

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Doktorský studijní program: Biochemie



Mgr. Martin Stráňava

Mechanismus přenosu signálu hemovými sensorovými proteiny detekujícími
kyslík

Molecular mechanisms of signal transduction in model heme-containing oxygen
sensor proteins

Disertační práce

Školitel: doc. RNDr. Markéta Martínková, Ph.D.

Praha, 2016

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 20.07.2016

Podpis

Poděkování

Na tomto místě bych rád poděkoval všem mým spolupracovníkům a lidem, bez jejichž pomoci by tato práce nemohla vzniknout. Děkuji hlavně mojí školitelce doc. RNDr. Markétě Martínkové, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady (vědecké i životní), věnovanou energii a veškerou poskytnutou pomoc v průběhu celého doktorského studia. Velké dík patří i Mgr. Veronice Fojtíkové za pomoc při experimentech a vytvoření přátelského prostředí v laboratoři 217.

Děkuji i RNDr. Petru Manovi, Ph.D. z Biotechnologického a biomedicínského centra Akademie věd a Univerzity Karlovy za hmotnostně-spektrometrická měření a pomoc při vyhodnocování vodík-deuteriových výměn. Dále děkuji doc. RNDr. Václavu Martínkovi, Ph.D. za přípravu modelů a cenné konzultace v průběhu příprav publikací.

V neposlední řadě bych pak rád poděkoval své rodině, manželce a všem přátelům za podporu během doktorského studia a všem členům katedry biochemie za vytvoření příjemného a přátelského pracovního prostředí.

Abstrakt CZ

Hemové sensorové proteiny, které detekují plynné molekuly, hrají v bakteriální fyziologii důležitou roli v regulaci mnoha procesů jako je např. buněčná diferenciace, virulence, tvorba biofilmu nebo mezibuněčná komunikace. Jejich struktura se vyznačuje typickou modulární architekturou, kde různé sensorové domény (nejčastěji na N-konci) regulují aktivitu katalytických neboli funkčních domén (nejčastěji na C-konci). V této disertační práci jsme se zaměřili na studium tří zástupců ze skupiny sensorových proteinů detekujících kyslík a to histidinkinasy *AfGcHK*, diguanylátcyklasy *YddV*, fosfodiesterasy *EcDOS* a dále na studium proteinu *RR*, který je interakčním partnerem *AfGcHK*.

Hlavním cílem disertační práce bylo prostudovat intraproteinový/interdoménový přenos signálu u dvou zástupců hemových sensorových proteinů s globinovým uspořádáním sensorové domény (*AfGcHK*, *YddV*) a u jednoho zástupce s PAS uspořádáním sensorové domény (*EcDOS*). Dalším cílem bylo popsat interproteínový přenos signálu u dvousložkového systému *AfGcHK-RR* a strukturně charakterizovat tyto dva interakční partnery. Důraz byl kladen také na studium interakce modelových sensorových domén s různými signálními molekulami a popis funkce jednotlivých aminokyselin účastnících se vazby těchto signálních molekul.

Studiem intraproteinového/interdoménového přenosu signálu bylo zjištěno, že aktivní formy *AfGcHK* vykazují velice podobné hodnoty V_{\max}^{ATP} , což pravděpodobně značí, že tyto stavy mají rovněž podobné konformace odpovědné za optimální aktivitu proteinu. Inaktivní stavy *AfGcHK* vykazovaly nižší hodnoty V_{\max}^{ATP} a také nižší afinitu vůči ATP v porovnání se stavy aktivními. U proteinu *EcDOS* byla pozorována korelace mezi aktivitou jeho funkční domény a flexibilitou jeho sensorové PAS domény, kdy flexibilita sensorové domény nejméně aktivní formy obsahující iont železa hemu ve stavu Fe^{3+} byla vyšší než flexibilita sensorové domény aktivnějších forem obsahujících iont železa hemu ve stavech Fe^{2+} a $\text{Fe}^{2+}\text{-CO}$.

Studium interproteínového přenosu signálu mezi proteiny *AfGcHK* a *RR* přineslo informace o vzájemném interakčním rozhraní těchto dvou proteinů, které je tvořeno oblastmi v dimerizační doméně *AfGcHK* a regulační doméně č. 1 *RR* proteinu. Komplex *AfGcHK-RR* je transientní, s vysokou rychlostí disociace, kde K_d pro komplex dimeru *AfGcHK* s jednou molekulou *RR* proteinu je přibližně 18 μM .

Zkoumáním interakce sensorové domény *YddV* a jejich mutantních forem s různými signálními molekulami byla potvrzena důležitost *Leu65* v stabilizaci těchto signálních molekul. *Leu65* zabraňuje vstupu molekuly vody do distální oblasti hemu. Vliv nové signální molekuly H_2S na aktivitu proteinu byl prokázán jen u proteinu *EcDOS*, zatímco u *AfGcHK* nebyl pozorován téměř žádný vliv H_2S na aktivitu tohoto proteinu.

Abstrakt EN

Heme containing gas sensor proteins play important role in bacterial physiology in regulating many processes such as cell differentiation, virulence, biofilm formation or intercellular communication. For their structure, typical modular architecture is characteristic where various sensor domains (usually at the N-terminus) regulate the activity of the catalytic or functional domains (usually at the C-terminus). In this dissertation thesis, we focused on three representatives from the group of oxygen sensing proteins, namely histidine kinase *AfGcHK*, diguanylate cyclase *YddV*, phosphodiesterase *EcDOS* and also on protein *RR*, which is the interaction partner of *AfGcHK*.

The main aim of the thesis was to study intra-protein/inter-domain signal transduction in two representatives of heme sensor proteins with a globin fold of the sensor domain (*AfGcHK*, *YddV*) and in one representative with PAS fold of the sensor domain (*EcDOS*). Another objective was to describe inter-protein signal transduction in the two component signaling system *AfGcHK-RR* and structurally characterize these two interacting partners. Emphasis was also placed on the study of the interaction between model sensor domains and different signaling molecules and also on function of individual amino acids involved in the binding of these signaling molecules.

Study of intra-protein/inter-domain signal transduction revealed that the active forms of *AfGcHK* exhibit very similar V_{\max}^{ATP} values, which probably indicates that these states also have similar conformations responsible for the optimum catalytic activity. Inactive states of *AfGcHK* exhibited lower V_{\max}^{ATP} values and lower affinity for ATP compared to active states. In case of *EcDOS* protein correlation between the activity of its functional domains and flexibility of its sensor PAS domain was observed. Flexibility of sensor domain of the least active form containing Fe^{3+} heme iron complex was higher than the flexibility of sensor domain of more active forms containing Fe^{2+} and Fe^{2+} -CO heme iron complexes.

Study of inter-protein signal transduction between *AfGcHK* and *RR* brought information about mutual interaction interface of these two proteins, which is localized in *AfGcHK*'s dimerization domain and a regulatory domain no. 1 of *RR* protein. Complex *AfGcHK-RR* is transient, with a high rate of dissociation, where the K_d for the complex of dimeric *AfGcHK* with one molecule of *RR* protein is about 18 μM .

Examining the interaction of *YddV* sensor domain and its mutant forms with different signaling molecules confirmed the importance of Leu65 in stabilizing of these signaling molecules. Leu65 prevents entry of water molecules into the heme distal side. Activating effect of the new signaling molecule H_2S was demonstrated only in case of *EcDOS* protein, while the activity of *AfGcHK* was not affected by the H_2S treatment.

OBSAH

| | |
|--|-----------|
| SEZNAM ZKRATEK | 7 |
| 1. TEORETICKÝ ÚVOD | 10 |
| 1.1. Hemoproteiny, jejich základní funkce a rozdělení | 10 |
| 1.2. Hemové sensorové proteiny | 12 |
| 1.2.1. Sensorové proteiny detekující hem | 13 |
| 1.2.2. Sensorové proteiny detekující plynné molekuly | 15 |
| 1.2.2.1. Sensorové proteiny detekující oxid dusnatý..... | 15 |
| 1.2.2.2. Sensorové proteiny detekující oxid uhelnatý | 16 |
| 1.2.2.3. Sensorové proteiny detekující kyslík | 17 |
| Kyslíkové senzory s GAF doménou | 18 |
| <i>Histidinkinasy DosS a DosT</i> | 18 |
| Kyslíkové senzory s PAS doménou..... | 19 |
| <i>Fosfodiesterasa EcDOS</i> | 19 |
| Kyslíkové senzory s globinovou doménou..... | 22 |
| <i>Diguanylátcyklasa YddV (EcDosC)</i> | 22 |
| <i>Histidinkinasa AfGcHK</i> | 25 |
| 2. CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE..... | 28 |
| 3. KOMENTÁŘ A DISKUSE K SOUBORU PUBLIKACÍ | 29 |
| 4. PUBLIKACE BLOKU I..... | 42 |
| 4.1. Gaseous O ₂ , NO, and CO in signal transduction: structure and function relationships of heme-based gas sensors and heme-redox sensors. | 43 |
| 4.2. Structural characterization of the heme-based oxygen sensor, AfGcHK, its interactions with the cognate response regulator, and their combined mechanism of action in a bacterial two-component signaling system. | 87 |
| 4.3. Kinetic analysis of a globin-coupled histidine kinase, AfGcHK: effects of the heme iron complex, response regulator, and metal cations on autophosphorylation activity. | 115 |
| 4.4. Effects of hydrogen sulfide on the heme coordination structure and catalytic activity of the globin-coupled oxygen sensor AfGcHK. | 133 |

| | |
|--|------------|
| 5. PUBLIKACE BLOKU II | 156 |
| 5.1. Catalytic enhancement of the heme-based oxygen-sensing phosphodiesterase <i>EcDOS</i> by hydrogen sulfide is caused by changes in heme coordination structure... | 157 |
| 5.2. Pressure effects reveal that changes in the redox states of the heme iron complexes in the sensor domains of two heme-based oxygen sensor proteins, <i>EcDOS</i> and <i>YddV</i> , have profound effects on their flexibility. | 181 |
| 5.3. Introduction of water into the heme distal side by <i>Leu65</i> mutations of an oxygen sensor, <i>YddV</i> , generates verdoheme and carbon monoxide, exerting the heme oxygenase reaction..... | 194 |
| 5.4. Ultrafast spectroscopy evidence for picosecond ligand exchange at the binding site of a heme protein: heme-based sensor <i>yddv</i> | 214 |
| 5.5. Probing the ligand recognition and discrimination environment of the globin-coupled oxygen sensor protein <i>YddV</i> by FTIR and time-resolved step-scan FTIR spectroscopy. | 229 |
| 6. ZÁVĚR | 242 |

Seznam zkratek

| | |
|---------------|---|
| 5kNS | pentakoordinovaný nízkospinový stav iontu železa hemu |
| 6kNS | hexakoordinovaný nízkospinový stav iontu železa hemu |
| Aer-sal | regulátor odpovědi bakterie <i>Aeromonas salmonicida</i> |
| AfGcHK | histidinkinasa s globinovou strukturou sensorové domény bakterie <i>Anaeromyxobacter</i> sp. Fw 109-5 |
| AvGReg | diguanylátcyklasa s globinovou strukturou sensorové domény bakterie <i>Azotobacter vinelandii</i> |
| BjFixL | histidinkinasa s PAS strukturou sensorové domény bakterie <i>Bradyrhizobium japonicum</i> |
| BpeGReg | diguanylátcyklasa s globinovou strukturou sensorové domény bakterie <i>Bordetella pertussis</i> |
| c-di-GMP | cyklický bis-(3',5')-guanosinmonofosfát |
| CA | katalytická doména |
| cAMP | cyklický adenosin-3',5'-monofosfát |
| cGMP | cyklický guanosin-3',5'-monofosfát |
| CooA | senzor oxidu uhelnatého |
| CP motiv | cystein, prolinový motiv vyskytující se u proteinů detekujících hem |
| CPR | NADPH:cytochrom P450 reduktasy |
| DGC | diguanylátcyklasa |
| DHp | dimerizační a fosfotransferová doména histidinkinasy |
| DosR | regulátor odpovědi bakterie <i>Mycobacterium tuberculosis</i> |
| DosS, DosT | histidinkinasy s GAF strukturou sensorové domény bakterie <i>Mycobacterium tuberculosis</i> |
| EAL doména | doména s fosfodiesterasovou aktivitou |
| EcDOS | fosfodiesterasa s PAS strukturou sensorové domény bakterie <i>E. coli</i> |
| eIF2 α | eukaryotický translační iniciační faktor |
| FixJ | regulátor odpovědi bakterie <i>Rhizobium meliloti</i> |
| FixL | histidinkinasa s PAS strukturou sensorové domény bakterie <i>Rhizobium meliloti</i> |
| FTIR | infračervená spektroskopie spojená s Fourierovou transformací |

| | |
|--------------|---|
| GAF | strukturní motiv prostorového uspořádání proteinů, akronym odvozený z anglických názvů proteinů, ve kterých se tento motiv vyskytuje: „cGMP-specific phosphodiesterases“, „ <i>Anabaena</i> adenyl cyclases“ a <i>E.coli</i> formate hydrogenlyase transcriptional activator“ |
| GGDEF doména | doména s diguanylátcyklasovou aktivitou |
| GsGCS | protein detekující kyslík s globinovou strukturou sensorové domény bakterie <i>Geobacter sulfurreducens</i> |
| H-NOX | doména detekující oxid dusnatý, akronym z anglického názvu „heme-nitric oxide binding domain“ |
| HAMP | sensorová doména vyskytující se v proteinech odpovědných za regulaci chemotaxe, akronym z anglického názvu „histidine kinase, adenylate cyclase, methyl accepting protein, and phosphatase“ |
| Hap1 | protein detekující hem |
| HD výměna | vodík-deuteriová výměna |
| HemAT | aerotaktický transduktor, který obsahuje hem |
| HemDGC | diguanylátcyklasa s globinovou strukturou sensorové domény bakterie <i>Desulfotalea psychrophila</i> |
| HemS | transportér hemu bakterie <i>Yersinia enterocolitica</i> |
| HRI | protein detekující hem v eukaryotní buňce, z anglického názvu „heme-regulated inhibitor“ |
| HRM | strukturní motiv vyskytující se v proteinech, které detekují hem |
| HTH | strukturní motiv vyskytující se v DNA vazebních proteinech, odvozeno z anglického názvu „helix-turn-helix“ |
| ChuS | hemoxigenasa <i>E. coli</i> |
| mPer2 | protein detekující hem a regulující cirkadiální rytmy |
| NPAS2 | protein detekující hem a regulující cirkadiální rytmy |
| PAS | strukturní motiv prostorového uspořádání proteinů, akronym odvozený z anglických názvů proteinů, ve kterých se tento motiv vyskytuje: „ <i>Drosophila</i> period clock protein“, „vertebrate aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator“ a „ <i>Drosophila</i> single minded protein“ |
| PccGCS | diguanylátcyklasa s globinovou strukturou sensorové domény bakterie <i>Pectobacterium carotovorum</i> |
| PDE | fosfodiesterasa |

| | |
|------------------------|--|
| pGpG | 5'-phosphoguanilyl-(3',5')-guanosin, vzniká linearizací c-di-GMP |
| RpoS | transkripční faktor <i>E. coli</i> |
| RR protein | regulátor odpovědi bakterie <i>Anaeromyxobacter</i> sp. Fw 109-5 |
| SCHIC | vazebná doména pro kobalamin |
| sGC | solubilní guanylátcyklasa |
| THAP | aspartátová proteasa organismu <i>Rhicephalus microplus</i> |
| TRS ² -FTIR | časově rozlišená infračervená spektroskopie spojená s Fourierovou transformací |
| YddV | diguanylátcyklasa s globinovou strukturou sensorové domény bakterie <i>E. coli</i> |
| YddV-hem | globinová sensorová doména proteinu YddV |

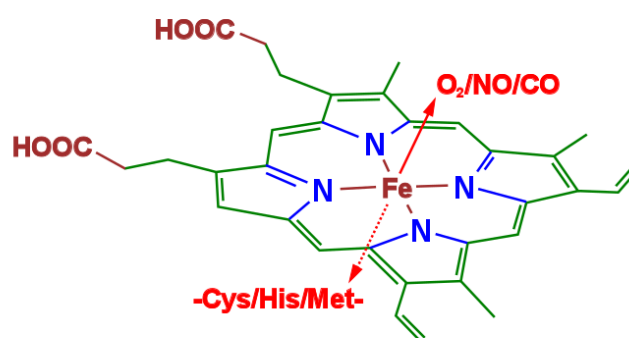
1. Teoretický úvod

1.1. Hemoproteiny, jejich základní funkce a rozdělení

V roce 2016 uplynulo již padesát osm let od doby, kdy byla publikována krystalová struktura prvního hemoproteinu - myoglobinu [Kendrew. *Nature* **181**, 662 /1958/]. I navzdory „pokročilému věku“ a množství publikovaných prací se problematice hemoproteinů i v současnosti věnuje velká pozornost, která je dána především důležitostí a rozšířením těchto biomakromolekul. Hemoproteiny jsou široce rozšířené ve všech organismech od jednobuněčných prokaryotů a eukaryotů přes organismy mnohobuněčné, rostliny až po zvířata a člověka [Garry *et al. Cell. Mol. Life Sci.* **57**, 896 /2000/]. Patří mezi nejdůležitější a nejvíce zastoupené metaloproteiny vykonávající rozličné biologické funkce, jako je transport a skladování kyslíku, selektivní aktivace C-H vazeb, redukce dusitanů nebo přenos elektronů [Lin *et al. Chem. Asian. J.* **8**, 2534 /2013/]. Kromě těchto tzv. „klasických funkcí“ byla popsána participace hemových proteinů např. na regulaci transkripce [Sun *et al. EMBO J.* **21**, 5216 /2002/, Zenke-Kawasaki *et al. Mol. Cell. Biol.* **27**, 6962 /2007/], funkci iontových kanálů [Tang *et al. Nature* **425**, 531 /2003/], kontrole cirkadiálních rytmů [Kaasik a Lee. *Nature* **430**, 467 /2004/], úpravě micro RNA [Faller *et al. Nat. Struct. Mol. Biol.* **14**, 23 /2007/] nebo detekci plyných molekul [Aono. *Acc. Chem. Res.* **36**, 825 /2003/].

Základ struktury těchto proteinů tvoří prostetická skupina hemu neboli protoporfyrinu IX s inkorporovaným iontem železa. Ačkoli je hem relativně malá molekula, po stránce chemické je velice komplexní. Na obr. 1 (str. 11) je zobrazena jeho struktura zahrnující vysoce hydrofobní (porfyrinový skelet, methylové a vinylové substituenty) i hydrofilní (propionáty a iont železa) oblasti. Tyto charakteristiky umožňují vazbu molekuly hemu do hydrofobních i hydrofilních oblastí proteinu a tvorbu hydrofobních, iontových i koordinačně kovalentních interakcí. Centrální iont železa může koordinovat celkem šest ligandů, přičemž čtyři koordinačně kovalentní vazby vytváří s dusíky pyrolových jader a zbylými dvěma ligandy mohou být postranní řetězce aminokyselin cysteinu (cytochromy P450), histidinu a methioninu (globiny, cytochromy c, cytochrom c oxidasy, oxidoreduktasy) nebo malé molekuly jako O₂, CO, NO, H₂S, CN⁻, OH⁻, imidazol aj. [Zhang. *Heme Biology* /2011/, Antonini a Brunori. *Hemoglobin and Myoglobin in Their Reactions with Ligands* /1971/]. V případě, že je atom železa ve struktuře proteinu pentakoordinovaný, je schopen vázat malé plyné molekuly což umožňuje těmto proteinům vykonávat specifické funkce jako je transport, detekce nebo aktivace plyných molekul pro následné reakce. Atom

železa se vyskytuje nejčastěji ve dvou oxidačních stavech a to ve stavu redukovaném Fe^{2+} nebo oxidovaném Fe^{3+} . Termínem hem se správně označuje redukovaný stav, zatímco hemin je označení pro stav oxidovaný [Zhang. *Heme Biology* /2011/, str. 3]. Oxidační stav rovněž rozhoduje o tom, jaký typ molekuly se bude na iont železa preferenčně koordinovat. O_2 a CO se mohou vázat jen na redukovaný iont železa Fe^{2+} , kdežto Fe^{3+} stav váže CN^- , OH^- nebo molekulu imidazolu [Zhang. *Heme Biology* /2011/, Antonini a Brunori. *Hemoglobin and Myoglobin in Their Reactions with Ligands* /1971/, Falk. *Porphyrins and Metalloporphyrins* /1964/].



Obr. 1 *Struktura molekuly hemu*

*Molekulu hemu tvoří čtyři pyrolová jádra, která jsou spojena čtyřmi methinovými můstky. Hydrofobní oblasti včetně methylových a vinylových skupin jsou zobrazeny zeleně, hydrofilní propionáty spolu s iontem železa tmavě červeně. Aminokyseliny, které nejčastěji koordinují iont železa ve struktuře proteinu, jsou Cys, His a Met. Mezi nejčastější plynné ligandy patří O_2 , NO , CO . Převzato z [Zhang. *Heme Biology* /2011/, str. 2].*

Do dnešní doby bylo objeveno a charakterizováno velké množství různých hemoproteinů. Jejich základní dělení vychází z funkce jednotlivých proteinů a zahrnuje čtyři velké skupiny. (1) Do první skupiny patří proteiny transportující a skladující plynné molekuly, nejčastěji kyslík. Typickými zástupci jsou hemoglobin a myoglobin. Molekula kyslíku je v jejich struktuře vázána reverzibilně a uvolňována na základě okamžitých potřeb a nároků organismu [Kajimura *et al. Antioxid. Redox Signal.* **13**, 157 /2010/]. (2) Druhou skupinu tvoří proteiny přenášející elektrony, typicky např. cytochrom c v dýchacím řetězci. Samotný přenos je zprostředkován jednoelektronovou redukcí nebo oxidací centrálního atomu železa, tj. přechody mezi Fe^{2+} a Fe^{3+} stavy. Velice často se jako axiální ligandy železa vyskytují postranní řetězce aminokyselin histidinu a methioninu (cytochrom c His-Fe-Met, cytochrom b5 His-Fe-His) [Imai *et al. Biochem. Biophys. Res. Commun.* **469**, 978 /2016/, Durley a Mathews. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **52**, 65 /1996/]. (3) Třetí funkcí hemoproteinů je katalýza oxidačně-redukčních reakcí. V průběhu těchto reakcí dochází

k aktivaci kyslíkové molekuly, která je následně inkorporována do molekuly substrátu. Do této skupiny patří např. oxygenasy (cytochromy P450), hemoxygenasa nebo NO syntasa [Matsui *et al. J. Biol. Chem.* **280**, 36833 /2005/, Montellano. *Chem. Rev.* **110**, 932 /2010/, Santolini. *J. Inorg. Biochem.* **105**, 127 /2011/]. (4) Poslední, nejnověji popsanou skupinu, tvoří hemové sensorové proteiny. V tomto případě se molekula hemu nenachází v samotném aktivním centru proteinu, ale v tzv. regulační části, která reguluje funkční oblasti v závislosti na vazbě různých ligandů hemu (molekuly plynu) nebo vazbě hemu samotného. Typickými zástupci jsou např. FixL (O₂ senzor), CooA (CO senzor) nebo solubilní guanylátcyklasa (NO senzor) [Gilles-González *et al. Biochemistry* **34**, 232 /1995/, Shelver *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 11216 /1997/, Gileadi. *Biochem. Soc. Trans.* **42**, 108 /2014/, Kajimura *et al. Antioxid. Redox Signal.* **13**, 157 /2010/].

Hemoproteiny jsou biomolekuly rozmanité rovněž i po stránce strukturní. Do dnešní doby bylo identifikováno více než 30 různých strukturních motivů schopných vazby hemového kofaktoru a množství hemoproteinů, u kterých byla vyřešena struktura, převyšuje číslo 2300 [Smith *et al. Proteins* **78**, 2349 /2010/, Schneider *et al. Nat. Prod. Rep.* **24**, 621 /2007/]. Navíc, jeden typ strukturního uspořádání se může vyskytovat v proteinech vykonávajících rozličné fyziologické funkce a zároveň určitá specifická funkce může být zprostředkována proteiny s velice odlišnými strukturními charakteristikami. Tak např. hemoxygenasa ChuS z *E. coli* sdílí stejnou architekturu domény jako protein HemS odpovědný za transport hemu u bakterie *Yersinia enterocolitica* [Suits *et al. J. Biol. Chem.* **281**, 36776 /2006/, Schneider *et al. J. Biol. Chem.* **281**, 32606 /2006/]. Dále, globinové sbalení typické pro hemoglobin nebo myoglobin můžeme rovněž najít u bakteriálních sensorových proteinů, které jsou odpovědné za detekci kyslíku [Hou *et al. Nature* **403**, 540 /2000/].

1.2. Hemové sensorové proteiny

Skupina hemových sensorových proteinů zahrnuje dvě podskupiny a to sensorové proteiny detekující hem a sensorové proteiny detekující plynné molekuly. Po stránce strukturní je společným rysem těchto dvou podskupin přítomnost minimálně dvou domén, sensorové a funkční. Sensorová doména je odpovědná za vazbu hemu, který může být vázán buďto reverzibilně, jak je tomu u sensorových proteinů detekujících hem, nebo relativně pevně, což je případ proteinů detekujících plyny [Igarashi *et al. Emerging Roles of Heme as a Signal and a Gas-Sensing Site: Heme-Sensing and Gas-Sensing Proteins* v knize *Handbook*

of Porphyrin Science /2011/]. U sensorových proteinů detekujících hem vystupuje tento kofaktor v roli signální molekuly, kde jeho asociace/disociace reguluje rozličné fyziologické děje, jako je transkripce, degradace proteinů, vazba na DNA nebo regulace aktivity některých kinas [Igarashi *et al. Acta Chim. Slov.* **55**, 67 /2008/]. Sensorové proteiny detekující plynné molekuly, které jsou výsadou především bakteriální říše, využívají hemový kofaktor pro vazbu plyných molekul, nejčastěji O₂, NO a CO. Na základě vazby těchto plynů reguluje sensorová doména doménu funkční, vykazující různé enzymové aktivity jako např. diguanylátcyklasová, proteinkinasová nebo fosfodiesterasová aktivita [Tagliabue *et al. Microbiology* **156**, 2901 /2010/, Sousa *et al. Biochemistry* **46**, 6249 /2007/, Tanaka a Shimizu. *Biochemistry* **47**, 13438 /2008/].

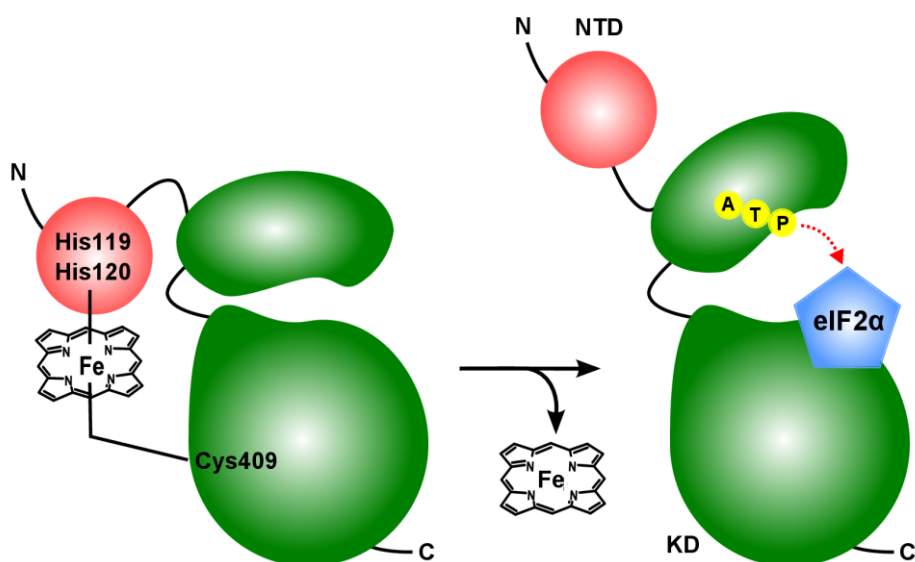
1.2.1. Sensorové proteiny detekující hem

Jelikož je volný hem sám o sobě relativně toxická molekula podílející se na tvorbě reaktivních forem kyslíku, musí být jeho hladina v buňce pečlivě regulována [Halliwell a Gutteridge. *Methods Enzymol.* **186**, 1 /1990/]. Většina sensorových proteinů detekujících hem, které zabezpečují tuto funkci, se vyznačuje přítomností tzv. CP (Cys, Pro) motivu, někdy označovaného jako HRM motivu (z angl. Heme-regulatory motif) [Zhang a Guarente. *EMBO J.* **14**, 313 /1995/]. Za vazbu molekuly hemu na protein je většinou odpovědná thiolátová síra cysteinu, která vytváří s iontem železa relativně slabou vazbu umožňující rychlou disociaci hemu z vazného místa. Rychlost asociace kofaktoru je podobná jako např. u myoglobinu nebo hemoglobinu a na funkci proteinů jako sensorů hemu nemá až tak zásadní vliv. [Igarashi *et al. Acta Chim. Slov.* **55**, 67 /2008/, Igarashi *et al. Emerging Roles of Heme as a Signal and a Gas-Sensing Site: Heme-Sensing and Gas-Sensing Proteins* v knize *Handbook of Porphyrin Science* /2011/].

Nejznámějším zástupcem této podskupiny je protein HRI (z angl. Heme-regulated inhibitor) neboli kinasa iniciačního faktoru eIF2 α regulována hemem. Funkcí tohoto proteinu je regulace počáteční fáze translace v nezralých erytrocytech (retikulocytech), kde v závislosti na dostupnosti volného hemu ovlivňuje biosyntézu globinových molekul pro tvorbu hemoglobinu. Za normálních podmínek, kdy je koncentrace hemu v buňce dostatečná, je hem navázaný na HRI a blokuje jeho kinasovou aktivitu. Pokles hladiny hemu způsobí jeho rychlou disociaci z komplexu s HRI proteinem, který následně fosforyluje Ser51 alfa podjednotky iniciačního faktoru eIF2. Takto fosforylovaný eIF2 není schopen po hydrolýze GTP na GDP opětovně vázat molekulu GTP výsledkem čehož je inhibice

translace globinových řetězců a udržování konstantního poměru mezi množstvím hemu a globinu (1:1) [Dever. *Cell* **108**, 545 /2002/, Hirai *et al. J. Inorg. Biochem.* **101**, 1172 /2007/].

Strukturně je HRI tvořen N-terminální doménou, která není považována za typickou senzorovou doménu, protože neváže hemový kofaktor sama o sobě, ale v součinnosti s katalytickou C-terminální doménou. Hem je koordinován histidinem N-terminální domény a cysteinem katalytické domény (viz obr. 2). Protein je velice flexibilní a z tohoto důvodu nebylo úplně jasné, který konkrétní histidin a cystein jsou za koordinaci hemu odpovědné. Mutace některých potenciálních axiálních ligandů neměly vliv na spektrální vlastnosti proteinu, což znamená, že axiální ligand mohl být nahrazen sousedním aminokyselinovým zbytkem z jiné části proteinu. V současnosti se má za to, že axiálními ligandy jsou His119 nebo His120 N-terminální části a Cys409 C-terminální katalytické části [Igarashi *et al. J. Biol. Chem.* **283**, 18782 /2008/, Miksanova *et al. Biochemistry* **45**, 9894 /2006/].



Obr. 2 Model struktury proteinu HRI v aktivním a inaktivním stavu

Vazba/disociace hemu na/z proteinu reguluje aktivitu HRI. Hem je pravděpodobně koordinován His119 nebo His120 a Cys409. NTD – N-terminální doména, KD – katalytická doména. Převzato z [Igarashi *et al. J. Biol. Chem.* **283**, 18782 /2008/].

Kromě HRI byly identifikovány i další proteiny detekující hem, např. NPAS2 [Dioum *et al. Science* **298**, 2385 /2002/] a mPer2 [Kaasik a Lee. *Nature* **430**, 467 /2004/] regulující cirkadiánní rytmy, Hap1 [Hon *et al. J. Biol. Chem.* **274**, 22770 /1999/] kontrolující expresi genů při oxidačním stresu nebo THAP protein vykazující proteolytickou aktivitu vůči určitým peptidům a proteinům [Sorgine *et al. J. Biol. Chem.* **275**, 28659 /2000/].

1.2.2. Senzorové proteiny detekující plynné molekuly

U proteinů detekujících plyny je primárním signálem vazba molekuly O₂, NO nebo CO na hem v aktivním centru N-terminální sensorové domény. Vazbou signální molekuly dochází ke konformační změně sensorové domény, která následně reguluje aktivitu C-terminální funkční domény. Přítomnost plyných molekul tak reguluje tvorbu nebo degradaci cyklického di-GMP (diguanylátcyklasy, fosfodiesterasy), fosforylaci proteinů (histidinkinasy), vazbu na DNA, chemotaxi aj [Igarashi *et al.* Emerging Roles of Heme as a Signal and a Gas-Sensing Site: Heme-Sensing and Gas-Sensing Proteins v knize *Handbook of Porphyrin Science* /2011/, Farhana *et al.* *Antioxid. Redox Signal.* **17**, 1232 /2012/]. Na enzymovou aktivitu těchto proteinů má navíc vliv i oxidačně/redukční stav iontu železa. Do současnosti bylo identifikováno pět typů sensorových domén vázajících hem, konkrétně H-NOX doména (detekce NO), CooA doména (detekce CO), GAF doména (detekce O₂), PAS doména (detekce O₂) a sensorová doména s globinovým uspořádáním (detekce O₂) [Farhana *et al.* *Antioxid. Redox Signal.* **17**, 1232 /2012/, Gilles-Gonzalez a Gonzalez. *J. Inorg. Biochem.* **99**, 1 /2005/]. Donesedávna sem byla chybně řazena i tzv. SCHIC doména, u které byla prokázána vazba hemu místo původně přítomného kobalaminu [Moskvin *et al.* *J. Bacteriol.* **192**, 5253 /2010/]. V roce 2015 bylo ovšem potvrzeno, že tato doména skutečně váže specificky jenom kobalamin a ne hem [Vermeulen a Bauer. *J. Bacteriol.* **197**, 2694 /2015/]. Obecně se sensorové proteiny detekující plynné molekuly vyznačují obrovskou rozmanitostí strukturních uspořádání, kde se různým způsobem a v různém počtu kombinují sensorové a katalytické domény za vzniku velkého množství funkčně odlišných proteinů.

1.2.2.1. Senzorové proteiny detekující oxid dusnatý

NO je fyziologicky velice důležitá plynná molekula účastnící se buněčné signalizace nebo plnící různé úlohy v imunitním systému při obraně organismu [Toledo a Augusto. *Chem. Res. Toxicol.* **25**, 975 /2012/]. Nejznámějším senzorem oxidu dusnatého je eukaryotní solubilní guanylátcyklasa (sGC). sGC je heterodimer tvořený ze dvou podjednotek $\alpha 1$ a $\beta 1$. Každá podjednotka je složena ze čtyř domén: N-terminální H-HNOX domény, PAS domény, tzv. „coiled-coil“ domény a C-terminální guanylátcyklasové domény [Fritz *et al.* *Biochemistry* **52**, 1568 /2013/, Cary *et al.* *Trends Biochem. Sci.* **31**, 231 /2006/]. Molekulu hemu váže jen H-NOX doména podjednotky $\beta 1$ a tudíž je i odpovědná za vazbu NO. Vazba NO na hem (Fe²⁺) sensorové domény aktivuje katalytickou doménu a dochází k tvorbě

cyklického GMP, které následně reguluje relaxaci hladkých svalů, buněčný růst nebo diferenciaci [Mel *et al. Chem. Rev.* **111**, 5742 /2011/].

I přes rozsáhlý výzkum věnující se sGC zůstává struktura celého proteinu a dokonce i jeho jednotlivých domén stále nevyřešena. Určité přiblížení nám ale mohou poskytnout bakteriální senzory NO, kde bylo v poslední době publikováno několik struktur H-NOX domény [Herzik *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **111**, E4156 /2014/, Pellicena *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 12854 /2004/, Ma *et al. EMBO J.* **26**, 578 /2007/]. Publikované práce ukazují, že na rozdíl od O₂ nebo CO, které vytváří s molekulou hemu hexakoordinovaný nízkospinový komplex, se NO koordinuje na hem za současného zániku vazby hem-histidin a vzniku pentakoordinovaného komplexu hem-NO [Herzik *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **111**, E4156 /2014/]. Tento mechanismus vazby potvrzuje kromě krystalových struktur i např. měření časově rozlišené spektroskopie, kde byla prokázána přítomnost tetrakoordinovaného hemu po disociaci molekuly NO [Yoo *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **112**, E1697 /2015/]. Bakteriální senzory oxidu dusnatého se v mnohých případech vyskytují jako samostatné H-NOX domény bez katalytické části a často jsou součástí dvousložkových signálních systémů nebo systémů odpovědných za bakteriální chemotaxi [Cary *et al. Trends Biochem. Sci.* **31**, 231 /2006/]. Některé jsou schopny i vazby kyslíkové molekuly, za co je odpovědný hlavně tyrosin v distální části hemu stabilizující O₂ pomocí vodíkové vazby. Nepřítomnost tohoto tyrosinu u specifických NO sensorů je důvodem vysoké citlivosti k NO i za podmínek, kdy je koncentrace O₂ v prostředí mnohonásobně vyšší [Boon *et al. Nat. Chem. Biol.* **1**, 53 /2005/, Martin *et al. J. Biol. Chem.* **281**, 27836 /2006/].

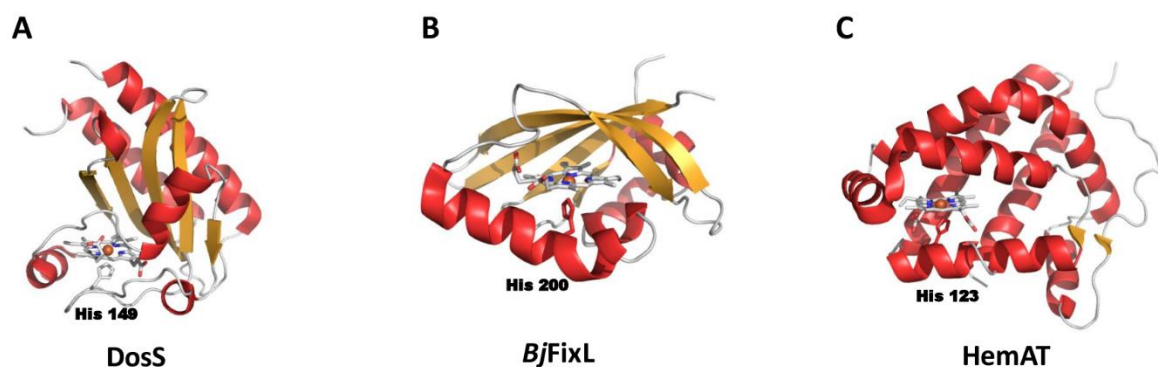
1.2.2.2. Senzorové proteiny detekující oxid uhelnatý

Oxid uhelnatý je plynem přirozeně se vyskytujícím v zemské atmosféře vznikajícím např. při nedokonalém spalování nebo sopečné činnosti. Je využíván především bakteriemi (aerobními i anaerobními) jako zdroj energie, případně uhlíku a u eukaryotních organismů plní funkci převážně signální molekuly (neurotransmise, modulace sGC nebo aktivace mitogenem aktivovaných proteinkinás) [Gullotta *et al. Biofactors* **38**, 1 /2012/]. Hlavním zdrojem CO u eukaryotů je degradace hemu hemoxygenasou za vzniku biliverdinu a volného iontu železa [Unno *et al. Nat. Prod. Rep.* **24**, 553 /2007/]. Jedním z nejlépe prozkoumaných sensorů oxidu uhelnatého je protein CooA fotosyntetické bakterie *Rhodospirillum rubrum*. Tento homodimerní protein patřící do rodiny transkripčních faktorů, reguluje expresi genů

účastnících se oxidace CO na CO₂. Ze struktury, která byla publikována v roce 2000, vyplývá, že protein je tvořen N-terminální doménou vázající hem a efektorovou doménou obsahující strukturní motiv HTH (z angl. helix-turn-helix) typický pro DNA vazebné proteiny. Ve stavu, kdy je iont železa v molekule hemu oxidován (Fe³⁺) je protein inaktivní a axiálními ligandy jsou Cys75 a Pro2 (Pro2 pochází z druhé podjednotky homodimeru) [Lanzilotta *et al. Nat. Struct. Biol.* **7**, 876 /2000/, Roberts *et al. J. Inorg. Biochem.* **99**, 280 /2005/, Kuchinskas *et al. Biochemistry* **45**, 7148 /2006/]. Redukce Fe³⁺ na Fe²⁺ způsobí disociaci Cys75 a jeho nahrazení His77. Vazba CO vytěsňuje Pro2 čímž dochází k signifikantní konformační změně, aktivaci proteinu a následné vazbě na příslušné regulační úseky DNA. Aktivitu proteinu specificky reguluje jenom vazba/disociace CO. Vazba O₂ způsobuje oxidaci iontu železa, takže nemůže tvořit stabilní komplex a NO dává vznik pentakoordinovanému komplexu, který rovněž není aktivní [Clark *et al. Biochemistry* **43**, 14149 /2004/, Yamamoto *et al. J. Biol. Chem.* **276**, 11473 /2001/]. Na základě signifikantních konformačních změn při přechodech mezi Fe³⁺ a Fe²⁺ stavy se uvažuje o CoxA také jako o možném redoxním senzoru, ovšem tato jeho funkce není doposud detailně popsána a vyžaduje důkladnější studium.

1.2.2.3. Senzorové proteiny detekující kyslík

Z hlediska fyziologie je pro většinu organismů nejdůležitější plynnou molekulou molekula kyslíku a i z tohoto důvodu jsou proteiny detekující kyslík nejvíce zastoupené a nejlépe charakterizované. Do této skupiny patří senzorové proteiny se třemi různými typy sbalení senzorové domény a to i) GAF doména ii) PAS doména iii) senzorová doména s globinovým upořádáním [Martínková *et al. J. Biol. Chem.* **288**, 27702 /2013/] (viz obr. 3, str. 18).



Obr. 3 Příklady struktur sensorových domén detekujících kyslík

A – GAF doména histidinkinasy DosS [Podust *et al. Biochemistry* **47**, 12523 /2008/], B – PAS doména histidinkinasy BjFixL [Gong *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **95**, 15177 /1998/], C – globinová doména chemotaktického proteinu HemAT [Zhang a Phillips. *Structure* **11**, 1097 /2003/].

Kyslíkové senzory s GAF doménou

Proteiny obsahující GAF doménu jsou hojně zastoupeny v prokaryotních i eukaryotních organismech. Akronym GAF je odvozený z názvu proteinových rodin, u kterých byla tato doména poprvé objevena, konkrétně cGMP dependentní fosfodiesterasy, *Anabena* adenylátcyklasy a *E. coli* FhlA [Heikaus *et al. Structure* **17**, 1551 /2009/, Zoraghi *et al. Mol. Pharmacol.* **65**, 267 /2004/]. GAF doména se vyznačuje typickým prostorovým uspořádáním, kde centrální část proteinu tvoří β -list složený z pěti antiparalelních řetězců, kolem kterého jsou uspořádané čtyři α -helixy [Cho *et al. J. Biol. Chem.* **284**, 13057 /2009/]. Vazebné místo pro hem může kromě tohoto kofaktoru vázat i jiné ligandy jako flaviny, adenin nebo cGMP [Ho *et al. EMBO J.* **19**, 5288 /2000/, Anantharaman *et al. J. Mol. Biol.* **307**, 1271 /2001/, Shimizu *et al. Chem. Rev.* **115**, 6491 /2015/].

Histidinkinasy DosS a DosT

Dobře prozkoumanými zástupci jsou dvě transmembránové histidinkinasy DosS a DosT z bakterie *Mycobacterium tuberculosis*, které se podílejí na přechodech mezi virulentním a latentním stavem [Roberts *et al. J. Biol. Chem.* **279**, 23082 /2004/]. Oba proteiny jsou společně s tzv. regulátorem odpovědi (z angl. Response Regulator) DosR součástí dvousložkového signálního systému, kde dochází k přenosu fosfátu z histidinkinasy na asparágovou kyselinu regulátoru odpovědi. Fosforylací dochází k aktivaci DosR, který se jakožto transkripční faktor váže na DNA a reguluje metabolické děje za hypoxických

podmínek a přechod bakterie do latentního stavu [Farhana *et al. Antioxid. Redox Signal.* **17**, 1232 /2012/, Ioanoviciu *et al. Biochemistry* **46**, 4250 /2007/, Chim *et al. J. Inorg. Biochem.* **133**, 118 /2014/]. DosS i DosT obsahují dvě strukturně podobné tandemové GAF domény (GAF-A, GAF-B), přičemž hemový kofaktor je vázán jen na první GAF-A doménu. GAF-B pravděpodobně moduluje vazbu ligandu v GAF-A doméně kde zvyšuje stabilitu komplexu $\text{Fe}^{2+}\text{-O}_2$ a pomáhá i při přenosu konformačních změn a aktivaci kinasové domény [Ioanoviciu *et al. Biochemistry* **48**, 5839 /2009/, Yukl *et al. Biochemistry* **47**, 12532 /2008/]. Proteiny jsou aktivní ve stavu, kdy je iont železa v hemu redukován (Fe^{2+}) bez navázaného ligandu a inaktivní ve stavu $\text{Fe}^{2+}\text{-O}_2$. Schopnost tvořit s kyslíkem stabilní komplex má jenom DosT, zatímco u DosS dochází k výrazně rychlejší autooxidaci komplexu $\text{Fe}^{2+}\text{-O}_2$ na Fe^{3+} [Vos *et al. Biochemistry* **51**, 159 /2012/]. I na základě této skutečnosti se DosS považuje spíše za redoxní než za kyslíkový senzor [Kumar *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**, 11568 /2007/].

Kyslíkové senzory s PAS doménou

PAS doména sestává z přibližně 100 – 120 reziduí a je jednou z nejrozšířenějších senzorových domén mající své zástupce ve všech organismech od bakterií až po člověka [Henry a Crosson. *Annu. Rev. Microbiol.* **65**, 261 /2011/]. Ačkoli je primární sekvence těchto proteinů častokrát značně odlišná, po strukturní stránce jsou si všechny PAS domény velice podobné. Jejich typickým rysem je přítomnost několika α -helixů a pěti antiparalelních řetězců tvořících β -skládaný list, které společně vytvářejí strukturu podobnou košíku na ovoce [Shimizu *et al. Chem. Rev.* **115**, 6491 /2015/, Möglich *et al. Structure* **17**, 1282 /2009/]. Stejně jako GAF doména i PAS doména je uzpůsobena pro vazbu rozličných molekul jako jsou FMN, FAD, 4-hydroxy skořicová kyselina, C3 a C4 karboxylové kyseliny (malonová, jablečná, jantarová) a samozřejmě i hem [Henry a Crosson. *Annu. Rev. Microbiol.* **65**, 261 /2011/]. Nejlépe charakterizovanými proteiny obsahujícími PAS doménu jsou histidinkinasa FixL, která je spolu s regulátorem odpovědi FixJ součástí dvousložkového signálního systému nitrifikační bakterie *Rhizobium meliloti* a fosfodiesterasa EcDOS bakterie *E. coli*.

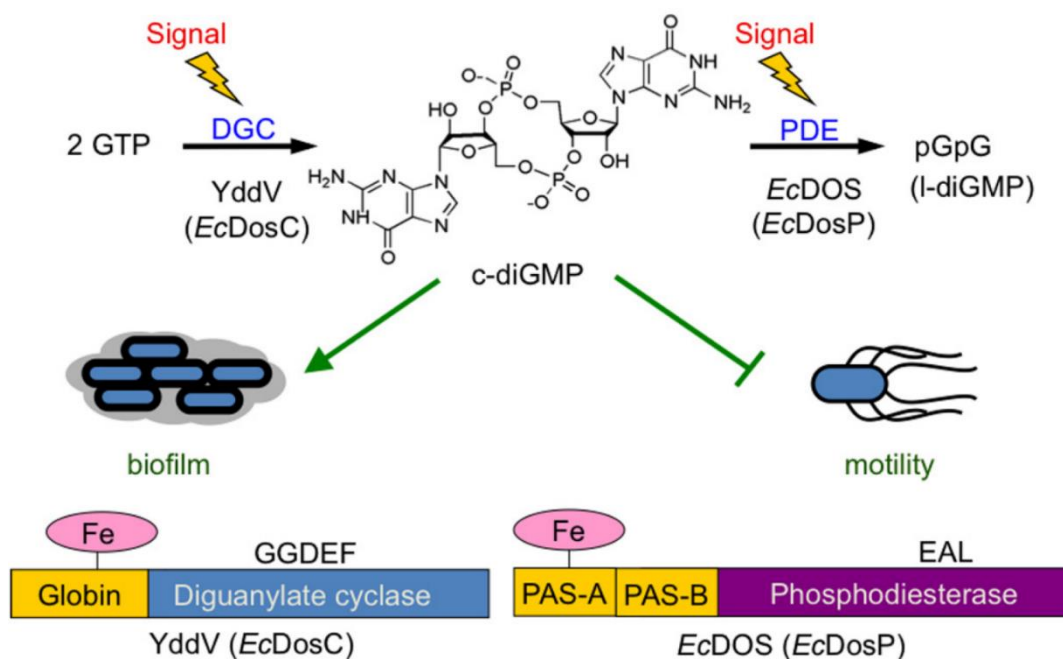
Fosfodiesterasa EcDOS

EcDOS (z angl. *E. coli* direct oxygen sensor) je protein, jehož hlavní funkcí je společně s dalším proteinem YddV (viz dále, str. 22), regulovat hladinu c-di-GMP (cyklický bis-(3',5')-guanosinmonofosfát) v buňce (viz obr. 4, str. 21). c-di-GMP je v říši prokaryot

velice důležitý druhý posel ovlivňující mnoho fyziologických funkcí, jako je buněčná diferenciaci, virulence, tvorba biofilmu, mezibuněčná komunikace a mnohé jiné [Hengge. *Nat. Rev. Microbiol.* **7**, 263 /2009/]. Především tvorba biofilmu je klinicky významná, jelikož zahrnuje pochody, na základě kterých bakterie snižuje svoji metabolickou aktivitu, dochází k produkci extracelulárního matrix, což má za následek vyšší odolnost vůči fyzikálním vlivům nebo působení antibiotik [Nadell *et al. FEMS Microbiol. Rev.* **33**, 206 /2009/, Mah. *J. Bacteriol.* **194**, 4791 /2012/]. Obecně platí, že proteiny regulující homeostázu c-di-GMP patří mezi nejvíce zastoupené v bakteriálních genomech. YddV je dokonce jednou z nejvíce exprimovaných diguanylátcyklas v *E. coli* [Galperin *et al. Mol. Biosyst.* **6**, 721 /2010/, Sommerfeldt *et al. Microbiology* **155**, 1318 /2009/]. Biosyntéza c-di-GMP u *E. coli* probíhá za účasti diguanylátcyklasy YddV, která je rovněž kyslíkovým senzorem, ovšem s jiným typem sensorové domény. Protein EcDOS je tvořen dvěma za sebou následujícími PAS doménami na N-konci a tzv. EAL funkční doménou na C-konci. Mezi druhou PAS doménou a EAL doménou se nachází ještě GGDEF doména, která je spíše typická pro diguanylátcyklasy. V případě EcDOS ale postrádá klíčové aminokyseliny asociované s diguanylátcyklasovou aktivitou a je tedy katalyticky inaktivní [Green *et al. Curr. Opin. Microbiol.* **12**, 145 /2009/, Tanaka *et al. J. Biol. Chem.* **282**, 21301 /2007/]. Protein se v roztoku vyskytuje ve formě homotetrameru [Yoshimura *et al. J. Biol. Chem.* **278**, 53105 /2003/], u kterého byla pozorována kooperativita při vazbě molekuly kyslíku (Hillův koeficient 1,5). Samostatná PAS doména již tuto vlastnost nevykazuje [Tuckerman *et al. Biochemistry* **48**, 9764 /2009/]. Hem je podobně jako u sensorů s GAF doménou DosS nebo DosT vázán jen na první PAS-A doménu a jeho axiálními ligandy jsou His77 a molekula H₂O (Fe³⁺ stav), případně Met95 (Fe²⁺ stav) [Sasakura *et al. Acc. Chem. Res.* **39**, 37 /2006/, Kurokawa *et al. J. Biol. Chem.* **279**, 20186 /2004/, Park *et al. Biochemistry* **43**, 2738 /2004/].

Funkční EAL doména katalyzuje hydrolýzu c-di-GMP na jeho lineární formu 1-di-GMP (pGpG). Aktivita C-terminální domény je výrazně zvýšena po vazbě kyslíku (61 min⁻¹), zatímco stav Fe²⁺ je aktivní jen částečně (9,7 min⁻¹) [Tanaka *et al. J. Biol. Chem.* **282**, 21301 /2007/]. Stav Fe³⁺ má aktivitu minimální. Vazba molekuly O₂ způsobí v okolí hemu rozsáhlé konformační změny, kdy dochází k odstoupení Met95 a změně pozice Arg97, který tak může interagovat s molekulou kyslíku [Park *et al. Biochemistry* **43**, 2738 /2004/]. Důležitou roli ve vazbě kyslíku má hlavně Arg97. Záměna této aminokyseliny výrazně zvyšuje rychlost autooxidace a zároveň i rychlost disociace molekuly O₂ z aktivního místa

proteinu [Ishitsuka *et al. Biochemistry* **47**, 8874 /2008/]. EcDOS bez hemu nebo PAS domény vykazuje aktivitu téměř totožnou se stavem $\text{Fe}^{2+}\text{-O}_2$, což znamená, že funkcí kofaktoru je potlačovat katalytickou aktivitu proteinu a udržovat ho v inaktivním stavu [Tanaka a Shimizu. *Biochemistry* **47**, 13438 /2008/]. Stejný efekt hemu byl pozorován i u dalšího proteinu YddV [Kitanishi *et al. Biochemistry* **49**, 10381 /2010/]. Zajímavostí je, že aktivační efekt mají i ostatní ligandy hemu jako jsou CO, NO, CN^- nebo imidazol, což je pravděpodobně dáno charakteristickými změnami v distální oblasti hemu, které souvisí především s disociací Met95 [Tanaka a Shimizu. *Biochemistry* **47**, 13438 /2008/].



Obr. 4 Syntéza a štěpení c-di-GMP proteinu YddV a EcDOS

Diguanylátcyklasa YddV syntetizuje ze dvou molekul GTP jednu molekulu c-di-GMP, která může být dále proteinem EcDOS linearizována na l-di-GMP. Koncentrace c-di-GMP v *E. coli* reguluje množství procesů, např. tvorbu biofilmu nebo pohyblivost bakterií. V dolní části je schematicky znázorněno i usprádaní domén v jednotlivých proteinech. Převzato z [Martínková *et al. J. Biol. Chem.* **288**, 27702 /2013/].

Dále bylo pozorováno, že EcDOS (jen ve stavu Fe^{2+}) může kromě c-di-GMP hydrolyzovat i cAMP, i když s mnohem nižší rychlostí [Imamura *et al. J. Biol. Chem.* **271**, 25423 /1996/]. Vyřazení genu pro EcDOS způsobilo u *E. coli* signifikantní nárůst intracelulární koncentrace cAMP (jen za aerobních podmínek) a byla pozorována i změna v buněčné morfologii a rychlosti růstu [Yoshimura-Suzuki *et al. J. Bacteriol.* **187**, 6678 /2005/]. Studie tedy naznačují, že i navzdory velice nízké rychlosti odbourávání cAMP ($0,15 \text{ min}^{-1}$) se může jednat o fyziologický substrát. Rychlost odbourávání může být částečně

kompenzována zvýšenou expresí proteinu, která je za aerobních podmínek 2,6 krát vyšší než za podmínek anaerobních [Yoshimura-Suzuki *et al. J Bacteriol.* **187**, 6678 /2005/].

Kyslíkové senzory s globinovou doménou

Jak již sám název naznačuje, globinové sensorové proteiny se vyznačují strukturálním uspořádáním sensorové domény podobným myoglobinu nebo hemoglobinu. Na rozdíl od těchto proteinů ale plní odlišné funkce. Vazba kyslíku v tomto případě má povahu signálu, který reguluje následné fyziologické děje. Pro strukturu sensorové domény je charakteristická přítomnost sedmi α -helixů A-H spojených krátkými smyčkami. V porovnání s myoglobinem (8 α -helixů) chybí celý helix D a helix E je kratší na C-konci. Toto uspořádání se označuje jako tzv. 3/3 α -helikální sbalení a je pravděpodobně výhodné pro správnou funkci globinových sensorů [Martínková *et al. J. Biol. Chem.* **288**, 27702 /2013/]. Dále existují proteiny vykazující 2/2 α -helikální sbalení, u kterého většinou chybí celý helix A (nebo je jen velice krátký), velká část helixu F je ve formě neuspořádané smyčky a mezi helixy C a E je jen velice krátká spojovací oblast [Lecomte *et al. Curr. Opin. Struct. Biol.* **15**, 290 /2005/]. Zatímco PAS i GAF domény vážou různé kofaktory i malé molekuly, globinová sensorová doména váže pouze hem. Ten je vázán v hydrofobním jádře proteinu a koordinován histidinem helixu F, který je velice konzervovaný u všech globinových sensorů [Freitas *et al. J. Inorg. Biochem.* **99**, 23 /2005/]. V distální části hemu je nejvíce konzervovanou aminokyselinou TyrB10, který je důležitý především při stabilizaci navázaného O₂ [Zhang *et al. Biophys. J.* **88**, 2801 /2005/]. Jako první zástupce skupiny globinových sensorů byl v roce 2000 popsán protein HemAT archaebakterie *Halobacterium salinarum* a bakterie *Bacillus subtilis* [Hou *et al. Nature* **403**, 540 /2000/]. Od té doby bylo objevených mnoho globinových sensorů, přičemž u některých dosud nebyla ani popsána jejich fyziologická funkce [Pesce *et al. J. Mol. Biol.* **386**, 246 /2009/]. Stejně jako proteiny obsahující PAS nebo GAF doménu, tak i globinové senzory jsou proteiny modulární a mohou regulovat různé funkční domény. V našem případě je výzkum zaměřen na dva proteiny, konkrétně již dříve zmíněnou diguanylátcyklasu YddV a histidinkinasu AfGcHK.

Diguanylátcyklasa YddV (EcDosC)

Jak již bylo zmíněno v souvislosti s EcDOS, YddV je diguanylátcyklasa syntetizující c-di-GMP a pracující v synergii s fosfodiesterasou EcDOS (viz obr. 4, str. 21). V genomu *E. coli* jsou tyto dva proteiny součástí jednoho operonu, jejich transkripce probíhá současně a je regulována sigma faktorem RpoS regulujícím transkripci proteinů za stresových

podmínek [Méndez-Ortiz *et al. J. Biol. Chem.* **281**, 8090 /2006/, Weber *et al. Mol. Microbiol.* **62**, 1014 /2006/]. Fyziologickou funkcí proteinu YddV je regulace produkce některých komponent biofilmu, jako jsou např. adherentní faktory (tzv. curli) [Tagliabue *et al. FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **59**, 477 /2010/] a exopolysacharidy (poly-N-acetylglukosamin) [Tagliabue *et al. Microbiology* **156**, 2901 /2010/]. Po strukturní stránce sestává YddV z N-koncové globinové sensorové domény, následuje tzv. středová doména tvořena pěti α -helixy a na C-konci se nachází funkční diguanylátcyklasová doména obsahující typický GGDEF motiv [Tarnawski *et al. Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **71**, 2158 /2015/]. Zatímco většina homologních diguanylátcyklas s globinovou doménou (HemDGC, PccGCS, BpGReg) vytváří funkční tetramery [Sawai *et al. Biochim. Biophys. Acta.* **1804**, 166 /2010/, Burns *et al. Mol. Biosyst.* **10**, 2823 /2014/], YddV byl v roztoku pozorován převážně ve formě dimeru [Tarnawski *et al. Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **71**, 2158 /2015/, Tuckerman *et al. Biochemistry* **48**, 9764 /2009/]. Zásadním problémem v případě YddV je stabilita proteinu exprimovaného v plné délce, kdy dochází k tvorbě vyšších oligomerů (tetramery, oktamery) až agregátů. Z toho vyplývá, že i protein ve formě tetrameru může mít rovněž fyziologickou relevanci.

YddV katalyzuje v závislosti na koncentraci kyslíku kondenzaci dvou molekul GTP za vzniku c-di-GMP a dvou molekul pyrofosfátu. Pro aktivitu proteinu jsou esenciální i Mg^{2+} ionty [Whiteley *et al. Biotechnol. Adv.* **33**, 124 /2015/]. Protein je inaktivní za stavu, kdy je centrální iont železa hemu v sensorové doméně redukován (Fe^{2+}). Aktivní protein reprezentují stavy Fe^{3+} ($0,066 \text{ min}^{-1}$) a $Fe^{2+}-O_2$ ($0,022 \text{ min}^{-1}$), přičemž stavy Fe^{2+} a Fe^{3+} vykazují spektra typická pro vysokospinový pentakoordinovaný komplex (jediný axiální ligand His98). Uvedené aktivity jsou v porovnání s hodnotami pro *EcDOS* (61 min^{-1} pro stav $Fe^{2+}-O_2$) velice nízké, což znamená, že rychlost určujícím krokem je právě tvorba c-di-GMP, který je pak v následné reakci substrátem pro *EcDOS*. Navíc se zdá, že přítomnost proteinu *EcDOS* ovlivňuje aktivitu YddV a společně vytváří stabilní komplex YddV-*EcDOS*. Za podmínek, kdy bylo YddV exprimováno a purifikováno samostatně, nebyla pozorována po přidání GTP tvorba c-di-GMP. Výsledkem společné koexprese a kopurifikace těchto dvou proteinu byl stabilní komplex YddV-*EcDOS* již vykazující enzymovou aktivitu [Tuckerman *et al. Biochemistry* **48**, 9764 /2009/]. Výše zmíněné katalytické aktivity byly naměřeny pro samotný protein YddV a nízké naměřené hodnoty tedy mohou být ovlivněny právě absencí proteinu *EcDOS*. Rovněž se zdá, že hladina c-di-GMP může být v *E. coli* regulována systémem YddV/*EcDOS* také v závislosti na koncentraci kyslíku v prostředí. Rovnovážná

disociační konstanta K_d pro kyslík je u YddV (14-20 μM) výrazně nižší než u *EcDOS* (74-340 μM), z čehož pak vyplývají i rozdílné aktivity jednotlivých proteinů za různých koncentrací kyslíku. Nicméně, na základě katalytických aktivit jednotlivých proteinů je zřejmé, že homeostáza c-di-GMP bude regulována především proteinem *EcDOS* [Shimizu *et al. Chem. Rev.* **115**, 6491 /2015/].

Celkově je afinita YddV ke kyslíku v porovnání s ostatními proteiny s globinovou doménou výrazně nižší. Diguanylátcyklasa *BpeGReg* vykazuje pro kyslík K_d přibližně 0,6 μM [Wan *et al. J. Mol. Biol.* **388**, 262 /2009/], u chemotaktického proteinu HemAT je to přibližně 0,7 μM [Aono *et al. J. Biol. Chem.* **277**, 13528 /2002/]. Také rychlost autooxidace komplexu $\text{Fe}^{2+}\text{-O}_2$ je u YddV relativně vysoká, což znamená, že v buňce je spíše rovnováha $\text{Fe}^{2+}\leftrightarrow\text{Fe}^{3+}$ než rovnováha mezi stavy $\text{Fe}^{2+}\leftrightarrow\text{Fe}^{2+}\text{-O}_2$. Aminokyselina mající největší vliv na stabilitu kyslíku v aktivním centru sensorové domény je Tyr43, který vytváří s molekulou kyslíku vodíkovou vazbu. Mutace této aminokyseliny má za následek výrazné snížení afinity ke kyslíku a také zvýšení rychlosti autooxidace [Kitanishi *et al. Biochemistry* **49**, 10381 /2010/]. Další důležitou aminokyselinou v distální oblasti hemu je Leu65. Absorpční spektra komplexu Fe^{3+} u proteinů s mutovaným Leu65 vykazují výrazné rozdíly, které naznačují, že je centrální iont železa v hexakoordinavém stavu a šestým ligandem je molekula vody. Mutantní proteiny dále vykazují výrazně vyšší autooxidační konstanty což rovněž poukazuje na roli Leu65 ve stabilizaci komplexu $\text{Fe}^{2+}\text{-O}_2$, kde zabraňuje vstupu molekuly vody do aktivního centra proteinu [Nakajima *et al. J. Inorg. Biochem.* **108**, 163 /2012/].

Strukturu jednotlivých domén proteinu YddV nedávno publikovali Tarnawski a kol. [Tarnawski *et al. Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **71**, 2158 /2015/]. Autorům se podařilo vykrytalizovat sensorovou doménu ve dvou stavech Fe^{3+} a Fe^{2+} , což umožnilo identifikovat konformační změny vedoucí k aktivaci proteinu. Sensorová doména vykazuje typické globinové uspořádání podobně jako proteiny HemAT [Zhang a Phillips. *Structure* **11**, 1097 /2003/] nebo *GsGCS* [Pesce *et al. J. Mol. Biol.* **386**, 246 /2009/] a její struktury v redukovaném a oxidovaném stavu jsou si rovněž velice podobné. Nejvýraznější konformační změna byla pozorována u helixu F, který obsahuje His98 koordinující molekulu hemu ve struktuře proteinu. Významnější rozdíly byly pozorovány také u helixů C a E a smyček spojující helixy C, E a F, G. Konformace hemu jsou téměř totožné, mírně se liší jen polohy propionátů. Všechny tyto diference jsou autory považovány za klíčové v aktivaci proteinu. Na základě těchto dat navrhují mechanismus přenosu signálu mezi

senzorovou a funkční GGDEF doménou, kdy je konformační změna v sensorové doméně přenesena přes středovou doménu, která následně aktivuje repozici funkční domény do polohy, kdy je táto dostatečně blízko druhé funkční doméně dimeru a jsou tak společně schopny ustavit produktivní konformaci potřebnou pro katalýzu [Tarnawski *et al. Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **71**, 2158 /2015/].

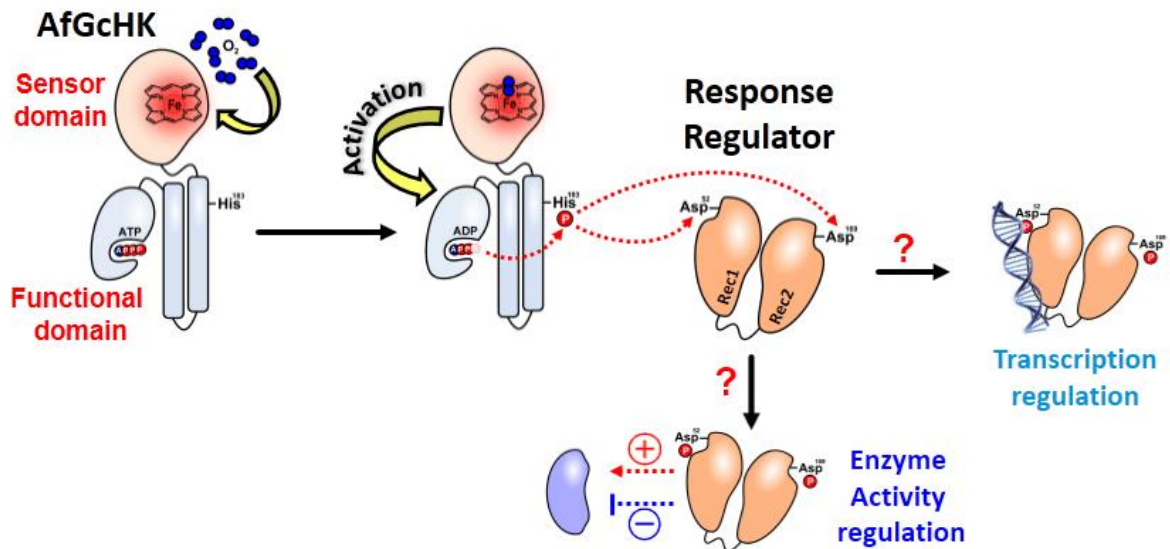
Histidinkinasa AfGcHK

Ze všech doposud popsaných proteinů je o histidinkinase AfGcHK známo nejméně informací. Nicméně, N-terminální globinová sensorová doména i C-terminální funkční histidinkinasová doména vykazují strukturní homologii k proteinům, které již byly v minulosti relativně dobře prozkoumány, takže můžeme z jejich vzájemného srovnání dedukovat některé důležité informace o funkci nebo struktuře proteinu AfGcHK. Tento protein pochází z půdní bakterie *Anaeromyxobacter* sp. Fw109-5, která byla získána ze sedimentů z hloubky 15 metrů pod povrchem a pro svůj růst vyžaduje především anaerobní podmínky [http://genome.jgi.doe.gov/ana_f/ana_f.home.html]. Protein je zajímavý hlavně z toho důvodu, že se jedná o doposud jedinou charakterizovanou histidinkinasu regulovanou pomocí globinové sensorové domény. Ostatní histidinkinasy mají nejčastěji na N-terminálním konci jednu nebo více sensorových PAS, GAF nebo HAMP domén [Galperin *et al. FEMS Microbiol. Lett.* **203**, 11 /2001/]. AfGcHK má molekulovou hmotnost 43 kDa a jako všechny doposud popsané histidinkinasy je ve formě stabilního dimeru. Funkční kinasovou doménu tvoří dva centrální α -helixy, označované jako DHp doména (z angl. „dimerization and histidine phosphotransfer domain“) a katalytická CA doména (z angl. „catalytic ATP-binding domain“) vázající ATP. DHp doména obsahuje vysoce konzervovaný fosforylovatelný zbytek histidinu 183, zprostředkovává dimerizaci proteinu a je rovněž místem interakce s RR proteinem. Dimer dvou histidinkinase je tedy tvořen svazkem čtyř antiparalelních α -helixů [Bhate *et al. Structure* **23**, 681 /2015/]. CA doména váže molekulu ATP a po strukturní stránce je tvořena β -listem složeným z pěti antiparalelních řetězců a tří α -helixů situovaných na jedné straně. ATP je vázáno dvěma helixy a dlouhou smyčkou označovanou jako „ATP lid“ [Bhate *et al. Structure* **23**, 681 /2015/]. Sekvence vázající ATP jsou vysoce konzervované a označované jako N, G1, G2 a F boxy. Mutace v těchto oblastech mají výrazný vliv na vazbu ATP a celkovou aktivitu proteinu [Kim a Forst. *Microbiology* **147**, 1197 /2001/].

Globinová senzorová doména *AfGcHK* vykazuje strukturní homologii k ostatním globinovým sensorům jako jsou HemAT, YddV, *GsGCS*, *BPeGReg* nebo *AvGReg*. K funkční doméně je připojena sekvencí čítající přibližně 15 aminokyselin. Ionť železa hemu je v sensorové doméně ve stavu Fe^{3+} hexakoordinován, přičemž axiálními ligandy jsou His99 a pravděpodobně OH^- . Stav Fe^{2+} vykazuje absorpční spektrum typické pro komplex hemu s pentakoordinovaným iontem železa. Afinita globinové domény ke kyslíku je neobyčejně vysoká s K_d kolem $0,08 \mu M$ a je schopná detekovat i stopová množství kyslíku v prostředí. Hlavní aminokyselinou stabilizující molekulu kyslíku je, podobně jako u ostatních globinových sensorů, Tyr45 v distální oblasti hemu [Kitanishi *et al. J. Biol. Chem.* **286**, 35522 /2011/].

V genomu bakterie *Anaeromyxobacter* sp. Fw109-5 je gen pro *AfGcHK* situovaný vedle genu pro regulátor odpovědi RR (z angl. „Response Regulator“) a společně jsou součástí dvousložkového signálního systému. Ty jsou v bakteriální říši hlavními činiteli zprostředkovávající přenos signálu z extracelulárního prostředí do buňky a v genomech bakterií jsou velice hojně zastoupeny (desítky až stovky různých proteinů) [Galperin *et al. Mol. Biosyst.* **6**, 721 /2010/]. V nejjednodušším uspořádání je tento systém tvořen histidinkinasou (nejčastěji ukotvenou v membráně), která po detekci signálu a autofosforylaci slouží jako donor fosfátu pro regulátor odpovědi RR. Ten funguje jako molekulární spínač regulující různé buněčné mechanismy od regulace genové exprese až po změnu pohyblivosti [West a Stock. *Trends. Biochem. Sci.* **26**, 369 /2001/]. Přenos fosfátové skupiny na RR protein je katalyzován samotným RR proteinem za přítomnosti Mg^{2+} iontů. Většina RR proteinů obsahuje konzervovanou N-terminální regulační doménu s fosforylovatelnou asparágovou kyselinou a variabilní efektorovou doménu, která odpovídá za výkon různých funkcí, jako je vazba na DNA, diguanylátcyklasová nebo methyltransferasová aktivita [Capra a Laub. *Annu. Rev. Microbiol.* **66**, 325 /2012/]. Regulační doména je tvořena pěti paralelními β -řetězci, které jsou obklopeny pěti α -helixy [Stock *et al. Annu. Rev. Biochem.* **69**, 183 /2000/]. V aktivním místě, kde dochází k fosforylaci aspartátového zbytku je koordinován ionť Mg^{2+} pomocí dalších dvou asparágových kyselin a jednoho karbonylového kyslíku hlavního řetězce [Stock *et al. Biochemistry* **32**, 13375 /1993/]. Během přenosu fosfátové skupiny pravděpodobně dochází za účasti hořčnatého iontu ke vzniku pětimocného fosforového intermediátu [Stock *et al. Annu. Rev. Biochem.* **69**, 183 /2000/]. Poločas života vzniklého fosfoaspartátu je častokrát velice krátký v rozsahu od několika sekund až po jednu hodinu v závislosti na buněčné

odpovědi, které musí být dosaženo [Foussard *et al. Microbes Infect.* **3**, 417 /2001/]. Defosforylace může probíhat za účasti histidinkinasy nebo samotného RR proteinu, který vykazuje autofosfataseovou aktivitu [West a Stock. *Trends. Biochem. Sci.* **26**, 369 /2001/].



Obr. 5 Dvousložkový signální systém AfGcHK-RR bakterie *Anaeromyxobacter sp Fw 109-5*

Po vazbě kyslíku na AfGcHK dochází k jeho aktivaci a fosforylaci His183. Fosfát je následně přenášen na Asp52 a Asp169 RR proteinu. Specifický cíl pro RR protein zatím nebyl identifikován, ale uvažuje se o jeho možném zapojení v regulaci transkripce nebo v regulaci aktivity jiných proteinů.

Přesná fyziologická role systému AfGcHK-RR není doposud známá, ale uvažuje se o jeho zapojení v přechodech mezi anaerobním a aerobním metabolismem. AfGcHK je inaktivní ve stavu Fe^{2+} , po vazbě molekuly kyslíku nebo oxidaci na Fe^{3+} dochází k aktivaci a přenosu fosfátu z ATP na His183. Fosfát je následně přenesen na dvě asparágové kyseliny 52 a 169 vyskytující se v konzervovaných oblastech dvou regulačních domén RR proteinu [Kitanishi *et al. J. Biol. Chem.* **286**, 35522 /2011/]. V tomto případě tedy není přítomna efektorová doména, která se obvykle u RR proteinů vyskytuje, a proto se uvažuje, že aktivovaný RR pravděpodobně reguluje ještě jiné proteiny (obr. 5).

2. Cíle disertační práce

Cílem předkládané disertační práce bylo prostudovat intraproteinový/interdoménový přenos signálu u dvou zástupců hemových sensorových proteinů s globinovým uspořádáním sensorové domény (*AfGcHK*, *YddV*) a u jednoho zástupce s PAS uspořádáním sensorové domény (*EcDOS*). Dalším cílem bylo popsat interproteinový přenos signálu u dvousložkového systému *AfGcHK-RR* a strukturně charakterizovat tyto dva interakční partnery. Nemalý důraz byl kladen také na studium interakce modelových sensorových domén s různými signálními molekulami.

V rámci studia intraproteinového/interdoménového přenosu signálu byly definovány tyto cíle:

- Určit kinetické parametry histidinkinasy *AfGcHK* v přítomnosti různých ligandů hemu a za různých oxidačních stavů iontu železa hemu.
- Zjistit, zda existuje korelace mezi flexibilitou sensorových domén proteinů *EcDOS*, *YddV* a aktivitou jejich funkčních domén.

Pro objasnění interproteinového přenosu signálu jsme se zaměřili na tyto cíle:

- Charakterizovat oligomerní stavy proteinů *AfGcHK* a *RR*, určit stechiometrii těchto proteinů v komplexu a charakterizovat jejich interakční rozhraní.
- Určit zda se kinetické parametry histidinkinasy *AfGcHK* liší v přítomnosti a nepřítomnosti *RR* proteinu.

Pro naplnění posledního hlavního cíle disertační práce, tj. studia interakce sensorové domény se signálem byla stanovena tato zadání:

- Popsat interakci sensorové domény proteinu *YddV* s různými signály a objasnit funkci jednotlivých aminokyselin v distální oblasti hemu (*Tyr43*, *Leu65*) ve stabilizaci navázané signální molekuly.
- Posoudit vliv možné nové signální molekuly SH^- na enzymovou aktivitu *AfGcHK*, *EcDOS* a spektrální změny sensorové domény proteinu *YddV*.

3. Komentář a diskuse k souboru publikací

Tato disertační práce se věnuje studiu mechanismu přenosu signálu u modelových senzorových proteinů, které detekují kyslík a je tematicky rozdělena na dva bloky obsahující práce publikované s původními výsledky a jednu souhrnnou práci. Blok I (kapitoly 4.1 – 4.4) obsahuje souhrnnou publikaci a dále původní vědecké výsledky ze studia histidinkinasy s globinovou strukturou senzorové domény AfGcHK a jejího interakčního partnera, kterým je tzv. regulátor odpovědi (RR protein). Oba tyto proteiny pochází z půdní bakterie *Anaeromyxobacter* sp. Fw109-5. Blok II (kapitoly 5.1 – 5.5) zahrnuje výsledky získané studiem dalších dvou hemoproteinů, které pocházejí z bakterie *E. coli* a to diguanylátcyklasy YddV a fosfodiesterasy EcDOS. Všechny uvedené proteiny jsou studovány v rámci výzkumné problematiky, které se věnuje skupina zaměřená na hemové senzorové proteiny na katedře biochemie PřF UK.

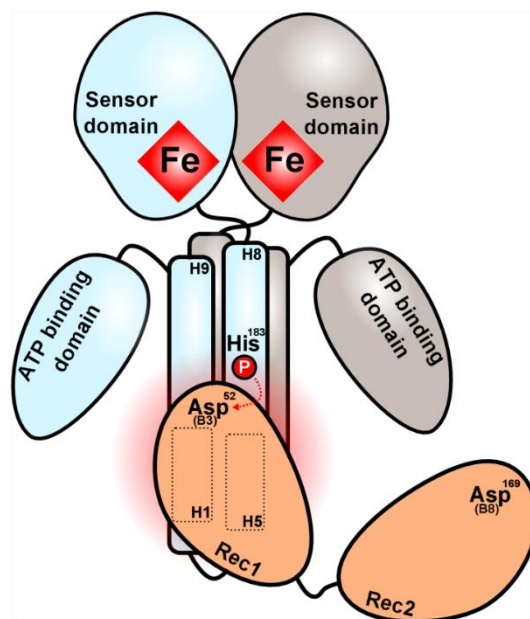
Úvodní kapitola 4.1 (str. 43) bloku I obsahuje jednu souhrnnou publikaci široce shrnující poznatky v oblasti hemových senzorových proteinů, kde je velký prostor věnován všem třem, v disertační práci studovaným, modelovým systémům AfGcHK, YddV a EcDOS. Dále se tato práce věnuje i ostatním senzorovým systémům detekujícím O₂, CO, NO a H₂S, přičemž největší důraz je kladen na aktuální poznatky publikované v posledních deseti letech.

Následující kapitoly prvního bloku jsou zaměřeny na studium nově popsaných proteinů AfGcHK a RR, které jsou součástí dvousložkového signálního systému bakterie *Anaeromyxobacter* sp. Fw109-5 (kapitoly 4.2 – 4.4). Především AfGcHK je velice zajímavým předmětem studia, jelikož jako jediná doposud popsaná histidinkinasa kombinuje globinovou senzorovou doménu s funkční histidinkinasovou doménou [Kitanishi *et al. J. Biol. Chem.* **286**, 35522 /2011/]. Přestože systém AfGcHK-RR byl již částečně charakterizován, mnoho otázek týkajících se jeho funkce zůstalo nevyjasněných. Rovněž nejsou známy ani příslušné struktury těchto dvou proteinů. Určité charakteristiky mohou být pouze odhadnuty na základě podobných systémů vyskytujících se v jiných organismech. V případě kyslíkových senzorových proteinů zůstává obecně velkou neznámou, jakým způsobem dochází k přenosu signálu ze senzorové na funkční doménu a jaké konformační změny jsou za aktivaci těchto proteinů odpovědné. Hlavním cílem naší práce shrnuté v kapitolách 4.2 – 4.4 byla strukturně-funkční studie tohoto systému a popsání charakteristik intraproteinového/interdoménového (AfGcHK) i interproteinového (AfGcHK – RR) přenosu signálu. V tomto případě jsme využili různých přístupů, jako je místně cílená mutageneze,

analytická ultracentrifugace, vodík-deuteriová (HD) výměna spojená s hmotnostní spektrometrií, homologní modelování a stanovení kinetických parametrů pomocí tzv. Phos-tag elektroforézy.

V kapitole 4.2 (str. 87) jsme se zaměřili na strukturní charakteristiku proteinů AfGcHK, RR a popis jejich vzájemné interakce, kdy jsme využili kombinaci tří metod, konkrétně homologního modelování, analytické ultracentrifugace a HD výměny. Analytickou ultracentrifugací bylo zjištěno, že RR protein se v roztoku nachází především ve formě monomeru ($s_{20,w} = 2,34$ S), s malým zastoupením dimerní formy ($s_{20,w} = 3,76$ S). Molekulová hmotnost pro monomerní formu byla z experimentu určena na 27 kDa, zatímco hmotnost dimeru na 52 kDa. Molekulová hmotnost RR proteinu určena ze sekvence je přibližně 26,9 kDa. Většina histidinkinas se vyskytuje ve formě dimerů, za tvorbu kterých je odpovědná tzv. dimerizační doména tvořena dvěma centrálními α -helixy, které v dimerní formě vytvářejí svazek čtyř helixů [Casino *et al. Nat. Commun.* **5**, 3258 /2014/]. AfGcHK není výjimkou a v roztoku se nachází téměř výhradně ve formě dimeru se sedimentačním koeficientem $s_{20,w} = 4,74$ S, který odpovídá molekulové hmotnosti 82 kDa. Molekulová hmotnost AfGcHK určena ze sekvence je v tomto případě 43 kDa. Dimerní forma tohoto proteinu je navíc velice stabilní, kdy přítomnost monomerního proteinu nebyla pozorována ani za nejnižší detekovatelné koncentrace (100 nM). Se zvyšujícími se přídávky RR proteinu k AfGcHK docházelo k postupnému posunu sedimentačního koeficientu pro dimer AfGcHK k vyšším hodnotám, ale nebyly pozorovány předpokládané stabilní komplexy dimeru histidinkinasy s jednou nebo dvěma molekulami RR proteinu. Uvedené výsledky značí, že komplex těchto dvou proteinů je transienční s vysokou rychlostí disociace ($k_{off} \geq 10^{-3}s^{-1}$). Z měření byly odhadnuty rovnovážné disociační konstanty K_d , které měly hodnotu 18 μ M pro komplex dimeru kinasy s jedním RR proteinem a 158 μ M pro komplex dimeru kinasy se dvěma RR proteiny. Dále byly vytvořeny homologní modely pro AfGcHK a RR protein na základě dostupných struktur GsGCS (model pro globinovou sensorovou doménu), HK853 (model pro funkční kinasovou doménu) a Aer-sal RR (model pro RR protein) a tyto modely srovnány s výsledky HD výměny pro časové rozpětí 0,5 – 180 min. Data ukazují, že nejvíce flexibilní oblastí proteinu AfGcHK je smyčka spojující sensorovou a funkční doménu, zatímco oblasti nejméně přístupné rozpouštědлу jsou situované v helixech H4 a H7 sensorové domény. Porovnání deuteriačních profilů pro samotnou AfGcHK a v komplexu s RR proteinem ukázalo, že oblast interakce s RR proteinem se nachází v helixech H8 a H9, které jsou zároveň odpovědné za dimerizaci. Mírné ovlivnění po vazbě RR proteinu bylo

patrné i na helixu H11, který je odpovědný za vazbu ATP. S touto skutečností pravděpodobně souvisí i nárůst hodnoty K_m pro ATP u AfGCHK v případě, že je ve směsi přítomen jeho interakční partner, protein RR (viz dále kapitola 4.3). RR interaguje s AfGCHK prostřednictvím helixů H1 a H5 regulační domény 1 (obr. 6), přičemž žádné změny v deuteraci nebyly pozorovány v regulační doméně 2, i když jsou si strukturně velice podobné. To znamená, že jako první je fosforylována regulační doména 1 (Asp52) a následně dochází k fosforylaci druhé regulační domény (Asp169) za vzniku dvojité fosforylovaného RR proteinu. Tyto výsledky jsou konzistentní i s prací Kitanishiho a kol. [Kitanishi *et al. J. Biol. Chem.* **286**, 35522 /2011/], kde byl po přidání ATP ke směsi AfGCHK-RR pozorován nárůst intenzity fosforylace Asp52 a Asp52/169, zatímco intenzita fosforylované formy Asp169 byla minimální. Všechny výše uvedené experimentální výsledky byly využity jako vstupní data pro výpočet možné orientace obou proteinů v komplexu, přičemž přenos fosfátu z His183 na Asp52 je možný v případě, že helix H8 AfGCHK interaguje s helixem H5 RR proteinu a helix H9 histidinkinasy interaguje s helixem H1 RR proteinu. Tímto jsme popsali interproteinový přenos signálu mezi AfGCHK a jeho interakčním partnerem RR proteinem.



Obr. 6 Schématický model interakce AfGCHK a RR proteinu

Dvě podjednotky dimeru AfGCHK (světle modrá a šedivá barva) a monomer RR proteinu (oranžová barva) vzájemně interagují pomocí helixů H8 a H9 AfGCHK a helixů H1 a H5 RR proteinu. Jako první je fosforylována regulační doména 1 (Asp52), regulační doména 2 (asp169) je fosforylována ve druhém kroku za vzniku dvojité fosforylovaného RR proteinu.

Jednou z nejdůležitějších a zároveň nejméně jasnou otázkou ve výzkumu sensorových proteinů je, jakým způsobem dochází k přenosu signálu mezi sensorovou a funkční doménou (intraproteinový/interdoménový přenos signálu), tj. jaký je mechanismus aktivace proteinu a jaké konformační změny jsou za aktivaci odpovědné. Největší překážkou v objasnění tohoto problému je především absence krystalových struktur nativních forem studovaných proteinů. Zatímco struktur individuálních sensorových, případně funkčních domén, bylo publikováno několik desítek, do dnešní doby se nepodařilo připravit krystal kyslíkového senzoru, který by současně obsahoval obě domény tj. sensorovou i funkční doménu. Neví se tedy téměř nic o interakčním rozhraní mezi sensorovou a funkční doménou, případně o jejich vzájemné orientaci v proteinu. Velkou část práce jsme věnovali právě této problematice intraproteinového přenosu signálu, kdy se podařilo vykrystalizovat globinovou sensorovou doménu, vyřešit její strukturu a za pomoci vodík-deuteriové výměny popsat konformační změny mezi aktivním a inaktivním stavem *AfGcHK*, případně porovnat změny v deuteraci mezi individuálními doménami (globinová, kinasová doména) a proteinem v nativní formě, který obsahoval obě domény (určení možného interakčního rozhraní). Publikace je ve fázi přípravy, s předpokládaným termínem dokončení do konce roku 2016 a tyto výstupy tedy nejsou zahrnuty v předkládané disertační práci, nicméně pro úplnost kapitoly „komentář a diskuse k souboru publikací“ bylo nezbytné toto zmínit.

Dalším způsobem, kterým lze studovat přenos signálu v našem modelovém systému, je určení kinetických parametrů autofosforylační reakce *AfGcHK* za různých podmínek, které mohou ovlivnit jak intraproteinový/interdoménový (různé stavy hemového iontu železa v sensorové doméně) tak interproteinový přenos signálu (přítomnost nebo absence RR proteinu). Enzymová reakce katalyzovaná *AfGcHK* je dvousubstrátová. Jedním substrátem je enzym sám a druhým substrátem je ATP. Produktem reakce je fosforylovaná forma *AfGcHK* na His183. Pro určení množství fosforylované formy *AfGcHK* v závislosti na koncentraci ATP byla v této práci (kapitola 4.3, str. 115) použita metoda tzv. Phos-tag elektroforézy, pomocí které byly určeny parametry jako K_m^{ATP} , V_{max}^{ATP} nebo k_{cat} vzhledem k ATP. Tyto parametry byly určeny jak pro aktivní formy proteinu $Fe^{3+}-OH^-$, $Fe^{2+}-O_2$, $Fe^{2+}-CO$, $Fe^{3+}-CN^-$, Fe^{3+} -imidazol, tak pro inaktivní formy, mezi které patří forma bez hemového kofaktoru (His99Ala) a stav Fe^{2+} . Naměřené hodnoty V_{max}^{ATP} pro aktivní stavy byly v rozmezí 9,6 – 11,8 pmol *AfGcHK*.min⁻¹.μL⁻¹ a k_{cat} 1,0 – 1,2 min⁻¹, což naznačuje, že aktivní formy mají velice podobné konformace odpovědné za optimální aktivitu proteinu. Na rozdíl od inaktivní formy Fe^{2+} , kde je iont železa molekuly hemu pentakoordinován a

v nízkospinovém stavu (5kNS), vykazují všechny aktivní stavy spektra typické pro hexakoordinovaný a nízkospinový stav (6kNS). Na základě analogie s molekulou myoglobinu můžeme odvodit, že iont železa ve stavu 6kNS bude ležet v rovině porfyrinového kruhu, zatímco ve stavu 5kNS bude vychýlen mimo jeho rovinu, přičemž tato změna v konformaci hemu je pravděpodobně odpovídá za přechod mezi aktivním a inaktivním stavem AfGcHK. Hodnoty V_{\max}^{ATP} a k_{cat} pro inaktivní formy byly v rozmezí 2,5 – 4,2 pmol AfGcHK.min⁻¹.μL⁻¹ a 0,3 – 0,4 min⁻¹. Aktivní formy vykazovaly velice podobné hodnoty V_{\max}^{ATP} (9,6 – 11,8 pmol AfGcHK.min⁻¹.μL⁻¹), zatímco hodnoty K_m^{ATP} se lišily mnohem výrazněji a to v rozmezí od 18,9 μM pro stav Fe³⁺-OH⁻ až po 357 μM v případě stavu Fe²⁺-CO. Výsledky tedy ukazují, že redoxní a koordinační stav molekuly hemu v sensorové doméně má výrazný vliv především na afinitu funkční domény AfGcHK k ATP. Největší vliv na afinitu k ATP má vazba molekuly CO, kdy pravděpodobně dochází ke konformačním změnám v místě vazby ATP, jejichž výsledkem je pak snížení afinity vůči tomuto substrátu. Ostatní ligandy jako O₂, CN⁻, nebo imidazol nevykazovaly tak signifikantní vliv na afinitu proteinu vůči ATP a hodnoty K_m^{ATP} se pohybovaly v rozmezí 23,0 – 35,4 μM. Snížení afinity vůči ATP bylo pozorováno i v případě inaktivních forem proteinu His99Ala (47,7 μM), Fe²⁺ (78 μM). Jak již bylo uvedeno, kromě intraproteinového/interdoménového přenosu signálu jsme se v této kapitole věnovali také studiu interakce mezi AfGcHK a RR (interproteinový přenos signálu). Právě tyto získané výsledky pak byly důležité pro finální závěry učiněné v kapitole 4.2. Sledovali jsme, jakým způsobem RR protein ovlivní autofosforylační aktivitu AfGcHK. Kdybychom použili přirozenou formu RR proteinu, kompetovalo by zde vzájemně několik procesů a závěry z takové studie by byly nejednoznačné. Proto jsme zvolili mutantní formu RR proteinu (Asp52/169Ala), která není schopna katalyzovat přenos fosfátu z fosforylovaného AfGcHK na své klíčové asparágové kyseliny 52 a 169. Sledovali jsme vliv přítomnosti takto modifikovaného RR proteinu na autofosforylacii AfGcHK a pozorovali jsme zvýšení hodnoty K_m^{ATP} , což souvisí se snížením afinity ATP k AfGcHK v přítomnosti RR proteinu. To je možné vysvětlit tím, že se RR protein váže do blízkosti aktivního centra funkční domény a ovlivňuje tak i vazbu ATP. Tyto závěry jsou ve shodě s výsledky získanými použitím jiných metodických přístupů (viz kapitola 4.2). Hodnota maximální rychlosti enzymové reakce nevykazovala výraznější odchylky od hodnoty pro stav Fe³⁺-OH⁻.

Relativně novým a velice zajímavým objektem studia v oblasti hemových sensorů a jejich interakce s molekulami plynů se v současnosti stává molekula sulfanu (H₂S). Sulfan

byl vždy považován za molekulu toxickou a to, že by se mohl účastnit fyziologických regulací, bylo dlouhou dobu jen hypotézou. Nedávno však byly objeveny i jeho fyziologické funkce, mezi které patří například neuromodulace, kardioprotekce, relaxace hladké svaloviny nebo indukce vasodilatace [Huang *et al. J. Mol. Biol.* **396**, 708 /2010/, Singh a Banerjee. *Biochim. Biophys. Acta* **1814**, 1518 /2011/, Liu *et al. Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **50**, 10327 /2011/]. Ve vodném roztoku, za fyziologického pH, H₂S disociuje na ionty SH⁻ a H⁺, přičemž nedisociované molekuly zůstává v roztoku přibližně jedna třetina [King. *Free Radic. Biol. Med.* **55**, 1 /2013/]. Kromě této reakce můžeme ionty SH⁻ získat i rozpuštěním sulfidu sodného (Na₂S) ve vodě [Nicolau a Menard. *J. Crystal Growth* **92**, 128 /1988/]. V poslední práci věnované histidinkinase AfGcHK (kapitola 4.4, str. 133), byl zkoumán vliv Na₂S na koordinační stav iontu železa hemu a enzymovou aktivitu tohoto proteinu. Přestože je AfGcHK považován za kyslíkový senzor, studium vlivu jiného ligandu iontu železa hemu může rovněž pomoci objasnit intraproteinový/interdoménový přenos signálu, jehož studiu je tato disertační práce věnována. Kromě AfGcHK byl v této práci zkoumán i vliv Na₂S na spektrální změny u dalšího zástupce hemových proteinů s globinovým uspořádáním sensorové domény a to diguanylátcyklasy YddV. I když je většina poznatků získaných studiem proteinu YddV součástí bloku II, v této publikaci jsme porovnávali vliv Na₂S na proteiny se stejným typem sensorové domény, a proto jsou pro přehlednost dané výsledky komentovány v tomto bloku. Z proteinů obsahujících globinové uspořádání byl vliv sulfanu popsán jen u myoglobinu nebo hemoglobinu, kdy v přítomnosti sulfanu docházelo u obou proteinů k tvorbě sulfhemu – hemu s inkorporovaným atomem síry [Berzofsky *et al. J. Biol. Chem.* **246**, 3367 /1971/, Nichol *et al. Biochim. Biophys. Acta* **156**, 97 /1968/, Pietri *et al. Antioxid. Redox Signal.* **15**, 393 /2011/]. Po přidání Na₂S docházelo v případě AfGcHK ke vzniku komplexu Fe³⁺-SH⁻, který byl stabilní v čase a nebyla pozorována redukce komplexu hemu na Fe²⁺ nebo vznik komplexu Fe²⁺-O₂ jako v případě proteinu EcDOS (viz dále blok II, kapitola 5.1). Stejně chování vykazovaly i proteiny s mutovaným Tyr45, který je odpovědný za vazbu molekuly O₂. Mutace v tomto místě (Tyr45Leu, Tyr45Phe, Tyr45Trp) tedy nemá výraznější vliv na vazbu ligandu SH⁻. Výraznější změny byly ovšem zaznamenány v případě některých variant s mutovanou aminokyselinou Leu68, u které se předpokládá, že plní analogickou funkci jako v případě Leu65 proteinu YddV, kde zabraňuje vstupu molekuly vody do aktivního centra sensorové domény (viz dále blok II, kapitoly 5.3 a 5.4). Zatímco Leu68Phe nevykazoval po přidání Na₂S výraznější změny v porovnání s původní formou proteinu, v případě mutantních forem Leu68Asn, Leu68Gly, Leu68Val

byl ve spektrech pozorován vznik širokého píku kolem 650 nm, který naznačuje přítomnost modifikovaného hemu. Z hmotnostních spekter bylo následně prokázáno, že se jedná o verdohem, přičemž přítomnost sulfhemu, jako v případě myoglobinu, nebyla prokázána. Tvorba verdohemu po přidání Na_2S byla pozorována i v případě proteinu *EcDOS*, konkrétně u mutantu Arg97Ile (viz blok II, kapitola 5.1). Na rozdíl od proteinu *EcDOS*, který je vazbou ligandu SH^- aktivován (blok II, kapitola 5.1), nebyl v případě *AfGcHK* ani jeho mutantních forem pozorován téměř žádný vliv tohoto ligandu na katalytickou aktivitu v porovnání s formou Fe^{3+} . Byl zaznamenán jenom mírný nárůst hodnot K_m^{ATP} , zatímco V_{max} zůstala nezměněna. Spektrální data naměřena pro *AfGcHK* byla dále porovnána s daty pro izolovanou sensorovou doménu proteinu YddV (YddV-hem), která vykazovala ve stavu Fe^{3+} spektrum typické pro pentakoordinovaný vysokospinový komplex iontu železa. Přidáním Na_2S docházelo velice rychle ke vzniku komplexu $\text{Fe}^{2+}\text{-O}_2$, zatímco komplex $\text{Fe}^{3+}\text{-SH}^-$ nebyl vůbec pozorován. Delším působením sulfanu vznikal redukovaný komplex Fe^{2+} . Takovéto chování je tedy výrazně odlišné od obou sensorových proteinů *AfGcHK* i *EcDOS*. Mutanty YddV-hem v polohách Tyr43 a Leu65, které jsou analogické mutantům Tyr45 a Leu68 proteinu *AfGcHK*, vykazovaly v přítomnosti sulfanu jenom pokles intenzity Soretova pásu značící degradaci hemového kofaktoru. Rovněž byla v případě některých proteinů pozorována přítomnost komplexu $\text{Fe}^{2+}\text{-O}_2$, který může být v tomto případě považován za meziprodukt při degradaci hemu (viz blok II, kapitola 5.3).

V následujícím bloku II, který zahrnuje kapitoly 5.1 až 5.5, jsou shrnuty výsledky získané studiem dalších dvou sensorových proteinů YddV a *EcDOS*. Protein *EcDOS* byl jediným modelovým sensorovým proteinem s PAS doménou, přičemž sensorová doména proteinu YddV (stejně jako sensorová doména *AfGcHK* – viz blok I) má globinové uspořádání. U těchto proteinů jsme se primárně zaměřili na porozumění interakce signálu s jejich sensorovou doménou. Pro tuto charakterizaci byly využity především spektroskopické techniky jako je UV-VIS, ultrarychlá a infračervená spektroskopie nebo spektroskopie za vysokých hydrostatických tlaků.

V návaznosti na pokusy s proteiny *AfGcHK*, YddV a sulfidem sodným (viz výše komentář ke kapitole 4.4) byl vliv této molekuly na enzymovou aktivitu zkoumán také u proteinu *EcDOS*. Jak již bylo vysvětleno výše, sulfan ve vodném roztoku disociuje za vzniku SH^- a stejný ion poskytuje také sulfid sodný rozpuštěný ve vodě. První práce věnující se působení Na_2S na protein *EcDOS* byla publikována autory Takahashi a kol., kde přidání Na_2S k roztoku *EcDOS* mělo za následek současný vznik hexakoordinovaných komplexů

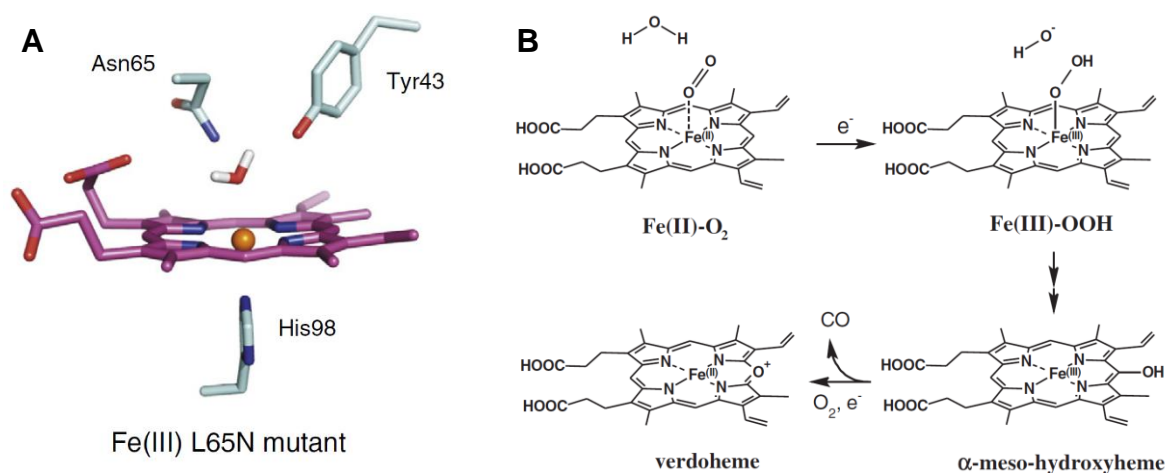
$\text{Fe}^{3+}\text{-SH}^-$ a $\text{Fe}^{2+}\text{-O}_2$. Zároveň došlo k výraznému nárůstu katalytické aktivity proteinu, přičemž nebylo jasné, jestli je za zvýšenou aktivitu odpovědný i komplex $\text{Fe}^{3+}\text{-SH}^-$ [Takahashi *et al. J. Inorg. Biochem.* **109**, 66 /2012/]. Pro objasnění role iontu SH^- v aktivaci proteinu jsme připravili mutantní proteiny v polohách Met95 a Arg97 (kapitola 5.1, str. 157). Met95 je axiálním ligandem komplexu hemu Fe^{2+} , zatímco Arg97 stabilizuje navázanou molekulu kyslíku v aktivním centru sensorové domény [Kurokawa *et al. J. Biol. Chem.* **279**, 20186 /2004/, Park *et al. Biochemistry* **43**, 2738 /2004/]. Po přidání Na_2S k mutantnímu proteinu Met95Ala došlo k vytvoření komplexu $\text{Fe}^{3+}\text{-SH}^-$ bez přítomnosti formy $\text{Fe}^{2+}\text{-O}_2$ a zároveň byl pozorován i nárůst enzymové aktivity proteinu. To znamená, že v tomto případě nedochází k redukci iontu železa a ani k následné vazbě molekuly kyslíku a iont SH^- je rovněž schopen aktivace proteinu. V situaci, kdy byl Na_2S přidán k roztoku Arg97Ile, došlo ke změně zbarvení proteinu, což naznačovalo přítomnost modifikované formy hemu. Hmotnostní spektrometrií bylo prokázáno, že v případě daného proteinu dochází působením sulfidu sodného k degradaci hemu a tvorbě redukováného verdohemu. Příčinou tohoto jevu je pravděpodobně působení reaktivních forem kyslíku. Přítomnost sulfidu sodného ale v tomto případě neměla výraznější vliv na enzymovou aktivitu proteinu.

Při dalším studiu proteinu *EcDOS* byla využita technika UV-VIS spektroskopie za vysokých hydrostatických tlaků, která může poskytnout cenné informace o flexibilitě/kompresibilitě okolí hemu sensorové domény. Flexibilita sensorové domény je jedním z faktorů, které hrají důležitou roli v regulaci enzymové aktivity hemových sensorových proteinů. Spolu s izolovanou sensorovou doménou proteinu *EcDOS* (*EcDOS*-hem) jsme výše uvedenou technikou zkoumali i sensorovou doménu proteinu YddV (YddV-hem) a naměřená data byla využita pro objasnění korelace mezi flexibilitou jejich sensorových domén a enzymovou aktivitou těchto dvou proteinů (kapitola 5.2, str. 181). Z měření bylo zjištěno, že flexibilita izolované PAS domény proteinu *EcDOS* je nižší ve stavu Fe^{2+} (forma asociována se středně aktivním stavem) než ve stavu Fe^{3+} (forma asociovaná s nejméně aktivním stavem). Když je navíc v sensorové doméně na hem vázána molekula CO (forma asociovaná s plně aktivním stavem), dochází k dalšímu poklesu flexibility. To naznačuje, že flexibilita sensorové PAS domény souvisí i s enzymovou aktivitou proteinu, kde aktivnější formy (Fe^{2+} , $\text{Fe}^{2+}\text{-CO}$) vykazují nižší míru flexibility než méně aktivní formy (Fe^{3+}). To je ve shodě s krystalografickou studií proteinu *EcDOS*, která ukazuje, že ve stavu Fe^{2+} je struktura jeho sensorové domény mnohem méně flexibilní než je tomu ve stavu Fe^{3+} [Kurokawa *et al. J. Biol. Chem.* **279**, 20186 /2004/, Park *et al.*

Biochemistry **43**, 2738 /2004/]. Protein YddV-hem byl měřen jen v přítomnosti CO, kdy bylo pozorováno zvýšení flexibility po mutaci Tyr43 a naopak její snížení v případě mutace Leu65. Snížení flexibility v případě Leu65Gln a Leu65Thr pravděpodobně souvisí i s přítomností molekuly vody v aktivním centru (viz také kapitoly 5.3 – 5.5). Korelace výsledků mezi aktivitou a flexibilitou je v případě YddV komplikovanější, jelikož formy Fe^{3+} , Fe^{2+} a Fe^{2+} -CO, nejsou všechny identické z hlediska koordinačního nebo spinového stavu.

Následující kapitoly 5.3 – 5.5 bloku II obsahují souhrn výsledků získaných studiem izolované globinové sensorové domény diguanylátcyklasy YddV. Detailní objasnění interakce sensorové domény se signálem, kterým je většinou ligand iontu železa hemu, souvisí se studiem mechanismu přenosu signálu. Za tímto účelem byla studována distální oblast hemu proteinu YddV-hem, kde k této interakci dochází. Cílem této části práce bylo popsat a charakterizovat vlastnosti jednotlivých mutantních proteinů, u kterých byly zaměněny klíčové aminokyseliny v distální oblasti hemu, konkrétně Leu65, případně Tyr43. V průběhu další práce se ukázalo, že všechny mutantní formy proteinu YddV-hem v místě Leu65 mají tendenci degradovat hem v aktivním centru globinové domény (kapitola 5.3, str. 194) a to dokonce i v nepřítomnosti Na_2S (Na_2S způsoboval u proteinu *EcDOS* s mutací Arg97Ile degradaci hemu na verdohem, viz kapitola 5.1). Po expresi a izolaci YddV-hem s Leu65 nahrazeným jinou aminokyselinou se ukázalo, že tyto proteiny obsahují kromě hemu i různé zastoupení verdohemu, přičemž jeho nejvyšší množství bylo pozorováno u mutantu Leu65Asn. Fyziologicky dochází ke vzniku verdohemu působením hemoxygenasy, za účasti molekuly O_2 a NADPH:cytochrom P450 reduktasy (CPR), která využívá jako zdroj redukčních ekvivalentů molekulu NADPH [Matsui *et al. J. Am. Chem. Soc.* **130**, 4220 /2008/]. Vysoce specifickým meziproduktem této reakce je molekula CO, která může být následně využita i pro kvantifikaci hemoxygenasové reakce. Při pokusech s nativní formou YddV-hem byla odhalena schopnost CPR redukovat tento protein v přítomnosti NADPH za vzniku komplexu Fe^{2+} - O_2 . Na základě tohoto zjištění jsme byli schopni připravit rekonstituovaný systém obsahující CPR a protein YddV-hem Leu65Asn, který byl připraven rekonstitucí apo-formy v roztoku heminu. Tvorba verdohemu tímto systémem byla prokázána měřením absorpčních spekter a na základě množství vyprodukovaného CO. Množství vyprodukovaného CO bylo měřeno i v bakteriálních kulturách exprimujících mutantní proteiny Leu65Asn, Leu65Gln, Leu65Gly, Leu65Met, Leu65Phe, Leu65Tyr. V porovnání s původní formou proteinu byl zaznamenán 3 – 7násobný nárůst

vyprodukovaného CO, kde nejvyšší hodnoty byly pozorovány právě v průběhu exprese mutantu Leu65Asn. Kromě toho bylo detailněji zkoumáno, jaké konkrétní reaktivní formy kyslíku se mohou degradace hemu účastnit. V tomto případě byl sledován vliv superoxidodismutasy, katalasy a peroxidasy na množství vyprodukovaného CO rekonstituovaným systémem. Přidání jednotlivých enzymů do systému způsobilo pokles v množství vyprodukovaného CO, čímž byla potvrzena participace reaktivních forem kyslíku, jako jsou superoxidové radikály nebo peroxidy na hemoxygenasovou reakci YddV-hem Leu65Asn (obr. 7B, str. 39). Přidáním systému xantinoxidasa-xantin (produkce superoxidových radikálů) a peroxidu vodíku k rekonstituovanému systému došlo k zvýšení produkce CO, což nám opět potvrdilo předpoklad o zapojení reaktivních forem kyslíku v tvorbě verdohemu. Na rozdíl od původní formy YddV-hem, která je typická přítomností pentakoordinovaného vysokospinového komplexu iontu železa, vykazují některé jeho Leu65 mutanty spektra pro hexakoordinovaný vysokospinový komplex, kde šestým ligandem je molekula vody (obr. 7A, str. 39) [Nakajima *et al. J. Inorg. Biochem.* **108**, 163 /2012/]. Jak se zdá, právě přítomnost vody v aktivním centru sehrává důležitou roli v destabilizaci navázané molekuly kyslíku, čímž přispívá ke tvorbě reaktivních forem kyslíku a degradaci hemového kofaktoru. Naše závěry tedy potvrzují, že Leu65 v sensorové doméně YddV brání vstupu molekul vody do aktivního centra globinové domény a velkým dílem se podílí na stabilizaci navázané molekuly kyslíku. Na základě těchto získaných výsledků můžeme odvodit i funkci analogické aminokyseliny Leu68 u proteinu AfGcHK (viz blok I, kapitola 4.4).



Obr. 7 Model aktivního místa YddV Leu65Asn s přítomnou molekulou vody a navrhovaný mechanismus tvorby verdohemu u proteinu YddV

(A) V případě, že je Leu65 v distální oblasti hemu nahrazen Asn, je ligandem iontu železa hemu molekula vody. Leu65 tedy zabraňuje vstupu molekuly vody do aktivního centra sensorové domény proteinu YddV. (B) Pravděpodobný mechanismus tvorby verdohemu u proteinů s mutovaným Leu65. Molekula vody může sloužit jako přímý donor protonů za vzniku hydroperoxidu navázaného na iont železa hemu, čímž umožňuje hydroxylaci molekuly hemu a následný vznik verdohemu.

Funkce mnoha hemových sensorových proteinů detekujících plyny závisí i na schopnosti vázat jako axiální ligandy různé molekuly, které se mohou vzájemně zaměňovat, čímž dochází k regulaci enzymové aktivity jejich funkčních domén. Proto je další důležitou otázkou týkající se funkce hemových proteinů, jakým způsobem mohou být ligandy vázané na hem nahrazeny za jiné ligandy vyskytující se v blízkosti hemu. Příkladem proteinu, jehož aktivace je spojena se záměnou axiálního ligandu je protein *EcDOS*. Při vazbě molekuly kyslíku dochází k odstoupení axiálního ligandu Met95 a zvýšení enzymové aktivity proteinu [Park *et al. Biochemistry* **43**, 2738 /2004/]. Do dnešní doby však nebyl znám systém, kde by bylo možné sledovat vzájemnou záměnu dvou rozličných ligandů současně přítomných v okolí hemu. V další kapitole jsme zkoumali metodou ultrarychlé spektroskopie mutantní proteiny YddV-hem v poloze Leu65 (kapitola 5.4, str. 214). Ukázalo se, že po fotodisociaci oxidu dusnatého (= imitace termální disociace ligandu) dochází u mutantu Leu65Gly k velice rychlým spektrálním změnám (~4 ps), které indikují nahrazení molekuly NO jiným ligandem. Jelikož již z předchozích měření víme, že mutace hydrofobního Leu65 má za následek zpřístupnění aktivního centra molekulám vody (kapitola 5.3), znamená to, že právě tato molekula se koordinuje na hem místo disociovaného oxidu dusnatého. Podobný proces např. v případě myoglobinu trvá stovky nanosekund a je limitován difuzí molekuly vody do

aktivního centra proteinu [Cao *et al. Biochemistry* **40**, 5728 /2001/]. To znamená, že v případě Leu65Gly je molekula vody v momentě fotodisociace NO přítomna v těsné blízkosti hemu a kompetuje s ní o vazbu na hem. Kvantitativní analýzou bylo zjištěno, že k tomuto nahrazení dochází asi v 25 % případů. Ve zbylé části pak dochází k opětovné vazbě NO na iont železa molekuly hemu. Proteiny s mutací v poloze Tyr43, vykazují podobná pentakoordinovaná spektra jako nativní (nemutovaná) forma proteinu a rovněž v případě fotodisociace komplexu Fe³⁺-NO nebyla pozorována tvorba komplexu Fe³⁺-H₂O. Dále bylo zjištěno, že aktivační bariéra nahrazení NO molekulou vody je velice nízká (~7x nižší než u myoglobinu), což dále podporuje předpoklad, že molekula vody je společně s NO přítomna v aktivním centru a neputuje do distální části z okolního prostředí. Pro lepší vysvětlení tohoto procesu byla využita simulace molekulové dynamiky, která ukázala, že v případě nativní formy YddV-hem i Leu65Gly se desítky ps po fotodisociaci NO tento ligand nachází ve vzdálenosti přibližně 4 Å od iontu železa. Ovšem, blízkost molekuly vody byla u obou proteinů velice rozdílná, kdy u původní formy byly pozorovány jedna až dvě molekuly vody ve vzdálenosti přibližně 8 Å, zatímco u Leu65Gly to byly v průměru tři až čtyři molekuly, v některých případech vzdálené jen 2 Å. Z těchto zjištění vyplývají nejen důležité poznatky týkající se daného modelového systému, ale také obecné závěry aplikovatelné a využitelné i pro další hemoproteiny interagující s různými ligandy. Při vzájemné záměně ligandů totiž může být rychlost jejich výměny limitována rychlostí termální disociace vazby hem-ligand spíše než hodnotou k_{off} původně navázaného ligandu, která mimo jiné závisí i na pravděpodobnosti, s jakou tento disociovaný ligand opustí aktivní centrum.

Funkce klíčových aminokyselin Tyr43 a Leu65 proteinu YddV-hem byla dále zkoumána pomocí dalších technik, konkrétně infračervené spektroskopie spojené s Fourierovou transformací (FTIR) a časově rozlišené infračervené spektroskopie spojené s Fourierovou transformací (TRS²-FTIR) (kapitola 5.5, str. 229). V předchozí práci Kitanishi a kol., kde byla zkoumána funkce Tyr43 technikou rezonanční Ramanovy spektroskopie [Kitanishi *et al. Biochemistry* **49**, 10381 /2010/] bylo zjištěno, že frekvence vazby Fe-O₂ a Fe-CO v případě Tyr43Phe se výrazně liší od hodnoty pro původní formu YddV-hem. To naznačuje, že Tyr43 vytváří s těmito ligandy vodíkovou vazbu a je tedy důležitý pro jejich stabilizaci v aktivním centru senzorové domény. Na rozdíl od rezonanční Ramanovy spektroskopie je výhodou techniky použité v této práci schopnost sledovat i krátkodobé konformační změny proteinu. Pro studium byly v tomto případě použity kromě nativní formy i mutantní proteiny Tyr43Ala, Tyr43Phe, Tyr43Trp, Leu65Met, Leu65Tyr. Přestože

víme, že sensorový protein YddV funguje jako kyslíkový senzor, pro konkrétní metodické přístupy bývají s výhodou využity i další biatomické plynné molekuly. Zatímco pro předchozí experimenty byla vhodnou modelovou plynnou molekulou molekula NO (kapitola 5.4), pro studie v kapitole 5.5 byla s výhodou použita molekula CO, kdy byl zkoumán vliv výše uvedených mutací na dynamiku proteinu po fotodisociaci této molekuly. Ve FTIR spektru vykazuje molekula CO vázaná proteinem YddV-hem dva konformery s frekvencemi 1962 a 1923 cm^{-1} , zatímco v případě proteinů Tyr43Phe, Tyr43Trp, Leu65Met, a byla pozorována jenom jedna vibrace C-O s hodnotou 1955 cm^{-1} , 1953 cm^{-1} a 1953 cm^{-1} , což poukazuje na signifikantní změnu v distální oblasti hemu po těchto mutacích. V případě mutantu Leu65Thr byla pozorována nižší účinnost fotodisociace, ale nebyla detekována žádná změna ve vibraci C-O. Rovněž nebyly pozorovány odlišné charakteristiky ani v případě mutantu Tyr43Ala, z čehož vyplývá, že tyto specifické mutace zásadním způsobem neovlivňují sílu vazby C-O. Z TRS²-FTIR diferenčních spekter po fotolýze CO byla měřena rychlost zpětné rekombinace molekuly oxidu uhelnatého, která byla v případě mutantů Leu65Met a Leu65Thr mnohem vyšší než v případě původní formy proteinu. Na rozdíl od FTIR, kde u Leu65Thr nebyly pozorovány výraznější odchylky, TRS²-FTIR měření ukazují, že obě mutace mají signifikantní vliv na dynamiku vazby CO na protein, a tedy potvrzují důležitost Leu65 ve vazbě tohoto ligandu. Výsledky dále ukazují, že i když je sensorová doména YddV podobná např. proteinu HemAT, vazba ligandů CO nebo O₂ je u nich velice odlišná [Tarnawski *et al. Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **71**, 2158 /2015/, Zhang a Phillips. *Structure* **11**, 1097 /2003/]. Hlavně konformační změny po disociaci ligandu jsou mnohem pomalejší v případě YddV, zatímco propionáty hemu se chovají po vazbě nebo disociaci ligandu velice podobně.

4. Publikace bloku I

4.1. Gaseous O₂, NO, and CO in signal transduction: structure and function relationships of heme-based gas sensors and heme-redox sensors.

Shimizu T., Huang D., Yan F., **Stranava M.**, Bartosova M., Fojtíková V., Martínková M. *Chem. Rev.* **2015**, 115, 6491. (IF₂₀₁₄ **46,568**)

4.2. Structural characterization of the heme-based oxygen sensor, AfGcHK, its interactions with the cognate response regulator, and their combined mechanism of action in a bacterial two-component signaling system.

Stranava M., Martínek V., Man P., Fojtikova V., Kavan D., Vaněk O., Shimizu T., Martinkova M. *Proteins* 2016, in press. (IF₂₀₁₄ 2,627)

4.3. Kinetic analysis of a globin-coupled histidine kinase, AfGcHK: effects of the heme iron complex, response regulator, and metal cations on autophosphorylation activity.

Fojtikova V., **Stranova M.**, Vos M. H., Liebl U., Hranicek J., Kitanishi K., Shimizu T., Martinkova M. *Biochemistry* **2015**, 54, 5017. (IF₂₀₁₄ **3,015**)

4.4. Effects of hydrogen sulfide on the heme coordination structure and catalytic activity of the globin-coupled oxygen sensor AfGcHK.

Fojtikova V., Bartosova M., Man P., **Stranova M.**, Shimizu T., Martinkova M. *Biometals* **2016**, in press. (IF₂₀₁₄ **2,503**)

5. Publikace bloku II

5.1. Catalytic enhancement of the heme-based oxygen-sensing phosphodiesterase EcDOS by hydrogen sulfide is caused by changes in heme coordination structure.

Yan F., Fojtikova V., Man P., **Stranova M.**, Martínková M., Du Y., Huang D., Shimizu T. *Biometals* **2015**, 28, 637. (IF₂₀₁₄ **2,503**)

5.2. Pressure effects reveal that changes in the redox states of the heme iron complexes in the sensor domains of two heme-based oxygen sensor proteins, EcDOS and YddV, have profound effects on their flexibility.

Anzenbacher P., Marchal S., Palacký J., Anzenbacherová E., Domaschke T., Lange R., Shimizu T., Kitanishi K., **Stranava M.**, Stiborová M., Martinkova M. *FEBS J.* **2014**, 281, 5208. (IF₂₀₁₄ **4,001**)

5.3. Introduction of water into the heme distal side by Leu65 mutations of an oxygen sensor, YddV, generates verdoheme and carbon monoxide, exerting the heme oxygenase reaction.

Stranava M., Martínková M., Stiborová M., Man P., Kitanishi K., Muchová L., Vitek L., Martínek V., Shimizu T. *J. Inorg. Biochem.* 2014, 140, 29. (IF₂₀₁₄ 3,444)

5.4. Ultrafast spectroscopy evidence for picosecond ligand exchange at the binding site of a heme protein: heme-based sensor YddV.

Lambry J. C., **Stranova M.**, Lobato L., Martinkova M., Shimizu T., Liebl U., Vos M. H. *J. Phys. Chem. Lett.* **2016**, 7, 69. (IF₂₀₁₄ 7,458)

5.5. Probing the ligand recognition and discrimination environment of the globin-coupled oxygen sensor protein YddV by FTIR and time-resolved step-scan FTIR spectroscopy.

Pavlou A., Martínková M., Shimizu T., Kitanishi K., **Stranova M.**, Loullis A., Pinakoulaki E. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2015**, 17, 17007. (IF₂₀₁₄ **4,493**)

6. Závěr

Předkládaná disertační práce shrnuje výsledky získané studiem celkem tří hemových senzorových proteinů detekujících kyslík a to *AfGcHK*, *YddV*, *EcDOS* a dále proteinu *RR*, který je interakčním partnerem *AfGcHK*. Mezi hlavní cíle této práce patřilo popsání intraproteinového/interdoménového (*AfGcHK*, *YddV*, *EcDOS*) a interproteinového přenosu signálu (*AfGcHK*-*RR*) a funkční charakterizace tohoto systému z hlediska enzymové aktivity za různých koordinačních nebo redoxních stavů *AfGcHK*. Pozornost byla dále věnována popisu funkce klíčových aminokyselin v distální části hemu a tím na samotný proces identifikace signálu proteinů *AfGcHK* (Tyr45, Leu68), *YddV* (Tyr43, Leu65), *EcDOS* (Met95, Arg97). Nejdůležitější výsledky disertační práce jsou shrnuty v následujících bodech:

Výsledky získané ze studia intraproteinového/interdoménového přenosu signálu lze shrnout následovně:

- Aktivní formy *AfGcHK*, charakteristické přítomností hexakoordinovaného iontu železa molekuly hemu, vykazují velice podobné hodnoty V_{\max}^{ATP} , což pravděpodobně značí, že tyto stavy mají rovněž podobné konformace odpovědné za optimální aktivitu proteinu. U stavu $\text{Fe}^{2+}\text{-CO}$, bylo pozorováno výrazné snížení afinity k ATP v porovnání se stavem Fe^{3+} .
- Inaktivní stavy *AfGcHK* vykazují nižší hodnoty V_{\max}^{ATP} a také nižší afinitu vůči ATP v porovnání se stavem Fe^{3+} .
- Protein *EcDOS* vykazoval korelaci mezi aktivitou jeho funkční domény a flexibilitou jeho senzorové PAS domény, kdy flexibilita senzorové domény nejméně aktivní formy obsahující iont železa hemu ve stavu Fe^{3+} byla vyšší než flexibilita senzorové domény aktivních forem obsahujících iont železa hemu ve stavech Fe^{2+} , $\text{Fe}^{2+}\text{-CO}$.

Studiem interproteinového přenosu signálu byly získány tyto výsledky:

- Histidinkinasa *AfGcHK* je v roztoku přítomna ve formě dimeru, zatímco její interakční partner *RR* protein se vyskytuje především jako monomer.
- Komplex *AfGcHK*-*RR* je transientní, s vysokou rychlostí disociace ($k_{\text{off}} \geq 10^{-3}\text{s}^{-1}$), kde K_d pro komplex dimeru *AfGcHK* s jednou molekulou *RR* je přibližně 18 μM a pro komplex 2:2 přibližně 158 μM .

- Interakční rozhraní komplexu *AfGcHK-RR* tvoří helixy H8 a H9 dimerizační domény *AfGcHK* a helixy H1 a H5 regulační domény 1 *RR* proteinu.
- *AfGcHK* vykazuje v přítomnosti *RR* proteinu sníženou afinitu vůči ATP, což naznačuje, že se *RR* protein váže do blízkosti vazného místa pro ATP v proteinu *AfGcHK*.

Nejdůležitější poznatky ze studia interakce různých sensorových domén se signálem jsou následující:

- Leu65 proteinu *YddV* je klíčovou aminokyselinou ve stabilizaci navázané molekuly kyslíku, kdy zabraňuje vstupu molekuly vody do distální oblasti hemu.
- Proteiny *YddV* s mutovaným Leu65 vykazují zvýšenou tvorbu verdohemu, za což jsou odpovědné reaktivní formy kyslíku (především superoxidové radikály a peroxidy), jejichž vznik je spojen právě s přítomností molekuly vody v distální oblasti hemu.
- Pokud protein *YddV*-hem Leu65Gly interaguje s NO, dochází po fotodisociaci této signální molekuly k její velice rychlé (~4 ps) záměně za molekulu vody. To znamená, že molekula vody je společně s NO přítomna v distální oblasti hemu.
- Leu65 proteinu *YddV* je rovněž důležitý pro vazbu molekuly CO, kdy mutace v tomto místě měly za následek zvýšení rychlosti zpětné rekombinace CO s molekulou hemu.
- Koordinace iontu SH^- na iont železa hemu nemá vliv na enzymovou aktivitu *AfGcHK* v porovnání s formou Fe^{3+} . Některé mutanty Leu68 však v přítomnosti Na_2S degradovaly hem za tvorby verdohemu.
- Vazba SH^- na iont železa hemu PAS domény proteinu *EcDOS* vede k nárůstu jeho enzymové aktivity. V případě mutantu Arg97Ile dochází v přítomnosti Na_2S k tvorbě verdohemu.