P61855)

MNPKSEVLIAAVLFMLLACVQC~~QLTFSPDWGKR~~SVGGAGPGTFFETQQGNCKTSNEMLLEIFRFVQSQAQLFLDC
KHRE

>Nasonia_vitripennis_AKH (ADM26613)

MNCRSLLALGLCLCVLLQTRAAEG~~QLNFSTGWGKR~~SSHLLQPARASSSSSSSSSSSSSTSAAAAAAASSGIGRPR
QQADLDYFLQRYRRLRKRKIEAQRANSQV

>Strigamia_maritima_AKH (from WGS, AFFK01019834.1)

MTKFTWLSMTLLVLMVFITVDVNG~~QINFSPGWQGGKR~~SLSDDKPVNGYSDCSETMIEVYRLLK

>Tribolium_castaneum_AKH1 (ABN79648.1)

MSRMFLIVVLIAFVGVCTA~~QLNFSTDWGKR~~SGSSAGSDANNCKEPVETIMLIYKIIQVSFFNIPNSPQQIFAE

>Tribolium_castaneum_AKH2 (ABN79648.1)

MHRVLLTVLLITIVGLCAA~~QLNFTPNWGKR~~APEGESNRCKESVDTIMLIYKIIQVFANYRNFFSHAIFLPERGAE
ISGL

>Hysibius_dujardini_AKH (from EST, CK326138.1)

MGSAVQSLGLGLGALLLVQVLFQVPTANS~~QLSFSTGWGHGKR~~SGNVPVNLAPADYRNGKANGDLCSAAYNEMA
VARIQELIQEEGFRQLACRKR

>Caenorhabditis_elegans_AKH (NP_500770.1)

MQLYVVLCLFVLLGLSAGQMTFTDQWTKKRATLHKQLPVVTPPEPICPSDRVQAVFEQLDQLQKAQQRLTEYLAS
 CAYPVEVPQKAEMK
 >Aplysia_californica_AKH (NP_001268793)
 MESSILLILVVLVIGTSTCLAQIHFSFDWGTGKRAVSTVTEKEIPHWCQIADKEIIDIMLLIQRTAKKLSSCLN
 TCPEL
 >Bithynia_siamensis_goniomphalos_AKH (from EST, GAQQ01002646.1)
 MAQTTMTSLLAVLLLLSLVLTVPVTSQIHFTPGWGSCKRSGRDDPSSSSSSSSASSSSSHSSSIPLPFSSIDSCWAE
 ADFRLFLQLARLVKREAKRFSQCLETENSMAENQENGPDL
 >Crassostrea_gigas_AKH (from WGS, AFTI01019272.1)
 MLCKFCILAVVAVSLLSLTLGQVSFSTNWGSCKRSSSSSFIAPQADDACWTKSNAKLLYDLMQVIQKQVDRLVACQ
 NSNDDLHRIW
 >Hyriopsis_cumingii_AKH (from EST, CW693635.1)
 MQTTTCIIAVTLVALWFTTSAQISFSTNWGSCKRSGYQDLQSAACLDDLEINVMKDLAALIKMEANRAAKCIIDAK
 TRKLTGVYETPK
 >Lottia_gigantea_AKH (from EST, FC743844.1)
 MSLSRNLSVLVCLCCLLSMCLAQIHFSPTWGSCKRSAPVQTYPDSSNTNCYDKLNTKILYQLVKI IKKESSEELTA
 CLLQDDDFLRR
 >Tritonia_diomedea_AKH (from EST, EV287376.1)
 MKIPDMHRTLHCSI PVLVLLMVCVSSLAQIHFSPPGWEPCKRSMEEPTRANKMACYDQLDMSLLLLDILKIKRQAE
 KLSYCTKSCPQL
 >Priapulus_caudatus_AKH (from EST, AXZU01076239)
 MHCILILATCLLGLYIHESSAQIFFSKGWRGCKRQEAPLMRHPTDVEEDTNQLVTTALGKESLKLGPSTEPLVDV
 SLRDAKAWHLTYRTPS
 >Brachionus_calyciflorus_AKH (from EST, GACQ01031992)
 MKNSASVAIICLSVLVVSIVFDKAMCNPQLTFSSDWSGCKRELENSKTI SNDKLDLIGKINFH
 >Capitella_teleta_AKH/GnRH1 (ELU16520.1)
 MKHFTLLLAVACIVVAYHMNTASAQFSFSLPGKWGNCKRAFSFSLPGRWGAQCKRASWTGATDCSRME SDGMMSV
 YAAIQEEAIKMLECMGKTSADKQENSLV GAPNINATLVLV SINFPKPI SMKSDYETSFE
 >Capitella_teleta_AKH/GnRH2 (from WGS, AMQN01001996.1)
 MNHMMVVVLVACSVLAFQLHSAEAQGFSLPGKWGGAGCKRSGGVPWLKDLGECGTYDPSLVVELYKIIQAEAFR
 LNECLMKAQREGN
 >Helobdella_robusta_AKH/GnRH (from WGS, AMQN01001996.1)
 MNCLALFLACLVLSTVILPAKSQFSFTPPGKWPFGTCKRDKIISDDDLTSFQEECFKQDPRILSQTFLRLQVQN
 LKCKF
 >Anopheles_gambiae_ACP (XP_563757.1)
 MNSISSSRHLAAKFLLLVALCAVLLPVPSAGQVTFSRDWNAGCKRAMPDSPVSGVAECSAIWRSVNNLCAAVTKNI
 QHLTLCETRSLKSLQTDSSMESNSGNNLPMFSNNHI
 >Bombyx_mori_ACP (NP_001124365.1)
 MGRALVVLVILSAALLVCEAQLTFTPGWQCKRSEATDYRNDGCSSEDSVYTIYKLIKNEAEKFLACRS
 >Ixodes_scapularis_ACP (from WGS, ABJB010491828.1)
 MASVSRAALAFLLLGLLVVQHVQCQITFSKNWQPKCKRGEMCSQREAAQAVIKLRQVLFR
 >Nasonia_vitripennis_ACP (NP_001161199.1)
 MGRRLSIGLAAAAILFSCMLHFALAQVTFSKGWGPKCKRSALYETDCSRVNYKSLALLFHTLLAEVKHLMACDHQA
 TVNYLQSVRQ
 >Ostrinia_furnacalis_ACP (from EST, GAQJ01047301.1)
 MNTVRCRGVTVVLVLCALAMALVSAQITFSRDWTGCKRAAPMAIDCGQFTRLCRHFVHELKQ
 >Strigamia_maritima_ACP (from WGS, AFFK01019675.1)
 MKWIAVYLLLTIIIVLTIIVAPVEGQVTFSRDWTGPKCKRGMDCGFVKTKLLRDIIVLLQVKYHFAELCMLTLAWLML
 DGGQFTEILWTS CDGAFP
 >Tribolium_castaneum_ACP (NP_001159497)
 MALKFRVFALVAVLVLMAWMFTGTQAQVTFSRDWNPKCKRTENTDLHNTLKTASAVCHLLMNQVRQLASCDNNNEL
 EPGATIFSGRR
 >Apis_mellifera_CRZ (NP_001012981.1)
 MVNSQILILFILSLTITIVMCQTFYSHGWTNGCKRSTSLLELANRNAIQSDNVFANCELOKLRLLLQGNINNQLF
 QTPCELLNFPKRSFSENMINDRQAPPTNNNY
 >Bombyx_mori_CRZ (BAC66443.1)
 MVTNITLILTLMTLASVTAQTFQYSRGWTNGCKRDGHKRDEL RDEVLERILTPCQLDKLKYVLEGKPLNDRFLVPC
 DYIEEEVNQPKRYKGERNHLEFDVFQ
 >Daphnia_pulex_CRZ (ACJ05606.1)
 MFINQYVRYSSSIAMAVRLYFVLLLVVVSAMAQTFQYSRGWTNGCKRSDPSFVQQQWIQRNGHPIVVPAEFRSN
 SFEDWSRYRINSEKVFIVCSCVTFSKRDFMLISVGCHDDNR

>Drosophila_melanogaster_CRZ (AAF55046.1)
MLRLLLLPLFLFTLSMCMGQTFQYSRGWTNGKRSFNAAASPLLANGHLHRASELGLTDLYDLQDWSSDRRLERCLS
QLQRSLIARNCPVGSDFNANRVDPDPENSAHPRLSNSNGENVLYSSANI PNRHRQSNELLEELSAAGGASAEFNV
FGKH

>Ixodes_scapularis_CRZ (from WGS, ABB010772673.1)
MSHYLGLSAVLLVCLAVTAYSQTFQYSRGWTNGKRSVAEMPLVGVPLRASNDHRALDEVLSKFTPRDRIVLERLG
HMRVRLDHAEQQEY

>Strigamia_maritima_CRZ (from WGS, AFFK01019339.1)
MGFQKTKLLLIVASILVFIICTSGQTFQYSKGWEPGRKRVAVDRSYQVRDWDAGRKRENIRGLDSSTAWILGLKRA
AFN

>Priapulus_caudatus_CRZ
MSLSRTLTTMLLLAIAALMLSHVTTAQTFHYSRGWEGKRSDDSMVSSQQRNTKTPLMSILRHRLKVRYSHSHL
TLLDSYFTRPVMF

>Aplysia_californica_GnRH/CRZ (NP_001191482)
MACRITSATTTLFSILLIVIAELCSAQNYHFSNGWYAGKRSASALLRPEALGSSSSSSNSGLDVTADSSRG
GVSSLSGRGFGVGELELRLVDSPCIRLETALINKLMQEEAARIQRTCVANVPGLRELLLEGAASKLESENKW

>Lymnaea_stagnalis_GnRH/CRZ (this paper; MN385595)
MTSSNLMSTLLVLLVAVVHTTTAQNYHFSNGWYAGKRS SPSYTGHIIGDSSSEAVRGPRTADEACNIRPEA
VLLINRIIQEEVARIQKVCTAETPSGLREILENAATRLDSESKW
EITRIITTCTNTVNDIADLQ

>Deroceras_reticulatum_GnRH/CRZ (ARS01378.1)
MVCSKVTYATLAVTILVLALVQHSLSQNYHFSNGWYPGKRSAAATTSAAANSDSGRRRGASASGALDEACGISPYA
LLLINRIVQDEVARLQKSCSPDLPSGFTEILENAANTLESDESKW

>Haliotis_laevigata_GnRH/CRZ (AKR13997.1)
MSVLSSQGVTVSVLLLLLTVHAVAGQNYHFSNGWHA GKRS GGSTSCVFRKDI LMLVNKLIMEESSRVAHRCQNA
VPHMDFTEPDTVDAESDGLTDRWK

>Haliotis_discus_hannai_GnRH/CRZ (AZL93822.1)
MSVLSRQGVTVSVLVLAEELCSAQNYHFSNGWYAGKRS CVFRKDI LMLVNKLIMEESSRVAHRCQNGVPHMDFTE
PDTVEADSARRQETWRGQHLRLQERHPACQSSASALLRPEALGSSSSSSNSGLDVTADSSRGVSSLSGRGF
GVGELRLQPADRQAMDSNSGLDVTADSSRGVSSLSGRGFGVGELELRLVDSPCIRLETALNLRR

>Patinoceten_yessoensis_GnRH/CRZ (ALS92801.1)
MSSYTQILVAQLLLAGLLVAVVSGQNFHYSNGWQPGKRAPMMSGTQLCSFRPHIKALLLWIEDEVKRIKSCGS
SGYDDIINLLQSKQSGPLSSGMPSDSQ

>Bithynia_siamensis_goniomphalos_GnRH/CRZ (from EST, GAGS01040432.1)
MVRPVTTPSLSSFLAACSLMLMLLLACPLPASAQSYHYSNGWNPGRKRS GIYGAASGPAVTDSDGADDLCLFRP
KVLAFISKAIMEEISRIEQLCFPVDVAVSGLKALLQQTAAAQSSSSAGPKLPEDGAKASW

>Crassostrea_gigas_GnRH/CRZ (ADZ17180.1)
MKVSPCTQVIVMVLTLGLLCEVHAQNYHFSNGWQPGKRSYRGCTVRPEIRSILIKIIEDEVERIQKCSHSNIEDV
FSLIQEKTGVDAEV

>Lottia_gigantea_GnRH/CRZ (from EST, FC805607.1)
MMPVPLKYFGLALTLALVTELAVGQHYHFSNGWKS GRKRS SGGVSNLCEMRPELINYINTLLSEELNRIKNTCNLN
TEDKSDVDFSEGAFSRLQNGLKLAADRKWK

>Octopus_vulgaris_GnRH/CRZ (BAB86782.1)
MSATASTSSRKMAFFIFSMLLLCLCLQTQAQNYHFSNGWHPGGRKSALSIDIQCHFRQOTKALIEKILDEEINRI
ITTCTGPVNEIADL

>Ruditapes_philippinarum_GnRH/CRZ (from EST, GAEH01003426.1)
MNACILLTTLVTMITIEKVQGSYHFSNGWNPGRKRS MQEPVCHFRQDVQTLVLKLIIEDEVYRMLSDPSCIGGVPT
LRNFLKKDLAYTVPLDDKK

>Capitella_teleta_GnRH/CRZ (from WGS, AMQN01007383.1)
MYRLELGCICSFCLLLCLACLQGCQQAAYHFSHGWFPGKRSAPVSEKSSLLSEFPTSHGYAPIRSQKSSEIM
DFFQYKRPIQRDDTPSTFDKEMCRM RPVQMIQDLINIEARRMAVECKSTIESAESSQQQREEDYPIKALEDWL
RRGQGLRRMESIRDESNE

>Danio_renio_GnRH (AAL99294)
MEWKGRLLVQLLLLVCVLEVSLCQHWSYGLWLPGRKRSVGEEMATFRMLDPGDTVLSIPADSPMEQLSPIHIVNEV
DAEGLPLKGQRYSDRRGRV

>Homo_sapiens_GnRH1 (NP_000816.4)
MCLRMKPIQKLLAGLILLTWCVEGCSSQHWSYGLRPGGRKRS DAENLIDSFQEI VKEVGVQLAETQRFECTTHQPRSP
LRDLKGALESLEEETGQKKI

>Gallus_gallus_GnRH1 (NP_001074346.1)
MEKSRKILVGVLLFTASVAICLAQHWSYGLQPGGRKRSNAENLVESFQEI ANEMESLGEQGKAECPGSYQHPRLSDL
KETMASLIEGEARRKEI

>Gallus_gallus_GnRH2 (AEZ51861.1)
MAPGGCLLLALLLLLAGTAQGQHWSHGWPYGGKRDL SAPQAI PAWSPWLVP SRGRKSRYP PPAKAKASRLKVPPPV
DPAELYVVTERYRQHRLVLSALRSIFRSEVVQRKREAQRDAEDSAALSEEHRLLMAWNDAENARQRARR
>Cionia_intestinalis_GnRH6 (AAP06794)
MLDIEKDELAALLQRENSAFRDLLYHKNAGNFEKSDSGKFGSLKPQNNFPHLDLGLGVDLDAVDQWNRYKQANAQ
RMQDLGVPVNAHQHWSYEFMPGGRRAAWENANVGVPSRQHWSYEMPGGRRSAGQHAMTKRQHWSKGYSPGGKK
RSVDLSEFDDQGRITKHEGMPEEPFKVEQPRPRNGIHGPAGLDQNEPDWKNWMNEQFAVSSDDKGT DVE
>Strangylocentrotus_purpuratus_GnRH (XP_800179.1)
MKQIITSLVSI SAALLLFVLI SEYTPRCNGQVHHRFSGWRPGGKKRSDAAEVNSNKITIERPQLPICQTTEERQL
LEGSDDILGDLRRAANRMRLQLFNL SKTRLNDLNDATSNEVDERPVYGDYLG TGL

Függelék 5: Az IHC és WB kísérletek során használt elsődleges antitestek részletes leírása

1) anti-ly-GnRH/CRZ antitest

- Immunogén: CNYHFSNGWYA-amid KLH-val konjugálva, megfelelően a szekvenálás és tömegspektrometria során azonosított ly-GnRH/CRZ aktív peptidnek (QNYHFSNGWYA-amid)

2) anti-humán GnRH antitest

- Immunogén: pQHWSYGLRPG-amid konjugáció nélkül
- A protein szekvencia nem adott „hit”-et sem az NCBI Blast-ot használva, sem a *L. stagnalis* genom és neurális transzkriptom adatainkat használva (nincs szekvencia átfedés a nem homológ *L. stagnalis* fehérjékkel).

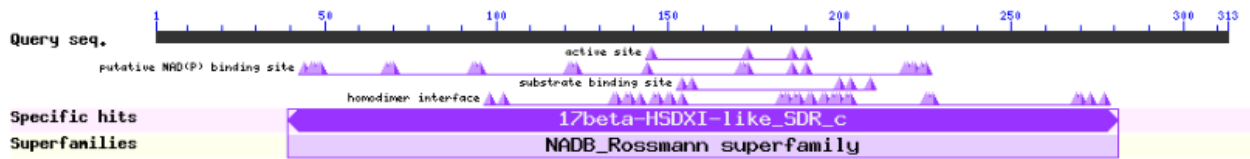
3) anti-humán CYP19A antitest

- Immunogén: a humán aromatáz enzim 221-270 aminosav tartománya (NCBI referencia szekvencia: NP_001334185.1) konjugáció nélkül. Az antitest számos gerinces fajban mutat immunreaktivitást.
- Sem az immunogén sem a teljes protein szekvencia nem adott „hit”-et sem az NCBI Blast-ot használva, sem a *L. stagnalis* genom és neurális transzkriptom adatainkat használva (nincs szekvencia átfedés a nem homológ *L. stagnalis* fehérjékkel).

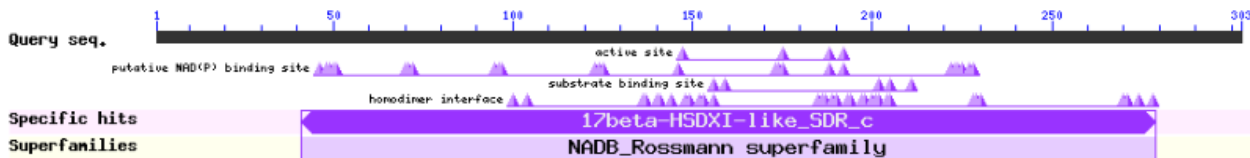
4) anti-humán nPR antitest

- Immunogén: csirke petevezeték citoszolból tisztított nPR (NCBI referencia szekvencia: NP_990593.1) konjugáció nélkül. Az antitest számos gerinces fajban mutat immunreaktivitást. A legtöbb releváns tanulmány az IHC-t csirke nPR ellen termeltetett antitesttel (vagy kis humán nPR fragmentek ellen termeltetett antitesttel) végzi emberi szövetekben.
- NCBI Blast-t használva, a teljes protein szekvenciával való keresés három korábban azonosított *L. stagnalis* fehérjét eredményezett: a munkám során azonosított nER homológot (#QIH29348.2; ~43 kDa), a „retinoid X

> *Lymnaea stagnalis*_17 β -hydroxysteroid dehydrogenase 9



> *Lymnaea stagnalis*_17 β -hydroxysteroid dehydrogenase 11



> *Lymnaea stagnalis*_17 β -hydroxysteroid dehydrogenase 14



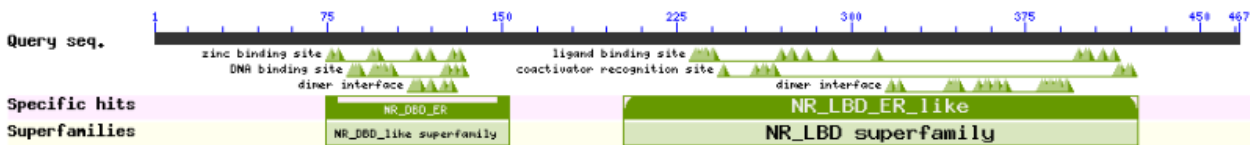
> *Lymnaea stagnalis*_5 α -reductase 1



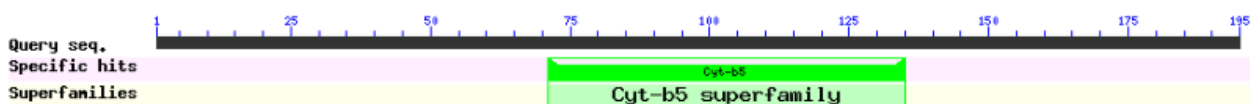
> *Lymnaea stagnalis*_5 α -reductase 2



> *Lymnaea stagnalis*_nER



> *Lymnaea stagnalis*_PGRMC1



Függelék 8: A gerinces szex szteroid szintézis útvonalban és receptor-mediációban részt vevő gének *L. stagnalis*-ban azonosított homológjainak fehérje szekvencia egyezése (homológia) egy reprezentatív puhatestű (*A. californica*) és gerinces (*R. norvegicus*) faj szekvenciáival

Fehérje	Homológia puhatestűvel ("identity %" és "similarity %")	Homológia gerinccsel ("identity %" és "similarity %")
StAR	57.9 és 69.2 (<i>A. californica</i>)	31.6 és 46.1 (<i>R. norvegicus</i>)
3 β -HSD	32.3 és 43.6 (<i>A. californica</i>)	18.0 és 27.8 (<i>R. norvegicus</i>)
CYP17	45.6 és 63.2 (<i>A. californica</i>)	28.4 és 43.6 (<i>R. norvegicus</i>)
17 β -HSD	65.6 és 78.2 (<i>A. californica</i>)	53.3 és 68.2 (<i>R. norvegicus</i>)
5 α Red	71.8 és 83.3 (<i>A. californica</i>)	41.7 és 60.1 (<i>R. norvegicus</i>)
nER	82.3 és 87.7 (<i>A. californica</i>)	30.0 és 41.8 (<i>R. norvegicus</i>)