

Proteinases and antiproteinases: biomedical correlations

Kotyza J

Proteinázy a antiproteinázy: biomedicínské korelace

Abstract

Kotyza J.:
Proteinases and antiproteinases: biomedical correlations
 Bratisl lek Listy 2000; 101 (8): 445–449

Both degradative and limited proteolysis are involved in physiological processes. Once activated, proteinases are controlled by endogenous inhibitors (antiproteinases). A variety of genetic disorders and exogenous microbial proteinases disturb the balance between proteinases and cognate inhibitors. α 1-Antitrypsin deficiency is a model disorder resulting in an insufficient control of leukocyte elastase with a subsequent alveolar tissue damage. It appears that the manifold molar excess of inhibitor required to compensate the deficiency, is the consequence of both the local relative inaccessibility of the serpin, and the mode of proteinase-serpin interaction, in accord with the "branched pathway" mechanism. Slow-binding kinetics and the leak of native proteinase from the complex is illustrated by the peptidolytic action of porcine elastase in the presence of human α 1-antitrypsin and by gelatin zymography, respectively. (Tab. 2, Fig. 5, Ref. 44.)

Key words: proteolysis, inhibitors, alpha-1-antitrypsin, elastase, zymography.

Proteolýza, hydrolytické štěpení peptidových vazeb bílkovin, je podobně jako proteosyntéza jedním ze základních funkčních projevů živých systémů. Biologickým smyslem proteolýzy není vždy jenom destrukce proteinových struktur. Cílené proteolytické modifikace jsou nezbytné pro dotváření funkčních proteinů, jejich transport a aktivaci. Tak se specifické proteinázy stávají nástrojem, ale také předmětem biologických regulací. Nejúčinnějším regulátorem aktivovaných proteináz jsou přirozené bílkovinné inhibitory, antiproteinázy. Porušení rovnováhy mezi proteolytickými enzymy a jejich inhibitory je významným patogenetickým faktorem, který je v současné době intenzivně studován v mnoha oblastech humánní medicíny.

Abstrakt

Kotyza J.:
Proteinázy a antiproteinázy: biomedicínské korelace
 Bratisl. lek. Listy, 101, 2000, č. 8, s. 445–449

Do fyziologických procesů je zapojena jak degradativní, tak limitovaná proteolýza. Aktivované proteinázy jsou kontrolovány endogenními inhibitory (antiproteinázami). Různé genetické poruchy i exogenní mikrobiální proteinázy narušují rovnováhu mezi proteinázami a příslušnými inhibitory. α 1-antitrypsinová deficiencie je modelovou poruchou vyúsťující v nedostatečnou kontrolu leukocytární elastázy s následným poškozením alveolární tkáně. Ukazuje se, že mnohonásobný molekulární nadbytek inhibitoru nutný ke kompenzaci poruchy je následkem jednak relativní lokální nedostupnosti inhibitoru, jednak zvláštnostmi interakcí mezi serpiny a proteinázami ve smyslu „branched pathway“ mechanismu. „Slow-binding“ kinetika a uvolňování nativní proteinázy z komplexu jsou ilustrovány jednak průběhem peptidolytické aktivity vepřové elastázy v přítomnosti lidského α 1-antitrypsinu, jednak želatinovou zymografií. (Tab. 2, obr. 5, lit. 44.)

Klíčová slova: proteolýza, inhibitory, alfa-1-antitrypsin, elastáza, zymografie.

Proteolytické systémy

Eukaryotická buňka je vybavena dvěma systémy degradativní proteolýzy: vakuolárním (*lyzosomálním*) a cytoplasmatickým (*proteasomálním*) (1, 8, 13, 14) (obr. 1). Lyzosomální systém degraduje vedle nitrobuněčných hlavně extracelulární struktury, včetně fagocytovaných částic, a uplatňuje se zejména ve stressových situacích. Naproti tomu proteosomální systém je zřejmě odpovědný za vysoce selektivní obrat cytoplasmatických proteinů v bazálních podmínkách, ale zahrnuje i degradaci bílkovinných produktů virového původu. Zcela odlišný je výběrový mechanismus: receptorový v prvním případě, ATP-závislé označení ubiquitinem

Department of Biochemistry, Charles University, Medical Faculty, Plzen.
 kotyza@lfp.cuni.cz

Address for correspondence: J. Kotyza, MD, PhD, Dpt of Biochemistry, Faculty of Medicine, Karlovarska 48, CZ-301 66 Plzen, Czech Republic.
 Phone: +420.19.7597 327

Ústav biochemie Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Plzni

Adresa: Doc. MUDr. J. Kotyza, CSc., Ústav biochemie LF UK v Plzni, Karlovarska 48, 301 66 Plzeň, Česká republika.

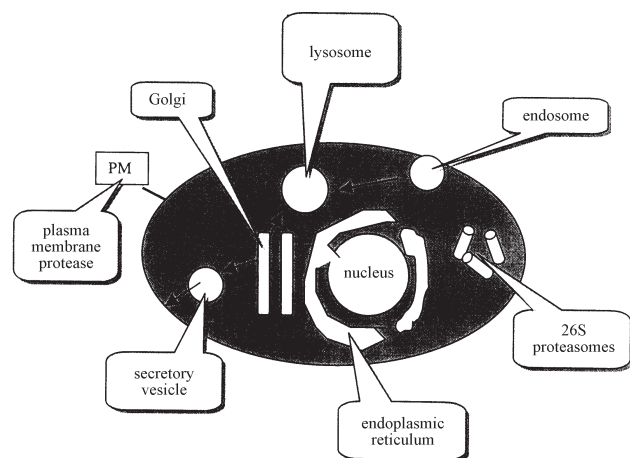


Fig. 1. Proteolytic compartments in eucaryotic cells are represented by the vacuolar system (including lysosomes, endosomes, endoplasmic reticulum and secretory vesicles) and by the cytoplasmic ubiquitin-mediated system (26S proteasomes).

Obr. 1. Proteolytické kompartmenty eukaryotických buněk představuje vakuolární systém (zahrnující lysosomy, endosomy, endoplasmatické retikulum a sekreční vezikly) a cytoplasmatický ubiquitinový systém (26S proteasomy).

v případě proteosomálního systému. Důležitým impulzem pro výzkum proteasomů bylo zjištění, že produkují *imunogenní peptidy* navazované na MHC-1, na rozdíl od lysosomů, které generují

Tab. 1. Classes of proteolytic enzymes, examples of common proteases and inhibitors.

Tab. 1. Třídy proteolytických enzymů, příklady běžných proteáz a inhibitorů.

| Proteinase class | Typical proteinase(s) | Typical inhibitor(s) |
|------------------|---------------------------------------|---|
| serine | chymotrypsin | "Small inhibitors": aprotinin, ovomucoid "Serpins": α 1-antitrypsin antithrombin antiplasmin, PAI |
| | elastase | |
| | thrombin | |
| | plasmin | |
| | plasminogen activator | |
| cysteine | cathepsin G | cystatins calpastatin IAP(inhibitors of apoptosis) |
| | papain | |
| | cathepsin B | |
| | calpains | |
| | caspses | |
| | | |
| aspartyl | pepsin | pepstatin (bacterial peptide) |
| | cathepsin D | |
| | SAP(Candida) HIV-1 protease | |
| metallo- | MMP 1-13 | TIMP 1-4 |
| | carboxypeptidase A, B | |
| | ACE (angiotensin I converting enzyme) | |
| | botulinus, tetanus toxins | |
| | | |

peptidy vystavované prostřednictvím MHC-2 (20). Dokonalá separace obou systémů umožňuje nastartování odlišných imunitních odpovědí s případnou likvidací buněk označených cizorodým antigenem navázaným na MHC-1.

Degradativní proteolýza zprostředkovaná secernovanými proteolytickými enzymy probíhá rovněž v extracelulárních a transcelulárních prostorech a zasahuje do nejrůznějších fyziologických a patologických procesů, mj. se podílí i na orgánové morfogenezi a invazivním růstu nádorů. Degradativní proteázy patří k fylogeneticky nejstarším enzymům, např. u digestivních proteináz lze prokázat společný původ s mikrobiálními proteolytickými enzymy. Během evoluce se však vyvinula nová kategorie proteináz, a to restrikcí původně širokého okruhu substrátů na vybraný, často velmi úzký soubor struktur (34). Tyto enzymy nelikvidují, pouze *funkčně modifikují* své substráty a umožňují, event. regulují tak řadu fyziologických pochodů. Příkladem je eliminace signálního peptidu po vstupu do endoplasmatického retikula (*signální peptidázy*), nebo vyštěpení funkčních peptidů ze složitějších proteinových prekurzorů (*konvertázy*) (3, 16, 17, 23, 24). Dobře známá je např. geneze peptidových hormonů. Modifikační proteázy jsou lokalizovány převážně ve vakuolárním systému buňky (*ER, Golgi, sekreční vezikly, endosomy*), jak je patrné z obrázku 1.

Endogenní inhibitory proteináz

Proteolytické enzymy jsou nejen fyziologickou nezbytností, ale také značným rizikem vzhledem ke svým potenciálně destruktivním schopnostem. Tím se vysvětluje současná přítomnost celé plejády specifických *inhibitorů proteináz*. Tato kategorie regulačních proteinů se uplatňuje u převážně většiny bílkoviny štěpících enzymů, včetně *aktivačních proteináz*, které z inaktivních zymogenu vytvářejí aktivní enzymy. Aktivační enzymy jsou někdy řetězově seskupeny, jak vidíme u amplifikačních kaskád (hemokoagulace, fibrinolýza), čímž se ještě zvyšuje riziko nekontrolované proteolýzy. Proteolytická aktivace je proces nevratný a jediným schůdným mechanismem, kterým je možno jednou aktivované proteinázy kontrolovat, je vytvoření proteolytický inaktivního komplexu s proteinovým inhibitorem.

Endogenní inhibitory proteináz se vyvíjely současně s proteolytickými enzymy jako reakce na změnu jejich specifit, takže se vyskytují v homologních rodinách s příslušností ke čtyřem základním třídám proteináz (tab. 1). Početná skupina inhibitorů *serinových proteináz* je rozčleněna na několik typů relativně malých proteinykových inhibitorů (např. aprotinin, ovomucoid) a důležitou podskupinu inhibitorů o větší molekulární hmotnosti, tzv. *serpinů* (akronym pro SERine Proteinase INhibitor), mezi něž řadíme např. antithrombin, antitrypsin, PAI, atd. (6, 7, 10, 18, 19, 30).

Prototypem *cysteinových proteináz* jsou kathepsiny (např. B, L), nejděle známým inhibitory pak *cystatiny* (5, 12, 21, 36, 42). V poslední době jsou intenzivně studovány další dvě skupiny cysteinových proteináz - *calpains* a *caspsy* s příslušnými inhibitory (4, 41).

Metalloproteinázy extracelulární matric (*MMPs*) a jejich tkáňové inhibitory (*TIMPs*) jsou v těchto letech intenzivně studovány zejména vzhledem k jejich účasti na progresi zhoubných nádorů a při degenerativních onemocnění pohybového aparátu (11, 25, 43). Do třídy zinek obsahujících proteolytických enzymů patří i botulotoxin A, B, a tetanický toxin (32).

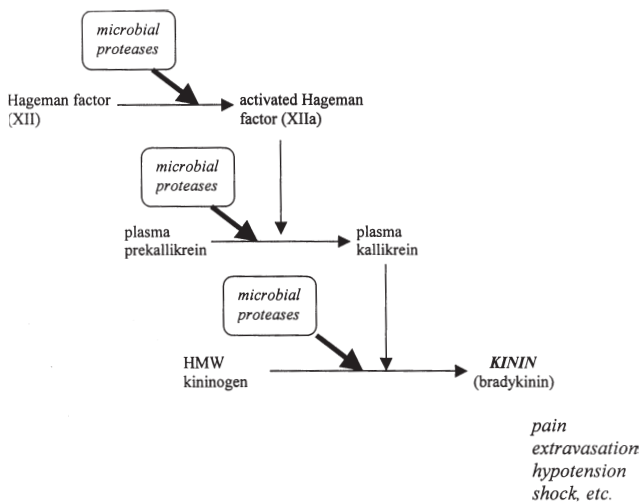


Fig. 2. Effects of microbial proteases in activating the bradykinin-generating cascade. After Maeda & Yamamoto (31).
Obr. 2. Aktivační účinky mikrobiálních proteáz na bradykininovou kaskádu. Podle Maedy a Yamamoty (31).

Mikrobiální proteinázy

Aspartylové proteinázy jsou jedinou skupinou, u které nebyly u vyšších organismů nalezeny žádné účinné proteinové inhibitory. To zvýhodňuje patogenní mikroorganismy vylučující tento typ enzymů (31, 32). Příkladem je medicínsky významný rod kvasinek *Candida*. Sekreční aspartylová proteináza (*SAP*) oportunních patogenů *Candida albicans*, *C. parapsilosis* a *C. tropicalis* je pokládána za význačný patogenetický faktor (15, 22, 37, 38). Produkci tohoto enzymu buňkami více než sta kultur *C. albicans* pocházejícími z kolekce referenčního mykologického pracoviště LF UK v Plzni jsme potvrdili i na našem pracovišti (28). Tato proteináza je schopna degradovat řadu strukturálních i sekrečních proteinů (keratin, kolagen, těžké řet. imunoglobulinů). Středem zájmu jsou v poslední době také proteinázy virového původu, např. maturační proteináza aspartylového typu *HIV* viru, která se stala jedním z významných zásahových míst při léčbě AIDS (44).

Na patologických projevech virulentních kmenů se podílejí i aktivace hostitelských proteázových zymogenů mikrobiálními proteázami. Zahrnují *aktivaci kininové kaskády*, koagulační kaskády a aktivaci komplementu. Endogenní nonapeptid *bradykinin* (kinin) vyvolává řadu typických zánětlivých projevů jako je bolest, edém, hypotenze, šok a j. (obr. 2).

Genetické defekty

Kato (27) nedávno shrnul *genetické poruchy* spojené s činností serinových a cysteinových proteináz, serpinů, ale i složitého ubiquitin-proteasomového systému. Na příklad pacienti s vrozeným defektem enterokinasy nemohou aktivovat své trávicí proteinázy a trpí proto pankreatickou exokrinní deficiencí. Nedostatek inhibitoru plasminogenového aktivátoru (PAI-1) vyúsťuje v deregulovanou fibrinolýzu, naopak abnormálně vysoká hladina PAI-1 bývá spojena s nadměrnou hemokoagulací. Defekt C1 inhibitoru je provázen angioneurotic-

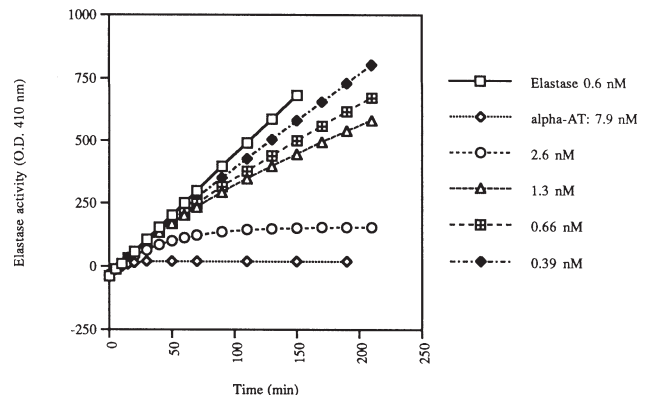


Fig. 3. Slow-binding kinetics of inhibition of porcine pancreatic elastase activity by human α 1-antitrypsin (AT). Release of p-nitroaniline from the chromogenic substrate (SAAANA) was monitored in 5–20 min intervals. When assayed without AT, the plot was linear, when assayed with specified concentrations of AT, slow-binding inhibition acc. to Morrison and Welsh (33) was observed. Two highest concentrations of AT (2.6 nM and 7.9 nM) resulted finally in a complete inhibition as shown by the horizontal steady-state lines. Methodology as in Sunderman et al. (40).
Obr. 3. Slow-binding kinetika inhibice vepřové pankreatické elastasy lidským α 1-antitrypsinem (AT). Bylo sledováno uvolňování p-nitroanilinu z chromogenního substrátu (SAAANA) v 5–20 min intervalech. V nepřítomnosti AT byla závislost lineární, v pokusech s danými koncentracemi AT byla pozorována slow-binding kinetika dle Morrisona a Welshe (33). Nejvyšší koncentrace AT (2,6 nM a 7,9 nM) způsobily posléze kompletní inhibici jak dokazují horizontální linie ustáleného stavu. Metodika jako uvádí Sunderman a spol. (40).

kým edémem (tab. 2). Mutace calpainového genu jsou sdruženy s muskulární dystrofií, genu pro kathepsin K s pyknodystosou, genu pro cystatin B s epileptogenním myoklonem. Postižení cytoplasmatického proteasomového systému je reprezentováno Angelmanovým syndromem (psychomotorická retardace), Liddleovým syndromem (pseudoadosteronismus) a viry indukovanou urychlenou degradací proteinu p53 (rakovina cervixu). Relativně častou a velmi dobře prostudovanou poruchou je *deficience α 1-antitrypsinu* (1-proteinázového inhibitoru). Studium její patogeneze značně napomohlo k poznání mechanismu účinku serpinových antiproteináz a budeme se jí proto zabývat poněkud podrobněji.

Interakce mezi serinovými proteinázami a serpiny

Kompatibilní dvojice proteináza-inhibitor se zpravidla vyskytují *in vivo* společně a jsou schopny vytvářet pevné komplexy v poměru 1:1, charakterizované extrémně nízkými inhibičními konstan-

Tab. 2. Inherited serpin-deficiency states.
Tab. 2. Vrozené serpinové deficiencie.

| Serpin | Target enzyme | Clinical manifestation |
|------------------------------------|-----------------------------|------------------------|
| α ₁ -antitrypsin | neutrophil elastase | emphysema |
| antithrombin III | thrombin, factor Xa | thrombosis |
| C1-inhibitor | C1, kallikrein, factor XIIa | angioedema |
| α ₂ -antiplasmin | plasmin | hemorrhage |
| PAI-1 | t-PA and urokinase | hemorrhage |

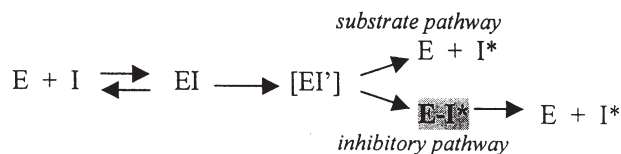


Fig. 4. Branched pathway mechanism of serpin action (E: proteinase, I: serpin, EI: Michaelis complex, [EI*] reaction intermediate, I*: reactive site cleaved serpin, E-I*: stable, effectively irreversible complex). After Gettings et al. (18).

Obr. 4. Větvený mechanismus účinku serpinů (E: proteinasa, I: serpin, EI: Michaelisův komplex, [EI*] reakční intermediát, I*: serpin rozštěpený v reakčním místě, E-I*: stabilní, efektivně irreverzibilní komplex). Podle Gettinge a spol. (18).

tami. Serpinové komplexy jsou stabilní i při teplotě varu a v přítomnosti tak účinných detergentů, jako je dodecylsulfát sodný. Jak vysvětlit skutečnost, že i v těchto podmínkách probíhá *in vivo* proteolýza? Uvedená problematika je dobře prostudována právě u dvojice leukocytární elastasy a α 1-antitrypsin. Deficience tohoto inhibitoru se typicky projevují jako časná rozedma plic z degradace plicní tkáně leukocytárními enzymy (2, 9, 10, 19, 26, 39). Zkušenosti se substituční terapií ukazují, že bezpečná koncentrace inhibitoru musí být o mnoho řádů vyšší, než by odpovídalo teoretickým předpokladům. Řada odpovědných faktorů již byla pojmenována. *In vivo* dochází předně k degradaci samotného antitrypsinu (jinými proteázami, reaktivními formami kyslíku). Leukocyty díky své přilnavosti mají schopnost vytvářet ohraničené prostory bez přístupu inhibitorů a výzkum mechanismu sekrece navíc ukázal, že okamžitá koncentrace po vyprázdnění azurofilních granul převyšuje lokálně předpokládané koncentrace inhibitorů (35). Inhibice samotná je dále znesnadněna vazbou elastasy na receptory a proteinové substráty. Toto jsou ovšem jevy dílem specifické, charakterizující uvedenou konkrétní situaci. Kromě toho však existují obecné argumenty, vycházející z *kinetiky inhibice*, v tomto případě z průběhu inhibice serinových proteináz serpinů.

Serpiny jsou řazeny do kategorie tzv. „pomalých inhibitorů“, u kterých se inhibiční komplex E-I* z pohotovité vytvářeného (v řádu milisekund) primárního Michaelisova komplexu organizuje podstatně pomaleji (za sekundy až minuty), bez ohledu na svou výslednou vysokou stabilitu (33). Tím získávají volné molekuly enzymu příležitost ještě před nástupem plné inhibice hydrolyzovat své substráty (obr. 3). Dále umožňuje dnes všeobecně přijímaný princip „větveného mechanismu“ (19) (obr. 4) únik enzymu substrátovou cestou končící rozštěpením inhibitoru bez vzniku komplexu, což je u silných inhibitorů méně významná alternativa, nebo uvolnění při eventuálním pozdějším rozpadu inhibičního komplexu. Tuto poslední možnost dobře ilustruje zymografická lokalizace enzymu (obr. 5), kdy po separaci komplexu v podmínkách SDS-PAGE a vymytí detergentu dochází v místě komplexu k digesci kopolymerizované želatiny. Zymografický průkaz proteolytické aktivity komplexu jsme již podali v souvislosti se studiem interakce chymotrypsinu s embryonálním serpinem *Xenopa*, jiné ukázky „pomalé inhibice“ mezi serpinem a serinovou proteinázou (29, 40).

Závěrem lze konstatovat, že podmínky „in vivo“ a reakční mechanismus inhibice umožňují i v přítomnosti velmi silných inhibitorů, jako jsou biologicky významné serpiny, místně a časově omezenou

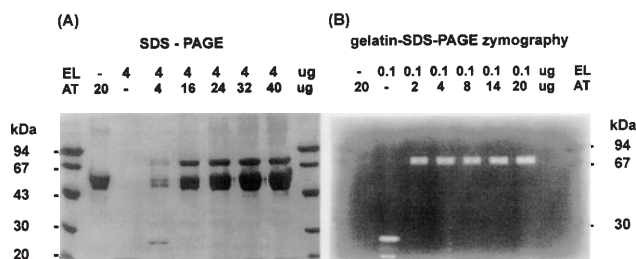


Fig. 5. SDS-PAGE fractionation of α 1-antitrypsin (AT)-elastase (EL) mixtures, demonstration of a serpin-serine proteinase complex and its proteolytic activity. Panel A: Variant proportions of porcine pancreatic elastase (Sigma) and human plasma α 1-antitrypsin were mixed in SDS-containing buffer and boiled prior to application on 10 % SDS-PAGE gels. Sample preparation, electrophoretic fractionation and staining as in Kotyza et al. (29). Lanes 1 and 9 contain molecular weight standards, lane 2 shows high concentrated AT. Uncomplexed elastase is seen in lane 4, enzyme in lane 3 is autolyzed. Intact and reaction loop-cleaved AT (around 45 kDa) is seen in lanes 4–8. Lanes 4–8 contain also AT-elastase complex (about 70 kDa). Panel B: Conditions as in A but lower concentrations of elastase were used and gelatin-containing gels were following fractionation washed to remove SDS, and subjected to 3 h incubation at 37 °C. Zymogram was stained with Coomassie blue to show the gelatinolytic action of elastase itself and elastase released from the EL-AT complex. The method is described in detail in Kotyza et al. (29). In lane 3, gelatinolytic activity of elastase and its autolysis products is seen, gelatinolytic bands corresponding to the localization of EL-AT complexes (about 70 kDa) are seen in lanes 4–8. Most of fractionated proteins, including molecular weight standards, were washed away during the wash and proteolytic procedure.

Obr. 5. Frakcionace směsi α 1-antitrypsinu (AT) a elastasy (EL) v podmínkách SDS-PAGE, demonstrace komplexu serpin-serinová proteináza a jeho proteolytické aktivity. Panel A: Vepřová pankreatická elastasa (Sigma) a lidský plasmatický α 1-antitrypsin (Sigma) byly v různých poměrech smíchány v SDS obsahujícím pufru a před nanášením na 10% SDS-PAGE gel 2 min povařeny. Příprava vzorku, frakcionace a barvení prováděny jako u Kotyzy a spol. (29). Dráhy 1 a 9 obsahují standardy molekul hmotnosti, dráha 2 nejvyšší užitou koncentraci AT. Volná elastasa je patrna na dráze 4 (25 kDa), enzym na dráze 3 je autolyzován. Intaktní a v reakční smyčce rozštěpený antitrypsin (43–45 kDa) jsou přítomny v drahách 4–8. Dráhy 4–8 obsahují také AT-EL komplex (asi 70 kDa). Panel B: Podmínky jako u A, pouze jsou užití nižší koncentrace elastasy. Želatinu obsahující gel je po frakcionaci promyt, aby bylo odstraněno SDS, a inkubován 3 h při 37 °C. Proteolytická aktivita volné elastasy a elastasy uvolněné z AT-EL komplexu se projevila po obarvení Coomassie modří. Užitá metoda je podrobně popsána v článku Kotyzy a spol. (29). V dráze 3 je patrna proteolytická aktivita elastasy a jejich autolytických produktů, v drahách 4–8 jsou výrazné želatinolytické pruhy v lokalizacích AT-EL komplexů (70 kDa). Větší část frakcionovaných proteinů včetně proteinových standardů byly z gelů vymyty během promývací a proteolytické fáze.

proteolýzu. Smyslem inhibice endogenními proteinovými inhibitory tedy není kompletní blokáda štěpení bílkovin, ale spíše jemné vyladění proteolytických dějů a znemožnění generalizované proteolýzy.

Literatura

1. Authier F., Posner B.I., Bergeron J.J.M.: Hepatic endosomes are a major physiological locus of insulin and glucagon degradation *in vivo*. In: Ciechanover A.J., Schwartz A.L. (Eds.): Cellular proteolytic systems. New York, Wiley-Liss, Inc, 1994.
2. Beaty K., Matheson M., Travis J.: Kinetic and chemical evidence for the inability of oxidized 1-proteinase inhibitor to protect lung elastin from elastolytic degradation. *Hoppe-Syler's Z Physiol Chem* 365: 731–736, 1984.

3. **Berman Y., Ageyeva L., Veksler B. et al.:** Dynorphin A processing enzyme: tissue distribution, isolation, and characterization, *J Biochem* 125: 641—647, 1999.
4. **Blomgren K., Hallin U., Andersson A.L. et al.:** Calpastatin is upregulated in response to hypoxia and is a suicide substrate to calpain after neonatal cerebral hypoxia-ischemia. *J Biol Chem* 274 (20): 14046—14062, 1999.
5. **Bode W., Engh R., Musil D. et al.:** The 2.0 Å X-ray structure of chicken egg white cystatin and its possible mode of interaction with cysteine proteinases. *EMBO J* 7: 2593—2599, 1988.
6. **Bode W., Huber R.:** Ligand binding: proteinase-protein inhibitor interaction. *Curr Opin Struct Biol* 1: 45—52, 1991.
7. **Bode W., Fernandez-Catalan C., Nagase H., Maskos A.:** Endoproteinase-protein inhibitor interactions. *APMIS* 107:3-10, 1999.
8. **Bonifacino J.S., Klausner R.D.:** Degradation of proteins retained in the endoplasmic reticulum. In: Ciechanover A.J., Schwartz A.L. (Eds.): *Cellular proteolytic systems*. New York, Wiley-Liss, Inc, 1994.
9. **Brantly M.L., Wittes J.T., Vogelmeier C.F. et al.:** Use of a highly purified α 1-antitrypsin standard to establish ranges for the common normal and deficient α 1-antitrypsin phenotypes. *Chest* 100: 703—708, 1991.
10. **Carrel R.W., Stein P.E.:** The biostructural pathology of the serpins: critical function of sheet opening mechanism. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 377: 1—17, 1996.
11. **Cawston T., Rowan D.:** Mechanisms of cartilage breakdown and repair. *ARC Reports on Rheum. Dis, Ser. 3, No. 15, ISSN 1351—4673*, 1998.
12. **Chan S.J., San Segundo B., McCormick M.B., Steiner D.F.:** Nucleotide and amino acid predicted sequences of cloned human and mouse preprocathepsin B cDNAs. *Proc. NAS USA* 83: 7721—7725, 1986.
13. **Ciechanover A.J.:** The ubiquitin-proteasome pathway: on protein death and cell life. *EMBO J* 24: 7151—7160, 1998.
14. **Ciechanover A.J., Schwartz A.L. (Eds.):** *Cellular proteolytic systems*. New York, Wiley-Liss, Inc, 1994.
15. **Cutler J.E.:** Putative virulence factors of *Candida albicans*. *Ann Rev Microbiol* 45: 187—218, 1991.
16. **Fuller R.S., Sterne R.E., Thorner J.:** Enzymes required for yeast prohormone processing. *Annu Rev Biochem* 50: 345—362, 1988.
17. **Fuller R.S., Brake A.J., Thorner J.:** Intracellular targeting and structural conservation of a prohormone-processing protease. *Science* 246: 482—486, 1989.
18. **Gettings P., Patston P.A., Schapira M.:** Structure and mechanism of action of serpins. *Hemat Oncol Clin North Amer* 6 (6): 1393—1408, 1992.
19. **Gettings P.G.W., Patston P.A., Olson S.T.:** *Serpins: structure, function and biology*. New York, Chapman&Hall 1996.
20. **Harding C.V.:** Protein catabolism and antigen processing. In: Ciechanover A.J., Schwartz A.L. (Eds.): *Cellular proteolytic systems*, New York, Wiley-Liss, Inc, 1994.
21. **Henskens Y.M.C., Veerman E.C.I., Amerongen A.V.N.:** Cystatins in health and disease. *Biol Chem Hoppe-Seyler* 377: 71—86, 1996.
22. **Hoegl L., Ollert M., Korting H.C.:** The role of *Candida albicans* secreted aspartic proteinase in the development of candidoses. *J Mol Med* 74 (3): 135—142, 1966.
23. **Hook V., Purviance R.T., Azaryan A.V. et al.:** Purification and characterization of alpha-1-antichymotrypsin-like protease inhibitor that regulates prohormone thiol protease involved in enkephalin precursor processing. *J Biol Chem* 268 (27): 20570—20577, 1993.
24. **Hook V.Y.H., Azaryan A.V., Hwang S.R., Tezapsidis N.:** Proteinases and the emerging role of protease inhibitors in prohormone processing. *FASEB J* 8: 1269—1278, 1994.
25. **Howard E.W., Bullen E.C., Banda M.J.:** Preferential inhibition of 72- and 92-kDa gelatinases by tissue inhibitor of metalloproteinases-2. *J Biol Chem* 266 (20): 13070—13075, 1991.
26. **Hutchinson D.C.S.:** Alpha-1-antitrypsin deficiency. Usage of alpha-1-proteinase inhibitor concentrate in replacement therapy. A symposium. *Amer J Med* 84: 3—12, 1988.
27. **Kato G.J.:** Human genetic disorders of proteolysis. *Human Mutation* 13: 87—98, 1999.
28. **Kotzyza J., Tomsikova A.:** Sekretorni proteaza patogennich kandid. *Epid. Microbiol. Imunologie* 44 (1): 33—35, 1995.
29. **Kotzyza J., Varghese A.H., Korza G., Sunderman F.W.:** Interaction of serine proteinases with pNiXa, a serpin of *Xenopus* oocytes and embryos. *Biochim Biophys Acta* 1382 (2): 266—276, 1998.
30. **Laskowski M., Kato I.:** Protein inhibitors of proteinases. *Annu Rev Biochem* 49: 593—626, 1980.
31. **Maeda H., Yamamoto T.:** Pathogenic mechanisms induced by microbial proteases in microbial infections. *Biol Chem Hoppe-Seyler* 377: 217—226, 1996.
32. **Maeda H.:** Role of microbial proteases in pathogenesis. *Microbiol Immunol* 40 (10): 685—699, 1996.
33. **Morrison J.F., Welsh C.T.:** The behavior and significance of slow-binding enzyme inhibitors. *Adv Enzymol* 61: 201—301, 1988.
34. **Neurath H.:** Evolution of proteolytic enzymes. *Science* 224: 350—357, 1984.
35. **Owen C.A., Campbell E.J.:** The cell biology of leukocyte-mediated proteolysis. *J Leukoc Biol* 65: 137—150, 1999.
36. **Rawlings N.D., Barret A.J.:** Families of cysteine peptidases. In: *Methods in Enzymol.* 244. Ed. by Barret A.J., Acad. Press, pp. 461—486, 1994.
37. **Rinaldi M.G.:** Biology and pathogenicity of *Candida* species. *Candidiasis: pathogenesis, diagnosis and treatment*. Ed. by Godey G.P. New York Raven Press Ltd., 1993.
38. **Sanglard D., Hube B., Monod M. et al.:** A triple deletion of the secreted aspartyl proteinase genes SAP4, SAP5, and SAP6 of *Candida albicans* causes attenuated virulence. *Inf Immun* 65 (9): 3539—3546, 1997.
39. **Silvermann E.K., Miletich J.P., Pierce J.A. et al.:** Alpha-1 antitrypsin deficiency: high prevalence in the St. Luis areadetermined by direct population screening. *Amer Rev Resp Dis* 140: 961—966, 1989.
40. **Sunderman F.W.Jr., Varghese A.H., Kroftova O.S., Grbac-Ivanovic S., Kotzyza J., Datta A.K., Davis M., Bal W., Kasprzak K.S.:** Characterization of pNiXa, a serpin of *Xenopus laevis* Oocytes and embryos, and its histidine-rich, Ni(II)-binding domain. *Molec Reprod Develop* 44: 507—524, 1996.
41. **Thornberry N.A., Lazebnik Y.:** Caspases: enemies within. *Science* 281 (5381): 1312—1319, 1998.
42. **Turk V., Bode W.:** Human cysteine proteinases and their inhibitors, stefins and cystatins. In: *Biological function of proteases and inhibitors*. Ed. Katunuma N., Suzuki K., Travis J., Fritz H. Japan Scientific Societies Press, Tokyo, pp 47—59, 1994.
43. **Woessner J.F.:** Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *FASEB J* 5: 2145—2154, 1991.
44. **Wlodawer A., Vondrasek J.:** Inhibitors of HIV-1 protease: a major success of structure-assisted drug design. *Ann Rev Biophys Biom* 27: 249—284, 1998.

Received November 2, 1999.

Accepted June 8, 2000.