



ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ДУОДЕНАЗЫ С СЕРПИНАМИ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

© 2003 г. Н. А. Попыкина*, И. П. Гладышева*, Т. С. Замолдчикова**, Н. И. Ларионова*#

*Кафедра химической энзимологии химического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова,
119899 ГСП, Москва, Воробьевы горы;

**Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

Поступила в редакцию 21.11.2002 г. Принята к печати 16.12.2002 г.

Изучено взаимодействие дуоденазы – новой сериновой протеиназы, принадлежащей к немногочисленному классу двуликих протеиназ, с серпинами – α_1 -ингибитором протеиназ (α_1 -PI) и антихимотрипсином (АСТ) из сыворотки крови человека. Стехиометрия процесса ингибирования равна 1.2 и 1.3 моль/моль для α_1 -PI и АСТ соответственно. Наличие стабильного фермент-ингибиторного комплекса дуоденаза- α_1 -PI подтверждено результатами Ds-Na-электрофореза. Наличие комплекса дуоденаза-АСТ продемонстрировать не удалось, однако появление полосы расщепленного ингибитора свидетельствовало о протекании реакции гидролиза.

Доказан суицидный механизм взаимодействия дуоденазы с серпинами крови человека. Константы скорости ассоциации ($k_a \times 10^5, \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$) равны $2.4 \pm 0.3 \times 10^5$ для α_1 -PI и $3.0 \pm 0.4 \times 10^5 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ для АСТ. Полученные результаты указывают на потенциальную возможность регуляции активности дуоденазы эндогенными серпинами.

Ключевые слова: антихимотрипсин; дуоденаза; α_1 -ингибитор протеиназ; серпины.

ВВЕДЕНИЕ

Дуоденаза, сериновая протеиназа кишечника, впервые выделена коллективом авторов во главе с В.К. Антоновым [1] в 1992 г. Было показано, что она локализуется в секреторных гранулах эпителиальных клеток бруннеровых желез дуоденальной слизистой [2]. Доказано, что дуоденаза принимает участие в активации проэнтеропептидазы – одноцепочечного предшественника энтеропептидазы [3] и таким образом, активируя проэнтеропептидазу, может играть центральную роль в инициации каскада реакций протеолитического расщепления, приводящих к активации панкреатических ферментов. Кроме того, недавние исследования показали, что дуоденаза способна активировать PAR-рецепторы [4], что не исключает ее роли в воспалительных процессах, происходящих в организме.

Субстратная специфичность дуоденазы необычна – она проявляет свойства трипсино- и химотрипсиноподобных протеиназ [5]. По отношению к синтетическим и белковым субстратам трипси-

ноподобная активность дуоденазы более ярко выражена по сравнению с химотрипсиноподобной активностью [2]. Однако при взаимодействии с белковыми ингибиторами протеиназ, как аналогами субстратов, дуоденаза проявляет свои химотрипсиноподобные свойства. Например, взаимодействуя с “двухголовой” соевым ингибитором семейства Баумана–Бирк (ВВ1), дуоденаза связывается его антихимотрипсиновым (Leu43-Ser44), а не с антитрипсиновым центром (Lys16-Ser17) [6].

Обычно активность протеиназ в организме регулируется другими белками или пептидами, которые функционируют как ингибиторы. Они разделяются на два больших класса: так называемые “канонические” ингибиторы и “серпины” [7]. Молекулы канонических белковых ингибиторов обычно имеют реакционную петлю, состоящую из 6–20 остатков, которые распознаются активным центром протеиназы [7]. Внутри этой петли находится специфичный участок (P1-позиция), который взаимодействует с участком связывания субстрата (S1-субпозиция). В основе действия канонических ингибиторов лежит способность ингибитора к нековалентному связыванию с протеиназой-мишенью. Ингибиторы обратимо связываются с протеиназами подобно субстратам, но удерживают фермент в очень прочном комплексе.

Серпины имеют очень консервативную вторичную структуру, состоящую из девяти α -спира-

Сокращения: АСТ – антихимотрипсин; α_1 -PI – α_1 -ингибитор протеиназ; PAR-рецепторы – рецепторы, активируемые протеиназами; ВВ1 – ингибитор типа Баумана–Бирк из бобов сои; ст. инг. – стехиометрия ингибирования; ВАЕЕ – этиловый эфир *N*-бензоил-*L*-аргинина; ВТЕЕ – этиловый эфир *N*-бензоил-*L*-тирозина; SDS – додецилсульфат натрия; ПААГ – полиакриламидный гель.

Автор для переписки (тел.: (095) 939-34-17; эл. почта: nilar@enzyme.chem.msu.ru).

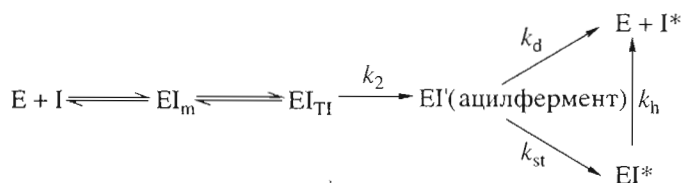


Рис. 1. Суицидный механизм ингибирования протеиназ серпинами.

EI_m – комплекс Михаэлиса фермент–ингибитор; EI_{TI} – тетраэдрический интермедиат; EI – ацилфермент; EI^* – ковалентный комплекс, в котором ингибитор находится в расщепленном состоянии (произошла вставка петли реакционного центра в β -слой А и транслокация протеиназы на противоположный полюс молекулы); I^* – расщепленный ингибитор.

k_2 – константа скорости превращения тетраэдрического интермедиата в ацилфермент; k_d – константа скорости диссоциации ацилфермента на свободный фермент и расщепленный ингибитор; k_{st} – константа скорости “стабилизации” ацилфермента (превращение в ковалентный комплекс с конформационно измененным ингибитором); k_h – константа скорости диссоциации ковалентного комплекса с конформационно измененным ингибитором на свободный фермент и расщепленный ингибитор.

лей и трех β -листов (А, В, С) [8]. В отличие от канонических ингибиторов они образуют с протеиназами устойчивые в денатурирующих условиях ковалентные комплексы по типу ацилфермента, промежуточного продукта в катализе, и кинетически ведут себя как необратимые ингибиторы. В отличие от канонических ингибиторов петля реакционного центра серпинов более длинная и гибкая и может легко вставляться в их центральный неполноценный β -слой А [9]. Серпины, претерпевшие такие изменения, теряют свою ингибирующую активность [9, 10].

α_1 -Ингибитор протеиназ (α_1 -PI) и антихимотрипсин (АСТ) – ингибиторы семейства серпинов. У АСТ в P_1 -положении находится остаток Leu, специфичный к химотрипсиноподобным ферментам, таким, как катепсин G, панкреатический химотрипсин, химаза тучных клеток и панкреатическая эластаза [11–13]. У α_1 -PI в положении P_1 находится остаток Met [14]. Целевой протеиназой α_1 -PI является эластаза лейкоцитов человека (HLE) [15], но спектр протеиназ, взаимодействующих с этим ингибитором, значительно шире, чем у АСТ. α_1 -PI взаимодействует с большим количеством протеиназ с трипсино-, химотрипсино- и эластазоподобными свойствами [14].

Механизм взаимодействия серпинов с протеиназами индивидуален для каждой пары фермент–ингибитор. Стандартным принято считать суицидный механизм, где продукты реакции распределяются между расщепленным ингибитором (с выделением свободного фермента) и комплексом фермент–ингибитор (рис. 1) [16].

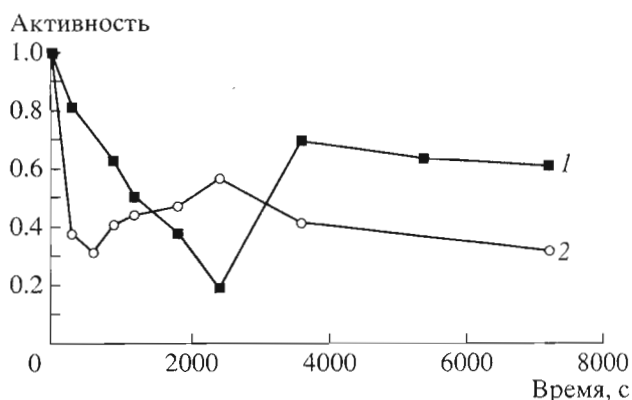


Рис. 2. Зависимость остаточной активности дуоденазы от времени инкубации с серпинами. 1 – $[E]_0 = [\alpha_1\text{-PI}]_0 = 11$ нМ; 2 – $[E]_0 = [\text{АСТ}]_0 = 175$ нМ. $[\text{Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA}] = 0.43$ мМ (по весу); 25°C; 0.05 М Трис-HCl, pH 8.0.

Восстановление ферментативной активности, однако, характерно не для каждой пары серпин–протеиназа. Время деацилирования варьируется от минут до месяца. Целевые протеиназы соответствующих серпинов связываются с ними необратимо и восстановления ферментативной активности не наблюдается. Если же такой комплекс и удается разрушить, то выделяющаяся протеиназа оказывается неактивной из-за искаженной под действием серпина каталитической машины фермента [16]. Каждой из протеиназ гранулоцитарной фракции полиморфоядерных лейкоцитов человека – эластазе и катепсину G в плазме крови соответствует свой физиологический ингибитор: α_1 -PI для HLE [15] и АСТ для катепсина G [17]. В норме эти ферменты находятся в составе комплексов с соответствующими им серпинами [18] и выделения активных ферментов не происходит. Цель настоящей работы – изучение взаимодействия дуоденазы с серпинами различной специфичности.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Зависимость активности дуоденазы от времени инкубации с серпинами и стехиометрия реакции дуоденаза–ингибитор. Мы изучили кинетику взаимодействия эквимольных концентраций активной дуоденазы и серпинов (АСТ и α_1 -PI) от времени. Как видно из рис. 2, минимум ферментативной активности достигается через 40 мин инкубации дуоденазы с α_1 -PI и через 5 мин инкубации фермента с АСТ, после чего наблюдается восстановление ферментативной активности. Подобная картина, наблюдаемая при любом соотношении дуоденаза–серпины, свидетельствует о том, что АСТ и α_1 -PI взаимодействуют с изучаемой протеиназой по суицидному механизму (см. рис. 1).

В качестве одной из характеристик суицидного механизма нами была измерена стехиометрия ингибирования (ст. инг.) дуоденазы АСТ и α_1 -PI. Распределение продуктов реакции между расщепленным ингибитором (I^*) и ковалентным комплексом серпин–протеиназа (EI^*) в соответствии со стехиометрией (ст. инг.) = $1 + k_d/k_{st}$ [18]. Таким образом, стехиометрия взаимодействия серпинов с протеиназами определяется константами скоростей диссоциации и стабилизации ацилфермента, а не количеством активных центров ингибитора, как в случае канонических ингибиторов. Стехиометрия ингибирования является характеристикой взаимодействия каждой пары серпин–протеиназа, так как она не зависит от концентрации фермента.

Результаты определения стехиометрии взаимодействия дуоденазы с серпинами крови человека представлены на рис. 3. В нашем случае стехиометрия ингибирования определялась в минимуме ферментативной активности, т.е. времена инкубации фермента с ингибиторами составляли в случае α_1 -PI 40 и в случае АСТ 5 мин. Стехиометрия составила 1.2 ± 0.1 и 1.3 ± 0.2 для реакции дуоденазы с α_1 -PI и с АСТ соответственно.

Кроме того, стехиометрия взаимодействия дуоденазы с серпинами может быть определена из рис. 2. В минимуме ферментативной активности при соотношении дуоденаза– α_1 -PI (дуоденаза–АСТ) 1 : 1 ингибирование составляет 80% (70%), следовательно, 100%-ное ингибирование будет наблюдаться при соотношении 1 : 1.2 (1 : 1.3) соответственно. Измеренные величины стехиометрии ингибирования позволяют предположить, что дуоденаза транслоцируется на противоположную сторону молекул серпинов (k_{st}) в 3 и 5 раз быстрее, чем гидролизуется ее ацилфермент (k_d) с АСТ и α_1 -PI соответственно.

Измерение константы скорости ассоциации (k_a) дуоденазы с α_1 -PI и АСТ. Для того чтобы количественно охарактеризовать ингибирование дуоденазы α_1 -PI и АСТ мы использовали упрощенную схему реакции [18]:



Если концентрации фермента и ингибитора значительно меньше величины K_i , то двухстадийный процесс ингибирования протекает как одностадийная необратимая бимолекулярная реакция с константой скорости k_a [18]. Зависимость остаточной активности дуоденазы от времени инкубации с серпинами в условиях протекания реакции по 2-му порядку приведена на рис. 4. Величины k_a , рассчитанные по уравнению (1), составили для α_1 -PI и АСТ $2.4 \pm 0.3 \times 10^5$ и $3.0 \pm 0.4 \times 10^5$ $M^{-1} c^{-1}$.

Изучение взаимодействия дуоденазы с серпинами крови человека методом SDS-ПААГ-электрофореза. Для того чтобы наглядно показать образование некоторых продуктов взаимодействия

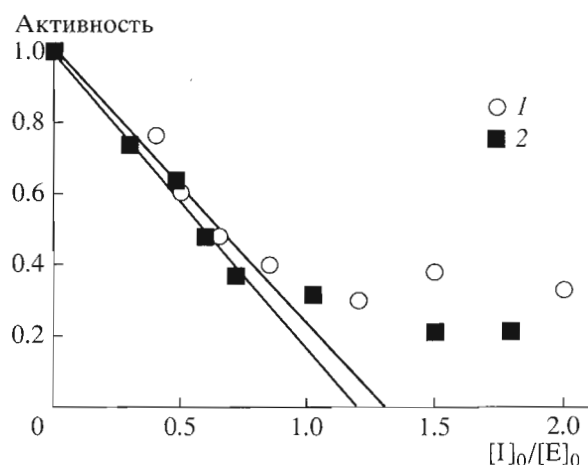


Рис. 3. Определение стехиометрии для реакции взаимодействия дуоденазы с серпинами.

АСТ ($[E]_0 = 175$ нМ, время инкубации 5 мин (1)); α_1 -PI ($[E]_0 = 110$ нМ, время инкубации 40 мин (2)). [Suc-Ala-Pro-Phe-pNA] = 0.43 мМ (по весу); 25°C; 0.05 М Трис-НCl, pH 8.0.

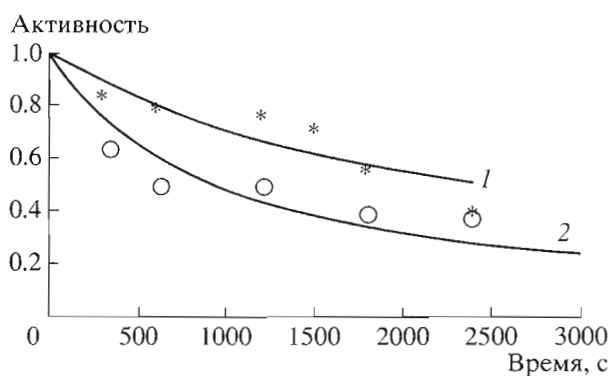


Рис. 4. Определение k_a взаимодействия дуоденазы с серпинами: 1 – $[E]_0 = [\alpha_1\text{-PI}]_0 = 2.2$ нМ; 2 – $[E]_0 = [\text{АСТ}]_0 = 0.9$ нМ. [Tos-Gly-Pro-Lys-pNA] = 1.04 мМ (по весу); 25°C; 0.05 М Трис-НCl, pH 8.0.

дуоденазы с серпинами, мы провели SDS-электрофорез в невозстанавливающих условиях в 8% ПААГ. Как видно на рис. 5, при взаимодействии дуоденазы с α_1 -PI появляется полоса, соответствующая ковалентному комплексу дуоденаза– α_1 -PI (EI^*), однако в случае АСТ, выявить полосу такого комплекса не удалось даже при минимальном времени инкубации (2 мин), но наблюдалось образование полосы расщепленного АСТ (АСТ^*), что свидетельствовало о протекании реакции гидролиза. По-видимому, дуоденаза взаимодействовала с АСТ с образованием ковалентного комплекса, но он оказался недостаточно устойчив.

В работе [19] обсуждаются структурные аспекты устойчивости ковалентных комплексов. Образование этого комплекса происходит после образования ацилфермента путем миграции

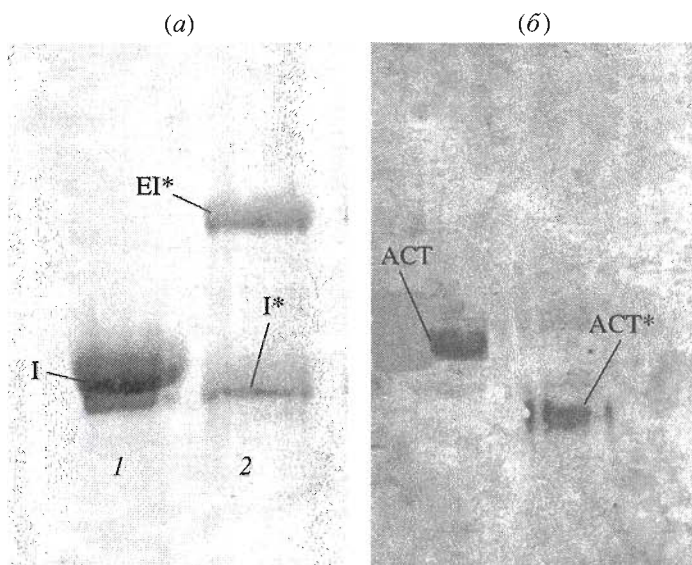


Рис. 5. SDS-электрофорез в 8% ПААГ продуктов взаимодействия серпинов с дуоденазой. (а) дорожка 1 – исходный препарат α_1 -PI, I (4 мкг); дорожка 2 – реакционная смесь после инкубации с дуоденазой (1 мкг) в течение 40 мин. [EI]* – ковалентный комплекс фермента с ингибитором; [I]* – расщепленный α_1 -PI. Полоса свободного фермента движется с фронтом красителя. (б) АСТ – исходный препарат антихимотрипсина (4 мкг); АСТ* – расщепленный ингибитор, образовавшийся в результате реакции с дуоденазой (1 мкг) в течение 2 мин.

ковалентно связанной с серпином протеиназы с одного полюса ингибитора на противоположный, которая сопровождается вставкой реакционной петли в центральный β -слой А. Для пар серпин-протеиназа со стехиометрией ингибирования около 1 стабильность EI*-комплекса, а следовательно, и активность протеиназы будет определяться величиной k_i . Эта константа скорости характеризует взаимодействие протеиназы с конформационно измененным ингибитором в новом сайте связывания и защитой ацильной связи фермента и ингибитора от гидролитического распада. Скорее всего, ацильная связь между остатками Ser195 дуоденазы и Leu358 конформационно измененного АСТ более доступна нуклеофилам растворителя, ацильная связь Ser195 дуоденазы с Met358 α_1 -PI, и происходит ее гидролиз с образованием активного фермента и расщепленного ингибитора (АСТ*), полоса которого и видна на SDS-ПААГ-геле.

Константы скорости и стехиометрия ингибирования сериновых протеиназ α_1 -PI и АСТ

Протеиназа	α_1 -PI		АСТ	
	k_a , $M^{-1}s^{-1}$	Ст. инг.	k_a , $M^{-1}s^{-1}$	Ст. инг.
Дуоденаза	2.4×10^5	1.2	3.0×10^5	1.3
Химаза тучных клеток человека [12]	7.5×10^3	5.0	2.1×10^4	4.5
Катепсин G [18]	6.8×10^4	1.14	4.5×10^5	1.09

Дуоденаза проявляет высокую степень гомологии с катепсином G гранулоцитов человека [20, 21]. Оба эти фермента интересны тем, что принадлежат к немногочисленному классу двуликих протеиназ, проявляющих трипсино- и химотрипсиноподобные свойства. С другой стороны, последние исследования по локализации дуоденазы показали ее наличие как в бруннеровых железах двенадцатиперстной кишки [2], так и в тучных клетках тощей кишки быка [4], что позволяет сравнивать дуоденазу с химазой тучных клеток. Как видно из таблицы, стехиометрия взаимодействия дуоденазы с α_1 -PI и АСТ более близка к соответствующей величине взаимодействия катепсина G с этими серпинами, а величина k_a для дуоденазы примерно в 3.5 раза больше, чем для катепсина G, в случае α_1 -PI и примерно такая же в случае АСТ. Однако проведенные нами эксперименты по взаимодействию дуоденазы с АСТ показали, что, несмотря на быстрое протекание первых стадий реакции, АСТ из-за недостаточной устойчивости ковалентного комплекса в большей степени является субстратом дуоденазы, чем ее ингибитором. Это роднит дуоденазу с химазой тучных клеток человека, хотя величины k_a для взаимодействия химазы с этими серпинами почти на 2 порядка меньше таковых для дуоденазы. Примерно одинаковые значения k_a дуоденазы с АСТ и α_1 -PI не позволяют говорить о преимущественном проявлении дуоденазой своих химотрипсино- или трипсиноподобных свойств при взаимодействии с серпинами крови человека.

В основном серпины синтезируются в клетках печени [22], однако, есть доказательства их наличия в эпителиальных клетках тонкого кишечника [23] и в панкреатическом соке человека [24]. В связи с тем, что дуоденаза и названные ингибиторы локализованы в одних и тех же компартментах, полученные в данной работе результаты по взаимодействию дуоденазы с ними, представляют особый интерес, поскольку указывают на потенциальную возможность регуляции активности дуоденазы эндогенными серпинами в норме и при воспалении или повреждении тканей кишечника.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе были использованы следующие реагенты: трипсин быка и *N,N,N,N*-тетраметилендиамин (Merck, Германия); фенолметилсульфонилфторид (Fluka, Германия); α_1 -PI (Miles, Канада); АСТ, Трис-НСI, акриламид, бисакриламид, персульфат аммония и Кумасси бриллиантовый синий R-250 (ICN, США); этиловый эфир *N*-бензил-*L*-аргинина (BAEE), этиловый эфир *N*-бензил-*L*-тирозина (BTEE), Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA, Tos-Gly-Pro-Lys-pNA, химоотрипсин быка и соевый ингибитор Баумана-Бирк (ВВI) (Sigma, США). TSK-гель Toyopearl HW-50 (ToyoSoda MFG, Япония). Препарат дуоденазы был любезно предоставлен Е.А. Соколовой (ИБХ РАН). Остальные реагенты были марки "ос. ч.", "х. ч." и "ч. д. а."

Концентрация активных центров трипсина была измерена по Чейзу и Шоу [25]. Концентрация активного ВВI, измеренная по подавлению им активности трипсина и химоотрипсина, составила 100%.

Содержание белка измеряли по методу Лоури [26].

Коммерческий препарат очищали методом гель-фильтрации на колонке Toyopearl HW-50, уравновешенной HCl, pH 3.0. Концентрация активных центров ингибитора, измеренная по подавлению активности трипсина, составила 75%.

Определение активности дуоденазы. Концентрация активных центров определялась титрованием дуоденазы ВВI с известной активностью [6].

Все кинетические эксперименты проводили при 25°C в Трис-НСI-буфере, pH 8.0. Подробно условия проведения экспериментов указаны в подписях к рисункам.

Остаточную ферментативную активность дуоденазы во время инкубации с α_1 -PI и АСТ при млярном соотношении фермент-ингибитор 1 : 1 измеряли по скорости гидролиза субстрата дуоденазы Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA. Смесь инкубировали 2–120 мин (α_1 -PI) и 1–40 мин (АСТ), после чего добавляли субстрат и регистрировали скорость реакции при длине волны 410 нм. Затем строили

график зависимости остаточной ферментативной активности от времени инкубации.

Стехиометрия взаимодействия дуоденазы с серпинами была измерена по подавлению амидазной активности дуоденазы ингибитором после пятиминутной предынкубации дуоденазы с АСТ (5 мин) или с α_1 -PI (40 мин). Строили график зависимости остаточной ферментативной активности от соотношения фермент-ингибитор и определяли стехиометрию линейной экстраполяцией начального участка графика до пересечения с осью абсцисс.

Измерение константы скорости ассоциации (k_a). Смесь дуоденазы и серпина (α_1 -PI или АСТ) инкубировали 2–40 мин, после чего добавляли избыток субстрата Tos-Gly-Pro-Lys-pNA и регистрировали скорость реакции при 410 нм. Строили график зависимости остаточной активности фермента от времени инкубации. Эту зависимость аппроксимировали по уравнению (1) [18]:

$$v/v_0 = 1/(1 + [E]_0 k_a t), \quad (1)$$

где v_0 и v — начальная скорость реакции и скорость реакции через время t соответственно.

SDS-ПААГ-электрофорез α_1 -PI, АСТ и их комплексов с дуоденазой проводили с использованием ячейки Mini Protean II фирмы "Bio-Rad" (США) в 8% геле, pH 8.3 [27], с нагрузкой 5 мкг белка на дорожку 40 мин при 20°C и напряжении 200 мВ. Затем гели окрашивали в течение 15 мин в растворе, содержащем 0.15% Кумасси бриллиантового синего R-250, 30% метанола и 10% уксусной кислоты. Гели отмывали в течение суток в растворе, содержащем 10% метанола и 10% уксусной кислоты.

Образцы для электрофореза готовили следующим образом: смесь 10 мкл (1 мкг) раствора дуоденазы и 4 мкл (4 мкг) раствора серпина инкубировали 5 мин для α_1 -PI и 2 мин для АСТ, затем останавливали реакцию прибавлением 2 мкл 2 мМ фенолметилсульфонилфторида и добавляли 4 мкл пятикратного буфера для образцов. Перед помещением в гель образцы выдерживали при 80°C в течение 10 мин и центрифугировали.

БЛАГОДАРНОСТИ

Данная работа поддержана грантом РФФИ № 01-04-49848.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Антонов В.К., Воротынцева Т.И., Замолодчикова Т.С. // Докл. АН. 1992. Т. 324. С. 1318–1322.
2. Zamolodchikova T.S., Sokolova E.A., Alexandrov S.L., Mikhaleva I.I., Prudchenko I.A., Morozov I.A., Kononenko N.V., Mirgorodskaya O.A., Da U., Larionova N.I., Pozdnev V.F., Ghosh D., Duax W.L., Vorotyntseva T.I. // Eur. J. Biochem. 1997. V. 249. P. 612–621.

3. Zamolodchikova T.S., Sokolova E.A., Deshun L., Sandler J.E. // FEBS Lett. 2000. V. 466. P. 295–299.
4. Pemberton A.D., Zamolodchikova T.S., Scudamore C.L., Chilvers E.R., Miller H.R.P., Walker T.R. // Eur. J. Biochem. 2002. V. 269. P. 1171–1180.
5. Zamolodchikova T.S., Vorotyntseva T.I., Antonov V.K. // Eur. J. Biochem. 1995. V. 227. P. 866–872.
6. Гладышева И.П., Замолодчикова Т.С., Соколова Е.А., Ларионова Н.И. // Биохимия. 1999. Т. 64. С. 1473–1479.
7. Bode W., Huber R. // Eur. J. Biochem. 1992. V. 204. P. 433–451.
8. Huber R., Carrell R.W. // Biochemistry. 1989. V. 28. P. 8951–8966.
9. Mottonen J., Strand A., Symersky J., Sweet R.M., Danley D.E., Geoghegan K.F., Gerard R.D., Goldsmith E.J. // Nature. 1992. V. 355. P. 270–273.
10. Loebermann H., Tokuoaka R., Deisenhofer J., Huber R. // J. Mol. Biol. 1984. V. 177. P. 531–556.
11. Travis J., Bowen J., Baugh R. // Biochemistry. 1978. V. 17. P. 5651–5656.
12. Schechter N., Sprows J., Shoenberger O., Lazarus G., Cooperman B., Rubin H. // J. Biol. Chem. 1989. V. 264. P. 21308–21315.
13. Davril M., Laine A., Hayem A. // Biochem. J. 1987. V. 245. P. 699–704.
14. Beatty K., Bieth J.G., Travis J. // J. Biol. Chem. 1980. V. 255. P. 3931–3934.
15. Bieth J. // Regulation of Matrix Accumulation / Ed. R.P. Mecham. New York: Acad. Press, 1986. P. 217–320.
16. Schechter N.M., Jordan L.M., James A.M., Cooperman B.S., Wang Z.M., Rubin H. // J. Biol. Chem. 1993. V. 268. P. 23616–23625.
17. Berniger R.W. // J. Med. Exp. Clin. 1986. V. 16. P. 101–128.
18. Duranton J., Adam C., Bieth J.G. // Biochemistry. 1998. V. 37. P. 11239–11245.
19. Wright H.T., Scarsdale J.N. // Proteins. 1995. V. 22. P. 210–225.
20. Salvesen G., Farley D., Shuman J., Przybyla A., Reilly C., Travis J. // Biochemistry. 1987. V. 26. P. 2289–2293.
21. Pletnev V.Z., Zamolodchikova T.S., Pangborn W.A., Duxax W.L. // Proteins. 2000. V. 41. P. 8–16.
22. Cichy J., Potempa J., Travis J. // J. Biol. Chem. 1993. V. 272. P. 8250–8255.
23. Malik A.K., McGee J.O. // Malays. J. Pathol. 1993. V. 15. P. 151–154.
24. Geboes K., Rutgeerts P., Vantrappen G., Desmet V.J. // Hepatogastroenterology. 1983. V. 30. P. 24–26.
25. Chase T., Shaw E. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1967. V. 269. P. 508–514.
26. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. // J. Biol. Chem. 1951. V. 193. P. 265–275.
27. Laemmli U.K. // Nature. 1970. V. 227. P. 680–685.

Interaction of Duodenase with Serpins from Human Blood Serum

N. A. Popykina*, I. P. Gladysheva*, T. S. Zamolodchikova**, and N. I. Larionova**

#Phone: +7 (095) 939-3417; e-mail: nilar@enzyme.chem.msu.ru

*Chair of Chemical Enzymology, Faculty of Chemistry, Moscow State University,
Vorob'evy gory, Moscow, 119899 Russia

**Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, ul. Miklukho-Maklaya 16/10,
GSP Moscow, 117997 Russia

The interaction of duodenase, a new serine protease from a small group of Janus-faced proteases, with serpins, α_1 -protease inhibitor (α_1 -PI) and antichymotrypsin (ACT) from human blood serum, was studied. The stoichiometry of the inhibition process was found to be 1.2 and 1.3 mol/mol for α_1 -PI and ACT, respectively. The presence of a stable enzyme–inhibitory complex duodenase– α_1 -PI was confirmed by SDS-PAGE. No formation of the duodenase–ACT complex was demonstrated; instead, the band of the cleaved inhibitor was indicated upon the ACT hydrolysis. The suicide mechanism of the duodenase interaction with the human blood serpins was proved. The association rate constants (K_a , $M^{-1} s^{-1}$) were $2.4 \pm 0.3 \times 10^5$ for α_1 -PI and $3.0 \pm 0.4 \times 10^5$ for ACT. These results indicate the possibility of the regulation of duodenase activity by endogenous serpins. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2003, vol. 29, no. 6; see also <http://www.maik.ru>.

Key words: antichymotrypsin, duodenase, α_1 -inhibitor of proteases, serpins