

**TRƯỜNG ĐẠI HỌC BÁCH KHOA HÀ NỘI
VIỆN CÔNG NGHỆ SINH HỌC & CÔNG NGHỆ THỰC PHẨM**

***** oOo*****



TIỂU LUẬN

PROTEIN KÌM HÃM PROTAESE PHÂN LOẠI-CƠ CHẾ-ỨNG DỤNG

Giáo viên hướng dẫn: **PGS. TS. Đặng Thị Thu**
Sinh viên : *Nguyễn Xuân Hưng*

Hà Nội 10-2005

MỤC LỤC

| | |
|---|-----------|
| MỤC LỤC | 1 |
| THUẬT NGỮ VIẾT TẮT | 2 |
| 1. GIỚI THIỆU CHUNG | 3 |
| 2. PHÂN LOẠI VÀ DANH PHÁP | 4 |
| 2.1 Cách phân loại cũ | 4 |
| 2.1 Cách phân loại mới..... | 4 |
| 3. PHÂN BỐ TRONG SINH GIỚI | 7 |
| 4. CẤU TRÚC | 8 |
| 3.1 Trung tâm phản ứng | 8 |
| 3.2 Mô hình cầu disulphide | 9 |
| 5. CƠ CHẾ KÌM HÃM | 11 |
| 5.1 Với PPI không đặc hiệu | 11 |
| 5.2 Với PPI đặc hiệu | 11 |
| 5.2.1 Kim hãm thông qua phức hệ enzyme-cơ chất (cơ chế ES)..... | 11 |
| 5.2.2 Kim hãm thông qua phức hệ enzyme-sản phẩm (cơ chế EP) | 13 |
| 5.2.3 Trung gian acyl-enzyme | 14 |
| 5.3 Khóa không gian trung tâm hoạt động của protease | 15 |
| 6. SINH TỔNG HỢP | 19 |
| 7. ỨNG DỤNG | 21 |
| 7.1 Trong nông nghiệp | 21 |
| 7.1.1 Chống sâu hại và côn trùng..... | 21 |
| 7.1.2 Chống nấm, virus..... | 22 |
| 7.1 Trong y học | 24 |
| 7.1.2 Ung thư | 24 |
| 7.1.2 Bệnh tim..... | 25 |
| 7.1.3 Bệnh sốt xuất huyết | 25 |
| TÀI LIỆU THAM KHẢO | 26 |

THUẬT NGỮ VIẾT TẮT

API: chất kìm hãm protease loại aspartic (aspartic proteinase inhibitor)
ATI: Chất kìm hãm ascidian trypsin (ascidian trypsin inhibitor)
BIR: baculoviral IAP repeat
BI-VI: chất kìm hãm bromelain VI của dứa (bromelain inhibitor VI from pineapple)
BPTI: chất kìm hãm trypsin từ tụy tạng bò (bovine pancreatic trypsin inhibitor)
CI: chất kìm hãm chuẩn (canonical inhibitor)
cIAP1: protein kìm hãm apoptosis tế bào 1 (cellular inhibitor of apoptosis protein 1)
CL: vòng chuẩn (canonical loop)
CMTI I: chất kìm hãm cucurbita maxima trypsin 1 (cucurbita maxima trypsin inhibitor 1)
CPI: chất kìm hãm protease loại cysteine (Cysteine proteinase inhibitor)
CpTI: SPI từ đậu đũa
CrmA: cytokine response modifier A
IA3: chất kìm hãm aspartic protease từ nấm men (inhibitor of aspartic protease from yeast)
IAP: chất kìm hãm apoptosis (inhibitor of apoptosis)
LCI: chất kìm hãm carboxypeptidase của đĩa (leech carboxypeptidase inhibitor)
MAPK: protein kinase hoạt hóa nguyên phân (mitogen-activated protein kinase)
MMP: metalloprotease trong chất nền (matrix metalloprotease)
MPI: chất kìm hãm protease loại metallo (Metallo proteinase inhibitor)
NCI: chất kìm hãm không chuẩn (noncanonical inhibitor)
OMTKY3: turkey ovomucoid third domain
PCI: chất kìm hãm carboxypeptidase của khoai tây (potato carboxypeptidase inhibitor)
PCIA: chất kìm hãm carboxypeptidase A của khoai tây (potato carboxypeptidase A inhibitor)
PCN: giun tròn trong nang khoai tây (potato cyst-nematode)
PI-3: chất kìm hãm pepsin 3 của ruột sâu (*Ascaris suum* pepsin inhibitor 3)
PI-9: chất kìm hãm protease 9 (protease inhibitor 9)
PIIF: yếu tố khởi đầu chất kìm hãm protease (proteinase inhibitor initiation factor)
PSTI: chất kìm hãm trypsin dịch chiết tụy tạng (pancreatic secretory trypsin inhibitor (Kazal))
PTI: chất kìm hãm trypsin tụy tạng (pancreatic trypsin inhibitor (Kunitz))
PVY: virus Y khoai tây (potato virus Y)
RCL: vòng trung tâm phản ứng (reactive center loop)
SFTI-1: chất kìm hãm trypsin 1 từ hoa hướng dương (sunflower trypsin inhibitor-1)
SMPI: Chất kìm hãm metalloprotease từ streptomyce (Streptomyces metalloprotease inhibitor)
SMV: virus khảm ở đậu tương (soybean mosaic virus)
SPI: chất kìm hãm protease loại serine (serine proteinase inhibitor)
STI: chất kìm hãm trypsin từ đậu tương (Kunitz)
TAP: peptide chống đông máu của ve (tick anticoagulant peptide)
TEP: peptide chống đông máu của ve (tick anticoagulant peptide)
TEV: tobacco etch virus
TIMP: chất kìm hãm metalloprotease trong mô (tissue inhibitors of metalloprotease)
TTI: chất kìm hãm trypsin từ thuốc lá (tobacco trypsin inhibitor)
XIAP: X-linked IAP
 α -1PI: chất kìm hãm protease α -1 (protease inhibitor)
 α 2-M: α 2-macroglobulin

1. GIỚI THIỆU CHUNG

Enzyme thủy phân protein (protease) có tầm quan trọng sống còn đối với toàn bộ sinh giới, xấp xỉ **2% tổng số gene mã hóa** cho nó [1]. Mặc dù vậy, các enzyme này có thể gây nguy hiểm cho cơ thể sống, nên hoạt tính của chúng cần được điều khiển chặt chẽ. Trải qua quá trình tiến hóa lâu dài đã xuất hiện một số cơ chế kiểm soát protease bao gồm điều hòa biểu hiện, bài tiết, hoạt hóa, phân hủy protease hoặc kìm hãm hoạt tính thủy phân protein của chúng [2]. Trong đó **quan trọng nhất là tương tác của enzyme với các protein kìm hãm**.

Protein kìm hãm protease hay còn gọi là chất kìm hãm protease có bản chất protein (PPI) đã được nghiên cứu từ rất lâu. Nghiên cứu về PPI xuất hiện đồng thời với các nghiên cứu về protease. Tới nay đã xác định được **hàng trăm PPI** và chúng là đối tượng của hàng ngàn cộng đồng nghiên cứu [3].

Vào năm 1947, lần đầu tiên người ta đã chứng minh được vai trò bảo vệ thực vật của PPI khi Mickel và Standish quan sát thấy ấu trùng của một số loài côn trùng không thể phát triển bình thường trong các sản phẩm đậu tương. Sau đó các **chất kìm hãm trypsin** trong đậu tương cho thấy độc tính với ấu trùng của bọ cánh cứng (flour beetle), *Tribolium confusum* [4]. Hiện tại ngày càng nhiều **cánh đồng biến đổi gene** được phát triển để chống lại sâu hại, côn trùng, nấm...[5-9] và cho thấy những thành công rõ rệt

Không chỉ trong thực vật, PPI hiện còn ngày càng cho thấy những ứng dụng to lớn **trong y học** như chống ung thư, trị bệnh tim...[10-13]. Hiện tại các chiến lược liệu pháp gene lợi dụng PPI đang được nghiên cứu rộng rãi [13].

Nhờ đâu mà PPI có phổ ứng dụng rộng như vậy? Để lý giải được điều này cần hiểu được các đặc trưng **cấu trúc, phân bố, cơ chế kìm hãm protease và đường hướng sinh tổng hợp của chúng**. Trong bài viết này tôi cố gắng trình bày một cách tóm lược nhất những vấn đề trên.

2. PHÂN LOẠI VÀ DANH PHÁP

2.1 Cách phân loại cũ

Trước năm 1980, danh pháp và hệ thống phân loại PPI là một mớ hỗn độn. Sau đó, vào năm 1980, trong một bài hết sức mẩu mực và có ý nghĩa, trên cơ sở các tài liệu về PPI trước đó, **Laskowski và Kato** đã đưa ra hệ thống phân loại và danh pháp PPI của mình trên tạp chí danh tiếng **Annual review of Biochemistry** [14]. Laskowski và Kato đã đưa ra hệ thống danh pháp mới, ở đó **tên của PPI được đặt sau nguồn sinh vật hay mô chứa nó** như '*Streptomyces subtilisin inhibitor*' hoặc '*pancreatic trypsin inhibitor*'. Họ chia PPI thành hai nhóm chính dựa trên phổ hoạt tính của chúng là PPI không đặc hiệu và PPI đặc hiệu nhóm [14].

PPI không đặc hiệu

PPI không đặc hiệu **có thể kìm hãm các thành viên của cả bốn nhóm protease**. Nhóm chất kìm hãm này chỉ có một họ duy nhất là α -macroglobulin, bao gồm α_2 -macroglobulin (α_2 -M) của người. α -macroglobulin là protein có hoạt tính kìm hãm protease lớn nhất, chiếm tới 8-10% tổng số protein trong huyết tương. Chúng độc nhất vô nhị trong khả năng kìm hãm cả bốn nhóm protease chính (aspartic, cysteine, serine, và metalloprotease). α_2 -M của người là một glycoprotein gồm bốn dưới đơn vị đồng nhất, mỗi cái có trọng lượng phân tử xấp xỉ 185.000. α_2 -M được tạo ra đầu tiên trong gan, mặc dù một số cơ quan khác cũng có thể tạo ra nó [15].

PPI đặc hiệu

Các họ PPI còn lại **đặc hiệu cho một trong bốn nhóm protease** cơ bản và dựa trên axit amin tại trung tâm phản ứng được chia thành chất kìm hãm protease loại serine (SPI), cysteine (CPI), aspartic (API) và metallo-protease (MPI). Chúng có trọng lượng phân tử thấp hơn, tính đặc hiệu với các enzyme đích cao hơn so với α -macroglobulin và **chỉ có khả năng kìm hãm một trong 4 nhóm protease** [14].

2.1 Cách phân loại mới

Mặc dù được dùng rất phổ biến (hầu hết các bài báo về PPI đều trích dẫn công trình năm 1980 của Laskowski và Kato) cách phân loại trên cũng có nhược điểm là nó **không thể hiện mối liên hệ giữa các chất kìm hãm và khó mà biết được cơ chế hoạt động của một chất kìm hãm này có đúng với chất kìm hãm khác không**.

Để khắc phục nhược điểm này, năm 2004, dựa trên trình tự axit amin của các PPI đã biết Rawlings và cộng sự đã tiến hành tìm kiếm, sắp xếp và so sánh với tất cả các trình tự axit amin khác trên ngân hàng gene. Qua đó họ đã tìm ra được **25.000 trình tự axit amin tương đồng** với các PPI đã biết. Trên cơ sở đó chia PPI thành **48 họ** (bảng 1) và lập nên **cơ sở dữ liệu PPI** tại <http://merops.sanger.ac.uk> [3].

Đôi khi tuy khác xa nhau về trình tự axit amin nhưng cấu trúc bậc ba của một số họ lại khá giống nhau, nên nhóm của Rawlings chia tiếp 31 họ ra thành **26 nhóm (clan)**. Các thành viên trong họ I1, I5, I8 và I20 có kiểu gấp nếp protein tương đồng đáng kể nên được gộp lại thành nhóm IA (bảng 1). Tương tự, họ I2 và I52 tạo thành nhóm IB, I7 và I37 thành nhóm IE. 23 họ khác không có cấu trúc bậc ba giống nhau nên mỗi họ được chia thành một nhóm riêng biệt. 15 họ còn lại không có cấu trúc bậc ba nên không được phân nhóm.

Bảng 1: Các họ PPI theo cách phân loại của Rawlings và cộng sự (2004)

| Họ | Tên | Đại diện (nguồn) |
|------|-------------------|--|
| I1 | Kazal | ovomucoid unit 3 (<i>Meleagris gallopavo</i>) |
| I2 | Kunitz (động vật) | aprotinin (<i>Bos taurus</i>) |
| I3A | Kunitz (thực vật) | STI (<i>Glycine max</i>) proteinase inhibitor B (<i>Sagittaria sagittifolia</i>) |
| I4 | serpin | α_1 -proteinase inhibitor (<i>Homo sapiens</i>) |
| I5 | ascidian | ATI (<i>Halocynthia roretzi</i>) |
| I6 | cereal | ragi seed trypsin/ α -amylase inhibitor (<i>Eleusine coracana</i>) |
| I7 | squash | trypsin inhibitor MCTI-1 (<i>Momordica charantia</i>) |
| I8 | Ascaris | nematode anticoagulant inhibitor (<i>Ascaris suum</i>) |
| I9 | YIB | protease B inhibitor (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>) |
| I10 | marinostatin | marinostatin (<i>Alteromonas</i> sp.) |
| I11 | ecotin | ecotin (<i>Escherichia coli</i>) |
| I12 | Bowman-Birk | Bowman-Birk plant trypsin inhibitor (<i>Glycine max</i>) unit 1 |
| I13 | pot 1 | eglin C (<i>Hirudo medicinalis</i>) |
| I14 | hirudin | hirudin (<i>Hirudo medicinalis</i>) |
| I15 | antistasin | antistasin unit 1 (<i>Haementeria officinalis</i>) |
| I16 | SSI | subtilisin inhibitor (<i>Streptomyces albogriseolus</i>) |
| I17 | elafin | mucus proteinase inhibitor unit 2 (<i>Homo sapiens</i>) |
| I18 | mustard | mustard trypsin inhibitor (<i>Sinapis alba</i>) |
| I19 | pacifastin | proteinase inhibitor LCMI I (<i>Locusta migratoria</i>) |
| I20 | pot 2 | proteinase inhibitor II (<i>Solanum tuberosum</i>) |
| I21 | 7B2 | secretogranin V (<i>Homo sapiens</i>) |
| I24 | pinA | pinA endopeptidase La inhibitor (bacteriophage T4) |
| I25A | cystatin 1 | cystatin A (<i>Homo sapiens</i>) |
| I25B | cystatin 2 | ovocystatin (<i>Gallus gallus</i>) |
| I25C | cystatin 3 | MPI (<i>Bothrops jararaca</i>) |
| I27 | calpastatin | calpastatin unit 1 (<i>Homo sapiens</i>) |
| I29 | CTLA | cytotoxic T-lymphocyte antigen |
| I31 | thyropan | equistatin (<i>Actinia equina</i>) |
| I32 | IAP | BIRC-5 protein (<i>Homo sapiens</i>) |
| I33 | ascaris PI3 | ascaris pepsin inhibitor PI-3 (<i>Ascaris suum</i>) |
| I34 | IA3 | saccharopepsin inhibitor (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>) |
| I35 | timp | timp-1 (<i>Homo sapiens</i>) |
| I36 | SMI | SMPI (<i>Streptomyces nigrescens</i>) |
| I37 | PCI | PCI (<i>Solanum tuberosum</i>) |
| I38 | aprin | MPI (<i>Erwinia chrysanthemi</i>) |
| I39 | α -2M | α_2 -M (<i>Homo sapiens</i>) |
| I40 | bombyx | Bombyxsubtilisin inhibitor (<i>Bombyx mori</i>) |
| I42 | chagasin | chagasin (<i>Leishmania major</i>) |
| I43 | oprin | oprin (<i>Didelphis marsupialis</i>) |
| I44 | - | carboxypeptidase A inhibitor (<i>Ascaris suum</i>) |
| I46 | LCI | LCI (<i>Hirudo medicinalis</i>) |
| I47 | latexin | latexin (<i>Homo sapiens</i>) |
| I48 | clitocypin | clitocypin (<i>Lepista nebularis</i>) |
| I49 | proSAAS | proSAAS (<i>Homo sapiens</i>) |
| I50 | p35 | baculovirus p35 caspase inhibitor (<i>Spodoptera litura</i> nucleopolyhedrovirus) |
| I51 | IC | carboxypeptidase Y inhibitor (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>) |
| I52 | TAP | tick anticoagulant peptide (<i>Ornithodoros moubata</i>) |
| I57 | - | staphostatin B (<i>Staphylococcus aureus</i>) |
| I58 | - | staphostatin A (<i>Staphylococcus aureus</i>) |
| I59 | triabin | triabin (<i>Triatoma pallidipennis</i>) |

Cách phân loại của Rawlings và cộng sự cho thấy **họ có số trình tự lớn nhất là serpin** (họ I4) với gần 500 trình tự. Các họ I1, I2 và I25 gồm trên 200 trình tự và các họ có trên 100 trình tự là I3, I12, I39 và I43. Mỗi họ I5, I24, I34, I36, I40, I44, I46 và I58 chỉ có duy nhất một trình tự đại diện.

Một số đơn vị kim hãm rất nhỏ, trong đó **formarinostatin** và chất kim hãm dạng vòng ở hoa hướng dương (sunflower cyclic inhibitor) **chỉ có 14 axit amin**. Các đơn vị có ít hơn 50 axit amin được tìm thấy trong các họ I7, I19, I31, I37 và I45.

Tuy nhiên, cách phân loại của Rawlings và cộng sự cũng có **nhược điểm** ở chỗ một số đơn vị kim hãm giả định trong một vài họ **có thể không có chức năng** kim hãm. Chúng chỉ tương đồng về mặt trình tự axit amin với các PPI đã xác định [3]. Hơn nữa khi đọc tên một họ hoặc một nhóm người ta không hình dung ra được nó có khả năng kim hãm protease nào, có nguồn gốc từ đâu.

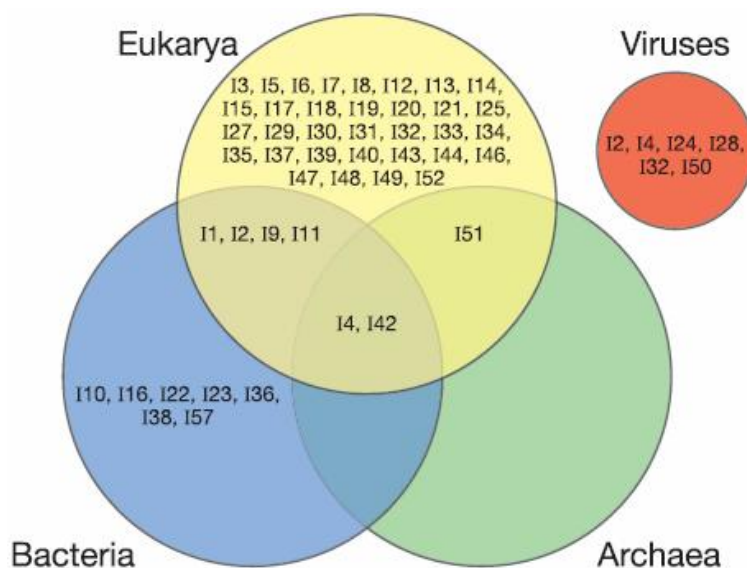
Có thể nói, công trình của Rawlings và cộng sự là một khối lượng công việc khổng lồ và đặc biệt có ý nghĩa. Trên cơ sở dữ liệu về PPI có tên là **MEROPS** (<http://merops.sanger.ac.uk>) có thể tìm thấy toàn bộ trình tự, cấu trúc, tên, nguồn gốc xác định, tài liệu tham khảo... của các loại PPI cũng như mối quan hệ về mặt trình tự (cây phân loại) giữa chúng. Hơn nữa nó còn được liên kết với các cơ sở dữ liệu khác như NCBI, ExPASy và được cập nhật thường xuyên.

Cả hai hệ thống phân loại đều có ưu, nhược điểm riêng nhưng theo tôi cách phân loại của Rawlings và cộng sự ưu việt hơn. Bởi trong bối cảnh ngày càng nhiều PPI được xác định, ngày càng nhiều bộ gene được giải trình tự và thì cách phân loại này rất thuận tiện cho việc cập nhật, tra cứu và liên kết các cơ sở dữ liệu với nhau cũng như thuận tiện cho việc định hướng nghiên cứu.

3. PHÂN BỐ TRONG SINH GIỚI

Người ta có thể tách được PPI trong rất nhiều loài từ virus, vi khuẩn đến động, thực vật. Hiện tại (tính đến tháng **6-2005**) tổng số sinh vật từ đó người ta có thể xác định được PPI đã lên đến con số **787** (<http://merops.sanger.ac.uk/>) và con số này vẫn tiếp tục tăng. Thông thường PPI tích lũy với lượng lớn trong hạt thực vật, trứng chim và dịch thể (body fluid). PPI tích lũy một lượng lớn trong huyết tương động vật có vú và động vật biển (chiếm tới **10% protein** tổng số) hoặc trong hạt thực vật (như các loại đậu) cho thấy tầm quan trọng của các tương tác protease/PPI trong tự nhiên.

Hình 1 cho thấy phân bố của các họ PPI trong sinh giới. Mặc dù có trong tất cả các loại sinh vật nhưng cho tới nay các họ được biết đến chủ yếu thuộc eukaryote. Chỉ có ba họ đã biết thuộc khuẩn cổ, hai trong số đó có trong cả ba giới. Họ **I4 phân bố rộng rãi nhất**, được tìm thấy trong cả virus. Không prokaryote nào chứa trên 6 gene mã hóa PPI trong khi bộ gene của tất cả các eukaryote chứa từ hàng chục đến hàng trăm gene mã hóa cho nó.



▲ **Hình 1:** Phân bố các họ PPI trong sinh giới (Chú ý, họ I4, serpin- α_1 -proteinase inhibitor (*Homo sapiens*)) có mặt trong cả bốn nhóm nhưng tiện cho việc vẽ hình, họ virus được tách biệt hoàn toàn.)

4. CẤU TRÚC

Cơ sở dữ liệu MEROPS cho thấy hiện có rất nhiều loại PPI khác nhau, từ nhiều nguồn khác nhau, đã được xác định bằng thực nghiệm cũng như tiên đoán nhờ tính tương đồng trình tự. Đã có rất nhiều nghiên cứu xác định cấu trúc tinh thể của PPI và phức hệ PPI/ protease đích. Những nghiên cứu này cho thấy PPI có **mức độ đa dạng về cấu trúc đáng kinh ngạc**. Rawlings và cộng sự dựa trên mức độ tương đồng cấu trúc đã tập hợp các PPI thành tới 26 nhóm khác nhau. Vì vậy, trong khuôn khổ bài viết này tôi khó có thể nêu ra đặc trưng cấu trúc của từng nhóm. Vì vậy, tôi chỉ đi sâu vào **hai đặc trưng cấu trúc chung**, chủ chốt của các loại PPI là **trung tâm phản ứng và cầu disulphide**.

3.1 Trung tâm phản ứng

Đặc trưng chung nổi bật của hầu hết các loại PPI là vùng trung tâm phản ứng đóng vai trò sống còn, trực tiếp tạo liên kết với protease đích không có cấu trúc (xoắn α hoặc phiến β). Vùng trung tâm phản ứng này có dạng vòng và được gọi là **vòng chuẩn** (canonical loop, CL) để phân biệt với các vòng khác trong PPI. Bode và Huber (1992) định nghĩa CL là vùng giống cơ chất đặc trưng, **gồm 6 gốc $P_3-P_2-P_1-P_1'-P_2'-P_3'$** theo đúng danh pháp do Schechter và Berger đề ra (1967), ở đó liên kết peptide P_1-P_1' là vị trí bị protein cắt [16]. Bảng 2 thể hiện trung tâm phản ứng của một số PPI.

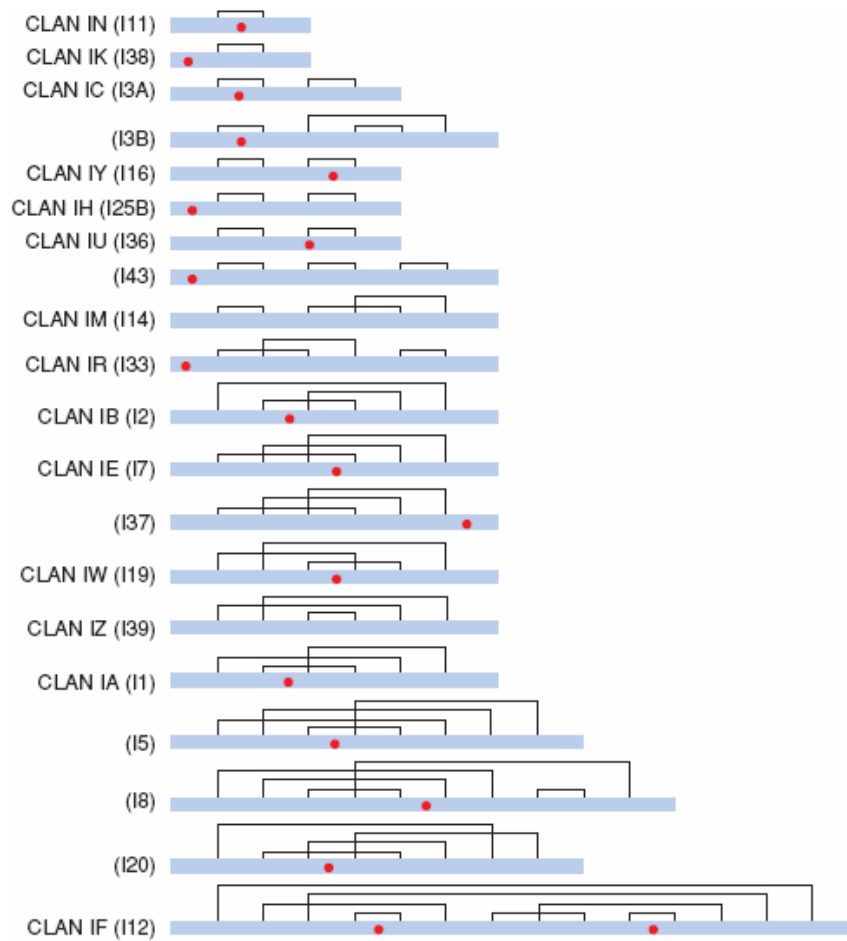
Liên kết peptide tại trung tâm phản ứng (như trong chất kim hãm đã biến đổi) cần một gốc đầu C gọi là P_1 và một gốc đầu N gọi là P_1' . Gốc vị trí phản ứng P_1 thường tương ứng với tính đặc hiệu của enzyme đích. Do đó, PPI với P_1 là Lys và Arg có khuynh hướng kim hãm các enzyme trypsin và giả trypsin, trong khi các PPI với P_1 là Tyr, Phe, Trp, Leu, và Met kim hãm các enzyme chymotrypsin và giả chymotrypsin, còn các PPI với P_1 Ala và Ser kim hãm các enzyme giả elastase (bảng 2) [6].

Bảng 2: Các gốc axit amin tại vùng trung tâm phản ứng của một số PPI

| | P ₄ | P ₃ | P ₂ | P ₁ | P' ₁ | P' ₂ | P' ₃ | P' ₄ | P' ₅ | P' ₆ | P' ₇ | P' ₈ |
|--|----------------|----------------|----------------|----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Pancreatic Trypsin Inhibitor (Kunitz) Family | ...G | P | C | K | A | R | I | I | R | Y | F | Y... |
| | | L | | L | G | A | L | P | Q | F | Y | F |
| | | R | | Y | R | S | F | L | S | W | A | |
| | | N | | M | Q | Y | T | R | A | I | H | |
| | | | | L | | K | V | Q | L | | | |
| | | | | - | | F | | S | | | | |
| | | | | | | H | | | | | | |
| | | | | | | M | | | | | | |
| | | | | | | P | | | | | | |
| Pancreatic Secretory Trypsin Inhibitor (Kazal) Family | ...G | C | P | R | I | Y | N | P | V | C... | | |
| | V | | N | K | D | L | R | L | I | | | |
| | A | | T | E | E | P | H | F | L | | | |
| | L | | A | D | A | F | Q | L | H | | | |
| | D | | M | A | L | H | S | E | | | | |
| | M | | L | L | Q | D | M | | | | | |
| | F | | S | S | N | Q | K | | | | | |
| | | | | M | | M | D | | | | | |
| | | | | V | | | I | | | | | |
| | | | | Q | | | E | | | | | |
| | | | | Y | | | | | | | | |
| Streptomycetes Subtilisin Inhibitor Family | ...M | C | P | M | V | Y | D | P | V | L... | | |
| | A | | T | K | Q | F | | | | V | | |
| Bowman-Birk Inhibitor Family | ...A | C | T | K | S | N | P | P | Q | C... | | |
| | M | | A | R | | M | | G | K | | | |
| | V | | | A | | I | | A | T | | | |
| | L | | | L | | Q | | | | | | |
| | I | | | F | | Y | | | | | | |
| | S | | | Y | | | | | | | | |
| Soybean Trypsin Inhibitor (Kunitz) Family | ...P | S | Y | R | I | R | F | I | A | E... | | |
| Potato Inhibitor I Family | ...P | V | T | L | D | Y | R | C | N | R... | | |
| | | | | M | | F | | | | | | |
| | | | | | | L | | | | | | |
| Potato Inhibitor II Family | ...A | S | Y | K | S | V | C | E | G | E... | | |
| | | | | | | | | | | | | |
| α1-Protein Inhibitor Family | ...A | I | P | M | T | I | P | P | E | V... | | |
| | | | | | S | | | | | | | |

3.2 Mô hình cầu disulphide

Một số PPI có cầu disulphide và một số họ có các vòng vị trí phản ứng ổn định (stabilize reactive-site loop), **làm dễ dàng việc tái tổng hợp liên kết tại vị trí phản ứng** sau khi nó bị enzyme đích cắt. Trước đây, các cầu disulphide này được dùng để phân chia các họ khi tính tương đồng trình tự thấp và để xác định các đơn vị kim hãm trùng lặp trong chất kim hãm nhiều đầu. Hình 2 mô tả sự sắp xếp của các cầu disulphide trong các nhóm và họ khác nhau.



▲ **Hình 2:** Mô hình cầu disulphide trong các họ PPI tiêu biểu. Hình tròn biểu thị vị trí phản ứng.

5. CƠ CHẾ KÌM HÃM

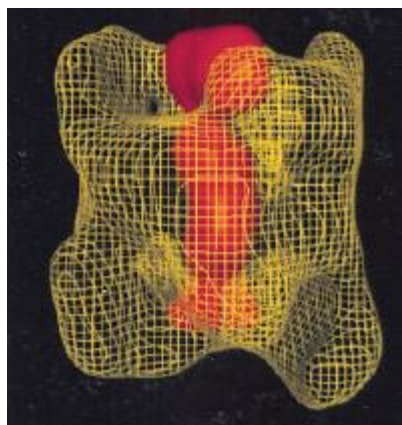
Các mô hình kim hãm, động học, tham số nhiệt động và phức hệ enzyme-chất kim hãm tự nhiên khác nhau một cách đáng ngạc nhiên. Một cách khác, trong một số trường hợp, sự phân kỳ của cấu trúc và/hoặc chức năng có thể được quan sát, chỉ ra sự thật là có một số giới hạn các mô hình kim hãm [17].

5.1 Với PPI không đặc hiệu

Cơ chế này phụ thuộc trực tiếp vào hoạt tính protease của enzyme đích giống như một chiếc “bẫy”. Loại phản ứng này đặc hiệu cho endoprotease vì nó cắt liên kết peptide bên trong, làm biến đổi hình dạng chất kim hãm.

Khi α_2 -M (họ I39) kết hợp với protease, chỉ hoạt tính thủy phân protein lớn bị giảm hoặc mất. Đáng chú ý là phức hệ α_2 -M-proteinase vẫn bị các PPI nhỏ (PTI, PSTI) kim hãm, nhưng không bởi các PPI lớn hơn (STI) [14]. Với α_2 -M, hình dạng của chất kim hãm bị biến đổi khi “vùng mồi” (bait region) nhạy cảm của nó bị cắt, qua đó enzyme đích bị bắt giữ (hình 3) [18].

Phức hệ enzyme-chất kim hãm được ổn định chủ yếu do các hiệu ứng không gian, mặc dù các nhóm thiolester hoạt hóa cũng có thể tạo thành những liên kết cộng hóa trị [19]. Enzyme đích phải là một loại endopeptidase để cắt vùng mồi của chất kim hãm và không quá lớn để được bao gói trong macroglobulin. Khả năng kim hãm cả bốn loại protease phân nào là do các liên kết trong vùng mồi của α_2 -M có thể bị cắt theo các



cách khác nhau, tương ứng tạo ra các loại “bẫy” khác nhau phù hợp với protease đích [20]. Một nguyên nhân khác là do phân đoạn peptide chính yếu dài hơn, chứa các liên kết bắt cặp với tính đặc hiệu đối với các protease khác nhau [14].

◀ **Hình 3:** Mô hình phức hệ plasmin- α_2 -M. Plasmin hình que (màu đỏ) nằm trong không gian của α_2 -M (khung dây màu vàng) với miền đầu N nhô ra từ một đầu của cấu trúc. Miền thủy phân protein đầu C của plasmin bị vùi sâu trong không gian của α_2 -M [21].

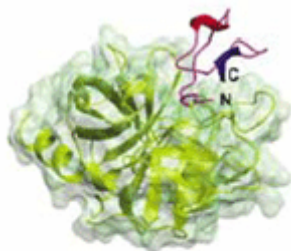
5.2 Với PPI đặc hiệu

5.2.1 Kim hãm thông qua phức hệ enzyme-cơ chất (cơ chế ES)

Theo cơ chế này, PPI gắn phi đồng hóa trị với protease, rất giống với tương tác enzyme-cơ chất, còn gọi là phức hệ Michaelis.

Ví dụ đã được nghiên cứu sâu sắc nhất của tương tác giống cơ chất là các chất kim hãm serine protease theo cơ chế chuẩn (CI) (hình 4). Phần lớn chúng là protein có cấu trúc chặt, ổn định, gồm toàn phiến β hay hỗn hợp α/β , nhưng cũng có thể có dạng xoắn α

hoặc bất quy tắc nhưng giàu liên kết disulfide. Một điều hấp dẫn là trong tất cả các họ này, **phần vòng (loop) rất giống nhau**, có cấu hình chuẩn (gọi là vòng chuẩn, CL), mặc dù trình tự axit amin ở phân đoạn P_3-P_3' giữa các họ và giữa các thành viên trong cùng một họ hoàn toàn khác nhau.



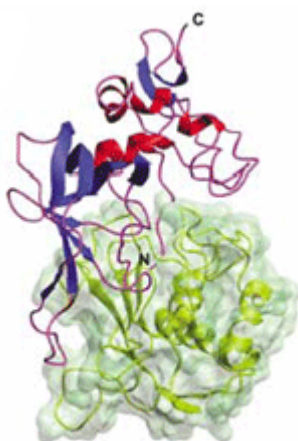
Trypsin : CMTI
(mechanism/ES)

◀ **Hình 4:** Phức hệ serine protease-chất kìm hãm: canonical trypsin/CMTI.

Cấu trúc lập thể của protease có dạng ruybăng màu vàng với bề mặt ngoài màu xanh lá cây mờ. Các thành phần cấu trúc bậc hai của chất kìm hãm có màu xanh da trời (phiến β), đỏ (xoắn α) và đỏ tươi (cuộn, coil).

Phần vòng trong mô hình tương tác giữa serine proteinase và CI thường có động lực học cao hơn khi chưa tạo phức và trở nên chặt đáng kể khi tạo phức với protease. Có một số liên kết hydro nội phân tử hằng định tạo thành giữa CL và trung tâm hoạt động của enzyme. Chúng bao gồm một phiến β ngắn đối song song giữa P_3-P_1 và phân đoạn 214-216 (trong họ chymotrypsin); hai liên kết H giữa O của nhóm carbonyl trên P_1 và các amide của anion oxy gắn liền và một tiếp xúc gần giữa C của nhóm carbonyl trên P_1 và serine xúc tác.

Mặc dù CI tạo thành phức hệ ổn định với enzyme đích, liên kết peptide P_1-P_1' tại trung tâm CL có thể bị enzyme thủy phân. **Hình dạng PPI có trung tâm phản ứng bị cắt hầu như vẫn nguyên vẹn**, trừ các biến đổi cấu trúc cục bộ tại vùng gần liên kết peptide P_1-P_1' . Khi trộn PPI có trung tâm phản ứng bị cắt với enzyme, liên kết peptide tại đây được tái lập, tạo phức với enzyme giống y như phức hệ giữa enzyme và PPI chưa bị cắt [22]. Tuy nhiên các phản ứng cắt và tái tổng hợp xảy ra rất chậm và hằng số cân bằng thủy phân gần như không đổi tại pH trung tính. Điều này có nghĩa là các chất kìm hãm nguyên vẹn và bị cắt có độ ổn định nhiệt động như nhau. Một điều thú vị là mặc dù **phản ứng tạo thành acyl-enzyme giữa enzyme và chất kìm hãm diễn ra nhanh**, thì **phản ứng deacyl đường như bị kìm hãm và xảy ra chậm**, thiên về sự tái tổng hợp lại liên kết peptide P_1-P_1' [23].



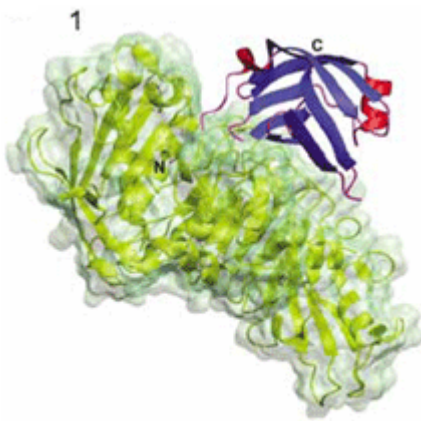
Mt-MMP-1: TIMP-2
(mechanism/ES)

Cơ chế thủy phân/tái tổng hợp liên kết peptide, đặc trưng nổi trội của CI, cũng xảy ra với chất kìm hãm *Streptomyces metalloproteinase* (SMPI, họ I36) [24]. Vòng vị trí hoạt động của nó chặt khi không có chất kìm hãm và rất giống với các chất kìm hãm theo cơ chế chuẩn, khớp với trung tâm hoạt động của enzyme.

◀ **Hình 5:** Phức hệ metalloprotease-chất kìm hãm: membrane-type MMP-1/TIMP-2. Chú thích màu như hình 4

Các chất kìm hãm metalloprotease trong mô (TIMP) cũng tương tác với phức hệ đích là metalloprotease trong chất nền (MMP) theo mô hình ES. Chúng ngăn ngừa sự

phân cắt bằng cách tách phân tử nước khỏi trung tâm hoạt động của enzyme. Các chất kìm hãm này gồm hai miền: miền đầu N với 125 gốc axit amin và miền đầu C linh động hơn gồm khoảng 65 gốc. Mỗi miền được ổn định hóa bởi ba cầu disulfide, cùng nhau tạo thành cạnh dài (elongated edge) [25]. Cạnh này gắn với rãnh trung tâm hoạt động của MMP đích [26] (hình 5). Khoảng 75% tiếp xúc tạo thành do đầu N, còn gọi là vòng liên kết (connector loop). Các miền đầu N tách ra khá ổn định và khóa hoạt tính của các MMP



S. marcescens metalloprotease:
E. chrysanthemi inhibitor
(mechanism/ES)

khác nhau [27]. Đầu N (Cys1-Pro5) gắn với trung tâm hoạt động MMP theo hướng giống như cơ chất. Một số tương tác của phức hệ này làm dịch chuyển phân tử nước xúc tác nên bộ máy xúc tác không bị biến dạng khi cắt.

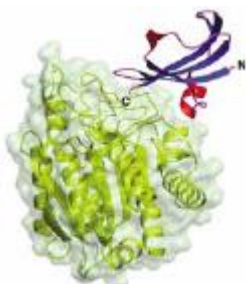
Tương tác mạnh giữa nhóm serralsin của metalloprotease và các chất kìm hãm của vi khuẩn *Pseudomonas aeruginosa* [28] và *Erwinia chrysanthemi* [29] tương tự với phức hệ TIMP-MMP (hình 6).

◀ **Hình 6:** Phức hệ metalloprotease-chất kìm hãm: *Serratia marcescens* metalloprotease/chất kìm hãm từ *Erwinia chrysanthemi*. Chú thích màu như hình 4

Mặc dù TIMP và hai chất kìm hãm vi khuẩn có cấu trúc khác nhau, cả hai nhóm này tạo thành các tương tác có cấu trúc giống nhau và các liên kết cùng phối hợp với Zn xúc tác sử dụng gốc đầu N. Chiều dài của phần đầu N cho phép ion kẽm và gốc đầu N tương tác chặt chẽ, chính xác. Các tiếp xúc gần bị ngăn cản bởi tám phiến β đối song song dạng vòng của chất kìm hãm [28].

5.2.2 Kìm hãm thông qua phức hệ enzyme-sản phẩm (cơ chế EP)

Chất kìm hãm carboxypeptidase A của khoai tây (PCIA) và đĩa (LCI) kìm hãm protease bằng cách tạo phức hệ enzyme-sản phẩm ổn định (hình 7). Tuy cấu trúc khác nhau nhưng chúng nhận dạng carboxypeptidase theo cùng một cách, với **gốc đầu C (Gly và Glu, tương ứng) bị cắt bỏ nhưng vẫn nằm trong phức hệ** [17].

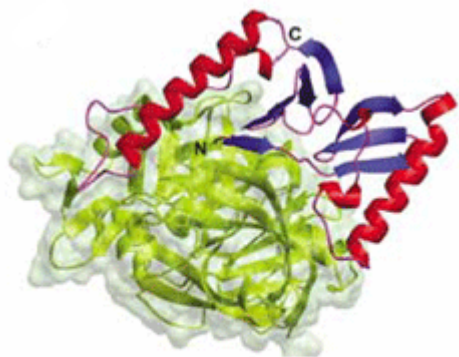


Carboxypeptidase A2:LCI
(mechanism/EP)

Trong cấu trúc tinh thể của cả hai phức hệ, tương tác chủ chốt tạo thành bởi gốc Val (tại P_1'). Tương tự với CI của serine protease, liên kết peptide P_1-P_1' **bị cắt chậm**, sản phẩm của phản ứng thủy phân có hoạt tính như chất kìm hãm và nhóm amin bị khóa tách ra [17].

◀ **Hình 7:** Phức hệ metalloprotease- chất kìm hãm: human carboxypeptidase A2/LCI. Chú thích màu như hình 4

Chất kìm hãm pepsin 3 (PI-3) trong ruột sâu *Ascaris suum* cũng có thể tạo phức enzyme-sản phẩm ổn định. Nó thuộc loại **không đặc hiệu** vì cũng gắn với một số aspartyl protease. PI-3 gồm hai dưới miền, mỗi dưới miền chứa các phiến β đối song



Pepsin A:PI-3
(mechanism/EP)

song, hai bên là một xoắn α [30] (hình 8). Phiến β đầu N của PI-3 cần cho hoạt tính kìm hãm: Gln1 nằm gần hai aspartate xúc tác và đường như nhóm α -amin của nó đủ gần với một trong các aspartate này để ngăn phân tử nước xúc tác. Gln1 cùng Phe2 và Leu3 chiếm giữ các hốc S_1' - S_3' của enzyme.

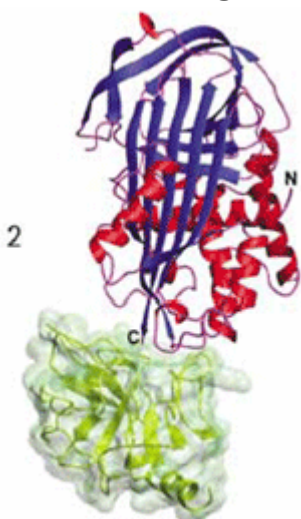
◀ **Hình 8:** Phức hệ aspartic protease- chất kìm hãm: porcine pepsin-PI-3. Chú thích màu như hình 4

5.2.3 Trung gian acyl-enzyme

Nếu như cơ chế Michaelis có tính ổn định nhiệt động học thì cơ chế kìm hãm bằng cách tạo acyl-enzyme là một quá trình **bất thuận nghịch và động**. Chỉ protease serine và cysteine tuân theo cơ chế kìm hãm này. Các chất kìm hãm tạo thành phức hệ acyl-enzyme ổn định, enzyme đích trải qua sự chuyển vị hợp tác cao, **phá hủy trung tâm hoạt động của protease trước khi deacyl hóa**. Trong nhóm chất kìm hãm này, vòng trung tâm phản ứng (RCL) linh động, dài và nhô ra thành một cơ chất tốt [17].

Ví dụ kinh điển của cơ chế kìm hãm này là họ serpin (I4), các protein 45-55 kDa chỉ có một miền gồm ba phiến β và 8 hoặc 9 xoắn α [31]. Không giống như các protein thường gặp, serpin bán ổn định (metastable) ở trạng thái hoạt động. Hình dạng của nó thay đổi lớn, tạo thành dạng ổn định khi kết hợp với protease đích. Đầu tiên, Sự nhận biết RCL nhô ra giống trường hợp CI và protease tấn công liên kết P_1 - P_1' như khi nó đối xử với cơ chất.

Tại giai đoạn này, protease hoặc serpin vẫn giữ nguyên hình dạng, và RCL có dạng chuẩn [32]. Sau đó, gốc Ser xúc tác tấn công liên kết peptide mỗi P_1 - P_1' của serpin làm biến hình mạnh PPI này, tạo thành trung gian acyl-enzyme. **Biến đổi này nhanh đến mức quá trình xúc tác chỉ với hình dạng của một enzyme acyl và giải phóng phần đầu C của vòng trung tâm phản ứng** [33]. Phần đầu N của vòng gắn với phiến β , mang



Trypsin:α-1-antitrypsin
(mechanism/acyl-enzyme)

phân tử enzyme vẫn gần như một acyl enzyme tới cực đối của phân tử kìm hãm. Áp lực này phá vỡ cấu trúc của phân tử enzyme và trung tâm hoạt động của nó nên acyl enzyme không bị thủy phân và phức hệ cộng hóa trị vẫn tồn tại (hình 9).

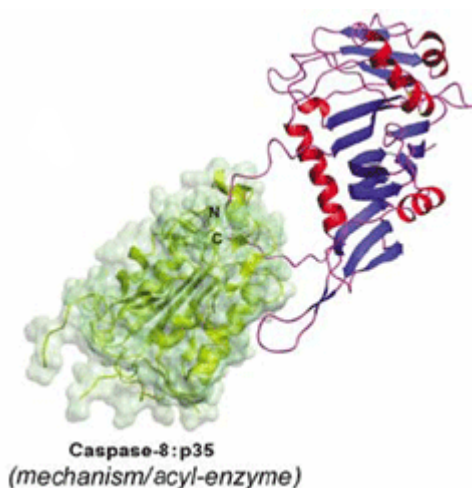
Ngược với CI, nhóm amin mới tạo thành bây giờ dễ dàng tách khỏi trung tâm hoạt động và sau đó RCL hoàn toàn không bị nén được gắn với phiến β A. Do đó, cơ chế kìm hãm serpin hoàn toàn phụ thuộc vào sự mở rộng nhanh chóng của phiến β A chính và sau đó kết hợp với RCL trước khi acyl-enzyme bị thủy phân. Các nghiên cứu hóa sinh và cấu trúc cho thấy tốc độ gắn của vòng rất quan trọng khi kìm hãm [17].

◀ **Hình 9:** Phức hệ serine protease-chất kìm hãm: serpin: trypsin/α-1-antitrypsin. Chú thích màu như hình 4

Do đó, chiều dài RCL bị gắn có thể khác nhau phụ thuộc vào protease bị kim hãm. Thậm chí đáng ngạc nhiên hơn, một **serpin duy nhất có thể có hoạt tính của nhóm hai cơ chế (dual mechanistic class reactivity) bao gồm serine và cysteine protease, sử dụng các trung tâm phản ứng khác nhau** [34]. Điều này trái ngược hoàn toàn với vị trí trung tâm phản ứng bất biến, được tạo thành bởi chiều dài và hình dạng không đổi của CL và là vị trí nhận biết duy nhất của các CI.

Trên một số khía cạnh, CI và serpin có các đặc trưng trái ngược. Với CI, trung tâm hoạt động khi phân cắt không làm biến đổi hình dạng. Vòng gắn tương đối ngắn và quá trình các nhóm amin, carboxyl mới giải phóng tái gắn với enzyme có lợi về mặt động học. Năng lượng tự do của dạng nguyên vẹn và dạng bị cắt gần bằng nhau. Ngược lại, RCL của serpin ít bị ép buộc và dài, giữa các axit amin 14 và 19 [31]. Chiều dài RCL ảnh hưởng mạnh mẽ đến tính ổn định của phức hệ protease-serpin: nếu quá dài, áp lực kéo trên trung tâm hoạt động của protease ít hơn, nhưng nếu quá ngắn thì cạnh tranh không gian giữa enzyme và phiên β A ngăn khả năng truy cập vòng.

Cơ chế kim hãm caspase bởi protein p35 của baculovirus (họ I50) tương tự với cơ chế của serpin. Cơ chế bất hoạt thông qua sự tạo thành thiol ester cộng hóa trị [36]. Tuy nhiên, khi đi sâu vào chi tiết thì khi liên kết peptide bị cắt làm phân tử chất kim hãm ít bị biến đổi hơn (hình 10). Sự cắt của liên kết peptide P_1-P_1' nằm trên vòng lộ ra làm phân đoạn amin của vòng bị cắt di chuyển và che vùi. Kết quả tất yếu là mạch đầu N của p35 (chứa gốc Cys2) được giải phóng. Trong phức hệ, Cys2 gắn với trung tâm hoạt động làm mất khả năng truy cập không gian của phân tử nước thủy phân. Tuy nhiên, so với serpin, chất kim hãm ít bị biến đổi hình dạng hơn và cấu trúc protease không thay đổi.

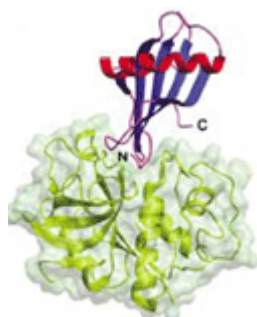


◀ **Hình 10:** Phức hệ cysteine protease-chất kim hãm: caspase-8–p35. Chú thích màu như hình 4

5.3 Khóa không gian trung tâm hoạt động của protease

Trong một số trường hợp không liên quan về mặt tiến hóa, chuỗi polypeptide của chất kim hãm có khả năng **khóa trung tâm hoạt động của protease**. Do vậy, liên kết peptide tại trung tâm phản ứng của PPI của nó không cần tiếp xúc trực tiếp với các nhóm xúc tác tại trung tâm hoạt động của enzyme.

Mô hình cổ điển là sự kim hãm cysteine protease giống papain bởi các chất kim hãm thuộc siêu họ cystatin (gồm cystatin, stefin và kininogen) [38]. Tuy nhiên mô hình tương tác của thyroglobulin loại 1 [39] với enzyme cysteine cũng rất giống cystatin. Trung tâm gắn protease của cystatin và stefin gồm hai vòng kẹp tóc (hairpin loop) và một phân đoạn đầu N. Chúng tạo thành **nêm kỵ nước vừa khít với trung tâm hoạt động** của cysteine protease và nhanh chóng kim hãm enzyme này (hình 10, 11, 12). Phản ứng kim hãm **không tác động đến Cys25 xúc tác nằm xa phân đoạn đầu N**. Một điều thú vị là cystatin cũng không có khả năng tạo thành phức hệ cho dù yếu với cysteine exopeptidase, như được khám phá ra bởi cấu trúc tinh thể của phức hệ stefin A-cathepsin H [40] (hình

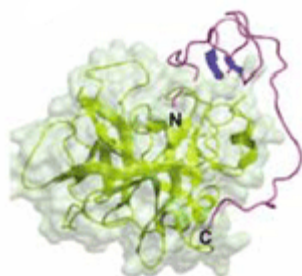


Cathepsin H: stefin A
(steric blockage)

11). Trong trường hợp này, chỉ cần một số biến đổi hình dạng tại phân đoạn đầu N để tạo thành phức hệ ổn định.

◀ **Hình 11:** Phức hệ cysteine protease-chất kìm hãm: cathepsin H-stefin A. Chú thích màu như hình 4

Một trong các ví dụ điển hình của cơ chế này là các chất kìm hãm không chuẩn (NCI) của serine protease. Chúng **gắn đuôi đầu N vào trung tâm hoạt động** của enzyme tạo thành một mạch β ngắn, song song với các gốc 214-216 của enzyme. Tương tác này ngược với CI, ở đó các tương tác thông qua vòng gắn phối bầy và tạo thành mạch β đối song song. NCI thường có ở động vật ăn máu (hematophagous) như một chất chống đông tụ để kìm hãm thrombin hoặc yếu tố Xa. Vùng bề mặt cựa của hai protease có chức năng quan trọng và được nhận ra bởi các phân đoạn phụ trợ: đuôi đầu C có tính axit hoặc một miền tương đồng. Các tương tác bậc hai mở rộng này tăng đáng kể vùng tiếp xúc và góp phần vào tốc độ, động lực và đặc biệt là sự nhận biết cao đến bất ngờ.

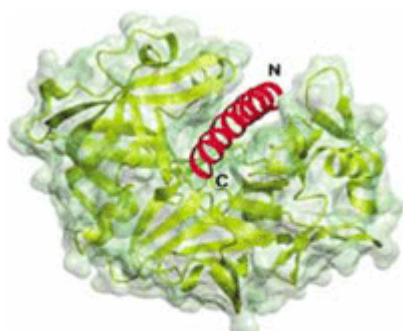


α -Thrombin: haemedin
(steric blockage)

Một trong các ví dụ là nhận biết thrombin bởi chất kìm hãm hirudin của đĩa. Đầu N của miền hình cầu của hirudin tiếp xúc với trung tâm hoạt động theo mô hình phiên β song song đề cập ở trên trong khi đuôi đầu N được nhận ra bởi vị trí ngoài miền nhận biết fibrinogen. Với haemedin của đĩa đồng ruộng (land-living leech), sự tương tác thông qua đầu N là tương tự, nhưng phân đoạn đầu C có tính axit tương tác với bề mặt gắn vùng kẹp tóc (hình 12) [41].

◀ **Hình 12:** Phức hệ serine protease-chất kìm hãm: noncanonical: α -thrombin/haemedin. Chú thích màu như hình 4

Trong trường hợp ornithodorin hai miền, đầu N gắn với trung tâm hoạt động theo mô hình không chuẩn trong khi miền đầu C được nhận ra bởi vị trí ngoài miền nhận biết



Proteinase A: IA3
(steric blockage)

◀ **Hình 13:** Phức hệ aspartic protease- chất kìm hãm: proteinase A-IA3. Chú thích màu như hình 4

fibrinogen (fibrinogen recognition exosite). Cả hai miền ornithodorin giống BPTI (một CI) nhưng các vòng gắn theo cơ chế chuẩn của chúng bị biến dạng và không tiếp xúc với enzyme. Chỉ có duy nhất một NCI tác động đến Xa là peptide chống đông máu của ve (TAP), ngược lại tương đồng cấu trúc với BPTI. Một protein nấm men IA3 nhỏ gồm 68 axit amin có thể khóa trung tâm hoạt động của aspartic protease A từ cùng một sinh vật theo cách rất đặc biệt. Nó **không có cấu trúc bậc hai trong dung dịch và có thể bị cắt bởi một số aspartic protease** tương tự về mặt cấu trúc bao gồm pepsin. Tuy nhiên, khi tạo phức với protease A, các gốc 2-32 của IA3 gần như tạo thành kiểu gấp nếp xoắn α , cho thấy phần thân protease có vai trò như một khuôn gấp nếp [42] (hình 13). Phân tử nước

ái nhân chiếm giữ vị trí xúc tác, nhưng không liên kết peptide của chất kim hãm nào đủ gần để bị tấn công.

Với ngày càng nhiều dữ liệu cấu trúc, chúng ta ngày nay có thể bắt đầu hiểu tốt hơn về các cơ chế phân tử cơ sở đảm bảo cho việc tạo thành phức hệ kim hãm. Các cơ chế này đã được phân loại thành một số loại. Chúng ta có thể tìm ra một số loại mới của các phức hệ protease trong những năm tiếp theo? Câu trả lời chắc chắn là có khi mà các protease mới được khám phá không ngừng và các PPI thường tiến hóa cùng với các enzyme thủy phân protein.

Bảng 3: Các đặc trưng cơ chế kim hãm của PPI

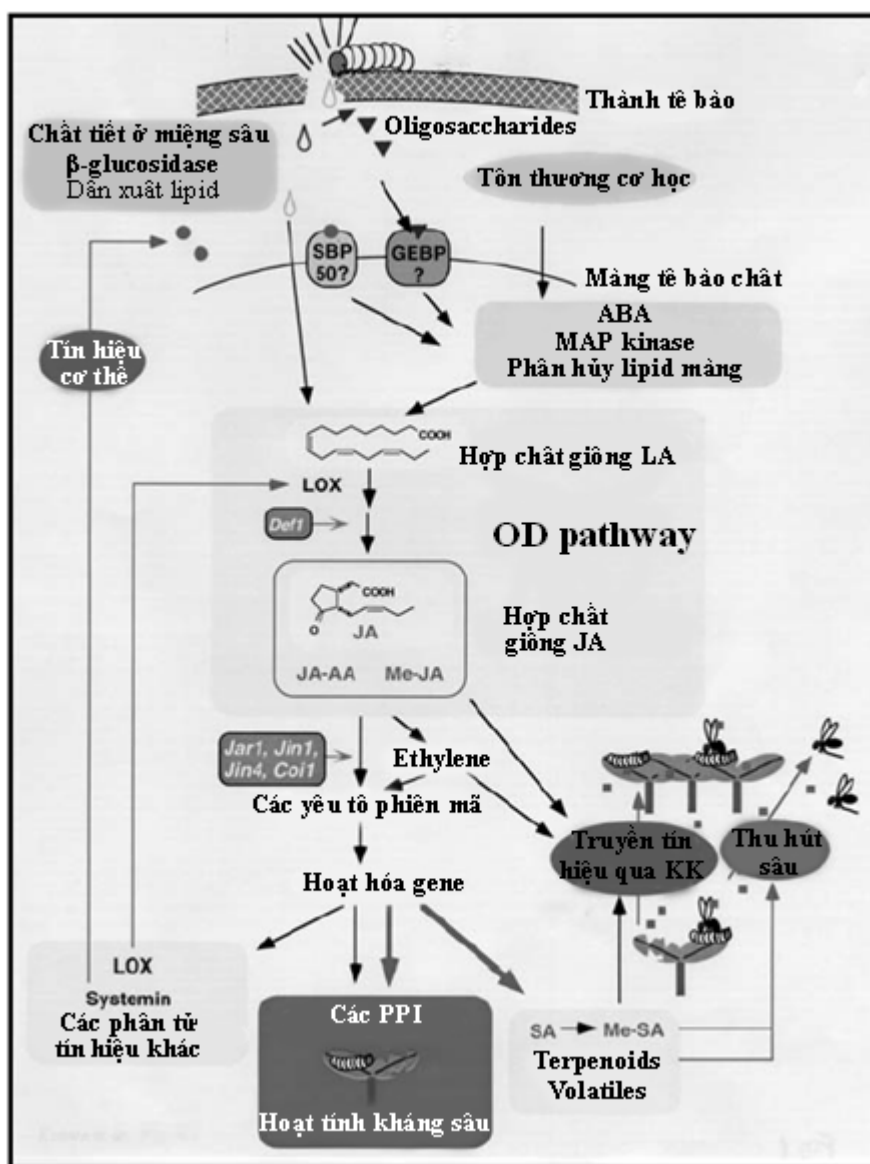
| Loại protease | Chất kim hãm | Đại diện | Đặc trưng kim hãm chính | Trọng lượng |
|---------------|---------------------|---|---|---|
| Serine | CI | BPTI, OMTKY3, eglin c, CMTI I | - Thường rất nhanh và chặt, giống tương tác không cộng hóa trị. - Phức hệ Michaelis trực tiếp khóa vị trí phản ứng, không làm biến đổi hình dạng. - Phiến β đối song song giữa enzyme và chất kim hãm, mô hình tương tự tương tác thông qua vòng gần protease chuẩn trong 18 chất kim hãm khác - Kích thước giao diện vừa phải, vai trò cực hạn của gốc P_1 , có hiệu ứng phụ do năng lượng kết hợp. | 3-21 kDa mỗi miền |
| | NCI | Hirudin, TAP, ornithodorin | - Cực kỳ mạnh, nhanh và tương tác đặc biệt chỉ tạo thành với yếu tố Xa và thrombin, động học bậc hai, kim hãm vị trí phản ứng thông qua đầu N của chất kim hãm tạo thành phiến β song song với trung tâm hoạt động của enzyme - Giao diện lớn gồm hai vùng tương tác. | 6-8 kDa mỗi miền |
| | Serpin | α -1-Antitrypsin, antithrombin | - Phức hệ acyl-enzyme cộng hóa trị bất thuận nghịch, cơ chế bẫy, chất kim hãm biến đổi hình dạng mạnh mẽ, vị trí P_1 có vai trò quan trọng. - Sự kim hãm gây chết, phá vỡ trung tâm hoạt động của protease. | 45-55 kDa |
| Cysteine | Cystatin | Chicken cystatin, cystatin C, stefin B, kininogen | - Vô cùng chặt nhưng không đặc hiệu, kim hãm thuận nghịch và không cộng hóa trị, tương tác thông qua nêm (wedge) tạo thành do hai vòng kẹp tóc (hairpin loop) và đầu N, có thể truy cập Cys25 xúc tác trong phức hệ, các tương tác quan trọng thông qua vị trí P_2 . | 11-13 kDa, up to 60-120 kDa (kininogen) |
| | Thyropin | p41, equistatin | - Kim hãm rất chặt, cơ chế tương tự cystatin nhưng thường đặc hiệu hơn, sự kim hãm lạ thường của cysteine và aspartic protease tại các miền khác nhau của equistatin. | 7 kDa mỗi miền |
| | Bromelain inhibitor | BI-VI | - Sự kim hãm mạnh vừa phải tại pH thấp và không kim hãm tại pH trung tính, cấu trúc tương tự CI thuộc họ Bowman-Birk. | 6-8 kDa |
| | Staphostatin | Staphostatin B | - Sự kim hãm chặt vừa phải, cơ chế kim hãm giống CI, cấu trúc chất kim hãm khác với cystatin, hình dạng lạ thường của Gly được bảo tồn tại P_1 , chiều hướng giống cơ chất của chất kim hãm - Vùng tương tác lớn, quan trọng với vị trí P_1 . | 11 kDa |
| | IAP | XIAP, cIAP1 | - Sự kim hãm đặc hiệu cao, động học gắn chặt thuận nghịch - Sự kim hãm cũng thông qua vùng liên kết linh động trong miền như sự gắn không quay vòng (nonproductive) theo chiều ngược với cơ chất. | 9 kDa mỗi miền BIR |
| | | Crma, PI-9 | - Kim hãm có tính đặc hiệu cao, tương tự với sự bất | 38 kDa |

| | | | | |
|----------|--|--|--|-----------|
| | | | hoạt theo cơ chế serpin. | |
| | | p35 | - Sự kìm hãm không đặc hiệu, acyl-enzyme bất thuận nghịch, biến dạng trung tâm hoạt động, đầu N p35 che Cys360 xúc tác khỏi phân tử nước - Toàn bộ hình dạng khi có chất kìm hãm thay đổi. | 35 kDa |
| Metallo | | PCI, LCI | - Phức hệ enzyme-sản phẩm chặt, kìm hãm thông qua phân đoạn đầu C, vai trò quan trọng của Val38 (P ₁) - Không biết đổi hình dạng khi chất kìm hãm gắn vào. | 4 kDa |
| | | SMPI | - Chất kìm hãm đặc hiệu vừa phải, cơ chế kìm hãm giống với cơ chế chuẩn của các CI của serine protease - Kìm hãm nhất thời, vòng gắn protease khít. | 11 kDa |
| | | <i>P. aeruginosa</i> inhibitor, <i>E.chrysanthemi</i> inhibitor | - Có cả sự kìm hãm yếu và mạnh, các tương tác quan trọng thông qua các gốc đầu N, nhóm axit amin đầu N tạo thành liên kết phối trí với Zn xúc tác. | 15 kDa |
| | | TIMP1-4 | - Tương tác không cộng hóa trị chặt nhưng không mấy đặc hiệu, đầu N và 5 vòng kìm hãm tạo thành nệm tiếp xúc với trung tâm hoạt động, phối trí hóa trị hai của Zn xúc tác thông qua đầu N - Các tương tác chủ yếu thông qua gốc P1', biến đổi hình dạng vừa phải khi tạo phức với chất kìm hãm. | 20-22 kDa |
| Aspartic | | IA3 | - Sự kìm hãm theo kiểu độc nhất vô nhị, đặc hiệu cao, mất sự gấp nếp hoàn toàn trong trạng thái tự do, tạo thành xoắn dài trong phức hệ chứa chỉ nửa đầu N của chất kìm hãm, không cộng hóa trị. | 8 kDa |
| | | PI-3 | - Mạnh nhưng không mấy đặc hiệu. - Phiến β đối song song tạo thành giữa enzyme và chất kìm hãm, không biến đổi hình dạng. | 17 kDa |

6. SINH TỔNG HỢP

Cho đến thời điểm hiện nay, con đường sinh tổng hợp PPI thường được nghiên cứu kỹ ở thực vật. Thực vật tạo ra PPI khi **bị côn trùng tấn công** hoặc khi **bị tổn thương**. PPI cũng thường được điều hòa **theo nhịp độ phát triển** ở cải bắp và khoai tây ngọt (sweet potato). Ở đó đó, hàm lượng PPI cao nhất trong lá non và thấp nhất trong lá già [6].

Lawrence và Koundal (2002) chỉ ra bằng chứng rằng **PPI được tổng hợp theo con đường octadecanoid (OD)**, xúc tác phân hủy axit linolenic và tạo thành axit jasmonic (JA), cảm ứng biểu hiện gene mã hóa PPI (hình 15) [4].



▲ **Hình 15:** Sơ đồ con đường tín hiệu cần thiết để tổng hợp PPI ở thực vật khi bị sâu ăn.

Chuyển hóa tín hiệu tổn thương ở thực vật từ sâu. Tổn thương cơ học làm hóa chất và enzyme trong các chất tiết ở miệng côn trùng dễ dàng loại bỏ đáp ứng phòng vệ của thực vật. β -glucosidase giải thoát các oligosaccharide của thành tế bào động vật. Các

oligosaccharide này gắn với GEBP (glucan elicitor binding protein) và gây ra sự phân hủy lipid màng.

Các kỹ thuật định vị miễn dịch (immunolocalization technique) đã khám phá rằng prosystemin (tiền chất trong thực vật của systemin) nằm trên tế bào nhu mô của bó mạch, systemin và oxylipin dễ dàng vận chuyển, được cảm ứng khi tế bào ngoại biên bị tổn thương. Systemin tương tác với thụ thể về mặt tế bào 160 kDa (SR160), hoạt hóa MAPK, kiểm hóa nhanh môi trường ngoại bào, hoạt hóa phospholipase và giải phóng axit linolenic (LA) [6]. LA và các dẫn xuất có nguồn gốc từ côn trùng chuyển hóa thành các oxylipin (axit phytodienoic và axit jasmonic (JA)) theo con đường octadecanoid (OD).

Trong các tế bào bị tổn thương, JA được tạo ra nhiều hơn, hoạt hóa sự biểu hiện của các gene mã hóa lipoxygenase (LOX) và systemin. Các gene này truyền tín hiệu hồi biến trở lại con đường OD làm JA dễ dàng sinh tổng hợp cả ở cục bộ lẫn toàn cơ thể. Chức năng của systemin liên quan đến một tương tác với protein gắn systemin của màng tế bào (SBP50). **JA là một trung gian chủ chốt trong con đường tín hiệu điều hòa sản sinh các protein phòng vệ (PPI)** và các chất hấp dẫn côn trùng (carnivore attractant). Một số JA được chuyển hóa thành Me-JA, hoặc có thể các liên hợp axit amin (JA-AA). Các chất này cũng có chức năng truyền tín hiệu phòng vệ [43].

Các cánh đồng khoai tây chuyển gene siêu biểu hiện gene prosystemin đã cho thấy điều hòa sự tổng hợp và tích tụ PPI trong lá. Paralogous với sự cảm ứng và tổng hợp tomato inhibitor-II trong lá đáp ứng với tổn thương, lá của thuốc lá tổng hợp chất tobacco trypsin inhibitor (TTI), chỉ ra sự tương tự giữa các hệ thống tín hiệu tổn thương của hai thực vật [6].

7. ỨNG DỤNG

7.1 Trong nông nghiệp

7.1.1 Chống sâu hại và côn trùng

Trong nông nghiệp, cải thiện và mở rộng sức đề kháng di truyền của cánh đồng hiện được coi là biện pháp chống thất thu từ nguyên nhân sâu bệnh và côn trùng hiệu quả nhất. Bởi vậy, từ rất lâu đã có nhiều nghiên cứu chuyển gene mã hóa PPI vào thực vật.

Sau quan sát đầu tiên Mickel và Standish về vai trò bảo vệ mùa màng của các sản phẩm đậu tương, một số nghiên cứu đã chứng minh **độc tính của các chất kìm hãm trypsin trong đậu tương với ấu trùng bọ cánh cứng** (flour beetle), *Tribolium confusum* [6].

Hơn nữa, khi các gene mã hóa PPI biểu hiện thành protein, chúng trở thành ứng cử viên xuất sắc giúp cây trồng kháng sâu bệnh. Điều này được Hilder và cộng sự chứng minh bằng cách chuyển gene kìm hãm trypsin từ *Vigna unguiculata* vào thuốc lá giúp **chống lại một dải rộng các loại sâu hại** gồm bộ **cánh vẩy** (Heliothis và Spodoptera), bộ **cánh cứng** (Diabrotica và Anthonomous), và bộ **cánh thẳng** (Locusts) [6]. Các gene khác nhau từ những nguồn thực vật khác nhau là một ưu điểm khi mà hai hoặc nhiều gene hơn có thể được chuyển kết hợp (với các mục tiêu sinh lý khác nhau) [44].

PPI cũng có hoạt tính **chống lại giun tròn, virus, vi khuẩn, các loại nấm gây bệnh**; do đó chúng có thể có hiệu ứng bảo vệ tích lũy ở thực vật. Hơn nữa, không có bằng chứng về hiệu ứng độc hay gây chết của PPI đối với các loại động vật có vú. Các ưu điểm này làm PPI là sự lựa chọn lý tưởng trong việc tạo ra các cánh đồng biến đổi gene kháng sâu bệnh [6].

Một số cách tiếp cận chiến lược để tăng cường năng lực kháng giun tròn của cánh đồng đã được tiến hành [5]. Hiện tại, chiến lược biểu hiện các gene mã hóa PPI mang lại cách tiếp cận nhiều ưu điểm nhất trong kiểm soát giun tròn. CPI (cystatins) là chất hiệu quả nhất, chống lại giai đoạn ký sinh của *Rotylenchulus reniformis* [7]. **Cystatin** của gạo biến đổi gene (Oc-IDD86) **giảm khả năng sinh sản và mật độ con cái** khi được biểu hiện trong Arabidopsis. Biểu hiện SPI tại các mức tương tự trên đậu đũa (CpTI) làm giảm mật độ con cái ít hơn và không giảm khả năng sinh sản. Tương tự, cystatin của gạo biến đổi gene, Oc-I delta D86, khi biểu hiện trong *Arabidopsis thaliana* tác động đến kích thước và khả năng sinh sản của con cái của chúng *Heterodera schachtii* (giun tròn ký sinh nang củ cải) và *Meloidogyne incognita* (giun tròn ký sinh nốt sần) [8]. **Hoạt tính cysteine proteinase trong ruột giun tròn bị mất nên không con cái của loài nào đạt được kích thước tối thiểu để đẻ trứng.**

Oryzacystatin I và II tạo phức với cysteine proteinase từ dịch chiết thô của ve nhện hai chấm (two spotted spider mite), một loại sâu hại thực vật [45]. Điều này cho thấy **oryzacystatin I và II có khả năng chống lại ve** (mite). Các cánh đồng chuyển gene biểu hiện phytocystatin cũng có thể **kìm hãm các quần thể sên** (slug) phát triển. Các nghiên cứu trên mô lá Arabidopsis chuyển gene biểu hiện oryzacystatin đã tạo ra cánh đồng kháng sên *Deroceras reticulatum* [46].

7.1.2 Chống nấm, virus

PPI cũng góp phần vào khả năng phòng chống nhiễm nấm tự nhiên của thực vật [9]. **Cystatin của thực vật có hoạt tính kháng virus.** Biểu hiện gene mã hóa CPI giúp các cánh đồng thuốc lá chuyển gene kháng lại virus gây hại thuốc lá (tobacco etch virus, TEV) và virus gây hại khoai tây (potato virus Y, PVY). Một số loại đậu tương cũng kháng virus khảm (soybean mosaic virus, SMV) khi có gene mã hóa PPI [47].

Bảng 4 thể hiện một số thực vật chuyển gene đã được biến đổi di truyền để đưa các gene mã hóa PPI và hiệu lực kháng sâu hại tự nhiên, giun tròn và các vật gây hại đến cây chủ [6].

Bảng 4: Các thực vật chuyển gene mang các gene mã hóa PPI chống lại sâu và côn trùng gây hại.

| Nguồn gene | Thực vật chuyển gene | Chống lại |
|---|---|---|
| Các gene mã hóa PPI | | |
| Cowpea trypsin inhibitor (CpTI) | Thuốc lá | Ấu trùng <i>Heliothis virescens</i> |
| | Thuốc lá | <i>Spodoptera litura</i> |
| | Bông | <i>Helicoverpa armigera</i> |
| | Gạo | Sâu ăn gốc gạo (rice stem borers): <i>Chilo suppressalis</i> và <i>Sesamia inferens</i> |
| | Khoai tây | Bướm cà chua (tomato moth): <i>Lacanobia oleraceae</i> |
| | Dâu tây | Mọt nho (vine weevil): <i>Otiorynchus sulcatus</i> F. |
| | Cải bắp | <i>P.rapae</i> |
| CpTi và snowdrop lectin | Đậu thiêu (Pigeon pea) | <i>Helicoverpa armigera</i> |
| | Khoai tây ngọt | <i>Cyclas formicarius</i> |
| | Khoai tây ngọt quý ('Jewel' sweet potato) | Mọt khoai tây (West Indian sweet potato weevil): <i>Euscepes postfaciatus</i> |
| Soybean serine-proteinase inhibitor (C-II) | Khoai tây/Thuốc lá | Cánh cứng/cánh vảy |
| Soybean (Kunitz) trypsin inhibitor | Thuốc lá | Ấu trùng <i>Spodoptera litura</i> |
| | Gạo | Bọ nhảy nâu ở thực vật: <i>Nilaparavata lugens</i> Stal |
| Soybean Kunitz trypsin inhibitor (SKTI-4) | Khoai tây ngọt | <i>Cyclas</i> spp. |
| Soybean Kunitz, C-II và PI-IV inhibitor | Khoai tây/Thuốc lá | <i>Spodoptera littoralis</i> |
| Chất kìm hãm trypsin của <i>Vigna unguiculata</i> | Thuốc lá | <i>Heliothis</i> <i>Spodoptera</i> <i>Diabrotica</i> <i>Anthonomus</i> Châu chấu |
| Tomato proteinase inhibitors I and II | Thuốc lá | Ấu trùng <i>Manduca sexta</i> |
| Tomato proteinase inhibitor I | Cây cà (cây lu lu) | - |
| | Thuốc lá | - |
| | Cỏ linh lăng | - |
| Proteinase inhibitor SaPIN2a | Rau diếp | - |
| Potato inhibitor II gene | Thuốc lá | <i>Chrysodeisus eriosoma</i> |

| | | |
|--|--|---|
| | Gạo | Sâu ăn gốc (pink stem borer): <i>Sesamia inferens</i> |
| | Mía | Sâu ăn mía (sugarcane grubs): <i>Antitrogus consanguineus</i> |
| Sweet potato (<i>Ipomea batatas</i>) trypsin inhibitor | Thuốc lá | <i>Spodoptera litura</i> |
| Trypsin inhibitor from barley (CMe) | Gạo Ấn Độ và Nhật | Mọt gạo (rice weevil): <i>Sitophilus oryzae</i> |
| | Lúa mạch | <i>Agrotis ipsilon</i> |
| | Thuốc lá | Bộ cánh vảy |
| | Lúa mì | <i>Spodoptera lituralis</i> |
| Mustard trypsin inhibitor-2 | - | Ấu trùng <i>Spodoptera littoralis</i> |
| Mustard trypsin inhibitor (MTI-2) | Thuốc lá | <i>Plutella xylostella</i> (L.) |
| | Arabidopsis | <i>Mamestra brassicae</i> (L.) |
| | Cải dầu (Oilseed rape) | <i>Spodoptera littoralis</i> (Boisduval) |
| Oryzacystatin I | Cây dương (Poplar) | <i>Chrysomela tremulae</i> (Bộ cánh cứng: Chrysomelidae) |
| | Khoai tây | Rệp khoai tây: <i>Myzus persicae</i> |
| | Khoai tây | Ấu trùng bộ cánh cứng khoai tây: <i>Leptinotarsa decemlineata</i> |
| | Cải dầu | <i>Cabbage seed weevil</i> (Bộ cánh cứng: Curculionidae) |
| | Cải dầu | <i>Myzus persicae</i> |
| Corn cystatin | Gạo | Mọt hạt ngô (maize grain weevil): <i>Sitophilus zeamais</i> |
| PPI của <i>Nicotiana glauca</i> | Thuốc lá | <i>Helicoverpa punctigera</i> |
| | Đậu Hà Lan | <i>Plutella xylostella</i> |
| CPI của <i>Arabidopsis thaliana</i> | Cây dương trắng (<i>Populus alba</i> L.) | Bọ môi vàng (Chrysomelid beetle): <i>Chrysomela populi</i> |
| Gene PPI kháng lại các vật gây bệnh khác (virus/giun tròn/...) | | |
| Modified oryzacystatin | Mô lá <i>Arabidopsis thaliana</i> | Sên đồng (Field Slug): <i>Deroceras reticulatum</i> |
| | <i>Arabidopsis</i> | Giun tròn ký sinh nang củ cải: <i>Heterodera schachtii</i> Giun tròn ký sinh nốt sần: <i>Meloidogyne incognita</i> |
| CPI | Thuốc lá | Potyvirus |
| Oryzacystatin | Transgenic hairy roots | <i>Globodera pallida</i> |
| Oryzacystatin I và II | Cỏ linh lăng | Giun tròn ký sinh vùng rễ tôn thương |
| Oryzacystatin I delta D86 | Gạo | <i>Nematode resistance</i> <i>Meloidogyne incognita</i> <i>Rotylenchulus reniformis</i> |
| PPI từ các sinh vật khác được biểu hiện trong thực vật trong thực vật | | |
| PPI của <i>Manduca sexta</i> | Bông | |
| | Thuốc lá | <i>Bemisia tabaci</i> |
| Bovine spleen trypsin inhibitor | Thuốc lá | <i>Helicoverpa armigera</i> larvae |

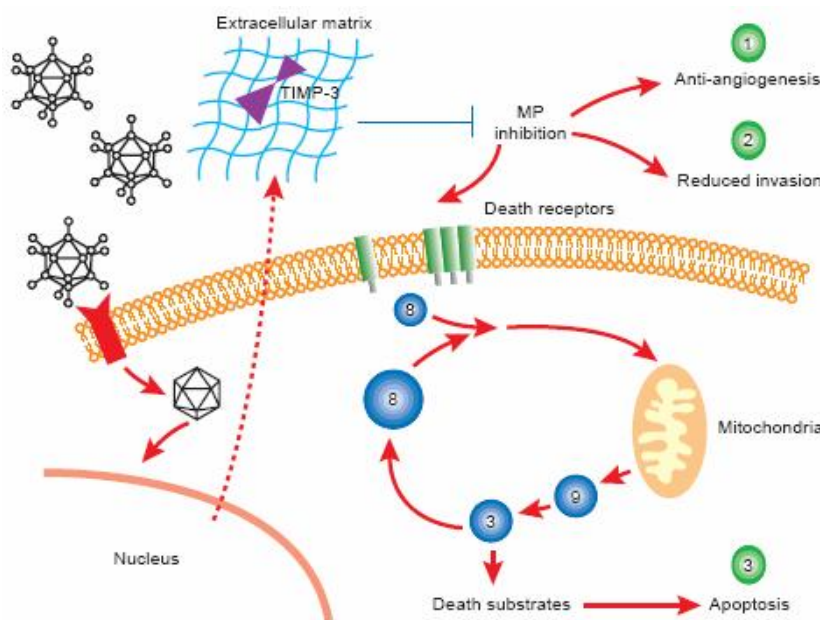
7.1 Trong y học

7.1.2 Ung thư

Ngoài hoạt tính kìm hãm protease, hoạt tính **chống ung thư** và **chống phóng xạ** của các chất kìm hãm **Bowman-Birk (BBI)** từ các loại cây họ đậu cũng đã được nghiên cứu rộng rãi. Nguy cơ mắc ung thư tiền liệt tuyến, ung thư ruột kết, ung thư vú và ung thư da của những quần thể ăn nhiều cây họ đậu tương đối thấp [10]. Người ta tin rằng hoạt tính chống ung thư là do **hoạt tính thủy phân protein của tế bào bị kìm hãm** [48].

Hiện có một số nghiên cứu chứng minh rằng siêu biểu hiện của TIMP giúp ngăn chặn sự phát triển và/hoặc mở rộng của ung thư cũng như bảo vệ các mô bình thường, không bị ung thư do di căn [49].

Celiker và cộng sự đã chuyển một DNA plasmid mã hóa TIMP-4 vào chuột có các khối u bằng cách tiêm vào cơ trong. Họ quan sát thấy tốc độ phát triển của khối u suy giảm đáng kể đi đôi với lượng TIMP-4 lưu thông tăng lên và sự hấp thụ của gene được chuyển vào các tế bào khối u [50].



▲ ◀ ▶ **Hình 16:** Cơ chế tác động của liệu pháp gene sử dụng TIMP-3. Chuyển vector adenovirus (đã biến đổi để biểu hiện TIMP-3 và giảm mạnh khả năng tái bản) vào tế bào thông qua thực bào (endocytosis) nhờ thụ thể. Vector này chuyển đến nhân, phiên mã và tiết ra TIMP-3. TIMP-3 tái tổ hợp gắn với ECM, bắt đầu tác động đến kiểu hình của tế bào (hình tròn xanh lá cây đánh số từ 1-3). Sự siêu biểu hiện của TIMP-3 được kết hợp với hoạt tính chống hình thành mạch (anti-angiogenic) (1), giảm sự di động và lan rộng của tế bào (2) và khởi đầu apoptosis (3). Sự

cảm ứng apoptosis xảy ra do hoạt tính của phối tử/thụ thể gây chết tại bề mặt tế bào bị điều biến bởi hoạt hóa caspase (màu xanh da trời). Apoptosis được trung gian thông qua con đường phụ thuộc loại 2 gồm caspase-8, -9 và -3 cũng như các thành phần của ty thể. Cuối cùng sự phân cắt trung gian caspase-3 của các cơ chất gây chết dẫn tới apoptosis.

Các đặc trưng sinh học của TIMP-3 được lợi dụng trong liệu pháp gene chống ung thư (hình 16). Các nghiên cứu trước đây cho thấy TIMP-3 kìm hãm tế bào ung thư lây lan, kích thích apoptosis, kìm hãm sự hình thành mạch (angiogenesis). Khi TIMP-3 siêu biểu hiện trong các khối u (melanomaderived subcutaneous tumours) của chuột rừng lông làm giảm mật độ mạch máu, kích thích apoptosis và giảm đáng kể sự phát triển của khối u [11].

Một số nghiên cứu y học cho thấy rằng cathepsin và/hoặc cystatin có giá trị chuẩn đoán hoặc chuẩn đoán sớm nhiều loại ung thư khác nhau [13].

7.1.2 Bệnh tim

Đã có một số cứu về vai trò của MPI với các bệnh tim mạch cấp tính. Sự siêu biểu hiện của TIMP **ngăn cản các tế bào cơ trơn di động**. Lỗi cấy ghép tĩnh mạch thường liên quan đến sự di động của tế bào cơ trơn. Ở In vivo, biểu hiện tăng của TIMP-3 kìm hãm đáng kể sự phát triển của bệnh thông qua khả năng kích thích apoptosis của nó [11].

7.1.3 Bệnh sốt xuất huyết

Sốt xuất huyết do Dengue virus gây nguy hiểm cho gần 2,4 tỷ người sống tại các vùng nhiệt đới. Hiện chưa có liệu pháp hay vaccine hiệu quả. Gần đây, Murthy và cộng sự cho thấy NS3 (một loại protease đóng vai trò thiết yếu trong sự tái bản của virus Dengue trong các tế bào chủ) có thể bị kìm hãm bởi BBI của mung bean, cấu trúc tinh thể của phức hệ protease với chất kìm hãm của mung bean cũng được xác định [12]. Kết quả này cho thấy BBI này có thể trở thành một loại thuốc hữu hiệu **chống lại bệnh sốt xuất huyết**.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Barrett, A. J., N. D. Rawlings, E. A. O'Brien.** 2001. The MEROPS database as a protease information system. *J. Struct. Biol.* 134:95-102
2. **Otlewski, J., D. Krowarsch, W. Apostoluk.** 1999. Protein inhibitors of serine proteinases. *Acta. Biochem. Pol.* 46:531-565
3. **Rawlings, N. D., D. P. Tolle, A. J. Barret.** 2004. Evolutionary families of peptidase inhibitors. *Biochem. J.* 378:705-716
4. **Lawrence, P. K., K. R. Koundal.** 2002. Plant protease inhibitors in control of phytophagous insects. *Electronic Journal of Biotechnology.* 5:1-17
5. **Atkinsen, H. J., P. E. Urwin, E. Hansen, M. J. McPherson.** 1995. Designs for engineered resistance to root-parasitic nematodes. *Trends Biotechnol.* 13:369-374
6. **Haq, S. K., S. M. Atif, R. H. Khan.** 2004. Protein proteinase inhibitor genes in combat against insects, pests, and pathogens: natural and engineered phytoprotection. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* 431:145-159
7. **Urwin, P. E., A. Levesely, M. J. McPherson, H. J. Atkinson.** 2000. Transgenic resistance to the nematode *Rotylenchulus reniformis* conferred by *Arabidopsis thaliana* plants expressing proteinase inhibitors. *Mol. Breed.* 6:257-264
8. **Urwin, P. E., C. J. Lilley, M. J. McPherson, H. J. Atkinson.** 1997. Resistance to both cyst and root knot nematodes conferred by transgenic *Arabidopsis* expressing a modified plant cystatin. *Plant J.* 12:455-461
9. **Soares-Costa, A., L. Beltramini, O. Thieman, F. Henrique-Silva.** 2002. A sugarcane crystatin: recombinant expression, purification, and antifungal activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 296:1194-1199
10. **Kennedy, A. R.** 1998. The Bowman-Birk inhibitor from soybeans as an anticarcinogenic agent. *Am. J. Clin. Nutr.* 68:1406s-1412s
11. **Baker, A. H., D. R. Edwards, G. Murphy.** 2002. Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities. *Journal of Cell Science.* 115:3719-3727
12. **Murthy, H. M., K. Judge, L. DeLucas, R. Padmanabhan.** 2000. Crystal structure of Dengue virus NS3 protease in complex with a Bowman-Birk inhibitor: Implications for flaviviral polyprotein processing and drug design. *J. Mol. Biol.* 301:759-767
13. **Keppler, D.** 2005. Towards novel anti-cancer strategies based on cystatin function. *Cancer Letters.* xx:1-18
14. **Laskowski, M. J., I. Kato.** 1980. Protein inhibitors of proteinases. *Annu. Rev. Biochem.* 49:593-626
15. **Borth, W.** 1992. Alpha-2-macroglobulin. A multifunctional binding protein with targeting characteristics. *Faseb. J.* 6:3345-3353
16. **Jackson, R. M., R. B. Russell.** 2001. Predicting function from structure: examples of the serine protease inhibitor canonical loop conformation found in extracellular proteins. *Computers and Chemistry.* 26:3139
17. **Otlewski, J., F. Jelen, M. Zakrzewska, A. Oleksy.** 2005. The many faces of protease-protein inhibitor interaction. *The EMBO Journal.* 24:1303-1310
18. **Barrett, A. J.** 1981. α_2 -Macroglobulin. *Methods Enzymol.* 80:737-754
19. **Sottrup-Jensen, L.** 1989. α -Macroglobulins: structure, shape and mechanism of proteinase complex formation. *J. Biol. Chem.* 264:11539-11542
20. **Sottrup-Jensen, L., O. Sand, L. Kristensen, G. H. Fey.** 1989. The α -macroglobulin bait region. Sequence diversity and localization of cleavage sites for proteinases in five mammalian α -macroglobulins. *J. Biol. Chem.* 264:15781-15789

21. Kolodziej, S. J., H. U. Klueppelberg, N. Nolasco, W. Ehses, D. K. Strickland, J. K. Stoops. 1998. Three-dimensional structure of the human plasmin alpha₂-macroglobulin complex. *J. Struct. Biol.* 123:124-133
22. Helland, R., J. Otlewski, O. Sundheim, M. Dadlez, A. O. Smalas. 1999. The crystal structures of the complexes between bovine betatrypsin and ten P₁ variants of BPTI. *J. Mol. Biol.* 287:923-942
23. Radisky, E. S., D. E. Koshland. 2002. A clogged gutter mechanism for protease inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99:10316-10321
24. Tate, S., A. Ohno, S. S. Seeram, K. Hiraga, K. Oda, M. Kainosho. 1998. Elucidation of the mode of interaction of thermolysin with a proteinaceous metalloproteinase inhibitor, SMPI, based on a model complex structure and a structural dynamics analysis. *J. Mol. Biol.* 282:435-446
25. Gomis-Ruth, F. X., K. Maskos, M. Betz, A. Bergner, R. Huber, *et al.* 1997. Mechanism of inhibition of the human matrix metalloproteinase stromelysin-1 by TIMP-1. *Nature.* 389:77-81
26. Fernandez-Catalan, C., W. Bode, R. Huber, D. Turk, J. J. Calvete, *et al.* 1998. Crystal structure of the complex formed by the membrane type 1-matrix metalloproteinase with the tissue inhibitor of metalloproteinases-2, the soluble procollagenase A receptor. *EMBO J.* 17:5238-5248
27. Murphy, G., A. Houbrechts, M. I. Cockett, R. A. Williamson, M. O'Shea, A. J. Docherty. 1991. The N-terminal domain of tissue inhibitor of metalloproteinases retains metalloproteinase inhibitory activity. *Biochemistry.* 30:8097-8102
28. Hege, T., R. E. F. R. D. G. U. Baumann. 2001. Crystal structure of a complex between *Pseudomonas aeruginosa* alkaline protease and its cognate inhibitor: inhibition by a zinc-NH₂ coordinative bond. *J. Biol. Chem.* 276:35087-35092
29. Baumann, U., M. Bauer, S. Letoffe, P. Delepelaire, C. Wandersman. 1995. Crystal structure of a complex between *Serratia marcescens* metallo-protease and an inhibitor from *Erwinia chrysanthemi*. *J. Mol. Biol.* 248:653-661
30. Ng, K. K., J. F. Petersen, M. M. Cherney, C. Garen, J. J. Zalatoris, *et al.* 2000. Structural basis for the inhibition of porcine pepsin by *Ascaris* pepsin inhibitor-3. *Nat. Struct. Biol.* 7:653-657
31. Gettins, P. G. 2002. Serpin structure, mechanism, and function. *Chem. Rev.* 102:4751-4804
32. Ye, S., A. L. Cech, R. Belmares, R. C. Bergstrom, Y. Tong, *et al.* 2001. The structure of a Michaelis serpin-protease complex. *Nat. Struct. Biol.* 8:979-983
33. Huntington, J. A., R. J. Read, R. W. Carrell. 2000. Structure of a serpin-protease complex shows inhibition by deformation. *Nature.* 407:923-926
34. Al-Khunaizi, M., C. J. Luke, Y. S. Askew, S. C. Pak, D. J. Askew, *et al.* 2002. The serpin SQN-5 is a dual mechanistic class inhibitor of serine and cysteine proteinases. *Biochemistry.* 41:3189-3199
35. Im, H., H. Y. Ahn, M. H. Yu. 2000. Bypassing the kinetic trap of serpin protein folding by loop extension. *Protein. Sci.* 9:1497-1502
36. Xu, G., M. Cirilli, Y. Huang, R. L. Rich, D. G. Myszka, H. Wu. 2001. Covalent inhibition revealed by the crystal structure of the caspase-8/p35 complex. *Nature.* 410:494-497
37. Chai, J., E. Shiozaki, S. M. Srinivasula, Q. Wu, P. Datta, *et al.* 2001. Structural basis of caspase-7 inhibition by XIAP. *Cell.* 104:769-780
38. Turk, B., V. Turk, D. Turk. 1997. Structural and functional aspects of papain-like cysteine proteinases and their protein inhibitors. *Biol. Chem.* 378:141-150
39. Guncar, G., G. Pungercic, I. Klemencic, V. Turk, D. Turk. 1999. Crystal structure of MHC class II-associated p41 Ii fragment bound to cathepsin L reveals the structural basis for differentiation between cathepsins L and S. *EMBO. J.* 18:793-803

40. **Jenko, S., I. Dolenc, G. Guncar, A. Dobersek, M. Podobnik, D. Turk.** 2003. Crystal structure of stefin A in complex with cathepsin H: N-terminal residues of inhibitors can adapt to the active sites of endo- and exopeptidases. *J. Mol. Biol.* 326:875-885
41. **Richardson, J. L., B. Kroger, W. Hoeffken, J. E. Sadler, P. Pereira, et al.** 2000. Crystal structure of the human alpha-thrombin-haemadin complex: an exosite II-binding inhibitor. *EMBO. J.* 19:5650-5660
42. **Li, M., L. H. Phylip, W. E. Lees, J. R. Winther, B. M. Dunn, et al.** 2000. The aspartic proteinase from *Saccharomyces cerevisiae* folds its own inhibitor into a helix. *Nat. Struct. Biol.* 7:113-117
43. **Michaud, D.** 2000. *Recombinant Protease Inhibitors in Plants*. Georgetown, USA: Eureka.com. 255 pp.
44. **Urwin, P. E., M. J. McPherson, H. J. Atkinson.** 1998. Enhanced transgenic plant resistance to nematodes by dual proteinase inhibitor constructs. *Planta.* 204:472-479
45. **Michaud, D., L. Cantin, D. A. Raworth, T. C. Vrain.** 1996. Assessing the stability of cystatin/cysteine proteinase complexes using mildly-denaturing gelatin-polyacrylamide gel electrophoresis. *Electrophoresis.* 17:74-79
46. **Walker, A. J., P. E. Urwin, H. J. Atkinson, P. Brain, D. M. Glenn, P. R. Shewry.** 1999. Transgenic Arabidopsis leaf tissue expressing a modified oryzacystatin shows resistance to the field slug *Deroceras reticulatum* (Muller). *Transgenic Res.* 8:95-103
47. **Chen, P., G. R. Buss, S. A. Tolin.** 1993. Resistance to soybean mosaic virus conferred by two independent dominant genes in PI 486355. *Heredity.* 84:25-28
48. **Billings, P. C., J. M. Habres.** 1992. A growth-regulated protease activity that is inhibited by the anticarcinogenic Bowman-Birk protease inhibitor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89:3120-3124
49. **Brand, K., A. Baker, A. Perez-Canto, A. Possling, M. Sacharjat, et al.** 2000. Treatment of colorectal liver metastases by adenoviral transfer of tissue inhibitor of metalloproteinases-2 into the liver tissue. *Cancer Res.* 60:5723-5730
50. **Celiker, M., M. Wang, E. Atsidaftos, X. Liu, Y. E. Liu, et al.** 2001. Inhibition of Wilms' tumor growth by intramuscular administration of tissue inhibitor of metalloproteinases-4 plasmid DNA. *Oncogene.* 20:4337-4343