

Lizosomalna karboksypeptydaza A

Marek Gacko^{1,✉}

Anna Worowska¹

Arkadiusz Woźniak¹

Monika Jedynak²

Bogusław Panek¹

Radosław Łapiński¹

¹Klinika Chirurgii Naczyń i Transplantacji i ²Klinika Anestezjologii i Intensywnej Terapii Akademii Medycznej w Białymstoku, Białystok

✉Klinika Chirurgii Naczyń i Transplantacji, Akademia Medyczna w Białymstoku, ul. M. Skłodowskiej-Curie 24a, 15-269 Białystok; e-mail: chirnacz@amb.edu.pl; tel. (85) 746 82 77

Artykuł otrzymano 23 września 2004
Artykuł zaakceptowano 4 stycznia 2005

Słowa kluczowe: lizosomalna karboksypeptydaza A, biosynteza, struktura chemiczna, mechanizm katalizy, rola biologiczna

STRESZCZENIE

Lizosomalna karboksypeptydaza A (katepsyna A) jest syntetyzowana w postaci preproenzymu, który w wyniku potranslacyjnej modyfikacji przechodzi w aktywny enzym. Odszczepia od peptydów i białek C-końcowe reszty aminokwasowe i współdziała z innymi proteazami w zachodzącej w lizosomach degradacji białek komórkowych. Działa także na hormony peptydowe i biologicznie czynne peptydy w tkankach i w płynach ustrojowych. Występuje w postaci kompleksów z niektórymi glikozydazami, co chroni je przed degradacją proteolityczną, a jej niedobór prowadzi do chorób spichrzeniowych. Lizosomalna karboksypeptydaza A jest enzymem wielofunkcyjnym, o ważnej roli regulacyjnej w metabolizmie ustrojowym.

WPROWADZENIE

W lizosomach degradowanych jest około 80% białek komórkowych i białek dostających się do komórki na drodze endocytozy [1]. W organellach tych występuje ponad 30 różnych peptydaz, z których większość nosi nazwę katepsyn [2]. Działają one w kwaśnym środowisku. Według lokalizacji rozszczepianego wiązania peptydowego katepsyny dzieli się na endopeptydazy i egzopeptydazy. Endopeptydazy rozszczepiają wiązania peptydowe zlokalizowane wewnątrz łańcucha polipeptydowego. Najbardziej aktywne są katepsyny B, D, E, F, H, I, J, K i L [3]. Produktem działania endopeptydaz na białka jest mieszanina peptydów, stanowiących substraty egzopeptydaz [4,5]. Egzopeptydazy rozszczepiają wiązania peptydowe znajdujące się na N- i C-końcach peptydów [6]. Amino-peptydazy rozszczepiają wiązania peptydowe za ostatnim (lizosomalne aminopeptydazy) lub przedostatnim (katepsyna C) aminokwasem N-końcowym. Karboksypeptydazy rozszczepiają wiązania peptydowe utworzone przez aminokwasy C-końcowe [7,8]. Jedynie katepsyna B i katepsyna H jest równocześnie endopeptydazą i egzopeptydazą [3,7]. Poszczególne aminopeptydazy i karboksypeptydazy różnią się między sobą specyficznością względem odszczepianych aminokwasów N- i C-końcowych i uzupełniają się dzięki temu w działaniu na peptydy. Końcowym produktem działania aminopeptydaz i karboksypeptydaz są tripeptydy. Tripeptydy są substratami tripeptydaz (aminotripeptydaz i karboksytripeptydaz) [9]. Powstające dipeptydy są rozkładane do aminokwasów, przez dipeptydazy lizosomalne i cytosolowe. Charakterystyka lizosomalnych karboksypeptydaz podana jest w tabeli 1. Miejsce katalityczne karboksypeptydaz lizosomalnych stanowi reszta serylowa lub cysteinyłowa, a ich inhibitorami są odpowiednio diizopropylfluorofosforan i jodoocetan. W lizosomach nie występują metalokarboksypeptydazy. Poszczególne karboksypeptydazy lizosomalne różnią się między sobą specyficznością względem odszczepianych C-końcowych aminokwasów. Warunkiem działania karboksypeptydaz na dipeptydy i tripeptydy jest zablokowanie N-końcowej grupy aminowej i wolna

Tabela 1. Charakterystyka lizosomalnych karboksypeptydaz, wg [27,95]

Karboksypeptydaza	Substrat	Miejsce katalityczne	Aktywator	Inhibitor	Optimum pH
Lizosomalna karboksypeptydaza A (EC 3.4.16.1)	Z-Phe-Ala	Ser	brak	diizopropylfluorofosforan, fluorek 4-aminofenylmetylsulfonylu	5,5
Lizosomalna karboksypeptydaza B (EC 3.4.18.1)	Z-Gly-Arg	Cys	ditiotreitrol	jodoocetan, leupeptyna	5
Lizosomalna karboksypeptydaza C (EC 3.4.16.2)*	Z-Pro-Phe	Ser	brak	diizopropylfluorofosforan	5

* - niewrażliwa na fluorek 4-aminofenylmetylsulfonylu

-1 -10 -20 1 10 20
MIRAAPPPLFLLLLLLLLLSVASRGEAAPDQDEIQRPLGLAKQPSFRQYSGYLK
 30 40 50 60 70 80
SSSGKHLHYWFVESQKDPENSPVWLWLNNGGPGCSSLDGLLTHEGPFVLPDGV
 90 100 110 120 130
TLEYNPYSWNLIANVLYLESPAGVGFSSYDDKFTATNDTEVAQSNFEALQDFFRL
 140 150 160 170 180 190
FPEYKNNKFLTGESYAGIYPTLAVLVMQDPSMNLQGLAVGNGLSSYEQNDNSL
 200 210 220 230 240
VYFAYYHGLLGNRLWSSLQTHCCSQNKCNFYDNKDLECVTNLQEVARIVGNSGL
 250 260 270 280 290
NIYNLYAPCAGGVPSHFRYEKDTVVVQDLGNIFTRLPLKRMWHQALLRSGDKVR
 300 310 320 330 340 350
MDPPCTNTTAASTYLNPNPYVRKALNIPEQLPQWQMCNFLVNLQYRRLYRSMNSQ
 360 370 380 390 400
YLKLLSSQKYQILLYNGDVMACNFMGDEWFVDSLQKMEVQRPPWLVKYGDS
 410 420 430 440 450
GEQIAGFVKEFSHIAFLTIKAGHVMPTDKPLAATTMTSRTLNLKQPY

Rysunek 1. Sekwencja aminokwasowa lizosomalnej preprokarboksypeptydazy A [88]. M1-A28 - prepeptyd sygnałowy; A1-R284 - podjednostka 32 kDa; M299-Y452 - podjednostka 20 kDa; Ser150, Arg372, His429 - triada katalityczna; N117, N305 - reszty N-glikozylowane; Q75-Y84, V400-G407 - sekwencje wiążące β-galaktozydazę.

grupa karboksylowa aminokwasu C-końcowego. Lizosomalna karboksypeptydaza A (EC 3.4.16.5) jest opisywana w literaturze także pod nazwą katepsyna A, katepsyna I, katepsynowa karboksydaza A, deamidaza i lizosomalne białko ochronne [10].

BIOSYNTeza

Gen kodujący lizosomalną karboksypeptydazę A występuje na fragmencie 20q 13.1 chromosomu 20 [11]. Zawiera on 15 eksonów i posiada 7,5 kb par zasad DNA. Lizosomalna karboksypeptydaza A jest syntetyzowana w postaci preproenzymu w rybosomach związanych z szorstką siateczką endoplazmatyczną [12-15]. W zbiornikach siateczki endoplazmatycznej następuje jego potranslacyjna modyfikacja. Przez proteazę sygnałową zostaje odszczepiony prepeptyd, tworzy się struktura przestrzenna, powstają mostki disiarczkowe, proenzym ulega glikozylacji, w wyniku której do dwóch grup amidowych reszt asparaginylowych zostają kowalencyjnie przyłączone łańcuchy oligosacharydowe. Od siateczki endoplazmatycznej odpączkowują pęcherzyki transportowe, które przenoszą proenzym lizosomalnej karboksypeptydazy A do aparatu Golgiego. Reszty mannozy oligosacharydu związanego z Asn305 ulegają fosforylacji do mannozo-6-fosforanu. To umożliwia łączenie się proenzymu z receptorem mannozo-6-fosforanu występującym w aparacie Golgiego. Odpączkowanie od aparatu Golgiego pęcherzyków prowadzi do utworzenia lizosomu pierwotnego. Kwaśne środowisko w lizosomie powoduje rozdysocjowanie połączenia proenzymu z receptorem, uwolniony receptor powraca do aparatu Golgiego, a od proenzymu odszczepiany jest peptyd aktywujący.

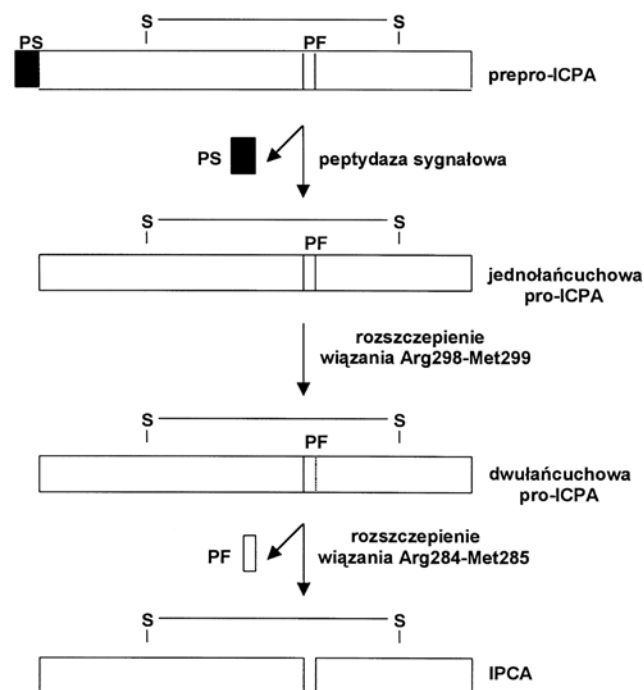
IZOLOWANIE I OCZYSZCZANIE

Lizosomalna karboksypeptydaza A występuje w lizosomach komórek budujących wszystkie tkanki i narządy ssaków oraz w lizosomach elementów morfotycznych krwi [16-18]. Największą aktywność tego enzymu obserwuje się w nerkach, wątrobie, płucach, śledzionie, mózgu, mięśniach szkieletowych i łożysku [19-24]. Występuje on także w fibro-

blastach, limfocytach, makrofagach i płytkach krwi [25-27]. Lizosomalną karboksypeptydazę A do niedawna izolowano i oczyszczano technikami stosowanymi powszechnie do rozdzielania mieszanin białkowych, uzyskując 500-1000-krotne oczyszczenie białka. Obecnie oczyszczone preparaty katepsyny A otrzymuje się stosując chromatografię powinowactwa na unieruchomionej na sefarozie konkanawalinie A, chromatografię hydrofobową z zastosowaniem fenylo-oktylo-sefarozy i Phe-Leu-agarozy oraz chromatografię jonowymienną z zastosowaniem kolumny wypełnionej dietyloaminoetylo-Sefacemem [28,29]. W celu wyizolowania kompleksu lizosomalnej karboksypeptydazy A z beta-galaktozydazą stosuje się chromatografię powinowactwa z zastosowaniem PATGAL-sefarozy, z którą kompleks wiąże się poprzez beta-galaktozydazę [30]. Kompleks ten można także wyizolować stosując chromatografię powinowactwa z zastosowaniem para-aminofenylo-tio-beta-galaktozyd-agarozy, w pH 4,5. Uzyskany kompleks rozdysocjuje się w pH 7,5 i rozdziela budujące go składniki przy użyciu filtracji żelowej z zastosowaniem kolumny Shim-pack Dial-300 [31]. Zastosowanie powyższych technik pozwoliło otrzymać lizosomalną karboksypeptydazę A oczyszczoną 3000-4000-krotnie. Lizosomalna karboksypeptydaza A jest stabilna w pH 5,0-6,0. Aktywność enzymu stabilizują aniony chlorkowe i sacharoza [19,32]. W pH powyżej 7,0 i w temperaturze 69°C lizosomalna karboksypeptydaza A ulega szybko zahamowaniu.

STRUKTURA

Preprolizosomalna karboksypeptydaza A o masie cząsteczkowej 58 kDa zbudowana jest z 480 reszt aminokwasowych i (Rys. 1). Sekwencja sygnałowa o masie cząsteczkowej 3,5 kDa zlokalizowana jest w N-końcowym fragmencie cząsteczki i zawiera 28 reszt aminokwasowych. Sekwencję tę odszczepia proteaza sygnałowa. Powstaje w wyniku tego



Rysunek 2. Aktywacja lizosomalnej prokarboksypeptydazy A (ICPA). PS - peptyd sygnałowy; PF - profragment, wg [88].

Tabela 2. Skład aminokwasowy lizosomalnej karboksypeptydazy A

Aminokwas*	Pre-lizosomalna karboksypeptydaza A	Pre-peptyd	Pro-lizosomalna karboksypeptydaza A	Pro-peptyd	Lizosomalna karboksypeptydaza A	Podjednostka 32kDa	Podjednostka 20kDa
Ala (A)	28	4	24	1	23	14	9
Arg (R)	19	2	17	2	15	8	7
Asn (N)	33		33		33	22	11
Cys (C)	9		9		9	6	3
Phe (F)	21	1	20		20	14	6
Gln (Q)	27		27	1	26	15	11
Gly (G)	32	1	31	1	30	23	7
His (H)	9		9	1	8	6	2
Ile (I)	13	1	12		12	7	5
Asp (D)	23		23	1	22	15	7
Glu (E)	20	1	19		19	14	5
Leu (L)	63	10	53	2	51	35	16
Lys (K)	21		21	1	20	11	9
Met (M)	12	1	11	1	20	2	8
Pro (P)	28	3	25		25	16	9
Ser (S)	36	2	34	1	33	24	9
Thr (T)	21		21		21	11	10
Trp (W)	9	1	8	1	7	4	3
Tyr (Y)	27		27		27	18	9
Val (V)	29	1	28	1	27	19	8
Suma amino- kwasów	480	28	452	14	438	284	154
Masa cząsteczkowa	62939,09	3561,31	59377,78	1931,22	57446,56	36888,5	20558,06

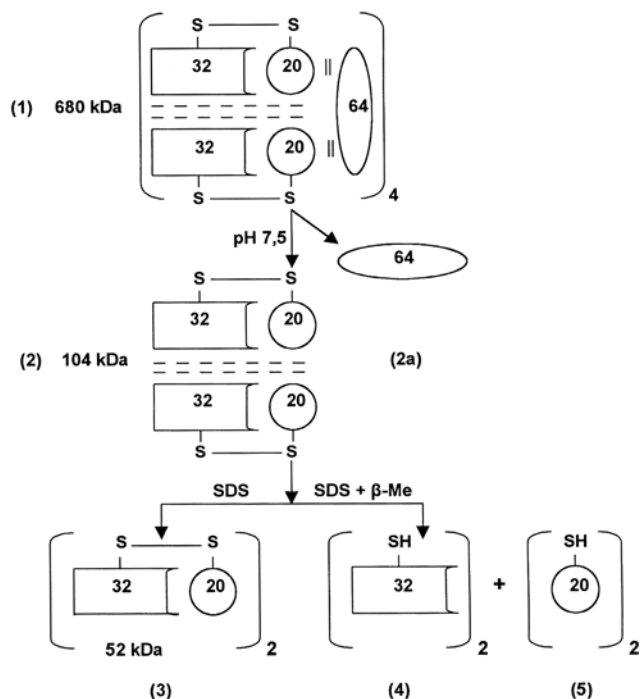
* - symbol trójliterowy (jednoliterowy)

proenzym lizosomalnej karboksypeptydazy A. o masie cząsteczkowej 54 kDa i zbudowany z 452 reszt aminokwasowych. Aktywacja proenzymu zachodzi w lizosomach i rozpoczyna się od rozszczepienia wiązania Arg298-Met299 przez proteazę trypsynopodobną. Następnie rozszczepiane jest wiązanie R284-Met285, co powoduje odszczepienie fragmentu złożonego z 14 reszt aminokwasowych (Met285-Arg298) o masie cząsteczkowej 2 kDa (Rys. 2). Aktywna forma lizosomalnej karboksypeptydazy A posiada masę cząsteczkową 52 kDa.

W wyniku odszczepienia peptydu aktywującego powstają dwie podjednostki, większa o masie cząsteczkowej 32 kDa (Ala1-Arg284) i mniejsza o masie cząsteczkowej 20 kDa (Met299-Tyr452) [33]. Skład aminokwasowy propre-lizosomalnej karboksypeptydazy A, form pośrednich i formy aktywnej podany jest w tabeli 2. Podjednostka o masie 32 kDa połączona jest z podjednostką o masie 20 kDa wiązaniem disiarczkowym. Miejsce katalityczne stanowi triada: Ser150, Asp372, His429 [14]. Lizosomalna karboksypeptydaza A zawiera 9 reszt cysteiny zajmujących pozycje: C60, C212, C213, C218, C228, C253, C303, C334 i C373. Osiem z nich tworzy 4 mostki disiarczkowe: C60-C375, C212-C228, C213-C218 i C303-C334. Mostek disiarczkowy C60-C375 łączy podjednostki [14]. Grupa sulfhydrylowa reszty cysteiny C253 jest wolna i ma istotne znaczenie dla zachowania aktywności enzymu. Dwie reszty Asn (Asn117, Asn305) znajdujące się w sekwencji Asn-Asp-Thr i Asn-Thr-Thr ulegają N-glikozylacji. Oligosacharyd związany z podjednostką 32 kDa zawiera mannozo-6-fosforan [12]. Rozmiary monomeru lizosomalnej karboksypeptydazy A wynoszą 60x50x70

Å [34]. Składa się on z dwóch domen, szczytowej i rdzeniowej. Domena szczytowa zawiera subdomenę utworzoną ze 121 reszt aminokwasowych uformowanych w 3 alfa-helisy i 3 beta-struktury [35]. Subdomena ta zawiera odszczepiany w czasie aktywacji czternastoaminokwasowy propeptyd Met285-Arg298. Domena rdzeniowa składa się z centralnie położonych 10 alfa-helisy i 10 beta-struktur oraz położonych bocznie 2 małych beta-struktur.

W środowisku kwaśnym lizosomów około 70% lizosomalnej karboksypeptydazy A występuje w postaci homodimeru o masie cząsteczkowej 98 kDa [30]. Pozostałe 30% lizosomalnej karboksypeptydazy A występuje w postaci dwuskładnikowego, aktywnego enzymatycznie połączenia kompleksowego z beta-galaktozydazą [36]. W cząsteczce lizosomalnej karboksypeptydazy A występują dwie sekwencje: Gln76-Tyr84 i Val400-Glu407 stanowiące powierzchnię kontaktową, wiążącą beta-galaktozydazę. Dimer lizosomalnej karboksypeptydazy A (104 kDa) łączy się z monomerem beta-galaktozydazy (64 kDa) tworząc heterotrimer o masie cząsteczkowej 168 kDa. Cztery cząsteczki heterotrimeru stanowią makrokompleks o masie cząsteczkowej 680 kDa [37]. Makrokompleks ten rozpada się w pH 7,5 na składowe: 8 cząsteczek lizosomalnej karboksypeptydazy A i 4 cząsteczki beta-galaktozydazy [37,38]. Sól sodowa siarczanu dodecyłu rozdysocjuje ten kompleks na monomery, a dodatek związku redukującego rozszczepia go na podjednostki, co można śledzić techniką elektroforezy w żelu poliakryloamidowym (Rys. 3). W pH 4,5 makrokompleks tworzy się ponownie. Około 1% lizosomalnej karboksypeptydazy A występuje w kompleksie z beta-galaktozydazą, N-acety-



Rysunek 3. Makrokompleks lizosomalnej prokarboksypeptydazy A (ICPA) z beta-galaktozydazą [8, 36, 37]. Kompleks lizosomalnej karboksypeptydazy A z beta-galaktozydazą (1) w pH 7,5 rozdysocjowuje na 2 homodimery lizosomalnej karboksypeptydazy A (2) i beta-galaktozydazę (2a); sól sodowa siarczuanu dodecyłu (SDS) rozdysocjowuje homodimer lizosomalnej karboksypeptydazy A na 2 monomery (3) i przez merkaptioetanol (β -Me) na podjednostkę 32 (4) i podjednostkę 20 (5). S-S - mostki disiarczkowe łączące podjednostki monomeru. = - wiązania hydrofobowe łączące monomery. Dalsze objaśnienia w tekście.

lo-alfa-neuramidazą i N-acetylogalaktozamino-6-siarczano sulfatazą, o masie cząsteczkowej około 1280 kDa [37].

SPECYFICZNOŚĆ

Lizosomalna karboksypeptydaza A odszczepia od peptydów kolejno większość aminokwasów C-końcowych do momentu powstania tripeptydu. Szybkość odszczepiania poszczególnych aminokwasów zależy od rozmiarów i właściwości fizykochemicznych ich rodnika oraz od konformacji cząsteczki. C-końcowe reszty Arg, Lys i Pro nie są odszczepiane przez ten enzym. Warunkiem działania lizosomalnej karboksypeptydazy A na dipeptydy i tripeptydy jest zablokowanie ich N-końcowej grupy aminowej i wolna grupa karboksylowa C-końcowego aminokwasu, ale ostatni warunek nie jest bezwzględnie konieczny [39]. Najszybciej hydrolizowane są substraty z aromatycznymi (Phe) i hydrofobowymi alifatycznymi (Ala) resztami aminokwasowymi w pozycji przedostatniej oraz aminokwasami aromatycznymi (Tyr) i hydrofobowymi alifatycznymi (Ala, Leu) w pozycji C-końcowej (Tabela 3). Potwierdzają to wyniki pomiarów kinetycznych (V_{max} , K_m) hydrolizy przez tą peptydazę N-blokowanych dipeptydów [40]. Specyficzność lizosomalnej karboksypeptydazy A uwarunkowana jest hydrofobowym charakterem miejsca wiążącego, które stanowi reszta Tyr247, Met430 i Asn305. Wiąże ono hydrofobową resztę aminokwasową znajdującą się w przedostatniej pozycji substratu. Aktywność esterolityczną lizosomalnej karboksypeptydazy A można wykazać przy użyciu estru etylowego karbobenzoksy-tyrozyny, a aktywność amidazową używając amidu benzoilo-fenylalaniny [21,41-43]. Lizosomalna karboksypeptydaza A nie hydrolizuje hemoglobiny,

Tabela 3. Dipeptydy z zablokowanym N-końcem i wolną grupą karboksylową na C-końcu jako substraty lizosomalnej karboksypeptydazy A, wg [22,28,31]

Substrat	Źródło lizosomalnej karboksypeptydazy A			
	wątroba szczura	wątroba wołu	wątroba kury	nerka świni
aktywność, %*				
Z-Glu-Tyr	100	100	100	100
Z-Phe-Leu	-	7143	12500	-
Z-Phe-Tyr	61	4936	11889	-
Z-Phe-Ala	-	2972	4400	1850
Z-Ala-Leu	-	1386	3038	-
Z-Phe-Phe	-	-	-	648
Z-Glu-Phe	-	-	136	475
Z-Phe-Pro	-	-	-	333
Z-Phe-Gly	271	50	50	-
Z-Leu-Gly	130	129	125	-
Z-Gly-Phe	64	100	138	70
Z-Ala-Glu	-	107	50	-
Z-Gly-Leu	64	57	57	50
Z-Gly-Met	46	-	-	-
Z-Gly-Ala	-	-	-	35
Z-Gly-Tyr	19	-	-	26
Z-Ile-Gly	-	21	25	-
Z-Gly-Gly	5	50	13	-
Z-Gly-Arg	5	-	-	-
Z-Gly-Pro	0,5	-	-	5,9
Z-Gly-Glu	0,5	-	-	-
Z-Pro-Gly	0	-	-	-

* - za 100% przyjęto aktywność oznaczoną przy użyciu Z-Glu-Tyr

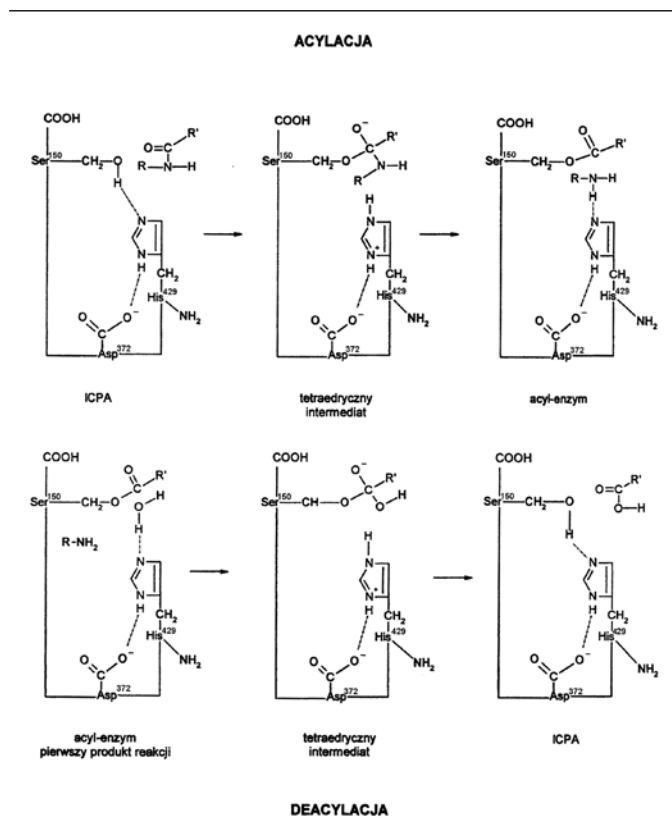
mioglobiny, gamma-globuliny, albuminy, cytochromu C i histonów [40,44,45]. Rozkłada jednak produkty degradacji tych białek powstające w wyniku działania katepsyny D i innych endopeptydaz [4,5,42,46,47].

MECHANIZM DZIAŁANIA

Triada katalityczna lizosomalnej karboksypeptydazy A złożona jest z reszt Ser150, Asp372 i His429. Reszty te są odległe sekwencyjnie, ale zbliżone przestrzennie [14]. Dominujące znaczenie w procesie rozszczepienia wiązania peptydowego ma reszta seryny. Hydroliza wiązania peptydowego katalizowana przez lizosomalną karboksypeptydazę A, podobnie jak w przypadku innych peptydaz serynowych, przebiega w dwóch etapach: acylacji i deacylacji [48]. Na etapie acylacji następuje atak tlenu grupy wodorotlenowej Ser150 na karbonyłowy atom węgla hydrolizowanego wiązania peptydowego (Rys. 4). Wiązanie między atomem węgla i tlenem w grupie karbonylowej przekształca się w wiązanie pojedyncze, a atom tlenu uzyskuje ładunek ujemny. Powstaje przejściowy tetraedryczny związek pośredni i następuje przeniesienie protonu z Ser150 na His429. Z His429 proton przenoszony jest z kolei na atom azotu hydrolizowanego wiązania peptydowego, które w wyniku tego zostaje rozerwane. Aminowa część substratu wiąże się wiązaniem wodorowym z His429, a kwasowa – wiązaniem estrowym z Ser150. Odłączenie pierwszego produktu reakcji (z wolną grupą aminową) kończy etap acylacji. Po oddysocjowaniu aminowej części substratu jego miejsce zajmuje cząsteczka wody. Reszta His429 odciąga proton od cząsteczki wody. Powstała zjonizowana His429 atakuje karbonyłowy atom węgla grupy acylowej, połączonej z Ser150. Podobnie jak to miało miejsce w procesie acylacji, powstaje przejściowy tetraedryczny związek pośredni. Po uwolnieniu drugiego produktu reakcji (z wolną grupą karboksylową) odtwarzany jest enzym, który uczestniczy w następnym cyklu katalizy.

INHIBITORY

Aktywność karboksypeptydazy A, jako peptydazy serynowej, hamuje diizopropylfluorofosforan i 3,4-dichloroizokumaryna [49]. Hamują ją także blokery grup sulfhydrylowych takie jak fluorek 4-aminofenylometylosulfonylu, kwas p-chlorortęcio-benzoowy, kwas marsalowy i kationy Hg^{2+} [40,41,50] oraz laktacystyna, chymostatyna, ebelakton B i antypaina [51,52]. Nie poznano dotychczas endogennych inhibitorów lizosomalnej karboksypeptydazy A. Wpływ różnych inhibitorów na aktywność peptydazową, esterazową i amidazową lizosomalnej karboksypeptydazy A podany jest w tabeli 4. Pepstatyna, leupeptyna i fosforoamidone nie hamują aktywności tej karboksypeptydazy [41,53].



Rysunek 4. Mechanizm działania lizosomalnej karboksypeptydazy A (ICPA), wg [48]. Objaśnienia w tekście.

ZNACZENIE W FIZJOLOGII I PATOLOGII

Lizosomalna karboksypeptydaza A jest białkiem wielofunkcyjnym. Wykazuje aktywność enzymatyczną: karboksypeptydazową w pH 5,0-5,5 oraz amidazową i esterazową w pH 7,0, a także pełni rolę ochronną względem niektórych glikozydaz [13,27,54-56]. Głównym zadaniem biologicznym

Tabela 4. Hamowanie aktywności peptydazowej (furyloakrylooil-Phe-Phe, pH 5,5), esterazowej (Z-Tyr-OEt, pH 7,0) i amidazowej (DLE- NH_2 , pH 7,0) lizosomalnej karboksypeptydazy A [21]

Inhibitor	nazwa	stężenie mmol/l	Hamowanie aktywności, %		
			peptydazowej	esterazowej	amidazowej
	Diizopropylfluorofosforan	1	100	100	100
	Z-Gly-Leu- Phe- CH_2Cl	0,1	100	90	100
	Chymostatyna	0,1	85	15	76
	Kwas p-chlorortęcio-fenylosulfonowy	1	75	98	94
	Chlorek rtęciowy	0,01	70	88	75
	Tos-Phe-chlorometyloketon	0,1	32	40	77
	Leupeptyna	0,1	26	36	25
	N-etylomaleimid	1	25	19	9
	Trans-epoksydulcynylo-L-Ieu-cyloamido-(3-metylo)butan	0,2	10	14	17
	Jodoacetamid	1	15	2	11
	Tos-Lys-chlorometylo-keton	0,1	2	11	0
	Octan kadmu	0,01	5	1	8
	Sól disodowa kwasu etylenodiaminotetraoctowego	0,1	12	0	0

lizosomalnej karboksypeptydazy A jest współdziałal w degradacji zużytych białek komórkowych, po ich fragmentacji przez endopeptydazy.

Lizosomalna karboksypeptydaza A uczestniczy także w ograniczonej proteolizie biologicznie czynnych peptydów, zwłaszcza działających na naczynia krwionośne i centralny układ nerwowy. W procesie tym funkcjonuje lizosomalna karboksypeptydaza A występująca w osoczu krwi i w płynach ustrojowych, do których uwalniana jest z płytek krwi i z limfocytów oraz z komórek różnych tkanek i narządów w wyniku egzocytozy ciałek resztkowych i rozpadu na skutek fizjologicznego zużycia. Uwolniona lizosomalna karboksypeptydaza A może wiązać się z błoną komórkową [13]. Biologicznie czynne peptydy degradowane przez lizosomalną karboksypeptydazę A wymienione są w tabeli 5 i tabeli 6. Ze znaczną szybkością peptydaza ta odszczepia C-końcową resztę tryptofanu od endoteliny I [57-59]. W wyniku odszczepienia C-końcowej reszty Leu i His konwertuje angiotensynę I do angiotensyny II [60-62] i inaktywuje angiotensynę II [63]. Odszczepia C-końcową resztę argininową od bradykininy [45]. Odszczepia także niewielkie ilości C-końcowej leucyny od Leu-enkefaliny-Phe-Leu. Ze znaczną szybkością odszczepia jednak C-końcową leucynę od Z-Phe-Leu. Wskazuje to, że podatność na hydrolizę fragmentu peptydu zależna jest od jego całkowitej struktury. Lizosomalna karboksypeptydaza A odszczepia C-końcową fenyloalaninę od Met-enkefaliny-Arg6-Phe7 [64-66]. Odszczepia też sekwencyjnie aminokwasy C-końcowe od formy amidowej i od formy kwasowej substancji P [67]. Lizosomalna karboksypeptydaza A uwalnia C-końcową ami-

dowaną glicynę (Gly-NH₂) od formy amidowej oksytocyny, a także resztę C-końcową glicyny od formy kwasowej tego peptydu. Bardzo wolno odłącza grupę aminową od formy amidowej wazopresyny, a forma kwasowa tego peptydu nie jest w ogóle wrażliwa na jej działanie. Lizosomalna karboksypeptydaza A odszczepia kolejno pięć C-końcowych aminokwasów od glukagonu [68] i C-końcową alaninę od łańcucha B insuliny [45,69]. Peptydaza ta uwalnia resztę fenyloalaniny od syntetycznego czynnika chemotaktycznego f-Met-Leu-Phe [70]. Skompleksowanie lizosomalnej karboksypeptydazy A z pro-beta-galaktozydazą umożliwia aktywację prekursora beta-galalitozydazy [71] i chroni ją przed degradacją i inaktywacją proteolityczną [55,56,72,73]. Dzieńdziczny niedobór lub mutacje punktowe sekwencji aminokwasowej lizosomalnej karboksypeptydazy A (Q21R, S23Y, W37R, S61L, V104M, L208P, Y221N, Y365C, M378T, G411S, F412V) uniemożliwiają powstawanie formy dimerycznej i kompleksów z glikozydazami [54,74-76]. Degradacja i inaktywacja beta-galaktozydazy i neuraminidazy powoduje wtórny niedobór tych enzymów, co prowadzi do nagromadzenia się galaktozaminoglikanów i sialoglikosacharydów i do choroby spichrzeniowej – galaktosialidozy [77-83]. Degradacji beta-galaktozydazy dokonują katepsyny cysteinowe. Inhibitor tych katepsyn – leupeptyna hamuje ten proces [84,85]. Obniżenie aktywności lizosomalnej karboksypeptydazy A obserwuje się w dystrofii mięśni [86,87] i w stwardnieniu rozsianym [26].

Tabela 5. Działanie lizosomalnej karboksypeptydazy A na biologicznie czynne peptydy, wg [28]

Peptyd	Sekwencja aminokwasowa	Aktywność %
Endotelina I	Cys-Ser-Cys-Ser-Ser-Leu-Met-Asp-Lys-Glu-Cys- Val-Tyr-Phe-Cys-His-Leu-Asp-Ile-Ile-Trp-OH	100
Angiotensyna I	Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu-OH	9,5
Bradykinina	Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg-OH	6,1
Leu-enkefalina	Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-OH	<0,5
Substancja P	Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-NH ₂	3,8
Substancja P (forma kwasowa)	Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-OH	21,6
Oksytocyna	Cys-Tyr-Ile-Gln-Asn-Cys-Pro-Leu-Gly-NH ₂	4
Oksytocyna (forma kwasowa)	Cys-Tyr-Ile-Gln-Asn-Cys-Pro-Leu-Gly-OH	10,4
Wazopresyna (forma zasadowa)	Cys-Tyr-Phe-Gln-Asn-Cys-Pro-Arg-Gly-NH ₂	<0,5
Wazopresyna (forma kwasowa)	Cys-Tyr-Phe-Gln-Asn-Cys-Pro-Arg-Gly-OH	0

▼ - rozszczepiane wiązanie; za 100% przyjęto aktywność względem endoteliny I; aktywność peptydazową oceniano w pH 5,5; aktywność amidazową oceniano w pH 7,0

Tabela 6. Działanie lizosomalnej karboksypeptydazy A na biologicznie czynne peptydy, wg [21]

Peptyd	Sekwencja aminokwasowa
Eledoizyna	pGlu-Pro-Ser-Lys-Asp-Ala-Phe-Ile-Gly-Leu-Met-NH ₂ ▼ ▼ ▼ Δ
Neurokinina A	His-Lys-Thr-Asp-Ser-Phe-Val-Gly-Leu-Met-NH ₂ ▼ Δ
D-Ala ² -Leu ⁵ -enkefalinamid	Tyr-D-Ala-Gly-Phe-Leu-NH ₂ ▼ Δ
D-Ala ² -Met ⁵ -enkefalinamid	Tyr-D-Ala-Gly-Phe-Met-NH ₂ ▼ Δ
Angiotensyna II	Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-OH*
Polipeptyd trzustkowy (31-36)	Leu-Thr-Arg-Pro-Arg-Tyr-NH ₂ *
Metorfinamid	Tyr-Gly-Gly-Phe-Met-Arg-Arg-Val-NH ₂ *
Met-enkefalina	Tyr-Gly-Gly-Phe-Met-OH*

Działanie w pH: ▼ - 5,5, Δ - 7,0; * - aktywność śladowa, lub brak aktywności.

OZNACZANIE STĘŻENIA I AKTYWNOŚCI

Ilościowego oznaczenia stężenia lizosomalnej karboksypeptydazy A w homogenatach tkankowych i w płynach ustrojowych dokonuje się przy użyciu specyficznych przeciwciał, techniką immunoenzymatyczną ELISA lub Western blot [33,88,89]. Przy użyciu przeciwciał można także dokonać lokalizacji komórkowej i tkankowej tej peptydazy metodą immunohistoenzymatyczną [89]. O ekspresji lizosomalnej karboksypeptydazy A wnioskuje się także na podstawie wyizolowania i oznaczenia ilościowego specyficznego mRNA [90]. Aktywność lizosomalnej karboksypeptydazy A oznacza się przy użyciu Z-Phe-Tyr, Z-Phe-Leu lub Z-Phe-Ala, w obecności 0,5 mol/l sacharozy i 0,1 mol/l KCl jako stabilizatora [22,91,92]. Ilość uwolnionego C-końcowego aminokwasu oznacza się metodą ninhydrynową [93]. Można także się posłużyć FA-Phe-Phe, śledząc rozkład tego substratu przez pomiar absorbancji przy 330 nm [92,94]. Aktywność esterazową lizosomalnej karboksypeptydazy A oznacza się przy użyciu Z-Glu-Tyr-OEe [39]. Enzymatyczna hydroliza wiązania estrowego powoduje uwalnianie grup karboksylowych, które miareczkuje się mianowanym roztworem NaOH wobec wskaźnika lub potencjometrycznie. Do oznaczenia aktywności amidazowej lizosomalnej karboksypeptydazy A używa się Z-Ser-Tyr-NH₂ [49]. Uwolniony amoniak oznacza się przy użyciu odczynnika Nesslera. Aktywność lizosomalnej karboksypeptydazy B oznacza się przy użyciu dipeptydów mających C-końcowe aminokwasy zasadowe: Z-Gly-Arg, Z-Gly-Lys, po aktywacji związkami sulfhydrylowymi [95]. Do oznaczenia aktywności lizosomalnej karboksypeptydazy C służą peptydy zawierające resztę proliłową w przedostatniej pozycji od C-końca, takie jak Z-Pro-Phe i Z-Pro-Val [6].

ZAKOŃCZENIE

Jak wynika z dokonanego przeglądu literatury biosynteza, potranslacyjne modyfikacje, transport i aktywacja lizosomalnej prokarboksypeptydazy A odbywa się według schematu dotyczącego także innych peptydaz lizosomal-

nych. W odróżnieniu od innych peptydaz lizosomalnych, lizosomalna karboksypeptydaza A jest peptydazą wielofunkcyjną. Współuczestnicząc w zachodzącej w lizosomach degradacji białek i peptydów pełni funkcje kataboliczne. Dokonując ograniczonej degradacji biologicznie czynnych peptydów w płynach ustrojowych i tkankach pełni funkcję regulatorową. Pełni także rolę ochronną tworząc międzycząsteczkowe kompleksy z glikozydazami, co czyni je niewrażliwymi na degradację i inaktywację proteolityczną. Struktura, specyficzność substratowa i mechanizm działania lizosomalnej karboksypeptydazy A tkanek zwierzęcych jest bardzo podobna do serynowych karboksypeptydaz niższych organizmów, takich jak karboksypeptydaza Y drożdży i karboksypeptydaza II ziarna pszenicy [13,96].

PIŚMIENNICTWO

- Seglen PO, Bohley P (1992) Autophagy and other vacuolar protein degradation mechanisms. *Experientia* 48: 158-172
- Pillay CS, Elliott E, Dennison C (2002) Endolysosomal proteolysis and its regulation. *Biochem J* 363: 417-430
- Bohley P, Seglen PO (1992) Proteases and proteolysis in the lysosome. *Experientia* 48: 151-157
- Goettlich-Riemann W, Young JO, Tappel AL (1971) Cathepsin D, A and B and the effect of pH in the pathway of protein hydrolysis. *Biochem Biophys Acta* 243: 137-146
- Iodice AA, Leong V, Weinstockl M (1966) Separation of cathepsins A and D of skeletal muscle. *Arch Biochem Biophys* 117: 477-486
- Mc Donald JK (1985) An overview of protease specificity and catalytic mechanisms: aspects related to nomenclature and classification. *Histochem J* 17: 773-785
- Lynn KR, Labow RS (1984) A comparison of four sulfhydryl cathepsins (B, C, H, and L) from porcine spleen. *Can J Biochem Cell Biol* 62: 1301-1308
- Skidgel RA, Erdös EG (1998) Cellular carboxypeptidases. *Immunol Rev* 161: 129-141
- Tomkinson B (1999) Tripeptidyl peptidase: enzymes that count. *TIBS* 24: 355-359
- Pshezhetsky AV (1998) Lysosomal carboxypeptidase A, W: Barret AJ Rawlings ND, Woessner JF (red) *Handbook of proteolytic enzymes* Academic Press, San Diego, str. 393-398
- Shimmoto M, Nakahori Y, Matsuhita I, Shinaka T, Kuroki Y, Itoh K, Sakuraba H (1996) A human protective protein gene partially overlaps the gene encoding phospholipid transfer protein on the complementary strand of DNA. *Biochem Biophys Res Commun* 220: 803-806

12. Morreau H, Galjart NJ, Willemsen R, Gillemans N, Zho XY, d'Azzo A (1992) Human lysosomal protective protein. Glycosylation, intracellular transport, and association with β -galactosidase in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 267: 17949-17956
13. Ostrowska H, Gacko M (1998) Cellular serine carboxypeptidases. *Rocz AMB* 43: 39-55
14. Rudenko G, Bonten E, d'Azzo A, Hol WGJ (1995) Three-dimensional structure of the human protective protein: structure of the precursor form suggests a complex activation mechanism. *Structure* 3: 1249-1259
15. Von Figura K, Hasilik A (1986) Lysosomal enzymes and their receptors. *Ann Rev Biochem* 55: 167-182
16. Gacko M, Głowiński S (1998) Activities of proteases in parietal thrombus of aortic aneurysm. *Clin Chim Acta* 271: 171-177
17. Gacko M, Worowska A, Głowiński S (1998) Activity of lysosomal carboxypeptidases in aneurysmal aortic wall. *Bull Pol Acad Sci* 46: 15-20
18. Hanna WL, Turbov JM, Jackman HL, Tan F, Froelich CJ (1994) Dominant chymotrypsin-like esterase activity in human lymphocyte granules is mediated by the serine carboxypeptidase called cathepsin A-like protective protein. *J Immunol* 153: 4663-4672
19. Bowen DM, Davison AN (1973) Cathepsin A in human brain and spleen. *Biochem J* 131: 417-419
20. Doi E, Kawamura Y, Matoba T, Hata T (1974) Cathepsin A of two different molecular sizes in pig kidney. *J Biochem* 75: 889-894
21. Jackman HL, Tan F, Tamei H, Beurling-Harburg C, Li XY, Skidgel RA, Erdős EG (1990) A peptidase in human platelets that deamidates tachykinins. *J Biol Chem* 265: 11265-11272
22. Kawamura Y, Matoba T, Hata T, Doi E (1974) Purification and some properties of cathepsin A of largemolecular size from pig kidney. *J Biochem* 76: 915-924
23. Kawamura Y, Matoba T, Hata T, Doi E (1975) Purification and some properties of cathepsin A of small molecular size from pig kidney. *J Biochem* 77: 729-737
24. Kawamura Y, Matoba T, Hata T, Doi E (1977) Substrate specificities of cathepsin A, L and A_S from pig kidney. *J Biochem* 81: 435-441
25. Beese J, Farr W, Grüner E, Haschen RJ (1966) Proteolytische enzyme in normalen menschlichen blutplättchen. *Klin Wsch* 44: 1049-1053
26. Bowen DM, Davison AN (1974) Macrophages and cathepsin A activity in multiple sclerosis brain. *J Neurol Sci* 21: 1974, 227-231
27. Ostrowska H, Krukowska K, Kalinowska J, Orłowska M, Lengiewicz J (2003) Lysosomal high molecular weight multienzyme complex. *Cell Molec Biol Lett* 8: 19-24
28. Hiraiwa M (1999) Cathepsin A / protective protein: on unusual lysosomal multifunctional protein. *Cell Mol Life Sci* 56: 894-907
29. Miller JJ, Changaris DG, Levy RS (1992) Purification subunit structure and inhibitory profile of cathepsin A. *J Chromatogr* 627: 153-162
30. Pshzhetsky AV, Potier M (1994) Direct affinity purification and supramolecular organization of human lysosomal cathepsin A. *Arch Biochem Biophys* 313: 64-70
31. Hiraiwa M, Saitoh M, Arai N, Shiraiishi T, Odani S, Uda Y (1997) Protective protein in the bovine lysosomal β -galactosidase complex. *Biochem Biophys Acta* 1341: 189-199
32. Doi E (1974) Stabilisation of pig kidney cathepsin A by sucrose and chloride ion, and inhibition of the enzyme activity by diisopropyl fluorophosphate and sulfhydryl reagents. *J Biochem* 75: 881-887
33. Bonten EJ, Galjart NJ, Willemsen R, Usmany M, Vlask JM, d'Azzo A (1995) Lysosomal protective protein cathepsin A: role of the 'linker' domain in catalytic activation. *J Biol Chem* 270: 26441-26445
34. Rudenko G, Bonten E, Hol WGJ, d'Azzo A (1998) The atomic model of the human protective protein cathepsin. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 621-625
35. Rudenko G, Bonten E, d'Azzo A, Hol WGJ (1996) Structure determination of the human protective protein: twofold averaging reveals the three-dimensional structure of a domain which was entirely absent in the initial model. *Acta Cryst D52*: 923-936
36. Randall A, Skidgel EG, Erdos EG (1998) Cellular carboxypeptidases. *Immunol Rev* 161: 129-141
37. Pshzhetsky AV, Elsliger MA, Vinogradova MV, Potier M (1995) Human lysosomal β -galactosidase-cathepsin A complex: definition of the β -galactosidase binding interface on cathepsin A. *Biochemistry* 34: 2431-2440
38. Pshzhetsky AV, Potier M (1993) Stoichiometry of the human lysosomal carboxypeptidase- β -galactosidase complex. *Biochem Biophys Res Commun* 195: 354-362
39. Logunov AI, Orekhovich VN (1972) Isolation and some properties of cathepsin A from bovine spleen. *Biochem Biophys Commun* 46: 1161-1168
40. Taylor SL, Tappel AL (1974) Characterization of rat liver lysosomal cathepsin A1. *Biochim Biophys Acta* 341: 112-119
41. Ioth K, Takiyama N, Kase R, Kondoh K, Sano A, Oshima A, Sakuraba H, Suzuki Y (1993) Purification and characterization of human lysosomal protective protein expressed in stably transformed Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem* 268: 1180-1186
42. Marks N, Grynbaum A, Benuck M (1976) On the sequential cleavage of myelin basic protein by cathepsin A and D. *J Neurochem* 27: 765-768
43. Matsuzaki H, Ueno H, Hayashi R, Liao TH (1998) Bovine spleen cathepsin A: characterization and comparison with the protective protein. *J Biochem* 123: 701-706
44. Logunov AI, Orekhovich VN (1972) Substrate specificity of cathepsin A and its behaviour toward inhibitors. *Biochemistry USSR (Engl Transl)* 37: 888-892
45. Matsuda K (1976) Studies on cathepsins of rat liver lysosomes. III. Hydrolysis of peptides and inactivation of angiotensin and bradykinin by cathepsin A. *J Biochem* 80: 659-669
46. Kussendragger KD, Jong Y, Bouma JMW, Gruber M (1972) The degradation of the β chain of oxidised insulin by extracts of rat liver lysosomes. *Biochem Biophys Acta* 279: 75-86
47. Shibko S, Tappel AL (1965) Rat-kidney lysosomes: isolation and properties. *Biochem J* 95: 731-741
48. Nduwimana J, Guenet L, Dorval I, Blayau M, LeGall JY, LeTreat A (1995) Proteases. *Ann Biol Clin* 53: 251-255
49. Chikuma T, Matsumoto K, Furukawa A, Nakayama N, Yajima R, Kato T, Ishii Y, Tanaka A (1996) A fluorometric assay for measuring deamidase (lysosomal protective protein) using high-performance liquid chromatography. *Anal Biochem* 233: 36-41
50. Tranchemontagne J, Michaud L, Potier M (1990) Deficient lysosomal carboxypeptidase activity in galactosialidosis. *Biochem Biophys Res Commun* 168: 22-29
51. Ostrowska H, Wójcik C, Omura K, Worowski K (1997) Lactacystin a specific inhibitor of the proteasome, inhibits human platelet lysosomal cathepsin A-like enzyme. *Biochem Biophys Res Commun* 234: 729-732
52. Suda H, Aoyagi T, Hamada M, Takeuchi T, Umezawa H (1972) Antipain, a new protease inhibitor isolated from actinomycetes. *J Antibiot* 25: 263-266
53. Matsuda K, Misaka E (1975) Studies on cathepsins of rat liver lysosomes. II. Comparative studies on multiple forms of cathepsin A. *J Biochem* 78: 31-39
54. Pshzhetsky AV, Ashmarina M (2001) Lysosomal multienzyme complex: biochemistry, genetics, and molecular pathophysiology. *Progr Nucl Acid Res Mol Biol* 69: 81-114
55. Van der Spoel A, Bonten E, d'Azzo A (1998) Transport of human lysosomal neuraminidase to mature lysosomes requires protective protein cathepsin A. *EMBO J* 17: 1588-1597
56. Verhijen F, Palmeri S, Hoogeveen AT, Galjaard H (1985) Human placental neuraminidase: activation, stabilization and association with β -galactosidase and its 'protective' protein. *J Biochem* 149: 315-321
57. Ioth K, Kase R, Shimmoto M, Satake H, Suzuki Y (1995) Protective protein as an endogenous endothelin degradation enzyme in human tissues. *J Biol Chem* 270: 515-518
58. Jackman HL, Morris PW, Deddish PA, Erdos EG (1992) Inactivation of endothelin I by deamidase (lysosomal protective protein). *J Biol Chem* 267: 2872-2875
59. Jackman HL, Morris PW, Rabito SF, Johansson GB, Skigel RA, Erdős EG (1993) Inactivation of endothelin-1 by an enzyme of the vascular endothelial cells. *Hypertension* 21: 925-928
60. Jackman HL, Massad MG, Sehosan M, Tan F, Brovkovich V, Marcie BM, Erdos EG (2002) Angiotensin 1-9 and 1-7 release in human heart- role of cathepsin A. *Hypertension* 39: 976-981
61. Miller JJ, Changaris DG, Levy RS (1988) Conversion of angiotensin I to angiotensin II by cathepsin A isoenzymes of porcine kidney. *Biochem Biophys Res Commun* 154: 1122-1129

62. Snyder RA, Watt KWK, Wintrub U (1985) A human platelet angiotensin I processing system. *J Biol Chem* 260: 7857-7860
63. Grynbaum A, Marks N (1976) Characterisation of a rat brain catheptic carboxypeptidase (cathepsin) inactivating angiotensin-II. *J Neurochem* 26: 313-318
64. Marks N, Sachs L, Stern F (1981) Conversion of Met-enkephalin-Arg6-Phe7 by a purified brain carboxypeptidase (cathepsin A). *Peptides* 2: 159-164
65. Rossier J, Audigier N, Ling N, Cros J, Udenfriend S (1995) Met-enkephalin-Arg6-Phe7. Presence in high amounts in brain of rat, cattle and man, is an opioid agonist. *Nature* 288: 88-90
66. Stern AS, Lewis RV, Kimura S, Rossier J, Gerber LD, Brink L (1979) Isolation of the opioid heptapeptide Met-enkephalin (Arg6, Phe7) from bovine adrenal medullary granules and striatum. *Proc Natl Acad Sci USA* 76: 6680-6683
67. Pernow B (1983) Substance P. *Pharmacol Rev* 35: 85-141
68. Iodice AA (1967) The carboxypeptidase nature of cathepsin A. *Arch Biochem Biophys* 121: 241-242
69. Bohley P (1987) Intracellular proteolysis. W: Neuberger K, Brocklehurst K (red) *Hydrolytic enzymes*. Elsevier, Sci. Publ. Amsterdam, str. 307-331
70. Jackman HL, Tan F, Schraufnagel D, Dragovic T, Dezzo B, Becker RP, Erdös EG (1995) Plasma membrane-bound and lysosomal peptidases in human alveolar macrophages. *Am J Resp Cell Mol Biol* 13: 196-204
71. Okamura-Oho Y, Zhand S, Hilson W, Hinek A, Callahan JW (1996) Early proteolytic cleavage with loss of a C-terminal fragment underlies altered processing of the β -galactosidase precursor in galactosialidosis. *Biochem J* 313: 787-794
72. Potier M, Michaud L, Tranchemontagne J, Thauvette L (1990) Structure of the lysosomal neuraminidase- β -galactosidase-carboxypeptidase multimeric complex. *Biochem J* 267: 197-202
73. Pshezhetsky AV, Potier M (1996) Association of N-acetyl-galactosamine-6-sulfate sulfatase with the multienzyme lysosomal complex of β -galactosidase, cathepsin A and neuraminidase: possible implication for intralysosomal catabolism of keratan sulfate. *J Biol Chem* 271: 28359-28365
74. Richard C, Tranchemontagne J, Elsliger MA, Mitchell GA, Potier M, Pshezhetsky AV (1998) Molecular pathology of galaktosialidosis in a patient affected with two new frameshift mutations in the cathepsin A protective protein gene. *Hum Mutation* 11: 461-469
75. Shimamoto M, Fukuhara Y, Itoh K, Oshima A, Sakuraba H, Suzuki Y (1993) Protective protein gene mutations in galactosialidosis. *J Clin Invest* 91: 2393-2398
76. Zhou XY, Galjart NJ, Willemsen R, Gillemans N, Galjaard H (1991) A mutation in a mild form of galactosialidosis impairs dimerization of the protective protein and renders it unstable. *EMBO J* 10: 4041-4048
77. D'Agrosa R, Hubbes M, Zhang S, Shankaran R, Callahan JW (1992) Characteristics of the β -galactosidase-carboxypeptidase complex in GMI-gangliosidosis and β -galactosialidosis fibroblasts. *Biochem J* 285: 833-838
78. d'Azzo A, Andria G, Strisciuglio P, Galjaard H (1995) Galactosialidosis. W: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (red) *Mc Graw-Hill*, New York, str. 2835-2837
79. d'Azzo A, Hoogeveen AT, Reuser JJ, Robinson H, Galjaard H (1982) Molecular defect in combined β -galactosidase and neuraminidase deficiency in man. *Proc Natl Acad Sci USA* 79: 4535-4539
80. Kase R, Itoh K, Takiyama N, Oshima A, Sakuraba H, Suzuki Y (1990) Galactosialidosis: simultaneous deficiency of esterase, carboxy-terminal deamidase and acid carboxypeptidase activities. *Biochem Biophys Res Commun* 172: 1175-1179
81. Neufeld EF (1991) Lysosomal storage diseases. *Am Rev Biochem* 60: 257-280
82. Schiffmann R, Brady RO (2002) New prospects for the treatment of lysosomal storage diseases. *Drugs* 62: 733-742
83. Zhou XY, van der Spoel A, Rottier R, Hale G., Willemsen R, Berry GT (1996) Molecular and biochemical-analysis of protective protein cathepsin A mutations: correlation with clinical severity in galactosialidosis. *Hum Mol Genet* 5: 1977-1987
84. Hoogeveen AT, Verheijen FW, Galjaard H (1983) The relation between human lysosomal β -galactosidase and its protective protein *J Biol Chem* 258: 12143-12146
85. Suzuki Y, Sakuraba H, Hayashi K, Suzuki K, Imahori K (1981) β -Galactosidase-neuraminidase deficiency: restoration of β -galactosidase activity by protease inhibitors. *J Biochem* 90: 271-273
86. Iodice AA, Weinstockl M (1965) Cathepsin A in nutritional and hereditary muscular dystrophy. *Nature* 207: 1102
87. Kar NC, Pearson CM (1976) Arylamidase and cathepsin A activity of normal and dystrophic human muscle. *Proc Soc Exp Biol Med* 151: 583-586
88. Galjart NJ, Gillemans N, Harris A, Gijbertus T, van der Horst J, Verheijen FW, Galjaard H, d'Azzo A (1988) Expression of cDNA encoding the human 'protective protein' associated with lysosomal β -galactosidase and neuraminidase: homology to yeast proteases. *Cell* 54: 755-764
89. Satake A, Itoh K, Shimamoto M, Saido TC, Sakuraba H, Suzuki Y (1994) Distribution of lysosomal protective protein in human tissues. *Biochem Biophys Res Commun* 205: 38-43
90. Galjart NJ, Gillemans N, Meijer D, d'Azzo A (1990) Mouse 'protective protein' cDNA cloning, sequence comparison and expression. *J Biol Chem* 265: 4678-4684
91. Kawamura Y, Matoba T, Doi E (1980) Subunit structure of pig kidney cathepsin A. *J Biochem* 88: 1559-1561
92. Pshezhetsky AV, Vinogradova MV, Elsliger MA, El-Zein F, Svedas VK, Potier M (1995) Continuous spectrophotometric assay of human lysosomal cathepsin A/protective protein in normal and galactosialidosis cells. *Anal Biochem* 230: 303-307
93. Morre S (1968) Amino acid analysis: aqueous dimethyl sulfoxide as solvent for ninhydrin reaction. *J Biol Chem* 243: 6281-6283
94. Pshezhetsky AV, Levashov AV, Wiederschain GY (1992) Regulation of the Gm-galactosidase supramolecular structure and catalytic activity in vitro. *Biochem Biophys Acta* 1122: 154-160
95. Lones M, Chatterjee R, Sing H, Kalnitsky G (1983) Lysosomal carboxypeptidase B from rabbit lung. Purification and characterization. *Arch Biochem Biophys* 221: 64-78
96. Elsliger MA, Pshezhetsky AV, Vinogradova MV, Svedas VK, Potier M (1996) Comparative modeling of substrate binding in the S'1 subsite of serine carboxypeptidases from yeast, wheat and human. *Biochemistry* 35: 14899-14909

Lysosomal carboxypeptidase A

Marek Gacko^{1,✉}, Anna Worowska¹, Arkadiusz Woźniak¹, Monika Jedynak², Bogusław Panek¹, Radosław Łapiński¹

¹Department of Vascular Surgery and Transplantation, ²Department of Anesthesiology and Intensive Care, Medical University of Białystok, 24a M. Skłodowska-Curie St., 15-269 Białystok, Poland

✉e-mail: chirmacz@amb.edu.pl;

Key words: Lysosomal carboxypeptidase A, biosynthesis, structure, mechanism of catalysis, biological role

ABSTRACT

Lysosomal carboxypeptidase A (cathepsin A) is synthesized in the form of proenzyme, which undergoes to active enzyme as a result of post-translational modification. It splits off C-terminal amino acid residues from peptides and proteins and synergizes with other proteases in degradation of cellular proteins in lysosomes. Lysosomal carboxypeptidase A has an effect on peptide hormones and peptides of biological activity of tissues and body fluids as well. It forms complexes with some glycosidases that protects them against proteolytic degradation. Deficiency of this enzyme induces storage diseases. Lysosomal carboxypeptidase A as multifunctional enzyme plays an important regulatory role in organismal metabolism.