

# Kazal 型蛋白酶抑制剂结构与功能研究进展

## Progresses in the Structure and Function of Kazal-type Proteinase Inhibitors

郑青亮, 盛清, 张耀洲\*

ZHENG Qing-Liang, SHENG Qing and ZHANG Yao-Zhou\*

浙江理工大学生命科学学院 生物化学研究所, 杭州 310018

Institute of Biochemistry Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China

**摘要** 蛋白酶抑制剂广泛存在于生物体内, 在许多生命活动过程中发挥必不可少的作用, 特别是对蛋白酶活性进行精确调控。其中 Kazal 型蛋白酶抑制剂是最重要的、研究最为广泛的酶抑制剂之一, 该类抑制剂一般由一个或几个结构域组成, 每一个结构域具有保守的序列和分子构象, 同时发现该类抑制剂与蛋白酶作用的结合部位高度易变, 它们大多数暴露于与溶剂接触的环上, 其中 P1 部位是抑制作用的关键部位, 抑制剂的专一性由 P1 部位氨基酸残基的性质决定, 其它残基取代结合部位残基对抑制剂-酶的结合常数有显著的影响。Laskowski 算法可直接从 Kazal 型丝氨酸蛋白酶抑制剂的序列推测其与 6 种丝氨酸蛋白酶之间的抑制常数 ( $K_i$ )。目前在生物体内发现大量的 Kazal 型蛋白酶抑制剂, 并证实具有重要的生物学功能。

**关键词** Kazal 型蛋白酶抑制剂, Laskowski 算法, 活性部位

中图分类号 Q81 R373 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2006)05-0695-06

**Abstract** Proteinase inhibitors are widely distributed in many living organisms and play crucial roles in many biological processes, particularly in regulating the proteinase activity spatially and temporally. However, the Kazal family of serine protease inhibitors is one of the most important and extensively studied protease inhibitor families. This type of protease inhibitor normally consists of one or several domains. Every domain has a highly conserved sequence structure and molecular conformation. It is found that contact residues are hyper variable, which are responsible for the interaction of inhibitors and proteinases. Most of them are in the solvent exposed loop. But P1 residue is the key active site of the interaction between inhibitor and enzyme. The types of the amino acid at P1 site likely play an important role in causing different inhibitory activity. The substitutions at the contact residues cause significant effects on the association constant. By using the Laskowski algorithm, the  $K_i$  values of a Kazal domain against six serine proteinases can be predicted from the domain's sequence alone. At present there are many Kazal proteinase inhibitors found in the organisms, which show important biological functions. This article gives a comprehensive review of the newer developments in the characters and the interaction of the Kazal-type inhibitors.

**Key words** Kazal type proteinase inhibitor, Laskowski algorithm, active site

丝氨酸蛋白酶抑制剂是一种首先在动物血清中 发现的蛋白, 广泛存在于植物、动物、细菌和病毒

Received: March 27, 2006; Accepted: May 8, 2006.

This work was supported by the grants from the National High Technology Research and Development Programs of China (No. 2005AA206120 and No. 2005BA711A07), and National Basic Research Program of China (No. 2005CB121006) and Zhejiang Natural Science Foundation (No. Z204267).

\* Corresponding author. Tel: 86-571-86843198; E-mail: yaozhou@chinagene.com

国家高技术研究与发展计划项目(No. 2005AA206120 和 No. 2005BA711A07) 国家 973 项目(No. 2005CB121006) 和浙江省自然科学基金重点  
项目(No. Z204267) 资助。  
© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

中<sup>[1]</sup> 根据它们的序列、二硫键的数目和三维结构,最少可以归类为 18 个非同源家族<sup>[2]</sup>。其中 Kazal 型的丝氨酸蛋白酶抑制剂是较为保守的家族之一,它是在 Kazal 首次发现胰蛋白酶抑制剂( PSTI)后命名的<sup>[3]</sup> 其存在于鸟蛋、昆虫、小龙虾、哺乳动物组织(如精液泡、胰腺、下颌腺)和体液(如血液,唾液)中。它们与血凝、纤维蛋白溶解、胚胎发生、个体发育、食物消化、炎症和免疫应答等有着密切关联<sup>[4]</sup>。目前已发现 100 多种 Kazal 型蛋白酶抑制剂,但其具体结构与功能还未得到充分研究,主要由于蛋白酶抑制剂承受残酷的进化压力,使其活性部位高度易变<sup>[5]</sup> 从而导致蛋白酶抑制剂功能的多样性且有些抑制剂已丧失了原有的功能,这给研究带来极大的挑战。现在越来越多的生物体中发现新型的 Kazal 抑制剂并且在逐步地应用于临床治疗,其中研究得最成功的是水蛭素应用于抗血栓的治疗,鉴于 Kazal 型抑制剂重要的生物学功能及研究需要,本文对其结构与功能作一总结。

# 1 序列结构特征

## 1.1 典型的 Kazal 结构域

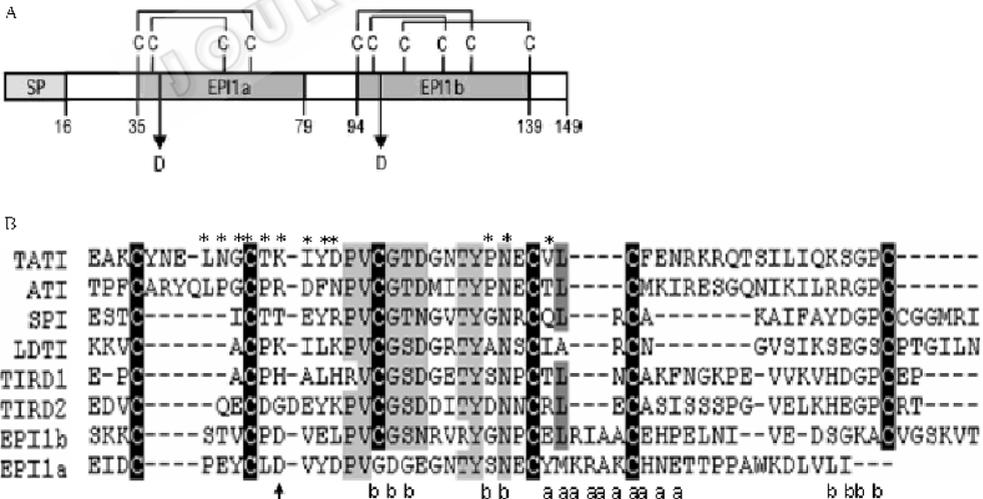
Kazal 型的丝氨酸蛋白酶抑制剂一般是由一个

或多个重复保守 Kazal 结构域所组成,典型的 Kazal 结构域(图 1)通常是由 50~60 个氨基酸残基组成,其中包括 6 个半胱氨酸残基和一个较为保守的序列模型: C<sub>I</sub>-X<sub>(1-7)</sub>-C<sub>II</sub>-X<sub>(5)</sub>-PVC<sub>III</sub> G-X<sub>(4)</sub>-TY-X-N-X-C<sub>IV</sub>-X<sub>(2-6)</sub>-C<sub>V</sub>-X<sub>(9-16)</sub>-C<sub>VI</sub>(X<sub>n</sub>), X 与 n 分别表示任意残基和残基的数目,前者形成的三对二硫键(Cys<sub>I</sub>-Cys<sub>V</sub>、Cys<sub>II</sub>-Cys<sub>IV</sub>、Cys<sub>III</sub>-Cys<sub>VI</sub>)稳固了结构域的分子构象。其中还包括一个 P1 活性部位,它是决定蛋白酶抑制剂专一性的关键部位,一般是第二个半胱氨酸后的第二个氨基酸残基<sup>[2,6]</sup>。许多 Kazal 型的蛋白酶抑制剂常有一段信号肽,位于 N 末端,其长度大约为 20 个氨基酸。

## 1.2 非典型的 Kazal 结构域

非典型 Kazal 结构域(图 1)是由 Magert 等于 1999 年首次报道,该小组研究的人类丝氨酸蛋白酶抑制剂 LEKTI 共有 15 个结构域,其中 13 个是非典型 Kazal 结构域,其结构域只有两对二硫键,缺少 Cys<sub>III</sub>-Cys<sub>VI</sub> 二硫键<sup>[7]</sup>。

Tian 等研究的重组蛋白 EPII(图 1)中包含非典型的 Kazal 结构域 EPIIa 和典型 Kazal 结构域 EPIIb<sup>[8]</sup> 而在重组蛋白 EPII0 中,包含两个典型的 Kazal 结构域 EPII0a、EPII0c 和非典型 Kazal 结构域



A: 摘自 Tian<sup>[8]</sup> 示意图表示 EPII 的结构,包括信号肽(SP)一个非典型 Kazal 结构域(EPIIa)和一个典型 Kazal 结构域(EPIIb) 数字代表距离 N 末端氨基酸残基的位置,半胱氨酸用 C 标出,二硫键是根据其它的 Kazal 结构域结构推出的,箭头所指的是 P1 残基(Asp); B: Kazal 结构域的序列比对,抑制剂的名字依次对应是 Homo sapiens Tumor-associated trypsin inhibitor (TATI);Macaca fascicularis Acrosin-trypsin inhibitor(ATI); Bombyx mori silk proteinase inhibitor(SPI);Hirudo medicinalis Leech-derived trypsin inhibitor (LDIT);Rhodnius prolixus Thrombin inhibitor rhodniin (TIRD1, TIRD2);Phytophthora infestans Kazal-like serine protease inhibitor(EPIIb, EPIIa)。箭头表示 P1 残基,\* 表示 Kazal 结构域-蛋白酶相互作用的 12 个结合位点(P6, P5, P4, P3, P2, P1, P1', P2', P3', P14', P15', P18') 二级结构用 α 螺旋和 β 折叠表示。

图 1 Kazal 型丝氨酸蛋白酶抑制剂结构及其序列特征

Fig. 1 The structure and the sequence's character of the Kazal-type serine protease inhibitors  
 A: the stretch map of the EPII's structure; B: the amino-acid sequence alignment of the eight different Kazal domains.  
 © 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

EPI10b 两种蛋白对枯草杆菌蛋白酶均有抑制作用<sup>[9]</sup>,将 EPI1 中的两个结构域基因分别在大肠杆菌中重组表达,发现仅非典型的 EPI1a 结构域对枯草杆菌蛋白酶有强烈的抑制作用,而 EPI1b 则无抑制活性<sup>[10]</sup>,是否可以推测在 EPI10 中也仅有 EPI10b 有抑制活性,其它两个结构域又起到什么作用,在抗宿主蛋白酶中二对二硫键结构域比三对二硫键结构域是否更具进化优势等问题,仍需进一步研究。

### 1.3 选择性剪切

大量资料表明:由基因编码推测的 Kazal 型蛋白酶抑制剂与生物体内起功能作用的抑制剂并不一致,通常需要经过转录后选择性的剪切过程,最终翻译成一个或几个蛋白。如 Friedrich 等研究的 rhodniin 蛋白,其基因编码 3 个结构域,而从生物体中分离出来的蛋白只有两个结构域<sup>[11]</sup>。最近 Mende 等研究的 Dipetalogastin 基因编码 6 个非典型 Kazal 型结构的蛋白,而生物体中活性蛋白只有 2 个结构域,分别对应的是基因编码的第三和第四结构域<sup>[12]</sup>。

这可能是在进化的压力下生物体选择对自身有益的方式进行剪切,其它被剪切掉的基因还能否编码抑制剂有待研究。

## 2 分子构象特征

Kazal 型蛋白酶抑制剂的结构域序列较为保守,并且其分子构象呈现高度保守<sup>[2]</sup>。典型的分子构象(图 2)包括 A、B、C 三个环状结构,Cys<sub>I</sub>-Cys<sub>V</sub> 封闭成 A 环,Cys<sub>II</sub>-Cys<sub>IV</sub> 将 A 环和 B 环分隔,其连接 N 末端和  $\alpha$  螺旋的中央形成 B 环,Cys<sub>III</sub>-Cys<sub>VI</sub> 连接 C 末端和  $\beta$  折叠的中央形成 C 环。A 环的大小是可变的,因

为 Cys<sub>I</sub> 与 Cys<sub>II</sub> 之间的氨基酸残基数目是可变的,在鸟卵类粘蛋白中多达 18 个残基,而在有些昆虫中只有 1 个残基<sup>[13]</sup>。Xavier 等研究的 SPI2 缺少 Cys<sub>V</sub>,不能形成 A 环,但它仍有生物活性,可见 A 环与生物活性没有必然的联系,B 环的长度一般是不变的,它构成了 Kazal 型结构域最稳定的区域,这与蛋白酶抑制剂专一性有密切的关系,C 环的长度一般在 31 至 34 个氨基酸残基之间变化<sup>[13,14]</sup>。典型的 Kazal 型抑制剂的二级结构(图 2)包含一个中心  $\alpha$  螺旋和较短的反向平行  $\beta$  折叠等结构,如 LDTI 的二级结构是由中心  $\alpha$  螺旋(Ser<sub>24</sub>-Asn<sub>30</sub>)和较短的反向平行  $\beta$  折叠(Val<sub>13</sub>-Gly<sub>15</sub>, Thr<sub>20</sub>-Tyr<sub>21</sub> 和 Ile<sub>34</sub>-Glu<sub>37</sub>)所组成<sup>[15]</sup>。

总之,Kazal 型蛋白酶抑制剂的空间结构呈球面凸起状,由三对二硫键、中心  $\alpha$  螺旋、反向平行  $\beta$  折叠所构成,P1 部位是决定抑制剂专一性的部位,位于 B 环中的凸起部分,其残基侧链暴露在外表面,起到催化作用。

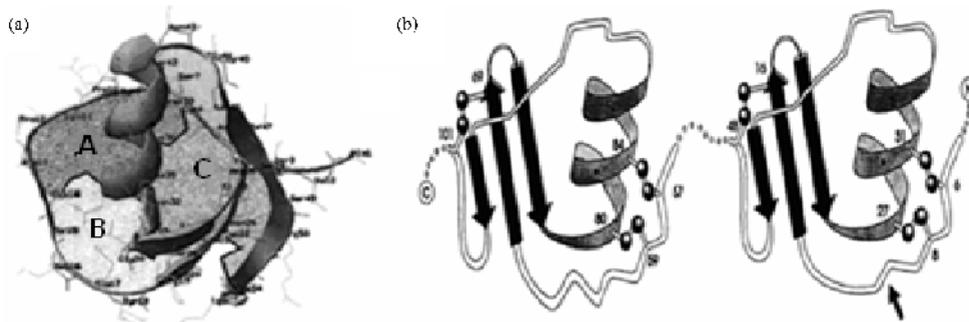
## 3 结构与功能关系

### 3.1 信号肽功能

目前通常用 signalP 3.0 软件分析蛋白质序列,其 S 值能有效地推测是否存在信号肽<sup>[17]</sup>。信号肽是决定抑制剂蛋白定位在胞内还是在胞外。Tomoaki 等研究的 KAZI 蛋白,其多肽  $\alpha$  的 N 末端有定位于线粒体的信号肽且多肽  $\beta$  和  $\delta$  均有信号肽,但  $\beta$  的信号肽效应要强于  $\delta$  的<sup>[18]</sup>。这表明信号肽决定了蛋白酶抑制剂的分泌途径,并且也有介导的强弱之分。

### 3.2 P1 残基的功能

大量的 Kazal 型蛋白酶抑制剂活性检测(表 1)



(a) 卵类粘蛋白(Mikado pheasant)第三结构域分子构象<sup>[16]</sup>,代表典型的 Kazal 家族成员分子构象,包括 A 环、B 环、C 环。(b) 两个典型 Kazal 结构域的带状模式图,是 rhodniin 的带状模型<sup>[11]</sup>,球和棒表示二硫桥,箭头指示 P1 残基位置。

图 2 典型的 Kazal 结构域包括一个中心  $\alpha$  螺旋和短的反向平行  $\beta$  折叠

Fig. 2 The typical Kazal domain contains a central  $\alpha$  helix and three small antiparallel  $\beta$  sheets

(a) molecular conformations of the ovomucoid third domain;(b) ribbon diagram of the model of rhodniin.

表 1 Kazal 型蛋白酶抑制剂结构域的数目、P1 残基和抑制的蛋白酶之间的关系

Table 1 The connection between the domain's numbers P1 residue of the Kazal-type proteinase inhibitors and the inhibitory proteinases

Species	Protein	NCBI Protein accession number	Inhibitory proteinases	Number of Kazal-type domains	P1 residue
<i>Rhodnius prolixus</i>	Thrombin inhibitor rhodniin	Q06684	Thrombin	2	His, Gly
<i>Hirudo medicinalis</i>	Leech derived trypsin inhibitor	P80424	Trypsin chymotrypsin	1	Lys
<i>Homo sapiens</i>	Trypsin inhibitor precursor	P00995	trypsin	1	Lys
<i>Phytophthora infestans</i>	EPI1	AAT00500	Subtilisin A	2	Asp, Asp
<i>Galleria mellonella</i>	Silk proteinase inhibitor 2	AAK48526	Proteinase K Subtilisin	1	Thr
<i>DipetalogasterMaximus</i>	dipetalogastin precursor	O96790	Thrombin Trypsin, Plasmin	6	Arg, Arg, Lys
<i>Penaeus monodon</i>	SPIPm2	AAF92779	Trypsin, Subtilisin Chymotrypsin	5	Thr, Ala, Glu, Lys, Glu
<i>Anemonia sulcata</i>	Elastase inhibitor	P16895	Elastase	1	Met
<i>Phyllomedusa sasawagii</i>	PSKP-1	P83578	Serum prolyl endopeptidase	1	Pro

表明:不同的 P1 残基能抑制同一种蛋白酶,而同一 P1 残基能抑制同一类蛋白酶。Lu 等研究发现,酶活性部位“口袋”大小和 P1 残基侧链结构、极性、离子电荷等因素均影响酶-抑制剂的相互作用<sup>[6]</sup>。有研究表明,抑制剂的 P1 残基为 Lys, Arg 时,对胰蛋白酶和类胰蛋白酶有显著的抑制作用,而 P1 残基为 Pro, Tyr, Phe, Leu, Met 时,能抑制胰凝乳蛋白酶和类胰凝乳蛋白酶, P1 残基为 Ala, Ser 时,却能抑制类弹性蛋白酶<sup>[2]</sup>。

本实验室已成功地从家蚕中克隆到 1000 多个碱基片段并测序,其序列已提交到 NCBI 的 GenBank 数据库中,其中作者研究的基因序列编号为:DN236893,该序列推测的蛋白质属于 kazal 型蛋白酶抑制剂,它包括三个典型的 kazal 结构域,其 P1 活性部位依次是 Thr, Ala, Gln,该蛋白已经在大肠杆菌中成功重组表达并初步推测其对枯草杆菌蛋白酶有显著的抑制作用。

在自然进化和蛋白质工程中, P1 残基的突变能显著地改变抑制剂专一性和结合能力<sup>[19]</sup>。Komiya 等研究发现,火鸡卵类粘蛋白第三结构域的 P1 残基为 Leu 时是胰凝乳蛋白酶、弹性蛋白酶和其它丝氨酸蛋白酶的抑制剂,当 P1 残基的 Leu 被替换成 Lys 和 Glu 时,该蛋白分别转变成胰蛋白酶抑制剂和链霉菌灰霉素蛋白酶的强烈抑制剂<sup>[20]</sup>。最近 Gebhard 等发现重组的生物活性肽 PSKP-1 也有类似的现象,当 P1 残基为 Pro,其对一种血清脯氨酰胺链内切酶有抑制作用,将其 P1 残基突变后,PSKP-1 能抑制胰蛋白酶<sup>[21]</sup>。

这表明尽管 P1 残基发生突变,抑制剂仍能保持其活性,且其专一性随 P1 残基的变化而变化。虽然 P1 残基的突变会严重损害结合能量,但是变异蛋白的构象改变很小,相互作用中的其它部分足以保持

结合构象的完整性,因而 P1 残基仍然以同样的方式结合到酶的活性“口袋”中<sup>[22]</sup>。

### 3.3 结构域变动(Domain shuffling)

抑制剂的结构域与活性部位相同,但其并不一定有相同的功能。Gebhard 等研究的 PSKP-1 在 P1、P2 位点均是 Pro,而在 Pfam 蛋白质家族数据库中发现的 6 种类似 Kazal 蛋白<sup>[23]</sup>,其对应位置也是两个 Pro,但均不属于蛋白酶抑制剂<sup>[21]</sup>。最近发现类似 Follistatin 的结构域与 Kazal 结构域极其相似,但至今未见报道其有抑制作用<sup>[24]</sup>,这表明并不是所有 Kazal 型蛋白均有抑制活性,可能是因为该类蛋白不能形成有效的空间构象,导致其活性丧失,但还未见报道该类蛋白的功能。

### 3.4 串联结构域的作用

串联的结构域具有相同或不同的功能,如 Mende 等分别研究了 Dipetalogastin 的三个串联同源区域: D<sub>I</sub>、D<sub>II</sub>、D<sub>III</sub>,每个同源区域包括两个 P1 部位不同的 Kazal 结构域, D<sub>I</sub>、D<sub>II</sub> 是凝血酶抑制剂,而 D<sub>III</sub> 是凝血酶、胰蛋白酶和血浆酶抑制剂<sup>[25]</sup>;多个结构域可能有协同效应,可稳定抑制作用,例如 LEKTI 的第六结构域对胰蛋白酶有显著的抑制效果,但这种抑制作用只是暂时的<sup>[7, 26, 27]</sup>,当重组的蛋白质包含 6、7、8、9 四个结构域时,则能永久地抑制胰蛋白酶<sup>[28]</sup>。

### 3.5 从序列推测活性

Laskowski 等对 Kazal 结构域-酶复合体的结构研究发现,结合部位的 12 个氨基酸残基(图 1)与酶之间的作用密切相关<sup>[6, 29-31]</sup>。该 12 个氨基酸残基中, P3 和 P15' 高度保守,分别为半胱氨酸残基和天冬酰胺残基,其它 10 个氨基酸残基均高度易变。由于非结合部位氨基酸残基的变化不会影响平衡常数(K<sub>d</sub>),而结合部位氨基酸残基的转变将导致显著的

$K_a$  变化,因此 Laskowski 等将火鸡卵类粘蛋白的第三结构域的 10 个易变结合残基突变,将其产生的 191 种变异蛋白分别与 6 种丝氨酸蛋白酶作用并分别计算其  $K_a$  或  $K_i$ ,大量结果统计最终将基于序列的加法发展成为活性算法,即 Laskowski 算法,该算法可直接从 Kazal 型丝氨酸蛋白酶抑制剂的序列推测其与 6 种丝氨酸蛋白酶之间的抑制常数 ( $K_i$ )<sup>[32,33]</sup>。用 Laskowski 算法验证典型的 Kazal 结构域活性,表明其预测与实验结果较为吻合<sup>[31-33]</sup>。Tian 等研究发现 Laskowski 算法对非典型 Kazal 结构域 EPIIa 的功能预测也与实验结果非常一致<sup>[10]</sup>。但是 Qasim 等用 Laskowski 算法推测 Furin 蛋白的 11 种变异蛋白抑制专一性,发现与已知的 Furin 蛋白专一性有很大差别,这 11 种变异蛋白的结合部位是高度极性的,该蛋白需要用非加算法推测其活性<sup>[34]</sup>。故基于序列的加法即 Laskowski 算法是一种预测作用底物的有效工具<sup>[9]</sup>,但该算法仍有欠缺,仍需要不断地完善。

## 4 作用机理

Kazal 型抑制剂的抑制机理是属于“标准规则机理”即“Laskowski 机理”,抑制剂的表面存在一个稳固凸起的环状结构,此暴露环上伸出的氨基酸侧链能看成蛋白酶专一性底物,该侧链主要通过疏水作用(还有静电、范德华力等作用)与酶的活性部位相互作用形成稳定的复合物,在蛋白酶活性“口袋”中长时间结合,从而有效抑制蛋白酶活性<sup>[2,35-37]</sup>。但是当抑制剂 P1 残基侧链为较大且极性的 Arg 时,其对人白细胞弹性蛋白酶(Human leukocyte elastase, HLE)作用很弱,因为弹性蛋白酶仅有极小的活性“口袋”,其更适合疏水、中性的残基侧链作用<sup>[34]</sup>。最新研究发现,除 12 个氨基酸残基为结合部位外, Kazal 型结构域的剩余氨基酸残基即脚手架能保持抑制剂活性部位规则的分子构象,增强 6 个数量级的结合能力和保护抑制剂免受蛋白酶水解,尽管如此,脚手架的稳定性与抑制作用无直接关系<sup>[38]</sup>。大量资料表明抑制机理呈以下特点:①抑制剂与蛋白酶之间的缔合是接近锁-钥一一对应的模型,而不是诱导契合;②抑制剂是呈球面凸起状,脚手架能稳定活性部位的分子构象,P1 残基侧链能否插入酶的活性“口袋”取决于 P1 氨基酸残基极性及其侧链大小和酶的活性“口袋”大小;③与抗原抗体间作用相比,主链-主链对相互作用能量的供给是主要的;④与核酸酶-核酸酶蛋白抑制剂系统相比,侧链相互作

用主要是靠疏水驱动,而不是静电力<sup>[22,32]</sup>。

## 5 研究展望

Kazal 型蛋白酶抑制剂经过 50 多年的研究,已经对其序列及其分子构象特征和作用机理有了比较清楚的认识。虽然最近几年许多科学工作者通过重组、突变等方法进行了大量的研究,但 Kazal 型蛋白酶抑制剂的结构与功能关系仍没有一个系统的认识。随着许多物种基因组测序的完成,更多的 Kazal 型抑制剂将会被研究发现。由于该抑制剂受到高度的进化压力,推测有可能发现结构更简单、专一性更强和抑制作用更稳定的抑制剂。对 Kazal 型蛋白酶抑制剂的研究工作下列问题可能成为在这一领域内的热点:保守的 3 对二硫键的突变与抑制剂功能关系,典型 Kazal 结构域与非典型 Kazal 结构域功能关系,单结构域与串联结构域对抑制剂功能的影响,将 Kazal 型抑制剂突变成其它类型的抑制剂的研究,从序列推测活性运算法则的完善等。相信在不久的将来,对 Kazal 型蛋白酶抑制剂进一步的研究,科学家能设计并重组表达对蛋白酶专一性抑制的抑制剂,作为传统农药的替代品,将广泛应用于农业领域中,另一方面可作为治疗药物,将在血凝异常、骨质疏松症、逆转录酶病毒死亡、癌症等临床医学上得到广泛应用。

致谢 感谢蔡荣、吕正兵教授和许多同学提出的宝贵意见。

## REFERENCES(参考文献)

- [1] Irving JA, Steenbakkens PJ, Lesk AM *et al.* Serpins in prokaryotes. *Mol Biol Evol*, 2002, **19**: 1881-1890
- [2] Laskowski M Jr, Kato I. Protein inhibitors of proteinases. *Annu Rev Biochem*, 1980, **49**: 593-626
- [3] Kazal LA, Spicer DS, Brahinsky RA. Isolation of a crystalline trypsin inhibitor-anticoagulant protein from pancreas. *J Am Chem Soc*, 1948, **70**: 3034-3040
- [4] Zhu L, Song L, Chang Y *et al.* Molecular cloning, characterization and expression of a novel serine proteinase inhibitor gene in bay scallops (*Argopecten irradians*, Lamarck 1819). *Fish Shellfish Immunol*, 2006, **20**: 320-331
- [5] Christeller JT. Evolutionary mechanisms acting on proteinase inhibitor variability. *FEBS J*, 2005, **272**: 5710-5722
- [6] Lu W, Apostol I, Qasim MA *et al.* Binding of Amino Acid Side-chains to S1 Cavities of Serine Proteinases. *J Mol Biol*, 1997, **226**: 441-461
- [7] Magert HJ, Standker L, Kreutzmann P *et al.* LEKTI, a novel 15-domain type of human serine proteinase inhibitor. *J Biol Chem*,

- [ 8 ] Tian M, Huitema E, Da Cunha L *et al.* A Kazal-like extracellular serine protease inhibitor from *Phytophthora infestans* targets the tomato pathogenesis-related protease P69B. *J Biol Chem*, 2004, **279** :26370 – 36377
- [ 9 ] Miaoying Tian, Brett Benedetti, Sophien Kamoun. A second Kazal-Like protease inhibitor from *phytophthora infestans* inhibits and interacts with the apoplastic Pathogenesis-Related protease P69B of tomato1. *Plant Physiology*, 2005, **138** :1785 – 1793
- [ 10 ] Miaoying Tian and Sophien Kamoun. A two disulfide bridge Kazal domain from *Phytophthora* exhibits stable inhibitory activity against serine proteases of the subtilisin family. *BMC Biochemistry*, 2005, **6** :15
- [ 11 ] Friedrich T, Kroger B, Bialojan S *et al.* A Kazal-type inhibitor with thrombin specificity from *Rhodnius prolixus*. *J Biol Chem*, 1993 **268** :16216 – 16222
- [ 12 ] Mende K, Petoukhova O, Koulitchkova V *et al.* Dipetalogastin, a potent thrombin inhibitor from the blood-sucking insect. *Dipetalogaster maximus* cDNA cloning, expression and characterization. *Eur J Biochem*, 1999 **266** :583 – 590
- [ 13 ] Nirmala X, Kodrik D, Zurovec M *et al.* Insect silk contains both a Kunitz-type and a unique Kazal-type proteinase inhibitor. *Eur J Biochem*, 2001 **268** :2064 – 2073
- [ 14 ] Tschesche H, Kolkenbrock H, Bode W. The covalent structure of the elastase inhibitor from *Anemonia sulcata*-a “ non-classical ” Kazal-type protein. *Biol Chem Hoppe Seyler*, 1987, **368** :1297 – 1304
- [ 15 ] Stubbs MT, Morenweiser R, Sturzebecher J *et al.* The three-dimensional structure of recombinant leech-derived tryptase inhibitor in complex with trypsin. *J Biol Chem*, 1997 **272** :19931 – 19937
- [ 16 ] Laskowski M Jr, Apostol I, Ardel W *et al.* Amino acid sequences of ovomucoid third domain from 25 additional species of birds. *J Protein Chem*, 1990 **9** :715 – 725
- [ 17 ] Bendtsen JD, Nielsen H, von Heijne G *et al.* Improved prediction of signal peptides : SignalP 3.0. *J Mol Biol*, 2004 **340**( 4 ) :783 – 795
- [ 18 ] Niimi T, Yokoyama H, Goto A *et al.* A drosophila gene encoding multiple splice variants of Kazal-type serine protease inhibitor-like proteins with potential destinations of mitochondria, cytosol and the secretory pathway. *Eur J Biochem*, 1999 **266** :282 – 292
- [ 19 ] Lu W, Apostol I, Qasim MA *et al.* Binding of amino acid side-chains to S1 cavities of serine proteinases. *J Mol Biol*, 1997 **266** :441 – 461
- [ 20 ] Komiya T, Bigler TL, Yoshida N *et al.* Replacement of P1 Leu18 by Glu18 in the reactive site of turkey ovomucoid third domain converts it into a strong inhibitor of Glu-specific *Streptomyces griseus* proteinase ( GluSGP ). *J Biol Chem*, 1991, **266** :10727 – 10730
- [ 21 ] Gebhard LG, Carrizo FU, Stern AL *et al.* A Kazal prolyl endopeptidase inhibitor isolated from the skin of *Phyllomedusa sauvagii*. *Eur J Biochem*, 2004 **271** :2117 – 2126
- [ 22 ] Jackson RM. Comparison of protein-protein interactions in serine protease-inhibitor and antibody-antigen complexes :Implications for the protein docking problem. *Protein Science*, 1999 **8** :603 – 613
- [ 23 ] Bateman A, Birney E, Durbin R *et al.* The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Res*, 2000 **28** :263 – 266
- [ 24 ] Bocock JP, Edgell CJ, Marr HS *et al.* Human proteoglycan testican-1 inhibits the lysosomal cysteine protease cathepsin L. *Eur J Biochem*, 2003 **270** :4008 – 4015
- [ 25 ] Mende K, Lange U, Nowak G. Three recombinant serine proteinase inhibitors expressed from the coding region of the thrombin inhibitor dipetalogastin. *Insect Biochem Mol Biol*, 2004 **34** :971 – 979
- [ 26 ] Kreuzmann P, Schulz A, Standker L *et al.* Recombinant production, purification and biochemical characterization of domain 6 of LEKTI : a temporary Kazal-type-related serine proteinase inhibitor. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2004, **803** :75 – 81
- [ 27 ] Lauber T, Schulz A, Schweimer K *et al.* Homologous proteins with different folds : the three-dimensional structures of domains 1 and 6 of the multiple Kazal-type inhibitor LEKTI. *J Mol Biol*, 2003 **328** :205 – 219
- [ 28 ] Jayakumar A, Kang Y, Mitsudo K *et al.* Expression of LEKTI domains 6-9 ' in the baculovirus expression system : recombinant LEKTI domains 6-9 ' inhibit trypsin and subtilisin A. *Protein Expr Purif*, 2004 **35** :93 – 101
- [ 29 ] Read RJ, Fujinaga M, Sielecki AR *et al.* Structure of the complex of *Streptomyces griseus* protease B and the third domain of the turkey ovomucoid inhibitor at 1.8-Å resolution. *Biochemistry*, 1983 **22** :4420 – 4433
- [ 30 ] Laskowski MJ, Kato I, Ardel W *et al.* Ovomucoid third domains from 100 avian species : isolation, sequences, and hypervariability of enzyme-inhibitor contact residues. *Biochemistry*, 1987 **26** :202 – 221
- [ 31 ] Qasim MA, Lu W, Lu SM *et al.* Testing of the additivity-based protein sequence to reactivity algorithm. *Biochemistry*, 2003 **42** :6460 – 6466
- [ 32 ] Lu SM, Lu W, Qasim MA *et al.* Predicting the reactivity of proteins from their sequence alone :Kazal family of protein inhibitors of serine proteinases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001 **98** :1410 – 1415
- [ 33 ] Laskowski MJ, Qasim MA, Yi Z. Additivity-based prediction of equilibrium constants for some protein-protein associations. *Curr Opin Struct Biol*, 2003 **13** :130 – 139
- [ 34 ] Qasim MA, Lu W, Lu SM *et al.* Testing of the additivity-based protein sequence to reactivity algorithm. *Biochemistry*, 2003 **42** :6460 – 6466
- [ 35 ] Krowarsch D, Cierpicki T, Jelen F *et al.* Canonical protein inhibitors of serine proteinases. *Cell Mol Life Sci*, 2003 **60** :2427 – 2444
- [ 36 ] Bode W, Huber R. Natural protein proteinase inhibitors and their interaction with proteinases. *Eur J Biochem*, 1992 **204** :433 – 451
- [ 37 ] Laskowski M, Qasim MA. What can the structures of enzyme-inhibitor complexes tell us about the structures of enzyme-substrate complexes ? *Biochim Biophys Acta*, 2000 **1477**( 1-2 ) :324 – 337
- [ 38 ] Kelly CA, Laskowski M Jr, Qasim MA. The role of scaffolding in standard mechanism serine proteinase inhibitors. *Protein Pept Lett*, 2005 **12** :465 – 471