

**Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta  
Katedra biochemie**

Doktorský studijní program: Biochemie

Autoreferát disertační práce



Regulace aktivity aspartátových a serinových proteas pomocí  
selektivních přirozených

**Mgr. Jaroslav Srp**

Školitel: RNDr. Michael Mareš, CSc.

Praha, 2018

# Obsah

Seznam zkratk	1
Abstrakt	2
<b>1. Úvod</b>	<b>3</b>
1.1. Aspartátové proteasy rodiny pepsinu a serinové proteasy rodiny chymotrypsinu.....	3
1.2. Přirozené proteinové inhibitory proteas.....	3
<b>2. Cíle práce.....</b>	<b>4</b>
<b>3. Metody</b>	<b>5</b>
3.1. Materiál a laboratorní vybavení	
3.2. Metody molekulární biologie	
3.3. Biochemické metody	
3.4. Enzymologické metody	
3.5. Krystalografické metody	
<b>4. Výsledky a diskuze</b>	<b>6</b>
<b>4.1. Publikace č. 1: Digestive proteolysis in the Colorado potato beetle, <i>Leptinotarsa decemlineata</i>: Activity-based profiling and imaging of a multipeptidase network</b> .....	<b>6</b>
<b>4.2. Nepublikované výsledky</b> .....	<b>6</b>
<b>4.3. Publikace č. 2: Complex modulation of peptidolytic activity of cathepsin D by sphingolipids</b> .....	<b>7</b>
<b>4.4. Publikace č. 3: Single- and double-headed chemical probes for detection of active cathepsin D in a cancer cell proteome</b> .....	<b>7</b>
<b>4.5. Publikace č. 4: Profiling system for skin kallikrein proteolysis applied in gene deficient mouse models</b> .....	<b>8</b>
<b>4.6. Publikace č. 5: Crystal structures of the complex of kallikrein inhibitor BbKI with trypsin and modeling of kallikrein complexes</b> .....	<b>8</b>
<b>4.7. Publikace č. 6: Plant Kunitz Protease Inhibitors: Structural and Functional Diversity...</b>	<b>8</b>
<b>5. Závěry</b>	<b>8</b>
<b>6. Použitá literatura</b> .....	<b>11</b>
<b>Curriculum vitae</b>	<b>12</b>
<b>Seznam publikací</b> .....	<b>15</b>

## Seznam zkratk

ABP	aktivní sondy („Activity Based Probe“)
BbKI	inhibitor kalikreinových serinových proteas z bauhinie ( <i>Bauhinia bauhinioides</i> )
BPTI	inhibitor serinové proteasy trypsinu z hovězí sleziny („Bovine Pankreas Trypsin Inhibitor“)
FPLC	„Fast Protein Liquid Chromatography“
FRET	„Fluorescence Resonance Energy Transfer“
HPLC	„High Performance Liquid Chromatography“
IA3	inhibitor aspartátové proteasy proteinasy A z kvasinky ( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> )
IC <sub>50</sub>	koncentrace inhibitoru potřebná k dosažení 50% inhibice enzymu
IrCD1	katapsin D z klíštěte obecného ( <i>Ixodes ricinus</i> )
k <sub>cat</sub>	číslo přeměny
K <sub>i</sub>	inhibiční konstanta
KLK	serinová proteasa kallikrein
K <sub>M</sub>	Michaelisova konstanta
LdCD	katapsin D z mandelinky bramborové ( <i>Leptinotarsa decemlineata</i> )
PCDI	inhibitor katapsinu D z brambor („Potato Cathepsin D Inhibitor“)
PI3	inhibitor aspartátové proteasy pepsinu ze škrkavky ( <i>Ascaris suum</i> )
PSPI	inhibitor serinových proteas z brambor („Potato Serine Protease Inhibitor“)
PVDF	polyvinylidifluorid
SDS-PAGE	elektroforéza na polyakrylamidovém gelu v přítomnosti SDS
STI	sójový inhibitor serinové proteasy trypsinu („Soybean Trypsin Inhibitor“)

## Abstrakt

Proteasy se účastní řady významných fyziologických procesů a jejich nedostatečná kontrola je spojena s řadou patologií. Přirozené inhibitory představují účinný nástroj pro regulaci jejich aktivity. Disertační práce se zaměřuje na živočišné a rostlinné inhibitory aspartátových a serinových proteas a přináší identifikaci, biochemickou charakterizaci a strukturní popis jejich mechanismu inhibice.

Rostlinné inhibitory z Kunitzovy rodiny jsou produkovány jako obranné proteiny s unikátní schopností blokovat široké spektrum proteas. V této práci byl s využitím metod funkční proteomiky popsán trávicí proteolytický systém mandelinky bramborové, herbivorního škůdce lilkových rostlin. Byl podán přímý důkaz, že trávicí aspartátové a serinové proteasy tohoto herbivora jsou efektivně blokovány pomocí dvou Kunitzových inhibitorů (nazývaných PCDI a PSPI), které jsou produkovány v lilku brambor. Pomocí strukturní analýzy byly na molekulách PCDI a PSPI identifikovány nové typy reaktivních center pro inhibici aspartátových proteas typu katepsinu D a serinových proteas typu trypsinu a chymotrypsinu. Popis reaktivního centra na PCDI inhibitoru společně s krystalovou strukturou trávicí proteasy typu katepsinu D mandelinky bramborové umožnilo vysvětlit mechanismus jejich vzájemné interakce.

Pro lidský katepsin D byly identifikovány sfingolipidy jako první specifické endogenní inhibitory. Tyto bioaktivní molekuly jsou známé svou protinádorovou aktivitou a lze předpokládat, že jedním z mechanismů jejich působení je regulace katepsinu D, který se tvorby nádorů účastní. Dále byla na bázi peptidomimetického inhibitoru aktivního místa vyvinuta proteomická sonda pro detekci katepsinu D jako prognostického nádorového markeru.

Pro serinové proteasy typu kalikreinů byl identifikován dosud nejúčinnější přirozený rostlinný inhibitor BbKI z Kunitzovy rodiny, který je selektivní pro nádorový marker kalikrein 4. Jejich interakce byla popsána pomocí strukturního modelu. Pro epidermální kalikreiny byl sestaven proteomický detekční systém selektivních substrátů a inhibitorů pro monitorování aktivit, který byl testován na geneticky modifikovaných myších.

Disertační práce přináší významné informace o specifitě a mechanismech inhibice aspartátových a serinových proteas, které lze využít pro racionální vývoj nových inhibičních molekul s uplatněním v biomedicíně a zemědělských biotechnologiích.

# 1. Úvod

Zástupci aspartátových a serinových proteas jsou zapojeny do významných fyziologických dějů a jejich nedostatečná regulace vede k řadě patologií. Kontrola jejich aktivity probíhá na více úrovních a jednou z nich je působení specifických přirozených inhibitorů. Tato disertační práce se zaměřila na biochemickou a strukturní analýzu mechanismu inhibice aspartátových a serinových proteas, kterou lze využít při racionálním navrhování chemoterapeutik a molekulárních proteomických nástrojů.

## 1.1. Aspartátové proteasy rodiny pepsinu a serinové proteasy rodiny chymotrypsinu

Modelovým zástupcem aspartátových proteas rodiny A1 je pepsin, u serinových proteas rodiny S1 to jsou chymotrypsin a trypsin. Obě rodiny obsahují medicíně významné proteasy, jako jsou katepsin D a kalikreiny, které jsou spojovány s nádorovými onemocněními (Beneš, Větvíčka, a Fusek 2008; Kryza et al. 2016), trombin, který je cílový enzymem pro regulaci krevní koagulace (Huntington 2014), nebo  $\beta$  sekretasa, která se podílí na vzniku Alzheimerovy choroby (Barao et al. 2016). Aspartátové a serinové proteasy jsou slibné cíle pro léčbu parazitárních onemocnění, protože jejich zástupci zprostředkovávají interakci parazita s hostitelem nebo se podílejí na trávicí proteolýze parazitů (Sojka et al. 2016; Dvořák a Horn 2018). Hmyzí herbivorní škůdci také využívají proteolytických enzymů z obou rodin pro trávení, a proti nim produkují rostliny obranné proteasové inhibitory, jež je možné využít pro přípravu odolných transgenních plodin (Terra a Ferreira 2012). Proteasy pepsinové a chymotrypsinové rodiny vykazují endopeptidasovou aktivitu v poměrně úzkém rozmezí pH a vyhraněnou inhibiční specifitu. Jako modelové inhibitory lze uvést pepstatin, který se váže do aktivního místa aspartátových proteas jako analog transitního stavu substrátu; serinové proteasy jsou blokovány syntetickým inhibitorem Pefabloc, bakteriálním leupeptinem nebo proteinovými inhibitory BPTI a STI. Prostorová struktura proteas z obou rodin je tvořena dvěma doménami, mezi kterými se nachází aktivní místo s katalytickými zbytky (diádou zbytků Asp u aspartátových proteas a triádou zbytků His, Asp a Ser u serinových proteas; Rawlings a Salvesen 2013). Aspartátové proteasy preferují štěpení mezi dvěma hydrofobními aminokyselinovými zbytky (Sun et al. 2013), zatímco serinové proteasy mají vyhraněnou substrátovou specifitu určenou  $P_1$  zbytkem (bazické aminokyseliny pro trypsinový typ a velké hydrofobní pro chymotrypsinový typ).

## 1.2. Přirozené proteinové inhibitory proteas

Proteasové inhibitory se uplatňují v řadě fyziologických i patologických dějů. Regulují endogenní proteolytické procesy nebo slouží jako obranné molekuly proti patogenům a parazitům. Inhibitory proteinového charakteru lze dělit: (1) na základě sekvenční a strukturní homologie do 80 rodin (Rawlings a Barrett 2010) a (2) podle mechanismu interakce s proteasami na reverzibilní a ireverzibilní inhibitory (Law et al. 2006; Krowarsch et al. 2003). Proteinové inhibitory aspartátových proteas jsou vzácné, doposud jich bylo popsáno pouze šest, z nichž jen dva byly strukturně

charakterizovány s navázanou proteasou - kvasinkový inhibitor IA3 (Li et al. 2000) a inhibitor PI3 z hlístice (Ng et al. 2000). Naopak proteinové inhibitory serinových proteas tvoří největší a nejrozmanitější skupinu proteasových inhibitorů. V této disertační práci jsou studovány rostlinné proteasové inhibitory z Kunitzovy rodiny, které mají zcela unikátní vlastnosti, neboť jsou schopné blokovat aktivitu serinových, cysteinových i aspartátových proteas (Bendre, Ramasamy, a Suresh 2018). Mechanismus interakce Kunitzových inhibitorů byl popsán pouze pro serinové proteasy, kdy reaktivní centrum je tvořeno jedinou povrchovou smyčkou inhibitoru, jejíž mechanismus interakce se označuje jako kanonický nebo Laskowského mechanismus (Krowarsch et al. 2003).

## **2. Cíle práce**

Práce má tyto dílčí cíle:

- 1) Biochemicky charakterizovat trávicí proteolytický systém mandelinky bramborové, herbivorního škůdce lilkovitých rostlin, s důrazem na interakci tohoto systému s přirozenými inhibitory z Kunitzovy rodiny z lilku brambor.
- 2) S využitím proteinové krystalografie analyzovat interakci mezi inhibitory z Kunitzovy rodiny a jejich cílovými enzymy z třídy serinových a aspartátových proteas se zaměřením na identifikaci nových reaktivních center inhibitorů.
- 3) Identifikovat přirozené mechanismy inhibiční regulace lidského katepsinu D pomocí sfingolipidů. Připravit a testovat aktivní sondy pro detekci katepsinu D jako prognostického nádorového markeru.
- 4) Analyzovat substrátovou a inhibiční specifitu epidermálních kalikreinů. Určit inhibiční specifitu kalikreinového inhibitoru z Kunitzovy rodiny se serinovými proteasami a vysvětlit jejich interakci na strukturní úrovni.

## 3. Metody

### 3.1. Materiál a laboratorní vybavení

Většina výsledků předkládané disertační práce byla získána v laboratořích Ústavu organické chemie a biochemie AV ČR (ÚOCHB AV ČR). Syntetické peptidové substráty, inhibitory a aktivní sondy pro detekci proteolytických aktivit byly připraveny ve skupině Medicinální chemie na ÚOCHB AV ČR nebo získány od firmy Bachem a Sigma-Aldrich. Enzymy trypsin a chymotrypsin byly od firmy Sigma-Aldrich, kalikreiny od firmy R&D Systems a lidský katepsin D byl izolován z placent (Máša et al. 2006). Sady komerčních krystalizačních roztoků byly od firem Molecular Dimensions, Jena Bioscience a Hampton Research. Difrakční data pro rentgenostrukturní analýzu byla získána na synchrotronu Bessy II electron storage ring (Helmholtz-Zentrum Berlin, Německo) a krystalové struktury byly řešeny ve spolupracující laboratoři Strukturní biologie na ÚOCHB AV ČR.

### 3.2. Metody molekulární biologie:

LdCD byl klonován do expresního plasmidu pGAPZ $\alpha$  a rekombinantně připraven v kvasinkovém expresním systému, IrCD1 byl připraven jako rekombinantní protein v bakteriálním systému.

### 3.3. Biochemické metody:

(1) Separace proteinů pomocí SDS-PAGE, (2) přenos proteinů na PVDF membránu metodou Western blot, (3) značení proteas pomocí proteomických aktivních sond, (4) purifikace proteinů pomocí chromatografických metod na FPLC, (5) separace peptidů pomocí HPLC, (6) analýza sekvence proteinů pomocí hmotové spektrometrie a Edmanova odbourávání, (7) určení koncentrace proteinů a peptidů pomocí aminokyselinové analýzy.

### 3.4. Enzymologické metody:

(1) Měření enzymových aktivit pomocí fluorogenních, chromogenních a FRET substrátů na čtečce mikrotitračních destiček, (2) stanovení kinetických parametrů ( $k_{cat}$ ,  $K_m$ ) a inhibičních konstant ( $IC_{50}$ ,  $K_i$ ), (3) určení disociační konstanty  $K_D$  pomocí termoforetického měření.

### 3.5. Krystalografické metody:

Pět komplexů proteasa-inhibitor bylo připraveno a přečištěno pomocí gelové chromatografie a následně byly krystalizovány metodou sedící a visící kapky. Difrakční data byla získána na synchrotronu BESSY II v Berlíně a zpracována ve spolupráci s laboratoří Strukturní biologie ÚOCHB AV ČR. Pro molekulární grafiku byl použit program PyMol.

## 4. Výsledky a diskuze

Výsledky disertační práce jsou shrnuty v celkem pěti publikacích a v jednom rukopisu, který je v současné době v recenzním řízení v oborovém impaktovaném časopise. Komentář první publikace je rozšířen o nepublikované výsledky, na jejichž základě jsou v současné době připravovány další dva rukopisy s mým prvoautorským podílem.

### 4.1. Publikace č. 1: Digestive proteolysis in the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*: Activity-based profiling and imaging of a multipeptidase network.

Mandelinka bramborová (*Leptinotarsa decemlineata*) patří mezi nejvýznamnější herbivorní škůdce lilkovitých rostlin. Tento projekt přinesl systematický popis trávicího proteolytického aparátu mandelinky pomocí nástrojů funkční proteomiky (selektivních substrátů, inhibitorů a aktivních sond). Jako hlavní trávicí proteolytické enzymy mandelinky byly identifikovány cysteinové, aspartátové a serinové proteasy a byla určena jejich role v dekadační kaskádě proteinů. V prvním kroku jsou proteiny v lumen střeva fragmentovány působením čtyř typů endopeptidas a vzniklé peptidy jsou dále štěpeny až na aminokyseliny pomocí čtyř typů exopeptidas. Hlavní detekované trávicí proteasy byly vizualizovány v extraktech střev mandelinky pomocí aktivních sond. Byl podán přímý biochemický důkaz, že přirozené inhibitory lilku brambor z Kunitzovy rodiny (PCDI a PSPI) účinně blokují trávicí enzymy mandelinky bramborové z aspartátové a serinové třídy proteas, což umožňuje klasifikovat tyto proteiny jako obranné molekuly proti herbivorům.

### 4.2. Nepublikované výsledky

Na základě výsledků z publikace č. 1 byly detailně studovány Kunitzovy inhibitory PCDI a PSPI z hlediska jejich funkčních vlastností a strukturního mechanismu inhibice. Analýza inhibiční specifity ukázala, že PSPI a PCDI jsou obecně až nanomolární inhibitory serinových proteas S1 rodiny chymotrypsinu a PCDI je bifunkční inhibitor, který také inhibuje aspartátové proteasy A1 rodiny pepsinu.

Pro inhibitor PSPI byly vyřešeny dvě prostorové struktury ternárního komplexu s trypsinem a chymotrypsinem, které umožnily popsat dva odlišné typy reaktivní center. První reaktivní centrum je tvořeno jedinou hlavní smyčkou s kanonickým mechanismem interakce, který je znám pro řadu rodin inhibitorů serinových proteas. Druhé reaktivní centrum je tvořeno dvěma nezávislými smyčkami, které vstupují do aktivního centra, a představuje nový inhibiční motiv pro regulaci serinových proteas, který nebyl doposud popsán. Pro inhibitor PCDI byly vyřešeny dvě prostorové struktury binárních komplexů. Struktura PCDI v komplexu s trypsinem potvrdila existenci nového inhibičního motivu pro serinové proteasy nalezeného u PSPI. Struktura PCDI v komplexu s katepsinem D identifikovala nové unikátní reaktivní centrum proti aspartátovým proteasám, které je tvořeno makrocyclickou smyčkou stabilizovanou dvěma vnitřními disulfidickými můstky, jež se váže do aktivního místa enzymu. Lze



předpokládat, že na základě kompaktní struktury tohoto reaktivního centra bude možné navrhovat syntetická mimetika jako inhibitory různých medicínálně významných aspartátových proteas.

Sada prostorových struktur komplexů PSPI a PCDI spolu s dříve známými kanonickými komplexy Kunitzových inhibitorů se serinovými proteasami umožnila nový pohled na molekulární evoluci této proteinové rodiny. Analýza topologie a struktury reaktivních center ukázala, že na Kunitzových inhibitech se vyvinuly tři odlišné typy inhibičních mechanismů pro regulaci proteas, které využívají celkem pět povrchových smyček, jež mohou být modulárně kombinovány do reaktivních center.

Trávící aspartátová proteasa mandelinky bramborové LdCD byla připravena v kvasinkovém expresním systému a byla určena její krystalová struktura. Pomocí molekulárního modelování byl konstruován komplex LdCD s inhibitorem PCDI s využitím strukturních informací o reaktivním centru PCDI pro aspartátové proteasy (viz. předchozí odstavec). Tato analýza umožnila vysvětlit specifickou interakci obou biologicky relevantních proteinů, které se účastní proteolytických interakcí mezi hmyzem a rostlinou.

#### **4.3. Publikace č. 2: Complex modulation of peptidolytic activity of cathepsin D by sphingolipids.**

Tato práce identifikovala sfingolipidy jako komplexní modulátory enzymové aktivity aspartátové proteasy lidského katepsinu D. Jedná se o vysoce specifický typ regulace, který nebyl pozorován u jiných zástupců aspartátových, cysteinových a serinových proteas. Analýza přirozených a syntetických sfingolipidů ukázala, že určité deriváty sfingosinu a ceramidu jsou sub-mikromolární inhibitory katepsinu D, zatímco pro fosforylované formy sfingolipidů byla nalezena pozitivní modulace (až několikanásobný nárůst aktivity). Pro inhibiční sfingolipidy byl určen kompetitivní typ inhibice, proto lze předpokládat jejich vazbu do aktivního místa enzymu. Výsledky této studie naznačují, že interakce sfingolipidů s katepsinem D může ovlivňovat procesy, jako jsou apoptóza a mitogeneze, jichž se jak tyto bioaktivní lipidy tak i proteasa účastní.

#### **4.4. Publikace č. 3: Single- and double-headed chemical probes for detection of active cathepsin D in a cancer cell proteome.**

Aktivní sondy (ABP, z angl. Activity Based Probe) jsou vyvíjeny jako efektivní nástroj pro *in vitro* a *in vivo* detekci cysteinových a serinových proteas (Sanman a Bogyo 2014). Pro aspartátové proteasy byly připraveny ABP se strukturou kombinující (1) nekovalentní specifický ligand aktivního místa, (2) fotoreaktivní skupinu, která kovalentně váže ABP k enzymu a (3) detekční skupiny pro vizualizaci (fluorescenční skupinu, biotin). Značené aspartátové proteasy lze vizualizovat pomocí fluorescence z SDS-PAGE gelu nebo po přenesení na PVDF membránu pomocí chemiluminiscence. Připravené ABP byly testovány s modelovými zástupci aspartátových proteas, včetně lidského katepsinu D v homogenátu nádorových buněk. V práci jsou diskutovány aplikace připravených sond pro detekci katepsinu D jako prognostického markeru nádorového onemocnění prsu.

#### **4.5. Publikace č. 4: Profiling system for skin kallikrein proteolysis applied in gene deficient mouse models**

Aktivity jednotlivých serinových proteas kalikreinového typu (KLK) je obtížné monitorovat v komplexních směsích kvůli překrývající se substrátové specifitě. V této práci byly analyzovány substrátové a inhibiční specifity hlavních epidermálních KLK. Vybrané selektivní substráty a inhibitory umožnily specifickou detekci KLK proteas v extraktech epidermis myši s deficiencí v genech pro studované KLK. Výsledky této práce pomohly objasnit roli KLK proteas v multienzymovém proteolytickém systému epidermální tkáně.

#### **4.6. Publikace č. 5: Crystal structures of the complex of kallikrein inhibitor BbKI with trypsin and modeling of kallikrein complexes**

Rostlinný proteasový inhibitor BbKI z bauhinie patří mezi inhibitory z Kunitzovy rodiny a již dříve byla popsána jeho schopnost inhibovat některé zástupce serinových proteas trypsinového typu (Oliva a Sampaio 2008). V této práci byla analyzována inhibiční specifita BbKI vůči kalikreinovým proteasám (KLK). Sub-nanomolární inhibiční konstanty byly určeny pro medicínálně významné proteasy KLK 4, KLK 7 a plasmový KLK. Krystalová struktura komplexu BbKI s trypsinem ukázala, že reaktivní centrum BbKI se váže do aktivního místa enzymu pomocí jediné smyčky a tzv. kanonického mechanismu interakce. S využitím tohoto strukturního templátu byly modelovány komplexy BbKI s kalikreiny. Konformační flexibilita interakční smyčky BbKI a přídatné kontakty v jejím okolí umožnily vysvětlit vysokou afinitu BbKI ke studovaným KLK proteasám.

Rukopis je nyní v recenzním řízení v časopise Acta Crystallographica Section D.

#### **4.7. Publikace č. 6: Kunitzovy proteasové inhibitory z rostlin: strukturní a funkční diverzita**

Referát podal ucelený přehled o rostlinných proteasových inhibitech z Kunitzovy rodiny se zaměřením na strukturní aspekty interakce těchto inhibitorů se serinovými proteasami. Diskutován je kanonický inhibiční mechanismus a rozdílná topologie doposud popsaných reaktivních center na molekule inhibitorů z Kunitzovy rodiny.

## **5. Závěry**

Disertační práce se zabývala regulací aktivity proteolytických enzymů ze třídy aspartátových a serinových proteas. Výsledky jsou shrnuty v pěti publikacích a jednom rukopisu, který je podáván do mezinárodního časopisu. Práce také obsahuje doposud nepublikované výsledky, které budou součástí dvou připravovaných publikací v impaktovaném časopise, kde bude autor disertace uveden jako první autor.

V disertační práci byly splněny zadané cíle a získané výsledky jsou následující:

- 1) S využitím přístupů funkční proteomiky byl popsán proteolytický trávicí systém mandelinky bramborové, který je založen na kombinovaném působení cysteinových, aspartátových a serinových proteas. Jednotlivé enzymy byly identifikovány a charakterizovány pomocí selektivních substrátů a inhibitorů a vizualizovány v extraktech střev mandelinky bramborové pomocí specifických aktivitních sond. Na základě získaných výsledků bylo sestaveno schéma degradace rostlinných proteinů v procesu trávení tohoto herbivorního škůdce lilkovitých rostlin. Dále bylo prokázáno, že Kunitzovy inhibitory z lilku brambor efektivně blokuje aktivitu serinových a aspartátových proteas mandelinky bramborové a fungují jako obranné proteiny cílené proti trávicímu traktu herbivora.
- 2) Byla vyřešena unikátní sada čtyř prostorových struktur protein-proteinových komplexů, které jsou tvořeny inhibitory z Kunitzovy rodiny (PSPI a PCDI z lilku brambor) a jejich cílovými proteasami. Na základě těchto struktur byla popsána nová reaktivní centra pro interakci se serinovými a aspartátovými proteasami s rozdílnou topologií na molekule inhibitoru:
  - a) Dvě reaktivní centra pro serinové proteasy, z toho první je tvořeno jedinou smyčkou s kanonickým mechanismem interakce popsaným v literatuře a druhé váže proteasy novým mechanismem, který je založený na dvou smyčkách, jež se skládají do aktivního místa enzymu. Tento typ reaktivního centra je schopen interagovat se serinovými proteasami s odlišnou substrátovou specifitou - trypsinem a chymotrypsinem.
  - b) Nový typ reaktivního centra pro aspartátové proteasy, které je tvořené makrocyclickou smyčkou stabilizovanou dvěma vnitřními disulfidickými můstky. Tento mechanismus interakce byl identifikován vyřešením první prostorové struktury Kunitzova inhibitoru v komplexu s aspartátovou proteasou.
- 3) Byla vyřešena prostorová struktura trávicí aspartátové proteasy LdCD z mandelinky bramborové. Dále byl konstruován molekulární model komplexu LdCD se specifickým inhibitorem PCDI (viz bod 2), což umožnilo vysvětlit interakci mezi oběma biologicky relevantními partnery - hmyzím trávicím enzymem a rostlinným obranným proteinem.
- 4) Sfingolipidy byly identifikovány jako první endogenní molekuly, které specificky regulují aktivitu lidského katepsinu D. V závislosti na struktuře působí sfingolipidy jednak jako účinné inhibitory a jednak ve formě fosforylovaných derivátů jsou aktivátory. Tento způsob modulace katepsinu D se potenciálně uplatňuje při regulaci tvorby nádorů.
- 5) Byly navrženy a syntetizovány proteomické aktivní sondy pro aspartátové proteasy pepsinové rodiny, které byly odvozené ze struktury přirozeného specifického inhibitoru pepstatinu. Na buněčných extraktech bylo prokázáno, že tyto sondy je možné využít k detekci katepsinu D jako prognostického markeru nádorových onemocnění.

- 6) Byly nalezeny selektivní fluorogenní substráty a inhibitory, které umožňují rozlišit aktivity epidermálních serinových proteas kalikreinového typu v biologických extraktech. Tento detekční systém byl využit pro analýzu kalikreinů u geneticky modifikovaných myší jako modelu pro studium kožních onemocnění.
- 7) Byla určena inhibiční specifita Kunitzova inhibitoru BbKI. Tento inhibitor byl identifikován jako nejvíce efektivní přirozený inhibitor medicínálně významných lidských kalikreinů s preferencí pro kalikrein 4, který je spojovaný s nádorovými onemocněními. Mechanismus interakce BbKI s kalikreiny byl vysvětlen pomocí molekulárního modelování s využitím vyřešené prostorové struktury komplexu BbKI-trypsin.

## 6. Použitá literatura

- Bendre, A. D., S. Ramasamy, and C. G. Suresh. 2018. "Analysis of Kunitz Inhibitors from Plants for Comprehensive Structural and Functional Insights." *International Journal of Biological Macromolecules* 113: 933–43.
- Barao, S., D. Moechars, S. F. Lichtenthaler, and B. De Strooper. 2016. "BACE1 Physiological Functions May Limit Its Use as Therapeutic Target for Alzheimer's Disease." *Trends in Neurosciences* 39 (3): 158–69.
- Beneš, P., V. Vetvicka, and M. Fusek. 2008. "Cathepsin D-Many Functions of One Aspartic Protease." *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 68 (1): 12–28.
- Dvořák, J., and M. Horn. 2018. "Serine Proteases in Schistosomes and Other Trematodes." *International Journal for Parasitology* 48 (5): 333–44.
- Huntington, J. A.. 2014. "Natural Inhibitors of Thrombin." *Thrombosis and Haemostasis* 111 (4): 583–89.
- Krowarsch, D., T. Cierpicki, F. Jelen, and J. Otlewski. 2003. "Canonical Protein Inhibitors of Serine Proteases." *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS* 60 (11): 2427–44.
- Kryza, T., M. L. Silva, D. Loessner, N. Heuze-Vourc'h, and J. A. Clements. 2016. "The Kallikrein-Related Peptidase Family: Dysregulation and Functions during Cancer Progression." *Biochimie* 122: 283–99.
- Law, R. H. P., Q. Zhang, S. McGowan, A. M. Buckle, G. A. Silverman, W. Wong, C. J. Rosado, et al. 2006. "An Overview of the Serpin Superfamily." *Genome Biology* 7 (5): 216.
- Li, M., L. H. Phylip, W. E. Lees, J. R. Winther, B. M. Dunn, A. Wlodawer, J. Kay, and A. Gustchina. 2000. "The Aspartic Proteinase from *Saccharomyces Cerevisiae* Folds Its Own Inhibitor into a Helix." *Nature Structural Biology* 7 (2): 113–17.
- Máša, M., L. Marešova, J. Vondrášek, M. Horn, J. Ježek, and M. Mareš. 2006. "Cathepsin D Propeptide: Mechanism and Regulation of Its Interaction with the Catalytic Core." *Biochemistry* 45 (51): 15474–82.
- Ng, K. K., J. F. Petersen, M. M. Cherney, C. Garen, J. J. Zalatoris, C. Rao-Naik, B. M. Dunn, M. R. Martzen, R. J. Peanasky, and M. N. James. 2000. "Structural Basis for the Inhibition of Porcine Pepsin by *Ascaris* Pepsin Inhibitor-3." *Nature Structural Biology* 7 (8): 653–57.
- Oliva, M. L. V., and U. M. Sampaio. 2008. "Bauhinia Kunitz-Type Proteinase Inhibitors: Structural Characteristics and Biological Properties." *Biological Chemistry* 389 (8): 1007–13.
- Rawlings, N. D., and A. J. Barrett. 2010. "MEROPS: The Peptidase Database." *Nucleic Acids Research* 38 (1): 325–31.
- Rawlings, N. D., and G. Salvesen. 2013. *Handbook of Proteolytic Enzymes*. Elsevier.
- Sanman, L. E., and M. Bogyo. 2014. "Activity-Based Profiling of Proteases." *Annual Review of Biochemistry* 83: 249–73.
- Sojka, D., D. Hartmann, P. Bartošová-Sojková, and J. Dvořák. 2016. "Parasite Cathepsin D-Like Peptidases and Their Relevance as Therapeutic Targets." *Trends in Parasitology* 32 (9): 708–23.
- Sun, H., X. Lou, Q. Shan, J. Zhang, X. Zhu, J. Zhang, Y. Wang, Y. Xie, N. Xu, and S. Liu. 2013. "Proteolytic Characteristics of Cathepsin D Related to the Recognition and Cleavage of Its Target Proteins." *PloS One* 8 (6): e65733.

## Curriculum vitae

### Osobní údaje:

**Jméno a příjmení, titul:** Jaroslav Srp, Mgr.  
**Datum a místo narození:** 8. června 1985, Praha  
**Národnost:** česká  
**Kontaktní telefon:** +420 220 183 470  
**E-mail:** srp@uochb.cas.cz

### Vzdělání:

- Od 2010 **Postgraduální studium:** Karlova Univerzita v Praze, Přírodovědecká fakulta, Katedra Biochemie, Studijní obor: Biochemie  
Dizertační práce: Regulace aktivity aspartátových a serinových proteas pomocí selektivních přirozených inhibitorů  
vypracována na Ústavu organické chemie a biochemie AV ČR  
Školitel: RNDr. Michael Mareš, CSc.
- 2008 - 2010 **Magisterské studium:** Karlova Univerzita v Praze, Přírodovědecká fakulta, Katedra Biochemie, Studijní obor: Biochemie  
Diplomová práce: Trávicí aspartátová proteasa z mandelinky bramborové  
vypracována na Ústavu organické chemie a biochemie AV ČR  
Školitel: doc. RNDr. Jan Konvalinka, CSc.  
Oponent: doc. RNDr. Věra Jonáková, DrSc.
- 2005 - 2008 **Bakalářské studium:** Karlova Univerzita v Praze, Přírodovědecká fakulta, Katedra Biochemie, Studijní obor: Biochemie  
Bakalářská práce: Genová exprese receptorů pro oxytocin v některých oblastech CNS a v srdci  
vypracována na Ústavu lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky 1. LF UK a VFN  
Školitel: doc. MUDr. Věra Klenerová, DrSc.  
Oponent: RNDr. Jiřina Slaninová, CSc.

### Zaměstnání:

- Od 09/2006 **Ph.D. Student**  
Ústav organické chemie a biochemie AV ČR  
skupina: Katepsinové proteasy v patologii

### Jazyky:

Anglický jazyk: plynule, FCE (3/2015)  
Německý jazyk: základy

### Absolvované kurzy:

- FEBS Advanced Course in Protein Crystallization, Nové Hrady (2012)  
LC/GC Chemstation kurz a ovládnání LC/GC systémů (Agilent), Praha (2012)

Kurz Real-Time PCR (SEQme s. r. o.), Praha	(2013)
EBI Bioinformatics Workshop, Praha	(2013)
ZEISS on Your Campus Workshop Series, školení mikroskopie, Praha	(2013)
IPS training workshops on “Protease Kinetics” Kapské Město, JAR	(2013)
FEBS Advanced Course: Ligand-binding Theory and Practice, Nové Hrady	(2014)
Výpočetní postupy v makromolekulární krystalografii, Nové Hrady	(2015)

### **Příspěvky na konferencích:**

**Srp J.**, Nussbaumerová M., Šanda M., Štajflová M., Horn M., Mareš M.: Plant-Insect Proteomic: Interaction of Plant Defense Protein with Insect Digestive Protease. Konference: International Conference on Proteomics in Plants, Microorganisms and Environment; Lucemburk, Lucembursko (2010). Plakátové sdělení

**Srp J.**, Nussbaumerová M., Šanda M., Štajflová M., Horn M., Mareš M.: Proteomic and Biochemical Analysis of Insect Digestive Proteases Targeted by Plant Defense Proteins. Konference: Final COST Meeting “Plant Proteomics in Europe: where do we stand and where are we heading to?; Dijon, Francie (2011). Plakátové sdělení

**Srp J.**, Žebrakovská I., Nussbaumerová M., Máša M., Řezáčová P., Horn M., Mareš M.: Regulation of activity of human and insect cathepsin D. Konference: Gordon Research Conference Proteolytic enzymes and their inhibitors; Lucca, Itálie (2012). Plakátové sdělení

**Srp J.**, Nussbaumerová M., Řezáčová P., Žebrakovská I., Pachtl P., Šanda M., Štajflová M., Horn M., Mareš M.: Interaction of Plant Defense Protein with Insect Digestive Aspartic Peptidase. Konference: FEBS Advanced Course in Protein Crystallization; Nové Hrady (2012). Plakátové sdělení

**Srp J.**, Nussbaumerová M., Šanda M., Štajflová M., Horn M., Mareš M.: Interakce rostlinného obraného proteinu s hmyzí trávicí aspartátovou peptidasou. Konference: XII Mezioborové setkání mladých biologů, biochemiků a chemiků; Resort Svátá Kateřina - Počátky (2012). Plakátové sdělení

**Srp J.**, Nussbaumerová M., Illner J., Horn M., Mareš M.: Activity-Based Profiling and Imaging of Digestive Proteolytic Enzymes of Colorado Potato Beetle. Konference: The 8th General Meeting of the International Proteolysis Society; Kapské Město, Jihoafrická republika (2013). Plakátové sdělení

**Srp J.**: A bug's life: Structure & regulation of digestive cathepsins D. Konference: Výjezdní zasedání ÚOCHB AV ČR; Harrachov (2014). Přednáška

**Srp J.**, Nussbaumerová M., Řezáčová P., Hánová I., Horn M., Mareš M.: Insect digestive aspartic protease targeted by a plant defense protein. Konference: FEBS Advanced Course: Ligand-binding Theory and Practice; Nové Hrady (2014). Plakátové sdělení

**Srp J.**, Hánová I., Brynda J., Řezáčová P., Sojka D., Kopaček P., Horn M., Mareš M.: Structure and activity of digestive cathepsins D of ticks and insects. Konference: 13<sup>th</sup> International Congress of Parasitology; Mexico City, Mexiko (2014). Plakátové sdělení

**Srp J.**, Pachtl P., Řezáčová P., Vondrášek J., Nussbaumerová M., Horn M., Mareš M.: Structures of cathepsin D and its inhibitor involved in plant-insect interaction. Konference: 9<sup>th</sup> General meeting of the International Proteolysis Society; Penang, Malajsie (2015). Plakátové sdělení

**Srp J.**, Pchl P., Řezáčová P., Vondrášek J., Nussbaumerová M., Horn M., Mareš M.: A Plant-Insect Interaction in 3D. Konference: XIII Discussions in Structural Molecular Biology; Nové Hrady (2015). Plakátové sdělení

**Srp J.**, Pchl P., Horn M., Mareš M.: Plant protease inhibitors from Kunitz family: structural and functional diversity. Konference: XXXIII<sup>rd</sup> Winter School on Proteinases and Their Inhibitors; Tiers, Itálie (2016). Přednáška

**Srp J.**, Pchl P., Horn M., Mareš M.: Crystal structure of plant defense protein in complex with serine protease. Konference: XIV Discussions in Structural Molecular Biology; Nové Hrady (2016). Plakátové sdělení

**Benýšek J.**, Kovářová Z., Mishra M., Brynda J., Buša M., **Srp J.**, Řezáčová P., Horn M., Mareš M.: Novel inhibition scaffolds targeting human cysteine cathepsins. Konference: XIV Discussions in Structural Molecular Biology; Nové Hrady (2016). Plakátové sdělení

**Srp J.**, Pchl P., Mishra M., Horn M., Mareš M.: A novel non-canonical binding mode for serine proteases on plant Kunitz inhibitors. Konference: 42<sup>nd</sup> FEBS Congress; Jerusalem, Israel (2017). Plakátové sdělení

**Srp J.**, Pchl P., Kukačka Z., Brynda J., Mishra M., Horn M., Novák P., Mareš M.: Potato Kunitz inhibitors evolved a novel non-canonical binding mode for serine proteases. Konference: 7<sup>th</sup> Symposium on Structural Proteomics; Vídeň, Rakousko (2017). Plakátové sdělení

**Srp J.**: From Bugs to Drugs new inhibitory motifs designed by nature. Konference: PhD Science Club ÚOCHB AV ČR; Praha (2017). Přednáška

**Srp J.**, Pchl P., Kukačka Z., Brynda J., Mishra M., Horn M., Novák P., Mareš M.: Structural characterization of a novel type of reactive site for inhibition of serine proteases. Konference: XV Discussions in Structural Molecular Biology; Nové Hrady (2018). Plakátové sdělení

**Srp J.**, Pchl P., Mishra M., Horn M., Mareš M.: Structural characterization of a novel, non-canonical reactive site against serine proteases on plant Kunitz inhibitors. Konference: Gordon Research Conference on Proteolytic Enzymes and Their Inhibitors; Lucca, Itálie (2018). Plakátové sdělení

**Srp J.**: Inhibitory motifs against proteases designed by plants. Konference: Výjezdní zasedání ÚOCHB AV ČR; Valeč (2018). Přednáška

**Gustchina A.**, Li M., **Srp J.**, Dauter Z., Mareš M., Wlodawer A.: Crystal Structures of the Complex of Kallikrein Inhibitor BbKI with Trypsin and a Comparison of its Inhibitory Properties for Various Kallikreins. Konference: 43<sup>rd</sup> FEBS Congress; Praha (2018). Plakátové sdělení



## Seznam publikací

**Srp J.**, Nussbaumerová M., Horn M., Mareš M.: Digestive proteolysis in the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*: Activity-based profiling and imaging of a multi-peptidase network; *Insect Biochem Mol Biol*, (78), 1-11 (2016). IF = 3,562

Žebrakovská I., Máša M., **Srp J.**, Horn M., Vávrová K., Mareš M.: Complex modulation of peptidolytic activity of cathepsin D by sphingolipids; *Biochim Biophys Acta*, (12), 1097-1104 (2011). IF = 3,679

Nussbaumerová M., **Srp J.**, Máša M., Hradilek M., Šanda M., Reiniš M., Horn M., Mareš M.: Single- and double-headed chemical probes for detection of active cathepsin D in a cancer cell proteome; *Chembiochem*, (11), 1538-1541 (2010). IF = 2,774

Horn M., Zbodáková O., Kašpárek P., **Srp J.**, Hanečková R., Hradilek M., Mareš M., Sedláček R.: Profiling system for skin kallikrein proteolysis applied in gene deficient mouse models; *Biol Chem*, (9), 1085-1089 (2018). IF = 3,022

Li M., **Srp J.**, Gustchina A., Dauter Z., Mareš M., Wlodawer A.: Crystal structures of the complex of kallikrein inhibitor BbKI with trypsin and modeling of kallikrein complexes; Rukopis je podán do časopisu *Acta Crystallographica Section D*, (2018). IF = 3,009

**Srp J.**, Mareš M.: Kunitzovy proteasové inhibitory z rostlin: strukturní a funkční diverzita; *Chem listy*, (110), 761-768 (2016). IF = 0,260

**Charles University in Prague, Faculty of Science  
Department of Biochemistry**

Doctoral study programme: Biochemistry

Summary of the Doctoral thesis



Regulation of the activity of aspartic and serine proteases by selective  
natural inhibitors

**M.Sc. Jaroslav Srp**

Supervisor: RNDr. Michael Mareš, CSc.

Prague, 2018

# Contents

List of Abbreviations .....	1
Abstract .....	2
<b>1. Introduction</b> .....	3
1.1. Aspartic proteases from the pepsin family and serine proteases from the chymotrypsin family .....	3
1.2. Natural protein inhibitors of proteases .....	3
<b>2. Aims of the Study</b> .....	4
<b>3. Methods</b> .....	5
3.1. Material and laboratory equipment	
3.2. Methods of molecular biology	
3.3. Biochemical methods	
3.4. Enzymological methods	
3.5. Crystallographic methods	
<b>4. Results and Discussion</b> .....	6
<b>4.1. Publication No. 1:</b> Digestive proteolysis in the Colorado potato beetle, <i>Leptinotarsa</i> <i>decemlineata</i> : Activity-based profiling and imaging of a multi-peptidase network .....	6
<b>4.2. Unpublished data</b> .....	6
<b>4.3. Publication No. 2:</b> Complex modulation of peptidolytic activity of cathepsin D by sphingolipids .....	7
<b>4.4. Publication No. 3:</b> Single- and double-headed chemical probes for detection of active cathepsin D in a cancer cell proteome .....	7
<b>4.5. Publication No. 4:</b> Profiling system for skin kallikrein proteolysis applied in gene deficient mouse models .....	8
<b>4.6. Publication No. 5:</b> Crystal structures of the complex of kallikrein inhibitor BbKI with trypsin and modeling of kallikrein complexes .....	8
<b>4.7. Publication No. 6:</b> Plant Kunitz protease inhibitors: Structural and functional diversity .....	8
<b>5. Conclusions</b> .....	8
<b>6. References</b> .....	11
<b>Curriculum Vitae</b> .....	12
<b>Selected Publications</b> .....	15

## List of Abbreviations

ABP	Activity Based Probe
BbKI	<i>Bauhinia bauhinioides</i> kallikrein inhibitor
BPTI	Bovine Pancreatic Trypsin Inhibitor
CPB	Colorado potato beetle
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography
FRET	Fluorescence Resonance Energy Transfer
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IA3	inhibitor of yeast aspartic protease proteinase A from <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
IC <sub>50</sub>	inhibitor concentration necessary to effect 50% inhibition of the enzyme
IrCD1	cathepsin D-type protease from the tick <i>Ixodes ricinus</i>
k <sub>cat</sub>	turnover number
K <sub>i</sub>	inhibition constant
K <sub>M</sub>	Michaelis constant
LdCD	cathepsin D-type protease of the Colorado potato beetle ( <i>Leptinotarsa decemlineata</i> )
PCDI	Potato Cathepsin D Inhibitor
PI3	inhibitor of aspartic protease pepsin from <i>Ascaris suum</i>
PSPI	Potato Serine Protease Inhibitor
PVDF	polyvinylidene difluoride
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis
STI	Soybean Trypsin Inhibitor

## **Abstract**

Proteases are involved in many physiological processes and their dysregulation is associated with various pathologies. Protease activity is effectively controlled by natural inhibitors. This PhD thesis is focused on the inhibitors of aspartic and serine proteases of animal and plant origin and provides the identification, biochemical characterization and structural description of their inhibition mechanisms.

Plant Kunitz inhibitors are produced as defensive proteins, and they are able to block activities of a broad spectrum of proteases. In this thesis, the digestive proteolytic system of the Colorado potato beetle, a herbivore pest of potato plants, was described with the help of functional proteomics. It was shown that aspartic and serine proteases from this herbivore are effectively blocked by two potato Kunitz inhibitors (namely PCDI, PSPI). Using structural analysis, novel types of reactive centers were identified on PCDI and PSPI molecules for the inhibition of aspartic protease cathepsin D and the serine proteases trypsin and chymotrypsin. The analysis of the reactive center on a PCDI with the crystal structure of digestive cathepsin D from the Colorado potato beetle explained the mechanism of their interaction.

Sphingolipids were identified as the first endogenous inhibitors of human cathepsin D. Sphingolipids are bioactive molecules with anti-cancer activity, and the mechanism of their action may include the regulation of cathepsin D, which is associated with cancer proliferation. Moreover, a proteomic probe based on a peptidomimetic inhibitor was developed for the detection of human cathepsin D, which is a prognostic marker in cancer.

The plant Kunitz inhibitor BbKI was identified as the most potent natural inhibitor of kallikrein-type serine proteases. BbKI is selective for the cancer marker kallikrein 4, and their interaction was described using a structural model. Furthermore, a proteomic tool for the detection of epidermal kallikreins was designed combining selective substrates and inhibitors, and evaluated on mice with genetically knock-out kallikreins.

To conclude, this PhD thesis provides important information about the specificity and inhibition mechanisms of aspartic and serine proteases, which can be used for the rational design of new inhibitors with biomedical and agricultural applications.

# 1. Introduction

Aspartic and serine proteases play an important role in many physiological processes and their insufficient regulation leads to a number of pathologies. Their activity is controlled on several levels; one of them is regulation by specific natural inhibitors. This Ph.D. thesis is focused on the biochemical and structural analysis of inhibitory mechanisms of aspartic and serine proteases, which can be employed for the rational design of chemotherapeutics and molecular proteomic tools.

## 1.1. Aspartic proteases from the pepsin family and serine proteases from the chymotrypsin family

Pepsin is a prototype enzyme of aspartic proteases from the A1 family, and trypsin and chymotrypsin are representatives of serine proteases from the S1 family. Both families contain medicinally important proteases such as cathepsin D and kallikreins associated with cancer (Beneš, Větvicka, and Fusek 2008; Kryza et al. 2016), thrombin, which is a target enzyme for the regulation of blood coagulation (Huntington 2014), and  $\beta$  secretase, playing a role in Alzheimer's disease (Barao et al. 2016). Aspartic and serine proteases are promising targets for the treatment of parasitic diseases since they mediate host-parasite interactions and play a role in the digestive proteolysis of parasites (Sojka et al. 2016; Dvořák and Horn 2018). In addition, insect herbivore pests use proteolytic enzymes from both families for digestion. Plants produce defensive protease inhibitors against these enzymes, which can be employed for the construction of resistant transgenic crops (Terra and Ferreira 2012). Proteases of pepsin and chymotrypsin families exhibit endopeptidase activities with a relatively narrow pH profile and distinct inhibitory specificity. Pepstatin is a model inhibitor, which binds to the active site of aspartic proteases as an analog of the substrate transition state; serine proteases are blocked by the synthetic inhibitor Pefabloc, bacterial leupeptin or the protein inhibitors BPTI and STI. The 3D structure of the proteases from both families is composed of two domains surrounding the active site cleft with catalytic residues (a diad of Asp residues for aspartic proteases and a triad of His, Asp and Ser residues for serine proteases; Rawlings and Salvesen 2013). Aspartic proteases prefer the substrate cleavage between two hydrophobic amino acid residues (Sun et al. 2013), whereas serine proteases have distinct substrate specificity defined by the P1 residue (basic amino acids for trypsin-like enzymes and bulky hydrophobic amino acids for chymotrypsin-like enzymes).

## 1.2. Natural protein inhibitors of proteases

Protease inhibitors are involved in many physiological and pathological processes. They regulate endogenous proteolytic processes or serve as defense molecules against pathogens and parasites. Protein inhibitors can be classified: (1) into 80 families based on their sequence and structural homology (Rawlings and Barrett 2010) and (2) according to their interaction mechanism with proteases as reversible or irreversible inhibitors (Law et al. 2006; Krowarsch et al. 2003). Protein

inhibitors of aspartic proteases are rare; only six have been described so far, and only two of them were structurally characterized in complex with a protease: the yeast inhibitor IA3 (Li et al. 2000) and the inhibitor PI3 from *Ascaris* (Ng et al. 2000). In contrast, protein inhibitors of serine proteases are the most abundant group of protease inhibitors. This Ph.D. thesis focuses on plant protease inhibitors from the Kunitz family, which have a unique broad specificity and block the activity of serine, cysteine and aspartic proteases (Bendre, Ramasamy, and Suresh 2018). The interaction mechanism of Kunitz inhibitors has only been described against serine proteases: the reactive center is formed by one surface loop, which is inserted into the active site with the canonical or Laskowski binding mode (Krowarsch et al. 2003).

## **2. Aims of the Study**

Specific aims of the thesis are the following:

- 1) Biochemical characterization of the digestive proteolytic system of the Colorado potato beetle, a herbivore pest of potato plants, with a special focus on its interaction with natural Kunitz inhibitors from potato.
- 2) Protein crystallography analysis of the interaction between Kunitz inhibitors with target proteases from aspartic and serine protease classes and the identification of novel reactive centers on inhibitor molecules.
- 3) The identification of natural mechanisms of the inhibitory regulation of human cathepsin D by sphingolipids. The design and synthesis of activity based probes for the detection of cathepsin D as a prognostic marker in cancer.
- 4) The substrate and inhibitory specificity analysis of epidermal kallikreins. The determination of the inhibitory specificity of a kallikrein inhibitor from the Kunitz family and a structural description of its inhibitory interaction.

## 3. Methods

### 3.1. Material and laboratory equipment

Most of the data were obtained using the laboratory facilities at the Institute of Organic Chemistry and Biochemistry the Academy of Sciences of the Czech Republic (IOCB AS CR). Synthetic peptide substrates, inhibitors and activity based probes were prepared in collaboration with the Laboratory of Medicinal Chemistry IOCB AS or obtained from Bachem and Sigma-Aldrich. Enzymes trypsin and chymotrypsin were from Sigma-Aldrich, kallikreins from R&D Systems and human cathepsin D was purified according (Máša et al. 2006). Sets of commercial crystallization liquids were purchased from Bachem Molecular Dimension, Jena Bioscience and Hampton Research. The diffraction data for crystal structure determination were collected on synchrotron at the Helmholtz-Zentrum Berlin, Bessy II electron storage ring, Berlin-Adlershof, Germany Crystal structures were determined in collaboration with the Laboratory of Structural Biology at the IOCB CAS.

### 3.2. The methods of molecular biology:

LdCD was cloned into the pGAPZ $\alpha$  plasmid and expressed as a recombinant protein in the yeast expression system. IrCD1 was prepared as a recombinant protein in the bacterial expression system.

### 3.3. Biochemical methods:

(1) The separation of proteins using SDS-PAGE, (2) the transfer of proteins to the PVDF membrane using the Western blot method, (3) the imaging of proteases using activity based probes, (4) the FPLC purification of proteins, (5) the HPLC separation of peptides, (6) an analysis of protein sequences using mass spectrometry and Edman sequencing, and (7) the determination of protein and peptide concentration using amino acid analysis.

### 3.4. Enzymological methods:

(1) Enzyme activity measurements using kinetic assays with synthetic fluorogenic, chromogenic and FRET substrates, (2) the determination of kinetic parameters ( $k_{\text{cat}}$ ,  $K_m$ ) and inhibition constants ( $IC_{50}$ ,  $K_i$ ), and (3) the determination of the dissociation constant ( $K_D$ ) using thermophoretic measurements.

### 3.5. Crystallographic methods:

Five protease-inhibitor complexes were prepared, purified by size-exclusion chromatography and crystallized using sitting or hanging drop methods. Diffraction data were collected on BESSY II synchrotron (Berlin) and analyzed in collaboration with the Structural Biology Laboratory at the



Institute of Organic Chemistry and Biochemistry of the Czech Academy of Sciences. Molecular graphics were done with the PyMol software.

## 4. Results and discussion

Results of this Ph.D. thesis are summarized in five publications and one manuscript, which is currently in review process in an impacted journal. The commentary on the first publication has been extended by unpublished results, on the basis of which two more manuscripts are being prepared.

### 4.1. Publication No. 1: Digestive proteolysis in the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*: Activity-based profiling and imaging of a multipeptidase network.

The Colorado potato beetle (CPB, *Leptinotarsa decemlineata*) is a major herbivore pest of potato plants. This project provides a systematic description of the digestive proteolytic system of the CPB using the tools of functional proteomics (selective substrates, inhibitors and activity based probes). Cysteine, aspartic and serine proteases were identified as major digestive proteolytic enzymes of the CPB, and their role in the degradation pathway was determined. In the first step, ingested proteins are fragmented by four types of endopeptidases in the gut lumen. The generated peptides are then degraded into amino acids by four types of exopeptidases. The major detected digestive proteases were visualized in the gut extract of CPB larvae using activity based probes. Direct biochemical evidence was provided that potato inhibitors from the Kunitz family (PCDI and PSPI) effectively block the digestive proteases of the CPB from the aspartic and serine classes. This makes it possible to classify these inhibitors as defensive molecules against herbivores.

### 4.2. Unpublished data

Based on the results from publication No. 1, the Kunitz inhibitors PCDI and PSPI were investigated in detail in terms of their functional properties and the structural mechanism of inhibition. The analysis of inhibitory specificity shows that PSPI and PCDI are nanomolar inhibitors of serine proteases from the S1 chymotrypsin family and PCDI is a bifunctional inhibitor, which also inhibits aspartic proteases from the A1 pepsin family.

Two 3D structures of the PSPI inhibitor in ternary complexes with trypsin and chymotrypsin solved, and two different types of the reactive centers were described. The first reactive center is formed by a single loop with the canonical mechanism of interaction, which is known from several families of serine proteases inhibitors. The second reactive center is formed by two independent loops, which enter the active site. This center represents a novel inhibitory motif for the regulation of serine proteases that was not described yet. Two 3D structures for the PCDI inhibitor in binary complexes were determined. The PCDI-trypsin complex verified the novel inhibitory motif against serine proteases found in the PSPI inhibitor. The PCDI complex with cathepsin D identified a new unique

reactive center against aspartic proteases, which is formed by a macrocyclic loop stabilized by two internal disulfide bridges that binds into the active site of the enzyme. The compact structure of this reactive center represent a potential template for the design of synthetic mimics as inhibitors of medicinally important aspartic proteases.

The set of the 3D structures of PCDI and PSPI complexes along with formerly known canonical complexes of Kunitz inhibitors with serine proteases provide a new insight into the molecular evolution of this protein family. The analysis of the topology and structure of the reactive centers shows that Kunitz inhibitors evolved three different types of inhibition mechanism for the regulation of proteases, which use five surface loops that can be modularly combined into reactive centers.

The digestive aspartic protease from the Colorado potato beetle (LdCD) was prepared in the yeast expression system, and its crystal structure was determined. The complex of the LdCD with a PCDI inhibitor was constructed using molecular modeling based on structural information about the reactive center of the PCDI against aspartic proteases (see the previous paragraph). This analysis explained the specific interaction between both biologically relevant partners that are involved in proteolytic interactions between plants and insects.

#### **4.3. Publication No. 2: Complex modulation of peptidolytic activity of cathepsin D by sphingolipids.**

This work identified sphingolipids as complex modulators of the enzymatic activity of human aspartic protease cathepsin D. This highly specific regulation of cathepsin D was not observed for other members of aspartic, cysteine and serine proteases. The screening of natural and synthetic sphingolipids shows that sphingosine and ceramide are sub-micromolar inhibitors of cathepsin D, whereas their phosphorylated derivatives are positive modulators, increasing the enzyme activity several times. The inhibitory sphingolipids were demonstrated to exert a competitive type of inhibition, indicating their interaction at the active site of the enzyme. The results of this study suggest that cell bioactive sphingolipids are involved in the control of cathepsin D-dependent processes such as apoptosis and mitogenesis.

#### **4.4. Publication No. 3: Single- and double-headed chemical probes for detection of active cathepsin D in a cancer cell proteome.**

Activity based probes (ABPs) are an effective tool for the *in vitro* and *in vivo* detection of cysteine and serine proteases (Sanman and Bogyo 2014). The ABPs for aspartic proteases were prepared combining: (1) a reversible specific active site ligand, (2) a photoreactive group crosslinking the probe to the target enzyme, and (3) a reporter group for visualization (a fluorescent dye moiety or biotin). The labeled aspartic proteases can be visualized by a fluorescence scanner in SDS-PAGE gels or by a chemiluminiscent detection system after transfer to a PVDF membrane by electroblotting. The

prepared ABPs were tested with model members of aspartic proteases, including human cathepsin D in the extract of cancer cells. The article discusses the proteomic application of the probes for the detection of cathepsin D as a prognostic marker in breast cancer.

#### **4.5. Publication No. 4: Profiling system for skin kallikrein proteolysis applied in gene deficient mouse models**

The profiling of individual serine proteases of kallikrein type (KLK) in complex biological mixtures is hampered by overlapping substrate specificities. In this work, the substrate and inhibitory specificities of the major epidermal KLKs were analyzed. The identified selective substrates and inhibitors enabled the specific detection of KLKs in protein extracts prepared from the epidermis of mice with KLK deficiencies. The results of this work help to elucidate the role of KLK proteases in the epidermal multienzyme proteolytic system.

#### **4.6. Publication No. 5: Crystal structures of the complex of kallikrein inhibitor BbKI with trypsin and modeling of kallikrein complexes**

The plant protease inhibitor from *Bauhinia bauhinioides* (BbKI) belongs to the Kunitz family, and its interaction with several trypsin-like serine proteases was previously reported (Oliva and Sampaio 2008). In this work, the inhibitory specificity of BbKI against kallikrein proteases (KLKs) was investigated. Sub-nanomolar inhibition constants were determined for the medically important proteases KLK 4 and KLK 7. The crystal structure of the complex of BbKI with trypsin shows that the reactive center of BbKI is formed by a single loop with the canonical binding mode. Based on this template, the complexes of BbKI with kallikreins were modeled. The conformational flexibility of the interaction loop of BbKI and additional contacts in the vicinity explain the high affinity of BbKI for KLK 4 and KLK 7.

The manuscript is now under review in Acta Crystallographica Section D.

#### **4.7. Publication No. 6: Plant Kunitz Protease Inhibitors: Structural and Functional Diversity**

This review article provides a comprehensive overview of plant protease inhibitors from the Kunitz family with the focus on the structural aspects of their interaction with serine proteases. It discusses the canonical inhibition mechanism and different topology of the reactive centers on the molecular Kunitz scaffold.

## **5. Conclusions**

The Ph.D. thesis focuses on the regulation of aspartic and serine proteases. The results are presented in five publications and one manuscript, which has been submitted to an impacted international journal. The work also contains unpublished data, which will form part of two

manuscripts currently in preparation that will be submitted to impacted journals; the author of the thesis contributes to them as the first author.

The aims of the thesis have been met with the following conclusions:

- 1) The digestive proteolytic system of the Colorado potato beetle (CPB) was described using functional proteomic analysis. This digestive system is based on combined action of cysteine, aspartic, and serine proteases. Individual enzymes were identified and characterized using specific substrates and selective inhibitors and visualized in the CPB gut protein extracts using imaging with activity based probes. Based on these results, a mechanistic model of the proteolytic pathway for the degradation of plant proteins in the CPB gut was proposed. Moreover, it was shown that Kunitz protease inhibitors from potato effectively block the activity of serine and aspartic proteases from CPB and act as plant defense proteins targeting the digestive system of the herbivore.
- 2) A set of four unique 3D structures of protein-protein complexes formed by Kunitz inhibitors (PSPI and PCDI from potato) and their target proteases was solved. Based on these structures, novel reactive centers for interaction with serine and aspartic proteases were described:
  - a) These comprise two reactive centers for serine proteases; the first one is formed by one loop with the canonical mechanism of interaction, that which has already been described in literature; the second center binds into the active site of the proteases by a new mechanism based on two loops. This type of reactive center is able to interact with trypsin as well as chymotrypsin, serine proteases with different substrate specificity.
  - b) A new type of reactive center for aspartic proteases is formed by a macrocyclic loop stabilized by two internal disulfide bridges. This interaction mechanism was identified by solving the first 3D structure of a Kunitz inhibitor in complex with aspartic protease.
- 3) The 3D structure of the digestive aspartic protease LdCD of the CPB was solved. Furthermore, the molecular model of the complex LdCD with a specific inhibitor, PCDI, was constructed (see 2). This explains the interaction between both biologically relevant partners – insect digestive enzyme and a plant defensive protein.
- 4) Sphingolipids were identified as the first endogenous molecules that specifically regulate the activity of human cathepsin D. Unmodified sphingolipids act as effective inhibitors, while their phosphorylated derivatives are activators. This modulation of cathepsin D plays a potential role in the regulation of tumor growth.
- 5) New activity based probes for the pepsin family of aspartic proteases were designed and synthesized. These probes were derived from the sequence of pepstatin, a natural specific inhibitor

of aspartic proteases. Using cell lysates, it was shown that these probes can be used for the detection of cathepsin D as a prognostic marker of tumor diseases.

- 6) Specific selective substrates and inhibitors were identified that allow the profiling of the individual activities of epidermal serine proteases of kallikrein type in biological extracts. This detection system was used for the analysis of kallikreins in genetically modified mice, which serve as a model for skin pathologies.
- 7) The inhibitory specificity of the Kunitz inhibitor BbKI was determined. BbKI was identified as the most effective natural inhibitor of medically important human kallikreins with preference for kallikrein 4, which is involved in cancer. The mechanism of the interaction between BbKI and kallikreins was explained by molecular modeling using the solved 3D structure of the BbKI-trypsin complex.

## 6. References

- Bendre, A. D., S. Ramasamy, and C. G. Suresh. 2018. "Analysis of Kunitz Inhibitors from Plants for Comprehensive Structural and Functional Insights." *International Journal of Biological Macromolecules* 113: 933–43.
- Barao, S., D. Moechars, S. F. Lichtenthaler, and B. De Strooper. 2016. "BACE1 Physiological Functions May Limit Its Use as Therapeutic Target for Alzheimer's Disease." *Trends in Neurosciences* 39 (3): 158–69.
- Beneš, P., V. Vetvicka, and M. Fusek. 2008. "Cathepsin D-Many Functions of One Aspartic Protease." *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 68 (1): 12–28.
- Dvořák, J., and M. Horn. 2018. "Serine Proteases in Schistosomes and Other Trematodes." *International Journal for Parasitology* 48 (5): 333–44.
- Huntington, J. A.. 2014. "Natural Inhibitors of Thrombin." *Thrombosis and Haemostasis* 111 (4): 583–89.
- Krowarsch, D., T. Cierpicki, F. Jelen, and J. Otlewski. 2003. "Canonical Protein Inhibitors of Serine Proteases." *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS* 60 (11): 2427–44.
- Kryza, T., M. L. Silva, D. Loessner, N. Heuze-Vourc'h, and J. A. Clements. 2016. "The Kallikrein-Related Peptidase Family: Dysregulation and Functions during Cancer Progression." *Biochimie* 122: 283–99.
- Law, R. H. P., Q. Zhang, S. McGowan, A. M. Buckle, G. A. Silverman, W. Wong, C. J. Rosado, et al. 2006. "An Overview of the Serpin Superfamily." *Genome Biology* 7 (5): 216.
- Li, M., L. H. Phylip, W. E. Lees, J. R. Winther, B. M. Dunn, A. Wlodawer, J. Kay, and A. Gustchina. 2000. "The Aspartic Proteinase from *Saccharomyces Cerevisiae* Folds Its Own Inhibitor into a Helix." *Nature Structural Biology* 7 (2): 113–17.
- Máša, M., L. Marešova, J. Vondrášek, M. Horn, J. Ježek, and M. Mareš. 2006. "Cathepsin D Propeptide: Mechanism and Regulation of Its Interaction with the Catalytic Core." *Biochemistry* 45 (51): 15474–82.
- Ng, K. K., J. F. Petersen, M. M. Cherney, C. Garen, J. J. Zalatoris, C. Rao-Naik, B. M. Dunn, M. R. Martzen, R. J. Peanasky, and M. N. James. 2000. "Structural Basis for the Inhibition of Porcine Pepsin by *Ascaris* Pepsin Inhibitor-3." *Nature Structural Biology* 7 (8): 653–57.
- Oliva, M. L. V., and U. M. Sampaio. 2008. "Bauhinia Kunitz-Type Proteinase Inhibitors: Structural Characteristics and Biological Properties." *Biological Chemistry* 389 (8): 1007–13.
- Rawlings, N. D., and A. J. Barrett. 2010. "MEROPS: The Peptidase Database." *Nucleic Acids Research* 38 (1): 325–31.
- Rawlings, N. D., and G. Salvesen. 2013. *Handbook of Proteolytic Enzymes*. Elsevier.
- Sanman, L. E., and M. Bogyo. 2014. "Activity-Based Profiling of Proteases." *Annual Review of Biochemistry* 83: 249–73.
- Sojka, D., D. Hartmann, P. Bartošová-Sojková, and J. Dvořák. 2016. "Parasite Cathepsin D-Like Peptidases and Their Relevance as Therapeutic Targets." *Trends in Parasitology* 32 (9): 708–23.
- Sun, H., X. Lou, Q. Shan, J. Zhang, X. Zhu, J. Zhang, Y. Wang, Y. Xie, N. Xu, and S. Liu. 2013. "Proteolytic Characteristics of Cathepsin D Related to the Recognition and Cleavage of Its Target Proteins." *PLoS One* 8 (6): e65733.

# Curriculum Vitae

## Personal details:

**Name and surname, title:** Jaroslav Srp, Mgr.

**Birth date and place:** June 8, 1985, Prague

**Nationality:** Czech

**Phone:** +420 220 183 470

**E-mail:** srp@uochb.cas.cz

## Education:

- Since 2010                    ***Ph.D. study:*** Charles University in Prague, Faculty of Science  
Ph.D. program: Biochemistry  
Ph.D. thesis: Regulation of the activity of aspartic and serine proteases by selective natural inhibitors  
Workplace: Institute of Organic Chemistry and Biochemistry of the CAS  
Supervisor: RNDr. Michael Mareš, CSc.
- 2008 - 2010                    ***Master study:*** Charles University in Prague, Faculty of Science,  
M.Sc. program: Biochemistry  
Master thesis: Digestive aspartic protease of Colorado potato beetle  
Workplace: Institute of Organic Chemistry and Biochemistry of the CAS  
Supervisor: doc. RNDr. Jan Konvalinka, CSc.  
Reviewer: doc. RNDr. Věra Jonáková, DrSc.
- 2005 - 2008                    ***Bachelor study:*** Charles University in Prague, Faculty of Science  
Bachelor program: Biochemistry  
Bachelor thesis: Gene expression of receptors for oxytocin in some brain areas and in the heart  
Workplace: Institute of Medical Biochemistry and Laboratory Diagnostics, The First Faculty of Medicine of Charles University  
Supervisor: doc. MUDr. Věra Klenerová, DrSc.  
Reviewer: RNDr. Jiřina Slaninová, CSc.

## Employment:

- Since 09/2006                    ***Ph.D. Student***  
Institute of Organic Chemistry and Biochemistry AS CR  
Senior research group: Cathepsin Proteases in Pathology

## Language skills:

English: fluent, FCE (3/2015)

German: elementary

### **Courses:**

FEBS Advanced Course in Protein Crystallization, Nové Hradý	(2012)
LC/GC Chemstation course on LC/GC systems (Agilent), Prague	(2012)
Course on Real-Time PCR (SEQme s. r. o.), Prague	(2013)
EBI Bioinformatics Workshop, Prague	(2013)
ZEISS on Your Campus Workshop Series, a microscopy workshop, Prague	(2013)
IPS training workshops on “Protease Kinetics”, Cape Town, JAR	(2013)
FEBS Advanced Course: Ligand-binding Theory and Practice, Nové Hradý	(2014)
Computational Approaches in Macromolecular Crystallography, Nové Hradý	(2015)

### **Meetings and conferences - presentations:**

**Srp J.**, Nussbaumerova M., Sanda M., Stajfova M., Horn M., Mares M.: Plant-Insect Proteomic: Interaction of Plant Defense Protein with Insect Digestive Protease. Conference: International Conference on Proteomics in Plants, Microorganisms and Environment; Luxemburg, Luxembourg (2010). Poster

**Srp J.**, Nussbaumerova M., Sanda M., Stajfova M., Horn M., Mares M.: Proteomic and Biochemical Analysis of Insect Digestive Proteases Targeted by Plant Defense Proteins. Conference: Final COST Meeting “Plant Proteomics in Europe: where do we stand and where are we heading to?”; Dijon, Francie (2011). Poster

**Srp J.**, Zbrakovska I., Nussbaumerova M., Masa M., Rezacova P., Horn M., Mares M.: Regulation of activity of human and insect cathepsin D. Conference: Gordon Research Conference: Proteolytic Enzymes and Their Inhibitors; Lucca, Italy (2012). Poster

**Srp J.**, Nussbaumerova M., Rezacova P., Žbrakovská I., Pachtl P., Sanda M., Stajfova M., Horn M., Mares M.: Interaction of Plant Defense Protein with Insect Digestive Aspartic Peptidase. Conference: FEBS Advanced Course in Protein Crystallization; Nové Hradý (2012). Poster

**Srp J.**, Nussbaumerova M., Sanda M., Stajfova M., Horn M., Mares M.: Interakce rostlinného obraného proteinu s hmyzí trávicí aspartátovou peptidasou. Conference: XII Mezioborové setkání mladých biologů, biochemiků a chemiků; Resort Svatá Kateřina - Počátky (2012). Poster

**Srp J.**, Nussbaumerova M., Illner J., Horn M., Mares M.: Activity-Based Profiling and Imaging of Digestive Proteolytic Enzymes of Colorado Potato Beetle. Conference: The 8th General Meeting of the International Proteolysis Society; Cape Town, South Africa (2013). Poster

**Srp J.**: A bug's life: Structure & regulation of digestive cathepsins D. Conference of the IOCB CAS; Harrachov (2014).

**Srp J.**, Nussbaumerova M., Rezacova P., Hanova I., Horn M., Mares M.: Insect digestive aspartic protease targeted by a plant defense protein. Conference: FEBS Advanced Course: Ligand-binding Theory and Practice; Nové Hradý (2014). Poster

**Srp J.**, Hanova I., Brynda J., Rezacova P., Sojka D., Kopacek P., Horn M., Mares M.: Structure and activity of digestive cathepsins D of ticks and insects. Conference: 13<sup>th</sup> International Congress of Parasitology; Mexico City, Mexico (2014). Poster



**Srp J.**, Pachl P., Rezacova P., Vondrasek J., Nussbaumerova M., Horn M., Mares M.: Structures of cathepsin D and its inhibitor involved in plant-insect interaction. Conference: 9<sup>th</sup> General meeting of the International Proteolysis Society; Penang, Malaysia (2015). Poster

**Srp J.**, Pachl P., Rezacova P., Vondrasek J., Nussbaumerova M., Horn M., Mares M.: A Plant-Insect Interaction in 3D. Conference: XIII Discussions in Structural Molecular Biology; Nové Hrady (2015). Poster

**Srp J.**, Pachl P., Horn M., Mares M.: Plant protease inhibitors from Kunitz family: structural and functional diversity. Conference: XXXIII<sup>rd</sup> Winter School on Proteinases and Their Inhibitors; Tiers, Italy (2016). Presentation

**Srp J.**, Pachl P., Horn M., Mares M.: Crystal structure of plant defense protein in complex with serine protease. Conference: XIV Discussions in Structural Molecular Biology; Nové Hrady (2016). Poster

**Benýšek J.**, Kovarova Z., Mishra M., Brynda J., Busa M., **Srp J.**, Rezacova P., Horn M., Mares M.: Novel inhibition scaffolds targeting human cysteine cathepsins. Conference: XIV Discussions in Structural Molecular Biology; Nové Hrady (2016). Poster

**Srp J.**, Pachl P., Mishra M., Horn M., Mares M.: A novel non-canonical binding mode for serine proteases on plant Kunitz inhibitors. Conference: 42<sup>nd</sup> FEBS Congress; Jerusalem, Israel (2017). Poster

**Srp J.**, Pachl P., Kukacka Z., Brynda J., Mishra M., Horn M., Novak P., Mares M.: Potato Kunitz inhibitors evolved a novel non-canonical binding mode for serine proteases. Conference: 7<sup>th</sup> Symposium on Structural Proteomics; Vienna, Austria (2017). Poster

**Srp J.**: From Bugs to Drugs: New Inhibitory Motifs Designed by Nature. Conference: PhD Science Club, IOCB CAS; Prague (2017). Presentation

**Srp J.**, Pachl P., Kukacka Z., Brynda J., Mishra M., Horn M., Novak P., Mares M.: Structural characterization of a novel type of reactive site for inhibition of serine proteases. Conference: XV Discussions in Structural Molecular Biology; Nové Hrady (2018). Poster

**Srp J.**, Pachl P., Mishra M., Horn M., Mares M.: Structural characterization of a novel, non-canonical reactive site against serine proteases on plant Kunitz inhibitors. Conference: Gordon Research Conference on Proteolytic Enzymes and Their Inhibitors; Lucca, Italy (2018). Poster

**Srp J.**: Inhibitory motifs against proteases designed by plants. Conference of the IOCB CAS; Valeč (2018). Presentation

**Gustchina A.**, Li M., **Srp J.**, Dauter Z., Mares M., Wlodawer A.: Crystal Structures of the Complex of Kallikrein Inhibitor BbKI with Trypsin and a Comparison of its Inhibitory Properties for Various Kallikreins. Conference: 43<sup>rd</sup> FEBS Congress; Prague (2018). Poster

## Selected Publications

**Srp J.**, Nussbaumerova M., Horn M., Mares M.: Digestive proteolysis in the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*: Activity-based profiling and imaging of a multi-peptidase network; *Insect Biochem Mol Biol*, (78), 1-11 (2016). IF = 3,562

Zebrakovska I., Masa M., **Srp J.**, Horn M., Vavrova K., Mares M.: Complex modulation of peptidolytic activity of cathepsin D by sphingolipids; *Biochim Biophys Acta*, (12), 1097-1104 (2011). IF = 3,679

Nussbaumerova M., **Srp J.**, Masa M., Hradilek M., Sanda M., Reinis M., Horn M., Mares M.: Single- and double-headed chemical probes for detection of active cathepsin D in a cancer cell proteome; *Chembiochem*, (11), 1538-1541 (2010). IF = 2,774

Horn M., Zbodakova O., Kasperek P., **Srp J.**, Haneckova R., Hradilek M., Mares M., Sedlacek R.: Profiling system for skin kallikrein proteolysis applied in gene deficient mouse models; *Biol Chem*, (9), 1085-1089 (2018). IF = 3,022

Li M., **Srp J.**, Gustchina A., Dauter Z., Mares M., Wlodawer A.: Crystal structures of the complex of kallikrein inhibitor BbKI with trypsin and modeling of kallikrein complexes; manuscript under review in *Acta Crystallographica Section D*, (2018). IF = 3,009

**Srp J.**, Mares M.: Plant Kunitz Protease Inhibitors: Structural and Functional Diversity; *Chem listy*, (110), 761–768 (2016). IF = 0,260