

НЕЙРОПЕПТИДЫ МЕДОНОСНОЙ ПЧЕЛЫ

Нейропептиды — короткие белковые молекулы, образующиеся в центральной или периферической нервной системе и регулирующие физиологические функции организма животных (Coast, Schooley, 2011). Нейропептиды широко распространены среди представителей царства Animalia (животные), обладающих нервной системой. Нейропептиды играют важную роль в регуляции большинства жизненных функций насекомых (Nassel 2002; Taghert, Veenstra 2003; Hauser et al., 2006; Johnson, 2006; Marciniak et al., 2010, 2011).

Предполагается, что первые нейропептиды возникли около 600 млн лет назад у самых древних животных с нервной системой — Cnidaria, Stenophora и Placozoa. Однако известно, что общие более древние предки — Metazoa, Choanoflagellata и Filasterea — уже обладали множеством семейств генов пептидов, похожих на нейропептиды, контролирующих поддержание многоклеточности. Хотя нейропептиды и рецепторы GPCR представителей типов Cnidaria, Stenophora и Placozoa не обнаруживают гомологий с известными нейропептидами других животных, но содержат консервативные среди животных ферменты процессинга: фурины, пропротеиновые конвертазы, пептидилглицин-альфа-гидроксилирующую монооксигеназу и карбоксипептидазу D (Peterson et al., 2005; Jorgensen, 2014; Moroz et al., 2014; Smith et al., 2014; Whalan, Webster, 2014; Jekely et al., 2015; Takahashi, Takeda, 2015; Schoofs et al., 2016).

Несмотря на то что нейропептиды позвоночных и членистоногих имеют единое происхождение, адаптивные эволюционные преобразования привели к возникновению существенных различий. Так, одни нейропептиды насекомых, такие как sNPF (short neuropeptide F), TK (tachykinin) и SK (sulfakinin), обладают высоким сходством с нейропептидами позвоночных, другие — PROC (proctolin) и ETH (ecdysis triggering

hormone) уникальны для членистоногих (Nassel, Winther, 2010).

Первым идентифицированным нейропептидом насекомых был миоактивный пептид PROC, выделенный из таракана *Periplaneta americana* (Starratt, Brown, 1975). Консервативная последовательность этого нейропептида встречается у большинства насекомых (Spittaels et al., 1995). Вторым идентифицированным нейропептидом насекомых был АКН (adipokinetic hormone), впервые выделенный из мигрирующей саранчи *Locusta migratoria* (Stone et al., 1976). Еще один миоактивный нейропептид — ССАР (crustacean cardioactive peptide) — был впервые выделен из краба *Carcinus maenas*, который также консервативен среди большинства видов насекомых (Stangier et al., 1987). Следует отметить, что консервативность аминокислотной последовательности нейропептидов насекомых — скорее исключение, чем правило, поскольку большинство их содержит множество изоформ (Schoofs et al., 2016). Так, нейропептид АКН является ортологом нейропептида RРСН (red pigment-concentrating hormone), выделенного из креветки *Pandalus borealis*. Нейропептид RРСН высоко консервативен среди представителей надкласса Crustacea (ракообразных) (Fernlund, Josefsson, 1972), тогда как нейропептид АКН полиморфен среди представителей надкласса Insecta (насекомых) и содержит около 40 изоформ (Gäde, Marco, 2006).

На основе анализа геномов видов *Drosophila melanogaster*, *Anopheles gambiae*, *Aedes aegypti*, *Bombyx mori* и *Apis mellifera* было показано, что насекомые содержат в среднем около 40 генов нейропептидов и рецепторов нейропептидов GPCRs. Поскольку в результате процессинга препропептидов некоторых нейропептидов формируется более одного продукта, то у насекомых число функциональных нейропептидов будет превышать число кодирующих генов (Hewes,

Taghert, 2001; Meeusen et al., 2003; Hauser et al., 2006; Hummon et al., 2006). Число идентифицированных нейропептидов с каждым годом увеличивается. Так, в 1980-х годах было известно только 20 нейропептидов насекомых, большинство из которых были изоформами нейропептида AKH, а сейчас известно уже несколько сотен (Schoofs et al., 2016). Также имеются виды насекомых, у которых идентифицирована большая часть нейропептидов. Например, у жука *Tribolium castaneum* обнаружено около 56 нейропептидов и их изоформ (Li et al., 2008), а у пчелы *A. mellifera* — 47 нейропептидов и изоформ (табл. 1) (Hewes, Taghert, 2001; Johnson, 2006; Hummon et al., 2006; Altstein, Nässel, 2010; Schoofs et al., 2016).

Известно, что точное число нейропептидов насекомых может быть определено только на основе анализа пептидома методами масс-спектрометрии, поскольку процессинг препропептидов происходит не по всем имеющимся сайтам расщепления. Так, точное число нейропептидов плодовой мушки *D. melanogaster* и медоносной пчелы *A. mellifera* было определено на основе анализа пептидома (Baggerman et al., 2002; Predel et al., 2004, 2005; Hummon et al., 2006). Недавно был разработан высокоэффективный метод анализа пептидома отдельных типов нейронов насекомых, который основан на генетической маркировке определенных групп

нервных клеток флюоресцентным белком GFP с использованием экспрессирующей системы Gal4-UAS. На основе данного метода стало возможно выявить нейроны, экспрессирующие определенные нейропептиды, и провести анализ их пептидома методом количественной масс-спектрометрии. Благодаря данной разработке стало возможным выявить распределение нейропептидов по нейронам и определить состав нейропептидов в разных типах нейронов насекомых (Yew et al., 2009).

Первоначально исследования нейропептидов насекомых и их GPCR-рецепторов проводили на плодовой мушке *D. melanogaster* путем целенаправленной интерференции dsRNA генов препропептидов и GPCR-рецепторов, а также путем специфической экспрессии генов апоптоза (McNabb et al., 1997; Renn et al., 1999; Wu et al., 2003, 2005; Johnson, 2006). Сравнительные исследования *in vitro* структуры нейропептидных GPCR-рецепторов у разных видов насекомых тоже способствовали пониманию механизмов передачи сигналов нейропептидов. В дальнейшем метод количественной масс-спектрометрии показал большую эффективность при изучении нейропептидов и их GPCR-рецепторов. Так, на основе количественной масс-спектрометрии было показано, что экспрессия нейропептидов является изменчивой у медоносной пчелы *A. mellifera* в процессе кастовой дифференциации (Brockmann et al., 2009).

1. Нейропептиды медоносной пчелы *A. mellifera*

Полное название	Аббревиатура	Полное название	Аббревиатура	Полное название	Аббревиатура
Adipokinetic hormone	AKH	Diuretic hormone 31	DH 31	Neuropeptide-like precursor 2	NPLP 2
Allatostatin A	AST A	Diuretic hormone 47	DH 47	Neuropeptide-like precursor 3	NPLP 3
Allatostatin C	AST C	Ecdysis triggering hormone	ETH	NVP-containing peptide	NVP
Allatostatin CC splicing variant a	AST CC a	Eclosion hormone	EH	NVP-like peptides	NVPL
Allatotropin	AT	FMRFamide	FMRFa	Orcokinin A	OK A
Apis-ITG-like	ITG	Insulin-like peptide 1	ILP 1	Orcokinin B	OK B
Bursicon alpha subunit	BURS α	Insulin-like peptide 2	ILP 2	Pheromone biosynthesis-activating neuropeptide	PBAN
Bursicon beta subunit	BURS β	Ion transport peptide a	ITP a	Pigment dispersing factor	PDF
Calcitonin-like diuretic hormone	CLDH	Ion transport peptide b	ITP b	RYamide	RYa
Capability neuropeptide splicing variant a	CAPA a	Ion transport peptide-like	ITPL	RYamide	RYa
CCHamide 1	CCH 1	Leucokinin	LK	Short neuropeptide F	sNPF
CCHamide 2	CCH 2	Myosuppressin	MS	Short neuropeptide F splicing variant a	sNPFa
CNMamide	CNMa	Natalisin	NTL	SIFamide	SIFa
Corazonin	CRZ	Neuroparsin	NP	Sulfakinin	SK
Crustacean cardioactive peptide	CCAP	Neuropeptide F 2	NPF 2	Tachykinin	TK
		Neuropeptide-like precursor	NPLP	Tachykinin related peptide	TKRP
		Neuropeptide-like precursor 1	NPLP 1		

2. Основные функции нейропептидов медоносной пчелы *A. mellifera*

Функция	Семейства нейропептидов пчел
Развитие	AT, AST
Линька	AT, AST, EH, ETH, CCAP, CRZ, FMRFa, BURS
Питание	NPF, sNPF, SK, LK
Рост	ILP
Размножение	CRZ, NP, ILP, PBAN, sNPF, SIFa
Метаболизм	AKH, ILP, NVPL
Водно-солевой обмен	DH, CAPA, LK, ITP
Миотропное действие	FMRFa, MS, OK, SK, AKH, CCAP, NVPL
Пигментация	CRZ, BURS
Социальное поведение	CRZ, SIFa, PDF, NPF, sNPF
Нейротрансмиттеры и нейромодуляторы	AT, CCAP, TKRP, sNPF, PROC, OK
Обоняние и вкус	AT, AST, CRZ, CCAP, sNPF, SIFa, TKRP
Обучение и память	sNPF, NPF

Нейропептиды играют чрезвычайно важную роль в жизни пчелиной семьи. Они регулируют физиологию, метаболизм, развитие, поведение пчел и вовлечены в кастовую дифференциацию семьи. Нейропептиды могут регулировать функции как отдельно взятых рабочих особей пчел, так и всей пчелиной семьи, координируя их социальное поведение (табл. 2).

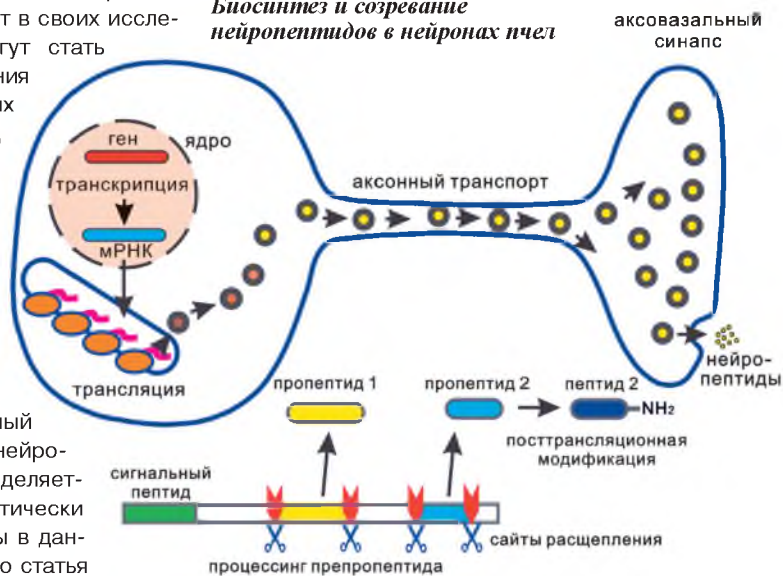
Несмотря на то что нейропептиды — уникальные пептиды, регуляторы практически всех жизненно важных функций пчел, их изучение и применение сильно ограничено в науке и пчеловодстве. К сожалению, на данный момент многие исследователи пчел еще недостаточно хорошо понимают весь потенциал нейропептидов и активно не используют в своих исследованиях. Нейропептиды могут стать как инструментом управления жизнедеятельностью полезных насекомых (например, пчелы, шелкопряда), так и средством борьбы и контроля численности вредных насекомых (например, саранчи, колорадского жука). В данной статье мы проанализировали литературные данные об эволюции, функциях, экспрессии и процессинге нейропептидов пчел. На данный момент в России изучению нейропептидов медоносной пчелы уделяется очень мало внимания. Практически нет русскоязычной литературы в данной области. Мы надеемся, что статья

повысит интерес к изучению этих веществ и разработке лекарственных препаратов для пчел нейропептидной природы в России.

Нейропептиды насекомых обычно содержат от 5 до 80 аминокислотных остатков. Известно, что некоторые более крупные нейропептиды действуют как гормоны. Так, нейропептиды PTTH (prothoracicotropic hormone) и BURS (bursicon), действуя как гормоны, играют важную роль в регуляции развития насекомых (Johnson, 2006). Строение и функции нейропептидов насекомых чрезвычайно разнообразны (Johnson, 2006; Nassel, 2006). Многие из них могут быть амидированными на С-конце, а также содержать цистеиновые дисульфидные мостики, которые придают им устойчивость к действию пептидаз и обеспечивают их повышенную биологическую активность (Taghert, Veenstra, 2003).

Разные виды насекомых содержат разное число функциональных нейропептидов. Так, у *D. melanogaster* 35 генов нейропептидов и 48 генов рецепторов GPCR, 25 из которых имеют идентифицированные лиганды (Hauser et al., 2006; Johnson, 2006), а у медоносной пчелы *A. mellifera* 36 генов нейропептидов и 37 генов рецепторов GPCR (Hewes, Taghert, 2001; Johnson, 2006; Hummon et al., 2006). Однако точное число функциональных нейропептидов не известно, поскольку процессинг (созревание) может происходить разными путями. Кроме того, еще до конца не известны лиганды для всех нейропептидных рецепторов GPCR насекомых. Также у насе-

Биосинтез и созревание нейропептидов в нейронах пчел



комых имеются нейропептиды, для которых еще не обнаружены рецепторы GPCR. Кроме того, некоторые нейропептиды работают с чужеродными рецепторами, как, например ILP (Insulin-like peptide), который взаимодействует с рецепторами фермента тирозинкиназа (Hewes, Taghert, 2001; Garofalo, 2002; Taghert, Veenstra, 2003). Также у насекомых не обнаружено генов GPCR-рецепторов нейропептида FMRFamide (Phe-Met-Arg-Phe) (Hewes, Taghert, 2001).

Нейропептиды насекомых образуются в результате процессинга более крупных белков-предшественников — препропептидов (рис.). Некоторые нейропептиды насекомых представлены в единственной форме, но часто и несколькими различающимися формами — изопептидами. Так, нейропептид FMRFamide у таракана *P. americana* представлен 23 изопептидами, которые образуются в результате дифференцированного процессинга единственного препропептида (Predel et al., 2004).

Поскольку процессинг препропептидов происходит не по всем сайтам расщепления, то точное число нейропептидов пчел может быть определено только на основе анализа пептидома методами масс-спектрометрии.

Возможно, что при биохимическом анализе не все нейропептиды могут быть идентифицированы. Так, у медоносной пчелы *A. mellifera* с помощью методов масс-спектрометрии было идентифицировано около 100 нейропептидов, кодируемых 36 генами (Hummon et al., 2006), а у таракана *P. americana* — только около 80 нейропептидов (Predel et al., 2004, 2005). Определение точного числа нейропептидов на основе изучения числа рецепторов GPCR также не всегда возможно, поскольку некоторые нейропептиды могут взаимодействовать с разными рецепторами GPCR (Hauser et al., 2006; Johnson, 2006).

Часто нейропептиды насекомых могут действовать как циркулирующие гормоны, синаптические модуляторы и нейротрансмиттеры (Davis et al., 1996; Nässel, 2002; Nässel DR, Homberg, 2006). Нейропептиды в центральной нервной системе насекомых могут продуцироваться нейросекреторными клетками, интернейронами, сенсорными нейронами и мотонейронами (Nässel, 2002; Nässel, Homberg, 2006). Нейроны насекомых, секретирующие нейропептиды, содержат хорошо развитый комплекс Гольджи, а аксоны заканчиваются своеобразными аксовазальными синапсами. Нейропептиды также могут быть экспрес-

сированы в эндокринных клетках желудочно-кишечного тракта насекомых (Ewer, Reynolds, 2002; Nässel, 2002). Основными местами экспрессии нейропептидов у пчел и других насекомых являются: нейроэндокринный комплекс *corpus cardiacum-corpora allata* (CC/CA), нейрогемальные и перивисцеральные органы, окончания аксонов на передней аорте, периферические нервы и мышцы тела и кишечника (Predel et al., 2004).

Число нейронов, экспрессирующих разные нейропептиды, может быть различным у разных видов насекомых. Так, нейропептиды EH (eclosion hormone) и SIFa (SIFamide) синтезируются, соответственно, двумя и четырьмя нейронами у *D. melanogaster*, а нейропептиды ТКРР (tachykinin related peptide) и АТ (allatotropin) — несколькими сотнями нейронов у мигрирующей саранчи *Locusta migratoria* (McNabb et al., 1997; Nässel, Homberg, 2006; Terhzaz et al., 2007).

Стратегия борьбы с насекомыми-вредителями и переносчиками болезней на основе нейропептидов заключается в целенаправленном нарушении функций жизненно важных нейропептидов. Нейропептиды насекомых активно изучали последние 30 лет, однако механизмы их функционирования до конца еще не выяснены. Один из перспективных методов изучения этого вопроса — метод GPCR-рецептор-селективных агонистов и антагонистов. К сожалению, несмотря на быстрое развитие науки и современных методов исследования, эксперименты по изменению функций нейропептидов насекомых на основе применения агонистов и антагонистов их GPCR-рецепторов практически не проводились. Возможно, это связано с тем, что большинство агонистов и антагонистов GPCR-рецепторов нейропептидов еще не известны. Недостаточно хорошо изучены и сигнальные пути нейропептидов, знание которых позволяло бы предсказывать результат действия агонистов и антагонистов GPCR-рецепторов нейропептидов.

Окончание следует

^{*1,2}Р.А.ИЛЬЯСОВ, ²Г.Ю.ХАН, ²Д.Х.СОНГ,
²С.Х.ЛИМ, ¹Л.Р.ГАЙФУЛЛИНА, ¹Е.С.САЛТЫКОВА,
¹А.Г.НИКОЛЕНКО, ^{**2}Х.В.КВОН

¹Институт биохимии и генетики
Уфимского федерального исследовательского центра
Российской академии наук;

²Колледж естественных наук и биоинженерии
Инчхонского национального университета,
Отдел наук о жизни Инчхон, Южная Корея

*E-mail: apismell@hotmail.com

**E-mail: hwkwon@inu.ac.kr