

**Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta**

**Katedra biochemie**

Doktorský studijní program: Biochemie

Autoreferát disertační práce



Nové inhibiční mechanismy regulace aktivity katepsinu D

**Iva Hánová**

Školitel: RNDr. Michael Mareš, CSc.

Školitel-konzultant: doc. RNDr. Jan Konvalinka, CSc.

Praha 2020

## **Obsah**

|  |    |
|--|----|
| Seznam zkratk.....                         | 1  |
| Abstrakt.....                              | 2  |
| 1. Úvod.....                               | 3  |
| 2. Cíle práce.....                         | 4  |
| 3. Materiály a metody.....                 | 4  |
| 3.1. Materiály a laboratorní vybavení..... | 4  |
| 3.2. Metody.....                           | 5  |
| 4. Výsledky a diskuze.....                 | 5  |
| 5. Závěry.....                             | 8  |
| 6. Použitá literatura.....                 | 9  |
| Curriculum vitae.....                      | 11 |
| Seznam publikací.....                      | 12 |

## Seznam zkratk

|                  |   |
|------------------|---|
| IC <sub>50</sub> | koncentrace inhibitoru potřebná k dosažení 50% inhibice enzymu              |
| IrKatD1          | katepsin D1 z klíštěte obecného ( <i>Ixodes ricinus</i> )                   |
| KatD             | katepsin D  |
| K <sub>d</sub>   | disociační konstanta  |
| k <sub>cat</sub> | číslo přeměny   |
| K <sub>i</sub>   | inhibiční konstanta   |
| K <sub>M</sub>   | Michaelisova konstanta  |
| proIrKatD1       | proenzym katepsinu D1 z klíštěte obecného ( <i>Ixodes ricinus</i> )         |
| proKatD          | prokatepsin D   |
| PVDF             | polyvinylidifluorid   |
| RP-HPLC          | „Reverse Phase High Performace Liquid Chromatography“                       |
| SDS-PAGE         | elektroforéza na polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsírany sodného |
| ÚOCHB            | Ústav organické chemie a biochemie AV ČR                                    |

## **Abstrakt**

Aspartátová proteasa katepsin D (KatD) je spojená s řadou patologií, a proto jsou zkoumány molekulární mechanismy regulace její aktivity, které mají potenciální využití v biomedicíně. Tato disertační práce je zaměřena na nové přirozené endogenní inhibitory KatD, analýzu jejich interakce a na odvození syntetických inhibičních biomimetik.

Byly identifikovány dvě skupiny inhibitorů KatD jako prvních specifických endogenních regulátorů tohoto enzymu. (1) Sfingolipidy jsou komplexními modulátory lidského KatD v závislosti na struktuře. Zatímco sfingosiny a ceramidy jsou inhibitory KatD, jejich fosforylované deriváty naopak fungují jako aktivátory KatD. Byla nalezena korelace mezi působením těchto sfingolipidů na KatD a jejich modulačním účinkem na nádorové buňky. (2) Analýzou KatD parazitárního původu byl identifikován nový mechanismus inhibice, který je konzervovaný u aspartátových proteas rodiny pepsinu. Autokatalytickým působením je z proenzymu KatD uvolněn peptidový fragment, který působí jako alosterický inhibitor, jenž se váže do exomísta na povrchu aktivního enzymu. Dále byly připraveny syntetické makrocyclické inhibitory lidského KatD, které mimikují vazebnou konformaci bakteriálního inhibitoru pepstatinu v aktivním místě aspartátových proteas. U těchto biomimetických inhibitorů lze na základě provedené analýzy strukturně-funkčních vztahů cíleně modifikovat vlastnosti.

Disertační práce přináší významné informace o třech nových typech inhibitorů KatD a regulačních mechanismech, které mohou být využity pro racionální navrhování inhibičních léčiv u patologií spojených s aspartátovými proteasami typu KatD.

## 1. Úvod

Aspartátové proteasy jsou široce rozšířené enzymy, které se podílejí na řadě fyziologických procesů (např. lysozomální degradaci proteinů nebo apoptóze) a také patologiích jako jsou neurodegenerativní, nádorová a parazitární onemocnění<sup>1,2</sup>. Na základě homologie aminokyselinové sekvence se aspartátové proteasy dělí na pět klanů a třináct rodin, z nichž nejznámější je rodina A1 – rodina pepsinu<sup>3</sup>. Pro proteasy této rodiny je nezbytná přesná regulace aktivity, která probíhá na několika úrovních, včetně regulace na úrovni proteinu. Nejprve jsou tyto proteasy syntetizovány ve formě neaktivních proenzymů (zymogenů), které se stávají katalyticky aktivními až po odštěpení tzv. propeptidu z N-konce proenzymu, čímž vzniká zralý, plně funkční enzym<sup>4</sup>. V dalším kroku může být aktivita zralého enzymu regulována inhibitory a aktivátory; o těchto molekulách, zejména endogenního původu, je zatím málo známo. Tato práce se zabývá mechanismy regulace aktivity katepsinu D (KatD) z rodiny pepsinu, které byly studovány jednak pro lidský KatD a jednak katepsin D1 z klíštěte obecného (*Ixodes ricinus*) (IrKatD1).

Lidský KatD se za fyziologických podmínek nachází v lysozomech, kde se podílí na odbourávání strukturálních a funkčních proteinů<sup>5</sup>. Během apoptózy se také dostává z lysozomů do cytosolu, kde se účastní proteolýzy iniciačních a mediátorových proteinů apoptózy a tím přispívá k rozvoji apoptotického procesu<sup>6-8</sup>. U nádorových onemocnění byla pozorována zvýšená exprese a sekrece KatD, který pak působí jako autokrinní růstový faktor a také degraduje extracelulární matrix, čímž napomáhá šíření a růstu nádoru<sup>9-12</sup>. KatD je prognostickým markerem a cílovou molekulou pro terapii nádorového onemocnění prsu<sup>13</sup>. Dále je lidský KatD spojován s rozvojem Alzheimerovy choroby a aterosklerózou<sup>14,15</sup>.

Klíště obecné (*Ixodes ricinus*) je přenašečem klíšťové encefalitidy a lymfské boreliózy. Hemoglobin získaný sáním krve hostitele je pro klíště hlavním zdrojem aminokyselin<sup>16</sup>. IrKatD1 hraje klíčovou roli při degradaci hemoglobinu ve střevu klíštěte, kde zahajuje proteolytickou kaskádu procesu trávení<sup>17</sup>. Proenzym IrKatD1 (proIrKatD1) se od příbuzných proteas liší velmi krátkým propeptidem, jehož struktura a regulační funkce nebyla dosud studována.

Předkládaná práce popisuje nové mechanismy regulace proteolytické aktivity aspartátových proteas typu KatD. Zaměřuje se zejména na identifikaci a charakterizaci

přirozených endogenních inhibitorů těchto proteas a dále na možnosti odvození syntetických biomimetických inhibitorů s potenciálním využitím jako chemoterapeutik.

## 2. Cíle práce

Disertační práce má tyto dílčí cíle:

1. Popsat působení bioaktivních sfingolipidů na funkci lidského KatD. Zejména analyzovat vztah mezi strukturou sfingolipidů a proteolytickou aktivitou KatD a vliv faktorů prostředí na interakci. Diskutovat možný vztah k patofyziologii.
2. Na katepsinu D1 z klíštěte obecného (IrKatD1) analyzovat strukturně funkční vztahy v tzv. aktivačním peptidu (propeptidu) s využitím proteinové krystalografie a biochemických metod. Identifikovat inhibiční motiv ve struktuře propeptidu, studovat jeho interakci s IrKatD1 a diskutovat význam tohoto regulačního mechanismu pro aspartátové proteasy.
3. Studovat funkční vlastnosti biomimetických makrocyclických inhibitorů odvozených ze struktury pepstatinu, mikrobiálního inhibitoru aspartátových proteas, zejména inhibiční interakci s lidským KatD, selektivitu a vlastnosti umožňující posoudit jejich potenciální využití pro vývoj léčiv.

## 3. Materiály a metody

Tato kapitola stručně popisuje základní materiály, vybavení a metodiky použité během vypracování disertační práce. Podrobné informace jsou uvedené v příložených publikacích.

### 3.1. Materiály a laboratorní vybavení

Většina výsledků byla získaná s využitím laboratorního vybavení na Ústavu organické chemie a biologie AV ČR (ÚOCHB). Sběr difrakčních dat pro rentgenostrukturní analýzu proteinových krystalů proběhl na synchrotronu Bessy II electron storage ring v Helmholtz-Zentrum v Berlíně v Německu a na synchrotronu ESRF v Grenoblu ve Francii. Krystalové struktury byly řešeny ve spolupráci s laboratoří Strukturní biologie na ÚOCHB. Peptidové a peptidomimetické inhibitory a nekomerční substráty byly syntetizovány ve skupině Medicinální chemie na ÚOCHB. Sady komerčních krystalizačních roztoků byly od firem Jena Bioscience, Molecular Dimensions a Hampton Research.

### 3.2. Metody

Uveden je výčet hlavních metod popsanych v příložených publikacích:

#### *Metody molekulární biologie:*

Klonování genu proIrKatD1 do plasmidu pET101/D-TOPO, mutageneze katalytického aspartátu D231N proIrKatD1 konstruktů, transformace buněk *E. coli* BL21(DE), rekombinantní exprese dvou forem proIrKatD1 (přirozené formy a katalyticky neaktivní formy) v *E. coli*.

#### *Biochemické metody:*

Izolace proIrKatD1 z inkluzních tělísek, renaturace proIrKatD1, jeho aktivace a purifikace chromatografickými metodami (ionexová, gelová a afinitní chromatografie); chromatografická izolace lidského KatD z tkání placent. Elektroforetická separace proteinů na SDS-PAGE, separace peptidů na RP-HPLC, určení N-koncové sekvence proteinů přenesených na PVDF membránu, kvantifikace peptidových substrátů a inhibitorů pomocí aminokyselinové analýzy.

#### *Enzymologické metody:*

Měření aktivit enzymů na fluorescenční čtečce (Tecan) pomocí FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) peptidových substrátů, stanovení kinetických parametrů  $IC_{50}$ ,  $K_m$ ,  $K_i$ ,  $k_{cat}$ , určení módu inhibice. Stanovení hodnoty disociační konstanty  $K_d$  s využitím měření termoforetického efektu na přístroji Monolith NT.115 (NanoTemper).

#### *Krystalografické metody:*

Příprava molekulárních forem a inhibičních komplexů IrKatD1 pro krystalizaci, vyhledání krystalizačních podmínek a jejich optimalizace. Analýza intermolekulárních interakcí ve 3D modelech a molekulární grafika.

## 4. Výsledky a diskuze

Výsledky disertační práce jsou shrnuty v celkem třech článcích publikovaných v oborových mezinárodních impaktovaných časopisech.

*Publikace č. 1: Complex modulation of peptidolytic activity of cathepsin D by sphingolipids.*

Tato publikace popisuje modulaci aktivity lidského KatD bioaktivními sfingolipidy. Pomocí panelu přirozených i syntetických sfingolipidů je zde podrobně popsán vliv struktury sfingolipidů na aktivitu KatD. Byly identifikovány konkrétně sfingolipidy vykazující sub-mikromolární kompetitivní inhibici KatD. Tyto sfingolipidy se pravděpodobně vážou do aktivního centra enzymu, které na základě substrátové specifity preferuje hydrofobní aminokyseliny. Odvozené fosfosfingolipidy, s fosforylací na C1 uhlíku, naopak zvyšují katalytickou účinnost KatD. Uvedené výsledky byly diskutovány v kontextu známého antagonistického působení sfingolipidů vs. fosfosfingolipidů při modulaci procesů apoptózy a buněčného dělení, kterých se KatD také účastní<sup>18–20</sup>. Dále bylo prokázáno, že v přítomnosti fosfosfingolipidů dochází k posunu pH optima KatD o přibližně jednu jednotku do neutrální oblasti, což je významné pro zvýšenou aktivitu KatD v mírně acidifikovaném prostředí nádorových tkání. Sfingolipidy nemají vliv na aktivitu modelových zástupců jiných tříd proteas ani ostatní aspartátové proteasy rodiny pepsinu a jedná se tedy o velmi specifickou regulaci aktivity lidského KatD. Protože k modulaci aktivity KatD vlivem sfingolipidů dochází i v přítomnosti liposomů, které simulují přítomnost buněčných membrán, je tento děj relevantní ve fyziologických podmínkách.

*Publikace č. 2: Novel structural mechanism of allosteric regulation of aspartic peptidases via an evolutionarily conserved exosite.*

Proenzymy aspartátových proteas mají na N-konci molekuly tzv. propeptid, který je během procesu aktivace odštěpen za vzniku zralého, katalyticky aktivního enzymu. Druhá publikace je zaměřena na strukturně funkční analýzu propeptidu u IrKatD1, katepsinu D1 z klíštěte obecného (*Ixodes ricinus*). Tento propeptid je velmi krátký v porovnání s propeptidy jiných pepsinových proteas a představuje tak ideální prototyp pro studium vlastností této domény.

S využitím krystalografických struktur proenzymu i zralého enzymu byl detailně popsán proces autoaktivace proIrKatD1 a analyzována úloha propeptidu. N-koncová část intaktního propeptidu se váže na povrch proenzymu v pozici, která byla označena jako exomísto. Bylo zjištěno, že tato část propeptidu je ve formě oligopeptidového fragmentu vyštěpena a uvolněna během autoaktivace a působí zpětně jako silný nanomolární inhibitor zralého enzymu. Z krystalové struktury inhibičního komplexu syntetického oligopeptidu s IrKatD1 je zřejmé, že vazba oligopeptidu do exomísta indukuje alosterickou konformační změnu



v aktivním centru IrKatD1, které se tak stane nedostupné pro substrát. Schopnost inhibitoru vázat se do exomísta je závislá na pH, což může hrát významnou roli během biogeneze trávicích vakuol klíštěte, kdy dochází k výrazným změnám pH. IrKatD1 je klíčová trávicí proteasa klíštěte, a tak tento inhibiční mechanismus představuje účinný způsob regulace degradace proteinů z krve hostitele.

Vzhledem k sekvenční a strukturální homologii propeptidů u pepsinových proteas je pravděpodobné, že vznik a působení endogenních alosterických inhibitorů jsou evolučně konzervované. Získané výsledky tak umožňují vývoj nové třídy inhibitorů cílených na exomísto příbuzných medicínálně významných proteas.

*Publikace č. 3: Biomimetic macrocyclic inhibitors of human cathepsin D: structure-activity relationship and binding mode analysis.*

Publikace je zaměřena na racionální navrhování nových inhibitorů lidského KatD, které byly odvozeny ze struktur lineárního mikrobiálního peptidu pepstatinu. Tento nejúčinnější přirozený inhibitor aspartátových proteas není vhodný jako terapeutické agens kvůli své nadměrné velikosti a nepříznivým fyzikálně-chemickým a farmakokinetickým vlastnostem<sup>21</sup>. V práci byla analyzována změna konformace pepstatinu, ke které dochází při jeho interakci s aktivním centrem KatD. Indukovaná konformace byla stabilizována navržením makrocyclické peptidové kostry, která vazebný mód mimikuje. Bylo připraveno více než 30 modifikovaných derivátů s výrazně menší molekulovou hmotností oproti pepstatinu, u kterých byla optimalizována stavba kostry a substituce v klíčových polohách.

Získané silné reverzibilní inhibitory KatD (funkční v nanomolárních koncentracích) vykazovaly výraznou selektivitu pro proteasy strukturálně blízké KatD. Pro komplexy tří inhibitorů byla vyřešena prostorová struktura rentgenostrukturální analýzou a byly analyzovány příspěvky jednotlivých částí makrocyclické kostry k inhibici. Připravené inhibitory splňují kritéria fyzikálně-chemických parametrů pro navrhování léčiv, jsou proteolyticky stabilní a netoxické. Představují perspektivní templát pro vývoj chemoterapeutik proti patologiím spojených s lidským KatD.

## 5. Závěry

Disertační práce se zabývá novými mechanismy regulace proteolytické aktivity katepsinu D (KatD) a příbuzných aspartátových proteas. Výsledky jsou shrnuty ve třech původních publikacích. Práce přináší zejména objev přirozených endogenních inhibitorů studovaných proteas a dále vývoj syntetických biomimetických inhibitorů. Studované nové typy inhibitorů představují molekulární templáty pro navrhování potenciálních léčiv.

V rámci disertační práce byly splněny zadané cíle s následujícími hlavními závěry:

### Regulace aktivity KatD pomocí sfingolipidů

Sfingolipidy byly identifikovány jako první endogenní inhibitory lidského KatD. Detailně byl analyzován vliv struktury sfingolipidů na jejich funkci: sfingolipidy typu sfingosinu a ceramidu účinně inhibovaly KatD, zatímco jejich fosforylované deriváty působily jako aktivátory enzymu a ovlivňovaly jeho pH optimum. Komplexní modulace aktivity pomocí sfingolipidů byla specifická pro lidský KatD a u jiných testovaných proteas nebyla zjištěna. Dále byla nalezena korelace mezi působením bioaktivních sfingolipidů na lidský KatD a jejich dříve popsaným modulačním účinkem na nádorové buňky, což naznačuje účast tohoto molekulárního interakčního systému v patofyziologických procesech.

### Regulace aktivity KatD pomocí alosterické inhibice

U katepsinu D z klíštěte obecného (IrKatD1) byla pomocí strukturní a biochemické analýzy popsána aktivace neaktivního proenzymu na zralý aktivní enzym. Bylo zjištěno, že autokatalytickou proteolýzou je během tohoto procesu generován peptidový fragment pocházející z propeptidové domény, který funguje jako inhibitor zralého enzymu. Inhibitor se váže do exomísta na povrchu enzymu a působí unikátním alosterickým mechanismem. Jde o první peptidový endogenní inhibitor aspartátových proteas u vyšších organismů. Výsledky naznačují, že popsaná regulace aktivity je evolučně konzervovaná a vyskytuje se i u příbuzných proteas. Jejich exomísto představuje perspektivní molekulární cíl pro vývoj nových alosterických inhibitorů.

### Regulace aktivity KatD pomocí biomimetických inhibitorů

Byly navrženy syntetické makrocyclické inhibitory lidského KatD, které napodobují vazebnou konformaci bakteriálního inhibitoru pepstatinu v aktivním místě aspartátových proteas. U těchto biomimetických inhibitorů byl popsán vazebný mód v aktivním centru

lidského KatD pomocí strukturní a výpočetní analýzy. Na základě provedeného rozboru strukturně-funkčních vztahů lze cíleně modifikovat funkční vlastnosti inhibitorů včetně jejich specificity. Připravené makrocykly jsou proteolyticky stabilní a netoxické a splňují kritéria fyzikálně-chemických parametrů pro vývoj chemoterapeutik.

## 6. Použitá literatura

1. Rawlings ND, Barrett AJ. Introduction: Aspartic and Glutamic Peptidases and Their Clans. In: Rawlings ND, Salvensen GS, eds. *Handbook of Proteolytic Enzymes*. Third Edit. Elsevier Ltd; 2013:3-19.
2. Sojka D, Hartmann D, Bartošová-Sojková P, Dvořák J. Parasite Cathepsin D-Like Peptidases and Their Relevance as Therapeutic Targets. *Trends Parasitol.* 2016;32(9):708-723.
3. MEROPS - the Peptidase Database. Accessed January 18, 2019. [https://www.ebi.ac.uk/merops/cgi-bin/family\\_index?type=P](https://www.ebi.ac.uk/merops/cgi-bin/family_index?type=P)
4. Tang J, Wong RNS. Evolution in the structure and function of aspartic proteases. *J Cell Biochem.* 1987;33(1):53-63.
5. Benes P, Vetvicka V, Fusek M. Cathepsin D—Many functions of one aspartic protease. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2008;68(1):12-28.
6. Appelqvist H, Johansson A-C, Linderöth E, et al. Lysosome-mediated apoptosis is associated with cathepsin D-specific processing of bid at Phe24, Trp48, and Phe183. *Ann Clin Lab Sci.* 2012;42(3):231-242.
7. Haendeler J, Popp R, Goy C, Tischler V, Zeiher AM, Dimmeler S. Cathepsin D and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Stimulate Degradation of Thioredoxin-1. *J Biol Chem.* 2005;280(52):42945-42951.
8. Emert-Sedlak L, Shangary S, Rabinovitz A, Miranda MB, Delach SM, Johnson DE. Involvement of cathepsin D in chemotherapy-induced cytochrome c release, caspase activation, and cell death. *Mol Cancer Ther.* 2005;4(5):733-742.
9. Maynadier M, Farnoud R, Lamy P-J, Laurent-Matha V, Garcia M, Rochefort H. Cathepsin D stimulates the activities of secreted plasminogen activators in the breast cancer acidic environment. *Int J Oncol.* 2013;43(5):1683-1690.
10. Garcia M, Platet N, Liaudet E, et al. Biological and clinical significance of cathepsin D in breast cancer metastasis. *Stem Cells.* 1996;14(6):642-650.
11. Scott PG, Pearson CH. Cathepsin D: Cleavage of soluble collagen and crosslinked peptides. *FEBS Lett.* 1978;88(1):41-45.
12. Roughley PJ. The degradation of cartilage proteoglycans by tissue proteinases. Proteoglycan heterogeneity and the pathway of proteolytic degradation. *Biochem J.* 1977;167(3):639-646.
13. Dubey V, Luqman S. Cathepsin D as a Promising Target for the Discovery of Novel Anticancer Agents. *Curr Cancer Drug Targets.* 2017;17(5):404-422.

14. Malik M, Fenko MD, Sheikh AM, Wen G, Li X. A Novel Approach for Characterization of Cathepsin D Protease and Its Effect on Tau and  $\beta$ -Amyloid Proteins. *Neurochem Res*. 2011;36(5):754-760.
15. Zhao CF, Herrington DM. The function of cathepsins B, D, and X in atherosclerosis. *Am J Cardiovasc Dis*. 2016;6(4):163-170.
16. Volf P, Horák P. Podřád Metastigmata (Ixodida). In: *Paraziti a Jejich Biologie*. Triton; 2007:260-264.
17. Horn M, Nussbaumerová M, Šanda M, et al. Hemoglobin Digestion in Blood-Feeding Ticks: Mapping a Multi-peptidase Pathway by Functional Proteomics. *Chem Biol*. 2009;16(10):1053-1063.
18. Minarowska A, Minarowski Ł, Karwowska A, Gacko M. Regulatory role of cathepsin D in apoptosis. *Folia Histochem Cytobiol*. 2007;45(3):159-163.
19. Liaudet-Coopman E, Beaujouin M, Derocq D, et al. Cathepsin D: newly discovered functions of a long-standing aspartic protease in cancer and apoptosis. *Cancer Lett*. 2006;237(2):167-179.
20. Young MM, Kester M, Wang H-G. Sphingolipids: regulators of crosstalk between apoptosis and autophagy. *J Lipid Res*. 2013;54(1):5-19.
21. Tumminello FM, Bernacki RJ, Gebbia N, Leto G. Pepstatins: aspartic proteinase inhibitors having potential therapeutic applications. *Med Res Rev*. 1993;13(2):199-208.

## Curriculum vitae

Jméno a příjmení: Iva Hánová, rozená Žebrakovská

Datum a místo narození: 26. 3. 1984 v Praze

Národnost: česká

Telefon: +420 220 183 287

E-mail: iva.hanova@uochb.cas.cz

### Vzdělání:

od 2008 **Postgraduální studium:** Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, Katedra biochemie, Studijní obor: Biochemie

*Disertační práce:* Nové mechanismy regulace aktivity katepsinu D vypracovaná na Ústavu organické chemie a biochemie AV ČR

Školitel: RNDr. Michael Mareš, CSc.

říjen 2014 – březen 2019 přerušení studia kvůli mateřské dovolené

2006-2008 **Magisterské studium:** Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, Katedra biochemie, Studijní obor: Biochemie

*Diplomová práce:* Expres a aktivace katepsinu D

vypracovaná na Ústavu organické chemie a biochemie AV ČR

Školitel: RNDr. Michael Mareš, CSc.

Oponent: RNDr. Milan Fábry, CSc.

2003-2006 **Bakalářské studium:** Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, Katedra biochemie, Studijní obor: Biochemie

*Bakalářská práce:* Nepeptidové inhibitory HIV proteasy

vypracovaná na Ústavu organické chemie a biochemie AV ČR

Školitel: doc. RNDr. Jan Konvalinka, CSc.

Oponent: prof. RNDr. Jiří Hudeček, CSc.

### Zaměstnání:

od 11/2008 Ph.D. studentka

Ústav organické chemie a biochemie AV ČR

skupina: Katepsinové proteasy v patologii

Jazyky: angličtina: C2 (CAE březen 2011), francouzština: B1

### Kurzy:

Workshop on Eukaryotic Expression – říjen 2009

qPCR a q-Seminář – listopad 2010 a duben 2011

International School of Crystallization – duben 2009

LC/GC Chemstation kurz – duben 2012

### Konference:

XI. mezioborové setkání mladých biologů, biochemiků a chemiků – květen 2011. Příprava a prezentace plakátu „Sfingolipidy jsou nové modulátory aktivity katepsinu D.“

## Seznam publikací:

**Publikace č. 1: Complex modulation of peptidolytic activity of cathepsin D by sphingolipids.**

Žebrakovská I., Máša M., Srp J., Horn M., Vávrová K., Mareš M.

*Biochim Biophys Acta*, 12, 1097-1104 (2011). (IF = 4,4)

**Publikace č. 2: Novel structural mechanism of allosteric regulation of aspartic peptidases via an evolutionarily conserved exosite.**

Hánová I., Brynda J., Houštická R., Alam N., Sojka D., Kopáček P., Marešová L., Vondrášek J., Horn M., Schueller-Furman O., Mareš M.

*Cell Chem Biol*, 25, 318-329 (2018). (IF = 6,8)

**Publikace č. 3: Biomimetic macrocyclic inhibition of human cathepsin D: structure-activity relationship and binding mode analysis.**

Houštická R., Hadzima M., Fanfrlík J., Brynda J., Pallová L., Hánová I., Mertlíková-Kaiserová H., Lepšík M., Horn M., Smrčina M., Majer P., Mareš M.

*J Med Chem*, 63, 1576-1596 (2020) (IF = 6,1)

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

**Department of Biochemistry**

Doctoral study programme: Biochemistry

Summary of the Doctoral Thesis



New inhibition mechanisms of regulation of cathepsin D activity

**Iva Hánová**

Supervisor: RNDr. Michael Mareš, CSc.

Supervisor-consultant: doc. RNDr. Jan Konvalinka, CSc.

Prague 2020

## **Contents**

|   |    |
|---|----|
| List of Abbreviations.....                    | 1  |
| Abstract.....                                 | 2  |
| 1. Introduction.....                          | 3  |
| 2. Aims of the Study .....                    | 4  |
| 3. Materials and methods .....                | 4  |
| 3.1. Materials and laboratory equipment ..... | 4  |
| 3.2. Methods .....                            | 5  |
| 4. Results and discussion .....               | 6  |
| 5. Conclusions.....                           | 8  |
| 6. References.....                            | 9  |
| Curriculum vitae.....                         | 11 |
| Selected publications.....                    | 12 |



## List of Abbreviations

|                  |  |
|------------------|--|
| CatD             | cathepsin D  |
| IC <sub>50</sub> | inhibitor concentration necessary to effect 50% inhibition of enzyme |
| IOCB             | Institute of Organic Chemistry and Biochemistry CAS                  |
| IrCatD1          | cathepsin D1 from tick <i>Ixodes ricinus</i>                         |
| K <sub>d</sub>   | dissociation constant  |
| k <sub>cat</sub> | turnover number  |
| K <sub>i</sub>   | inhibition constant  |
| K <sub>M</sub>   | Michaelis constant   |
| proCatD          | procathepsin D   |
| proIrCatD1       | proenzyme of cathepsin D1 from tick <i>Ixodes ricinus</i>            |
| PVDF             | polyvinyliden difluoride   |
| RP-HPLC          | Reverse Phase High Performace Liquid Chromatography                  |
| SDS-PAGE         | sodium dodecyl sulphate – polyacrylamide gel electrophoresis         |

## **Abstract**

The aspartic protease cathepsin D (CatD) is associated with numerous pathologies, and therefore the molecular mechanisms of its activation are studied for their potential uses in biomedicine. This dissertation thesis is focused on new, natural endogenous inhibitors of CatD, the analysis of their interaction, and the development of synthetic inhibitory biomimetics.

Two groups of inhibitors of CatD, which are the first specific endogenous regulators of this enzyme, have been identified. (1) Sphingolipids are complex modulators of human CatD, depending on their structure. While sphingosines and ceramides are inhibitors of CatD, their phosphorylated derivatives act as activators of CatD. A correlation was found between the action of these sphingolipids on CatD and their modulatory effect on cancer cells. (2) Using the analysis of a CatD of parasitic origin, a new mechanism of inhibition was identified, which is conserved in aspartic proteases of the pepsin family. A peptide fragment is released autocatalytically from the zymogen of CatD, which then acts as an allosteric inhibitor, binding to an exosite on the surface of the catalytically active enzyme. Furthermore, synthetic macrocyclic inhibitors of CatD were prepared, which mimic the binding conformation of the bacterial inhibitor pepstatin in the active site of aspartic proteases. Based on these results of the structure-function analysis, it is possible to purposefully modify the properties of these biomimetic inhibitors.

This thesis contains important new information about three new types of inhibitors of CatD and regulation mechanisms, which can be used for an intelligent design of inhibitory drugs for pathologies associated with CatD-like aspartic proteases.

## 1. Introduction

Aspartic proteases are widely spread enzymes that participate in many physiological processes (e.g. lysosomal degradation of proteins and apoptosis) and they also take part in pathologies such as neurodegenerative and parasitic diseases and tumors<sup>1,2</sup>. Based on the homology of their amino acid sequence, aspartic proteases are classified into five clans and thirteen families, the best known is the A1 family – the family of pepsin<sup>3</sup>. Precise regulation of activity is essential in this family of proteases. It takes place at several levels including the regulation of activity at the protein level. At first, these proteases are synthesized in the form of inactive proenzymes (zymogens), which become catalytically active after the cleavage of the propeptide from the N-terminus of the proenzyme. This leads to the formation of the mature, fully active enzyme<sup>4</sup>. In the next step, the activity of the mature enzyme can be regulated by inhibitors and activators; we do not know much about these molecules, especially those of endogenous origin. This thesis is focused on the mechanisms of regulation of activity of cathepsin D (CatD) from the pepsin family; in particular, human CatD and cathepsin D1 from tick *Ixodes ricinus* (IrCatD1) were studied.

Under physiological conditions human CatD is found in lysosomes, where it degrades structural and functional proteins<sup>5</sup>. During apoptosis, CatD is released from the lysosomes to the cytosol, where it participates in the proteolysis of initiation and mediator proteins of apoptosis and thus participates in the progression of the apoptotic process<sup>6-8</sup>. Higher levels of CatD expression and secretion were found in tumors, where CatD acts as an autocrine growth factor and also degrades the extracellular matrix, thereby promoting the growth and the spreading of the tumour<sup>9-12</sup>. CatD is a prognostic marker and a molecular target for the therapy of breast cancer<sup>13</sup>. Furthermore, human CatD is associated with the development of Alzheimer's disease and atherosclerosis<sup>14,15</sup>.

Tick *Ixodes ricinus* is the disease vector for tick-borne encephalitis and Lyme disease. Hemoglobin, from blood of the host, is the main source of amino acids for the tick<sup>16</sup>. IrCatD1 plays a key role in the degradation of hemoglobin in the tick gut, where it initiates the proteolytic cascade of the process of digestion<sup>17</sup>. Proenzyme of IrCatD1 (proIrCatD1) differs from other related proteases by a very short propeptide, whose structure and regulatory function have not yet been studied.

This thesis describes new mechanisms of regulation of the proteolytic activity of the cathepsin D-type proteases. It is focused on the identification and characterization of natural

endogenous inhibitors of these proteases and also on the possibilities of inference of synthetic biomimetic inhibitors with a therapeutic potential.

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

The specific aims of the thesis are the following:

1. Description of the effects of bioactive sphingolipids on the function of human CatD. In particular, the analysis of the relationship between the structure of the sphingolipids and the proteolytic activity of CatD and factors influencing this interaction. Discussion of the possible pathophysiological effects.
2. Using cathepsin D1 from tick *Ixodes ricinus* (IrCatD1), perform a structure-function analysis of the activation peptide (propeptide) using protein crystallography and biochemical methods. Identify the inhibition motive in the structure of the propeptide, study its interaction with IrCatD1 and discuss the significance of this regulatory mechanism for aspartic proteases.
3. Study the functional properties of biomimetic macrocyclic inhibitors derived from the structure of pepstatin, a microbial inhibitor of aspartic proteases, especially the interaction with human CatD, the selectivity and other properties to enable us to assess their potential to be used for drug design.

## **3. Materials and methods**

This chapter briefly describes the basic materials, equipment and techniques used. Detailed information is given in the selected publications.

### **3.1. Materials and laboratory equipment**

Most of the data were obtained using the laboratory facilities at the Institute of Organic Chemistry and Biochemistry of the Czech Academy of Sciences (IOCB). Collection of diffraction data for the crystal structure determination was performed at the synchrotron Bessy II electron storage ring in Helmholtz-Zentrum in Berlin, Germany and synchrotron ESRF in Grenoble, France. Crystal structures were determined in collaboration with the Laboratory of Structural Biology at IOCB. Peptidic and peptidomimetic inhibitors and non-commercial substrates were synthesized by the Laboratory of Medicinal Chemistry at IOCB. Sets for commercial crystallization screens were purchased from Jena Bioscience, Molecular Dimensions a Hampton Research.

### 3.2. Methods

This is a brief description of the main methods used, further details are given in the selected articles.

#### *Methods of molecular biology:*

Cloning of proIrCatD1 gene into the plasmid pET101/D-TOPO, mutagenesis of catalytic aspartate D231N in the proIrCatD1 construct, transformation of *E.coli* BL21(DE), recombinant expression of two forms of proIrCatD1 (wild-type and catalytically inactive form) in *E.coli*.

#### *Biochemical methods:*

Isolation of proIrCatD1 from inclusion bodies, renaturation of proIrCatD1, its activation and purification using various chromatographic methods (ionex, gel and affinity chromatographies); chromatographic isolation of human CatD from placentas. Separation of proteins using SDS-PAGE, separation of peptides using RP-HPLC, determination on the N-terminal sequence of proteins that were transferred to the PVDF membrane, quantification of peptide substrate and inhibitors using amino acid analysis.

#### *Enzymological methods:*

Enzyme activity measurements using kinetic assays with FRET substrates on fluorescent reader (Tecan), determination of kinetic parameters  $IC_{50}$ ,  $K_m$ ,  $K_i$ ,  $k_{cat}$ , mode of inhibition, determination of dissociation constant  $K_d$  using the thermophoretic effect on Monolith NT.115 (NanoTemper).

#### *Crystallographic methods:*

Preparation of different molecular forms and inhibition complexes of IrCatD1 for crystallization, screening for crystallization conditions and their optimization, analysis of intermolecular interactions in 3D models and creating molecular graphics with PyMol software.

## 4. Results and discussion

Results of this thesis are summarized in three articles that were published in high impact international journals.

*Publication no. 1: Complex modulation of peptidolytic activity of cathepsin D by sphingolipids.*

This article describes the modulation of activity of human CatD by bioactive sphingolipids. Using a panel of natural and synthetic sphingolipids, a detailed study of the influence of the structure of the sphingolipids on CatD activity was performed. Sphingolipids with sub-micromolar competitive inhibition of CatD were identified. These sphingolipids probably bind to the active center of the enzyme that, based on its substrate specificity, prefers hydrophobic amino acids. Phosphosphingolipids, derivatives with phosphate group on the C1 carbon, on the contrary increase the catalytic efficiency of CatD. The presented results are discussed in the context of the known antagonistic effects of sphingolipids vs. phosphosphingolipids in the modulation of processes of apoptosis and cell division in which CatD also takes part in<sup>18–20</sup>. Furthermore, it was described that in the presence of phosphosphingolipids the pH optimum of CatD moves by approximately one unit to the neutral range. This could be significant for the increase of activity of CatD in the mildly acidified environment of tumors. Sphingolipids do not modulate the activity of other proteases representing other families or aspartic proteases from the pepsin family, indicating that this is a highly specific regulation of the activity of human CatD. Since the modulation of CatD activity by sphingolipids takes place even in the presence of liposomes, which simulate the environment of cell membranes, this process is relevant in physiological conditions.

*Publication no. 2: Novel structural mechanism of allosteric regulation of aspartic peptidases via an evolutionarily conserved exosite.*

Proenzymes of aspartic proteases have a propeptide on their N-terminus that is removed during autoactivation to form a mature, catalytically active enzyme. The second publication is focused on the structure-function analysis of the propeptide of IrCatD1, cathepsin D1 from tick *Ixodes ricinus*. This propeptide is very short in comparison to the propeptides of other pepsin family proteases and thus represents an ideal prototype to study the properties of this domain.

Using the crystallographic structures of the proenzyme and mature enzyme, the process of autoactivation of proIrCatD1 was described in detail and the function of the propeptide was

analyzed. The N-terminal part of the intact propeptide binds to the surface of the proenzyme at a specific site which was named exosite. It was described that this part of the propeptide is cleaved in the form of an oligopeptide and released during autoactivation and acts reversely as a strong nanomolar inhibitor of the mature enzyme. Based on the crystal structure of the inhibition complex of the synthetic oligopeptide with IrCatD1, it is clear that the binding of the oligopeptide to the exosite induces an allosteric conformational change of the active site of IrCatD1, such that the active site becomes inaccessible for substrate binding. The ability of the inhibitor to bind to the exosite is dependent on pH, which could be important during the biogenesis of digestive vacuoles of the tick, where significant pH changes occur. IrCatD1 is a key protease for the tick and thus this inhibition mechanism represents an effective way to regulate the degradation of proteins from the host blood.

Considering the sequence and structural homologies of propeptides of pepsin proteases, it is probable that the emergence and functioning of the endogenous allosteric inhibitors is evolutionarily conserved. Based on these results it is possible to design a new class of inhibitors targeting the exosite of related, medicinally significant aspartic proteases.

*Publication no. 3: Biomimetic macrocyclic inhibition of human cathepsin D: structure-activity relationship and binding mode analysis.*

This article is focused on the rational design of new inhibitors of human CatD that are based on the structure of linear microbial peptide pepstatin. This is the most effective inhibitor of aspartic proteases, but for its large molecular weight and adverse physico-chemical and pharmacodynamic properties, it is not suitable as a therapeutic agent<sup>21</sup>. In this publication the change of conformation of pepstatin, which takes place during the interaction in the active site of CatD, was analyzed. The induced conformation was stabilized by designing a macrocyclic peptide scaffold that mimics the binding mode. More than 30 modified derivatives were prepared with lower molecular weight compared to pepstatin in which the scaffold and substitutions in several key positions were optimized.

These strong reversible inhibitors of CatD (working in nanomolar range) showed higher selectivity for proteases structurally similar to CatD. The crystal structure was solved for three complexes and the interaction energies for different positions of the macrocycles were calculated. These inhibitors fulfill the criteria of physico-chemical parameters for the design of drugs, they are proteolytically stable and nontoxic. They are perspective templates for the design of chemotherapeutics against pathologies associated with human CatD.

## 5. Conclusions

This doctoral thesis is focused on the new mechanisms of regulation of the proteolytic activity of cathepsin D-type (CatD) aspartic proteases. It includes the identification of natural endogenous inhibitors of the studied proteases as well as the development of synthetic biomimetic inhibitors. These newly studied inhibitors represent molecular templates for the design of potential drugs. The results are presented in three original publications.

The aims of this thesis were met with the following conclusions:

### Regulation of the activity of CatD by sphingolipids

Sphingolipids were identified as the first endogenous inhibitors of human CatD. The structure-function relationship was described in detail with focus on their function: sphingolipids of the sphingosine-type and ceramide-type were inhibitors of CatD, while their phosphorylated derivatives acted as enzyme activators and influenced its pH optimum. This complex modulation of the activity by sphingolipids was specific for CatD and was not found in other proteases. A correlation was found between the functioning of bioactive sphingolipids on human CatD and their modulation effect on cancer cells, which was described earlier, suggesting that this molecular interaction system could participate in pathophysiological processes.

### Regulation of activity of CatD using allosteric inhibition

Using structural and biochemical analysis, the activation of the inactive zymogen to a mature active enzyme was described for cathepsin D1 from the tick *Ixodes ricinus* (IrCatD1). It was discovered during this process, through autocatalytic proteolysis, a peptide fragment is generated, which comes from the propeptide domain and it acts as an inhibitor of the mature enzyme. This inhibitor binds to an exosite on the surface of the enzyme and functions through a unique allosteric mechanism. This is the first described peptide endogenous inhibitor of an aspartic proteases in higher organisms. Results suggest that this regulation of activity is evolutionarily conserved and is also present in other related proteases. Their exosite is therefore a perspective molecular target for the design of new allosteric inhibitors.

### Regulation of activity of CatD using biomimetic inhibitors

Synthetic macrocyclic inhibitors of CatD were designed which mimic the binding conformation of the bacterial inhibitor pepstatin in the active site of aspartic proteases. The binding mode of these biomimetic inhibitors in the active site of human CatD was described



using structural and computational analysis. Based on the analysis of the structure-function relationship, it is possible to purposefully modify the properties of these inhibitors including their specificity. The prepared macrocycles are proteolytically stable, nontoxic and fulfill the physico-chemical parameters for drug design.

## 6. References

1. Rawlings ND, Barrett AJ. Introduction: Aspartic and Glutamic Peptidases and Their Clans. In: Rawlings ND, Salvensen GS, eds. *Handbook of Proteolytic Enzymes*. Third Edit. Elsevier Ltd; 2013:3-19.
2. Sojka D, Hartmann D, Bartošová-Sojková P, Dvořák J. Parasite Cathepsin D-Like Peptidases and Their Relevance as Therapeutic Targets. *Trends Parasitol*. 2016;32(9):708-723.
3. MEROPS - the Peptidase Database. Accessed January 18, 2019. [https://www.ebi.ac.uk/merops/cgi-bin/family\\_index?type=P](https://www.ebi.ac.uk/merops/cgi-bin/family_index?type=P)
4. Tang J, Wong RNS. Evolution in the structure and function of aspartic proteases. *J Cell Biochem*. 1987;33(1):53-63.
5. Benes P, Vetvicka V, Fusek M. Cathepsin D—Many functions of one aspartic protease. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2008;68(1):12-28.
6. Appelqvist H, Johansson A-C, Linderöth E, et al. Lysosome-mediated apoptosis is associated with cathepsin D-specific processing of bid at Phe24, Trp48, and Phe183. *Ann Clin Lab Sci*. 2012;42(3):231-242. Accessed April 17, 2019. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22964611>
7. Haendeler J, Popp R, Goy C, Tischler V, Zeiher AM, Dimmeler S. Cathepsin D and H 2 O 2 Stimulate Degradation of Thioredoxin-1. *J Biol Chem*. 2005;280(52):42945-42951.
8. Emert-Sedlak L, Shangary S, Rabinovitz A, Miranda MB, Delach SM, Johnson DE. Involvement of cathepsin D in chemotherapy-induced cytochrome c release, caspase activation, and cell death. *Mol Cancer Ther*. 2005;4(5):733-742.
9. Maynadier M, Farnoud R, Lamy P-J, Laurent-Matha V, Garcia M, Rochefort H. Cathepsin D stimulates the activities of secreted plasminogen activators in the breast cancer acidic environment. *Int J Oncol*. 2013;43(5):1683-1690.
10. Garcia M, Platet N, Liaudet E, et al. Biological and clinical significance of cathepsin D in breast cancer metastasis. *Stem Cells*. 1996;14(6):642-650.
11. Scott PG, Pearson CH. Cathepsin D: Cleavage of soluble collagen and crosslinked peptides. *FEBS Lett*. 1978;88(1):41-45.
12. Roughley PJ. The degradation of cartilage proteoglycans by tissue proteinases. Proteoglycan heterogeneity and the pathway of proteolytic degradation. *Biochem J*. 1977;167(3):639-646.
13. Dubey V, Luqman S. Cathepsin D as a Promising Target for the Discovery of Novel Anticancer Agents. *Curr Cancer Drug Targets*. 2017;17(5):404-422.
14. Malik M, Fenko MD, Sheikh AM, Wen G, Li X. A Novel Approach for Characterization of Cathepsin D Protease and Its Effect on Tau and  $\beta$ -Amyloid Proteins. *Neurochem Res*. 2011;36(5):754-760.

15. Zhao CF, Herrington DM. The function of cathepsins B, D, and X in atherosclerosis. *Am J Cardiovasc Dis.* 2016;6(4):163-170. Accessed February 10, 2019. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28078176>
16. Volf P, Horák P. Podřád Metastigmata (Ixodida). In: *Paraziti a Jejich Biologie*. Triton; 2007:260-264.
17. Horn M, Nussbaumerová M, Šanda M, et al. Hemoglobin Digestion in Blood-Feeding Ticks: Mapping a Multi-peptidase Pathway by Functional Proteomics. *Chem Biol.* 2009;16(10):1053-1063.
18. Minarowska A, Minarowski Ł, Karwowska A, Gacko M. Regulatory role of cathepsin D in apoptosis. *Folia Histochem Cytobiol.* 2007;45(3):159-163.
19. Liaudet-Coopman E, Beaujoui M, Derocq D, et al. Cathepsin D: newly discovered functions of a long-standing aspartic protease in cancer and apoptosis. *Cancer Lett.* 2006;237(2):167-179.
20. Young MM, Kester M, Wang H-G. Sphingolipids: regulators of crosstalk between apoptosis and autophagy. *J Lipid Res.* 2013;54(1):5-19.
21. Tumminello FM, Bernacki RJ, Gebbia N, Leto G. Pepstatins: aspartic proteinase inhibitors having potential therapeutic applications. *Med Res Rev.* 1993;13(2):199-208. Accessed September 24, 2019. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8445958>

## Curriculum vitae

Name and surname: Iva Hánová, maiden name Žebrakovská

Date and place of birth: 26. 3. 1984 in Prague

Nationality: Czech

Phone number: +420 220 183 287

E-mail: iva.hanova@uochb.cas.cz

### Education:

since 2008

**Ph.D. study:** Charles University in Prague, Faculty of Science, Department of Biochemistry, Ph.D. programme: Biochemistry

*Ph.D. thesis:* New mechanisms of regulation of cathepsin D activity

Workplace: Institute of Organic Chemistry and Biochemistry of the CAS

Supervisor: RNDr. Michael Mareš, CSs.

October 2014 – March 2019 maternity leave

2006-2008

**Master study:** Charles University in Prague, Faculty of Science, Department of Biochemistry, Master programme: Biochemistry

*Master thesis:* Expression and activation of cathepsin D

Workplace: Institute of Organic Chemistry and Biochemistry of the CAS

Supervisor: RNDr. Michael Mareš, CSc.

Reviewer: RNDr. Milan Fábry, CSc.

2003-2006

**Bachelor study:** Charles University in Prague, Faculty of Science, Department of Biochemistry, Bachelor programme: Biochemistry

*Bachelor thesis:* Nonpeptide inhibitors of HIV protease

Workplace: Institute of Organic Chemistry and Biochemistry of the CAS

Supervisor: doc. RNDr. Jan Konvalinka, CSc.

Reviewer: prof. RNDr. Jiří Hudeček, CSc.

### Employment:

since 2008

Ph.D. student at Institute of Organic Chemistry and Biochemistry of the CAS

Senior research group: Cathepsin proteases in pathology

Languages: English: C2 (CAE March 2011), French: B1

### Courses:

Workshop on Eukaryotic Expression – October 2009

qPCR a q-Seminar – November 2010 and April 2011

International School of Crystallization – April 2009

LC/GC Chemstation course – April 2012

### Conferences:

XI. mezioborové setkání mladých biologů, biochemiků a chemiků – May 2011. Creation and presentation of the poster “Sphingolipids are new modulators of the activity of cathepsin D.”

## Selected publications

**Publication no. 1: Complex modulation of peptidolytic activity of cathepsin D by sphingolipids.**

Žebrakovská I., Máša M., Srp J., Horn M., Vávrová K., Mareš M.

*Biochim Biophys Acta*, 12, 1097-1104 (2011). (IF = 4,4)

**Publication no. 2: Novel structural mechanism of allosteric regulation of aspartic peptidases via an evolutionarily conserved exosite.**

Hánová I., Brynda J., Houštická R., Alam N., Sojka D., Kopáček P., Marešová L., Vondrášek J., Horn M., Schueller-Furman O., Mareš M.

*Cell Chem Biol*, 25, 318-329 (2018). (IF = 6,8)

**Publication no. 3: Biomimetic macrocyclic inhibition of human cathepsin D: structure-activity relationship and binding mode analysis.**

Houštická R., Hadzima M., Fanfrlík J., Brynda J., Pallová L., Hánová I., Mertlíková-Kaiserová H., Lepšík M., Horn M., Smrčina M., Majer P., Mareš M.

*J Med Chem*, 63, 1576-1596 (2020) (IF = 6,1)