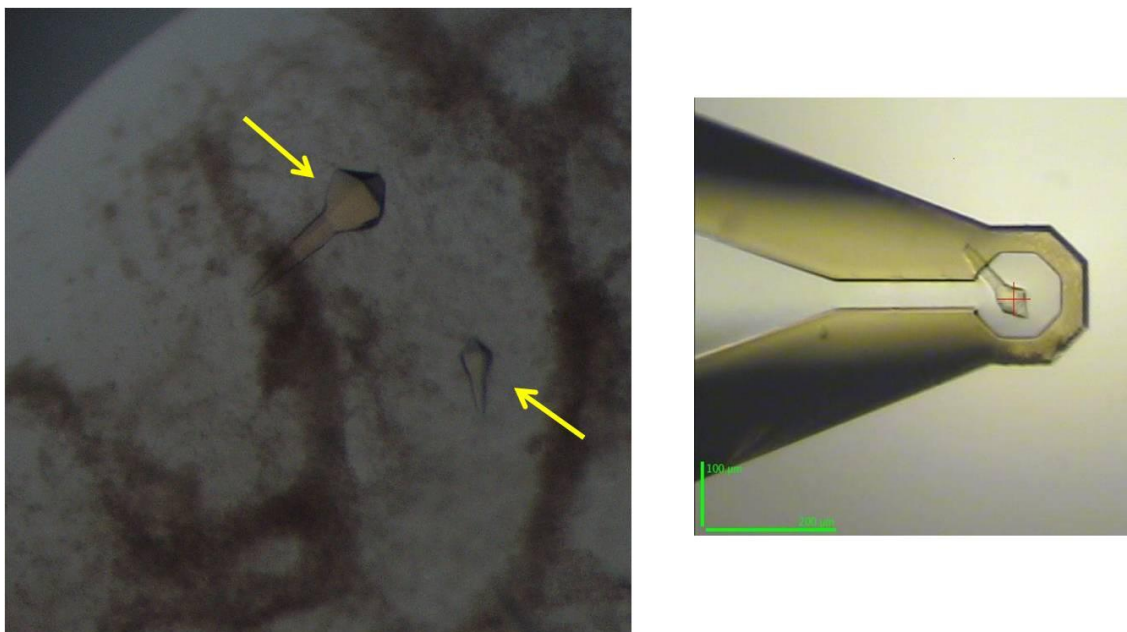


## Supplementary Material



**Supplementary Figure S1.** Related to Experimental Procedures. A crystal of AfuMep in the crystallization drop, and mounted in a cryoloop.

*Fungalysin*      η1      β1      α1      α2      β2  
                     40      50      60      70      80

*Fungalysin*      TVDLN<sup>A</sup>FR<sup>L</sup>KL<sup>S</sup>LAK<sup>Y</sup>VNATETVIEAPSS<sup>S</sup>FAP<sup>F</sup>K<sup>P</sup>QSYVEVATQHVKMIAPDATFRV  
*Thermolysin*      .....  
*Vibriolysin*      ..... ANKKYL<sup>N</sup>Q<sup>Q</sup>PTIN<sup>N</sup>MV<sup>Q</sup>SNSAS<sup>L</sup>LSV  
*Elastase*      .....  
*Protealysin*      .....  
*Aureolysin*      .....

*Fungalysin*      TT      β3      TT      β4      TT      β5      TT      β6      TT  
                     90      100      110      120      130      140

*Fungalysin*      VDDHYVGDNGVAHVHFRQTANGLDIDNADFNVN<sup>V</sup>GKDGK<sup>V</sup>FSYGN<sup>S</sup>FYT<sup>G</sup>QIP<sup>S</sup>SA  
*Thermolysin*      .....  
*Vibriolysin*      SPNQLIG<sup>L</sup>SVG<sup>N</sup>ELV<sup>L</sup>VKE<sup>F</sup>TSN<sup>N</sup>GEV<sup>T</sup>RRY<sup>Q</sup>QTY<sup>Q</sup>GIP<sup>V</sup>IG<sup>D</sup>TV<sup>S</sup>LT<sup>F</sup>N<sup>N</sup>G<sup>M</sup>L<sup>K</sup>K  
*Elastase*      .....  
*Protealysin*      .....  
*Aureolysin*      .....

*Fungalysin*      α3      α4      β7      β8  
                     150      160      170      180      190

*Fungalysin*      ALTKR<sup>D</sup>FS<sup>D</sup>PV<sup>T</sup>ALK<sup>G</sup>TINT<sup>L</sup>QL<sup>P</sup>ITVAA<sup>S</sup>SE<sup>S</sup>T<sup>E</sup>E<sup>K</sup>ES<sup>Y</sup>V<sup>F</sup>K<sup>G</sup>V<sup>S</sup>GT<sup>V</sup>SD<sup>P</sup>KA<sup>K</sup>  
*Thermolysin*      .....  
*Vibriolysin*      AHGAA<sup>V</sup>YN<sup>I</sup>DE<sup>D</sup>LS<sup>D</sup>VS<sup>A</sup>KL<sup>T</sup>KK<sup>D</sup>AI<sup>L</sup>K<sup>G</sup>S<sup>K</sup>T<sup>G</sup>IA<sup>A</sup>K<sup>S</sup>V<sup>G</sup>L<sup>K</sup>KK<sup>H</sup>NE<sup>Q</sup>S<sup>R</sup>LA<sup>I</sup>W<sup>V</sup>DD  
*Elastase*      .....  
*Protealysin*      .....  
*Aureolysin*      .....

*Fungalysin*      β9      TT      β10      β11      β12      β13      TT  
                     200      210      220      230      240      250

*Fungalysin*      LVYF<sup>V</sup>K<sup>D</sup>D<sup>G</sup>T<sup>L</sup>AL<sup>A</sup>WR<sup>V</sup>ET<sup>D</sup>IDS<sup>N</sup>W<sup>L</sup>L<sup>T</sup>Y<sup>I</sup>DA<sup>K</sup>S<sup>G</sup>E<sup>E</sup>I<sup>H</sup>G<sup>V</sup>V<sup>D</sup>Y<sup>V</sup>A<sup>E</sup>AD<sup>Y</sup>Q<sup>V</sup>Y<sup>A</sup>W<sup>G</sup>  
*Thermolysin*      ..... IT<sup>G</sup>T<sup>S</sup>T  
*Vibriolysin*      QNKA<sup>H</sup>L<sup>V</sup>Y<sup>E</sup>V<sup>S</sup>Y<sup>V</sup>T<sup>Y</sup>G<sup>K</sup>SP<sup>R</sup>P<sup>Y</sup>LI<sup>I</sup>D<sup>A</sup>NT<sup>G</sup>EV<sup>L</sup>LS<sup>Y</sup>DN<sup>L</sup>QH<sup>H</sup>... ANAT<sup>G</sup>P<sup>G</sup>GN<sup>L</sup>K  
*Elastase*      ..... AEAG<sup>G</sup>P<sup>G</sup>G  
*Protealysin*      ARSV<sup>I</sup>PP<sup>Y</sup>ML<sup>R</sup>RI<sup>I</sup>E<sup>H</sup>GS<sup>L</sup>P<sup>Q</sup>R<sup>D</sup>CA<sup>L</sup>H<sup>T</sup>LN<sup>H</sup>V  
*Aureolysin*      ..... AAAT<sup>G</sup>T<sup>G</sup>K<sup>G</sup>V

*Fungalysin*      η2      β14      TT      β15      TT      T  
                     260      270      280      290      300

*Fungalysin*      INDP<sup>T</sup>EG<sup>E</sup>RT<sup>V</sup>IK<sup>D</sup>P<sup>W</sup>DS<sup>V</sup>ASE<sup>F</sup>T<sup>W</sup>IS<sup>D</sup>GS<sup>T</sup>NY<sup>T</sup>TS<sup>R</sup>GN<sup>N</sup>GI<sup>A</sup>Q<sup>S</sup>N...PSG<sup>G</sup>PS<sup>Y</sup>L  
*Thermolysin*      VGV<sup>G</sup>R<sup>G</sup>VL<sup>G</sup>D<sup>Q</sup>KN<sup>I</sup>NT<sup>T</sup>Y<sup>S</sup>TY<sup>Y</sup>L<sup>Q</sup>DN<sup>T</sup>R...GD<sup>G</sup>IF<sup>T</sup>Y<sup>D</sup>AK<sup>Y</sup>R<sup>T</sup>TL<sup>L</sup>.P<sup>G</sup>.  
*Vibriolysin*      TGK<sup>Y</sup>L<sup>Y</sup>GT<sup>D</sup>FD<sup>S</sup>LD<sup>V</sup>S<sup>Q</sup>SG<sup>N</sup>T<sup>C</sup>SM<sup>N</sup>NA...N<sup>V</sup>R<sup>T</sup>IN<sup>L</sup>NG<sup>G</sup>T<sup>S</sup>G<sup>S</sup>...  
*Elastase*      NQ<sup>K</sup>I...G<sup>K</sup>Y<sup>T</sup>Y<sup>G</sup>S<sup>D</sup>Y<sup>G</sup>PL<sup>I</sup>V<sup>N</sup>DR<sup>C</sup>EM<sup>D</sup>DD<sup>G</sup>...N<sup>V</sup>I<sup>T</sup>V<sup>D</sup>M<sup>N</sup>S<sup>.</sup>ST<sup>D</sup>DS<sup>K</sup>T  
*Protealysin*      .....KT<sup>S</sup>T<sup>G</sup>G<sup>E</sup>V...I<sup>R</sup>D<sup>T</sup>Y<sup>D</sup>AE<sup>N</sup>ST<sup>Q</sup>L.P<sup>G</sup>.  
*Aureolysin*      .....L<sup>G</sup>D<sup>T</sup>K<sup>D</sup>I<sup>N</sup>I<sup>N</sup>S<sup>I</sup>D<sup>G</sup>G<sup>F</sup>S<sup>L</sup>E<sup>D</sup>L<sup>T</sup>H...Q<sup>G</sup>K<sup>L</sup>S<sup>A</sup>Y<sup>N</sup>F<sup>N</sup>D<sup>Q</sup>T<sup>G</sup>Q<sup>.</sup>A...

*Fungalysin*      T      TT      α5  
                     310      320      330      340      350

*Fungalysin*      NNY<sup>.</sup>R...P<sup>S</sup>S<sup>S</sup>S<sup>L</sup>S<sup>F</sup>K<sup>Y</sup>P<sup>Y</sup>S<sup>V</sup>S<sup>S</sup>S<sup>P</sup>P<sup>S</sup>...Y<sup>I</sup>D<sup>A</sup>S<sup>I</sup>I<sup>Q</sup>L<sup>F</sup>Y<sup>T</sup>A<sup>N</sup>I<sup>Y</sup>H<sup>D</sup>L<sup>L</sup>  
*Thermolysin*      .SL<sup>W</sup>A...D<sup>A</sup>D<sup>N</sup>Q...F<sup>F</sup>A...S<sup>Y</sup>D<sup>A</sup>P<sup>A</sup>V<sup>D</sup>A<sup>H</sup>Y<sup>Y</sup>A<sup>G</sup>V<sup>T</sup>Y<sup>D</sup>Y<sup>Y</sup>  
*Vibriolysin*      .S<sup>A</sup>Y<sup>S</sup>...F<sup>T</sup>C...P<sup>E</sup>...N<sup>T</sup>F<sup>K</sup>E<sup>I</sup>N<sup>G</sup>A<sup>Y</sup>S<sup>P</sup>L<sup>N</sup>D<sup>A</sup>H<sup>F</sup>F<sup>G</sup>N<sup>V</sup>I<sup>F</sup>N<sup>M</sup>Y  
*Elastase*      .T<sup>P</sup>F<sup>R</sup>...F<sup>A</sup>C...P<sup>T</sup>N<sup>T</sup>Y<sup>K</sup>Q<sup>V</sup>N<sup>G</sup>A<sup>Y</sup>S<sup>P</sup>L<sup>N</sup>D<sup>A</sup>H<sup>F</sup>F<sup>G</sup>V<sup>V</sup>F<sup>K</sup>L<sup>Y</sup>  
*Protealysin*      .K<sup>Q</sup>V<sup>R</sup>N<sup>E</sup>G<sup>Q</sup>A<sup>S</sup>N...H<sup>D</sup>V<sup>A</sup>V<sup>D</sup>E<sup>A</sup>Y<sup>D</sup>Y<sup>L</sup>G<sup>V</sup>T<sup>Y</sup>D<sup>F</sup>F  
*Aureolysin*      .T<sup>L</sup>I<sup>T</sup>...N<sup>E</sup>D...E<sup>N</sup>F<sup>V</sup>K...D<sup>D</sup>Q<sup>R</sup>A<sup>G</sup>V<sup>D</sup>A<sup>N</sup>Y<sup>Y</sup>A<sup>K</sup>Q<sup>T</sup>Y<sup>D</sup>Y<sup>Y</sup>

*Fungalysin*      TT      β16      TT      β17      TT      β18  
                     360      370      380      390      400

*Fungalysin*      Y<sup>T</sup>L<sup>G</sup>F<sup>T</sup>E<sup>K</sup>A<sup>G</sup>N<sup>F</sup>E<sup>Y</sup>N<sup>T</sup>N<sup>G</sup>Q<sup>G</sup>L<sup>G</sup>N<sup>D</sup>Y<sup>V</sup>I<sup>L</sup>N<sup>A</sup>Q<sup>D</sup>G<sup>S</sup>G<sup>.</sup>T<sup>N</sup>N<sup>A</sup>N<sup>F</sup>A<sup>T</sup>P<sup>P</sup>D<sup>G</sup>Q<sup>P</sup>G<sup>R</sup>M<sup>R</sup>M  
*Thermolysin*      K<sup>N</sup>V<sup>H</sup>N<sup>R</sup>L...S<sup>Y</sup>D<sup>G</sup>N<sup>N</sup>A...I<sup>R</sup>S<sup>S</sup>V<sup>H</sup>Y<sup>S</sup>.Q<sup>G</sup>Y<sup>N</sup>N<sup>A</sup>F<sup>W</sup>N<sup>G</sup>...S<sup>E</sup>M<sup>V</sup>Y  
*Vibriolysin*      N<sup>D</sup>W<sup>L</sup>G<sup>T</sup>A...P<sup>L</sup>S...F<sup>Q</sup>...L<sup>Q</sup>M<sup>R</sup>V<sup>H</sup>Y<sup>S</sup>.S<sup>N</sup>Y<sup>E</sup>N<sup>A</sup>F<sup>W</sup>D<sup>G</sup>...S<sup>A</sup>M<sup>T</sup>F  
*Elastase*      R<sup>D</sup>W<sup>F</sup>G<sup>T</sup>S...P<sup>L</sup>T...H<sup>K</sup>...L<sup>Y</sup>M<sup>K</sup>V<sup>H</sup>Y<sup>G</sup>.R<sup>S</sup>V<sup>E</sup>N<sup>A</sup>F<sup>W</sup>D<sup>G</sup>...T<sup>A</sup>M<sup>L</sup>F  
*Protealysin*      W<sup>Q</sup>A<sup>F</sup>K<sup>R</sup>N...S<sup>L</sup>D<sup>N</sup>Q<sup>G</sup>L<sup>P</sup>...L<sup>T</sup>G<sup>S</sup>V<sup>H</sup>Y<sup>G</sup>.K<sup>E</sup>Y<sup>Q</sup>N<sup>A</sup>F<sup>W</sup>N<sup>G</sup>...Q<sup>Q</sup>M<sup>V</sup>F  
*Aureolysin*      K<sup>N</sup>T<sup>F</sup>G<sup>R</sup>E...S<sup>Y</sup>D<sup>N</sup>H<sup>G</sup>S<sup>P</sup>I<sup>V</sup>S<sup>.</sup>L<sup>T</sup>H<sup>V</sup>N<sup>H</sup>Y<sup>G</sup>Q<sup>D</sup>N<sup>R</sup>.N<sup>N</sup>A<sup>W</sup>I<sup>G</sup>...D<sup>K</sup>M<sup>I</sup>Y



marked below with an oval sign (cyan/green). Red, white character, strictly identical and structurally equivalent residue. Blue frame, red character, similar and structurally equivalent residue. Triangles: magenta, calcium binding; black, Glu245-Ala246 cleavage point. Stars, zinc binding. Figure prepared with ESPript 1.6 [29].

**Supplementary Table S1.** Related to Figure 2. Prodomain-catalytic domain hydrogen bond interactions.

<b>Prodomain-catalytic domain hydrogen bond interactions</b>		
Catalytic domain (residue ID/atom)	Prodomain (residue ID/atom)	Donor-acceptor distance (Å)
Lys361 NZ	Val92 O	2.94
Asn392 Nδ2	Glu245 Oε2	3.22
Phe395 N	Ala244 O	2.78
Phe395 O	Ala244 N	2.87
Thr397 N	Tyr242 O	2.89
Arg405 NH1	Asp218 Oδ2	2.89
Arg405 NH2	Asp218 Oδ1	3.07
Glu430 Oε1	Glu245 O	2.74
Glu430 Oε2	Glu245 O	3.07
His433 Nε2	Glu245 O	3.22
Pro443 N	Asp89 Oδ2	3.28
Ala444 N	Asp89 Oδ2	2.88
Asn447 Nδ2	Tyr227 OH	2.90
Asn450 O	Arg38 NH1	2.91
Asn450 Oδ1	Asp241 O	2.99
Asn450 Nδ2	Asp241 N	3.01
Glu459 Oε1	Glu245 OXT <sup>a</sup>	2.96
Glu459 Oε2	Glu245 OXT	3.22
Asn517 O	Asn35 Nδ2	2.77
His520 Nε2	Glu245 OXT	2.85
Lys565 NZ	Asp94 Oδ1	2.64

Ala572 O	His99 Nδ1	3.28
Leu573 O	Asn117 Oδ1	2.84
Leu573 O	Asn119 Nδ2	3.02
Gln582 Nε2	Ala43 O	2.80
Asp585 Oδ2	Asn47 Nδ2	2.97
Asp589 Oδ2	Tyr45OH	2.68
Asp589 Oδ2	Ala48 N	2.92
Tyr618 OH	Ser41 OG	3.27
<p>Notes</p> <p><sup>a</sup>Glu245 is the C-terminal residue of the propeptide, OXT refers the α-carboxylic acid oxygen atoms</p> <p><sup>b</sup>Selected interactions between O-N atoms, bond distance below 3.2 Å</p>		

**Supplementary Table S2.** Related to Figure 3. The Zn-binding site.

<b>The Zn-binding site</b>		
Protein residue ID	Atom and distance to Zn <sup>2+</sup> (Å)	
His429	Nε2	2.04
His433	Nε2	1.99
Glu459	Oε1	1.97
Glu245	OXT <sup>a</sup>	1.96
Notes		
<sup>a</sup> Glu245 is the C-terminal residue of the propeptide, OXT indicates the α-carboxylic acid oxygen atom		