

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ.

УДК 547.963.3:577.113.6

© Коллектив авторов

### ИНГИБИТОР ЭНТЕРОПЕПТИДАЗЫ И ТРИПСИНА ИЗ ДВЕНАДЦАТИПЕРСТНОЙ КИШКИ БЫКА.

А. Г. МИХАЙЛОВА, Н. Г. ЕВТЮКОВА, Л. А. ЧУПОВА, Л. Д. РУМШ

Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,  
117871, Москва, ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

При очистке энтеропептидазы (ЭП) в слизистой двенадцатиперстной кишки быка обнаружен ингибитор этого фермента (ДИ). Разработан метод очистки ДИ. Обнаружено, что препараты ДИ, полученные в результате аффинной хроматографии на иммобилизованном трипсине, содержат два основных компонента: ДИ-9 (9 кДа) и ДИ-20 (20 кДа). N-концевая аминокислотная последовательность 1-19 ДИ-9 свидетельствует о том, что он принадлежит к семейству ингибиторов Кунитца (БПИ). ДИ-9 обладает такой же молекулярной массой, как и БПИ - 6,5 кДа. Аминокислотная последовательность 1-19 ДИ-9 отличается от соответствующей области БПИ заменой аргинина-17 на аланин. N-концевая аминокислотная последовательность 1-25 ДИ-20 позволяет предположить, что этот белок является ранее неизвестной мембранно-связанной фосфолипазой A<sub>2</sub>. По-видимому, ингибитор ДИ-9 находится с этой фосфолипазой в общем липопротеиновом комплексе. Единственный обнаруженный ранее *in vitro* ингибитор энтеропептидазы, БПИ, *in vivo* пространственно отделен от этого фермента. Найденный нами в дуоденуме быка ДИ-9, ингибитор из семейства кунинов, может быть, таким образом, физиологическим ингибитором энтеропептидазы.

**Ключевые слова:** ингибитор энтеропептидазы, двенадцатиперстная кишка быка, очистка, N-концевая аминокислотная последовательность, фосфолипаза A<sub>2</sub>.

**ВВЕДЕНИЕ.** Белковые ингибиторы протеиназ широко распространены в природе; существует множество гипотез об их физиологической роли в регулировании процессов синтеза и гидролиза белков [1].

Наиболее изученным протеиназным ингибитором животного происхождения является панкреатический ингибитор Кунитца, или основной протеиназный ингибитор быка (БПИ). Этот низкомолекулярный (6,5 кДа), основной белок, обладающий широким спектром активности по отношению к различным сериновым протеиназам, впервые был выделен из бычьей поджелудочной железы [2] и затем обнаружен в различных органах быка (легкие, селезенка, тимус, печень, слюнные железы) [3]. Широкое распространение этого ингибитора объясняется его локализацией в тучных клетках [4], которые присутствуют во всех соединительных тканях. Более того, оказалось, что в этих тканях содержится, наряду с БПИ, целый набор близкородственных ему ингибиторов [3, 5-7], названных семейством ингибиторов Кунитца, или кунинами. Гомологичные ингибиторы

семейства Кунитца обнаружены также в плазме крови быка [8] и молозиве [9]. В плазме крови млекопитающих ингибиторы кунитового типа присутствуют в виде структурных и функциональных доменов, локализованных в N-концевой области интер- $\alpha$ -трипсинового ингибитора, высокомолекулярного гликопротеина [10]. Низкомолекулярные ингибиторы, принадлежащие к семейству Кунитца, обнаружены в плазме крови человека [11], а также в морских анемонах, улитках и змеином яде [12].

БПИ, выделенный первоначально из поджелудочной железы, был предложен на роль регулятора процесса превращения трипсиногена (Тг) в трипсин (Тр), происходящего в двенадцатиперстной кишке [2]. Однако вскоре было обнаружено, что этот ингибитор не секретируется в панкреатический сок и содержится только в ткани поджелудочной железы [13, 14]. Панкреатический сок млекопитающих содержит другой, не гомологичный БПИ, секреторный специфический ингибитор Тр (ингибитор Казаля), предохраняющий Тг от преждевременной активации [13, 15].

Активация Тг с образованием Тр происходит в двенадцатиперстной кишке под действием высокоспецифической протеиназы процессинга энтеропептидазы (ЭП) (энтерокиназа; КФ 3.4.21.9). Этот фермент катализирует с высокой эффективностью гидролиз полипептидной цепи после консервативной последовательности Asp-Asp-Asp-Asp-Lys, находящейся в N-концевых активационных пептидах различных Тг [16, 17]. По своей структуре и некоторым свойствам ЭП является трипсиноподобным ферментом [17-19]. Однако узкая специфичность этой протеиназы приводит, в частности, к тому, что из большого числа белковых ингибиторов Тр (включая и секреторный) лишь один БПИ является хорошим ингибитором этого фермента ( $K_i = 5 \times 10^{-9}$  М) [17]. Высокое сродство ЭП быка к БПИ позволяет использовать этот ингибитор в иммобилизованном виде для аффинной очистки данного фермента [17]. Для расщепления химерных белков, содержащих последовательность тетрааспартил-лизин, нами был разработан метод получения препаративных количеств высокоочищенной ЭП быка, не содержащей примесей других протеолитических ферментов [20, 21]; конечной стадией очистки при этом является аффинная хроматография на БПИ - сефарозе. Долгое время как в наших экспериментах, так и в литературе (например, [17]) оставалась необъяснимой неполная сорбция ЭП на аффинном сорбенте, несмотря на значительный избыток иммобилизованного ингибитора. Мы обнаружили, что ЭП находится в слизистой дуоденума в виде комплекса с ранее неизвестным ингибитором (ДИ), причем комплекс настолько прочен, что сохраняется на всех стадиях очистки фермента, вплоть до последней. Действительно, из фракций, содержащих ЭП, оставшихся в растворе после аффинной хроматографии на иммобилизованном БПИ, был выделен низкомолекулярный термостабильный белок, оказавшийся также хорошим ингибитором Тр. Это позволило применить Тр, иммобилизованный на сефарозе, для удаления ингибитора из его комплекса с ЭП. После такой обработки практически вся ЭП сорбируется на иммобилизованном БПИ, что значительно повышает выход фермента. Однако количество полученного ДИ оказалось недостаточно для исследования природы этого белка. Была поставлена задача разработать метод индивидуальной очистки ингибитора.

**МЕТОДИКА.** В работе использовали акриламид, персульфат аммония, N,N'-метиленабисакриламид, N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин, реактив Protein Assay (Bio-Rad, США), трис(гидроксиметил)аминометан (трис), *n*-нитрофениловый эфир *n*'-гуанидинбензойной кислоты (NPGB) (Merck, Германия), глицин, мочевины,  $\beta$ -меркаптоэтанол, додецилсульфат натрия (SDS), кумасси R-250, этиловый эфир *N*-ацетил-L-тирозина (АТЭЕ) (Serva, Германия), *n*-нитроанилид  $\alpha$ -N-бензил-D,L-аргинина (BAPNA), этиловый эфир  $\alpha$ -N-бензил-L-аргинина (BAEE) (Sigma, США), белковые стандарты для электрофореза в полиакриламидном геле, сефарозу 4В (Pharmacia,

Швеция), иммобилон (Millipore, США). Остальные реагенты - отечественного производства классификации ос.ч. или х.ч.

БПИ был любезно предоставлен Н. И. Ларионовой (МГУ им. М. В. Ломоносова).

Трипсин (КФ 3.4.23.1) и химотрипсин (КФ 3.4.21.1) бычий лиофилизированный произведен заводом мед. препаратов г. Санкт-Петербург, Россия.

Энтеропептидаза (КФ 3.4.21.9) получена по модифицированному методу [17]; тканевой калликреин человека (КФ 3.4.21.35) - по модифицированному методу [22].

Количество белка определяли по методу Бредфорд [23].

Аминокислотный состав ДИ-9 установлен в филиале ИБХ им. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова (г. Пущино) после кислотного гидролиза с помощью аминокислотного анализатора Biotronic 6000 (Германия).

SDS-электрофорез проводили по методу Леммли [24] в 15%-ном полиакриламидном геле (ПААГ; толщина пластин 1 мм, концентрирующий гель 4%), используя установку для проведения электрофореза "Power Supplier 500/400" фирмы Pharmacia (Швеция). Электроблоттинг белковых зон, полученных в результате электрофореза, проводили на аппаратуре фирмы Bio-Rad (США) с переносом на иммобилон для секвенирования N-концевых аминокислотных последовательностей.

Аминокислотные последовательности анализировали на автоматическом газофазном секвенаторе Applied Biosystems 470 A (США).

Компьютерный поиск гомологичных фрагментов ДИ выполнен с помощью базы данных FASTA.

Оптическую плотность измеряли на спектрофотометре "Gilford 2400-2" (США). Активность трипсина определяли с помощью BAPNA [25]. Регистрировали возрастание оптической плотности при гидролизе субстрата с образованием *n*- нитроанилина (405 нм, 25°C). Смешивали 1,425 мл раствора BAPNA (0,5 мг/мл) в 0,1М трис-НСl буфере рН 8, содержащем 0,05М CaCl<sub>2</sub> и 10% диметилсульфоксида с 0,75 мл пробы (5-20 мкл  $1 \times 10^{-5}$  -  $1 \times 10^{-6}$  М раствора трипсина) в кварцевой кювете шириной 1 см.

Активность химотрипсина определяли, регистрируя уменьшение оптической плотности при 237 нм, 25°C, происходящее при гидролизе АТЭЕ [26]. К 1,5 мл раствора АТЭЕ ( $1 \times 10^{-3}$ М) в 0,01М трис-НСl рН 8, содержащем 0,05М CaCl<sub>2</sub>, добавляли 5- 10 мкл раствора фермента ( $4 \times 10^{-6}$  М).

Калликреиновую активность измеряли при 255 нм по [27], используя ВАЕЕ как субстрат при 37°C. К 0,1 мл пробы, содержащей 20 мкл  $2 \times 10^{-6}$  М фермента в кварцевой кювете шириной 0,5 см, добавляли 0,9 мл раствора субстрата ( $1 \times 10^{-3}$  М) в 0,05 М трис-НСl рН 8.

Антипротеолитическую активность БПИ и ДИ сравнивали, смешивая 5-20 мкл раствора каждого ингибитора с 5-20 мкл раствора соответствующего фермента и инкубируя 30 мин. при рН 8 и 25°C. Затем добавляли соответствующий субстрат и измеряли активность трипсина, химотрипсина или калликреина вместе с контролем, не содержащим ингибитора.

Концентрацию активного трипсина определяли с помощью титрования NPGV как описано [28]. Растворы трипсина известной молярности использовали для определения концентраций растворов ДИ и БПИ; в свою очередь, с помощью титрования БПИ определяли концентрацию растворов калликреина и других ферментов.

Для сравнения антиэнтеропептидазной активности ДИ и БПИ инкубировали энтеропептидазу ( $6,5 \times 10^{-9}$  М) с 200-кратным молярным избытком каждого из двух ингибиторов в 0,01 М трис-НСl рН8 при 25°C в течение 30 мин., вместе с контролем, содержащим то же количество фермента без ингибитора. Активность фермента измеряли с помощью химерного белка P<sub>g</sub>AP26 по [21], смешивая 4 мкл этих инкубационных смесей с 16 мкл раствора субстрата ( $1 \times 10^{-4}$  М) в том же буфере при 37°C. За

образованием продукта гидролиза субстрата (P26) следили с помощью высокоэффективной гель-фильтрации на колонке Ultracac TSK-G 2000 SW, хроматограф Beckman [21].

*Выделение и очистка ДИ.* 0,5 кг слизистой двенадцатиперстной кишки быка перемешивали в течение 18 - 20 часов с 1 л 0,1М уксусной кислоты при рН 3, смесь центрифугировали при 10000 об/мин., супернатант нагревали до 80-90°C в течение 30 мин., отделяли выпавший белковый осадок центрифугированием при 4000 об/мин. Лيوфилизированный супернатант растворяли в 170 мл 0,01 М трис-НСl рН 8, содержащем 0,5 М NaCl и 0,05 М CaCl<sub>2</sub> и после центрифугирования наносили на аффинный сорбент (20 мл). Трипсин-сефарозу 4В получали с помощью активации смолы бромцианом [29]; сорбент МПС-ПА-2000-трипсин получен по методике [30]. Емкость сорбентов 10 нмоль /мл в случае МПС-ПА-трипсина и 20 нмоль/мл для трипсин-сефарозы. Колонку промывали с той же скоростью 0,01М трис рН 8, содержащим 0,5 М NaCl до полного отсутствия оптической плотности на выходе.

Ингибитор элюировали двумя способами: ступенчато понижая рН с 3 до 1,5 (0,1 М формиатный буфер рН 3, содержащий 0,1М NaCl; затем тот же буфер с рН 2 и, наконец, 0,01 М соляная кислота содержащая 0,5 М NaCl), или же с помощью градиента рН 5 (0,1 М ацетатный буфер, 0,1 М NaCl) - рН 2. Фракции, содержащие антитрипсиновую активность, объединяли и обессоливали на колонке PD-2 (Pharmacia, Швеция).

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.** Ингибитор Тр и ЭП из слизистой двенадцатиперстной кишки быка (ДИ) был сначала получен нами как побочный продукт при очистке ЭП на аффинном сорбенте, содержащем иммобилизованный БПИ. В зависимости от исходной партии слизистой дуоденума, около 30-40% (иногда до 90%) ферментативной активности ЭП не связывалось с аффинной смолой и оставалось в растворе. При повторном нанесении таких фракций фермент вообще не сорбировался иммобилизованным ингибитором. Объяснение этому феномену было найдено нами, когда было предположено, а затем и доказано экспериментально, что ЭП находится в слизистой дуоденума в виде комплекса с ранее неизвестным ингибитором.

При сравнении количества ДИ в слизистой дуоденума (1600 - 2000 нмоль/кг) с соответствующим количеством ЭП (40-60 нмоль/кг), стало очевидным, что ингибитор находится примерно в 40-кратном избытке, а это по нашим данным, необходимо для предотвращения автолиза фермента [31].

В качестве первой стадии очистки ДИ была применена экстракция слизистой кислым (рН 3) раствором без детергентов. Далее была использована термостабильность ДИ. Нагревание экстракта до 80-90°C позволило успешно удалить с помощью тепловой денатурации значительные количества примесных белков, в том числе и ЭП, причем ингибитор сохранился почти полностью.

Наряду с Тр-сефарозой нами был применен аффинный сорбент МПС-ПА-Тр, с другим носителем - модифицированным кремнеземом [30]. Результаты, полученные при использовании этих двух аффинных сорбентов, были практически одинаковы. Общее количество полученного белка с антитриптической активностью было достаточно велико, однако, препараты ДИ оказались не гомогенными: количественный и качественный состав их варьировался в широких пределах в зависимости от рН буфера элюции и исходной партии слизистой. Если в одних случаях был получен практически гомогенный, по данным SDS-электрофореза в восстанавливающих условиях, белок с молекулярной массой 9 кДа (ДИ-9), то в других случаях, наряду с этим преобладающим продуктом, присутствуют также белки с молекулярной массой 20 кДа и , в наименьшем количестве, 14 кДа (рис. 1). При этом более высокомолекулярные компоненты наблюдаются в элюатах с более высоким значением рН, а в элюатах с рН 1,5 ДИ-9 был обнаружен практически в чистом виде. На основании этих результатов, а также сравнения

антитриптической активности различных препаратов ДИ, можно предположить, что белки ДИ-20 и ДИ-14 сами не являются ингибиторами Тр, а находятся в комплексе с ингибитором ДИ-9.

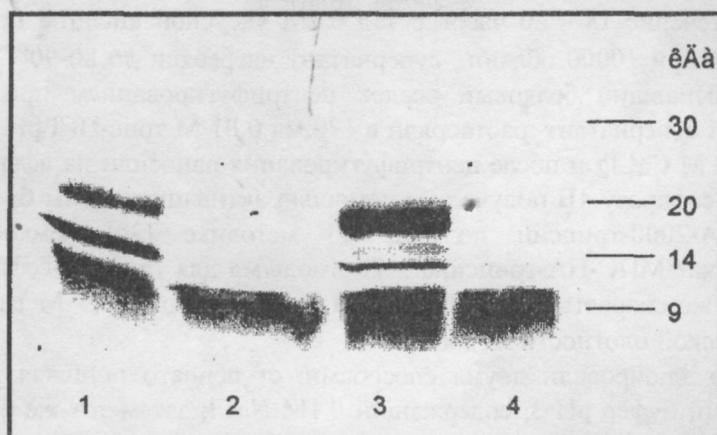


Рисунок 1.

SDS-электрофорез (15% ПААГ) в восстанавливающих условиях различных партий ДИ в сравнении с БПИ. Элюция с аффинного сорбента: 1. рН 3; 2. рН 1,5; 3. градиент рН 5-2. 4. БПИ.

Наличие гомогенного ДИ-9 позволило использовать этот препарат для определения N-концевой аминокислоты, N-концевой аминокислотной последовательности 1-19 (рис. 2), аминокислотного состава (табл.), а также способности ингибировать некоторые другие, кроме Тр и ЭП, ферменты.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19				
ДИ-9	R	P	D	F	C	L	E	P	P	Y	T	G	P	C	K	A	A	I	I				
БПИ	R	P	D	F	C	L	E	P	P	Y	T	G	P	C	K	A	R	I	I	[13]			
СИ-П	R	P	D	F	C	L	E	P	P	Y	T	G	P	C	K	A	K	M	I	[13]			
СИ-I	A	Q	R	P	D	F	C	L	E	P	P	Y	T	G	P	C	K	A	K	M	I	[13]	
БИ-8	T	E	R	P	D	F	C	L	E	P	P	Y	T	G	P	C	K	A	A	M	I	[8]	
МИ	F	Q	T	P	P	D	L	C	Q	L	P	Q	A	R	G	P	C	K	A	A	L	L	[9]

Рисунок 2.

N-концевые аминокислотные последовательности ДИ-9 и гомологичных ингибиторов семейства кунинов.

N-концевая аминокислотная последовательность 1-19 ДИ-9 (рис. 2) свидетельствует о том, что он принадлежит к семейству ингибиторов Кунитца. Согласно данным SDS-электрофореза, молекула ДИ-9 обладает такой же молекулярной массой, как БПИ - 6,5 кДа (рис. 1). Некоторую аномалию в электрофоретической подвижности БПИ отмечали ранее [3]; еще ярче эта особенность проявилась при проведении электрофореза в невосстанавливающих условиях, где кажущаяся молекулярная масса как ДИ-9, так и БПИ соответствовала, по нашим данным, 14-16 кДа. Это явление в литературе не упоминается; однако образование димера, связанного дисульфидными связями, для кунинов исключено, так как их ингибиторные свойства, по данным рентгеноструктурного анализа, жестко определяются наличием трех внутримолекулярных дисульфидных мостов [32].

Аминокислотная последовательность 1-19 ДИ-9 отличается от соответствующей области БПИ заменой аргинина-17 на аланин. Замена Arg-17 на лизин встречается в случае ингибиторов I и II из селезенки быка (СИ-I и II); эта же аминокислота заменена на

аланин в молекулах ингибиторов из плазмы крови быка (БИ-8) и из молозива (МИ) (рис. 2). Однако в этих случаях Пе-18 также заменен на метионин или лейцин. Таким образом, ДИ-9 является ранее неизвестным представителем семейства кунинов.

Таблица. Сравнение аминокислотного состава ДИ-9 и некоторых кунинов быка (по данным [3],[6]).

Аминокислота	ДИ-9	БПИ [3]	СИ-П [6]
Asx	5.05	5	5
Thr	2.89	3	3
Ser	2.42	1	2
Glx	4.41	3	3
Pro	3.91	4	4
Gly	6.03	6	6
Ala	5.40	6	6
Cys	не определяли	6	6
Val	1.30	1	1
Met	0.38	1	2
Pe	1.54	2	1
Leu	1.99	2	1
Tyr	1.05	4	4
Phe	2.30	4	5
His	0	0	0
Lys	3.49	4	5
Arg	3.50	6	4
Trp	не определяли	0	0

При сравнении ингибиторной эффективности ДИ-9 и БПИ было обнаружено, что они ингибируют ЭП и Тр практически одинаково, ( $K_i$  соответственно  $\sim 10^{-8}$  -  $10^{-9}$  М и  $10^{-10}$ - $10^{-11}$  М). ДИ ингибирует также химотрипсин, причем, как и БПИ, значительно хуже, чем Тр ( $K_i \sim 10^{-8}$  М). Различие ДИ-9 и БПИ, как следует из литературы, может проявиться только по отношению к калликреину (КР), так как этот фермент предпочитает остатки аргинина в положении 17, 19 и 39 [8, 12]. Очевидно (рис. 2), что лишь в случае отсутствия остатка Arg-39 ДИ-9 не будет ингибировать КР.

Оказалось, однако, что препараты ДИ содержат, по видимому, большее число компонентов, чем обнаруживается при электрофорезе в ПААГ. В некоторых образцах ДИ-9 наряду с остатком аланина в положении 17 обнаружен также и аргинин. Данные об аминокислотном составе ДИ-9 тоже достаточно неопределенны (табл.). Наконец, результаты ингибирования тканевого КР человека препаратами ДИ подтверждают предположение о гетерогенности ДИ-9: если предварительные результаты показали, что ДИ-9 ингибирует КР практически также (или слегка хуже), чем БПИ, то полученный позднее гомогенный, по данным электрофореза, другой препарат этого белка не являлся ингибитором КР.

По-видимому, также как в случае кунинов, обнаруженных в других органах быка [3, 5-7] и в плазме крови человека [11], ингибитор из дуоденума ДИ-9 может содержать несколько белков с одной и той же молекулярной массой (6,5 кДа), отличающихся заменой нескольких аминокислотных остатков, в т.ч. и функционально важных (17 и 39). В зависимости от исходного материала, в конечном препарате ДИ-9 преобладает один из этих белков. Смесь таких изоингибиторов разделяли с помощью FPLC на колонке моно-S и обратнофазной ВЭЖХ [5, 7, 11]. В настоящее время нами также проводятся эксперименты по дальнейшему разделению компонентов ДИ-9.

Попытки разделения комплекса белков ДИ-9 и ДИ-20 (и 14) оказались безуспешными. В отсутствие гомогенного препарата ДИ-20 его N-концевая аминокислотная последовательность была определена с помощью переноса соответствующей белковой полосы с геля (SDS-электрофорез в восстанавливающих условиях) на иммобилон. Результаты такого секвенирования ДИ-20 оказались неожиданными: его

1	10	20
1. D L L N F R K M I K L T T G K E P A T R Y S F Y G		
2. D L L N F R K M I K L K T G K A P V P N Y A F Y G [33]		
3. H L L Q F R K M I K K M T G K E P V I S Y A F Y G [34]		
4. H L L D F R K M I R Y T T G K E A T T S Y G A Y G [34]		
N L V N F H R M I K L T T G K E A A L S Y G F Y G [35]		

Рисунок 3.

1. ДИ-20 (20 кДа), 2. Фосфолипаза A<sub>2</sub> из илеума свиньи, фрагмент 1-48, 15-16 кДа, 3. Основная фосфолипаза A<sub>2</sub>, *Agkistrodon halys blomhoffi*, 122 а.к. остатка, 4. Мембранносвязанная фосфолипаза A<sub>2</sub> кролика, 68 а.к. остатка, 5. Мембранносвязанная фосфолипаза A<sub>2</sub> человека, 124 а.к. остатка N-концевые аминокислотные последовательности ДИ-20 и гомологичные фрагменты некоторых фосфолипаз A<sub>2</sub>.

аминокислотная последовательность 1-25 (рис. 3) гомологична некоторым фосфолипазам A<sub>2</sub> (ЕС 3.1.1.4) из различных источников [33-35]. Известно свойство фосфолипаз прочно ассоциироваться с липидами [33]: фосфолипазы A<sub>2</sub>- сильноосновные белки [33], так же как и ингибиторы семейства Кунитца [3]. Некоторые особенности поведения препаратов ДИ, содержащих компоненты с молекулярной массой 9, 14 и 20 кДа, привели нас к предположению, что ингибитор ДИ-9 находится с фосфолипазой ДИ-20 (14) в общем липопротеиновом комплексе. По данным изофокусировки, изоэлектрическая точка комплекса ДИ-9 - 20 находится между 10 и 11, поэтому разделение его с помощью ионообменной хроматографии невозможно. Неудачными оказались попытки разрушения этого комплекса с помощью различных детергентов. Лишь SDS-электрофорез по Лэммли в восстанавливающих условиях (15% гель) (рис. 1) приводит к разделению этих белков. При этом полосы, соответствующие белкам с молекулярной массой 14 и 20 кДа, часто при повторных электрофорезах одного и того же препарата ДИ переходят одна в другую. Так как по литературным данным фосфолипазы A<sub>2</sub> обычно имеют молекулярную массу 14-16 кДа [33-35], скорее всего, ДИ-14 является этой фосфолипазой в чистом виде, а ДИ-20 - белком, ассоциированным с липидами.

До сих пор считали, что единственным ингибитором Тр, регулирующим процесс его активации из Тг, является секреторный ингибитор Казалья [13], в то время как ингибитор Кунитца (БПИ) не секретируется из поджелудочной железы. Позднее БПИ и родственные ему ингибиторы были обнаружены во многих тканях быка [3], и локализованы в тучных клетках [4]. Однако какие-либо данные, касающиеся дуоденума, отсутствуют. Поступающий в дуоденум из поджелудочной железы секреторный ингибитор трипсина не является ингибитором ЭП [17]. Этот ингибитор отличается невысокой стабильностью [15]. Поэтому в разработанном нами методе очистки с использованием экстракции в кислых условиях при высокой температуре примесь этого белка не может оказаться в препаратах ДИ.

Вызывает удивление тот факт, что единственный обнаруженный ранее *in vitro* ингибитор энтеропептидазы, БПИ [17], *in vivo* пространственно отделен от этого фермента [13,14]. Найденный нами в дуоденуме быка ДИ-9, ингибитор из семейства кунитинов, может быть, таким образом, физиологическим ингибитором энтеропептидазы.

Авторы приносят благодарность Н. А. Потапенко, Ю. Ф. Леоновой и А. А. Тагаеву за анализ аминокислотных последовательностей и Т. А. Мурановой за определение аминокислотного состава.

Настоящая работа выполнена при поддержке гранта № 96-04-48765 РФФИ.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Bode W., Huber R. (1992) Eur. J. Biochem. **204**, 433-451.
2. Kunitz M., Nortrop J. H. (1936) J. Gen. Physiol. **19**, 991-1007.
3. Fioretti E., Binotti I., Barra D., Citro G., Ascoli F., Antonini E. (1983) Eur. J. Biochem. **130**, 13-18.
4. Fritz H., Kruck J., Russe I., Liebich H. G. (1979) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. **360**, 430-444.
5. Fioretti E., Angeletti M., Fiorucci L., Barra D., Bossa F., Ascoli F. (1988) Hoppe-Seulers Z. Biol. Chem. **369**, 37-42.
6. Fioretti E., Iacopino G., Angeletti M., Barra D., Bossa F., Ascoli F. (1985) J. Biol. Chem. **260**, 11451-11455.
7. Barra D., Simmaco M., Bossa F., Fioretti E., Angeletti M., Ascoli F. (1987) J. Biol. Chem. **262**, 13916-13919.
8. Wachter E., Deppner K., Hochstrasser K., Lempart K., Geiger R. (1980) FEBS Lett. **119**, 58-62.
9. Cechova D., Jonacova V., Sorm F. (1971) Collect. Czech. Chem. Commun. **36**, 3342-3357.
10. Gebhard W., Hochstrasser K. (1986) In: Proteinase Inhibitors (Eds A. Barrett, G. Salvesen). - Amsterdam, Elsevier, 389-401.
11. Fioretti E., Angeletti M., Citro G., Barra D., Ascoli F. (1987) J. Biol. Chem. **262**, 3586-3589.
12. Diel T., Huber C., Geiger R., Iwanaga S., Fritz H. (1979) Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem. **360**, 67-71.
13. Fritz H., Woitinas F., Werle E. (1966) I) Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem. **345**, 168-180.
14. Werle E. (1964) ) Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem. **338**, 228-230.
15. Rigbi M., Green L.J. (1968) J. Biol. Chem. **243**, 5457-5464.
16. Guy O., Bartelt D.C., Amic J., Colomb E., Figarella C. (1976) FEBS Lett. **62**, 150-153.
17. Liepnieks J. J., Light A. (1979) J. Biol. Chem. **254**, 1677-1683.
18. Light A., Fonseca P. (1984) J. Biol. Chem. **259**, 13195-13198.
19. Kitamoto Y., Yuan X., Wu Q., McCourt D. W., Sadler J. E. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **91**, 7588-7592.
20. Добрынин В. Н., Болдырева Е. Ф., Филиппов С. А., Чувпило С. А., Коробко В. Г., Воротынцева Т. И., Михайлова А. Г., Бессмертная Л. Я., Америк А. Ю., Антонов В. К. (1987). Биоорган. химия. **13**, 119-121.
21. Михайлова А. Г., Шибанова Е. Д., Руми Л. Д., Антонов В. К. (1994) Биоорган. химия. **20**, 883-893.
22. Рабинович С. Э., Лобарева Л. С., Пасхина Т. С. (1990) Биохимия, **55**, 1675-1689.
23. Bradford M. (1976) Anal. Biochem. **72**, 248-254.

24. Laemmli U. (1970) *Nature*, **227**, 680-685.
25. Kassel B. (1970) *Methods Enzymol.* **19**, 844-853.
26. Walsh K. A., Wilcox P. E *Methods Enzymol.* **19**, 31-41.
27. Schwert G. B., Takenaka Y. *Biochim. Biophys. Acta.* **16**, 570-575.
28. Chase T., Jr., Shaw E. (1970) *Methods Enzymol.* **19**, 20-27.
29. March S. C., Parikh I., Guatrecasas P. (1974) *Anal. Biochem.* **60**, 149-152.
30. Кудрявцева Н. Е., Жигис Л. С., Зубов В. Г., Вульфсон А. Н., Мальцев К. В., Руми Л. Д. (1995) *Хим. фарм. журнал.* №1, 61-63.
31. Михайлова А.Г., Руми Л. Д. (1998) *Биоорган. химия.* В печати.
32. Creighton T. E. (1985) *J. Physiol. Chem.* **89**, 2452-2459.
33. Verger R., Ferrato F., Mansbach M., Pieroni G. (1982) *Biochemistry*, **21**, 6883-6889.
34. Forst S., Weiss J., Elsbach P. (1986) *Biochemistry*, **25**, 8381-8385.
35. Kramer R. M., Hession C., Johansen B., Hayes G., McGray P., Chow E., Tizard R., Pepinsky R. B. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 5768-5775.

#### INHIBITOR OF ENTEROPEPTIDASE AND TRYPSIN FROM BOVINE DUODENUM

A. G. MIKHAILOVA, N. G. EVTYUKOVA, L. A. CHUPOVA, L. D. RUMSH

Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences. Ul. Miklukho-Maklaya 16/10, GSP-7 Moscow, 117871, Russia

Enteropeptidase inhibitor (DI) was isolated from bovine duodenum during purification of this enzyme. DI was purified by affinity chromatography on immobilised trypsin. DI preparations contain two main components: DI-9 (9 kD) and DI-20 (20 kD). The N-terminal amino acid sequence 1-19 of DI-9 is highly homologous to the Kunitz inhibitor (BPI). Molecular weights of DI-9 and BPI are the same (gel electrophoresis data). Fragment 1-19 of DI-9 differs from the corresponding region of BPI only at the position 17: DI-9 contains Ala-17 instead of Arg in BPI. The homology of N-terminal amino acid sequence 1-25 of DI-20 with the corresponding regions of some phospholipases A<sub>2</sub> suggests that this protein is a new intestinal phospholipase A<sub>2</sub>. Inhibitor DI-9 and phospholipase DI-20 are probably isolated in a common lipoprotein complex. The only earlier known *in vitro* inhibitor of enteropeptidase, BPI, was localised *in vivo* in different tissues with this enzyme. In our opinion the Kunitz-type inhibitor DI-9 is, a physiological inhibitor of enteropeptidase.

**Key Words:** enteropeptidase inhibitor, bovine duodenum, purification, N-terminal amino acid sequence.