

ФРАГМЕНТОМИКА ПРИРОДНЫХ ПЕПТИДНЫХ СТРУКТУР

©2009 г.

А. А. ЗАМЯТНИН^{1,2}

¹ *Институт биохимии им. А.Н.Баха РАН, Москва*

² *Universidad Técnica Federico Santa Maria,
Departamento de Informática, Valparaiso, Chile*

I. Введение. II. Природные пептидные фрагменты. III. Методы изучения фрагментов и фрагмента. IV. Математические начала фрагментомики. V. Структурные характеристики фрагмента. VI. Функциональные характеристики фрагмента. VII. Заключение.

I. ВВЕДЕНИЕ

Фрагментная организация структуры характерна как для самых простых, так и для самых сложных биомолекул. Составляющие биополимеры низкомолекулярные фрагменты можно легко увидеть на разнообразных метаболических картах [1]. Существует множество примеров того, что сравнительно небольшие природные физиологически активные вещества являются фрагментами более крупных. Наглядный пример представляет собой β -каротин, «составленный» из двух молекул витамина А [2].

Понятие фрагмента чаще всего используется при рассмотрении полимерных молекул, таких как белки, нуклеиновые кислоты и полисахариды. Наиболее часто упоминаемыми являются фрагменты природных полипептидов. Так, в белково-пептидной базе данных SwissProt/TrEMBL (<http://www.expasy.org/sprot/>) на сегодняшний день содержатся сведения о структуре почти полутора миллионов фрагментов, а другая – PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>) выдает информацию о более чем 130000 публикациях, посвященных любым фрагментам (а о метаболитах – менее 60000). Однако функции большинства этих фрагментов неизвестны.

Адрес для корреспонденции: aaz@inbi.ras.ru

Работа выполнена при финансовой поддержке Программы Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология» и Чилийского Национального Научного Фонда FONDECYT (грант № 1080504).

В последние годы наблюдается постоянный рост количества публикаций посвященных структуре и функциям белковых фрагментов. У некоторых белков число детально изученных фрагментов уже исчисляется сотнями и можно думать, что в будущем будут сформированы представления о функциональной значимости всей совокупности возможных фрагментов одного белка. В связи с этим нами было предложено изучение структуры и функций совокупности молекулярных фрагментов называть фрагментомикой, а полный набор фрагментов биомолекулы – фрагментомом [3]. В случае пептидных структур, фрагментомику можно считать понятием, объединяющим протеомику и пептидомику.

В данной работе формулируются основные понятия фрагментомики и принципы их использования при изучении природных пептидных структур.

II. ПРИРОДНЫЕ ПЕПТИДНЫЕ ФРАГМЕНТЫ

Фрагментирование пептидных структур у живых организмов хорошо известно. Например, фрагментами являются молекулы, которые образуются в организме из специализированных предшественников в результате отщепления сигнального пептида и про-пептида(ов). Этот процесс характерен как для крупных белковых структур [4], так и для олигопептидных регуляторов, содержащих от 2 до ~50 аминокислотных остатков (а. о.) [5, 6]. Простым примером белкового фрагментирования является сывороточный альбумин быка, состоящий из 583 а. о. [7]. Его предшественник, содержащий 607 остатков, распадается на фрагменты: сигнальный пептид (остатки 1–18), про-пептид (19–24) и собственно сывороточный альбумин (25–607) [8]. В случае регуляторных олигопептидов, например, гормона кортиколиберина человека [9], его предшественник (194 а. о.) включает сигнальный пептид (1–24), про-пептид (25–153) и гормон (154–194) [10].

Однако часто предшественники содержат информацию не об одной функционально значимой структуре. Типичным представителем такого полипептида является про-опиомеланокортин (РОМС). Как следует из названия, в нем присутствуют разные структуры, обладающие также и разными функциями – регуляторов нервной (опиоиды) и эндокринной систем. Предшественник РОМС человека (рис. 1) содержит 267 а. о. [11], от которого сначала отщепляется сигнальный пептид (1–26). Остающаяся последовательность и представляет собой РОМС, распадающийся затем на 4 части:

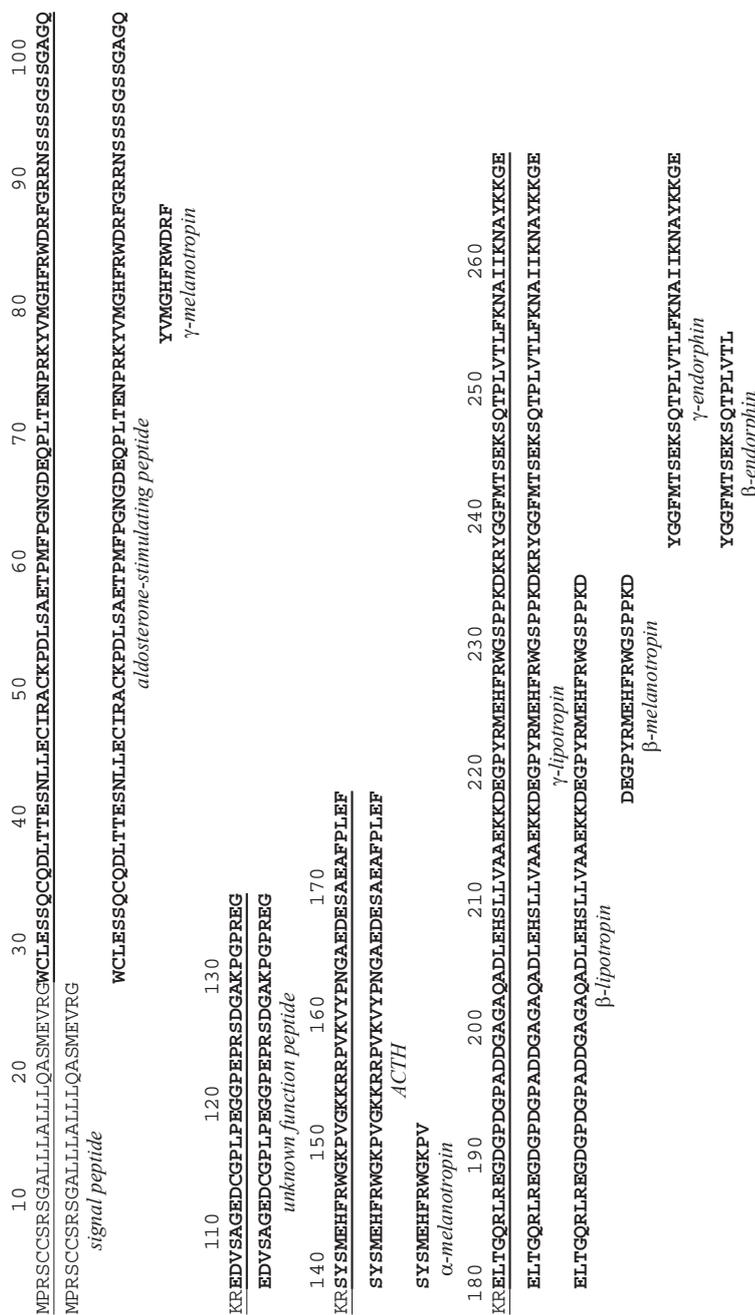


Рис. 1. Полная аминокислотная последовательность предшественника про-опиомеланокортина человека (подчеркнута) и первичные структуры его природных фрагментов. Структура РОМС дана жирным шрифтом, а сигнальный пептид и выщепляющиеся лизил-аргининовые пары (KR) – обычным. Для обозначения аминокислотных остатков использовался стандартный одно-буквенный код. Другие подробности – в тексте.

альдостерон-стимулирующий пептид (27–102) [12], включающий последовательность γ -меланотропина (77–87) [13], пептид с неизвестной функцией (105–135) [14], АКТГ (138–176) [15] с участком α -меланотропина (138–150) [15] и β -липотропин (179–267) [16], включающий в себя γ -липотропин (179–234) с последовательностью β -меланотропина (217–234) [17], а также β -эндорфин (237–267) [18] с последовательностями γ - и [19] α -эндорфинов [20]. Дипептидные участки 104–105, 136–137 и 177–178 являются лизил-аргиниловыми (RK) парами, которые узнаются расщепляющими предшественник протеазами и выщепляются [21]. В приведенном примере цифровое обозначение начала и конца фрагментов, как и в базе данных SwissProt/TrEMBL, дано с учетом сигнального пептида. Однако при нумерации экспериментально полученных белково-пептидных фрагментов сигнальный пептид обычно не учитывается.

Следует отметить, что первые пять а. о. β -эндорфина представляют собой последовательность мет-энкефалина [22], но данный олигопептид не выщепляется из структуры POMC, а образуется из своего собственного специализированного предшественника [23]. Этот предшественник организован по тем же, как описано выше, принципам и содержит последовательности одного лей- и шести мет-энкефалинов. Содержание более одной копии одного и того же олигопептида не является редкостью, и их число может быть весьма большим. Например, предшественник нейропептидов моллюска *Aplysia californica* содержит 28 структур тетрапептида FMRF и, кроме того, одну структуру FLRF [24]. Большинство этих олигопептидов разделены (фланкированы) лизил-аргиниловыми парами в разных сочетаниях таких а. о.

После выщепления из предшественников процесс формирования укороченных структур во многих случаях не заканчивается. Например, у олигопептидов уже давно отмечено сосуществование множественных форм, которые образуются в результате дальнейших ферментативных реакций, приводящих к образованию все более коротких фрагментов. Так, расшифровка аминокислотной последовательности одного из первых известных олигопептидов – ангиотензина (ранее называвшегося гипертензином) – сразу привела к выявлению двух структур, состоящих из десяти (1–10) и восьми (1–8) аминокислотных остатков, которые были названы соответственно ангиотензинами I и II [25]. Однако позднее оказалось, что существуют еще, по крайней мере, четыре более короткие природные формы этих олигопептидов – ангиотензины III (2–8), IV (2–10), V (3–8) и VI (4–8) [26]. В результате детальных исследований были выявлены ферменты,

участвующие в их образовании, и показано, что такие структуры могут существовать одновременно. Впоследствии стало ясно, что полиморфизм олигопептидов является довольно распространенным явлением – он обнаружен у соматостатина [27–29], атриального натриуретического пептида [30, 31] и многих других олигопептидных регуляторов. Поэтому среди тысяч уже открытых олигопептидов может оказаться немало таких, которым также свойственен полиморфизм, но пока их фрагменты экспериментально не идентифицированы.

Природные фрагменты более крупных пептидных молекул могут сохранять свои функции, как, например, эндорфины и энкефалины. Однако они могут не обладать функциями исходной молекулы, проявляя другие функциональные свойства. Так, N-концевой фрагмент (13 а. о.) отмеченного выше адренкортикотропного гормона быка, состоящего из 39 остатков, не обладает функцией АКТГ высвобождать кортизол, а проявляет активность меланоцитостимулирующего гормона (α -меланотропина) [32, 33].

Кроме того, появляется все больше и больше свидетельств тому, что в разных органах и тканях живых организмов присутствуют еще и пептидные структуры, которые образуются не из специализированных предшественников, а являются природными фрагментами хорошо известных белков. Большое число фрагментов α - и β -цепей гемоглобина было выявлено в мозге [34–37] и шишковидной железе [38] быка, казеина – в коровьем молоке [39, 40] и в других источниках.

Таким образом, уже известно довольно большое число природных пептидных фрагментов, образующихся в результате биогенеза, и это число продолжает расти.

III. МЕТОДЫ ИЗУЧЕНИЯ ФРАГМЕНТОВ И ФРАГМЕНТОМА

Существует несколько подходов к получению фрагментов пептидных структур. При экспериментальном подходе основные методы представляют собой аналитическое выделение, очистку и секвенирование. Мощным инструментом для выделения белков и олигопептидов является метод двумерного электрофореза [41, 42], а для определения первичной структуры – масс-спектрометрия [43], в которой производится расщепление исходной пептидной структуры на фрагменты. Комплексное применение этих методов привело к бурному развитию протеомики и пептидомики [44].

Широко распространен также метод искусственного фрагментирования, в основе которого лежит деградация природных пептидных структур (например, химическая деградация по Эдману [45, 46]). С использованием такого подхода впервые были открыты структуры транслируемых пептидных структур – окситоцина [47], арг-8-вазопрессина быка и лиз-8-вазопрессина свиньи [48], а также бычьего инсулина [49]. Однако в подобных методах получаемые фрагменты используются лишь для дальнейшего выявления полной первичной структуры изучаемого вещества, а их функциональные свойства, как правило, не исследуются.

Функциональные свойства фрагментов часто изучают с целью нахождения минимального участка, сохраняющего физиологическую активность, характерную для исходной структуры. Для этого используют методы химического синтеза различных фрагментов одной пептидной структуры. Например, для этого были синтезированы многие фрагменты α -меланотропина [50] и брадикинина [51]. Более того, в случае брадикинина фактически был синтезирован полный фрагментом, который представлен на рис. 2. После синтеза все его фрагменты в стандартном тесте исследовали на способность сокращать полосу гладкой мускулатуры мышцы ileum морской свинки. В результате было показано, что лишь один фрагмент (5–9) обладал сколько-нибудь заметной активностью по сравнению с целой молекулой брадикинина.

Следует отметить, что химический синтез широко применяется для создания многочисленных химических аналогов природных олигопептидов с целью поиска структур более активных, чем природные. Так, только для одной молекулы брадикинина было синтезировано почти 200 аналогов [52].

Фрагменты используют также и в различных теоретических анализах, в частности, при выявлении гомологии белков [53–55]. Для этого создаются компьютерные программы, которые позволяют генерировать фрагменты одной сравниваемой структуры и, осуществляя их сканирование вдоль аминокислотной последовательности другой, выявлять гомологию. С помощью специально разработанных компьютерных программ можно сравнивать пептидные фрагменты одного происхождения, например, гемоглобина быка, со структурами известных олигопептидов, полученных из других источников [3, 56]. Таким методом выявляют участки белка, идентичные или гомологичные регуляторному олигопептиду, функции которого известны. Генерация фрагментов в этих программах осуществляется в той же последовательности, как она представлена на рис. 2, – от дипептидных до

№№	Фрагмент	<i>n</i>	Структура	Активность, %
1.	БК	9	RPPGFSPFR	100.000
2.	БК(1-2)	2	RP	0.098
3.	БК(2-3)	2	PP	0.000
4.	БК(3-4)	2	PG	0.001
5.	БК(4-5)	2	GF	0.001
6.	БК(5-6)	2	FS	0.000
7.	БК(6-7)	2	SP	0.002
8.	БК(7-8)	2	PF	0.001
9.	БК(8-9)	2	FR	0.016
10.	БК(1-3)	3	RPP	0.000
11.	БК(2-4)	3	PPG	0.000
12.	БК(3-5)	3	PGF	0.001
13.	БК(4-6)	3	GFS	0.000
14.	БК(5-7)	3	FSP	0.000
15.	БК(6-8)	3	SPF	0.003
16.	БК(7-9)	3	PFR	0.004
17.	БК(1-4)	4	RPPG	0.000
18.	БК(2-5)	4	PPGF	0.001
19.	БК(3-6)	4	PGFS	0.000
20.	БК(4-7)	4	GFSP	0.000
21.	БК(5-8)	4	FSPF	0.026
22.	БК(6-9)	4	SPFR	0.014
23.	БК(1-5)	5	RPPGF	0.005
24.	БК(2-6)	5	PPGFS	0.004
25.	БК(3-7)	5	PGFSP	0.000
26.	БК(4-8)	5	GFSPFR	0.000
27.	БК(5-9)	5	FSPFR	2.915
28.	БК(1-6)	6	RPPGFS	0.000
29.	БК(2-7)	6	PPGFSP	0.000
30.	БК(3-8)	6	PPGFSPF	0.000
31.	БК(4-9)	6	GFSPFR	0.000
32.	БК(1-7)	7	RPPGFSP	0.000
33.	БК(2-8)	7	PPGFSPF	0.000
34.	БК(3-9)	7	PGFSPFR	0.214
35.	БК(1-8)	8	RPPGFSPF	0.000
36.	БК(2-9)	8	PPGFSPFR	0.029

Рис. 2. Результаты синтеза фрагментов брадикинина (БК) и исследования их влияния на сокращение полосок гладкой мускулатуры мышцы ileum морской свинки (GPI-test) [51].

n – число аминокислотных остатков.

самых крупных. Использование в теоретическом анализе данных, полученных экспериментальными методами, позволяет получать новую информацию о структурно-функциональных свойствах еще не изученных фрагментов природных пептидных структур.

IV. МАТЕМАТИЧЕСКИЕ НАЧАЛА ФРАГМЕНТОМИКИ

В процессе трансляции вначале всегда образуются только линейные пептидные структуры. В дальнейшем они могут образовывать внутримолекулярные S–S-связи, превращающие их в нелинейные молекулы. Однако практически во всех экспериментально выявленных фрагментах более крупных структур дисульфидные связи отсутствуют, поэтому на данном этапе можно ограничиться простейшим математическим анализом линейных фрагментов.

Очевидно, что число возможных природных пептидных структур P , составленных из разных а. о. и включающих аминокислотные повторы, описывается формулой:

$$P = A^n, \quad (1)$$

где A – число разных а. о., а n – число остатков в структуре. Поскольку число канонических транслируемых остатков равно 20, то, согласно формуле (1), максимально возможное число разных дипептидов равно 400, трипептидов – 8000, тетрапептидов – 160000 и т.д. Таким образом, с ростом длины пептидной структуры быстро растет число возможных комбинаций остатков. Однако из той же формулы следует, что при использовании природой всех возможных комбинаций, во всем геноме, например, человека ($\sim 3 \cdot 10^9$ оснований [57]), могли бы быть записаны все разные структуры, содержащие не более 8 остатков, поскольку $20^8 = \sim 3 \cdot 10^{10}$. А вследствие того, что транслируемая часть составляет лишь несколько процентов от всего генома, разные аминокислотные комбинации должны быть еще короче. В результате анализа всех известных природных пептидных структур было показано, что с ростом длины доля существующих комбинаций от возможных быстро уменьшается и для октапептидов составляет уже лишь 0,0016% [58]. Очевидно, что в структурах, транслируемых только с одного генома, таких комбинаций будет еще меньше.

Теоретически возможное максимальное число всех (включая одинаковые) перекрывающихся фрагментов пептидной структуры N_k^{theor} с заданным числом аминокислотных остатков k описывается выражением [3]:

$$N_k^{\text{theor}} = n - (k - 1), \quad (2)$$

а максимальное суммарное число всех возможных перекрывающихся пептидных фрагментов белка (также включая одинаковые) для всех k , т.е. от $k = 2$ (дипептиды) до $k = n - 1$, может быть получено, используя следующее выражение:

$$N_{\text{sum}}^{\text{theor}} = \sum_2^{k-1} \frac{n(n-1)}{2} - 1. \quad (3)$$

Таблица 1.
Максимально возможное число фрагментов $N_{\text{sum}}^{\text{theor}}$ у ряда природных олигопептидов и белков без учета повторов

№№	Олигопептид/Белок	n^1	$N_{\text{sum}}^{\text{theor}}$
1.	Энкефалин (несколько биологических типов)	5	9
2.	Брадикинин (млекопитающие)	9	35
3.	АКТГ (человек)	39	740
4.	α -цепь гемоглобина (человек)	141	9869
5.	β - цепь гемоглобина (человек)	146	10584

¹ – число аминокислотных остатков в полной структуре.

Приведенные формулы характеризуют верхний предел рассчитываемых величин. В частности, как следует из формулы 2, гипотетическая последовательность, содержащая по одной все разные комбинации дипептидных фрагментов, должна состоять из 401 аминокислотного остатка, а согласно формуле (3), в этой последовательности суммарное число всех возможных перекрывающихся фрагментов составит величину 80199.

На основании формулы 3 нами был проведен расчет величин теоретически возможных фрагментов $N_{\text{sum}}^{\text{theor}}$ для ряда различных природных олигопептидов и белков (табл. 1). Однако результаты расчета по указанным формулам справедливы только при условии неповторяемости первичной структуры фрагмента в исходной молекуле. Этому условию удовлетворяют первичные структуры приведенных в таблице молекул пентапептидного мет-энкефалина (YGGFM) [22] и нанопептидного брадикинина (RPPGFSPFR) [59]. Однако, например, в структуре АКТГ [15] имеется две копии дипептидного фрагмента GK, а у α - и β -гемоглобинов [60] фрагментные повторы встречаются многократно. Даже у природных пентапептидов возможно существование повторяющихся фрагментов, как это видно из первичной структуры одного из гормонов сверчка (AAAPF) [61], в которой дипептидный фрагмент AA присутствует дважды. С ростом числа аминокислотных остатков в исходной структуре у более крупных молекул повторяющиеся последовательности аминокислотных остатков встречаются все чаще и чаще, в результате чего реальное число разных фрагментов становится меньше величин N_k^{theor} и $N_{\text{sum}}^{\text{theor}}$. Поэтому формулы (2) и (3) неприменимы для вычисления истинных характеристик фрагмента белка, которые можно обозначить как N_k^{exp} и $N_{\text{sum}}^{\text{exp}}$.

Таким образом, число разных фрагментов N_k^{exp} для каждого k должно быть меньше N_k^{theor} на некоторую величину R_k , т.е.

$$N_k^{\text{exp}} = N_k^{\text{theor}} - R_k. \quad (4)$$

При этом даже одинаковые по длине фрагменты (т.е. при одной и той же величине k) могут иметь разную аминокислотную последовательность. Поэтому для того, чтобы вычислить R_k , необходимо ввести дополнительные величины: i (число одинаковых структур при одном k) и m (число разных структур также при одном k). Тогда в результате суммирования по m

$$R_k = \sum_1^m (i-1), \quad (5)$$

т. е. число разных фрагментов одной длины всех значений k равно

$$N_k^{\text{exp}} = N_k^{\text{theor}} - \sum_2^{k-1} \left[\sum_1^m (i-1) \right] \quad (6)$$

или в полном виде

$$N_{\text{sum}}^{\text{exp}} = \left[\sum_2^{k-1} \frac{n(n-1)}{2} - 1 \right] - \sum_2^{k-1} \left[\sum_1^m (i-1) \right]. \quad (7)$$

В протяженных пептидных структурах практически всегда наблюдается разнообразие аминокислотных последовательностей у повторяющихся перекрывающихся фрагментов с одним значением k . Поэтому для расчетов реального содержания разных фрагментов необходимо пользоваться формулами (6) и (7). В этих выражениях сначала производится суммирование повторяющихся фрагментов, имеющих одинаковое число одинаковых по аминокислотной последовательности аминокислотных остатков (суммирование по m при одном k), а затем суммирование проводится для всех k , т.е. для фрагментов любой длины и имеющих как одинаковую, так и разную аминокислотную последовательность. Конечный результат, т.е. нахождение величины $N_{\text{sum}}^{\text{exp}}$, получается после вычитания результата двукратного суммирования из значения $N_{\text{sum}}^{\text{theor}}$, даваемого формулой (3). Эти громоздкие вычисления целесообразно проводить с помощью специального компьютерного анализа структуры и функций природной пептидной структуры, примеры которого приводятся ниже.

Как следует из данных олигопептидной базы данных EROP-Moscow (<http://erop.inbi.ras.ru/>) [62], к настоящему времени наибольшее число фрагментов экспериментально выявлено и функционально охарактеризовано у бычьего гемоглобина (62 фрагмента) и казеина

(72). Структурно-функциональный анализ фрагментов гемоглобина нами уже описан ранее [3, 63], поэтому в данной работе для описания свойств фрагмента выбраны другие природные пептидные структуры.

V. СТРУКТУРНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ФРАГМЕНТОМА

В качестве примера детально рассмотрим фрагментом казеина быка. Этот белок (рис. 3) состоит из 4 субъединиц α -s1 [64], α -s2 [65], β [65] и κ [64], содержащих от 169 до 209 а. о. (без сигнальных пептидов). Структура предшественника каждой субъединицы содержит сигнальный пептид и собственно белковую аминокислотную последовательность. В аминокислотном составе субъединиц α -s2 и κ присутствуют все 20 стандартных а. о., а в субъединицах α -s1 и β отсутствует остаток цистеина.

Компьютерное фрагментирование всех субъединиц и анализ получаемых таким образом фрагментов показали, что многие малые фрагменты повторяются как в каждой отдельной, так и в разных субъединицах казеина. Повторяющимися оказались десятки разных фрагментов. Чаще всего ($i = 13$) встретились самые короткие (дипептидные) фрагменты EE в трех субъединицах α -s1, α -s2, и β . Следующими по частоте встречаемости были PF (1 в субъединице α -s1 и 6 в β), QS (6 в β -субъединице), а также PT (1 в α -s2, 1 в β и 4 в κ -субъединицах). Самыми крупными повторяющимися структурами оказались гептапептидные фрагменты SSSEESI, которые присутствуют в β -субъединице два раза.

В табл. 2 представлены результаты компьютерного анализа реального содержания дипептидных и всех фрагментов в сравнении с соответствующими величинами, полученными при использовании формул (2) и (3) для фрагментов отдельных субъединиц и для полного фрагмента казеина. В обоих случаях истинные величины оказались меньше расчетных ввиду наличия повторяющихся структур. Например, в α -s1-субъединице число разных повторяющихся дипептидных фрагментов (с числом повторов от 1 до 4) оказалось равным 64, в результате чего N_2^{theor} и N_2^{exp} и составляют величины 198 и 134, соответственно. Следует также отметить, что величины, характеризующие полный фрагмент казеина, не являются суммой реальных значений для субъединиц, поскольку повторяемость структур встречается не только внутри субъединиц, но и в разных субъединицах. С учетом этого в случае разных дипептидных фрагментов полного фрагмента казеина N_2^{exp} оказалось почти в два раза меньше суммы N_2^{exp} , полученных для всех субъединиц (266 вместо 507).

α -s1-Casein precursor (214)

*MKLLILTC*LVAVALARPKHP IKHQGLPQEVLNENLLRFFVAP**PF**PEVFGKEKVNELSKDIG
SESTEDQAMEDIKQMEAESISS**SEE**IVPNSVEQKH IQKEDVPSERYLGYLEQLRLKKYK
VPQLEIVPNSA**EE**RLHSMKEGIHAQQKEPMIGVNQELAYFYPELFRQFYQLDAYPSGAWY
YVPLGTQYTDAPSFSDIPNP IGSENSEKTTMPLW

 α -s2-Casein precursor (222)

*MKFFIFTCLL*AVALAKNTMEHV**SSSEESI**ISQETYKQEKNA INPSKENLCSTFCKEVVR
NAN**EE**EYSIGSS**EE**SAEVAT**EE**VKITVDDKH YQKALNEINQFYQKFPQYLQYLYQGPIV
LNPWDQVKNAPVIT**PT**LNREQLST**SE**ENSKKTVDMESTEVEFTKTKL**TE**EENRNLNFKL
KISQRYQK FALPQYLKTVYQH QKAMKPWIQPKTKVIPYVRYL

 β -Casein precursor (224)

*MKVLILACLVAL*ALAREL**EEL**NVPG EIVESLS**SSSEESI**TRINKKIEKFQ**SEE**QQQTEDEL
QDKIH**PF**AQT**QS**LVY**PF**PGPIPNSLPQNIPPLTQTPVVV**PF**LQPEVMGVSKVKEAMAPK
HKEM**PF**PKYPVE**PF**TES**QS**LTLTDVENLHLPL**LL****QS**WMHQPHQPL**PT**VMFPP**QS**VLSL
QSKVLPVPQKAVPYPPQRDMPIQAFLLYQEPV LGPVVR**PF**PIIV

 κ -Casein precursor (190)

*MMKSFFLVVTIL*ALTL**PFL**GAQEQNQEQPIRCEKDERFFSDKIAKYIPIQYVLSRYPYSG
LNYYQKQKVALINNQFLPYYPYAKPAAVRSPAQILQWQVLSNTVPAKSCQA**PT**TMARHP
HPHLSFMAIPPKKNQDKTEI**PT**INTIASGE**PT**ST**PT**TEAVESTVATLEDSPEVIESPPEI
NTVQVTSTAV

Рис. 3. Аминокислотные последовательности предшественников субъединиц казеина быка.

После названия субъединицы дано полное число аминокислотных остатков. Курсивом и подчеркиванием выделены сигнальные пептиды. Жирным шрифтом выделены некоторые повторяющиеся структуры (объяснения а тексте).

Таблица 2.
Сравнение реального числа разных дипептидных ($k = 2$) фрагментов N_2^{exp} и всех (при всех k) фрагментов $N_{\text{sum}}^{\text{exp}}$ с N_2^{theor} и $N_{\text{sum}}^{\text{theor}}$, соответственно, у казеина быка

№№	Казеин (бык)	n^1	N_2^{theor}	N_2^{exp}	$N_{\text{sum}}^{\text{theor}}$	$N_{\text{sum}}^{\text{exp}}$
1.	α -s1-субъединица	199	198	134	19700	19621
2.	α -s2-субъединица	207	206	131	21320	21216
3.	β -субъединица	209	208	124	21735	21641
4.	κ -субъединица	169	168	118	14195	14138
5.	α -s1 + α -s2 + β + κ	784	780	266	76950	76304

¹ – число аминокислотных остатков в полной структуре.

Распределение фрагментов казеина по длине продемонстрировано на рис. 4, где представлено графическое изображение всех начальных участков фрагмента 4-х субъединиц (в одинаковом масштабе) и полного фрагмента казеина. Из этих данных видно, как соотносятся реальные и теоретические величины числа фрагментов и на какой длине фрагмента (k) величины N_k^{theor} и N_k^{exp} становятся одинаковыми.

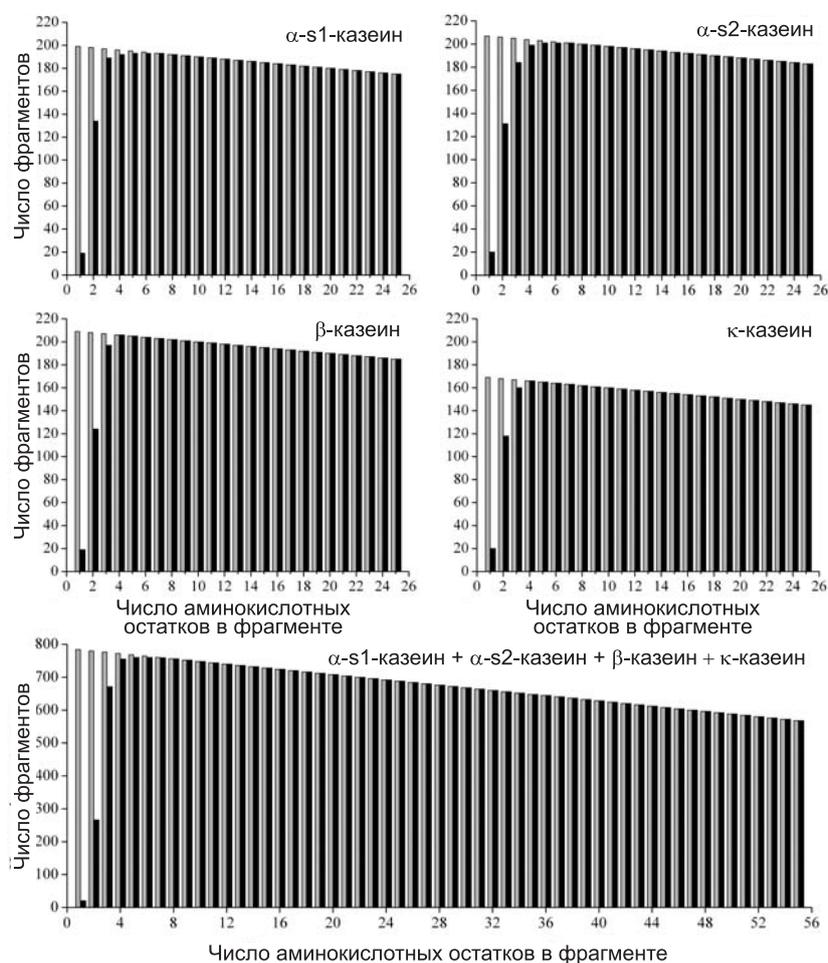


Рис. 4. Графическое изображение фрагментов разных субъединиц казеина быка и его полной белковой молекулы.

Теоретические значения N_k^{theor} даны серым цветом, а экспериментальные N_k^{exp} – черным. Помимо пептидных структур представлены данные и о «монопептидах» ($k = 1$).

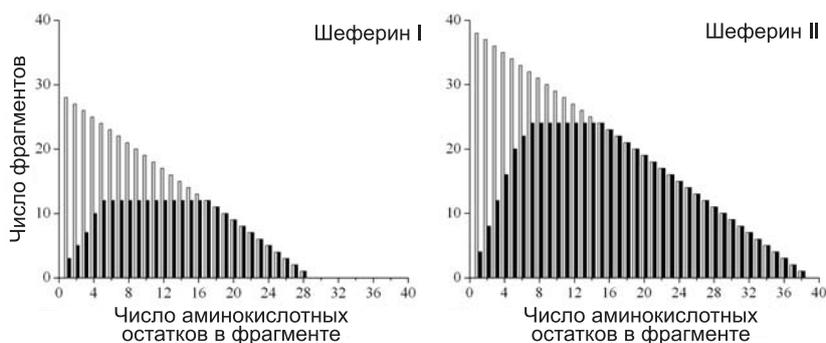


Рис. 5. Графическое изображение фрагментов природных антимикробных олигопептидов Шеферинов I и II.

Видно также, что размеры повторяющихся фрагментов рассмотренного белка сравнительно невелики.

Однако существуют природные пептидные структуры, которые составлены из малого числа разных аминокислотных остатков, в результате чего их повторяющиеся фрагменты могут быть существенно длиннее. Таким примером являются высоко гомологичные антимикробные олигопептиды Шеферины корней лекарственного растения *Capsella bursa-pastoris* [66], образованные всего 3 и 4 разными аминокислотными остатками и длиной в 28 и 38 остатков, соответственно:

Шеферин I **GY** **GGHGGH** **GGHGGHGGH** **GGHGGGGGGH**

Шеферин II **GY****HGGHGGHGG****GGY****NGGGGGHGGHGG****GY****NGGGHGGGGH**

Их сравнительно небольшой фрагментом может быть продемонстрирован полностью. Из данных графиков, представленных в одном масштабе на рис. 5, следует, что у этих олигопептидов повторяющимися является уже значительная часть возможных фрагментов. Соотношение $N_k^{\text{exp}}/N_k^{\text{theor}}$ для Шеферина I составляет 243/377, т.е. 64,4%, а для Шеферина II – 569/702 (81,1%). Кроме того, обращает на себя внимание то, что число разных фрагментов постоянно на некотором участке шкалы аминокислотных остатков (k). В основе этого явления лежит существование у олигопептидных структур протяженных участков (подчеркнуты), содержащих регулярные последовательные повторы одних и тех же комбинаций аминокислотных остатков (GGH, GHG и HGG). Таким образом, подобное графическое представление позволяет осуществлять наглядную визуализацию структурных особенностей фрагмента и выявлять регулярно повторяющиеся фрагменты.

VI. ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ФРАГМЕНТОМА

Можно предположить, что разнообразие структур фрагментов является основой и разнообразия функций, содержащихся в нем фрагментов. В случае казеина это можно проследить на рис. 6, где представлены структуры 60 его фрагментов, полученных экспериментально разными исследователями и занесенных в базу данных EROP-Moscow вместе с функциональными характеристиками. Некоторые из них можно считать природными, поскольку они были выделены либо из организма коровы, либо из ее молока. В большинстве же случаев фрагменты получены в результате искусственного протеолиза. Конечно же, эти фрагменты составляют лишь малую часть фрагментома казеина (~0,1%), однако и в их функциях наблюдается большое разнообразие. Среди них больше всего оказалось таких, которые обладают функцией ингибитора ферментов (ангиотензин-конвертирующего фермента и катепсина). Самыми представительными являются фрагменты β -субъединицы. Особая группа из 4 фрагментов, образованная из участка этой субъединицы (60–70), получила название казоморфинов ввиду проявления ими опиоидной активности [67–69]. В той же субъединице обнаружено наличие функций ингибиторов ферментов у четырех фрагментов участка 43–66 (см. данные базы EROP-Moscow по идентификационным номерам, указанным на рисунке).

Эти данные могут быть дополнены результатами исследований целого ряда синтетических фрагментов казеина. Как показано на рис. 7, все 12 синтезированных фрагментов, представляющие участок 48–61 β -субъединицы, обладают функцией ингибитора фермента (рис. 7) [70] так же, как и экспериментально полученные фрагменты, относящиеся к тому же участку той же субъединицы 47–52 и 58–65 (рис. 6). Помимо отмеченных функций фрагменты разных субъединиц казеина обладают антимикробной активностью, проявляют свойства гормонов и других важных пептидных регуляторов, а для некоторых из них отмечено проявление даже более одного типа активности.

Компьютерный анализ позволяет выявить функциональные свойства и других фрагментов. Нами было проведено компьютерное сравнение всех фрагментов казеина со всеми известными функционально охарактеризованными олигопептидами, занесенными в базу EROP-Moscow. В результате оказалось (рис. 8), что 22 разных дипептидных и 12 трипептидных фрагментов казеина полностью идентичны природным неказеиновым олигопептидам, полученным из разных царств живых организмов (животных, растений, бактерий и

Рис. 6. Фрагменты казеина (CN), полученные экспериментально (см. стр. 421).

Последовательно даны идентификационные номера базы данных EROP-Moscow, названия фрагментов, включающие номера первого и последнего остатка в субъединице (без учета сигнального пептида), источники, функциональные свойства и первичные структуры.

Аббревиатуры функциональных свойств: AM – антимикробный, CAI – ингибитор клеточной агрегации, EI – ингибитор фермента, HM – гормон, IM – иммуномодулятор, NP – нейропептид, PI – ингибитор белка, PTI – ингибитор белкового транспорта, SPI – ингибитор солевой преципитации.

грибов). В сумме они представляют 77 участков во всех субъединицах казеина и многие из них находятся вне пределов аминокислотных последовательностей экспериментально полученных структур (рис. 6). Спектр их функций также разнообразен. Сравнение данных рис. 6 и 8 в ряде случаев подтверждает сохранение функциональных свойств при укорочении фрагментов. Так, например, фрагмент 31–32 (VF) α -s1-субъединицы (рис. 8), полученный из мышц сардин *Sardinops melanosticus* [71], является частью фрагмента 23–34 той же субъединицы казеина (рис. 6) и оба они обладают функцией ингибитора фермента. Однако при дроблении фрагментов наблюдается и изменение функциональных свойств, как в случае фрагмента 34–35 (RY) κ -субъединицы (рис. 8), полученного из тех же сардин [72], и фрагмента 33–38 (рис. 6) той же субъединицы казеина, для которых обнаружены функции ингибитора фермента и нейропептида, соответственно.

№№	Фрагмент	Первичная структура	IC ₅₀ , μ M
1.	β -CN(48-61)	KIHPFAQTQSLVYP	39
2.	β -CN(49-61)	IHPFAQTQSLVYP	19
3.	β -CN(50-61)	HPFAQTQSLVYP	26
4.	β -CN(51-61)	PFAQTQSLVYP	nd*
5.	β -CN(52-61)	FAQTQSLVYP	25
6.	β -CN(53-61)	AQTQSLVYP	76
7.	β -CN(54-61)	QTQSLVYP	73
8.	β -CN(55-61)	TQSLVYP	64
9.	β -CN(56-61)	QSLVYP	41
10.	β -CN(57-61)	SLVYP	40
11.	β -CN(58-61)	LVYP	170
12.	β -CN(59-61)	VYP	44

Рис. 7. Ингибирование ангиотензин-конвертирующего фермента (angiotensin-converting enzyme - ACE) искусственно синтезированными фрагментами β -казеина быка.

* – фрагмент 4 нерастворим при концентрациях выше 1 μ M [70].

E07452	α -s1-CN(1-9)	h* AM	IKHQGLPQE
E07453	α -s1-CN(15-22)	h AM	VLNENLLR
E07424	α -s1-CN(23-27)	h EI	FFVAP
E01836	α -s1-CN(23-34)	h EI	FFVAPFPEVFGK
E07439	α -s1-CN(43-58)	h SPI	DIGSESTEDQAMEDIK
E07438	α -s1-CN(80-90)	h NP	HIQKEDVPSER
E00398	α -s1-CN(90-95)	b* NP	RYLGYL
E00397	α -s1-CN(90-096)	h NP	RYLGYLE
E07441	α -s1-CN(143-148)	h EI	AYFYPE
E07442	α -s1-CN(170-199)	h EI	QTQYTDAPSFSDIPNPIGSENSEKTTMPLW
E07454	α -s1-CN(180-193)	h AM	SDIPNPIGSENSEK
E07426	α -s1-CN(194-199)	h EI, IM	TTMPLW
E07427	α -s2-CN(25-32)	h EI	NMAINPSK
E07428	α -s2-CN(81-89)	h EI	ALNEINQFY
E07429	α -s2-CN(81-91)	h EI	ALNEINQFYQK
E07430	α -s2-CN(92-98)	h EI	FPQYLQY
E04001	α -s2-CN(150-188)	h AM	KTKLTFEEKNRLNFKKISQRYQKFALPQYLKTVYQHOK
E07157	α -s2-CN(164-179)	h AM	LKKISQRYQKFALPQY
E07431	α -s2-CN(174-179)	h EI	FALPQY
E07432	α -s2-CN(182-184)	h EI	TVY
E07158	α -s2-CN(183-207)	h AM	VYQHOKAMKPWIQPKTKVIPYVRYL
E01032	β -CN(1-25)	h SPI	RELEELNVPGEIVESLSSESSEITR
E07413	β -CN(6-14)	h EI	LNVPGEIVE
E07417	β -CN(7-14)	h EI	NVPGEIVE
E07408	β -CN(26-30)	h HM, NP	INKKI
E07450	β -CN(43-69)	h EI	DELQDKIHPPFAQTQSLVYPPFGPIPNS
E07418	β -CN(47-52)	h EI, PTI	DKIHPF
E07434	β -CN(58-65)	h EI	LVYPPFGP
E07433	β -CN(58-76)	h EI	LVYPPFGPIPNSLPQNIPP
E00302	β -CN(60-63)	m* NP	YPPF
E00234	β -CN(60-64)	m NP	YPPFG
E00233	β -CN(60-66)	h EI, NP, IM	YPPFGPI
E00610	β -CN(60-70)	h NP	YPPFGPIPNSL
E02217	β -CN(61-66)	m PI	PPFGPI
E07448	β -CN(70-97)	h EI	LPPQNIPPLTQTPVVVPPFLQPEVMGVSK
E07414	β -CN(73-82)	h EI	NIPPLTQTPV
E07046	β -CN(74-76)	s EI	IPP
E07415	β -CN(74-82)	h EI	IPPLTQTPV
E07416	β -CN(75-82)	h EI	PPLTQTPV
E07045	β -CN(84-86)	s* EI	VPP
E07409	β -CN(98-105)	h NP	VKEAMAPK
E07412	β -CN(108-113)	h EI	EMPPFK
E07443	β -CN(113-127)	h EI	KYPVEFFTESQSLTL
E07411	β -CN(114-121)	h EI, NP	YPVEFFTE
E07445	β -CN(158-175)	h EI	PPQSVLSLSQSKVLPVPQ
E07444	β -CN(168-175)	h EI	SKVLPVPQ
E07407	β -CN(169-175)	h NP	KVLPVPQ
E07425	β -CN(177-183)	h EI	AVPYPQR
E07446	β -CN(183-190)	h EI	RDMPIQAF
E01884	β -CN(191-193)	h IM	LLY
E07449	β -CN(191-209)	h EI	LLYQEPVLPVVRGPFPIIV
E07451	β -CN(193-198)	h EI	YQEPVL
E07447	β -CN(193-209)	h EI	YQEPVLPVVRGPFPIIV
E02218	β -CN(203-207)	m PI	GPFFI
E02135	κ -CN(25-34)	h NP	YIPIQYVLSR
E07437	κ -CN(33-38)	h NP	SRYPST
E07422	κ -CN(35-41)	h NP	YPSYGLN
E07423	κ -CN(58-61)	h NP	YPPY
E07440	κ -CN(106-116)	h CAI	MAIPPKKNQDK
E07160	κ -CN(138-158)	h AM	AVESTVATLEDSPEVIESPPE
E07421	κ -CN(155-160)	h EI	SPPEIN

* – h – hydrolysate, b – blood plasma, m – milk, s – sour milk

Рис. 6. Подпись к рис. дана на стр. 420.

Фрагмент	α -s1-CN	α -s2-CN	β -CN	κ -CN	Природный регуляторный олигопептид	EROP №
HP	4-5		50-51	98-99, 100-101	Hormone TRH* [2-3] (pig)	E00244
YF	144-145				Hypothalamic hormone IV (pig)	E00285
DE			43-44	14-15	Neuropeptide (rat)	E00596
VF	31-32	146-147			Enzyme inhibitor 1 (sardine)	E01331
MF			156-157		Enzyme inhibitor 3 (sardine)	E01333
RY	90-91	170-171, 205-206		34-35	Enzyme inhibitor 4 (sardine)	E01334
LY		99-100	192-193		Enzyme inhibitor 6 (sardine)	E01336
YL	91-92, 94-95	95-96, 98-99, 179-180, 206-207			Enzyme inhibitor 7 (sardine)	E01337
AL		81-82, 175-176		49-50	Transporter (ground squirrel)	E01599
SP				69-70, 149-150, 155-156	Neuropeptide bradykinin [6-7] (bovine)	E01800
FR	150-151				Neuropeptide bradykinin [8-9] (bovine)	E01801
LF	149-150				Enzyme inhibitor 2 (soybean)	E01831
PG		9-10, 63-64			Memory regulator (rat)	E02533
LP	11-12	177-178	70-71, 135136, 137-138, 151-152, 171-172,	56-57	Hormone, transporter 6 (human)	E02539
LV			58-59		Enzyme inhibitor (<i>P. carneus</i>)	E03322
TF		38-39			Enzyme inhibitor 1 (wheat)	E04068
AF			189-190		Enzyme inhibitor 4 (wheat)	E04069
VK		69-70, 112-113	98-99		Enzyme inhibitor 1 (buckwheat)	E04097
AY	143-144, 158-159				Enzyme inhibitor 3 (buckwheat)	E04098
YQ	154-155	78-79, 89-90, 100-101, 171-172, 184-185	193-194	43-44	Enzyme inhibitor 6 (buckwheat)	E04099
AW	163-164				Enzyme inhibitor SA [213-214] (human)	E04540
FP	28-29	92-93	62-63, 111-112, 157-158, 205-206		Antifungal peptide (<i>L. plantarum</i>)	E04808
LA	142-143				Transporter DtpT 1 (<i>L. monocytogenes</i>)	E06287
PSY				36-38	Enzyme inhibitor 8 (buckwheat)	E04101
GLP	10-12				Hormone 5 (human)	E02538
GEP				128-130	Enzyme inhibitor (edible mushroom)	E05453
EQP				6-9	Hormone Gonadin Q (rat)	E06239
LVY			58-60		Enzyme inhibitor 3 (oriental sesame)	E06530
LQP			88-90		Enzyme inhibitor 4 (sesame)	E06531
PPK				109-111	Antihypertensive peptide (pig)	E07050
AFL			189-191		Antihypertensive peptide (chlorella)	E07051
FAL		174-176			Antihypertensive peptide (chlorella)	E07052
QEP			194-196		Hormone TRH-related peptide (human)	E00823
QQK	130-132			44-46	Enzyme inhibitor 5 (jararaca)	E01003
Sum:	17	23	21	15	34	34

* – TRH – тиреолиберин.

Рис. 8. Фрагменты казеина (CN) быка, идентичные по структуре функционально охарактеризованным природным олигопептидам, полученным из других живых организмов.

Кроме идентичных структур, из олигопептидной базы было также выделено множество природных олигопептидов, структуры которых высоко гомологичны природным фрагментам казеина и их функции одинаковы. В то же время сходные структуры могли обладать и другими функциями.

Ввиду присутствия протеолитических ферментов в клетках и во внеклеточной среде живого организма постоянно происходит деградация пептидных структур. 400 разных типов пептидных связей расщепляются с разной вероятностью и в результате этого процесса может образовываться постоянно изменяющаяся мозаика множества фрагментов эндогенных белков. В предельном случае возможно формирование полного фрагмента каждого из них. Образование полного фрагмента в результате процесса пищеварения, при котором большой совокупностью ферментов расщепляются поступающие с пищей экзогенные белки, включая и обладающие ферментативной активностью [56], вполне вероятно. Таким образом, к пулу эндогенных фрагментов добавляются экзогенные, среди которых могут быть регуляторные олигопептиды. Ввиду повторяемости частей аминокислотных последовательностей фрагментов внутри и вне белковых субъединиц, а также в разных белках, эти регуляторы могут образовываться в значительных количествах и заметно влиять на различные процессы метаболизма. В частности, обнаружение среди них ингибиторов ферментов свидетельствует о том, что процесс расщепления пищевых белков может тормозиться продуктами протеолиза. Кроме того, фрагменты, только что образованные в желудочно-кишечном тракте и обладающие антимикробными свойствами, имеют возможность сразу же принять участие в регуляции баланса микрофлоры и, следовательно, быть компонентом иммунной регуляции [73]. Таким образом, в результате фрагментирования в организме возможно формирование динамично развивающегося пула экзогенных регуляторных олигопептидов, функции которых могут изменяться в процессе образования все более и более мелких фрагментов. Очевидно, что существование эндогенно-экзогенного пула регуляторных молекул расширяет смысл и содержание гипотезы о функционально-непрерывной совокупности (континууме) природных олигопептидов [74].

VII. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Фрагментом одного белка является только часть совокупности фрагментов всех белков клетки. Все они являются составными частями глобального фрагмента, который усилиями многочисленных исследователей формируется в белково-пептидных базах данных. В свою очередь, этот белково-пептидный фрагмент представляется составной частью глобального фрагмента всех химических веществ всех живых организмов, который и является объектом биохимических исследований.

К настоящему времени экспериментально идентифицирована лишь малая часть возможных природных фрагментов белков и еще меньше известно об их функциональных свойствах. В частности, это относится к образованию и функциям фрагментов, образующихся в желудочно-кишечном тракте при расщеплении продуктов питания ферментами (примеров, подобных исследованию фрагментов мышц сардин [71], приведенных на рис. 8, не так уж много). Также далеко от завершения выявление природных олигопептидов, образующихся из специализированных предшественников. Кроме того, у большинства из них изучался лишь один тип функции, в то время как они могут быть полифункциональными.

Накопление данных о структуре и функциях позволит более полно охарактеризовывать функциональные возможности многочисленных, еще не изученных белковых фрагментов, приблизиться к пониманию их роли в эволюции и использовать все эти данные на практике. Например, учет функциональных свойств фрагментов пищевых белков может подсказать диетологам, какая пища предпочтительна для ее потребителя, а фармакологам – какие пептидные фрагменты целесообразно использовать в виде лекарственных средств и пищевых добавок. В качестве терапевтических средств уже успешно применяются некоторые аминокислоты, например, глицин, который оказывает седативное (успокаивающее) [75–81] действие, глутамат, широко применяемый в пищевой индустрии и т.д.

Благодаря совершенствованию методов исследований, включая компьютерный анализ, наши знания о структурных и функциональных свойствах глобального фрагмента интенсивно пополняются. Этих знаний еще недостаточно для полного понимания регуляторной роли фрагментов в живых организмах. Тем не менее, уже сейчас, используя накопленную информацию, можно формировать представления о структурно-функциональной фрагментомике природных пептидных и других веществ.

Автор выражает благодарность Б.И.Курганову и А.Г.Мальгину за полезное обсуждение материалов данной работы, А.С.Борчикову за участие в модификации компьютерных программ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Мальгин А.Г. (1999) Метаболизм карбоновых кислот (периодическая схема), «Международная программа образования», Москва.
2. Carper, N.S. (1930) *Biochem. J.*, **24**, 980–982.
3. Замятнин А.А. (2008) *Биофизика*, **53**, 725–733.
4. Замятнин А.А. (2004) *Биохимия*, **59**, 1565–1573.
5. Zamyatnin, A.A. (1984) *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.*, **13**, 145–165.
6. Zamyatnin, A.A. (1991) *Prot. Seq. Data Anal.*, **4**, 49–52.
7. Holowachuk, E.W., Stoltenborg, J.K., Reed, R.G., Peters, T. Jr. (1991) Submitted (AUG-1991) to the EMBL/GenBank/DDBJ databases.
8. Brown, J.R. (1974) *Fed. Proc.*, **33**, 1389–1389.
9. Shibahara, S., Morimoto, Y., Furutani, Y., Notake, M., Takahashi, H., Shimizu, S., Horikawa, S., Numa, S. (1983) *EMBO J.*, **2**, 775–779.
10. Romier, C., Bernassau, J.-M., Cambillau, C., Darbon, H. (1993) *Protein Eng.*, **6**, 149–156.
11. Takahashi, H., Teranishi, Y., Nakanishi, S., Numa, S. (1981) *FEBS Lett.*, **135**, 97–102.
12. Seidah, N.G., Rochemont, J., Hamelin, J., Lis M., Chretien, M. (1981) *J. Biol. Chem.*, **256**, 7977–7984.
13. Shibasaki, T., Ling, N., Guillemin, R. (1980) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **96**, 1393–1399.
14. Seidah, N.G., Rochemont, J., Hamelin, J., Benjannet, S., Chretien, M. (1981) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **102**, 710–716.
15. Harris, J.I., Lerner, A.B. (1957) *Nature*, **179**, 1346–1347.
16. Li, C.H., Chung, D. (1976) *Nature*, **260**, 622–624.
17. Harris, J.I. (1959) *Nature*, **184**, 167–169.
18. Dragon, N., Seidah, N.G., Lis, M., Routhie, R., Chretien, M. (1977) *Can. J. Biochem.*, **55**, 666–670.
19. Ling, N., Burgus, R., Guillemin, R. (1976) *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **73**, 3942–3946.
20. Guillemin, R., Ling, N., Burgus, R. (1976) *Compt. Rend. Acad. Sci.*, **282D**, 783–785.
21. Loh, Y.P., Parish, D.C., Tuteja, R. (1985) *J. Biol. Chem.*, **260**, 7194–7205.
22. Hughes, J., Smyth, T.W., Kosterlitz, H.W., Fothergill, L.A., Morgan, B.A., Morris, H.R. (1975) *Nature*, **258**, 577–579.
23. Noda, M., Teranishi, Y., Takahashi, H., Toyosato, M., Notake, M., Nakanishi, S., Numa, S. (1982) *Nature*, **297**, 431–434.
24. Sheller, R.H., Kirk, M.D. (1987) *Trends Neurosci.*, № 10, 46–52.
25. Skeggs, L.T., Lentz, K.L., Kahn, J.R., Shumway, N.P., Woods, K.R. (1956) *J. Exp. Med.*, **104**, 193–197.

26. Tsai, B.S., Peach, M.J., Khoshla, M.C., Bumpus, F.M. (1975) *J. Med. Chem.*, **18**, 1180–1183.
27. Brazeau, P., Vale, W., Burgus, R., Ling, N., Butcher, M., Rivier, J., Guillemin, R. (1973) *Science*, **179**, 77–79.
28. Arakawa, Y., Tachibana, S. (1984) *Life Sci.*, **35**, 2529–2536.
29. Pradayrol, L., Jornvall, H., Mutt, V., Ribet, A. (1980) *FEBS Lett.*, **109**, 55–58.
30. Geller, D.M., Currie, M.G., Wakitani, K., Cole, B.R., Adams, S.P., Fok, F.K., Siegel, N.R., Eubanks, S.R., Galluppi, G.R., Needleman, P. (1984) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **120**, 333–338.
31. Iimura, O., Shimamoto, K., Ando, T., Ura, N., Ishida, H., Nakagawa, M., Yokoyama, T., Fukuyama, S., Yamaguchi, Y., Yamaji, I. (1987) *Can. J. Physiol. Pharm.*, **65**, 1701–1705.
32. Lee, T.H., Lerner, A.B., Buettner-Janusch, V. (1961) *J. Biol. Chem.*, **236**, 2970–2974.
33. Graf, L., Bajusz, S., Patty, A., Barat, E., Cseh, G. (1971) *Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung.*, **6**, 415–418.
34. Takagi, H., Shiomi, H., Ueda, H., Amano, H. (1979) *Nature*, **282**, 410–412.
35. Takagi, H., Shiomi, H., Fukui, K., Hayashi, K., Kiso, Y., Kitagawa, K. (1982) *Life Sci.*, **31**, 1733–1736.
36. Бархударян Н., Келлерман И., Лоттишайх Ф., Галоян А.А. (1991) *Нейрохимия*, **10**, 146–154.
37. Иванов В.Т., Карелин А.А., Михалева И.И., Васьковский Б.В., Свиряев В.И., Назимов И.В. (1992) *Биоорг. химия*, **18**, 1271–1311
38. Venson, B., Ebels, L. (1993) *Life Sci.*, **54**, PL437–PL443.
39. Ekeke, N.U., Shaw, C., Johnston, C.F., Thim, L. (1992) *Regul. Peptides*, **40**, 140–140.
40. Nakamura, Y., Yamamoto, N., Sakai, K., Takano, T. (1995) *J. Dairy Sci.*, **78**, 1253–1257.
41. Kenrick, K.G., Margolis, J. (1970) *Anal. Biochem.*, **33**, 204–207.
42. Малыгин А.Г. (1993) *Усп. Биол. Химии*, **33**, 173–213.
43. Chapman, J.R., Ed. (1996) *Protein and Peptide analysis by mass-spectrometry*. Humana Press.
44. Wilkins, M.R., Williams, K.L., Appel, R.D., Hochstrasser, D.F., Eds. (1997) *Proteome Research: New Frontiers in Functional Genome*. Springer. Berlin.
45. Edman, P. (1949) *Arch. Biochem. Biophys.*, **22**, 475–476.
46. Edman, P. (1970) In: *Protein sequence determination* (Ed. S.B.Needleman) Springer. Berlin. P. 211–215.
47. Tuppy, H. (1953) *Biochim. Biophys. Acta*, **11**, 449–450.
48. du Vigneaud, V., Lowler, H.C., Popenoe, E.A. (1953) *J. Am. Chem. Soc.* **75**, 4880–4881.
49. Ryle, A.P., Sanger, F., Smith, L.F., Kitai, R. (1955) *Biochem. J.*, **60**, 541–556.
50. Hruby, V.J., Wilkes, B.C., Hadley, M.E., Al-Obeidi, F., Sawyer, T.K., Staples, D.J., de Vaux, A.E., Dym, O., Castrucci, A.M., Hintz, M.F., Riehm, J.P., Rao, K.R. (1987) *J. Med. Chem.*, **30**, 2126–2130.
51. Suzuki, K., Abiko, T., Endo, N. (1969) *Chem. Pharm. Bull.*, **17**, 1671–1678.
52. Erdös, E.G., Ed. (1970) *Bradykinin, Kallidin, Kallikrein*. Springer-Verlag. Berlin, Heidelberg, New York.

53. Nazipova, N.N., Shabalina, S.A., Ogurtsov, A.Yu., Kondrashov, A.S., Roytberg, M.A., Buryakov, G.V., Ver-noslov, S.E. (1995) *Comput. Appl. Biosci.*, **11**, 423–426.
54. Panchenko A.R., Bryant, S.H. (2002) *Protein Sci.*, **11**, 361–370.
55. Huska, M.R., Buschmann, H., Andrade-Navarro M.A. (2007) *Bioinformatics*, **23**, 3093–3094.
56. Zamyatnin, A.A. (2007) *Neurochem. J.*, **1**, 188–195.
57. International Human Genome Sequencing Consortium (2004) *Nature*, **431**, 931–945.
58. Orcutt, B.C., Barker, W.C. (1984) *Bull. Math. Biol.*, **46**, 545–552.
59. Elliott, D.F., Lewis G.P., Horton, E.W. (1960) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **3**, 87–91.
60. Braunitzer, G., Gehring-Muller, R., Hilschmann, N., Hilse, K., Hobom, G., Rudloff, V., Wittmann-Liebold, B. (1961) *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **325**, 283–286.
61. Wicker, C.L., Wicker, C.A. (1987) *Comp. Biochem. Physiol.* **88C**, 185–187.
62. Zamyatnin, A.A., Borchikov, A.S., Vladimirov, M.G., Voronina, O.L. (2006) *Nucl. Acids Res.*, **34**, D261–D266.
63. Замятнин А.А. (2009) *Биохимия*, **74**, 247–256.
64. Nagao, M., Mak,i M., Sasaki, R., Chiba, R. (1984) *Agric. Biol. Chem.*, **48**, 1663–1667.
65. Stewart, A.F., Bonsing, J., Beattie, C.W., Shah, F., Willis, I.M., Mackinlay, A.G. (1987) *Mol. Biol. Evol.*, **4**, 231–241.
66. Park, C.J., Park, C.B., Hong, S.-S., Lee, H.-S., Lee, S.Y., Kim, S.C. (2000) *Plant Mol. Biol.*, **44**, 187–197.
67. Henschen, A., Lottspeich, F., Brantl, V., Teschemacher, H. (1979) *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.*, **360**, 1217–1224.
68. Meisel, H. (1986) *FEBS Lett.*, **196**, 223–227.
69. Brantl, V., Teschemacher, H., Blasig, J., Henschen, A., Lottspeich, F. (1981) *Life Sci.*, **28**, 1903–1909.
70. Kohmura, M., Nio, N., Ariyoshi, Y. (1990) *Agric. Biol. Chem.*, **54**, 1101–1102.
71. Matsuda, H., Ishizaki, T., Morita, H., Nagaoka, T., Osajima, K., Osajima, Y. (1992) *J. Jap. Soc. Biosci. Biotechnol. Agrochem.*, **66**, 1645–1647.
72. Matsufuji, H., Matsui, T., Seki, E., Osajima, K., Nakashima, M., Osajima, Y. (1994) *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **58**, 2244–2245.
73. Замятнин А.А., Воронина О.Л. (1998) *Усп. биол. химии*, **38**, 165–197.
74. Ашмарин И.П., Обухова М.Ф. (1986) *Биохимия*, **51**, 531–544.
75. Asechi, M., Kurauchi, I., Tomonaga, S., Yamane, H., Suenaga, R., Tsuneyoshi, Y., Denbow, D.M., Furuse, M. (2008) *Amino Acids*, **34**, 55–60.
76. Dolu, N. (2007) *J. Basic Clin. Physiol. Pharmacol.*, **18**, 141–147.
77. Chojnacka-Wójcik, E., Tatarczyńska, E., Dereń-Wesołek, A. (1996) *Pol. J. Pharmacol.*, **48**, 627–629.
78. Javitt, D.C., Silipo, G., Cienfuegos, A., Shelley, A.M., Bark, N., Park, M., Lindenmayer, J.P., Suckow, R., Zukin, S.R. (2001) *Int. J. Neuropsychopharmacol.*, **4**, 385–391.
79. File, S.E., Fluck, E., Fernandes, C. (1999) *J. Clin. Psychopharmacol.*, **19**, 506–512.

80. *Ohno, M., Yamamoto, T., Watanabe, S.* (1994) *Eur. J. Pharmacol.*, **253**, 183–187.
81. *Schwartz, B.L., Hashtroudi, S., Herting, R.L., Handerson, H., Deutsch, S.I.* (1991) *Neurology*, **41**, 1341–1343.