

KUNITZOVY PROTEASOVÉ INHIBITORY Z ROSTLIN: STRUKTURNÍ A FUNKČNÍ DIVERZITA

JAROSLAV SRP^{a,b} a MICHAEL MAREŠ^a

^a Ústav organické chemie a biochemie Akademie věd České republiky, Flemingovo nám. 2, 166 10 Praha, ^b Katedra biochemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova v Praze, Hlavova 2030/8, 128 40 Praha
srp@uochb.cas.cz

Došlo 23.3.16, přijato 12.5.16.

Klíčová slova: inhibitory proteas, Kunitzovy inhibitory, proteolytické enzymy, prostorová struktura proteinů, obranné proteiny rostlin

Obsah

1. Úvod
2. Specifita a funkce proteinů z Kunitzovy rodiny
 - 2.1. Proteasové inhibitory z Kunitzovy rodiny
 - 2.1.1. Inhibitory serinových proteas
 - 2.1.2. Inhibitory aspartátových proteas
 - 2.1.3. Inhibitory cysteinových proteas
 - 2.2. Další funkce proteinů z Kunitzovy rodiny
3. Struktura inhibitorů Kunitzovy rodiny a jejich interakce s proteasami
 - 3.1. Architektura a strukturní variabilita inhibitorů
 - 3.2. Struktura komplexů inhibitorů s proteasami
4. Závěr

1. Úvod

Proteolýza patří mezi nejvýznamnější biochemické děje, které zahrnují na jedné straně nespecifickou degradaci proteinů při procesech jako je trávení a na druhé straně vysoce specifickou úpravu struktury proteinů a regulaci jejich funkce¹. Vzhledem ke své důležitosti je proteolýza ve všech organismech pod přísnou kontrolou, která se odehrává na několika úrovních, a jednu z nich představují inhibitory proteas. Největší skupinou přírodních inhibitorů proteas jsou inhibitory proteinového charakteru, které se klasifikují podle struktury do 67 rodin uvedených v databázi proteas a jejich inhibitorů Merops (<http://merops.sanger.ac.uk/inhibitors/>).

Podle mechanismu interakce s proteasami lze inhibitory rozdělit na reverzibilní a ireverzibilní. Reverzibilní inhibitory tvoří nekovalentní protein-proteinové komplexy

s proteasami, kde stericky blokují přístup substrátu do katalytického místa, zatímco ireverzibilní inhibitory jsou atakovány proteasami za vzniku kovalentních inhibičních komplexů^{2,3}. U proteasových inhibitorů došlo během evoluce ke značné specializaci a jednotlivé rodiny inhibitorů se obvykle zaměřují na regulaci pouze jedné konkrétní třídy proteas. Několik rodin inhibitorů ale toto obecné pravidlo porušuje a je u nich zřejmý spíše opačný trend: jednotlivé inhibitory se strukturně a funkčně diverzifikovaly, takže rodina inhibitorů jako celek umožňuje regulaci dvou nebo dokonce tří proteasových tříd. V tomto kontextu jsou unikátní rostlinné inhibitory z Kunitzovy rodiny, jejichž zástupci jsou schopni inhibovat enzymy ze třídy serinových, cysteinových nebo aspartátových proteas. Dokonce se u některých inhibitorů této rodiny vyvinula multifunkčnost – více reaktivních center na jediné molekule cílených proti odlišným třídám proteas.

Tento přehledný článek je zaměřen na rostlinné proteasové inhibitory z Kunitzovy rodiny (rodina I3 dle Merops databáze, také nazývaná Kunitz-P), které jsou široce rozšířené u řady rostlinných taxonů⁴. Historie inhibitorů Kunitzovy rodiny je spojena se dvěma jmény – Kunitz a Laskowski. Prvně jmenovaný ve 40. letech 20. století izoloval a charakterizoval inhibitor serinové proteasy trypsinu ze semen sóje označovaný jako STI (soybean trypsin inhibitor)⁵. Laskowski v 80. letech popsal mechanismus interakce trypsinu s Kunitzovými inhibitory a zobecnil ho pro další rodiny reverzibilních inhibitorů interagující se serinovými proteasami⁶. Od 70. let jsou inhibitory Kunitzovy rodiny studovány na úrovni prostorové struktury a tyto informace spolu s detailní analýzou biochemických vlastností a molekulární fylogeneze z nich dělají jednu z nejvíce studovaných rodin proteasových inhibitorů. Mezi hlavní důvody současného zájmu o Kunitzovy inhibitory patří jejich funkce v rostlinách, kde hrají důležitou roli při obraně rostlin: tvoří významnou součást komplexního anti-proteolytického systému, kterým jsou blokovány trávicí proteasy herbivorního hmyzu a patogenů^{7,8}. Z tohoto důvodu jsou geny Kunitzových inhibitorů atraktivní pro konstrukci transgenních plodin odolných proti škůdcům^{9,10}. Další potenciální využití Kunitzových inhibitorů vyplývá z jejich unikátní strukturní architektury, která je základem enormní funkční variability. To umožňuje vyhledávat přírodní formy účinných inhibitorů specifických pro medicíně zajímavé proteasy nebo takové inhibitory cíleně konstruovat mutacemi a racionální strukturní přestavbou molekuly^{11,12}. Výzkum zaměřený tímto směrem vyžaduje nové informace zejména o struktuře reaktivních center Kunitzových inhibitorů a mechanismech jejich interakce se širokým spektrem relevantních typů proteas.

2. Specifita a funkce proteinů z Kunitzovy rodiny

Rostlinné inhibitory z Kunitzovy rodiny jsou proteiny nebo N-glykosylované glykoproteiny s molekulovou hmotností v rozmezí 18–22 kDa. Jde zpravidla o jednořetězcové molekuly, ale jsou známy i dvouřetězcové inhibitory, které vznikají proteolytickou fragmentací v oblasti povrchové smyčky⁴. Kunitzovy proteiny byly identifikovány a studovány v různých rostlinných pletivech, zejména v semenech, hlízách, listech a kůře. V listech hrají významnou roli jako obranné molekuly proti hmyzím herbivorům; jejich exprese je indukovaná při poškození listů požerem nebo spouštěna methyljasmonátem jako signální molekulou pro systémovou odpověď rostliny¹³. Vysoký obsah inhibitorů je v zásobních pletivech (semenech a hlízách), kde zřejmě vytvářejí permanentní obrannou bariéru proti proteasám patogenů, a předpokládá se, že by zde mohly hrát také roli jako zásobní proteiny a jako endogenní inhibitory, které kontrolují rostlinné proteasy např. během klíčení semen⁴.

2.1. Proteasové inhibitory z Kunitzovy rodiny

2.1.1. Inhibitory serinových proteas

Výrazně největší skupinou inhibitorů z Kunitzovy rodiny jsou inhibitory serinových proteas (tab. I). Dokáží inhibovat především aktivitu proteas z rodiny S1 a menší počet inhibitorů interaguje s proteasami z rodiny S8. V prvním případě jde o inhibitory širokého spektra trávicích proteas trypsinového a chymotrypsinového typu, od enzymů hmyzích herbivorů po savčí enzymy. Při detailní analýze jejich inhibiční specifity byla také u řady inhibitorů nalezena účinná křížová inhibice medicíně zajímavých proteas z rodiny S1 jako jsou proteasy krevní koagulace (faktory VIIa, XIa, Xa), fibrinolýzy (plasmin), kallikreiny nebo proteasy zánětu (elastasa a katepsin G)⁴. Přestože proteasy trypsinového a chymotrypsinového typu mají zcela odlišnou substrátovou specifitu, některé inhibitory Kunitzovy rodiny jako STI nebo PTI dokáží inhibovat oba typy těchto proteas (tab. I). Byly také konstruovány mutované formy původně chymotrypsinového inhibitoru WCI, které byly konvertovány na trypsinové inhibitory pomocí bodové mutace na reaktivní smyčce inhibitoru nebo transplantací reaktivní smyčky z jiného trypsinového inhibitoru^{14,15}. Ačkoli interakce Kunitzových inhibitorů s trypsinovými proteasami byla intenzivně studována na strukturní úrovni, obdobné informace zatím chybí pro chymotrypsinové proteasy. Skupina Kunitzových inhibitorů ze semen obilnin má inhibiční specifitu k subtilisinům z rodiny S8 serinových proteas. Jde o bifunkční inhibitory, které kromě subtilisinu inhibují odlišným reaktivním centrem také endogenní α -amylasu. Nejlépe prostudovaným je inhibitor BASI z ječmene, který bude dále komentován v kap. 2.2.

2.1.2. Inhibitory aspartátových proteas

Inhibitory aspartátových proteas proteinového charakteru vznikly během evoluce pouze několikrát a představují velmi malou skupinu proteasových inhibitorů. Patří mezi ně několik inhibitorů z Kunitzovy rodiny, které byly izolovány z brambor jako dva izoinhibitory PDI (cit.¹⁶) a NID (cit.¹⁷) a z rajčat jako TDI (cit.¹⁸). Tyto proteiny jsou silně bifunkční inhibitory jednak aspartátových proteas typu katepsinu D a jednak serinových proteas trypsinového a chymotrypsinového typu. Jejich schopnost inhibovat aspartátové proteasy představuje evoluční odpověď na přítomnost tohoto typu proteas v trávicím traktu přirozených hmyzích herbivorů jako je mandelinka bramborová, typický škůdce těchto plodin¹⁹. Jejich obrannou úlohu v listech podporuje i inducibilní exprese methyljasmonátem²⁰. PDI je také schopen inhibovat proteinazu A z kvasinek, která je blízkým homologem hmyzích a savčích katepsinů D, což naznačuje další možnou obrannou funkci inhibitorů proti fungálním patogenům²¹. Prostorová struktura PDI byla nedávno určena, nicméně unikátní reaktivní místo pro interakci s aspartátovými proteasami je neznámé a předmětem spekulací založených na molekulárním modelování^{22,23}.

2.1.3. Inhibitory cysteinových proteas

Bylo popsáno jen několik zástupců Kunitzovy rodiny z bobovitých a lilkovitých rostlin, kteří jsou schopni inhibovat aktivitu cysteinových proteas. Jedná se o obecně o bifunkční inhibitory interagující s cysteinovými proteasami rodiny C1 (rodina papainu) a také se serinovými proteasami rodiny S1. Nejlépe charakterizován, včetně prostorové struktury, byl inhibitor BbCI z bauhinie funkční proti modelovým cysteinovým proteasám jako je katepsin L a cruzipain (a serinovým proteasám typu elastas)²⁴. Pro skupinu izoinhibitorů PCPI z bramboru s inducibilní expresí v listech zatím chybí detailní biochemická analýza²⁵. Interakční mechanismus těchto inhibitorů s cysteinovými proteasami není známý, ale je pravděpodobné, že reaktivní centrum inhibitorů bude na rozdíl od Kunitzových inhibitorů serinových proteas obsahovat více než jednu strukturní smyčku. Tato hypotéza je založena na inhibičním mechanismu clitocypinu (rodina I48), který má analogickou prostorovou architekturu jako proteiny z Kunitzovy rodiny a blokuje aktivní místo cysteinové proteasy pomocí dvou smyček²⁶.

2.2. Další funkce proteinů z Kunitzovy rodiny

U několika proteinů Kunitzovy rodiny byly podrobně popsány interakce s jinými skupinami proteinů, než jsou proteasy. Bifunkční inhibitor BASI je inhibitorem endogenní α -amylasy (dále také inhibuje serinovou proteasu subtilisin) a jeho úlohou je regulace štěpení zásobního škrobu v semenech ječmene při klíčení²⁷. Příbuzné inhibitory WASI a RASI byly identifikovány v dalších obilnách²⁸. Protein mirakulin z Kunitzovy rodiny byl izolován z plodů keře *Synsepalum dulcificum*. Ovlivňuje činnost chuťových pohárků tím, že se váže v neutrálním pH na

Tabulka I

Přehled rostlinných proteinů Kunitzovy rodiny s vyřešenou prostorovou strukturou. Uvedeno je označení proteinů a zdrojové rostliny. Typické modelové proteasy (senzitivní enzymy), které interagují s inhibitory, jsou klasifikovány podle tříd jako serinové (SerPR), cysteinové (CysPR) a aspartátové (AspPR) proteasy. Kód v PDB databázi se týká prostorových struktur samotných proteinů a jejich komplexů s uvedenými enzymy.

Inhibitor	Původ	Inhibiční specifita (senzitivní enzymy)	3D struktura (PDB kód)	
			inhibitor	komplex s enzymem
STI	<i>Glycine max</i>	SerPR (trypsin, chymotrypsin)	1BA7; 1AVU	trypsin 1AVW, 1AVX
DrTI	<i>Delonix regia</i>	SerPR (trypsin, kallikren)	1R8N	
WCI	<i>Psophocarpus tetragonolobus</i>	SerPR (chymotrypsin)	1WBC, 2WBC, 4WBC, 1EYL; mutované inhibitory ^a : 1FMZ, 1FNO, 3QYD, 3I2A, 3I2X, 1XG6, 2ET2, 2BEA, 2BEB, 2ESU, 4H9W, 4TLP, 4HA2	trypsin 3VEQ, 3I29, 2QYI
ETI	<i>Erythrina caffra</i>	SerPR (trypsin)	1TIE	
WBA	<i>Psophocarpus tetragonolobus</i>	nebyla nalezena	1WBA	
CTI	<i>Copaifera langsdorffii</i>	SerPR (trypsin)	1R8O	
BASI	<i>Hordeum vulgare</i>	SerPR (subtilisin) α -amylasa		subtilisin 3BX1 α -amylasa 1AVA
BbCI	<i>Bauhinia bauhinoides</i>	CysPR (cruzipain, katepsin L) SerPR (elastasa)	2GZB	
BbKI	<i>Bauhinia bauhinoides</i>	SerPR (kallikrein)	4ZOT	
API-A	<i>Sagittaria sagittifolia</i>	SerPR (trypsin)		2x trypsin ^b 3E8L
Mirakulin	<i>Murraya koenigii</i>	nebyla nalezena ^c	3IIR, 3ZC8	
CrataBL	<i>Crataeva tapia</i>	SerPR (trypsin, faktor Xa)	4IHZ	
EcTI	<i>Enterolobium contortisiliquum</i>	SerPR (trypsin)	4J2K	trypsin 4J2Y
TKI	<i>Tamarindus indica</i>	SerPR (trypsin, faktor Xa)	4AN6	trypsin 4AN7
PPI	<i>Carica papaya</i>	SerPR (trypsin, chymotrypsin, elastasa)	3S8K	
PTI	<i>Solanum tuberosum</i>	SerPR (trypsin, chymotrypsin)	3TC2	
PCPI	<i>Solanum tuberosum</i>	CysPR (katepsiny L, B) SerPR (trypsin, chymotrypsin)	5DVD, 5DVH, 5DWH ^d	
PDI	<i>Solanum tuberosum</i>	AspPR (katepsin D, proteinasa A) SerPR (trypsin, chymotrypsin)	5DZU	

^a Rekombinantní inhibitory s mutacemi zavedenými v aminokyselinové sekvenci, ^b ternární komplex inhibitoru se dvěma molekulami trypsinu, ^c interaguje s chuťovými receptory, ^d nepublikované struktury

receptory sladké chuti jako antagonistu a v kyselém pH se mění na agonistu; kyselý pokrm se tak zdá konzumentovi sladký²⁹. Příbuzným s mirakulinem je protein CrataBL izolovaný z kůry stromu *Crataeva tapia*, který vykazuje insekticidní aktivitu. Jde o lektin vážící glykoproteiny a glykosaminoglykany. Kromě toho je také inhibitorem serinových proteas trypsinového typu¹¹.

3. Struktura inhibitorů Kunitzovy rodiny a jejich interakce s proteasami

3.1. Architektura a strukturní variabilita inhibitorů

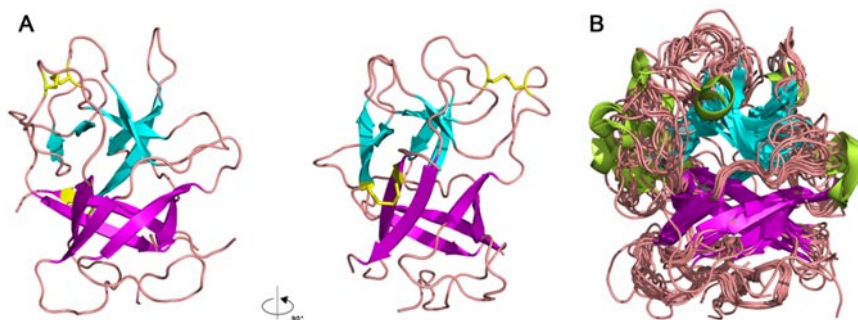
V současné době jsou v databázi PDB více než tři desítky prostorových struktur rostlinných proteinů z Kunitzovy rodiny a šest struktur jejich komplexů, kde je Kunitzův inhibitor navázaný na hydrolytický enzym – proteasu nebo α -amylasu (tab. I). Tyto prostorové struktury mají jednotnou architekturu, která je charakteristická pro proteiny z Kunitzovy rodiny a je označována jako β -trojlístek (angl. β -trefoil). Obr. 1A ukazuje prostorovou strukturu molekuly trypsinového inhibitoru STI jako typického modelového zástupce Kunitzovy rodiny³⁰. Architektura β -trojlístku je tvořena dvanácti segmenty se sekundární strukturou (β -strukturou), které jsou organizovány po dvojicích do vláseňek a jsou propojeny smyčkami. Tato uspořádání bývá popisováno jako strom, jehož kmen je tvořen šesti segmenty β -struktury vytvářejícími β -soudek a koruna se skládá ze tří párů β -struktur uspořádaných do trojúhelníku³¹. Sekvenční a strukturní analýza ukázala, že architekturu β -trojlístku využívá kromě proteinů Kunitzovy rodiny ještě nejméně pět dalších skupin proteinů, přičemž vzájemná sekvenční homologie těchto skupin je velmi malá^{31,32}.

Na obr. 1B je superpozice patnácti prostorových struktur Kunitzových proteinů dostupných v PDB databázi; analyzovány byly volné přirozené formy proteinů bez navázaného interakčního partnera. Z porovnání je patrné, že tyto Kunitzovy proteiny na jedné straně sdílejí společnou vnitřní architekturu β -trojlístku (topologii β -struktury) a na druhé straně jsou vysoce variabilní na povrchu v konformaci smyček exponovaných do roztoku. Některé smyčky mohou obsahovat segment se sekundární strukturou, konkrétně krátký motiv α -šroubovice, který se vyskytuje u řady z těchto molekul. Porovnání sekvencí pěti Kunitzových inhibitorů na obr. 2 názorně ukazuje variabilitu smyček v jejich délce i sekvenci.

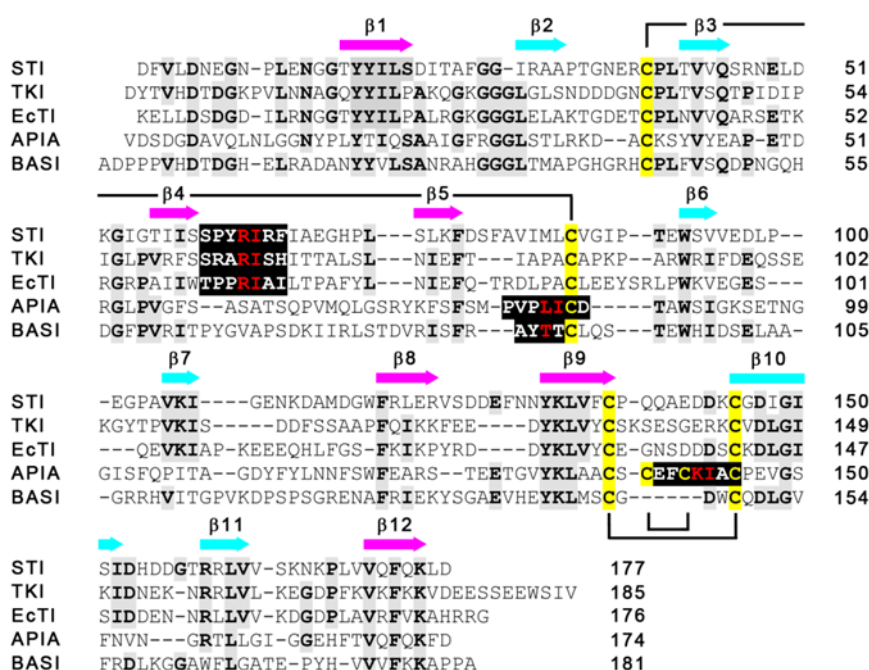
Architektura Kunitzových proteinů je stabilizována pomocí dvou konzervativních disulfidických můstků mezi cysteinovými zbytky Cys39-Cys86 a Cys136-Cys145 (číslování podle STI, obr. 1 a 2). Některé Kunitzovy proteiny obsahují další přídavný disulfid jako je tomu u inhibitoru serinových proteas API-A (cit.³³) (obr. 2) a inhibitorů serinových/aspartátových proteas PDI (cit.¹⁶) a NDI (cit.¹⁷) nebo mají redukovaný počet disulfidů, případně disulfidy zcela chybí, jak bylo zjištěno u inhibitorů serinových a cysteinových proteas BbCI (cit.³⁴) a BbKI (cit.³⁵) (tab. I). Počet a rozmístění disulfidických vazeb na molekule Kunitzových proteinů byly také navrženy jako kritérium pro klasifikaci této proteinové rodiny do čtyř skupin³⁶.

3.2. Struktura komplexů inhibitorů s proteasami

Z šesti dostupných prostorových struktur komplexů Kunitzových inhibitorů s vazebnými partnery jsou čtyři pro komplex se serinovou proteasou trypsinem a další komplexy jsou se serinovou proteasou subtilisinem a s α -amylasou (tab. I).



Obr. 1. **Prostorová struktura molekul Kunitzových inhibitorů.** (A) Struktura reprezentativního inhibitoru STI (PDB kód: 1AVU). Molekula má architekturu β -trojlístku a je znázorněna pomocí stužkového modelu s barevně vyznačenými segmenty β -struktur. Šest fialových segmentů vytváří β -soudek označovaný jako “kmen” molekuly, šest modrých segmentů je umístěno v “koruně” molekuly. Smyčky spojující segmenty β -struktur mají lososovou barvu a dva disulfidové můstky mezi cysteinovými zbytky jsou znázorněny žlutě. (B) Superpozice prostorových struktur Kunitzových inhibitorů (15 struktur dostupných v PDB databázi). Barevné kódování je stejné jako v panelu (A); disulfidové můstky nejsou kvůli přehlednosti znázorněny. Zřetelné je konzervativní uspořádání segmentů β -struktur a konformační variabilita smyček. Zeleně jsou znázorněny krátké segmenty s konformací α -šroubovice umístěné v odlišných smyčkách některých inhibitorů. Molekulární grafika pro všechny obrázky byla připravena programem PyMol.



Obr. 2. Přřazení aminokyselinových sekvencí Kunitzových inhibitorů. Analyzovány byly inhibitory, pro které je známá prostorová struktura komplexu s proteasou (tab. 1), konkrétně s trypsinem (inhibitory STI, TKI a EcTI), dvěma molekulami trypsinu (API-A) a subtilisinem (BASI). Černým pozadím jsou zvýrazněny aminokyselinové zbytky, které tvoří reaktivní smyčku interagující s proteasou: červeně jsou uvedeny zbytky $P_1'-P_1$, které se vážou v blízkosti katalytického místa trypsinu (v podmístech S_1' a S_1) a zbytek P_3 , který se vážou do S_3 podmísta subtilisinu. Párování cysteinových zbytků (žluté) do disulfidických můstků je vyznačeno svorkou. Šedým pozadím jsou zvýrazněny zbytky identické alespoň ve třech sekvencích. Barevné šipky udávají konzervativní pozici segmentů β -struktur (barevné kódování odpovídá topologii uvedené v obr. 1; nad šipkami je uvedeno značení segmentů). Přřazení sekvencí bylo provedeno programem ClustalW (<http://embnet.vital-it.ch/software/ClustalW.html>) a upraveno podle superpozice prostorových struktur v programu PyMol.

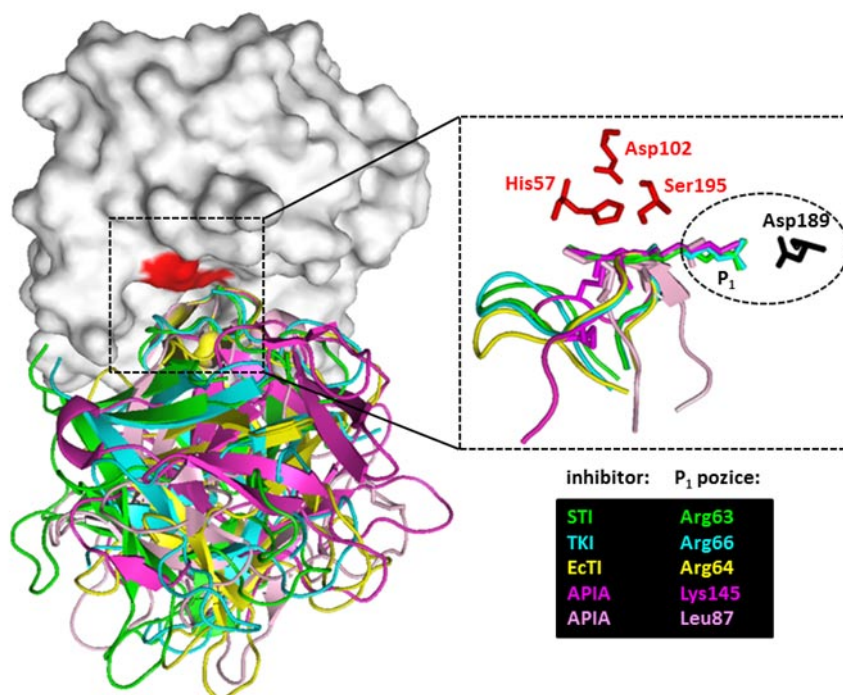
Komplexy s trypsinem umožňují podrobnou srovnávací analýzu interakce. Obr. 2 dává na úrovni sekvencí inhibitorů základní informaci o poloze reaktivního místa, které zprostředkovává vazbu na trypsin. Reaktivní místo nemá stejné umístění v sekvenci jednotlivých inhibitorů, ale během molekulární evoluce se vytvořilo nezávisle na třech odlišných smyčkách umístěných mezi segmenty β -struktur. Je to smyčka $\beta 4$ - $\beta 5$ u inhibitorů STI (cit.³⁰), TKI (cit.³⁷) a EcTI (cit.³⁸) a dále smyčky $\beta 5$ - $\beta 6$ a $\beta 9$ - $\beta 10$ u inhibitoru API-A (cit.³³), který je schopen interagovat se dvěma molekulami trypsinu (smyčky jsou značeny podle číslování okolních segmentů β -struktur v obr. 2).

Obr. 3 analyzuje prostorovou stavbu reaktivních smyček inhibitorů vázaných v aktivním místě trypsinu. Superpozice smyček ukazuje, že všechny Kunitzovy inhibitory využívají analogický mechanismus interakce s trypsinem. Ten umísťuje klíčový zbytek P_1 inhibitoru do vazebného podmísta S_1 trypsinu, které je v těsné blízkosti katalytických zbytků His57, Asp102 a Ser195. Podmísto S_1 je zodpovědné za substrátovou specifitu trypsinu s preferencí pro bazické aminokyseliny, proto Kunitzovy inhibitory využívají v pozici P_1 především zbytky Arg a Lys (vzácnější je

nahrazení hydrofobní aminokyselinou jako je Leu87 v $\beta 5$ - $\beta 6$ smyčce u inhibitoru API-A) (obr. 2 a 3). Tímto způsobem reaktivní smyčka napodobuje stavbu peptidového substrátu, který je trypsinem vázán a štěpen mezi pozicemi P_1 a P_1' (pozn. v konvenčním značení aminokyselinových zbytků substrátů NH_2 - P_x - P_2 - P_1 - P_1' - P_2' - P_x' -COOH je štěpena vazba P_1 - P_1'). Uvedený mechanismus inhibice serinových proteas se nazývá Laskowského kanonický mechanismus^{39,40}.

Reaktivní smyčky Kunitzových inhibitorů, přestože jsou v těsné blízkosti katalytických zbytků trypsinu, nejsou efektivně štěpeny, protože jejich konformace je stabilizována. K tomu dochází pomocí interakce reaktivní smyčky s konzervovaným zbytkem Asn14 v architektuře inhibitoru, jako je tomu u inhibitorů STI, TKI a EcTI, nebo pomocí sítě vodíkových interakcí v rámci smyčky a pomocí disulfidických můstků, jako tomu je u inhibitoru API-A (cit.³³) (obr. 2). Podrobně byla stabilizační role zbytku Asn14 studována u inhibitoru WCI s využitím mutantů, které byly funkčně a strukturně analyzovány^{41,42} (tab. 1).

Vznik reaktivních smyček s odlišným umístěním v architektuře Kunitzových inhibitorů umožnil evoluci



Obr. 3. **Jednotný mechanismus interakce trypsinu s reaktivními místy Kunitzových inhibitorů.** Molekula trypsinu je znázorněna šedě jako povrchový model, katalytické zbytky jsou zvýrazněny červeně. Jednotlivé inhibitory jsou znázorněny stužkovým modelem s barevným kódováním, které umožní identifikovat inhibitor v panelu s vysvětlivkami. V komplexu s trypsinem mají inhibitory rozdílnou orientaci, protože reaktivní místa inhibitorů mají odlišné umístění v architektuře molekuly inhibitoru. Zvětšený výřez obrázku vpravo ukazuje analogickou konformaci reaktivní smyčky inhibitorů, která se váže do katalytického místa trypsinu. Ve struktuře smyčky jsou zobrazeny postranní řetězce aminokyselinových zbytků, které se váží do S₁ a S₁' podmíst trypsinu. Ovál rámuje klíčovou interakci v S₁ podmístě mezi zbytkem Asp189 trypsinu a zbytkem v P₁ pozici inhibitoru (přehled P₁ zbytků a jejich barevné kódování jsou uvedeny v panelu s vysvětlivkami). Katalytická triáda trypsinu (His57, Asp102 a Ser195) je zobrazena červeně.

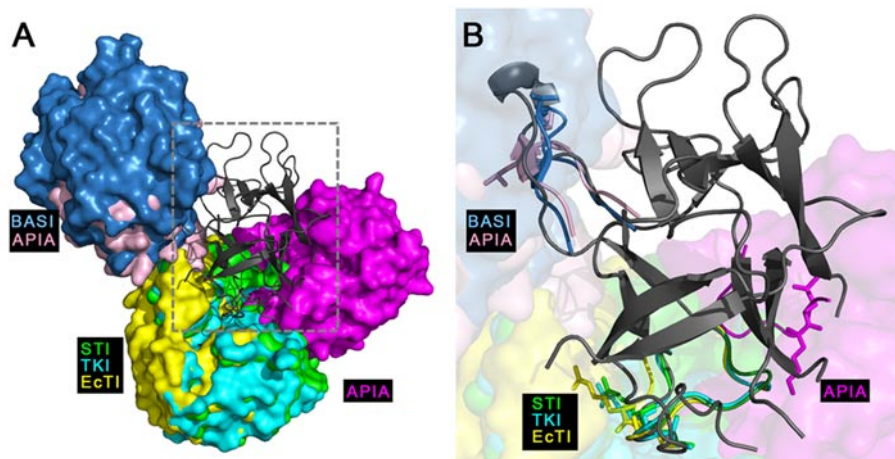
multifunkčních inhibitorů interagujících s více partnery. Na strukturní úrovni byl charakterizován ternární komplex inhibitoru API-A se dvěma molekulami trypsinu, jež se váží na nezávislé reaktivní smyčky umístěné na opačných stranách molekuly inhibitoru (obr. 4). Druhým bifunkčním inhibitorem je BASI, inhibitor serinové proteasy subtilisinu a α -amylasy. Byly určeny prostorové struktury obou komplexů, které ukazují rozdílnou stavbu a umístění příslušných reaktivních míst na molekule BASI.

V komplexu BASI-subtilisin je reaktivní místo inhibitoru tvořeno smyčkou β 5- β 6, která polohou odpovídá reaktivní smyčce pro trypsin na inhibitoru API-A (obr. 2 a 4). Inhibiční mechanismus pro subtilisin se ale liší od Laskowkého kanonického mechanismu, který využívají Kunitzovy inhibitory pro inhibici trypsinu. BASI interaguje se subtilisinem pouze v pozicích P₅-P₂, protože Cys90 v P₁ pozici tvoří disulfid a vychyluje tak reaktivní smyčku z katalytického centra subtilisinu, což ji chrání před štěpením (obr. 2). Pro inhibici je klíčový zbytek P3 (Thr88), který pomocí intramolekulárních interakcí stabilizuje reaktivní smyčku⁴³. Vznik těchto odlišných inhibičních mechanismů lze vysvětlit strukturní odlišností subtilisinu a try-

psinu, jež patří do jiných klanů serinových proteas, takže nejsou sekvenčně homologické, ačkoli mají analogický katalytický mechanismus (s katalytickou triádou zbytků Asp, His a Ser). Prostorová struktura komplexu BASI s α -amylasou ukazuje, že inhibitor využívá pro vazbu na enzym rozsáhlou interakční plochu (2355 Å²), která zahrnuje šest smyček a dva segmenty β -struktury inhibitoru a je tak největší u dosud známých komplexů Kunitzových inhibitorů²⁷. Na straně inhibitoru se interakce účastní celkem 26 aminokyselinových zbytků. Katalytické zbytky α -amylasy nejsou v přímém kontaktu s BASI a mezi oběma proteiny je specificky vázán iont vápníku.

4. Závěr

Rostlinné proteasové inhibitory z Kunitzovy rodiny jsou hojně zastoupené obranné molekuly rostlinných pletiv cílené proti proteolytickému systému hmyzích herbivorů a patogenů. Tyto inhibitory jsou unikátní svou širokou funkční diverzitou, která je umožněna molekulární architekturou inhibitorů se systémem variabilních smyček.



Obr. 4. **Reaktivní místa Kunitzových inhibitorů pro interakci s proteasami mají rozdílnou topologii.** (A) Superpozice prostorových struktur komplexů Kunitzových inhibitorů se serinovými proteasami. Centrálně je umístěn reprezentativní inhibitor znázorněný pomocí černého stužkového modelu. Molekuly serinových proteas, které interagují s inhibitory, jsou znázorněny pomocí povrchových modelů: barevné kódování proteas odpovídá popiskám, které uvádějí příslušný inhibitor tvořící komplex. Inhibitor BASI interaguje se subtilisínem, ostatní inhibitory s trypsinem (API-A se dvěma molekulami trypsinu). (B) Zvětšený výřez z panelu (A) ukazuje, jak jsou rozmístěna reaktivní centra jednotlivých inhibitorů v architektuře molekuly. Reaktivní smyčky inhibitorů jsou znázorněny ve stejném barevném kódování, jako mají příslušné interagující proteasy v panelu (A). Ve struktuře smyčky je zobrazen postranní řetězec aminokyselinových zbytků v pozicích P_1 a P_1' , které se vážou do podmíst S_1 a S_1' trypsinu, a zbytků v pozici P_3 , který se váže do podmísta S_3 subtilisínu.

V současné době v PDB databázi rychle přibývají prostorové struktury Kunitzových inhibitorů. Lze očekávat, že výzkum se nyní bude soustředit především na technicky náročnou strukturní analýzu komplexů inhibitorů s proteasami. Tím budou získány informace o reaktivních centrech inhibitorů a identifikovány nové inhibiční mechanismy pro jednotlivé typy proteas, zejména pro cysteinové a aspartátové proteasy. Na jejich základě bude možné konstruovat vysoce specifické inhibitory cílené proti různým typům proteas, které najdou uplatnění v zemědělství a biomedicíně.

Referát vznikl v rámci řešení grantového projektu InterBioMed LO1302 a výzkumného záměru RVO 61388963.

LITERATURA

- Rawlings N. D., Salvesen G. (ed.): *Handbook of Proteolytic Enzymes*. 3. vyd. Elsevier, Amsterdam 2013.
- Bode W., Huber R.: *Biochim. Biophys. Acta* 1477, 241 (2000).
- Law R. H. P., Zhang Q., McGowan S., Buckle A. M., Silverman G. A., Wong W., Rosado C. J., Langendorf C. G., Pike R. N., Bird P. I., Whisstock J. C.: *Genome Biol.* 7, 216 (2006).
- Oliva M. L., Ferreira R. S., Ferreira J. G., de Paula C. A. A., Salas C. E., Sampaio M. U.: *Curr. Protein Pept. Sci.* 12, 348 (2011).
- Kunitz M.: *J. Gen. Physiol.* 20, 311 (1947).
- Laskowski M. Jr., Qasim M. A.: *Biochim. Biophys. Acta* 1477, 324 (2000).
- Gatehouse J. A.: *New Phytol.* 156, 145 (2002).
- Jongsma M. A., Bolter C.: *J. Insect Physiol.* 43, 885 (1997).
- Habib H., Fazili K. M.: *Biotechnol. Mol. Biol. Rev.* 2, 68 (2007).
- Schlüter U., Benchabane M., Munger A., Kiggundu A., Vorster J., Goulet M. C., Cloutier C., Michaud D.: *J. Exp. Bot.* 61, 4169 (2010).
- Ferreira R. dS., Zhou D., Ferreira J. G., Silva M. C. C., Silva-Lucca R. A., Mentele R., Paredes-Gamero E. J., Bertolin T. C., Correia M. T. dS., Paiva P. M. G., Gustchina A., Wlodawer A., Oliva M. L.: *PLoS One* 8, e64426 (2013).
- Zani M. L., Moreau T.: *Biochimie* 92, 1986 (2010).
- Ishikawa A., Ohta S., Matsuoka K., Hattori T., Nakamura K.: *Plant Cell Physiol.* 35, 303 (1994).
- Khamrui S., Dasgupta J., Dattagupta J. K., Sen U.: *Biochim. Biophys. Acta* 1752, 65 (2005).
- Khamrui S., Majumder S., Dasgupta J., Dattagupta J. K., Sen U.: *Protein Sci.* 19, 593 (2010).
- Mareš M., Meloun B., Pavlík M., Kostka V., Baudyš M.: *FEBS Lett.* 251, 94 (1989).
- Ritonja A., Krizaj I., Mesko P., Kopitar M., Lucovnik P., Strukelj B., Pungercar J., Buttler D. J., Barrett A. J., Turk V.: *FEBS Lett.* 267, 13 (1990).
- Werner R., Guitton M. C., Mühlbach H. P.: *Plant Physiol.* 103, 1473 (1993).
- Brunelle F., Nguyen-Quoc B., Cloutier C., Michaud D.: *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 42, 88 (1999).

20. Kreft S., Ravnikar M., Mesko P., Pungercar J., Umek A., Kregar I., Strukelj B.: *Phytochemistry* 44, 1001 (1997).
21. Cater S. A., Lees W. E., Hill J., Brzin J., Kay J., Philip L. H.: *Biochim. Biophys. Acta* 1596, 76 (2002).
22. Guo J., Erskine P. T., Coker A. R., Wood S. P., Cooper J. B., Mareš M., Baudyš M.: *J. Struct. Biol.* 192, 554 (2015).
23. Guerra Y., Valiente P. A., Berry C., Pons T.: *J. Mol. Model.* 18, 2673 (2012).
24. Hansen D., Macedo-Ribeiro S., Veríssimo P., Yoo Im S., Sampaio M. U., Oliva M. L.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 360, 735 (2007).
25. Krizaj I., Drobnic-Kosorok M., Brzin J., Jerala R., Turk V.: *FEBS Lett.* 333, 15 (1993).
26. Renko M., Sabotic J., Mihelic M., Brzin J., Kos J., Turk D.: *J. Biol. Chem.* 285, 308 (2010).
27. Vallée F., Kadziola A., Bourne Y., Juy M., Rodenburg K. W., Svensson B., Haser R.: *Structure* 6, 649 (1998).
28. Yamasaki T., Deguchi M., Fujimoto T., Masumura T., Uno T., Kanamaru K., Yamagata H.: *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 70, 1200 (2006).
29. Koizumi A., Tsuchiya A., Nakajima K., Ito K., Terada T., Shimizu-Ibuka A., Briand L., Asakura T., Misaka T., Abe K.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 16819 (2011).
30. Song H. K., Suh S. W.: *J. Mol. Biol.* 275, 347 (1998).
31. Renko M., Sabotič J., Turk D.: *Biol. Chem.* 393, 1043 (2012).
32. Murzin A. G., Lesk A. M., Chothia C.: *J. Mol. Biol.* 223, 531 (1992).
33. Bao R., Zhou C. Z., Jiang C., Lin S. X., Chi C. W., Chen Y.: *J. Biol. Chem.* 284, 26676 (2009).
34. de Oliveira C., Santana L. A., Carmona A. K., Cezari M. H., Sampaio M. U., Sampaio C. A., Oliva M. L.: *Biol. Chem.* 382, 847 (2001).
35. Zhou D., Hansen D., Shabalin I. G., Gustchina A., Vieira D. F., de Brito M. V., Araújo A. P., Oliva M. L., Wlodawer A.: *Acta Crystallogr., Sect. F: Struct. Biol. Commun.* 71, 1055 (2015).
36. Oliva M. L., Silva M. C., Sallai R. C., Brito M. V., Sampaio M. U.: *Biochimie* 92, 1667 (2010).
37. Patil D. N., Chaudhary A., Sharma A. K., Tomar S., Kumar P.: *FEBS J.* 279, 4547 (2012).
38. Zhou D., Lobo Y. A., Batista I. F., Marques-Porto R., Gustchina A., Oliva M. L., Wlodawer A.: *PLoS One* 8, e62252 (2013).
39. Laskowski M. Jr., Kato I.: *Annu. Rev. Biochem.* 49, 593 (1980).
40. Bode W., Huber R.: *Eur. J. Biochem.* 204, 433 (1992).
41. Dasgupta J., Khamrui S., Dattagupta J. K., Sen U.: *Biochemistry* 45, 6783 (2006).
42. Ravichandran S., Dasgupta J., Chakrabarti C., Ghosh S., Singh M., Dattagupta J. K.: *Protein Eng., Des. Sel.* 14, 349 (2001).
43. Micheelsen P. O., Vévodová J., De Maria L., Ostergaard P. R., Friis E. P., Wilson K., Skjøt M.: *J. Mol. Biol.* 380, 681 (2008).

J. Srp^{a,b} and M. Mareš^a (^a*Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, v.v.i., Prague,* ^b*Department of Biochemistry, Faculty of Science, Charles University, Prague*): **Plant Kunitz Protease Inhibitors: Structural and Functional Diversity**

Protease inhibitors of the plant Kunitz family (I3 or Kunitz-P family) are widely distributed in the plant kingdom. They are critically involved in plant defense against insect herbivores and pathogens through the regulation of exogenous proteases. The majority of characterized members of the Kunitz family are inhibitors of proteases of the serine class (S1 and S8 families); inhibitors of aspartic proteases (A1 family) and cysteine proteases (C1 family) are less abundant. Some of the inhibitors are double-headed, with two independent reactive sites, or bifunctional, targeting different protease families. The high functional versatility stems from a system of multiple variable loops exposed on the conserved β -trefoil scaffold. Several reactive sites on the loops with different locations evolved independently during evolution as demonstrated by recent 3D structures of the complexes of Kunitz inhibitors with serine proteases. This review provides new insight into structure-function relationships in the Kunitz inhibitor family.