



## COMPARATIVE ANALYSIS OF PROTEOLYTIC ENZYMES OF HUMAN AND PULMONARY FRESHWATER MOLLUSCS

Chirkin Aliaksandr\*, Dolmatova Viktoryia

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

## СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ ЧЕЛОВЕКА И ЛЕГОЧНЫХ ПРЕСНОВОДНЫХ МОЛЛЮСКОВ

Чиркин Александр, Долматова Виктория

Витебский Государственный Университет им. П.М. Машерова, Витебск, Беларусь

Received: 09. 10. 2018

Revised: 29. 10. 2018

Published: 10. 12. 2018

The article is devoted to substantiating the feasibility of obtaining proteolytic enzymes from the tissues of pulmonary freshwater molluscs for use in scientific and practical purposes. The article presents the results of the two phases of the study. Initially, the authors conducted a comparative analysis of the biochemical parameters of human, rat tissues and molluscs, and then they evaluated the degree of proteolytic enzymes homology in humans and molluscs using methods of bioinformatics. The results of studies of the first stage showed that the tissues of pulmonary freshwater molluscs can serve as the starting material for the production of proteins, including enzymes. The results of the second stage of research showed that in humans and molluscs the homology of the enzymes of unregulated proteolysis is 66–69% and that of the proteolytic enzymes of the ubiquitin-proteasome pathway is 72–76%. The obtained results substantiate the possibility of forming aquaculture of molluscs in order to obtain from their tissues proteolytic enzymes for use in biopharmaceutics, cosmetology and the food industry.

**Keywords:** proteolytic enzymes, *Lymnaea stagnalis*, *Planorbarius corneus*, *Biomphalaria glabrata*, docking

### Введение

Легочные пресноводные моллюски прудовик (*Lymnaea stagnalis* L.) и роговая катушка (*Planorbarius corneus* L.) распространены в естественных водоемах Европы. Первый из них признан модельным организмом для исследования действия

\*Corresponding author: Chirkin Aliaksandr, Vitebsk State University named after P.M. Masherova, Faculty of Biology, Department of Chemistry, Moskovskiy Avenue, 33, 210038 Vitebsk, Belarus, ✉ [chir@tut.by](mailto:chir@tut.by)

водорастворимых химических агентов в ЕЭС в 2010 году. Разработаны детальные требования к проведению строго контролируемых исследований в течение всей или части жизни моллюска (Series on Testing and Assessment. No. 121. Detailed review paper on molluscs life-cycle toxicity testing. JT03284405. Environment Directorate. Paris 2010). В этом фундаментальном документе приведены данные о достаточной идентичности различных метаболических путей, например, путей биосинтеза гормонов стероидной природы у *Lymnaea stagnalis*, а также у млекопитающих животных и человека. В большинстве сообщений, описывающих практическое использование этих видов пресноводных моллюсков, указывается на их участие в пищевых цепях экосистем, их роль как промежуточных переносчиков возбудителей некоторых заболеваний, использование в качестве модельных организмов для изучения физиологических процессов (размножение, нервная регуляция, клеточный метаболизм, генетика и др.). Однако нам не удалось найти систематизированных исследований, в которых бы обсуждался вопрос о возможности использования пресноводных легочных моллюсков для получения ферментов, продуктов питания, биологически активных веществ (Чиркин и др., 2012).

Ранее было показано, что в гемолимфе и гепатопанкреасе *Lymnaea stagnalis* и *Planorbarius corneus* имеются трипсиноподобные протеиназы, а также антитрипсиновые ингибиторы протеолиза и  $\alpha$ 2-макроглобулин (Chirkin and Dolmatova, 2017). Учитывая, что структуры протеолитических ферментов консервативны, была сформулирована задача предварительной оценки гомологии белков системы протеолиза у человека и легочных пресноводных моллюсков. В обращении к участникам Gordon Research Conference «Understanding Proteases and Their Roles as Regulators of Health and Disease» (3–8 июня 2018 года) указано, что протеазы играют разнообразную роль в регулировании биологии практически всех организмов. Фактически они составляют примерно 5% всех генов в любом данном геноме. Раньше протеазы были молекулярными единицами удаления «мусора», которые просто деградировали отработанные белки для поддержания общего гомеостаза. Однако детальные исследования продемонстрировали, что функции протеолитических ферментов намного сложнее, поскольку они играют ключевые роли в качестве регуляторов важных клеточных процессов, таких как клеточный сигналинг, деление клеток, их гибель и обмен веществ. Внеклеточные белки и некоторые белки поверхности клетки поглощаются эндоцитозом и деградируют в лизосомах. Эти органеллы содержат ряд кислых протеаз, включая катепсины В, Н и D, а также многие другие гидролазы. Некоторые цитозольные белки деградируют в лизосомах после поглощения в аутофагических везикулах, которые сливаются с лизосомами. Учитывая не совпадение сроков деления клетки и ее митохондрий, некоторые исследователи выделяют понятие аутофагии митохондрий как тип запрограммированной гибели. Известна также шаперон-зависимая аутофагия, при которой происходит направленный транспорт частично денатурированных белков из цитоплазмы сквозь мембрану лизосомы в её полость. При разрушении мембраны лизосом происходит автолиз клетки. Однако во всех тканях живых организмов большинство внутриклеточных белков деградируют с помощью убиквитин (ubiquitin,

Ub) – протеасомного пути (UPP). Этот регулируемый тип протеолиза играет наиболее важную роль в сигналинге клетки (McCarthy et al., 2017). Уже бактерии используют протеолиз для разрушения или активации регуляторных белков и для получения сигналов для временного и пространственного контроля процессов морфологического развития (Lai and Caplan, 2011). В эпителиальных и нервных клетках за счет кальпаинов и убиквитин-зависимых протеасом формируются компартменты с определенным составом белков, в том числе ферментов, для выполнения специальных клеточных функций (Burger and Seth, 2004). Внутримембранный протеолиз, осуществляемый мембраносвязанными протеазами и комплексами  $\gamma$ -секретазы, является фундаментальным процессом трансдукции сигналов от рецепторов цитокинов, факторов роста, рецепторов смерти (фактора некроза опухоли типа I, FasR и TRAIL-R1/2). Протеолиз позволяет высвободить растворимые рецепторные эктодомены и генерировать фрагменты цитоплазматических доменов рецептора. Этот процесс способствует образованию внутриклеточных посредников и формированию расходящихся внутриклеточных сигнальных путей (Lecker et al., 2006; Salvesen et al., 2016). Регулируемый протеолиз (сайт-специфический протеолиз) является важным биологическим механизмом регуляции экспрессии генов, клеточной сигнализации, развития и гибели клеток. Центральный компонент этой системы – протеасома может быть определена и как «протеаза клеточной смерти» (Vogel and Kristie, 2000). Деградация белков по АТФ-зависимому убиквитин-протеасомному пути включает в себя два этапа – ковалентное присоединение к субстрату полиубиквитиновой цепочки и деградацию помеченного белка 26S-протеасомой. Реакция убиквитирования осуществляется каскадом ферментов: E1 (Ubiquitin activating enzyme) – E2 (Ubiquitin conjugating enzyme) – E3 (Ubiquitin ligase). В протеасомах млекопитающих каталитически активными являются  $\beta$ 1-,  $\beta$ 2- и  $\beta$ 5-субъединицы, причём все эти субъединицы обладают разными ферментативными активностями (каспазоподобной, трипсиноподобной и химотрипсиноподобной, соответственно). Протеасомное разрушение белков является быстрым процессом, который обеспечивает переключение важнейших механизмов экспрессии генов, клеточного цикла и апоптоза путем разрушения регуляторных белков p19, p21, p27, p53 и других, ряда транскрипционных факторов (Borquez and Gonzalez-Billault, 2011; Konovalova et al., 2014).

Целью настоящей работы было обоснование целесообразности получения протеолитических ферментов из тканей легочных пресноводных моллюсков для их использования в практических целях.

### **Материал и методика**

На первом этапе работы был проведен сравнительный анализ биохимических показателей тканей легочных пресноводных моллюсков, плазмы крови человека и печени крыс линии Вистар. В плазме крови и гемолимфе определяли содержание общего белка, глюкозы, общего холестерина (ОХС), холестерина липопротеинов высокой плотности (ХС ЛПВП), триглицеридов (ТГ), мочевой кислоты и активность гамма-глутамилтрансферазы (ГГТ) с помощью наборов НТПК «Анализ X» (Беларусь).

В тканях печени крысы и гепатопанкреаса моллюсков определяли содержание белка (Lowry et al., 1951), ДНК, РНК (Blober and Potter, 1968; Данченко, 2013) и гликогена (Krisman, 1962; Данченко и Чиркин, 2010). Средняя величина каждого показателя определялась в 8–10 повторностях, и сравнительный анализ производился методом параметрической статистики с использованием t-критерия Стьюдента.

На втором этапе работы поиск и отбор нуклеотидных последовательностей, кодирующих белки человека, осуществлялся на сервере <https://www.ensembl.org>; поиск гомологичных последовательностей для моллюсков осуществлялся 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 MEGA5.2; построение 3D-структур ферментов для моллюсков выполнялось на сервере <https://swissmodel.expasy.org> по шаблону 3D-структуры ферментов человека, найденных в банке данных трёхмерных структур белков и нуклеиновых кислот <http://www.rcsb.org>. В работе использован следующий алгоритм: поиск нуклеотидной последовательности → построение аминокислотных последовательностей сравниваемых белков → их парное выравнивание и оценка степени гомологии первичных структур – построение 3D-структур по шаблону структуры сравниваемого белка человека → оценка третичной структуры по архитектуре молекул и их доменной организации. Исследование мотивов и строения активных центров ферментов не входило в задачи данной работы. Ранее при сравнении результатов 2-х докингов между собой было выяснено, что 6 аминокислот трипсина у *Homo sapiens* и у *Biomphalaria glabrata* связываются с этионином в близких локусах молекул фермента. Аминокислоты для *Homo sapiens*: Asp 189, Ser 190, Gln 192, Ser 195, Val 213, Cys 220, аминокислоты для *Biomphalaria glabrata*: Asp 224, Ser 225, Gln 227, Ser 230, Val 248, Cys 254. Гомология молекул трипсина человека и моллюска составила 26,6% (Chirkin et al., 2017).

## Результаты и дискуссия

В таблице 1 представлены биохимические показатели плазмы крови человека и гемолимфы моллюсков, а также ткани печени крысы и гепатопанкреаса моллюсков.

**Таблица 1** Сравнение биохимических показателей плазмы крови и печени млекопитающих с аналогичными показателями гемолимфы и гепатопанкреаса моллюсков  
**Table 1** Comparison of biochemical parameters of blood plasma and liver of mammals with similar indicators of hemolymph and hepatopancreas of mollusks

Показатель	Млекопитающие	<i>Lymnaea stagnalis</i>	<i>Planorbarius corneus</i>
Исследуемая жидкость	Плазма ( <i>Homo sapiens</i> )	Гемолимфа	
Общий белок (г.л <sup>-1</sup> )	74,4±2,35	14,9±0,24**	36,3±1,62*,**
Мочевая к-та (ммоль.л <sup>-1</sup> )	301±12,6	30,4±0,76**	89,1±2,00*,**
Глюкоза (ммоль.л <sup>-1</sup> )	4,99±0,37	0,54±0,04**	1,15±0,08*,**
ОХС (ммоль.л <sup>-1</sup> )	5,19 ±0,52	0,49 ±0,01**	0,33 ±0,01*,**
ХС ЛПВП (ммоль.л <sup>-1</sup> )	1,22 ±0,12	0,06 ±0,01**	0,11 ±0,01*,**
ТГ (ммоль.л <sup>-1</sup> )	1,47 ±0,14	0,35 ±0,01**	0,23 ±0,01*,**
ГГТ (Ед.л <sup>-1</sup> )	40,1 ±4,25	187 ±9,42**	178 ±7,70**
Исследуемая ткань	Печень ( <i>Rattus</i> )	Гепатопанкреас	
Общий белок (мг.г <sup>-1</sup> )	225 ±9,82	203 ±4,30	205 ±7,50
ДНК (мг.г <sup>-1</sup> )	3,12 ±0,42	2,44 ±0,08	2,73 ±0,29
РНК (мг.г <sup>-1</sup> )	8,53 ±0,82	7,46 ±0,28	6,79 ±0,58
Гликоген (мг.г <sup>-1</sup> )	42,5 ±3,10	27,0 ±0,36**	21,1 ±0,11*,**

Примечание: \*  $P < 0,05$  при сравнении показателей *Planorbarius corneus* с *Lymnaea stagnalis*; \*\*  $P < 0,05$  при сравнении показателей *Homo sapiens* и *Rattus* с *Lymnaea stagnalis* и *Planorbarius corneus*

Установлено, что большинство биохимических показателей в плазме крови человека выше по сравнению с гемолимфой прудовиков и роговых катушек, вероятно, из-за незамкнутого кровообращения: общий белок в 4,99 и 2,05 раза, мочевая кислота в 9,90 и 3,38 раза, глюкоза в 9,24 и 4,34 раза, общий холестерол в 10,6 и 15,7 раза, холестерол липопротеинов высокой плотности в 20,3 и 12,2 раза, триглицериды в 4,20 и 6,39 раза, соответственно. Только один показатель – активность гамма-глутамилтрансферазы оказалась существенно выше в гемолимфе прудовиков и роговых катушек в 4,66 и 4,62 раза, по сравнению с активностью этого фермента в плазме крови человека. Вероятно, это результат большего контакта мембран паренхиматозных клеток с гемолимфой, омывающей эти клетки при отсутствии сосудистых стенок (Чиркин и др., 2018). Содержание белков, ДНК, РНК, гликогена в гепатопанкреасе легочных пресноводных моллюсков достаточно близко к уровню этих биополимеров в печени крысы. Результаты этих исследований позволили предположить, что ткани легочных пресноводных моллюсков могут служить исходным материалом для получения белков, в том числе ферментов, как это реализуется в промышленном масштабе при использовании тканей ряда морских гидробионтов.

Сравнительный биоинформатический анализ протеолитических ферментов человека и моллюска *Biomphalaria glabrata*, являющегося родственным организмом с *Planorbarius corneus*, представлен в таблице 2.

**Таблица 2** Оценка гомологии первичных и третичных структур молекул внутриклеточных протеолитических ферментов человека и моллюска  
**Table 2** Evaluation of the primary and tertiary structures homology of the of the humans and mollusks molecules of intracellular proteolytic enzymes



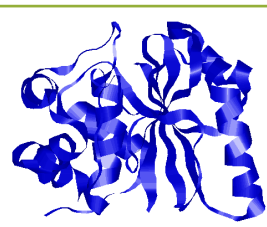

Фермент	Гомология	
	Последовательности аминокислот (%)	Третичные структуры, однотипные участки
<b>Prolyl oligopeptidase (КФ 3.4.21.26)</b>	66	альфа-спирализованный и бета-складчатый домены
<b>ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit (КФ 3.4.21.92)</b>	68	признаки структуры типа семилучевой звезды
<b>Furin - КФ 3.4.21.75</b>	69	альфа-спирализованный и бета-складчатый домены
<b>Signal Peptide Peptidase (КФ 3.4.11.2)</b>	66	повторяющиеся 4 типа альфа-спиральных структур
<b>Leucyl aminopeptidases (cytosol aminopeptidase, КФ 3.4.11.1)</b>	66	аналогичная гексамерная структура
<b>Thimet oligopeptidases (КФ 3.4.24.15)</b>	66	преобладание альфа-спирализованных участков
<b>Ubiquitin conjugating factor E4 B-like (КФ 6.3.2.19)</b>	72	однотипные альфа-спирализованные фрагменты
<b>Ubiquitin conjugating factor E2 W-like</b>	75	одинаково чередуются альфа-спиральные, бета-структурные и неупорядочные фрагменты
<b>Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L5</b>	72	сходные каталитические домены
<b>Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 5</b>	76	построение домена, состоящего из альфа-спиральных и бета-структурных участков
<b>Amidophosphoribosyl-transferase (phosphoribosyl pyrophosphate amidotransferase) (КФ 2.4.2.14)</b>	64	четыре однотипных домена
<b>Adenylosuccinate lyase (adenylosuccinase, КФ 4.3.2.2)</b>	68	мономеры имеют по три идентичных домена

Первые шесть ферментов, представленных в таблице 2, являются ферментами, которые можно отнести к группе строго нерегулируемых протеолитических ферментов: 1 – Prolyl oligopeptidase представляет собой цитозольную сериновую пептидазу, которая расщепляет пептидную связь С-концевого пролина; 2 – ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit входит в состав высокоактивной сериновой эндопептидазы Clp; 3 – Furin является сериновой протеазой клеток животных, расположенной в аппарате Гольджи и напоминает бактериальный протеолитический фермент субтилизин; 4 – Signal Peptide Peptidase – это внутримембранная аспартил-протеаза, расщепляющая остаточные сигнальные пептиды, оставшиеся в мембране после действием

сигнальной пептидазы; 5 – Leucyl aminopeptidases (cytosol aminopeptidase) относится к ферментам, которые преимущественно катализируют гидролиз лейциновых остатков на N-конце пептидов и белков; 6 – Thimet oligopeptidases, известные как TOPs, являются металлопептидазами и у животных они участвуют в деградации пептидов – брадикинина, нейротензина, ангиотензина I и пептида A $\beta$ . Первичные структуры этих ферментов человека и моллюска *Biomphalaria glabrata* после парного выравнивания демонстрируют гомологию в интервале 66–69%. 3D-структуры этих ферментов у человека и моллюска близки по архитектуре и наличию доменных структур. Следующие четыре фермента относятся к управляемому убиквитин-протеасомному пути протеолиза; 7 – Ubiquitin conjugating factor E4 B-like, конъюгирующие убиквитин ферменты, также известные как ферменты E2; 8 – Ubiquitin conjugating factor E2 W-like; 9 – Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L5; 10) Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 5.

Нуклеотидные последовательности этих ферментов для моллюсков оказались неполными, но, тем не менее, проведенный анализ фрагментов первичных структур показал более высокую степень гомологии при парном выравнивании 72–76%, а фрагменты 3D-структур позволили выявить сходство третичных структур на уровне общей архитектуры молекул и их доменного строения. Для сравнения биоинформатическому анализу были подвергнуты два фермента пуринового обмена, важного для синтеза нуклеотидов: 11 – Amidophosphoribosyl-transferase (phosphoribosyl pyrophosphate amidotransferase), который содержит аналог каталитической триады цистеиновых протеаз, и 12 – Adenylosuccinate lyase (adenylosuccinase), который превращает аденилосукцинат в AMP и фумарат. Гомология этих ферментов у человека и моллюска такая же, как и у ферментов нерегулируемого протеолиза. В таблице 3 в качестве примера приведены 3D-структуры нерегулируемого и регулируемого ферментов протеолиза человека и моллюска *Biomphalaria glabrata*.

**Таблица 3** 3D-структуры клеточных протеолитических ферментов человека и моллюска  
**Table 3** 3D structures of cellular proteolytic enzymes of the human and molluscs

Фермент	3D-структура фермента человека	3D-структура фермента моллюска
Furin		
Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L5 (каталитический домен)		

Предсказание структуры белков *in silico* является эффективным способом получения моделей белков, структура которых еще не определена экспериментально. В данной статье использован метод гомологичного моделирования, который опирается на существующую “шаблонную” структуру, сходную по аминокислотной последовательности с моделируемым белком. Этот успешный метод получил достаточно широкое распространение при сравнительном анализе белков живых систем методами биоинформатики (Xiang, 2006; Zhang, 2008). Представленные данные показывают, что высокая степень гомологии ферментов протеолиза у человека и моллюска сопряжена с формированием близких третичных структур белков. Это свидетельствует в пользу предположения, что сравниваемые протеолитические ферменты человека и моллюсков выполняют однотипные функции. Можно также предположить, что более высокая степень гомологии первичных структур у протеолитических ферментов убиквитин-протеасомного пути может быть связана с более высокой степенью консервативности этого регулируемого пути внутриклеточного протеолиза.

Практическая значимость полученных данных о высокой степени гомологии протеолитических ферментов у человека и легочных пресноводных моллюсков обосновывает формирование аквакультуры моллюсков с целью получения из их тканей белковых ферментативных препаратов протеолитического действия в рамках задач биофармации, для совершенствования косметических средств и применения в пищевой промышленности.

## **Выводы**

Содержание белков, ДНК, РНК, гликогена в гепатопанкреасе легочных пресноводных моллюсков близко к уровню этих биополимеров в печени млекопитающих.

Гомология ферментов нерегулируемого протеолиза у человека и легочных пресноводных моллюсков находится в пределах 66–69%, а убиквитин-протеасомного пути – 72–76%. Практическое значение высокой степени гомологии протеолитических ферментов у людей и пресноводных легочных моллюсков обосновывает возможность получения из тканей последних белковых ферментативных препаратов протеолитического действия для практического применения.

## **Благодарность**

Авторы благодарны доценту В.В. Хрусталеву за консультации по методам биоинформатики.

## **ЛИТЕРАТУРА**

- ДАНЧЕНКО, Е.О., ЧИРКИН, А.А. 2010. Новый методический подход к определению концентрации гликогена в тканях и некоторые комментарии по интерпретации результатов. В *Судебно-медицинская экспертиза*, No 3. с. 25–28.
- ДАНЧЕНКО, Е.О. 2013. Биохимические методы оценки метаболизма в печени. В *Современные проблемы биохимии. Методы исследований*. Под. редакцией проф. А.А. Чиркина. Минск: Вышэйшая школа, с. 341371. ISBN 978-985-06-2192-4.



- ЧИРКИН, А.А., ДАНЧЕНКО, Е.О., БОКУТЬ, С.Б. 2012. *Биохимия филогенеза и онтогенеза*. Минск: Новое знание, с. 83–101. ISBN 978-985-475-506-9.
- ЧИРКИН, А.А., БАЛАЕВА-ТИХОМИРОВА, О.М., ДАНЧЕНКО, Е.О., ТОЛКАЧЕВА, Т.А., КАЦНЕЛЬСОН, Е.И. 2018. Сравнительный биохимический анализ тканей легочных пресноводных моллюсков, обитающих в озерах Витебской и Гомельской областей Республики Беларусь. В *SWorld. Научный мир*, вып. 51(1), с. 90–95. <http://dx.doi.org/10.21893/2410-0720/2018-51-1-031>
- CHIRKIN, A., DOLMATOVA, V. 2017. Inhibition of proteolysis in plant and animal tissues. In *Agrobiodiversity for improving nutrition, health and life quality*, vol. 1. p. 60–65. <http://dx.doi.org/10.15414/agrobiodiversity,2017.2585-8246.60-65>
- CHIRKIN, A.A., DOLMATOVA, V.V., BALAEVA-TICHOMIROVA, O.M. 2017. Proteolysis-antiproteolysis system and possible mechanism of the divergence of *Lymnaea stagnalis* and *Planorbarius corneus*. *The 3<sup>rd</sup> International symposium on EuroAsian Biodiversity*. Minsk-Belarus: BSU, IPBB, p. 236. Available at: <https://vsu.by/images/science/conf/70%20conf%202018/1.2.pdf>
- BLOBER, G., POTTER, V.R. 1968. Distribution of radioactivity between the acid-soluble pool and pools of RNA in the nuclear, nonsedimentable and ribosome fractions of rat liver after a single injection of labeled orotic acid. In *Biochem. Biophys. Acta*, vol. 166, p. 48–54.
- BORQUEZ, D.A., GONZALEZ-BILLAULT, C. 2011. Regulation of cell polarity by controlled proteolytic systems. In *Biol. Res.*, vol. 44(1), p. 35–41. <http://dx.doi.org/10.4067/S0716-97602011000100005>
- BURGER, A.M., SETH, A.K. 2004. The ubiquitin-mediated protein degradation pathway in cancer: therapeutic implications. In *Eur. J. Cancer*, vol. 40(15), p. 2217–2229. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejca.2004.07.006>
- KONOVALOVA, A., SEGAARD-ANDERSEN, L., KROOS, L. 2014. Regulated proteolysis in bacterial development. In *FEMS Microbiology Reviews*, vol. 38(3), p. 493–522. <http://dx.doi.org/10.1111/1574-6976.12050>
- KRISMAN, C. R. 1962. A method for the colorimetric estimation of glycogen with iodine. In *Analytical Biochemistry*, vol. 4 (1), p. 17–23. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(62\)90014-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(62)90014-3)
- LAI, M., CAPLAN, M. 2011, Regulated intramembrane proteolysis: signaling pathways and biological functions. In *Physiology (Bethesda)*, vol. 26(1), p. 34–44. <http://dx.doi.org/10.1152/physiol.00028.2010>
- LECKER, S.H., GOLDBERG, A.L., MITCH, W.E. 2006 Protein Degradation by the Ubiquitin-Proteasome Pathway in Normal and Disease States. In *JASN*, 2006. vol. 17, p. 1807–1819. <http://dx.doi.org/10.1681/ASN.2006010083>
- LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L., RANDALL, R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. In *J. Biol. Chem.*, vol. 193(1), p. 265–275. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14907713>
- McCARTHY, A.J., COLEMAN-VAUGHAN, C., McCARTHY, J.V. 2017. Regulated intramembrane proteolysis: emergent role in cell signalling pathways. In *Biochem. Soc. Trans.*, vol. 45(6), p. 1185–1202. <http://dx.doi.org/10.1042/BST20170002>
- SALVESEN, G.S., HEMPEL, A., COLL, N. S. 2016. Protease signaling in animal and plant-regulated cell death. In *FEBS J.*, 2016. vol. 283(14), p. 2577–2598. <http://dx.doi.org/10.1111/febs.13616>
- VOGEL, J.L., KRISTIE, T.M. 2000. Autocatalytic proteolysis of the transcription factor-coactivator C1 (HCF): A potential role for proteolytic regulation of coactivator function. In *PNAS*, vol. 97(17), p. 9425–9430. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.160266697>
- XIANG, Z. 2006. Advances in homology protein structure modeling. In *Current Protein and Peptide Science*, vol. 7 (3), p 217–227. <http://dx.doi.org/10.2174/138920306777452312>
- ZHANG, Y. 2008. Progress and challenges in protein structure prediction. In *Current Opinions in Structural Biology*, vol. 18 (3), p. 342–348. <http://dx.doi.org/10.1016/j.sbi.2008.02.004>
-