

ISSN 1561-8331 (Print)

ISSN 2524-2342 (Online)

УДК 577.15:[611+594.3]

<https://doi.org/10.29235/1561-8331-2021-57-2-206-217>

Поступила в редакцию 05.02.2021

Received 05.02.2021

А. А. Чиркин, О. М. Балаева-Тихомирова, В. В. Долматова, И. О. Семенов

Витебский государственный университет имени П. М. Машерова, Витебск, Беларусь

МОЛЕКУЛЯРНО-СТРУКТУРНАЯ ГОМОЛОГИЯ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ В ИЗУЧЕНИИ МЕХАНИЗМА ПРОТЕОЛИЗА И ЕГО РЕГУЛЯЦИИ

Аннотация. В современной медицине животные рассматриваются как модельные организмы для различных патологий при доклинических испытаниях и источники биологического материала для заместительной терапии. Целью исследования явился сравнительный анализ степени гомологии протеолизитических ферментов у человека и легочных пресноводных моллюсков. В ходе исследования установлено, что гомология ферментов по нуклеотидным последовательностям у человека и легочных пресноводных моллюсков при анализе нерегулируемого протеолиза составляет 66–68 %; регулируемого протеолиза – 69–76 %; убиквитин-подобных модификаторов – 78–83 %; внеклеточных ферментов – 67–76 % и внутриклеточных ферментов – 65–72 %. Эволюционный консерватизм протеолизитических ферментов позволяет использовать этих животных в качестве дешевых и удобных в содержании тест-организмов и обосновывает целесообразность формирования аквакультуры моллюсков, для получения из их тканей белковых ферментативных препаратов протеолизитического действия в рамках задач биофармацевтики, косметики и пищевой промышленности.

Ключевые слова: модельные организмы, ферменты протеолиза, нуклеотидные последовательности, аминокислотные последовательности, человек, легочные пресноводные моллюски

Для цитирования. Молекулярно-структурная гомология протеолизитических ферментов в изучении механизма протеолиза и его регуляции / А. А. Чиркин [и др.] // Вест. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. хим. наук. – 2020. – Т. 57, № 2. – С. 206–217. <https://doi.org/10.29235/1561-8331-2021-57-2-206-217>

A. A. Chirkin, O. M. Balaeva-Tikhomirova, V. V. Dolmatova, I. O. Semenov

Vitebsk State University named after P. M. Masherov, Vitebsk, Belarus

MOLECULAR-STRUCTURAL HOMOLOGY OF PROTEOLYTIC ENZYMES IN THE STUDYING OF PROTEOLYSIS MECHANISM AND ITS REGULATION

Abstract. The actual problem of experimental medicine is the substantiation of new model organisms that meet modern requirements of bioethics, cost and conditions of detention. The aim of this work was a comparative analysis of the homology degree of proteolytic enzymes in humans and pulmonary freshwater mollusks. The homology of enzymes in nucleotide sequences in humans and pulmonary freshwater mollusks in the analysis of unregulated proteolysis is 66–68 %; regulated proteolysis – 69–76 %; ubiquitin-like modifiers – 78–83 %; extracellular enzymes – 67–76 %; and intracellular enzymes – 65–72 %. The evolutionary conservatism of proteolytic enzymes and the presence of an open blood circulation, which allows the substances under study to be delivered from the hemolymph directly to target cells, make it possible to use these animals as cheap and convenient test organisms. The practical importance of a sufficiently high homology degree of proteolytic enzymes in humans and pulmonary freshwater mollusks justifies the expediency of forming mollusk aquaculture to obtain proteolytic enzyme protein preparations from their tissues within the framework of the tasks of biopharmaceuticals, cosmetics and the food industry.

Keywords: model organisms, proteolysis enzymes, nucleotide sequences, amino acid sequences, humans, pulmonary freshwater mollusks

For citation. Chirkin A. A., Balaeva-Tikhomirova O. M., Dolmatova V. V., Semenov I. O. Molecular-structural homology of proteolytic enzymes in the studying of proteolysis mechanism and its regulation. *Vestsi Natsyyanal' nai akademii navuk Belarusi. Seriya khimichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Chemical series*, 2021, vol. 57, no. 2, pp. 206–217 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1561-8331-2021-57-2-206-217>

Введение. Около 5 % генома многоклеточных организмов обеспечивает кодирование ферментов протеолиза. Они присутствуют практически во всех клетках и биологических жидкостях организма. Генотип организмов выражается в фенотипе, т. е. в спектрах белков. Белки протеолизитически расщепляются для обеспечения важнейших функций клеток, тканей и организма. Протеолизитические ферменты относятся к классу гидролаз, которые расщепляют пептидную связь между аминокислотами в белках. В настоящее время согласно международной базе MEROPS 12.0 (<https://www.ebi.ac.uk/merops/whatsnew.shtml>) пептидазы и протениазы (протеазы) подразде-

ляются на семь семейств на основе природы каталитических центров: аспарагиновые – тип А (впервые описаны в 1993 г.), цистеиновые – тип С (1993 г.), сериновые – тип S (1993 г.), металло – тип М (1993 г.), треониновые – тип Т (1997 г.), глутаминовые – тип G (2004 г.), аспаргин-пептид-лиазы (2010 г.). К аспарагиновым протеазам относят катепсины D, E, ренин, пепсин, пресенилины и др.; к цистеиновым протеазам – каспазы, катепсины, кальпаины, амидофосфорилтрансферазы и др.; к сериновым – панкреатические ферменты, эластаза, нуклеопорин, лактоферрин, калликреины, олигопептидазы и др.; к металлопептидазам – амино- и карбоксипептидазы, АДАМ и др.; к металлопротеиназам относят цинк-зависимые ферменты межклеточного матрикса (коллагеназы, желатиназы, стромелизины); к треониновым – протеасомные ферменты; к глутаминовым – кислые нечувствительные к пепстатину протеазы – эколизины; к аспаргин-пептид-лиазам – белки оболочек вирусов, аутотранспортные белки, интеин-содержащие белки. К семейству U относят неизвестные и плохо изученные протеиназы [1–3].

Цели протеолиза: 1) посттрансляционный процессинг (препроальбумин → проальбумин → альбумин); 2) удаление инициирующего метионина, что определяет период полужизни белка (правило N-конца); 3) удаление сигнального пептида после целевого транспорта белка через мембрану; 4) расщепление белков-предшественников для формирования специфичных молекул (биорегуляторов, каскад свертывания крови, система комплемента); 5) внеклеточное (пищеварение) и внутриклеточное расщепление белков (лизосомы – аутофагия неселективный путь, при наличии пептидной последовательности KFERQ селективный путь; протеасомы – убиквитинирование и АТФ-зависимый протеолиз); 6) «сотовая» регуляция путем активации или деактивации ферментов метаболических и сигнальных путей, факторов транскрипции и рецепторов; 7) управление клеточным циклом через протеолиз циклинов убиквитин-опосредованным протеолитическим путем; 8) каспазы – протеолитические ферменты апоптоза; 9) аутопротеолитическое образование доменов фактора фон Виллебранда типа D, домена FrpC *Neisseria meningitidis*, разрыва связи Gly-Ser в подмножестве доменов белка спермы и др.; 10) самопереваривание тканей при панкреатите, активация лизосом при сахарном диабете, ревматоидном артрите, развитие болезни Альцгеймера и др.; 11) протеазы могут регулироваться антипротеазами или ингибиторами протеаз, и дисбаланс между протеазами и антипротеазами может приводить к заболеваниям, например, к разрушению тканей легких при эмфиземе. Такое разнообразие протеолитических ферментов обеспечивает их участие в судьбе, локализации и активности многих белков, управлении белок-белковыми взаимодействиями, создании новых биоактивных молекул, внесении вклада в обработку клеточной информации посредством генерирования, преобразования, усиления или отмены молекулярных сигналов. Как прямой результат этих множественных действий, протеиназы влияют на репликацию и транскрипцию ДНК, пролиферацию и дифференцировку клеток, морфогенез и ремоделирование тканей, тепловой шок, ангиогенез, нейрогенез, овуляцию, оплодотворение, заживление ран, мобилизацию стволовых клеток, гемостаз, свертывание крови, воспаление, иммунитет, аутофагию, старение, некроз, апоптоз и многие другие процессы [4–6]. Поэтому изменения в протеолитических системах лежат в основе множества патологических состояний. Например, в патогенезе синдрома Папийона–Лёфевра важную роль играет катепсин С, лимфомы Ходжкина – катепсины В, Н, L, S, дерматитов и заболеваний кишечника – металлопротеаза 17, поврежденной кожи – элилизин (MMP 28), рещесивного дистрофического буллезного эпидермолиза – MMP 1, лимфоаденопатии – DDP IV (сериновая протеаза), псориаза и ревматоидного артрита – арг-, ала-, лей-аминопептидазы и DDP IV, псориаза и себореи – каспаза 14, аллергического контактного дерматита – триптаза. Внутрикожный и подкожный пути введения терапевтических белков и вакцин могут снижать их биодоступность за счет протеолитических ферментов кожи, подкожной клетчатки, лимфатических путей и лимфатических тканей [7]. Это особенно важно для успешности вакцинации населения в условиях пандемии COVID-19 [8, 9]. В связи с пандемией особый интерес представляют также малоизученные природные резервуары коронавирусов в водной среде и сточных водах, а также их связь с водной биотой, включая легочных пресноводных моллюсков [10]. При этом важна связь протеолиза и регуляции вирулентности патогенов [11]. В настоящее время ферментативная терапия – очень перспективное направление лечения состояний, вызванных фиброзными и рубцовыми процессами и связанными

с чрезмерным накоплением коллагена. При недостаточности матричных металлопротеиназ используют коллагеназы из *Clostridium histolyticum* и из поджелудочной железы краба *Paralithodes camtschatica* из семейства *Lithodidae*. Целесообразен поиск более доступных и близких к человеческим протеинам протеолитических ферментов животных [12]. Используя флуоресцентные молекулярные маяки ближнего инфракрасного диапазона и методы инверсии, удалось получить трехмерные изображения протеазы *in vivo* (метод молекулярной томографии протеолитической активности) [13].

Разработка биологических и медицинских аспектов протеолиза требует использования модельных организмов. По классическим представлениям Г. Карпа [14] существуют шесть основных модельных организмов: *Escherichia coli* (для прокариот), *Saccharomyces cerevisiae* (для эукариот), *Arabidopsis thaliana* (для растений), *Caenorhabditis elegans* (клеточный цикл, нейробиология), *Drosophila melanogaster* (генетика), *Mus musculus* (человек). При доклинических испытаниях и отработке лечебных технологий обычно используются млекопитающие (крысы, кролики, собаки, свиньи, обезьяны). Однако из-за этических причин и дороговизны их применение сокращается. В то же время эксперименты на клеточных культурах не решают многих проблем межклеточного взаимодействия в тканях организма, требуют специального оборудования, реагентов и специалистов-морфологов. Поэтому внимание исследователей привлекают простейшие многоклеточные эукариотические организмы, в которых представлены основные типы клеток, межклеточных взаимодействий, метаболизма и регуляторных систем. Широко распространенные легочные пресноводные моллюски были кандидатами тест-организмов для нейробиологии и экотоксикологии [15]. Во второй половине XX века лауреаты Нобелевской премии А. Ходжкин, Э. Хаксли и Э. Кандел признали, что легочные пресноводные моллюски могут служить моделями для понимания основных нейробиологических процессов [16, 17]. К настоящему времени у них идентифицировано около 100 нейропептидов [18], определены механизмы памяти, в том числе определена роль микроРНК (*Lym-miR-137*) [19, 20], исследованы механизмы проявлений паркинсонизма [21] и др. В Республике Беларусь такие исследования осуществляются под руководством доктора биологических наук А. В. Сидорова [22]. Широко распространенный в водоемах моллюск *Lymnaea stagnalis* был признан модельным организмом для исследования воздействия водорастворимых химических агентов в Европейском союзе в 2010 г. [23]. Разработаны детальные требования к проведению строго контролируемых экотоксикологических исследований в течение всей или части жизни моллюска [24–27]. Инициаторами многочисленных исследований по этому направлению в Республике Беларусь являются доктора биологических наук А. П. Голубев и С. Е. Дромашко [28–30]. Обширные геномные, транскриптомные, протеомные и метаболомные данные, полученные для легочных пресноводных моллюсков, доступны в международных базах данных. Не аннотированный черновой геном *Lymnaea stagnalis* уже доступен в базе данных NCBI и в настоящее время предпринимаются усилия по созданию аннотированного генома. Это позволит моделировать процессы хиральности, репродукции, иммунитета, взаимодействия паразит–хозяин, острых и хронических адаптивных реакций и проявлений ряда заболеваний человека [15]. На легочных пресноводных моллюсках применен метод редактирования генома CRISPR / Cas9, удостоенный Нобелевской премии в 2020 г. [31, 32]. Это открывает новые возможности для использования легочных пресноводных моллюсков как модельных организмов различных патологических процессов, а также на доклинических этапах исследования фармакодинамики биологически активных веществ.

Цель данной работы – сравнительный анализ степени гомологии протеолитических ферментов у человека и легочных пресноводных моллюсков.

Материал и методы исследования. В качестве сравниваемых животных и возможных источников получения протеолитических ферментов избраны широко распространенные в водоемах Европы легочные пресноводные моллюски – прудовик обыкновенный (*Lymnaea stagnalis*), также катушка роговая (*Planorbarius corneus*). Ближайшим родственником последней является хорошо изученная *Biomphalaria glabrata*, в частности, известен ее полный аннотированный геном [33, 34]. Учитывая это, был проведен сравнительный анализ гомологии протеолитических ферментов человека (*Homo sapiens*) и *Biomphalaria glabrata*.

Поиск и отбор нуклеотидных последовательностей, кодирующих белки человека, осуществлялся на сервере <https://www.ensembl.org>; поиск гомологичных последовательностей для моллюсков – на сервере <https://www.ncbi.nlm.nih.gov> при помощи ресурса BLAST; описание белков для человека было взято с ресурса <https://www.uniprot.org>; парное выравнивание и сравнение последовательностей человека и моллюсков выполнено в программе MEGA 5.2.; построение 3D-структур ферментов для моллюсков осуществлялось на сервере <https://swissmodel.expasy.org> по шаблону 3D-структуры ферментов человека, найденных в банке данных трехмерных структур белков и нуклеиновых кислот <http://www.rcsb.org>. В работе использовали следующий алгоритм: поиск нуклеотидной последовательности → построение аминокислотных последовательностей сравниваемых белков → их парное выравнивание и оценка степени гомологии первичных структур NS (нуклеотидные последовательности) AAS (аминокислотные последовательности) → оценка третичных структур по архитектуре молекул и их доменной организации [35]. Исследование мотивов и строения активных центров ферментов не входило в задачи данной работы.

В работе проведен анализ 75 белков (в скобках курсивом обозначены гены):

семи ферментов нерегулируемого протеолиза в том числе: **КФ 3.4.11.** – Aminopeptidase B (*RNPEP*); Leucyl aminopeptidases (*LAP*); **КФ 3.4.21.** – Prolyl oligopeptidase (*PREP*); ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit (*CLPP*); Furin или PACE (Paired basic Amino acid Cleaving Enzyme – «фермент, расщепляющий белок в месте спаренных основных аминокислот») (*FURIN*); **КФ 3.4.23.** – Signal Peptide Peptidase (*SPP*); **КФ 3.4.24.** – Thimet oligopeptidases (*THOPI*);

шести ферментов регулируемого протеолиза (убиквитин-протеасомного пути) в том числе: **КФ 2.3.2.** – Ubiquitin conjugating factor E4 B-like (*TcasGA2*); Ubiquitin conjugating factor E2 W-like (*UBE2W*); Ubiquitin conjugation factor E2 E1 (*UBE2E1*); E3 ubiquitin ligase (WD40 domain) (*RFDW2*); Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 5 (*UBA5*); **КФ 3.4.19.** – Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L5 (*UCHL5*);

девяти белков убиквитин-подобных модификаторов и убиквитина: SUMO2 и SUMO3 (Small ubiquitin-like modifier); NEDD8 (Neuronal-precursor cell-expressed developmentally down-regulated protein 8); ISG15 (IFN-stimulated gene 15); GABARAP (Gamma-aminobutyric acid receptor-associated protein); FAT10 (F-adjacent transcript-10); UFM1 (Ubiquitin-fold modifier-1); URM1 (Ubiquitin-related modifier-1); Ub (ubiquitin);

20 внеклеточных ферментов в том числе: **КФ 3.4.15.1** – Angiotensin-converting enzyme (*ACE*); **КФ 3.4.17.** – Angiotensin-converting enzyme 2 (*ACE2*); Carboxypeptidase B2 (*CPB2*); **КФ 3.4.11.** – Chymotrypsinogen B (*CTRB1*); Chymotrypsinogen B2 (*CTRB2*); Chymotrypsin-C (*CTRC*); Chymotrypsin-like elastase family member 2A (*CELA2A*); Kallikrein-1 (*KLK1*); Plasma kallikrein (*KLKB1*); Plasminogen (*PLG*); Prothrombin (*F2*); **КФ 3.4.23.** – Pepsin A-3 (*PGA3*); Pepsin A-4 (*PGA4*); Pepsin A-5 (*PGA5*); Renin (*REN*); Gastricsin (Pepsinogen C) (*PGC*); **КФ 3.4.24.** – Matrix metalloproteinase-9 (*MMP9*); Matrix metalloproteinase-17 (*MMP17*); Matrix metalloproteinase-21 (*MMP21*); Matrix metalloproteinase-24 (*MMP24*);

33 внутриклеточных фермента в том числе: **КФ 3.4.11.** – Glutamyl aminopeptidase (*ENPEP*); Cytosol aminopeptidase (*LAP3*); Methionine aminopeptidase 1 (*METAP1*); Methionine aminopeptidase 1 mitochondrial (*METAP1D*); Methionine aminopeptidase 2 (*METAP2*); Aspartyl aminopeptidase (*DNPEP*); Aminopeptidase Q (*LVRN*); Aminopeptidase B (*RNPEP*); Aminopeptidase N (*ANPEP*); Aminopeptidase O (*AOPEP*); **КФ 3.4.17.** – Carboxypeptidase A1 (*CPA1*); Carboxypeptidase A2 (*CPA2*); Carboxypeptidase A4 (*CPA4*); Carboxypeptidase A6 (*CPA6*); Carboxypeptidase B1 (*CPB1*); Carboxypeptidase D (*CPD*); **КФ 3.4.21.** – Granzyme-B (*GZMB*); Hepsin (*HPN*); Rhomboid-related protein 1 (*RHBDL1*); Rhomboid-related protein 2 (*RHBDL2*); **КФ 3.4.22.** – Caspase 1 (*CASP1*); Caspase 3 (*CASP3*); Caspase 7 (*CASP7*); Caspase 8 (*CASP8*); Calpain 1 (*CAPN1*); Calpain 2 (*CAPN2*); **КФ 3.4.23.** – Cathepsin D (*CTSD*); Cathepsin E (*CTSE*); Presenilin-1 (*PSEN1*); Presenilin-2 (*PSEN2*); Signal Peptide Peptidase (*SPP*); **КФ 3.4.24.** – Nephrylin 2 (*NEP2*); Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 17 (*ADAM17*).

Для сравнения были взяты два фермента пуринового обмена, важного для синтеза нуклеотидов: Amidophosphoribosyl-transferase (phosphoribosyl pyrophosphate amidotransferase) (**КФ 2.4.2.14**) (*PPAT*) и Adenylosuccinate lyase (adenylosuccinate) (4.3.2.2) (*ADSL*).

Гомология изученных белков по NS- и AAS-последовательностям находилась в пределах 26,4–95 %, поэтому условно диапазон 20–40 % был принят как низкий уровень гомологии, 41–70 % – средний уровень гомологии и более 70 % – высокий уровень гомологии.

Результаты и их обсуждение. При сравнительном анализе ферментов нерегулируемого протеолиза человека и *Biomphalaria glabrata* установлено, что цитозольная сериновая пептидаза Prolyl oligopeptidase, расщепляющая пептидную связь С-концевого пролина, имеет гомологию по NS – 66 %, по AAS – 62 %; ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit – сериновая протеаза, содержащая каталитическую триаду Asp-His-Ser, гомологична по NS – 68 %, по AAS – 67 %; Furin – сериновая протеаза клеток животных, расположенная в аппарате Гольджи, гомологична по NS – 69 %, по AAS – 68 %; Signal Peptide Peptidase – внутримембранная аспартил-протеаза гомологична по NS – 67 %, по AAS – 68 %; Amino-peptidase B – катализирует отщепление от пептидов N-концевых α-аминокислотных остатков, а также гидролиз α-амидов аминокислот и ее гомология по NS – 66 %, по AAS – 50 %; Leucyl aminopeptidases (cytosol aminopeptidase) – фермент, преимущественно катализирующий гидролиз лейциновых остатков на N-конце пептидов и белков, гомологичен по NS – 66 %, по AAS – 55 % и, наконец, Thimet oligopeptidases – семейство металлопептидаз, участвующих в деградации пептидов – брадикинина, нейротензина, ангиотензина I и пептида Aβ, имеют гомологию по NS – 66 %, по AAS – 63 %.

Сравнительный анализ ферментов регулируемого протеолиза показал, что Ubiquitin conjugating factor E4 B-like – опосредующий сборку полиубиквитиновых цепей на субстратах, убиквитинированных другой убиквитинилигазой E3 гомологичен по NS – 72 %, по AAS – 49 %; Ubiquitin conjugation factor E2 W-like, принимающий убиквитин из комплекса E1 и катализирующий его ковалентное присоединение к другим белкам, гомологичен по NS – 75 %, по AAS – 74 %. Ubiquitin conjugation factor E2 E1 – принимает убиквитин из комплекса E1 и катализирует его ковалентное присоединение к другим белкам гомологичен по NS – 75 %, по AAS – 88 %; Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L5 – деубиквитирующий фермент, связанный с регуляторной субъединицей 19S протеасомы 26S гомологичен по NS – 72 %, по AAS – 67 %; Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 5 – специфически катализирует первую стадию присоединения модификаторов UFM1 и SUMO2 и имеет гомологию по NS – 76 %, по AAS – 59 % и E3 ubiquitin ligase – распознает белковый субстрат и способствует или непосредственно катализирует перенос убиквитина от E2 к белковому субстрату – гомология по NS – 69 %, по AAS – 51 %.

Для сравнения приведены данные о двух ферментах пуринового обмена: Amidophosphoribosyl-transferase – фермент, катализирующий превращение 5-фосфорибозил-1-пирофосфата в 5-фосфорибозил-1-амин, гомология по NS – 68 %, по AAS – 67 %, Adenylosuccinate lyase (adenylosuccinase) – фермент, катализирующий превращение аденилсукцината в AMP и фумарат, гомологичен по NS – 64 %, по AAS – 60 %.

Известно, что убиквитин-подобные модификаторы SUMO (Small ubiquitin-like modifier) вовлечены в регуляцию ряда клеточных процессов: ядерный транспорт, репликацию и репарацию ДНК, транскрипцию, апоптоз, стабилизацию белков. У позвоночных обнаружено 4 гомологичных гена – *SUMO1*, *SUMO2*, *SUMO3*, *SUMO4*. Подобно убиквитинированию, присоединение SUMO к субстрату – сумоилирование (sumoylation) – происходит через образование изопептидной связи между С-концевым остатком Gly в молекуле SUMO и ε-аминогруппой остатка Lys в молекуле субстрата – гомология по AAS для *SUMO2* – 33 % и для *SUMO3* – 35 %; последовательностей *SUMO1* и *SUMO4* у моллюска не обнаружено. Белок NEDD 8 (Neuronal-precursor cell-expressed developmentally down-regulated protein 8) подавляет экспрессию набора генов в предшественниках нервных клеток во время развития мозга; его гомология по AAS составляет 92 %. Белок ISG15 (IFN-stimulated gene 15) вовлечен в регуляцию иммунного ответа, клеточный рост и дифференцировку; он гомологичен по AAS на 33 %. Белок GABARAP у млекопитающих вовлечен в регуляцию аутофагии при нейродегенеративных, нервно-мышечных и онкозаболеваниях, бактериальных и вирусных инфекциях характеризуется гомологией по NS – 78 %, по AAS – 95 %. Фактор FAT10 (F-adjacent transcript-10) – белок, который кодируется геном главного комплекса гистосовместимости и индуцируется TNFα и γ-интерфероном и состоит из двух убиквитин-подобных доменов, один из которых может напрямую связываться с 26S протеасомой и опосре-

довать убиквитин-независимую деградацию белков; его гомология по AAS составляет 32 %. Модификатор UFM1 (Ubiquitin-fold modifier-1) с пока не установленной биологической функцией гомологичен по NS – 83 %, по AAS – 89 %. Белок URM1 (Ubiquitin-related modifier-1) ковалентно конъюгируется через изоопептидную связь с остатками лизина целевых белков и его гомология по AAS равна 64 %. Для моллюска *Lymnaea stagnalis* была найдена только одна аминокислотная последовательность, которая при парном выравнивании давала процент сходства с несколькими модификаторами – NEDD8 (56 %), ISG15 (33 %), FAT10 (31 %).

Убиквитин (Ubiquitin) представляет собой небольшой (8,6 кДа) регуляторный белок, обнаруженный в большинстве тканей эукариотических организмов. В геноме человека четыре гена кодируют убиквитин: *UBB*, *UBC*, *UBA52* и *RPS27A*. При сравнительном анализе этих четырех генов были получены следующие данные для *Biomphalaria glabrata*: *UBB* – гомология по NS – 81 %, по AAS – 99 %; *UBC* – гомология по NS – 79 %, по AAS – 100 %; *UBA52* – гомология по NS – 79 %, по AAS – 94 %; *RPS27A* – гомология по нуклеотидной последовательности – 81%, по аминокислотной – 93 %. Для *Lymnaea stagnalis* были получены несколько иные данные: *UBB* – гомология по NS – 82 %, по AAS – 100 %; *UBC* – гомология по NS – 84 %, по AAS – 100 %; *UBA52* – гомология по NS – 82 %, по AAS – 100 %; *RPS27A* – гомология по NS – 80 %, по AAS – 93 %. Полученные данные характеризуют высокую степень консерватизма убиквитина.

К внеклеточным протеолитическим ферментам можно отнести ферменты внутриполостного протеолиза (пепсин, трипсин, химотрипсин и др.), кровеносного русла (протеазы системы свертывания крови, фибринолиза, калликреин-кининовой, ренин-ангиотензиновой систем, протеолитические ферменты комплемента и др.), а также экстраклеточного пространства и внешней поверхности клеточной мембраны.

При сравнительном анализе внеклеточных протеолитических ферментов человека и *Biomphalaria glabrata* установлено, что Pepsin (пепсин) и его изоформы A-3 – A-5, отличающиеся по оптимуму pH, имеют гомологию по AAS около 43 %. Renin (ренин) – компонент ренин-ангиотензиновой системы, регулирующий кровяное давление, протеолитический фермент и Gastricisin (пепсиноген C) – протеиназа аспарагинового типа действия гомологичны по AAS на 40,8 %. Chymotrypsin-C (химотрипсин) регулирует активацию и деградацию трипсиногенов и прокарбокситрипсидазы, Chymotrypsin-like elastase family member 2A – подсемейство сериновых протеаз, которые гидролизуют многие белки в дополнение к эластину, Chymotrypsinogen B – сериновый тип эндопептидазной активности имеет гомологию AAS на уровне 34,5 %. Kallikrein-1 расщепляет связи Met-Lys и Arg-Ser в кининогене с высвобождением Lys-брадикинина, имеет гомологию AAS – 26,4 %; Plasma kallikrein расщепляет связи Lys-Arg и Arg-Ser и активирует в ответной реакции фактор XII свертывания крови, участвует в высвобождении брадикинина из кининогена и превращения проренина в ренин – характеризуются низким уровнем гомологии по AAS в 29,5 %. Angiotensin-converting enzyme (ангиотензинпревращающий фермент – АПФ) — циркулирующий во внеклеточном пространстве фермент (экзопептидаза), катализирующий расщепление декапептида ангиотензина I до октапептида ангиотензина II характеризуется гомологией по NS – 66,8 % и по AAS – 46,3 %; Angiotensin-converting enzyme 2 (ангиотензинпревращающий фермент 2 – АПФ2) — мембранная цинк-содержащая экзопептидаза, также катализирующая превращение ангиотензина I в ангиотензина II; секретируемая форма, образуется за счет протеолитического расщепления протеазой ADAM17. АПФ2 человека является рецептором и точкой входа в клетку некоторых коронавирусов и характеризуется гомологией по AAS в 40,3 %. Prothrombin (протромбин) синтезируется в печени и при повреждении сосудов превращается в активный фермент тромбин, который путем гидролиза пептидных связей после Arg и Lys превращает фибриноген в фибрин. Протромбин имеет гомологию по AAS 33,3 %. Plasminogen (плазминоген) – циркулирующий профермент, из которого образуется плазмин (фибринолиз) и ангиостатин (ингибирование роста сосудов) гомологичен по AAS на 38,4 %. Matrix metalloproteinases (матриксные металлопротеиназы – MMP) – семейство внеклеточных цинк-зависимых эндопептидаз, способных разрушать различные типы белков внеклеточного матрикса и характеризуются низким уровнем гомологии по AAS: MMP-9 – 28,3 %, MMP-17 – 39,1 %, MMP-21 40,8 %, MMP-24 36,9 %. В то же время металлопротеиназы MMP-21 (играют особую роль в генерации лево-правой

асимметрии во время эмбриогенеза и может действовать как негативный регулятор сигнального пути NOTCH) и MMP-24 (опосредует расщепление N-кадгерина и действует как регулятор нейрон-нейронных взаимодействий и покоя нервных стволовых клеток) характеризуются высокой степенью гомологии – 71,7 и 76,4 % соответственно. Carboxypeptidase B2 (карбоксипептидаза B2) отщепляет C-концевые остатки аргинина или лизина от биологически активных пептидов типа кининов или анафилатоксинов в кровотоке и подавляет фибринолиз, удаляя C-концевые остатки лизина из фибрина после частичного разрушения плазмином, имеет гомологию AAS в 36,0 %.

К внутриклеточным протеолитическим ферментам можно отнести ферменты внутримембранного, цитоплазматического и лизосомального протеолиза. Исследована гомология семи ферментов мембранного типа протеолиза человека и *Biomphalaria glabrata*.

Пресенилины — семейство трансмембранных белков, составляющих часть протеазного комплекса γ -секретазы. Presenilin-1 и Presenilin-2 гомологичны по NS – 68,3 и 66,6 % соответственно, а по AAS – 54,4 и 55,3 % соответственно. Интересно, что близкий уровень гомологии обнаружен при сравнении этих ферментов у человека и моллюска *Lymanea stagnalis*: по NS – 67,4 и 68,5 % соответственно, по AAS – 54,2 и 66,1 % соответственно. Средним уровнем гомологии отличается Signal Peptide Peptidase (пептидаза сигнальных пептидов) по NS – 67,1% и по AAS – 68,1%. Пограничными между низким и средним уровнями гомологии характеризуются сериновая протеаза Hepsin (гепсин), Rhomboid-related protein 1 и Rhomboid-related protein 2 по AAS – 37,3, 43,0 и 37,0 % соответственно. Фермент Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 17 (АДАМ17) отвечает за протеолитическое высвобождение ряда белков клеточной поверхности, включая ACE2, и действует как активатор пути Notch, гомологичен по NS – 68,4 % и по AAS – 35,3 %. Цистеиновые протеазы каскада каспаз (участвующих в апоптозе) – Caspase1, Caspase 3, Caspase 7, Caspase 8 оказались гомологичными по AAS на 28,6 %, 50,4, 30,1 и 40,0 % соответственно. В качестве эффекторов апоптоза рассматриваются кальпаины (Calpain 1, Calpain 2) – представители семейства цитозольных Ca^{2+} -активируемых цистеиновых протеаз с гомологией по AAS – 45,0 %. Granzyme-B (гранзим B) представляет собой сериновую протеазу, наиболее часто обнаруживаемую в гранулах естественных клеток-киллеров (NK-клетки) и цитотоксических Т-клеток. Он секретируется этими клетками вместе с пороборазующим белком перфорином, опосредуя апоптоз в клетках-мишенях. Гомология гранзима B по AAS низкая и составляет 27,3 %. Лизосомальные ферменты катепсины (Cathepsin D и Cathepsin E) характеризуются средним уровнем гомологии по AAS 51,2 % и 45,2 % соответственно. Neprilysin (неприлизин) – цинк-зависимая металлопротеиназа, которая инактивирует несколько пептидных гормонов, включая глюкагон, энкефалины, вещество P, нейротензин, окситоцин и брадикинин, гомологична по AAS – 40,4 %. Комплекс аминопептидаз, включающий глутамиламинопептидазу, цитозольную Zn^{2+} -зависимую аминопептидазу, метионин-аминопептидазы 1, 2, аспартат-аминопептидазу, аминопептидазы Q, B, N, O, гомологичны по NS в диапазоне 65,4–72,4 %, а по AAS в диапазоне 31,2–71,1 %. Карбоксипептидазы (A1, A2, A4, A6, B1, B2, D) гомологичны по AAS в диапазоне 35,5–70,8 %.

Средние данные оценки гомологии первичных структур протеолитических ферментов *Homo sapiens* и моллюска *Biomphalaria glabrata* представлены в таблице.

Из анализа данных таблицы следует, что наиболее консервативными по кодирующим нуклеотидным последовательностям являются убиквитин-подобные модификаторы, ферменты регулируемого протеолиза и внеклеточные ферменты, а по аминокислотным последовательностям – убиквитин-подобные модификаторы, ферменты регулируемого и нерегулируемого протеолиза. Однако по мере расширения исследований по нуклеотидным и аминокислотным последовательностям приведенные данные могут уточняться.

Следует отметить, что при парном выравнивании нуклеотидных последовательностей ферментов нерегулируемого протеолиза человека и моллюска *Biomphalaria glabrata* было обнаружено, что показатели Active site, Binding site и Metal binding для 7 ферментов были полностью гомологичны у человека и моллюска (Prolyl oligopeptidase, Thimet oligopeptidases, ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit, Leucyl aminopeptidases, Signal Peptide Peptidase, Adenylosuccinate lyase, Aminopeptidase B), а 2 фермента – гомологичны частично (Amidophosphoribosyltransferase и Furin). При парном выравнивании нуклеотидных последовательностей ферментов регулируемого

Оценка гомологии первичных структур протеолитических ферментов человека *Homo sapiens*
и моллюска *Biomphalaria glabrata*

Assessment of the homology of the primary structures of *Homo sapiens*
and the mollusk *Biomphalaria glabrata* proteolytic enzymes

Исследованные белки	Количество	Нуклеотидные последовательности (NS)		Аминокислотные последовательности (AAS)	
		покрытие, %	гомология, %	покрытие, %	гомология, %
Ферменты нерегулируемого протеолиза	7	32,5 (16–61)	66,8 (66–68) Средний уровень	90,0 (79–99)	61,9 (50–68) Средний уровень
Ферменты регулируемого протеолиза	6	17,0 (4–31)	73,1 (69–76) Высокий уровень	85,8 (65–99)	64,7 (49–88) Средний уровень
Убиквитин-подобные модификаторы	9	23,5 (21–26)	80,5 (78–83) Высокий уровень	83,3 (47–100)	66,6 (32–95) Средний уровень
Внеклеточные ферменты	20	8,3 (2–34)	71,6 (67–76) Высокий уровень	88,8 (33–98)	37,2 (26–46) Низкий уровень
Внутриклеточные ферменты	33	24,8 (3–61)	67,8 (65–72) Средний уровень	77,7 (44–98)	45,2 (27–71) Средний уровень

Примечание. Приведены средние величины, в скобках показан диапазон показателей.

протеолиза человека и моллюска *Biomphalaria glabrata* было обнаружено, что показатели Active site, Binding site and Metal binding для 4 ферментов были полностью гомологичны у человека и моллюска (SUMO, NEDD8, FAT10, ISG15), для 3 ферментов активные сайты и сайты связывания не описаны (UFM1, URM1, GABARAP). Парное выравнивание нуклеотидных последовательностей кодирующих генов убиквитина человека и моллюска *Biomphalaria glabrata* и *Lymnaea stagnalis* продемонстрировало, что показатели Active site, Binding site and Metal binding полностью гомологичны в 4 нуклеотидных последовательностях как *Biomphalaria glabrata*, так и *Lymnaea stagnalis*. Ранее было выяснено, что 6 аминокислот трипсина у *Homo sapiens* и у *Biomphalaria glabrata* связываются с этионином в близких локусах молекул фермента: у *Homo sapiens* – Asp 189, Ser 190, Gln 192, Ser 195, Val 213, Cys 220, а у *Biomphalaria glabrata* – Asp 224, Ser 225, Gln 227, Ser 230, Val 248, Cys 254. Гомология молекул трипсина человека и моллюска составила 26,6 % [36].

Приведенные материалы о гомологии ферментов и регуляторных белков протеолиза у человека и легочных пресноводных моллюсков доказывают возможность использования последних в качестве модельных организмов для моделирования нарушений протеолитических процессов и доклинического испытания регулирующих протеолиз субстанций, а также получения из аквакультур этих гидробионтов ферментативных и регуляторных белков протеолиза. Кроме того, легочные пресноводные моллюски могут быть организмами для воспроизведения и экспериментального лечения запрограммированной гибели клеток, а также заболеваний обмена веществ, опорно-двигательного аппарата и канцерогенеза с лабораторным контролем в виде биомаркеров протеолиза [37–40].

Заключение. Гомология ферментов по нуклеотидным последовательностям у человека и легочных пресноводных моллюсков при анализе нерегулируемого протеолиза составляет 66–68 %, регулируемого протеолиза – 69–76 %, убиквитин-подобных модификаторов – 78–83 %, внеклеточных ферментов – 67–76 % и внутриклеточных ферментов – 65–72 %. Эволюционный консерватизм протеолитических ферментов, наличие незамкнутого кровообращения, позволяющего доставлять изучаемые субстанции из гемолимфы непосредственно к клеткам-мишеням, позволяют использовать этих животных в качестве дешевых и удобных в содержании тест-организмов. Практическое значение достаточно высокой степени гомологии протеолитических ферментов у людей и легочных пресноводных моллюсков обосновывает целесообразность формирования аквакультуры моллюсков, для получения из их тканей белковых ферментативных препаратов протеолитического действия в рамках задач биофармацевтики, косметики и пищевой промышленности.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Rawlings, N. D. MEROPS: the peptidase database / N. D. Rawlings, A. J. Barrett, A. Bateman // *Nucleic Acids Res.* – 2010. – Vol. 38, N 1, – P. D227–D233. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp971>
2. Molecular basis of substrate recognition and degradation by human presequence protease / J. V. King [et al.] // *Structure.* – 2014. – Vol. 22, N 7. – P. 996–1007. <https://doi.org/10.1016/j.str.2014.05.003>
3. Oda, K. New families of carboxyl peptidases: serine-carboxyl peptidases and glutamic peptidases / K. Oda // *J. Biochemistry.* – 2012. – Vol. 151, N 1. – P. 13–25. <https://doi.org/10.1093/jb/mvr129>
4. Чиркин, А. А. Внутриклеточный сигналинг и протеолиз / А. А. Чиркин // *Біологія і хімія.* – 2019. – № 4(76). – С. 6–17.
5. Веремеенко, К. Н. Протеолиз в норме и при патологии / К. Н. Веремеенко, О. П. Голобородько, А. И. Кизим. – Киев: Здоров'я, 1988. – 200 с.
6. Косинец, А. Н. Протеиназы и их ингибиторы в гнойной хирургии и онкологии / А. Н. Косинец, Л. Н. Кирпиченко. – Витебск: ВГМУ, 2003. – 409 с.
7. Proteolysis and oxidation of therapeutic proteins after intradermal or subcutaneous administration / N. Varkhed [et al.] // *Journal of Pharmaceutical Sciences.* 2020. – Vol. 109, N 1. – P. 191–205. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2019.08.005>
8. Robson, B. Computers and viral diseases. Preliminary bioinformatics studies on the design of a synthetic vaccine and a preventative peptidomimetic antagonist against the SARS-CoV-2 (2019-nCoV, COVID-19) coronavirus / B. Robson // *Comput. Biol. Med.* – 2020. – Vol. 119. – P. 103670. <https://doi.org/10.1016/j.combiomed.2020.103670>
9. Robson, B. COVID-19 Coronavirus spike protein analysis for synthetic vaccines, a peptidomimetic antagonist, and therapeutic drugs, and analysis of a proposed achilles' heel conserved region to minimize probability of escape mutations and drug resistance / B. Robson // *Comput. Biol. Med.* – 2020. – Vol. 121. – P. 103749. <https://doi.org/10.1016/j.combiomed.2020.103749>
10. Wartecki, A. On the coronaviruses and their associations with the aquatic environment and wastewater / A. Wartecki, P. Rzymiski // *Water.* – 2020. – Vol. 12, N 6. – P. 1598. <https://doi.org/10.3390/w12061598>
11. Proteolysis of virulence regulator ToxR is associated with entry of *Vibrio cholerae* into a Dormant State / S. Almagro-Moreno [et al.] // *PLoS Genet.* – 2015. – Vol. 11, N 4. – P. e1005145. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005145>
12. Collagenolytic enzymes and their applications in biomedicine / A. B. Shekhter [et al.] // *Current Medicinal Chemistry.* – 2019. – Vol. 26, N 3. – P. 487–505. <https://doi.org/10.2174/092986732466671006124236>
13. Fluorescence molecular tomography resolves protease activity *in vivo* / V. Ntziachristos [et al.] // *Nat. Med.* – 2002. – Vol. 8, N 7. – P. 757–761. <https://doi.org/10.1038/nm729>
14. Karp's cell and molecular biology: concepts and experiments / G. Karp, J. Iwasa, W. Marchall. – 8th. ed. – Danvers: Wiley, 2015. – 829 p.
15. The natural history of model organisms. The unlimited potential of the great pond snail, *Lymnaea stagnalis* / I. Fodor [et al.] // *eLife.* – 2020. – Vol. 9. – e56962. <https://doi.org/10.7554/eLife.56962>
16. Hodgkin, A. L. A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve / A. L. Hodgkin, A. F. Huxley // *J. Physiol.* – 1952. – Vol. 117, N 4. – P. 500–544. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1952.sp004764>
17. Kupfermann, I. Neuronal controls of a behavioral response mediated by the abdominal ganglion of *Aplysia* / L. Kupfermann, E. R. Kandel // *Science.* – 1969. – Vol. 164, N 3881. – P. 847–850. <https://doi.org/10.1126/science.164.3881.847>
18. Benjamin, P. R. Peptidergic systems in the pond snail *Lymnaea*: From genes to hormones and behavior / P. R. Benjamin, I. Kemenes // *Advances in Invertebrate (Neuro) Endocrinology* / Eds.: S. Saleuddin, A. B. Lange, I. Orchard. – New York: Apple Academic Press, 2020. – P. 213–254. <https://doi.org/10.1201/9781003029854-7>
19. CREB2-targeting microRNA is required for long-term memory after single-trial learning / S. A. Korneev [et al.] // *Sci. Rep.* – 2018. – Vol. 8, N 1. – P. 3950. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-22278-w>
20. *Lymnaea stagnalis* as model for translational neuroscience research: From pond to bench / V. Rivi [et al.] // *Neurosci. Biobehav. Rev.* – 2020. – Vol. 108. – P. 602–616. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2019.11.020>
21. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) has a neuroprotective function in dopamine-based neurodegeneration in rat and snail parkinsonian models / G. Maasz [et al.] // *Disease Models and Mechanisms.* – 2017. – Vol. 10, N 2. – P. 127–139. <https://doi.org/10.1024/dmm.027185>
22. Сидоров, А. В. Нейромоделлярное действие пероксида водорода на центральные нейроны пищевой сети моллюска *Lymnaea stagnalis* // *Журн. эволюц. биохим. и физиол.* – 2017. – Т. 53, № 6. – С. 437–443.
23. Detailed review paper on mollusks-cycle toxicity testing. Series on testing and assessment. N 121 [Electronic Resource] / OECD Environment, Health and Safety Publications. – Paris: Environment directorate organization for economic co-operation and development, 2010. – Mode of access: <https://www.oecd-ilibrary.org/director/9789264221468-en.pdf?expres=1618472688&id=id&accname=guest&checksum=0C664FF27BEAFCA64AA28DEB6FF0EEB>
24. *Lymnaea stagnalis* as a freshwater model invertebrate for ecotoxicological studies / J. Amorim [et al.] // *Sci. Total Environ.* – 2019. – Vol. 669. – P. 11–28. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.03.035>
25. Atli, G. Characterization and response of antioxidant systems in the tissues of the freshwater pond snail (*Lymnaea stagnalis*) during acute copper exposure / G. Atli, M. Grosell // *Aquat. Toxicol.* – 2016. – Vol. 17. – P. 38–44. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2016.04.007>
26. Baudrot, V. New Insights to compare and choose TKTD models for survival based on an Interlaboratory study for *Lymnaea stagnalis* exposed to Cd / V. Baudrot [et al.] // *Environ. Sci. Technol.* – 2018. – Vol. 52, N 3. – P. 1582–1590. <https://doi.org/10.1021/acs.est.7b05464>

27. Cremazy, A. Chronic toxicity of binary mixtures of six metals (Ag, Cd, Cu, Ni, Pb, and Zn) to the great pond snail *Lymnaea stagnalis* / A. Cremazy, K. V. Brix, C. M. Wood // *Environ. Sci. Technol.* – 2018. – Vol. 52, N 10. – P. 5979–5988. <https://doi.org/10.1021/acs.est.7b06554>
28. Голубев, А. П. Динамика процессов радиоадаптации в популяциях моллюсков из водоемов Белорусского сектора зоны загрязнения ЧАЭС / А. П. Голубев // *Экологический вестник.* – 2012. – №2 (20). – С. 44–57.
29. Оценка совместного влияния температурного стресса, загрязнения и паразитарной инвазии на активность ферментов антиоксидантной системы у легочного моллюска *Lymnaea stagnalis* / А. С. Хомич [и др.] // *Сибирский экол. журн.* – 2017. – № 2. – С. 184–192. <https://doi.org/10.15372/sej20170208>
30. Дромашко, С. Е. Влияние тяжёлых металлов на большого прудовика *Lymnaea stagnalis* L. / С. Е. Дромашко, С. Н. Шевцова, А. С. Бабенко. – Минск: Беларус. навука, 2018. – 172 с.
31. Perry, K. J. CRISPR/Cas9-mediated genome modification in the mollusc, *Crepidula fornicata* / K. J. Perry, J. Q. Henry // *Genesis.* – 2015. – Vol. 53, N 2. – P. 237–244. <https://doi.org/10.1002/dvg.22843>
32. Abe, M. The development of CRISPR for a mollusc establishes the form *Lsdia1* as the long-sought gene for snail dextral/sinistral coiling / M. Abe, R. Kuroda // *Development.* – 2019. Vol. 146, N 9:dev175976. <https://doi.org/10.1242/dev.175976>
33. Chirkin, A. A. Proteolysis-antiproteolysis system and possible mechanism of the divergence of *Lymnaea stagnalis* and *Planorbis corneus* / A. A. Chirkin, V. V. Dolmatova, O. M. Balaeva-Tichomirova // The 3rd International symposium on EuroAsian Biodiversity, 05–08 July, 2017. – Minsk, BSU, 2017. – P. 236.
34. Chirkin, A. A. Comparative analysis of proteolytic enzymes of human and pulmonary freshwater molluscs / A. A. Chirkin, V. V. Dolmatova // *Agr. bio. div. Impr. Nut., Health Life Qual.* – 2018. – P. 234–242. <https://doi.org/10.15414/agrobiodiversity.2018.2585-8246.234-242>
35. Чиркин, А. А. Биоинформатический анализ внутриклеточных протеолитических ферментов человека и легочных пресноводных моллюсков / А. А. Чиркин, В. В. Долматова // *Новости мед.-биол. наук.* – 2018. – Т. 18, № 4. – С. 11–16.
36. Изучение системы протеолиз-антипротеолиз в тканях легочных пресноводных моллюсков при введении этионина / А. А. Чиркин [и др.] // *Новости мед.-биол. наук.* 2017. – Т. 15, № 2. – С. 38–45.
37. Семенов, И. О. Биоинформатическое исследование сигнальных путей апоптоза у человека и легочных пресноводных моллюсков / И. О. Семенов, А. А. Чиркин // *Физико-химическая биология как основа современной медицины: тез. докл. Республ. конф. с междунар. участием (к 80-летию Т. С. Морозкиной), Минск, 29 мая 2020 г.* / под ред. А. Д. Тагановича, В. В. Хрусталёва, Т. А. Хрусталёвой. – Минск : БГМУ, 2020. – С. 164–165.
38. Моделирование биохимических признаков сахарного диабета у легочных пресноводных моллюсков / А. А. Чиркин [и др.] // *Новости мед.-биол. наук.* 2016. – Т. 14, № 3. – С. 28–32.
39. Ковтун, Н. Е. Остеоиндуктивные свойства перламутра и его компонентов / Н. Е. Ковтун, А. А. Сеид-Гусейнов, А. Д. Повшенко // *Современные проблемы биохимии* / под ред. А. П. Солодкова и А. А. Чиркина. – Витебск: ВГУ, 2010. – С. 358–383.
40. Aguilera, F. Neoplasia in mollusks: what does it tell us about cancer in humans? / F. Aguilera // *J. Genet. Disord.* – 2017. – Vol.1, N 1. – P. 7–16.

References

1. Rawlings N. D., Barrett A. J., Bateman A. MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Res.* 2010, vol. 38, no. 1, D227–D233. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp971>
2. King J. V., Liang W. G., Scherpelz K. P., Schilling A. B., Meredith S. C., Tang W. J. Molecular basis of substrate recognition and degradation by human presequence protease. *Structure.* 2014, vol. 22, no 7, pp. 996–1007. <https://doi.org/10.1016/j.str.2014.05.003>
3. Oda K. New families of carboxyl peptidases: serine-carboxyl peptidases and glutamic peptidases. *Journal of Biochemistry.* 2012, vol. 151, no. 1, pp. 13–25. <https://doi.org/10.1093/jb/mvr129>
4. Chirkin A. A. Intracellular signaling and proteolysis. *Biyologiya i khimiya = Biology and chemistry*, 2019, no.4(76), pp. 6–17 (in Russian).
5. Veremeenko K. N., Goloborodko O. P., Kizim A. I. *Proteolysis in normal and pathological conditions.* Kiev, Zdorov'ya Publ., 1988. 200 p. (in Russian).
6. Kosinets A. N., Kirpichenok L. N. *Proteinases and their inhibitors in purulent surgery and oncology.* Vitebsk, Vitebsk State Medical University, 2003. 409 p. (in Russian).
7. Varkhede N., Bommana R., Schöneich C. M., Forrest L. F. Proteolysis and oxidation of therapeutic proteins after intradermal or subcutaneous administration. *Journal of Pharmaceutical Sciences.* 2020, vol. 109, no. 1, pp. 191–205. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2019.08.005>
8. Robson B. Computers and viral diseases. Preliminary bioinformatics studies on the design of a synthetic vaccine and a preventative peptidomimetic antagonist against the SARS-CoV-2 (2019-nCoV, COVID-19) coronavirus. *Computers in Biology and Medicine.* 2020, vol. 119, pp. 103670. <https://doi.org/10.1016/j.compbiomed.2020.103670>
9. Robson B. COVID-19 Coronavirus spike protein analysis for synthetic vaccines, a peptidomimetic antagonist, and therapeutic drugs, and analysis of a proposed achilles' heel conserved region to minimize probability of escape mutations and drug resistance. *Computers in Biology and Medicine.* 2020, vol. 121, pp. 103749. <https://doi.org/10.1016/j.compbiomed.2020.103749>

10. Wartecki A., Rzymyski P. On the coronaviruses and their associations with the aquatic environment and wastewater. *Water*, 2020, vol. 12, no. 6, pp. 1598. <https://doi.org/10.3390/w12061598>
11. Almagro-Moreno S., Kim T. K., Skorupski K., Taylor R. K. Proteolysis of Virulence Regulator Tox R Is Associated with Entry of *Vibrio cholerae* into a Dormant State. *PLoS Genet*, 2015, vol. 11, no. 4, pp. e1005145. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005145>
12. Shekhter A. B., Balakireva A. V., Kuznetsova N. V., Vukolova M. N., Litvitsky P. F., Zamyatnin A. A. Collagenolytic enzymes and their applications in biomedicine. *Current Medicinal Chemistry*, 2019, vol. 26, no. 3, pp. 487–505. <https://doi.org/10.2174/0929867324666171006124236>
13. Ntziachristos V., Tung C.-H., Bremer C., Weissleder R. Fluorescence molecular tomography resolves protease activity *in vivo*. *Nature Medicine*, 2002, vol. 8, no. 7, pp. 757–761. <https://doi.org/10.1038/nm729>
14. Karp G., Iwasa J., Marchall W. *Karp's cell and molecular biology: concepts and experiments*. 8th. ed. Danvers, Wiley, 2015. 829 p.
15. Fodor I., Hussein A. A., Benjamin P. R., Koene J. M., Pirger Z. The natural history of model organisms. The unlimited potential of the great pond snail, *Lymnaea stagnalis*. *eLife*, 2020, vol. 9, pp. e56962. <https://doi.org/10.7554/eLife.56962>
16. Hodgkin A. L., Huxley A. F. A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *Journal of Physiology*, 1952, vol. 117, no. 4, pp. 500–544. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1952.sp004764>
17. Kupfermann I., Kandel E. R. Neuronal controls of a behavioral response mediated by the abdominal ganglion of *Aplysia*. *Science*, 1969, vol. 164, no. 3881, pp. 847–850. <https://doi.org/10.1126/science.164.3881.847>
18. Benjamin P. R., Kemenes I. Peptidergic systems in the pond snail *Lymnaea*: From genes to hormones and behavior. Saleuddin S., Lange A. B., Orchard I. (Eds). *Advances in Invertebrate (Neuro) Endocrinology*. New York: Apple Academic Press, 2020, pp. 213–254. <https://doi.org/10.1201/9781003029854-7>
19. Korneev S. A., Vavoulis D. V., Naskar S., Dyakonova V. E., Kemenes I., Kemenes G. CREB2-targeting microRNA is required for long-term memory after single-trial learning. *Scientific Reports*, 2018, vol. 8, no. 1, pp. 3950. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-22278-w>
20. Rivi V., Benatti C., Colliva C., Radighieri G., Brunello N., Tascetta F., Blom J. M. S. *Lymnaea stagnalis* as model for translational neuroscience research: From pond to bench. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 2020, vol. 108, pp. 602–616. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2019.11.020>
21. Maasz G., Zrinyi Z., Reglodi D., Petrovics D., Rivnyak A., Kiss T., Jungling A., Tamas A., Pirger Z. Pituitary adenylyl cyclase-activating polypeptide (PACAP) has a neuroprotective function in dopamine-based neurodegeneration in rat and snail parkinsonian models. *Disease Models and Mechanisms*, 2017, vol. 10, no. 2, pp. 127–139. <https://doi.org/10.1242/dmm.027185>
22. Sidorov A. V. Neuroendulatory effects of hydrogen peroxide on central neurons in the feeding network of the mollusk *Lymnaea stagnalis*. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*, 2017, vol. 53, no. 6, pp. 493–500. <https://doi.org/10.1134/s0022093017060060>
23. OECD Environment, Health and Safety Publications. *Detailed review paper on mollusks-cycle toxicity testing. Series on testing and assessment No. 121*. Paris, Environment Directorate organization for economic co-operation and development, 2010. Available at: <https://www.oecd-ilibrary.org/docservice/9789264221468-en.pdf?expires=1618472688&id=id&accname=guest&checksum=0C664FF27BEAFA64AA28DEB6FF0EEB>
24. Amorim J., Abreu L., Rodrigues P., Peixoto D., Pinheiro C., Saraiva A., Carvalho A. P., Guimaraes L., Oliva-Teles L. *Lymnaea stagnalis* as a freshwater model invertebrate for ecotoxicological studies. *Science of The Total Environment*, 2019, vol. 669, pp. 11–28. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.03.035>
25. Atli G., Grosell M. Characterization and response of antioxidant systems in the tissues of the freshwater pond snail (*Lymnaea stagnalis*) during acute copper exposure. *Aquatic Toxicology*, 2016, vol. 17, pp. 38–44. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2016.04.007>
26. Baudrot V., Preux S., Ducrot V., Pave A., Charles S. New Insights to compare and choose KTD models for survival based on an interlaboratory study for *Lymnaea stagnalis* exposed to Cd. *Environmental Science & Technology*, 2018, vol. 52, no. 3, pp. 1582–1590. <https://doi.org/10.1021/acs.est.7b05464>
27. Cremazy A., Brix K. V., Wood C. M. Chronic toxicity of binary mixtures of six metals (Ag, Cd, Cu, Ni, Pb, and Zn) to the great pond snail *Lymnaea stagnalis*. *Environmental Science & Technology*, 2018, vol. 52, no. 10, pp. 5979–5988. <https://doi.org/10.1021/acs.est.7b06554>
28. Golubev A. P. The dynamics of radioadaptation processes in mollusk populations in water bodies within the Belarusian sector of Chernobyl nuclear contamination zone. *Ekologicheskii vestnik = Ecological Bulletin*, 2012, no. 2(20), pp. 44–57 (in Russian).
29. Khomich A. S. Assessment of the joint effect of thermal stress, pollution, and parasitic infestation on the activity of antioxidant enzymes in pulmonate mollusk *Lymnaea stagnalis*. *Contemporary Problems of Ecology = Sibirskii Ekologicheskii Zhurnal*, 2017, no. 2, pp. 184–192 (in Russian). <https://doi.org/10.15372/sej20170208>
30. Dromashko S. E., Shevtsova S. N., Babenko A. S. Influence of heavy metals on the large pond snail *Lymnaea stagnalis* L. Minsk, Belaruskaya Navuka Publ., 2018. 172 p. (in Russian).
31. Perry K. J., Henry J. Q. CRISPR/Cas9-mediated genome modification in the mollusk, *Crepidula fornicata*. *Genesis*, 2015, vol. 53, no. 2, pp. 237–244. <https://doi.org/10.1002/dvg.22843>
32. Abe M., Kuroda R. The development of CRISPR for a mollusk establishes the form *lscdial* as the long-sought gene for snail dextral/sinistral coiling. *Development*, 2019, vol. 146, no. 9, pp. dev175976. <https://doi.org/10.1242/dev.175976>
33. Chirkin A. A., Dolmatova V. V., Balaeva-Tichomirova O. M. Proteolysis-antiproteolysis system and possible mechanism of the divergence of *Lymnaea stagnalis* and *Planorbis cornutus*. *The 3rd International symposium on EuroAsian Biodiversity, 05-08 July, 2017*. Minsk, BSU, 2017, p. 236.

34. Chirkin A. A., Dolmatova V.V. Comparative analysis of proteolytic enzymes of human and pulmonary freshwater molluscs. *Agrobiodiversity for Improving Nutrition, Health and Life Quality*, 2018, pp. 234–242. <https://doi.org/10.15414/agrobiodiversity.2018.2585-8246.234-242>

35. Chirkin A. A., Dolmatova V. V. Bioinformatic analysis of intracellular proteolytic enzymes in humans and freshwater lung molluscs. *Novosti mediko-biologicheskikh nauk = News of biomedical sciences*, 2018, vol. 18, no. 4, pp. 11–16 (in Russian).

36. Chirkin A. A., Dolmatova V. V., Katsnelson E. I., Tolkacheva T. A. Study of the proteolysis-antiproteolysis system in the tissues of pulmonary freshwater molluscs with the introduction of ethionine. *Novosti mediko-biologicheskikh nauk = News of biomedical sciences*, 2017, vol. 15, no. 2, pp. 38–45 (in Russian).

37. Semenov I. O., Chirkin A. A. Bioinformaticeskoye issledovaniye signal'nykh putey apoptoza u cheloveka i legochnykh presnovodnykh mollyuskov [Bioinformatic study of signaling pathways of apoptosis in humans and pulmonary freshwater mollusks]. *Fiziko-khimicheskaya biologiya kak osnova sovremennoy meditsiny: tez. dokl. Respubl.konf. s mezhdunar. uchastiyem, posvyashchennoy 80-letiyu so dnya rozhdeniya T. S. Morozkinoi (Minsk, 29 May 2020 g.)* [Physico-chemical biology as the basis of modern medicine: abstracts. report Republic of conf. with int. participation, dedicated to the 80th anniversary of the birth of T. S. Morozkina (Minsk, May 29, 2020)]. Minsk, BSMU, 2020, pp. 164–165 (in Russian).

38. Chirkin A. A., Danchenko E. O., Tolkacheva T. A., Balaeva-Tikhomirova O. M., Stugareva S. S. Modeling of biochemical signs of diabetes mellitus in pulmonary freshwater molluscs. *Novosti mediko-biologicheskikh nauk = News of biomedical sciences*, 2016, vol. 14, no. 3, pp. 28–32 (in Russian).

39. Kovtun N. E., Seid-Guseinov A. A., Povshenko A. D. Osteoinductive properties of mother-of-pearl and its components. Solodkov A. P., Chirkin A. A. (eds.) *Modern problems of biochemistry*. Vitebsk, VSU, 2010, pp. 358–383 (in Russian).

40. Aguilera F. Neoplasia in molluscs: what does it tell us about cancer in humans? A Review. *The International journal of eating disorders*, 2017, vol. 1, no. 1, pp. 7–16.

Информация об авторах

Чиркин Александр Александрович – д-р биол. наук, профессор. Витебский государственный университет им. П. М. Машерова (Московский пр. 33, 210038, Витебск, Республика Беларусь). E-mail: chir@tut.by

Балаева-Тихомирова Ольга Михайловна – канд. биол. наук, доцент, зав. кафедрой. Витебский государственный университет им. П. М. Машерова (Московский пр. 33, 210038, Витебск, Республика Беларусь). E-mail: olgabal.tih@gmail.com

Долматова Виктория Викторовна – аспирант. Витебский государственный университет им. П. М. Машерова (Московский пр. 33, 210038, Витебск, Республика Беларусь). E-mail: vika.dolmatova19@yandex.by

Семенов Игорь Олегович – магистрант. Витебский государственный университет им. П. М. Машерова (Московский пр. 33, 210038, Витебск, Республика Беларусь). E-mail: igor.semionov.96@br.u

Information about the authors

Alexander A. Chirkin – D. Sc. (Biology), Professor. Vitebsk State University named after P. M. Masherov (33, Moskovsky Ave, 210038, Vitebsk, Republic of Belarus). E-mail: chir@tut.by

Olga M. Balaeva-Tikhomirova – Ph. D. (Biology), Associate Professor, Head of the Department. Vitebsk State University named after P. M. Masherov (33, Moskovsky Ave, 210038, Vitebsk, Republic of Belarus). E-mail: olgabal.tih@gmail.com

Victoria V. Dolmatova – Postgraduate Student. Vitebsk State University named after P. M. Masherov (33, Moskovsky Ave, 210038, Vitebsk, Republic of Belarus). E-mail: vika.dolmatova19@yandex.by

Igor O. Semenov – Master's Student. Vitebsk State University named after P. M. Masherov (33, Moskovsky Ave, 210038, Vitebsk, Republic of Belarus). E-mail: igor.semionov.96@br.u