

Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta
Katedra biochemie

Charles University in Prague, Faculty of Science
Department of Biochemistry

Doktorský studijní program: Biochemie
Ph.D. study program: Biochemistry

Autoreferát disertační práce
Summary of the dissertation thesis



Substrátová specifita, mechanismus a regulace aktivity intramembránových proteas
z rodiny rhomboidů

Substrate specificity, mechanism and activity regulation of the rhomboid family
intramembrane proteases

Mgr. Jan Škerle

Školitel/Supervisor: Kvido Stříšovský, Ph.D.

Prague, 2020

Abstrakt

Intramembránové proteasy z rodiny rhomboidů jsou v přírodě široce rozšířeny a vyskytují se ve všech doménách života. Podílejí se na mnoha důležitých procesech, jako například kontrola kvality membránových proteinů nebo mitochondriální dynamika. Jejich aktivita souvisí s nemocemi jako Parkinsonova nemoc nebo rakovina. Proto se rhomboidy jeví jako potenciální terapeutické cíle. V této práci jsme se snažili objasnit detailní mechanismus fungování modelové proteasy GlpG z *E. coli*. Zaměřili jsme se i na mechanismus rhomboidu RHBDL2, což je jeden ze čtyř eukaryotických rhomboidů, jejichž funkce není příliš prostudována. Pro pochopení vazby mezi substrátem a enzymem jsme připravili řadu nových peptidyl-chlormethylketonových inhibitorů odvozených od proteinu TatA, což je substrát rhomboidu v *P. stuartii*. Díky krystalové struktuře komplexů GlpG s těmito inhibitory jsme prozkoumali vazebná místa substrátu S1 až S4, což nám umožnilo objasnit strukturní podstatu substrátové specifity enzymu. Ukázali jsme, že rychlost štěpení substrátu může být významně ovlivněna modifikací sekvence substrátu na pozicích P1 až P5. Na základě těchto pozorování jsme vyvinuli fluorogenní transmembránový peptidový substrát rhomboidových proteas, který je použitelný jak v detergentu, tak v liposomech, a je vhodný pro testování s vysokou propustností. Pomocí těchto substrátů jsme dokázali, že rhomboidy pro efektivní zpracování substrátu vyžadují takřka kompletní transmembránovou část substrátu a že interakce mezi enzymem a substrátem nejspíš probíhá uvnitř membrány. Díky těmto znalostem se nám podařilo navrhnout silné inhibitory proteas z rodiny rhomboidů, jejichž základem jsou peptidyl- α -ketoamidy. Tyto inhibitory jsou aktivní v nanomolárních koncentracích a působí selektivně na proteasy z rodiny rhomboidů. Pomocí krystalových struktur jsme prokázali, že vazba peptidyl- α -ketoamidu na rhomboid je kovalentní, podobná tetraedrálmu meziprojektu štěpení substrátu. Pomocí pokročilých metod fluorescenční spektroskopie (FRET a FCCS) jsme objasnili chování rhomboidové proteasy RHBDL2 v jejím přirozeném prostředí. Zatímco dosavadní výsledky naznačovaly možnost alosterické aktivace rhomboidů jejich dimerizací, my jsme nenašli žádné důkazy o dimerizaci RHBDL2 v bimembráně. Během této práce se nám podařilo vyvinout metodiku široce aplikovatelnou na studium dimerizace membránových proteinů. Všechny poznatky popsané v této práci významně přispívají k pochopení mechanismu fungování rhomboidových proteas.

Abstract

Intramembrane proteases from the rhomboid-like superfamily are enzymes widely distributed and conserved in all domains of life. They participate in many important processes such as membrane protein quality control or mitochondrial dynamics. Their activity is also linked with diseases like Parkinson's disease or cancer. This makes them potential therapeutic targets. In this work we tried to elucidate in more detail the mechanism of action of the main model intramembrane protease, GlpG from *E. coli*. We also focused on the mechanism of eukaryotic rhomboid RHBDL2, one of the four mammalian rhomboids, function of which is poorly understood. To acquire more detailed information about substrate-enzyme interaction, we synthesized a series of novel peptidyl-chloromethylketone inhibitors derived from natural rhomboid substrate TatA from *P. stuartii*. Crystal structure of the complex of GlpG with these inhibitors revealed four substrate binding subsites (S1 to S4) of the enzyme and explained its observed substrate specificity structurally. This study showed that substrate cleavage rate can be dramatically modified by changing the substrate sequence in positions P1 to P5. This helped us develop fluorogenic transmembrane peptide substrates for rhomboid proteases, which are usable in detergent and liposomes, and compatible with high-throughput screening. Using these substrates we showed that rhomboid proteases require almost the entire transmembrane domain of the substrate for efficient recognition and cleavage, and the enzyme probably interacts with the transmembrane domain of the substrate via a membrane-immersed exosite. Based on this knowledge we have designed novel and potent rhomboid inhibitors based on peptidyl- α -ketoamides. These compounds are active at nanomolar concentrations, and are selective for rhomboids. Crystal structures revealed that peptidyl- α -ketoamides bind the rhomboid covalently by mimicking the tetrahedral intermediate. Finally, by employing advanced fluorescence spectroscopy techniques (FRET and FCCS), we have investigated the behavior of the rhomboid protease RHBDL2 in a natural biomembrane. While it was previously thought that rhomboids are allosterically activated by dimerization, we found no evidence of RHBDL2 dimerization in natural membranes. Importantly, the approaches developed in this work are generally applicable to the assessment of dimerization of transmembrane proteins. In summary, the findings described in this thesis significantly contribute to the understanding of the mechanism of action of rhomboid proteases.

1. Úvod

V této práci jsme se zaměřili na chování dvou modelových proteas z rodiny rhomboidů. Bakteriální rhomboid GlpG z *E. coli* představuje modelovou intramembránovou proteasu pro strukturní a mechanistické studie. Proteasa RHBDL2 je exprimována na plasmatické membráně některých eukaryotických buněk a o její funkci se toho dosud ví jen poměrně málo. Kombinací biochemických a biofyzikálních technik jsme se pokusili objasnit substrátovou specifitu a mechanismus akce proteasy GlpG. Pomocí pokročilých spektroskopických metod jsme se pokusili objasnit oligomerní stav proteasy RHBDL2 v přirozeném prostředí biologické membrány.

1.1. Biologická role proteolysy a proteas v buňce

Proteolysa je jedním z nejstarších studovaných enzymatických buněčných dějů. V průběhu let vědci odhalili, že se podílí na tak komplikovaných procesech, jako je například apoptosa, hojení, angiogenese, buněčná migrace a diferenciacie, re-modelování tkání a homeostase [1].

Proteolysa je studována hlavně u rozpustných (cytosolických) proteinů ve vodném prostředí a je známo, že přítomnost molekuly vody je pro průběh reakce zásadní. Zvláštním typem proteolysy je potom ta odehrávající se uvnitř biologické membrány, a to jednak kvůli absenci molekul vody [2] a také kvůli fluiditou membrány limitované difuzi [3].

1.2. Intramembránové proteasy z rodiny rhomboidů

Podle starší klasifikace rhomboidy tvoří jednu ze čtyř rodin intramembránových proteas (spolu se site-2 proteasami, preseniliny a rodinou peptidas signálního peptidu) [2]. Jméno této rodiny je odvozeno od prvního objeveného zástupce, rhomboidu-1 z *D. melanogaster*, jehož delece se projevila rhombickou deformací hlavy mušičího embrya [4]. Později byly objeveny i rhomboidům podobné pseudoproteasy (postrádají katalytickou aktivitu) zvané iRhomy [5] a derliny [6] které nyní s rhomboidy tvoří nadrodinu rhomboidům příbuzných proteinů [7].

Většina znalostí o mechanismu fungování proteas z rodiny rhomboidů byla získána jednak pomocí rekonstituce rhomboidů do detergentových micel a sledování jejich aktivity *in vitro* [6,8] a dále díky pokroku na poli rentgenové krystalografie

membránových proteinů a získání struktury membránové části bakteriálního rhomboidu GlpG ve vysokém rozlišení [9–11]. Nejnovější poznatky potvrzují již dříve vyslovenou hypotézu, že substrát rhomboidu se do jeho aktivního místa dostává „branou“ tvořenou druhým a pátým membránový helixem enzymu [12]. Velká pozornost je také upřena na nalezení určujících znaků společných pro širší vzorek substrátů rhomboidů. Vzhledem k jejich široké variabilitě je těžké identifikovat konkrétní vlastnosti a musíme se spokojit s obecným pozorováním, podle kterého je pro substrát zásadní jednak přítomnost helix-destabilizujících residuí [13] a dále pak primární sekvence aminokyselin tzv. rekogničního motivu v pozicích P4 a P2' [14]. V poslední době se také ukazuje, že pro fungování rhomboidu v biologické membráně je zásadní i jeho specifický tvar, který způsobuje neuspořádanost lipidů v jeho okolí a tím i jeho větší mobilitu (rychlejší difusi) v porovnání s ostatními membránovými proteiny [3].

Díky svému širokému rozšíření zastávají rhomboidy v přírodě bohaté spektrum funkcí od regulace proteinové sekrece u bakterií až po mitochondriální dynamiku eukaryotní buňky [15–18]. Mohou být také potenciálním cílem terapeutických zásahů kvůli vztahu k patogenním stavům, jako je rakovina [19] nebo Parkinsonova choroba [20]. Z prokaryotních rhomboidů je nejlépe prostudovaným AarA z bakterie *P. Stuartii*, u které štěpením proteinu TatA jednak aktivuje twin-arginin sekreční dráhu a také umožňuje bakteriální quorum sensing [21]. Hlavním modelovým rhomboidem pro strukturní a mechanistické studie [22] je však GlpG z bakterie *E. coli* a to i přes to, že jeho funkce a tím i přirozený substrát jsou stále neznámé [23]. Využití GlpG pro mechanistické studie je možné díky jeho schopnosti štěpit celou řadu substrátů ostatních rhomboidů [24]. Podle některých autorů je GlpG alostericky aktivováno dimerizací a je možné, že se jedná o vlastnost společnou všem rhomboidům [25]. Toto tvrzení je nicméně v rozporu s naším vlastním pozorováním (viz. Sekce 3.4) i nejnovějším pozorováním ostatních autorů [26].

Rhomboidy rostlin jsou prostudovány jen velmi málo, mnohem víc je toho známo o jejich funkci v eukaryotických parazitech. Patří mezi virulentní faktory u parazitů *Toxoplasma gondii* a *Plasmodium falciparum* [27] a řadí se u nich k potenciálním terapeutickým cílům [28].

Zvláštní skupinu pak tvoří mitochondriální rhomboidy eukaryot [29]. Jsou lokalizovány na vnitřní mitochondriální membráně a zodpovídají za přestavbu [30] a dynamiku [31] membrány. Za konkrétní zmínku jistě stojí myší mitochondriální

rhomboid PARL, který je studován pro možnou souvislost s Parkinsonovou chorobou [20].

Kromě rhomboidů v mitochondriích můžeme v savčí buňce nalézt ještě 4 další proteasy z této rodiny, konkrétně enzymy RHBDL1 – 4 [32], které jsou lokalizovány v rámci buněčné sekreční dráhy mezi Golgiho aparátem, endoplasmatickým retikulem (ER) a buněčným povrchem [33]. O jejich funkci toho zatím víme jen velmi málo. Nejlépe prostudovaným savčím rhomboidem je RHBDL4 nacházející se v ER, kde se mimo jiné podílí na komplikovaném procesu degradace proteinů spojené s endoplasmatickým retikulem (angl. ERAD) [33]. Intenzivně zkoumaný je také RHBDL2 lokalizovaný na plasmatické membráně. U něho můžeme, díky jeho nedávno objeveným přirozeným substrátům, usuzovat o zapojení do udržení vnitřní rovnováhy epitelu [34].

Rodinu rhomboidům podobných proteinů tvoří kromě aktivních proteas ještě iRhomy a derliny, což jsou katalyticky neaktivní skupiny pseudoproteas. S aktivními rhomboidy sdílí podobnou architekturu [35], ale postrádají katalyticky aktivní residua [5]. iRhomy jsou fylogeneticky bližší aktivním rhomboidům, než je tomu u derlinů [16]. Funkce obou skupin se pojí s endoplasmatickým retikulem a zatímco iRhomy se podílí zejména na transportu ADAM17 z ER dále do sekreční dráhy [5], derliny se zapojují do degradace proteinů v dráze ERAD [36].

2. Cíle práce

Tato práce se zabývá studiem mechanismu a specifity proteas z rodiny rhomboidů. Zaměřuje se zejména na hlavní modelový rhomboid GlpG z bakterie *E. coli* a zabývá se také jedním ze čtyř lidských rhomboidů, RHBDL2. Cílem studia GlpG byla *in vitro* charakterizace jeho substrátové specifity, vazebných vlastností a kinetických parametrů proteolytické reakce, naproti tomu RHBDL2 byl studován *in vivo* s důrazem na jeho vlastnosti v přirozeném prostředí biomembrány.

Dílčí cíle:

- Objasnění mechanismu vazby GlpG se substrátem, jeho substrátové specifity a mechanismu reakce.
- Studium dimerizačních vlastností RHBDL2 v prostředí přirozené biomembrány.

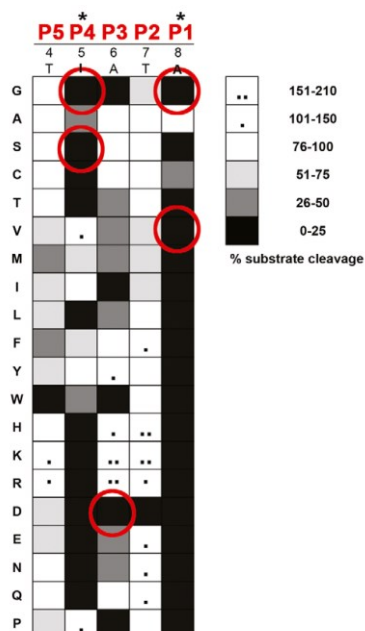
3. Výsledky a diskuse

3.1. Zkoumání substrátové vazby a specifity intramembránové rhomboidové proteasy pomocí struktury komplexu mezi enzymem a substrátem

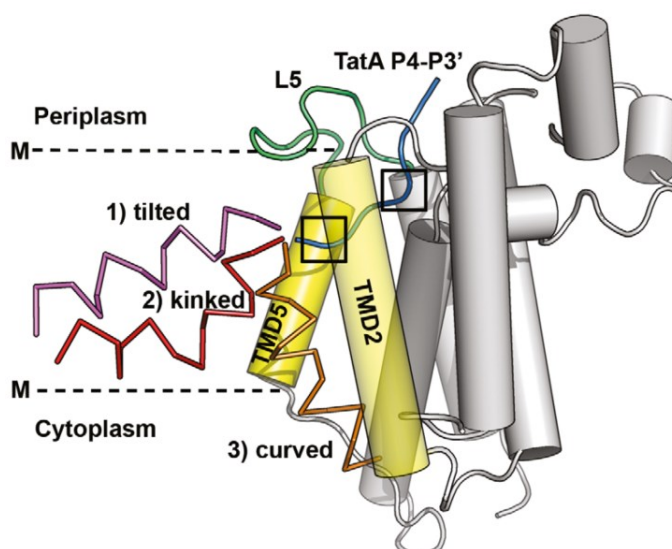
Rhomboidová proteasa GlpG z bakterie *E. coli* slouží jako hlavní model strukturních a mechanistických studií. Struktura tohoto enzymu je známá, avšak naše znalosti o mechanismu jeho fungování naráží na nedostatek informací o komplexu mezi enzymem a jeho substrátem. K překonání těchto obtíží jsme využili informace získané z krystalové struktury GlpG v komplexu s peptidyl-chlormethylketonovým inhibitorem odvozeným od přirozeného substrátu rhomboidu z *P. stuartii* TatA (Obrázek 1).

Za pomoci biochemické analýzy jsme ověřili, že se náš peptidyl-chlormethylketonový inhibitor váže na GlpG podobným způsobem jako jeho substrát. Díky rentgenové krystalografii jsme identifikovali vazebná místa proteasy S1 až S4. Objasnili jsme vztah mezi místem S1 a pro proteolytickou reakci zásadním vodním reservoárem enzymu a také fakt, že smyčka L1 enzymu, konzervovaná napříč celou rodinou rhomboidů, pomáhá s vytvořením místa S4. Předpokládáme, že tato smyčka plní podobně zásadní roli i v reakcích katalyzovaných ostatními rhomboidy. Na závěr jsme s využitím dříve publikovaných dat [37] navrhli model Michaelisovského komplexu GlpG s jeho substrátem navázaným v aktivním místě. Residua substrátu na pozicích P4, P1 a P2' jsme identifikovali jako zásadní pro hodnotu k_{cat} příslušné enzymové reakce, ale s minimálním vlivem na K_M [38]. Na základě těchto pozorování lze vyvodit, že oblast substrátu ohraničená rezidui P4 a P2' zodpovídá pouze za část vazebné energie substrátu a že celkové interakční rozhraní mezi substrátem a enzymem je mnohem větší než pouze tento úsek. Významně jsme tímto pozorováním přispěli k objasnění mechanismu vazby substrátu proteasy z rodiny rhomboidů na enzym. K získání strukturního modelu GlpG s navázaným substrátem jsme využili publikovanou NMR strukturu proteinu TatA z *E. coli* [37], který je sekvenčně a strukturně příbuzný substrátu rhomboidu AarA [21]. Rozdíl mezi délkou membránového helixu našeho modelového substrátu (*P. stuartii* TatA, 22 Å) a tloušťkou membrány v okolí rhomboidu GlpG (13 Å) je podle našich simulací příčinou několika možných orientací substrátu v membráně, který se svým ohnutím, zalomením nebo naklopením (Obrázek 2) snaží minimalizovat kontakt

hydrofobního helixu s vodným prostředím mimo membránu. Na základě našich dat je nejpravděpodobnější scénář, kdy se membránový helix substrátu uvnitř membrány ohne a svým přimknutím k enzymu zvětší kontaktní rozhraní komplexu enzym – substrát. Tuto domněnku také podporuje již dříve pozorované podobné chování u jiných proteinů [39].



Obrázek 1: Mapa in vitro specifiity proteasy GlpG – úplná bodová poziční mutagenese na substrátu TatA a účinnost štěpení těchto individuálních variant substrátu rhomboidem GlpG.



Obrázek 2: Model komplexu proteasy GlpG s membránovou částí substrátu TatA. Struktura enzymu a fragmentu substrátu (modře) pochází z krystalové struktury. Možné orientace substrátu uvnitř membrány jsou barevně odlišeny.

Výsledky jsou součástí publikace:

Substrate binding and specificity of rhomboid intramembrane protease revealed by substrate–peptide complex structures.

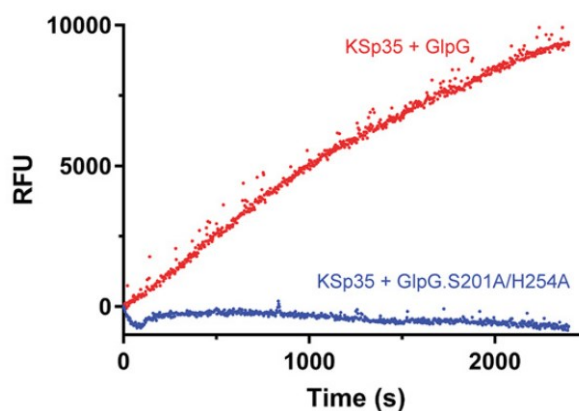
Sebastian Zoll, Stancho Stanchev, Jakub Began, Jan Škerle, Martin Lepšík, Lucie Peclinovská, Pavel Majer, and Kvido Strisovsky (2014), The EMBO Journal. 33, 2408-2421.

3.2. Universální fluorogenní citlivý transmembránový peptidový substrát pro proteasy z rodiny rhomboidů

Rozšíření proteas z rodiny rhomboidů ve všech doménách života spolu s širokou paletou jejich biologických funkcí (kontrola kvality membránových proteinů, mitochondriální dynamika, ERAD) z nich dělá velmi slibné cíle terapeutických zásahů. Pro využití jejich plného potenciálu nám však stále schází jejich vhodné selektivní inhibitory. Současné metody jejich studia *in vitro* nebylo možné kombinovat s výkonnými screeningovými metodami a detailní kinetickou analýzou. Pro překonání těchto obtíží jsme proto na platformě fluorogenního transmembránového peptidového substrátu navrhli robustní metodu vhodnou pro aktivitní studie.

Jako základ pro náš nový fluorogenní substrát posloužila sekvence druhého transmembránového helixu z polytopického proteinu LacY (LacY^{TM2}). O tomto substrátu je známo, že je obvykle štěpen proteasami z rodiny rhomboidů. Modifikací jeho sekvence na pozicích P5 a P4' fluorescenčním párem EDANS/DABCYL jsme získali fluorogenní substrát, jehož štěpení proteasou je doprovázeno zvýšením fluorescence EDANS. U neštěpeného substrátu je pár EDANS/DABCYL v dostatečné vzdálenosti pro vzájemný přenos energie (FRET) a ke zmíněné fluorescenci tedy nedochází. Pozice P5 a P4' není pro štěpení rhomboidem zásadní [14,40] a mutace těchto residuí neovlivní aktivitu GlpG. Tento náš substrát je kromě použití v detergentových micelách vhodný také pro použití v liposomech (Obrázek 3). Další výhodou tohoto substrátu je možnost změnou jeho sekvence modifikovat jeho štěpitelnost proteasou. Když jsme podle publikované specifity GlpG [40] upravili sekvenci našeho fluorogenního substrátu

odvozeného od LacYTM2, zvýšila se efektivita jeho štěpení až 23-krát. Podobná strategie může být použita i pro optimalizaci substrátů ostatních proteas z rodiny rhomboidů.



Obrázek 3: Štěpení fluorogenního substrátu KSp35 proteasou GlpG v prostředí liposomu je indikováno růstem fluorescence (červená křivka). Modrá křivka reprezentuje substrát inkubovaný s neaktivní proteasou o stejné koncentraci.

Výsledky jsou součástí publikace:

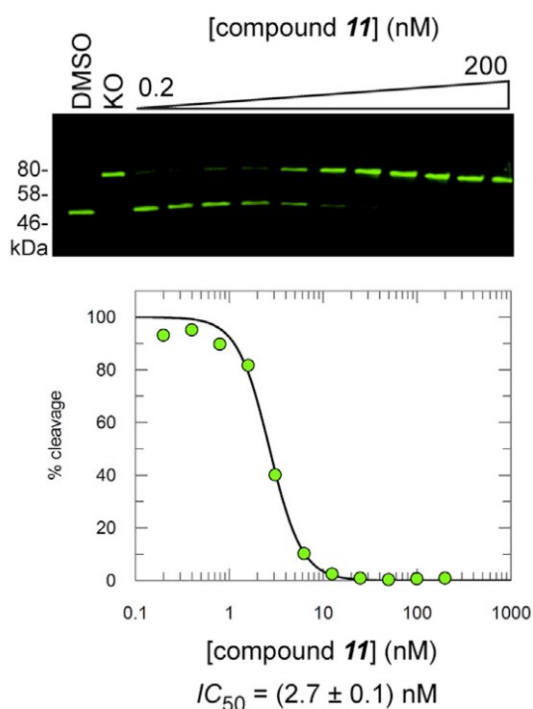
Sensitive versatile fluorogenic transmembrane peptide substrates for rhomboid intramembrane proteases.

Anežka Tichá, Stancho Stanchev, Jan Škerle, Jakub Began, Marek Ingr, Kateřina Švehlová, Lucie Polovinkin, Martin Růžička, Lucie Bednárová, Romana Hadravová, Edita Poláchová, Petra Rampírová, Jana Březinová, Václav Kašička, Pavel Majer, and Kvido Strisovsky (2017), *The Journal of Biological Chemistry*. 292, 2703-2713

3.3. Universální strategie pro návrh selektivních a farmakologicky využitelných inhibitorů proteas z rodiny rhomboidů

Svou funkcí jsou rhomboidové proteasy asociovány s nemocemi jako je Parkinsonova choroba, malárie a rakovina. Jejich využití jako terapeutických cílů je však mimo jiné omezeno absencí vhodných selektivních inhibitorů, které by šlo využít při návrhu nových léčiv. Abychom doplnili tento nedostatek, otestovali jsme použitelnost oligopeptidů s elektrofilní reaktivní skupinou jako inhibitorů rhomboidových proteas.

Při návrhu nové skupiny peptidyl- α -ketoamidových inhibitorů rhomboidových proteas jsme vycházeli ze znalosti substrátové specifity modelového rhomboidu GlpG. Elektrofilní ketoamidová reakční skupina se pro použití v inhibitoru ukázala jako nejvhodnější ze všech testovaných skupin (trifluormethylketony, boronáty, acylsulfonamidy, thiazolketony) běžně používaných pro inhibici serinových proteas [41,42]. Ukázali jsme, že modifikací hydrofobních residuů peptidové části inhibitoru důležitých pro rozpoznání rhomboidem [14,38] je možné modifikovat jeho inhibiční potenciál. Testování našich inhibitorů vůči paletě lidských serinových hydrolas publikovanou metodou [43] potvrdilo jejich vysokou selektivitu vůči rhomboidům. Kinetické a strukturní parametry inhibitorů potvrdily, že jde o inhibici nekompetitivní a vazba na rhomboid je kovalentní a reversibilní. Biologické experimenty navíc potvrdily možnost použití peptidyl- α -ketoamidů pro inhibici rhomboidů *in vivo* (Obrázek 4). Jejich velkou výhodou je možnost nezávislou modifikací jak peptidové části, tak reaktivní ketoamidové skupiny připravit inhibitor cíleně selektivní pro danou rhomboidní proteasu.



Obrázek 4: *In vivo* inhibice bakteriálního rhomboidu GlpG pomocí inhibitoru č.11.

Výsledky jsou součástí publikace:

General and modular strategy for designing potent, selective, and pharmacologically compliant inhibitors of rhomboid proteases.

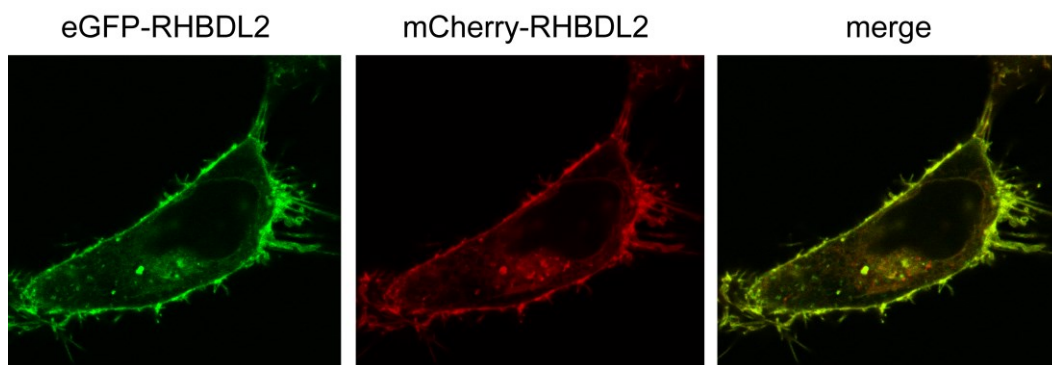
Anežka Tichá, Stancho Stanchev, Kutti R. Vinothkumar, David C. Mikles, Petr Pachtl, Jakub Began, Jan Škerle, Kateřina Švehlová, Minh T.N. Nguyen, Steven H.L. Verhelst, Darren C. Johnson, Daniel A. Bachovchin, Martin Lepšík, Pavel Majer, and Kvido Strisovsky (2017), *Cell Chemical Biology*. 24, 1523–1536

3.4. Objasnění oligomerního stavu lidské proteasy z rodiny rhomboidů RHBDL2 v přirozeném prostředí biomembrány

Informace o chování proteinů z rodiny rhomboidů v prostředí přirozené biologické membrány jsou velmi omezené. Podle některých autorů je dimerizace rhomboidů pozorovaná v detergentových micelách součástí regulačních mechanismů a vede k jejich alosterické aktivaci [25]. Tato hypotéza se však opírá pouze o data získaná *in vitro* na detergentem solubilizovaných proteinech. Důkazem o potřebě objasnit oligomerní stav proteinů z rodiny rhomboidů v prostředí biomembrány je nezávisle vzniklá práce [26], jejíž autoři jinými metodami dospěli k podobným závěrům, jaké jsme učinili my.

Výhodou našeho přístupu ovšem je, že jsme se zaměřili nejen na detekci silných interakcí jako již zmíněná práce [26] (metodou fluorescenční korelační spektroskopie: FCCS), ale i slabých interakcí (metodou FRET). Pomocí kombinace těchto biofyzikálních fluorescenčních technik jsme se zaměřili na oligomerní chování lidského proteinu z rodiny rhomboidů RHBDL2 v jeho přirozeném prostředí biomembrány. Abychom se vyhnuli chybné interpretaci a falešně pozitivním výsledkům způsobeným přehustěním a přílišnou blízkostí molekul v membráně [44], bylo nutné mít expresi a lokalizaci (Obrázek 5) proteinů v buňce pod přísnou kontrolou, a následně jsme také získaná data ověřovali pomocí Monte Carlo (MC) simulací. Věnovali jsme také zvláštní pozornost návrhu linkeru mezi rhomboidem a fluorescenčním proteinem v našich fúzních konstruktech, protože vzdálenost mezi fluorofory je jeden z faktorů určujících intenzitu detekovaného FRETu. Během své maturace je membránový protein vystaven změnám v lipidovém složení různých buněčných kompartmentů [45], což také může ovlivnit jeho oligomerní chování [46]. Pomocí kolokalizačních experimentů jsme tedy ověřili tendenci

RHBDL2 k dimerizaci i během jeho maturace v endoplasmatickém retikulu (ER). Při zkoumání RHBDL2 v jeho přirozeném prostředí biomembrány jsme nezaznamenali žádnou tendenci k dimerizaci ani na povrchu cytoplasmatické membrány ani během maturace v ER. Dříve propagovaná teorie o dimerizaci rhomboidů a jejich alosterické regulaci byla tedy výrazně ovlivněna měřením *in vitro* a neplatí pro situaci v živých buňkách.



Obrázek 5: Lokalizace proteinu RHBDL2 ve fúzi s fluorescenčním proteinem na plasmatické membráně buňky.

Výsledky jsou součástí publikace:

Membrane protein dimerization in cell-derived lipid membranes measured by FRET with MC simulations.

Jan Škerle, Jana Humpolíčková, Nicholas Johnson, Petra Rampírová, Edita Poláchová, Monika Fliegl, Jan Dohnálek, Anna Suchánková, David Jakubec, and Kvido Strisovsky (2020), *Biophysical Journal*, accepted

4. Závěr

V této práci jsme se s pomocí biochemických a biofyzikálních metod zaměřili na mechanismus a specifitu proteas z rodiny rhomboidů a na jejich budoucí možné terapeutické využití. Pomocí rentgenové krystalografie v kombinaci s enzymologickou analýzou a počítačovým modelováním jsme zkoumali interakci mezi modelovou proteasou z rodiny rhomboidů GlpG a jejím substrátem. S využitím neinvazivních spektroskopických technik FRET a FCCS v kombinaci s Monte Carlo simulacemi jsme se zaměřili na objasnění oligomerního stavu lidské proteasy z rodiny rhomboidů RHBDL2 v přirozeném prostředí biomembrány.

Cílenou mutagenezí residuí P5 až P1 substrátu TatA jsme objasnili specifitu proteasy GlpG. Naše pozorování potvrdilo důležitost residuí na pozicích P4 a P1. Zjistili jsme, že některé změny sekvence substrátu zabraňují jeho štěpení a některé jsou naopak proteasou štěpeny mnohem efektivněji. Ze strukturních dat pro GlpG v komplexu s peptidyl-chlorometylketonovým inhibitorem odvozeným od TatA jsme identifikovali S1 a S4 místa proteasy a objasnili jsme roli u rhomboidů konzervované smyčky L1, jež místo S4 spoluutváří. Pomocí počítačového modelování jsme také ustanovili model proteasy GlpG se substrátem TatA navázaným do aktivního místa.

Zaměřili jsme se také na využití rhomboidů jako potenciálních terapeutických cílů. S využitím detailních informací o interakci mezi GlpG a substrátem jsme navrhli sadu fluorogenních substrátů odvozených od substrátu společného pro mnoho rhomboidových proteas, LacYTM2. S využitím metody pro stanovení aktivity rhomboidových proteas jsme potvrdili využitelnost našich fluorogenních substrátů jak v detergentových micelách, tak v liposomech. Modifikací residuí na pozicích P5 až P1 je také možné tyto substráty přizpůsobit pro štěpení ostatními proteasami z rhomboidové rodiny. Stejným přístupem jako u fluorogenních substrátů jsme postupovali při vývoji sady peptidyl- α -ketoamidových inhibitorů rhomboidových proteas. Tyto inhibitory se na enzym vážou podobným způsobem jako substrát, vazba je kovalentní, ale reverzibilní. Inhibitory jsou velmi selektivní a vysoce účinné. Jejich velkou výhodou je, že mohou být, podobě jako fluorogenní substráty, přizpůsobeny pro různé rhomboidové proteasy a to buď modifikací peptidové části, nebo funkční skupiny.

Analyzovali jsme vlastnosti lidské rhomboidové proteasy RHBDL2 *in vivo*. Kombinací spektroskopických technik FRET a FCCS v kombinaci s *in vivo* detekcí

a lokalizací fluorescenčně značených molekul a Monte Carlo simulací jsme zkoumali tendence rhomboidu k dimerizaci. Ačkoliv dimerizace a tím i alosterická aktivace rhomboidové proteasy byla popsána v *in vitro* prostředí detergentových micel, nenašli jsme žádný důkaz, že by se tento jev uplatňoval *in vivo*. Metodologický přístup použitý pro studium dimerizace RHBDL2 je uplatnitelný na jiné membránové proteiny přítomné na plasmatické membráně.

5. Introduction

In this work we focused on the characterisation of two model proteases from the rhomboid family. Bacterial rhomboid GlpG from *E. coli* represents the main model intermembrane protease for structural and mechanistic studies. Protease RHBDL2 is expressed on the plasmatic membrane of some eukaryotic cells and its function is poorly understood. By an integration of biochemical and biophysical techniques we have tried to understand substrate specificity and mechanism of action of the GlpG protease. Employing advanced spectroscopic techniques we focused on the oligomeric state of RHBDL2 protease in the natural environment of a biological membrane.

5.1. Biological role of proteolysis and proteases in cell

Proteolysis is one of the longest studied enzymatic reactions in the cell. It was discovered that it is associated with complex processes like for example apoptosis, wound healing, angiogenesis, cell migration and differentiation, tissue remodelling and homeostasis [1].

Proteolysis is studied mainly for soluble (cytosolic) proteins in aqueous environment and water molecules are known to be crucial for the proteolytic reaction. Proteolysis which takes place within a biomembrane is a specific type of reaction due to the absence of water molecules [2] and a limited diffusion dependant on membrane fluidity [3].

5.2. Intramembrane proteases from the rhomboid family

Older classification defines rhomboids as one of four families of intramembrane proteases (with site-2 proteases, presenilins, and signal peptide peptidases) [2]. The name of this family is derived from the first discovered rhomboid, rhomboid-1 from *D. melanogaster*, whose gene deletion causes a rhomboid-shape malformation of the fly embryo head [2]. Recently, rhomboid-like pseudoproteases (lacking the catalytic activity) were also discovered, called iRhoms [5] and derlins [6], which now, together with rhomboids, constitute the rhomboid-like superfamily [7].

Studying the rhomboid protease mechanism of action was possible mainly due to enzyme reconstitution in detergent micelles and analysing their activity *in vitro* [6,8] and also by the progress in X-ray crystallography of membrane proteins and obtaining high-resolution structures of the transmembrane part of the bacterial rhomboid GlpG [9–11].

The latest observations confirm the older hypothesis about the substrate entering the rhomboid active site by a gate created by the second and fifth membrane helices of the enzyme [12]. Another important question is the definition of rhomboid substrate common features. Due to the broad variability of rhomboid substrates it is difficult to find characteristics common to all of them. General observation of rhomboid substrates revealed the importance of helix-destabilizing residues [13] and the rhomboid recognition motif in positions P4 and P2' in the substrate sequence [14]. One of the latest hypotheses also puts emphasis on the importance of the rhomboid specific shape which affects the order of the surrounding lipids and thus increases rhomboid diffusion in comparison with other membrane proteins [3].

Rhomboids are widespread in nature and are involved in many important biological processes like regulation of protein secretion in bacteria or mitochondrial dynamics in eukaryotes [15–18]. They are also potential therapeutic targets due to association with pathological conditions like cancer [19] or Parkinson's disease [20]. The most studied prokaryotic rhomboid is AarA from the bacterium *P. stuartii*, which activates the twin-arginine secretion pathway and affects bacterial quorum sensing by utilisation of its substrate TatA [21]. The main model rhomboid for structural and mechanistic studies [22] is GlpG from the bacterium *E. coli* despite its function and natural substrate are still unknown [23]. The usage of GlpG for mechanistic studies is possible due to its ability to cleave a palette of other rhomboid substrates [24]. Some authors are speculating about GlpG allosteric activation by its dimerization and a possible overlap of this phenomenon with other rhomboid family members [25]. This observation is nevertheless in contrast with our own data (section 7.4) and also with the results of other scientists [26].

Plant rhomboids are studied very poorly, more information is known about their function in eukaryote parasites. Rhomboids are virulent factors of *Toxoplasma gondii* and *Plasmodium falciparum* [27] and this makes them potential therapeutic targets [28].

Mitochondrial rhomboids of eukaryotes represent a special class of rhomboids [29]. They are localised in the internal mitochondrial membrane and are responsible for membrane remodelling [30] and dynamics [31]. Especially mouse mitochondrial rhomboid PARL is intensively studied for possible linkage with Parkinson's disease [20]. Besides mitochondrial rhomboids, we can find four more representants of rhomboid family in mammalian cells; enzymes RHBDL1 – 4 [32] are involved in the secretion

pathway from Golgi to endoplasmic reticulum (ER) and to cell surface [33]. Their function remains unclear. The best studied mammalian rhomboid is RHBDL4 localised in ER where it participates on endoplasmic reticulum associated degradation (ERAD) pathway [33]. Another intensively studied mammalian rhomboid is RHBDL2 localised in the plasmatic membrane and possibly involved in epithelial homeostasis [34].

The rhomboid-like protein superfamily contains, besides active proteases, also iRhoms and derlins which are catalytically inactive pseudoproteases. They share similar architecture [35] with active rhomboids but lack the catalytically active residues [5]. iRhoms are phylogenetically more similar to active rhomboids than derlins [16]. The function of both groups of pseudoproteases is associated with ER; iRhoms participate mainly on ADAM17 secretion [5] and derlins are associated with the ERAD pathway [36].

6. Aims of the study

This work is a complex study of the mechanism and specificity of intramembrane proteases from the rhomboid-like superfamily. It is focused on the main rhomboid model GlpG from the bacterium *E. coli* and on one of the four human secretase rhomboids, RHBDL2. GlpG was studied mainly *in vitro* to obtain a detailed information about its substrate specificity, binding properties, and kinetics parameters of the cleavage reaction, while RHBDL2 was studied *in vivo* with the emphasis on its behaviour in a natural biomembrane.

Specific research aims

- Investigation of substrate binding, specificity and reaction mechanism of GlpG.
- Study of dimerization properties of RHBDL2 in natural lipid membrane.

7. Results and discussion

7.1. Substrate binding and specificity of rhomboid intramembrane protease revealed by substrate–peptide complex structures

Rhomboid protease GlpG from the bacterium *E. coli* is the main mechanistic and structural rhomboid model. The structure of this enzyme is known, but our knowledge of the enzyme function is limited by the lack of structural information on the enzyme – substrate complex. We have filled this gap by solving the X-ray structure of GlpG in complex with a peptidyl-chlormethylketone inhibitor derived from natural rhomboid substrate TatA from *P. stuartii* (Figure 1).

Through biochemical analysis we confirmed that the peptidyl-chlormethylketone inhibitor binds to GlpG in the same manner as the substrate. By X-ray crystallography we identified the protease binding sites S1 to S4. We elucidated the relationship between the S1 binding site and the enzyme water cavity which is important for the proteolytic reaction and we also found that the enzyme L1 loop, which is conserved throughout the rhomboid family, helps with the formation of the S4 binding site of the enzyme. We also assume that this loop plays a similar role in reactions catalysed by other enzymes from the rhomboid family. With the help of previously published results [37] we postulated a model of the GlpG Michaelis complex with the substrate bound in the active site. Substrate residues at positions P4, P1 and P2' are important for the k_{cat} value of the enzymatic reaction but at the same time have a minimal impact on K_M [38]. Based on these observations we deduce that the substrate region flanked by residues P4 to P2' is only partially responsible for the substrate binding energy and thus the whole interaction interface between the enzyme and the substrate is much larger. Our observations significantly contribute to the understanding of the mechanism of rhomboid substrate binding to the enzyme. We used the published NMR structure of *E. coli* TatA [37], which is similar to the AarA rhomboid substrate [21], to create a structural model of the GlpG – substrate complex. The length difference between the membrane helix of our substrate (*P. stuartii* TatA, 22 Å) and membrane thickness around GlpG (13 Å) results in our simulations in several possible substrate orientations within the membrane, where by tilting, kinking or bending (Figure 2) the substrate is trying to minimize the contact of the

hydrophobic helix with the aqueous environment outside the membrane. Our data implicate that in the most likely scenario the membrane helix of the substrate bends within the membrane and by approaching the enzyme increases the contact interface in the enzyme – substrate complex. This theory is also supported by the observation of a similar behaviour in other proteins [39].

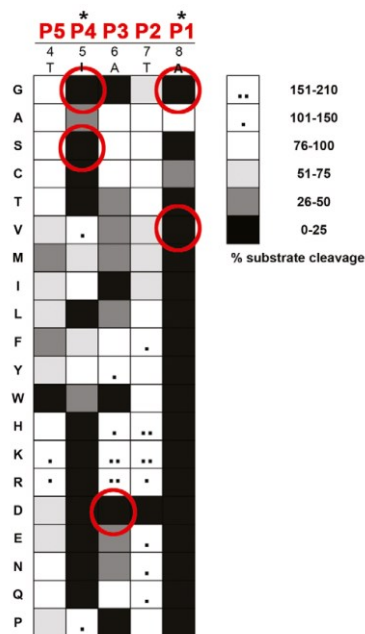


Figure 1: A map of the *in vitro* specificity of the GlpG protease – a complete position mutagenesis of the *TatA* substrate and cleavage efficiency of individual substrate variants by GlpG rhomboid protease.

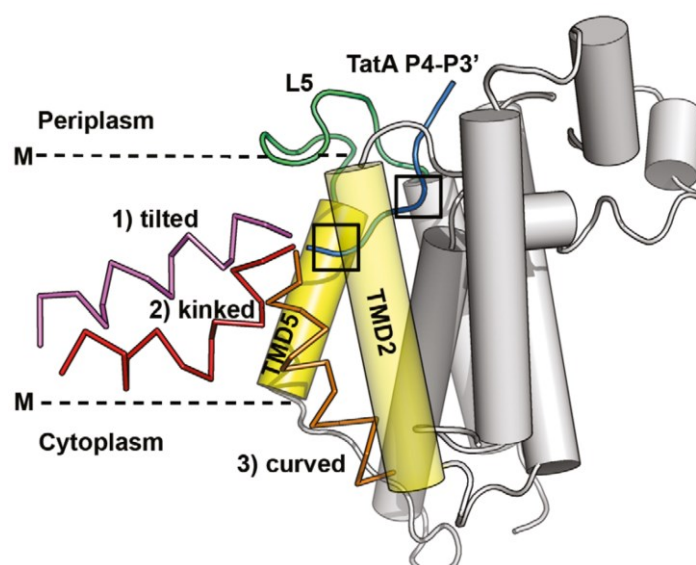


Figure 2: Model of GlpG protease in complex with membrane part of TatA substrate. Structure of enzyme with blue part of substrate fragment is based on X-ray data and simulated orientation of the substrate within the membrane are shown in different colours.

Results are included in the following publication:

Substrate binding and specificity of rhomboid intramembrane protease revealed by substrate– peptide complex structures.

Sebastian Zoll, Stancho Stanchev, Jakub Began, Jan Škerle, Martin Lepšík, Lucie Peclinovská, Pavel Majer, and Kvido Strisovsky (2014), The EMBO Journal. 33, 2408-2421.

7.2. Sensitive versatile fluorogenic transmembrane peptide substrates for rhomboid Intramembrane proteases

The rhomboid protease family has members in all three domains of life, where they take part in many important biological processes (membrane protein quality control, mitochondrial dynamics, ERAD), which makes them promising therapeutic targets. To fully exploit their potential we are still missing their selective inhibitors. Current methods of *in vitro* studies of rhomboids are not compatible with high throughput screening and detailed kinetic analyses.

To overcome these difficulties we developed a robust method on the platform of a fluorogenic transmembrane peptidyl substrate, which is suitable for activity assays.

As a scaffold for our fluorogenic substrate we used the sequence of the second transmembrane helix of the polytopic protein LacY (LacY TM2). This substrate is known to be cleaved by proteases from the rhomboid family. By modifying the substrate sequence in positions P5 and P4' by the fluorescent pair EDANS/DABCYL we obtain a fluorogenic substrate, the cleavage of which is accompanied by an increased fluorescence of EDANS. In the uncleaved substrate the fluorescent pair EDANS/DABCYL is close enough for mutual energy transfer (FRET), which quenches EDANS fluorescence. Positions P5 and P4' are not important for rhomboid cleavage [14,40] and mutations of these residues do not affect substrate cleavage efficiency by the rhomboid GlpG. Our substrate is versatile and can be used in detergent micelles and also in liposomes (Figure

3). Another advantage of our substrate is the possible cleavage efficiency harmonisation by a modification of the substrate sequence. When the sequence of LacYTM2 derivative substrate was optimised based on the published GlpG specificity [40], we increased the cleavage efficiency by 23-fold in comparison with the unmodified substrate. A similar strategy could be used for the optimisation of other rhomboid family substrates.

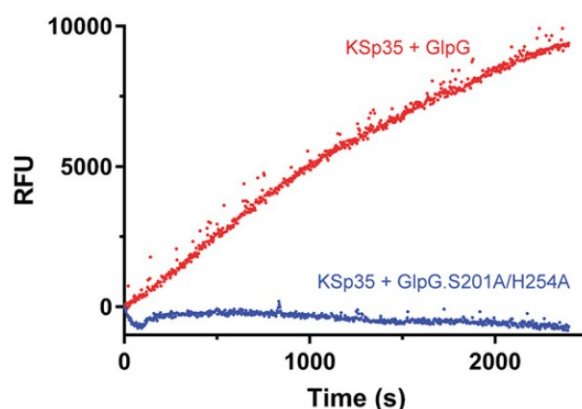


Figure 3: Cleavage of fluorogenic substrate KSp35 by GlpG protease in liposomes is indicated by increased fluorescence (red). Substrate incubated with inactive protease stays intact (blue).

Results are included in the following publication:

Sensitive versatile fluorogenic transmembrane peptide substrates for rhomboid intramembrane proteases.

Anežka Tichá, Stancho Stanchev, Jan Škerle, Jakub Began, Marek Ingr, Kateřina Švehlová, Lucie Polovinkin, Martin Růžička, Lucie Bednářová, Romana Hadravová, Edita Poláchová, Petra Rampířová, Jana Březinová, Václav Kašička, Pavel Majer, and Kvido Strisovsky (2017), *The Journal of Biological Chemistry*. 292, 2703-2713

7.3. General and modular strategy for designing potent, selective, and pharmacologically compliant inhibitors of rhomboid proteases.

The function of rhomboid proteases is associated with several diseases, like Parkinson's disease, malaria and cancer. The use of rhomboids as therapeutic targets is limited by the absence of potent selective inhibitors suitable for drug design. To address this problem, we tested the applicability of oligopeptides with electrophile warhead as rhomboid proteases inhibitors.

We used the information about substrate specificity of the model rhomboid protease GlpG to design a novel group of peptidyl- α -ketoamide inhibitors of rhomboid proteases. Out of all the tested warheads commonly used for serine protease inhibition (trifluoromethylketones, boronates, acylsulfonamides, thiazolyketones) [41,42] the ketoamide electrophilic moiety was the most appropriate one. We have shown that by a modification of the hydrophobic residues of the peptidyl part of the inhibitor, which are important for rhomboid substrate recognition [14,38], it is possible to modify its inhibition potential. We confirmed the high selectivity of the inhibitors for rhomboids by testing them against a set of human serine proteases in a high-throughput assay [43]. The inhibition is non-competitive and the substrate is bound covalently and reversibly, as revealed by the kinetic and structural analyses of inhibition. The inhibitors are also active *in vivo* (Figure 4), which was confirmed in biological experiments. The big advantage of the inhibitors is that by a modification of their peptidyl or reactive part it is possible to prepare tailored inhibitors for selected rhomboid proteases.

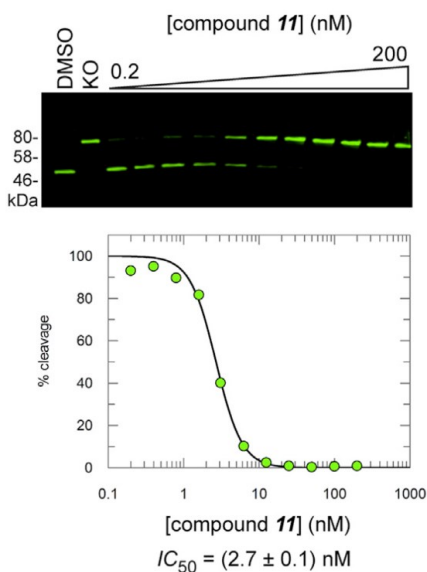


Figure 4: *In vivo* inhibition of the bacterial rhomboid GlpG by the compound n.11.

Results are included in the following publication:

General and modular strategy for designing potent, selective, and pharmacologically compliant inhibitors of rhomboid proteases.

Anežka Tichá, Stancho Stanchev, Kutti R. Vinothkumar, David C. Mikles, Petr Páchl, Jakub Began, Jan Škerle, Kateřina Švehlová, Minh T.N. Nguyen, Steven H.L. Verhelst, Darren C. Johnson, Daniel A. Bachovchin, Martin Lepšík, Pavel Majer, and Kvido Strisovsky (2017), *Cell Chemical Biology*. 24, 1523–1536

7.4. Investigation of the human rhomboid protease RHBDL2 oligomeric state in the natural biomembrane environment

The information about the behaviour of proteins from the rhomboid family in the environment of a natural biological membrane is very limited. Some authors postulate rhomboid dimerization in detergent micelles as a part of their regulation mechanism resulting in allosteric activation [25]. This hypothesis is however based only on *in vitro* studies on detergent solubilised proteins. The importance of the elucidation of rhomboid oligomeric state in natural membrane is supported by the results of independent research [26], which used different methods but yielded similar results as our work.

In our approach, we used fluorescence correlation spectroscopy (FCCS) to measure strong protein-protein interactions, as also performed by others [26], but we also included the detection of weak interactions by Förster resonance energy transfer (FRET). We focused on the behaviour of the human rhomboid protease RHBDL2 in the natural biomembrane environment by an integration of biophysical fluorescence techniques. To avoid any misinterpretation and false-positive results caused by the crowding effect [44] of fluorescently labelled molecules, we had to have the protein expression and localisation (Figure 5) under our strict control, and we also checked our data with Monte Carlo (MC) simulations. Linkers between the rhomboid and the fluorescent protein in our fusion constructs were carefully designed as the linker length and mobility can have a dramatic impact on FRET intensity. Membrane protein is, during its maturation in cellular compartments [45], exposed to membranes with different lipid composition, which could influence its oligomerisation tendencies [46]. We used protein colocalization assay to investigate the oligomeric state of RHBDL2 during its maturation in endoplasmic reticulum (ER). We have found no evidence of RHBDL2 dimerization in natural biomembrane environment neither on cellular surface, nor during its maturation in ER.

The previously propagated theory of rhomboid dimerization and allosteric regulation [25] was an artefact valid only *in vitro* with no overlap with the situation in a living cell.



Figure 5: Localisation of human rhomboid RHBDL2 in fusion with fluorescent protein on the plasma membrane.

Results are included in the following publication:

Membrane protein dimerization in cell-derived lipid membranes measured by FRET with MC simulations.

Jan Škerle, Jana Humpolíčková, Nicholas Johnson, Petra Rampírová, Edita Poláchová, Monika Fliegl, Jan Dohnálek, Anna Suchánková, David Jakubec, and Kvido Strisovsky (2020), *Biophysical Journal*, accepted

8. Conclusions

In this work we focused on the mechanism, specificity and potential drug targeting of intramembrane rhomboid proteases by employing biochemical and biophysical approaches. We focused on the interaction between the *E. coli* rhomboid protease GlpG and its substrate using a combination of X-ray crystallography, an enzymatic assay and *in silico* modelling. We also used the non-invasive spectroscopic techniques FRET/FCCS together with MC simulations to investigate the oligomerization of human rhomboid protease RHBDL2 in native cell-derived biomembranes.

We elucidated the specificity of GlpG by positional scanning mutagenesis of rhomboid substrate TatA. Our data confirmed the importance of substrate residues at positions P4 and P1. We observed that some substrate mutations inhibit cleavage, but GlpG was also unexpectedly more efficient in the cleavage of some mutant substrates. In our structural study on GlpG in complex with a TatA-derived peptidyl-chloromethylketone inhibitor, we identified the S1 to S4 subsites of the protease and explained how the conserved L1 loop co-forms the S4 subsite. With the help of molecular dynamics, we also built a model of GlpG with the TatA substrate bound in its active site.

Further on, we focused on rhomboid proteases as potential therapeutic targets for inhibitor development. Detailed information about GlpG interaction with the substrate helped us to design a variety of fluorogenic substrates based on the sequence of the promiscuous rhomboid substrate TatATM2. We confirmed the applicability of our fluorogenic substrates in the environment of both detergent micelles and liposomes, using the functional rhomboid cleavage assay. Our substrates can be as well easily adapted for different rhomboid proteases by mutating residues at the P1 to P5 positions, in the peptidyl portion of the substrate. Moreover, by applying principles similar to those for the fluorogenic substrates, we developed rhomboid peptidyl- α -ketoamide inhibitors, which bind the enzyme in a substrate-like manner, covalently and reversibly. The inhibition is selective and the inhibitors work in nanomolar range. The advantage of such inhibitors is their simple adaptability to different rhomboid proteases by inhibitor warhead modification and, in addition, by alteration of amino acid residues in the peptidyl part.

We analysed *in vivo* the behaviour of human rhomboid RHBDL2. By a combination of spectroscopic techniques FCCS and FRET together with *in vivo* imaging of rhomboid localization and with MC simulations, we investigated the tendency of the

rhomboid to dimerize. Although rhomboid dimerization and an associated activation has been described in detergent micelles *in vitro*, we found no evidence for such behaviour *in vivo*. The methodological approach we have employed here to study RHBDL2 is generally applicable to any eukaryotic membrane protein.

9. Použitá literatura/References

1. López-Otín C, Bond JS (2008) Proteases: multifunctional enzymes in life and disease. *J Biol Chem* **283**: 30433–30437.
2. Erez E, Fass D, Bibi E (2009) How intramembrane proteases bury hydrolytic reactions in the membrane. *Nature* **459**: 371–378.
3. Kreutzberger AJB, Ji M, Aaron J, Mihaljević L, Urban S (2019) Rhomboid distorts lipids to break the viscosity-imposed speed limit of membrane diffusion. *Science* (80-).
4. Jürgens G, Wieschaus E, Nüsslein-Volhard C, Kluding H (1984) Mutations affecting the pattern of the larval cuticle in *Drosophila melanogaster*. *Wilhelm Roux's Arch Dev Biol* **193**: 283–295.
5. Zettl M, Adrain C, Strisovsky K, Lastun V, Freeman M (2011) Rhomboid family pseudoproteases use the ER quality control machinery to regulate intercellular signaling. *Cell* **145**: 79–91.
6. Lemberg MK, Menendez J, Misik A, Garcia M, Koth CM, Freeman M (2005) Mechanism of intramembrane proteolysis investigated with purified rhomboid proteases. *EMBO J* **24**: 464–472.
7. Freeman M (2014) The Rhomboid-Like Superfamily: Molecular Mechanisms and Biological Roles. *Annu Rev Cell Dev Biol* **30**: 235–254.
8. Urban S, Wolfe MS (2005) Reconstitution of intramembrane proteolysis in vitro reveals that pure rhomboid is sufficient for catalysis and specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 1883–1888.
9. Ben-Shem A, Fass D, Bibi E (2007) Structural basis for intramembrane proteolysis by rhomboid serine proteases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 462–466.
10. Lemieux MJ, Fischer SJ, Cherney MM, Bateman KS, James MNG (2007) The crystal structure of the rhomboid peptidase from *Haemophilus influenzae* provides insight into intramembrane proteolysis. *Proc Natl Acad Sci* **104**: 750–754.
11. Wu Z, Yan N, Feng L, Oberstein A, Yan H, Baker RP, Gu L, Jeffrey PD, Urban S, Shi Y (2006) Structural analysis of a rhomboid family intramembrane protease reveals a gating mechanism for substrate entry. *Nat Struct Mol Biol* **13**: 1084–1091.
12. Cho S, Baker RP, Ji M, Urban S (2019) Ten catalytic snapshots of rhomboid

- intramembrane proteolysis from gate opening to peptide release. *Nat Struct Mol Biol* **26**: 910–918.
13. Moin SM, Urban S (2012) Membrane immersion allows rhomboid proteases to achieve specificity by reading transmembrane segment dynamics. *Elife* **1**: e00173.
 14. Strisovsky K, Sharpe HJ, Freeman M (2009) Sequence-specific intramembrane proteolysis: identification of a recognition motif in rhomboid substrates. *Mol Cell* **36**: 1048–1059.
 15. Freeman M (2008) Rhomboid Proteases and their Biological Functions. *Annu Rev Genet* **42**: 191–210.
 16. Bergbold N, Lemberg MK (2013) Emerging role of rhomboid family proteins in mammalian biology and disease. *Biochim Biophys Acta - Biomembr* **1828**: 2840–2848.
 17. Hill RB, Pellegrini L (2010) The PARL family of mitochondrial rhomboid proteases. *Semin Cell Dev Biol* **21**: 582–592.
 18. Dowse TJ, Soldati D (2005) Rhomboid-like proteins in Apicomplexa: phylogeny and nomenclature. *Trends Parasitol* **21**: 254–258.
 19. Etheridge SL, Brooke MA, Kellsell DP, Blaydon DC (2013) Rhomboid proteins: A role in keratinocyte proliferation and cancer. *Cell Tissue Res* **351**: 301–307.
 20. Chan EYL, McQuibban GA (2013) The mitochondrial rhomboid protease: Its rise from obscurity to the pinnacle of disease-relevant genes. *Biochim Biophys Acta - Biomembr* **1828**: 2916–2925.
 21. Stevenson LG, Strisovsky K, Clemmer KM, Bhatt S, Freeman M, Rather PN (2007) Rhomboid protease AarA mediates quorum-sensing in *Providencia stuartii* by activating TatA of the twin-arginine translocase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 1003–1008.
 22. Baker RP, Urban S (2012) Architectural and thermodynamic principles underlying intramembrane protease function. *Nat Chem Biol* **8**: 759–768.
 23. Maegawa S, Ito K, Akiyama Y (2005) Proteolytic Action of GlpG, a Rhomboid Protease in the *Escherichia coli* Cytoplasmic Membrane[†]. *Biochemistry* **44**: 13543–13552.
 24. Urban S, Schlieper D, Freeman M (2002) Conservation of intramembrane proteolytic activity and substrate specificity in prokaryotic and eukaryotic rhomboids. *Curr Biol* **12**: 1507–1512.

25. Arutyunova E, Panwar P, Skiba PM, Gale N, Mak MW, Lemieux MJ (2014) Allosteric regulation of rhomboid intramembrane proteolysis. 1–13.
26. Kreutzberger AJB, Urban S (2018) Single-Molecule Analyses Reveal Rhomboid Proteins Are Strict and Functional Monomers in the Membrane. *Biophys J* **115**: 1755–1761.
27. Urban S, Freeman M (2003) Substrate specificity of rhomboid intramembrane proteases is governed by helix-breaking residues in the substrate transmembrane domain. *Mol Cell* **11**: 1425–1434.
28. Düsterhöft S, Künzel U, Freeman M (2017) Rhomboid proteases in human disease: Mechanisms and future prospects. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res* **1864**: 2200–2209.
29. Esser K, Tursun B, Ingenhoven M, Michaelis G, Pratje E (2002) A Novel Two-step Mechanism for Removal of a Mitochondrial Signal Sequence Involves the mAAA Complex and the Putative Rhomboid Protease Pcp1. *J Mol Biol* **323**: 835–843.
30. McQuibban GA, Saurya S, Freeman M (2003) Mitochondrial membrane remodelling regulated by a conserved rhomboid protease. *Nature* **423**: 537–541.
31. McQuibban GA, Lee JR, Zheng L, Juusola M, Freeman M (2006) Normal mitochondrial dynamics requires rhomboid-7 and affects Drosophila lifespan and neuronal function. *Curr Biol* **16**: 982–989.
32. Lemberg MK, Freeman M (2007) Functional and evolutionary implications of enhanced genomic analysis of rhomboid intramembrane proteases. *Genome Res* **17**: 1634–1646.
33. Fleig L, Bergbold N, Sahasrabudhe P, Geiger B, Kaltak L, Lemberg MK (2012) Ubiquitin-Dependent Intramembrane Rhomboid Protease Promotes ERAD of Membrane Proteins. *Mol Cell* **47**: 558–569.
34. Johnson N, Březinová J, Stephens E, Burbidge E, Freeman M, Adrain C, Strisovsky K (2017) Quantitative proteomics screen identifies a substrate repertoire of rhomboid protease RHBDL2 in human cells and implicates it in epithelial homeostasis. *Sci Rep* **7**: 1–13.
35. Lemberg MK (2013) Sampling the membrane: function of rhomboid-family proteins. *Trends Cell Biol* **23**: 210–217.
36. Christianson JC, Olzmann JA, Shaler TA, Sowa ME, Bennett EJ, Richter CM,

- Tyler RE, Greenblatt EJ, Harper JW, Kopito RR (2011) Defining human ERAD networks through an integrative mapping strategy. *Nat Cell Biol* **14**: 93–105.
37. Rodriguez F, Rouse SL, Tait CE, Harmer J, De Riso A, Timmel CR, Sansom MSP, Berks BC, Schnell JR (2013) Structural model for the protein-translocating element of the twin-arginine transport system. *Proc Natl Acad Sci* **110**: E1092–E1101.
38. Dickey SW, Baker RP, Cho S, Urban S (2013) Proteolysis inside the Membrane Is a Rate-Governed Reaction Not Driven by Substrate Affinity. *Cell* **155**: 1270–1281.
39. Lewis BA, Engelman DM (1983) Bacteriorhodopsin remains dispersed in fluid phospholipid bilayers over a wide range of bilayer thicknesses. *J Mol Biol* **166**: 203–210.
40. Zoll S, Stanchev S, Began J, Skerle J, Lepšík M, Peclinovská L, Majer P, Strisovsky K (2014) Substrate binding and specificity of rhomboid intramembrane protease revealed by substrate-peptide complex structures. *EMBO J* 1–14.
41. Hedstrom L (2002) Serine protease mechanism and specificity. *Chem Rev* **102**: 4501–4523.
42. Walker B, Lynas JF (2001) Strategies for the inhibition of serine proteases. *Cell Mol Life Sci* **58**: 596–624.
43. Bachovchin DA, Koblan LW, Wu W, Liu Y, Li Y, Zhao P, Woznica I, Shu Y, Lai JH, Poplawski SE, et al. (2014) A high-throughput, multiplexed assay for superfamily-wide profiling of enzyme activity. *Nat Chem Biol* **10**: 656–663.
44. King C, Sarabipour S, Byrne P, Leahy DJ, Hristova K (2014) The FRET signatures of noninteracting proteins in membranes: simulations and experiments. *Biophys J* **106**: 1309–1317.
45. Voelker DR (1991) Organelle biogenesis and intracellular lipid transport in eukaryotes. *Microbiol Rev* **55**: 543–560.
46. Goddard AD, Dijkman PM, Adamson RJ, Watts A (2013) Lipid-Dependent GPCR Dimerization. In, *Methods in Cell Biology* pp 341–357. Academic Press Inc.

Education

Since 2011: PhD student at Charles University in Prague, Faculty of Science, Department of Biochemistry

Supervisor: Kvido Stříšovský, Ph.D.

Dissertation thesis: Substrate specificity, mechanism and activity regulation of the rhomboid family intramembrane proteases

2009 – 2011: Master of Science studies at Masaryk University in Brno, Faculty of Science, Department of Biochemistry

Supervisor: Richard Štefl, Ph.D.

Masters thesis: Mechanism of RNA degradation by the TRAMP-exosome complex.

2006 – 2009: Bachelor of Science studies at Masaryk University in Brno, Faculty of Science, Department of Biochemistry

Supervisor: Richard Štefl, Ph.D.

Bachelor thesis: Cloning and expression of Air2 protein in *Pichia Pastoris*.

Employment

Since 2011: Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, AS CR, v.v.i.

Certificates and Courses

- EMBO Workshop on Advances in protein–protein interaction analysis and modulation (Hyères, 2014)
- First Certificate in English, grade B, level B2 (Prague 2014)
- Entry to employment (Prague, 2013)

Grants

2013 – 2016 Student grant from the Grant Agency of the Charles University in Prague (GAUK 232313) supporting the project “Biological function and substrate specificity of *E.coli* GlpG, an intramembrane protease from the rhomboid family“

Publications

1. Substrate binding and specificity of rhomboid intramembrane protease revealed by substrate–peptide complex structures

Sebastian Zoll, Stancho Stanchev, Jakub Began, Jan Škerle, Martin Lepšík, Lucie Peclínovská, Pavel Majer, and Kvido Strisovsky (2014), *The EMBO Journal*. 33, 2408-2421.

2. Sensitive versatile fluorogenic transmembrane peptide substrates for rhomboid intramembrane proteases

Anežka Tichá, Stancho Stanchev, Jan Škerle, Jakub Began, Marek Ingr, Kateřina Švehlová, Lucie Polovinkin, Martin Růžička, Lucie Bednárová, Romana Hadravová, Edita Poláchová,

Petra Rampírová, Jana Březinová, Václav Kašička, Pavel Majer, and Kvido Strisovsky (2017), *The Journal of Biological Chemistry*. 292, 2703-2713.

3. General and modular strategy for designing potent, selective, and pharmacologically compliant inhibitors of rhomboid proteases

Anežka Tichá, Stancho Stanchev, Kutti R. Vinothkumar, David C. Mikles, Petr Páchl, Jakub Began, Jan Škerle, Kateřina Švehlová, Minh T.N. Nguyen, Steven H.L. Verhelst, Darren C. Johnson, Daniel A. Bachovchin, Martin Lepšík, Pavel Majer, and Kvido Strisovsky (2017), *Cell Chemical Biology*. 24, 1523–1536.

4. Membrane protein dimerization in cell-derived lipid membranes measured by FRET with MC simulations

Jan Škerle, Jana Humpolíčková, Nicholas Johnson, Petra Rampírová, Edita Poláchová, Monika Fliegl, Jan Dohnálek, Anna Suchánková, David Jakubec, and Kvido Strisovsky (2020), *Biophysical Journal*, accepted

Skills

Molecular cloning, protein expression and purification, proteoliposomes, enzymatic assays, bacterial genetics and cell biology, mammalian cell culture basics.
MS Office, Adobe Photoshop and Illustrator, DNASar Lasergene