

UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie

Doktorský studijní program: Biochemie



RNDr. Alžběta Lengálová

Studium struktury a funkce modelových hemových proteinů

Structure and function relationships of model hemoproteins

DISERTAČNÍ PRÁCE

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

Praha 2020

Prohlášení:

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

V Praze, dne

Poděkování:

Ráda bych touto cestou poděkovala své školitelce doc. RNDr. Markétě Martínkové, Ph.D. za odborné vedení, ochotu a cenné rady při řešení této disertační práce, za nesmírně laskavý a lidský přístup a veškerou poskytnutou pomoc v průběhu celého mého studia. Děkuji také Mgr. Martinovi Stráňavovi, Ph.D. a RNDr. Veronice Proškové, Ph.D. za objasnění experimentálních přístupů a pomoc při plánování experimentů. Velký dík patří i Mgr. Jakubovi Vávrovi za pomoc při experimentech a vytvoření přátelského prostředí v laboratoři 217. Děkuji také kolegům z Biotechnologického a biomedicínského centra Akademie věd a Univerzity Karlovy (RNDr. Petr Man, Ph.D., RNDr. Petr Pompach, Ph.D. a Mgr. Pavla Vaňková) za hmotnostně-spektrometrická měření a pomoc při vyhodnocování výsledků vodík-deuteriové výměny. Dále děkuji doc. RNDr. Miroslavovi Šulcovi, Ph.D. za pomoc při provedení experimentů analytické ultracentrifugace, RNDr. Olívii Petřalské, Ph.D. za hodnotné rady při zpracování a interpretaci výsledků analytické ultracentrifugace a RNDr. Jakubovi Hraníčkoví, Ph.D. za provedení měření atomové absorpční spektrometrie. V neposlední řadě bych ráda poděkovala své rodině za všestrannou podporu a pomoc v průběhu mého studia a všem členům katedry biochemie za vytvoření příjemného pracovního prostředí.

Abstrakt

Hem je jedním z nejdůležitějších a nejlépe prostudovaných kofaktorů potřebných pro správné fungování mnoha proteinů. Proteiny obsahující hem tvoří obrovskou skupinu biologicky významných molekul, které se účastní mnoha fyziologických procesů. Předkládaná disertační práce se věnuje dvěma skupinám hemových sensorových proteinů, a to prokaryotickým hemovým sensorům plyných molekul a eukaryotickým sensorům detekujících hem. Hemové senzory, které detekují plynné molekuly, hrají důležitou roli v regulaci mnoha bakteriálních procesů a jsou obvykle tvořeny dvěma doménami, doménou sensorovou a doménou funkční. Disertační práce se zaměřuje na studium dvou zástupců ze skupiny bakteriálních sensorů detekujících plyny, histidinkinasy *AfGcHK* a diguanylátcyklasy *YddV*. Hlavním cílem práce bylo objasnit mechanismus mezidoménového přenosu signálu u těchto dvou modelových hemových sensorů. Za pomoci rentgenové krystalografie a metody vodík-deuteriové výměny v kombinaci s hmotnostní spektrometrií byly odhaleny významné rozdíly ve struktuře proteinu *AfGcHK* při přechodu z jeho aktivní na neaktivní formu. Příjem určitého signálu sensorovou doménou *AfGcHK* ovlivní strukturální vlastnosti proteinu, a tyto konformační změny mají pak nepřímý vliv na enzymovou aktivitu domény funkční. Disertační práce se dále detailněji věnuje vlivu uspořádání dimerizačního rozhraní na přenos signálu mezi sensorovou a funkční doménou. V případě, že je dimerizace sensorové domény narušena, je ovlivněna schopnost proteinu signál dál přenést, a protein tak ztrácí svou enzymovou aktivitu. Jak změny v sensorové doméně proteinu ovlivňují jeho katalytickou aktivitu v případě druhého studovaného senzoru, diguanylátcyklasy *YddV*, nám pomohla objasnit detailní kinetická analýza. Tato studie odhalila, že katalytická aktivita výrazně závisí na redoxním a ligandovém stavu iontu železa hemu. Analýza oligomerních stavů pak ukázala, že *YddV* tvoří v roztoku převážně dimery a jeho neaktivní mutantní forma *H98A* má tendenci vytvářet oktamery. Tyto výsledky naznačují, že správný oligomerní stav je, podobně jako v případě *AfGcHK*, pro optimální funkci proteinu klíčový. Součástí disertační práce je také souhrnná publikace, která se zabývá eukaryotickými hemovými senzory a přehledně shrnuje nově objevenou roli hemu jako signální molekuly.

Klíčová slova

AfGcHK, *Bach1*, dimerizační rozhraní, hem, hemové sensorové proteiny, HRI, přenos signálu, *YddV*

Abstract [IN CZECH]

Heme is one of the most important and most studied cofactors that are essential for proper function of many proteins. Heme-containing proteins comprise of a large group of biologically important molecules that are involved in many physiological processes. The presented dissertation is focused on two groups of heme sensor proteins, namely prokaryotic heme-based gas sensors and eukaryotic heme-responsive sensors. Heme-based gas sensors play an important role in regulation of many bacterial processes and consist usually of two domains, a sensor domain and a functional domain. The dissertation thesis aims at the study of two model bacterial heme-based gas sensors, histidine kinase *AfgCHK* and diguanylate cyclase *YddV*, in order to elucidate their mechanism of interdomain signal transduction. Using X-ray crystallography and hydrogen-deuterium exchange coupled to mass spectrometry approaches, significant differences in the structure of the *AfgCHK* protein between the active and inactive forms were described. The signal detection by the *AfgCHK* sensor domain affects the structural properties of the protein, and these conformational changes then have indirect impact on the enzyme activity of the functional domain. Further, the dissertation pays more attention to the effect of a sensor domain dimerization interface arrangement on a signal transduction. When the dimerization of the sensor domain is disrupted, the ability of the subsequent signal transduction is affected, and the protein thus loses its enzyme activity. A detailed kinetic analysis helped us to reveal how changes in the sensor domain of the protein affect its catalytic activity in the case of the second studied protein, the diguanylate cyclase *YddV*. This study showed that the catalytic activity depends significantly on the redox and ligand state of the heme iron. Analysis of oligomeric states then exposed that *YddV* forms dimers in solution and its inactive mutant form H98A tends to form octamers. These results suggest that the oligomeric state is crucial for optimal protein function, as in the case of *AfgCHK*. The dissertation thesis contains also a comprehensive review which focuses on eukaryotic heme-based sensors and summarizes the newly discovered role of heme as a signal molecule.

Keywords [IN CZECH]

AfgCHK, *Bach1*, dimerization interface, heme, heme-based sensor proteins, HRI, signal transduction, *YddV*

OBSAH

<i>Seznam zkratk</i>	7
1 Teoretický úvod	9
1.1 Prokaryotické hemové senzory plynných molekul	11
1.1.1 Kinasa <i>AfGCHK</i>	11
1.1.2 Diguanylátcyklasa <i>YddV</i>	13
1.2 Eukaryotické sensorové proteiny detekující hem	14
1.2.1 Kinasa HRI	14
1.2.2 Transkripční faktor <i>Bach1</i>	15
2 Cíle disertační práce	18
3 Komentář a diskuze k souboru publikací	19
3.1 Prokaryotické kyslíkové senzory <i>AfGCHK</i> a <i>YddV</i>	19
3.2 Eukaryotické senzory hemu <i>Bach1</i> a HRI	32
4 Soubor publikací	41
4.1 Coordination and redox state-dependent structural changes of the heme-based oxygen sensor <i>AfGCHK</i> associated with intraprotein signal transduction	42
4.2 Disruption of the dimerization interface of the sensing domain in the dimeric heme-based oxygen sensor <i>AfGCHK</i> abolishes bacterial signal transduction	58
4.3 Kinetic analysis of a globin-coupled diguanylate cyclase, <i>YddV</i> : Effects of heme iron redox state, axial ligands, and heme distal mutations on catalysis	78
4.4 Heme: emergent roles of heme in signal transduction, functional regulation and as catalytic centres	89
5 Závěr	125
<i>Seznam použité literatury</i>	127

Seznam zkratek

A/GcHK	histidinkinasa s globinovou strukturou senzoroové domény bakterie <i>Anaeromyxobacter</i> sp. Fw 109-5 (z angl. názvu <i>Anaeromyxobacter</i> sp. Fw109-5 <u>g</u> lobin- <u>c</u> oupled <u>h</u> istidine <u>k</u> inase)
Bach1	transkripční faktor se strukturou leucinového zipu (akronym z angl. <u>B</u> TB domain and <u>C</u> NC <u>h</u> omolog <u>1</u>)
BTB	jedna z domén proteinu Bach1 (z angl. pojmenování <u>B</u> road-complex, <u>T</u> ramtrack, <u>B</u> ric-à- <u>B</u> rac domain)
bZIP	jedna z domén proteinu Bach1 (z angl. <u>b</u> asic leucine <u>z</u> ipper transcription factors)
c-di-GMP	cyklický diguanosin-5'-monofosfát
CNC	název rodiny transkripčních faktorů (z angl. pojmenování <u>C</u> ap' <u>n</u> ' <u>c</u> ollar)
CP-motiv	strukturní motiv dipeptidu cystein-prolin
EcDOS	fosfodiesterasa s PAS strukturou senzoroové domény bakterie <i>Escherichia coli</i> (z angl. názvu <i>Escherichia coli</i> <u>d</u> irect <u>o</u> xxygen sensor)
eIF2 α	eukaryotický iniciační faktor 2 podjednotka α
Fe ^{II}	protoporfyrin XI v komplexu s iontem železa ve stavu Fe ^{II}
Fe ^{III}	protoporfyrin XI v komplexu s iontem železa ve stavu Fe ^{III}
Fe ^{III} -CN ⁻	protoporfyrin XI v komplexu s iontem železa ve stavu Fe ^{III} s navázaným ligandem CN ⁻
Fe ^{III} -imidazol	protoporfyrin XI v komplexu s iontem železa ve stavu Fe ^{III} s navázaným ligandem imidazolem
Fe ^{III} -OH ⁻	protoporfyrin XI v komplexu s iontem železa ve stavu Fe ^{III} s navázaným ligandem OH ⁻
Fe ^{II} -O ₂	protoporfyrin XI v komplexu s iontem železa ve stavu Fe ^{II} s navázanou molekulou kyslíku
FLAG-tag	purifikační polypeptidová značka se sekvencí DYKDDDDK
GTP	guanosintrifosfát
HDX-MS	vodík-deuteriová výměna v kombinaci s hmotnostní spektrometrií
His-tag	purifikační polypeptidová značka se sekvencí HHHHHH
HO-1	hemoxygenasa 1

HRI	inhibitor, který je regulován hemem (z angl. <u>h</u> eme- <u>r</u> egulated <u>i</u> nhibitor)
IC ₅₀	poloviční inhibiční koncentrace
K _d	disociační konstanta
K _m	Michaelisova konstanta
<i>l</i> -di-GMP	lineární diguanosinmonofosfát
MafK	svalovoaponeurotický fibrosarkomový (angl. <u>m</u> usculo <u>a</u> poneurotic <u>f</u> ibrosarcoma) transkripční faktor typu <u>K</u>
MBP	maltosu vázající protein (z angl. <u>m</u> altose <u>b</u> inding <u>p</u> rotein)
PAS	strukturní motiv prostorového uspořádání proteinů (akronym odvozený z angl. názvů tří proteinů, ve kterých se tento strukturní motiv vyskytuje: <u>p</u> eriod circadian protein, <u>a</u> ryl hydrocarbon receptor nuclear translocator protein, <u>s</u> ingle-minded protein)
RR protein	protein označovaný jako regulátor odpovědi (z angl. <u>r</u> esponse <u>r</u> egulator protein)
V _{max}	maximální rychlost enzymové reakce
wt	přirozená forma proteinu (z angl. <u>w</u> ild- <u>t</u> ype)
YddV	diguanylátcyklasa s globinovou strukturou senzorové domény bakterie <i>Escherichia coli</i>

1. Teoretický úvod

Proteiny obsahující hem si v posledních desetiletích získávají stále větší pozornost vědeckých skupin po celém světě. Vědecký zájem o hemové proteiny je zcela opodstatněný, neboť tyto proteiny tvoří obrovskou skupinu biologicky významných molekul a nacházejí se ve všech známých živých organismech [Rodgers 1999, Shimizu 2015]. Hem (komplex protoporphyrinu IX s iontem železa) je jedním z nejdůležitějších a nejlépe prostudovaných kofaktorů potřebných pro správné fungování mnoha proteinů a enzymů [Kadish 2010]. Hem je sám o sobě prakticky nerozpustný ve vodných roztocích a je toxický [Roumenina 2016]. Jeho toxicita spočívá zejména v tvorbě reaktivních forem kyslíku, které vznikají při reakci peroxidu vodíku s ionty železa uvolněných ze struktury hemu. Koncentrace volného hemu v buňkách musí být proto přísně regulována a udržuje se na velmi nízké koncentraci. V cytosolu kvasinek je například koncentrace volného hemu 20–40 nM [Hanna 2018].

Prototypické hemové proteiny, které obsahují ve své molekule vázaný hem, plní mnoho důležitých fyziologických funkcí, například přenáší kyslík (hemoglobin), „skladují“ kyslík (myoglobin), aktivují molekulární kyslík (cytochromy P450, peroxidasy, katalasy), přenáší elektrony (cytochromy c) a mají mnoho dalších rolí zásadních pro přežití organismu. Hem tvoří v těchto modelových hemových proteinech katalytické nebo funkční centrum [Tsiftoglou 2006, Guengerich 2018, Huang 2018, Kadish 2010].

Kromě těchto prototypických a všeobecně známých funkcí hemového komplexu se postupně objevují další a další důležité role hemu. Hem sám o sobě může regulovat četné fyziologické procesy u mnoha organismů včetně člověka. Tyto nově objevené úlohy hemu jsou zprostředkovány skupinou hemoproteinů označovaných jako **hemové senzorové proteiny**. V takových proteinech může hem fungovat jako místo detekce plyných molekul (tj. místo detekce signálu) nebo může být hem sám o sobě primárním signálem [Igarashi 2008a, Igarashi 2010, Martinkova 2013, Shimizu 2015]. Hemové senzorové proteiny tak můžeme rozdělit do dvou skupin, (1) „HEMOVÉ SENZORY PLYNŮ“ (hemové proteiny, které detekují plyné molekuly) a (2) „SENZORY HEMU“ (senzorové proteiny detekující hem).

První skupinu (HEMOVÉ SENZORY PLYNŮ) tvoří proteiny, které mají hem relativně pevně vázán ve své struktuře (a za normálních okolností prakticky nemůže hem z molekuly proteinu disociovat). Hem je v těchto proteinech místem detekce

plynných molekul, např. O₂, NO, CO. Pro hemové senzory plynů platí, že jejich funkce (nejčastěji fosfodiesterasová, diguanylátcyklasová nebo histidinkinasová aktivita) je mimo jiné aktivována nebo deaktivována v závislosti na tom, zda je na hem v sensorové doméně proteinu vázána molekula plynu či nikoli. Hem tak nepřímo, prostřednictvím vazby plynu, reguluje mnoho fyziologických funkcí [Girvan 2013, Shimizu 2015, Martinkova 2013, Sawai 2018, Kang 2019, Igarashi 2008a, Igarashi 2010]. Do této skupiny hemových sensorů patří dva prokaryotické proteiny, které byly studovány v rámci této disertační práce, histidinkinasa AfGcHK z bakterie *Anaeromyxobacter* sp. Fw109-5 a diguanylátcyklasa YddV z bakterie *Escherichia coli*. Prokaryotické hemové senzory poskytují bakteriím unikátní možnosti jak průběžně sledovat složení jejich okolí a regulovat vnitrobuněčné procesy tak, aby se přizpůsobily měnícím se podmínkám [Martinkova 2013, Shimizu 2015].

V případě druhé skupiny hemových sensorů (SENZORY HEMU) funguje molekula hemu jako první signál a protein plní svou funkci v závislosti na dostupnosti volného hemu v okolí. Senzory hemu regulují řadu významných fyziologických funkcí, např. transkripci a translaci některých proteinů, fosforylaci a degradaci proteinů, otevírání draslíkových kanálů apod. [Shimizu 2015, Martinkova 2013, Igarashi 2008a, Igarashi 2010]. Vazba hemu na tyto proteiny (nebo naopak disociace hemu z molekuly proteinu) způsobí aktivaci/deaktivaci těchto funkcí. Poškození popsaného systému signalizace a regulace může být spojována s výskytem vážných onemocnění [Igarashi 2008a, Igarashi 2010]. Do skupiny sensorových proteinů detekujících hem řadíme také dva eukaryotické proteiny, kterými se předkládaná disertační práce zabývá. Jsou jimi transkripční faktor Bach1 a kinasa HRI.

Hemové sensorové proteiny z obou skupin mají vždy nejméně dvě domény: **senzorovou** (většinou N-terminální) doménu a **funkční** (většinou C-terminální) doménu [Igarashi 2008a, Igarashi 2010, Martinkova 2013, Shimizu 2015]. Hem je umístěn v sensorové doméně, kde je místem detekce signálu, příp. je sám signálem a se sensorovou doménou reverzibilně interaguje. Signál je přenesen z domény sensorové na doménu funkční, kde způsobí takové strukturní změny, které vedou ke zvýšení nebo snížení aktivity tohoto proteinu [Martinkova 2013, Shimizu 2015, Walker 2017, Igarashi 2008a, Igarashi 2010]. Strukturně-funkční vztahy, mechanismus komunikace mezi těmito doménami a přenos signálu z jedné domény na druhou však zatím nejsou zcela objasněny. Pro práci se sensorovými proteiny obsahujícími hem je potřeba tyto mechanismy vysvětlit.

1.1 PROKARYOTICKÉ HEMOVÉ SENZORY PLYNNÝCH MOLEKUL

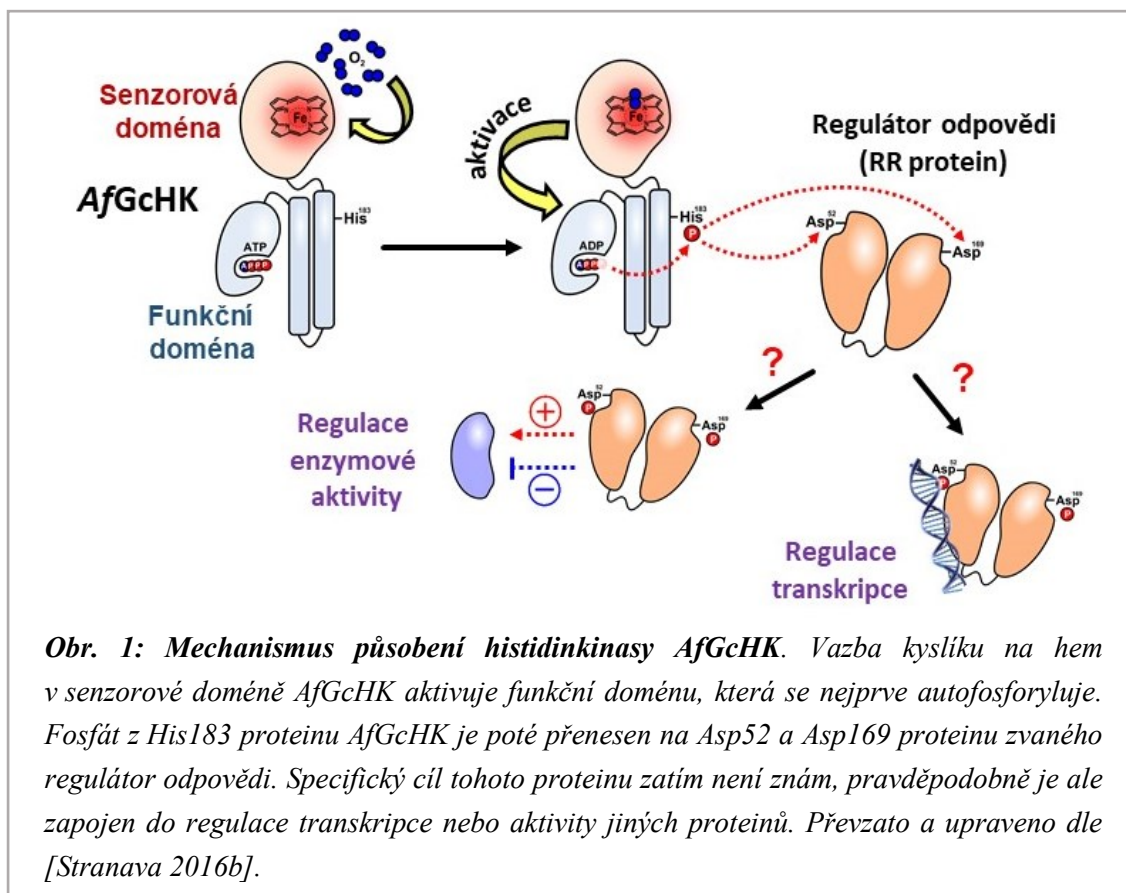
V naší laboratoři se v posledních letech podařilo přispět k charakterizaci a vysvětlení strukturně-funkční vztahů a přenosu signálu v případě několika modelových prokaryotických hemových sensorových proteinů detekujících plynné molekuly [Du 2013, Stranava 2014, Yan 2015, Pavlou 2015, Fojtikova 2015, Lambry 2016, Stranava 2016a, Fojtikova 2016]. Prokaryotické senzory plyných molekul umožňují patogenním bakteriím měnit jejich stádium a virulenci, napomáhají jim vytvářet biofilmy apod., a jsou tudíž jedinečným cílem pro vývoj nových antibiotik a informace o nich jsou velmi důležité pro lidské zdraví.

1.1.1 Kinasa *AfGcHK*

Protein *AfGcHK* (z anglického názvu *g*lobin-*c*oupled *h*istidine *k*inase from *A*naeromyxobacter sp. *F*w109-5) je hemový senzor detekující kyslík, který se nachází v půdní bakterii *Anaeromyxobacter* sp. Fw109-5. *AfGcHK* sestává z N-terminální (globinové, sensorové) domény, která obsahuje hem, a C-terminální (kinasové, funkční) domény, která zodpovídá za enzymovou (autofosforylační) aktivitu proteinu. Dvouatomová molekula kyslíku se váže na ion hemového železa (Fe^{II}) v sensorové globinové doméně, což vede k významnému zvýšení autofosforylační aktivity jeho kinasové domény za pomoci mezidoménového přenosu signálu (obr. 1, str. 12). Dochází k fosforylaci His183 v C-terminální doméně *AfGcHK*, přičemž fosfát je následně přenesen z His183 histidinkinasy *AfGcHK* na Asp52 a Asp169 jiného proteinu nazývaného regulátor odpovědi, RR protein (z angl. *r*esponse *r*egulator). Enzymová aktivita hemového senzoru *AfGcHK* tedy závisí na dostupnosti kyslíku [Gushchin 2017, Abriata 2017, Willett 2017, Zschiedrich 2016, Kitanishi 2011, Martinkova 2013].

Protein *AfGcHK* již byl částečně charakterizován [Kitanishi 2011, Stranava 2016a, Fojtikova 2015], stále však zůstává nevyřešeno několik otázek týkajících se jeho funkce a přesného mechanismu působení. Doposud není například zcela jasné, jak je signál přenášen mezi sensorovou a funkční doménou. Protein *AfGcHK* se vyskytuje v půdní bakterii, která sama o sobě nemá přímou vazbu na lidské zdraví, tedy nezpůsobuje žádnou lidskou nemoc, a *AfGcHK* tedy není vzhledem k jeho biologické funkci tolik atraktivní. Přesto však je tento senzor dobrým modelovým proteinem dvousložkových signalizačních systémů, které jsou spojovány s tvorbou

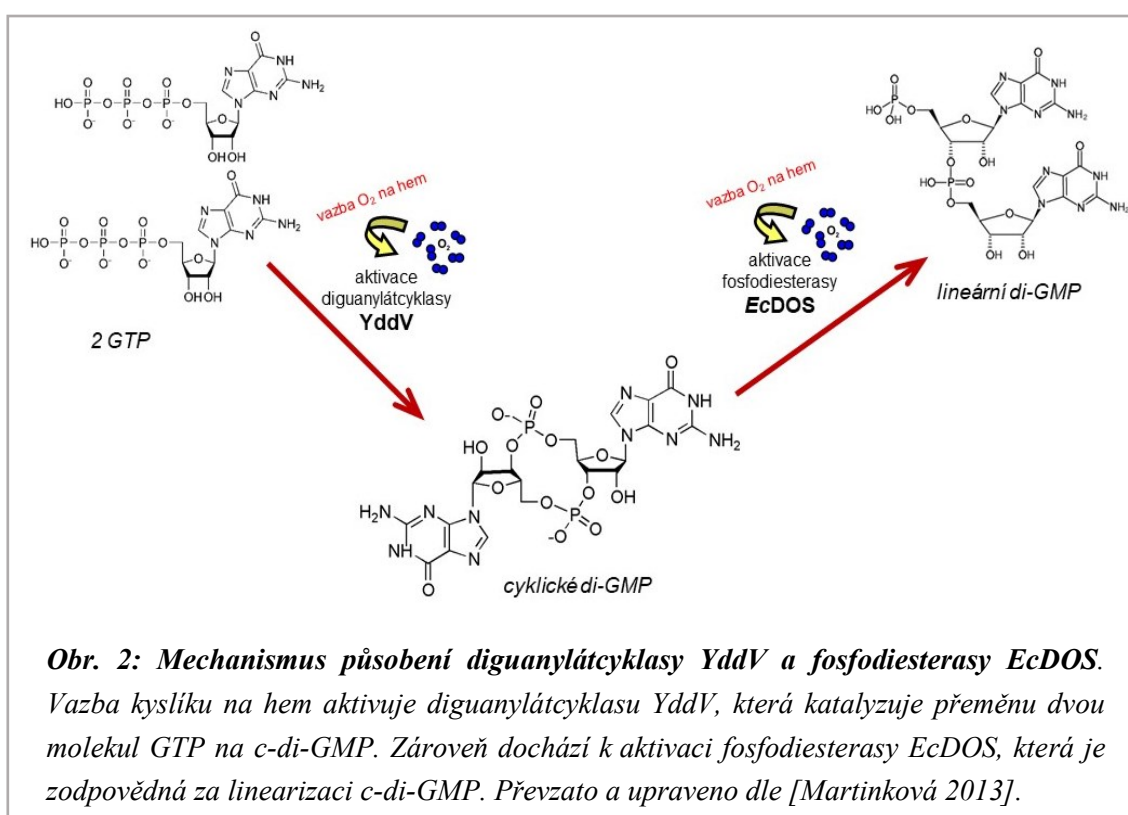
biofilmu a virulencí některých patogenních bakterií [Shimizu 2015, Kitanishi 2011, Martinkova 2013]. Hlubší pochopení mechanismu účinku proteinu *AfGcHK* by mohlo být přímo aplikovatelné na analogické systémy patogenních bakterií, a umožnit tak kontrolu a potlačení patologických procesů způsobených těmito bakteriemi.



Na ion hemového železa v sensorové doméně *AfGcHK* se vedle kyslíku (komplex $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-O}_2$) mohou vázat i další malé molekuly, a vytvářet tak různé stavy, z nichž některé tvoří aktivní formy kinasy *AfGcHK* a jiné jsou formami neaktivními. Kromě komplexu hemu s kyslíkem ($\text{Fe}^{\text{II}}\text{-O}_2$) jsou s aktivní formou asociovány také stavy $\text{Fe}^{\text{III}}\text{-CN}^-$ a $\text{Fe}^{\text{III}}\text{-OH}^-$ [Fojtikova 2015]. Kinasa *AfGcHK* je neaktivní, je-li hemové železo ve stavu Fe^{II} bez navázaného ligandu, případně pokud v molekule proteinu hem chybí úplně. To naznačuje, že strukturní změny v blízkosti vazebného místa hemu v globinové doméně jsou úzce spjaty s regulací enzymové aktivity kinasové domény prostřednictvím meziproteinového přenosu signálu [Fojtikova 2015].

1.1.2 Diguanylátcyklasa YddV

Druhým prokaryotickým hemoproteinem, na který se disertační práce zaměřuje, je protein YddV (neboli *EcDosC*), což je hemový senzor detekující kyslík s diguanylátcyklasovou aktivitou z bakterie *Escherichia coli* [Tuckerman 2009, Kitanishi 2010, Tarnawski 2015]. Cyklický diguanosin-5'-monofosfát (*c*-di-GMP) je důležitou molekulou signalizačních drah (tzv. druhý posel) bakterií a reguluje řadu klíčových fyziologických funkcí, jako je např. pohyb bakterií, jejich vývoj, virulence, tvorba biofilmu, mezibuněčná komunikace nebo odolnost vůči okolnímu prostředí [Schirmer 2009, Tuckerman 2011].



Obr. 2: Mechanismus působení diguanylátcyklasy YddV a fosfodiesterasy EcDOS. Vazba kyslíku na hem aktivuje diguanylátcyklasu YddV, která katalyzuje přeměnu dvou molekul GTP na *c*-di-GMP. Zároveň dochází k aktivaci fosfodiesterasy EcDOS, která je zodpovědná za linearizaci *c*-di-GMP. Převzato a upraveno dle [Martinková 2013].

Protein YddV se skládá z N-terminální domény vázající hem, která má globinovou strukturu a je doménou detekující signál (plynný kyslík), a C-terminální funkční domény, která je zodpovědná za katalýzu přeměny guanosintrifosfátu (GTP) na *c*-di-GMP. Diguanylátcyklasa YddV pracuje společně s fosfodiesterasou *EcDOS* (neboli *EcDosP*), která je také hemovým senzorem detekujícím kyslík a katalyzuje konverzi cyklického di-GMP na lineární di-GMP (*l*-di-GMP) [Tuckerman 2009, Tanaka 2008]. Vazba kyslíku na hem v sensorové doméně diguanylátcyklasy YddV způsobí zvýšení jeho enzymové aktivity, a podporuje tak přeměnu GTP na *c*-di-GMP (obr. 2). Podobně kyslík vázaný na hem sensorové domény fosfodiesterasy *EcDOS* má

také za následek jeho aktivaci a vzniklé *c*-di-GMP je přeměňováno na *l*-di-GMP [Tagliabue 2010]. Pravděpodobně je tak regulována syntéza signální molekuly *c*-di-GMP tak, aby se v případě primárního podnětu (zvýšení koncentrace O₂) nehromadila a byla rychle po svém vzniku a požadovaném působení opět degradována.

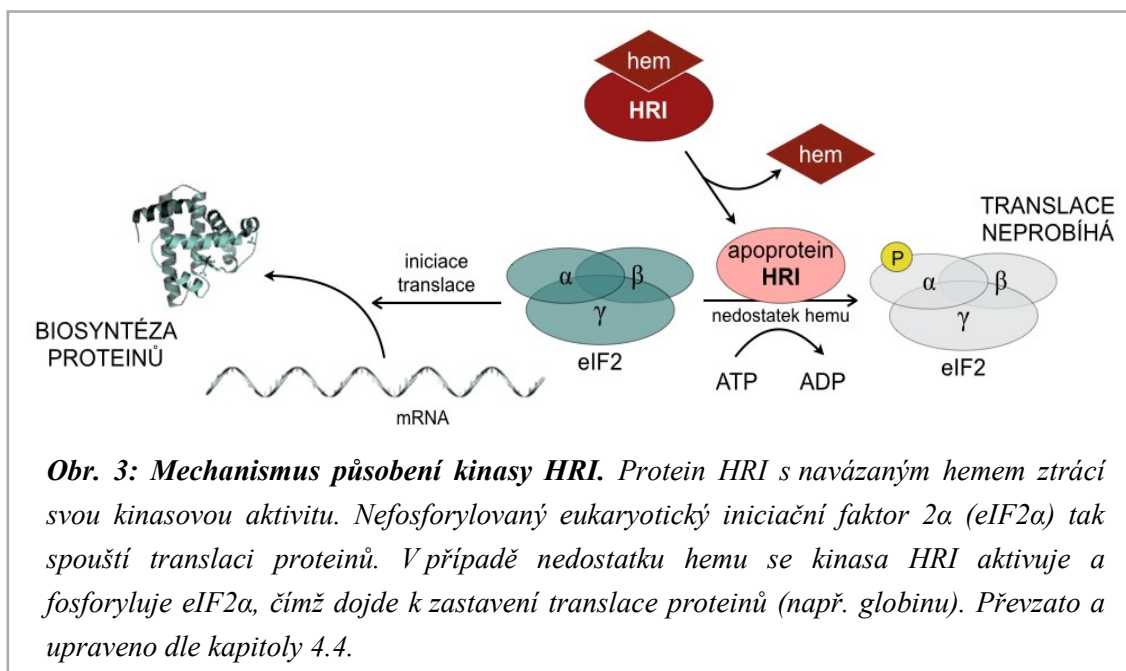
Podobně jako v případě histidinkinasy *AfGcHK* byly strukturně funkční vztahy diguanylátcyklasy YddV v minulosti podrobně studovány [Tarnawski 2015, Lambry 2016, Pavlou 2015, Stranava 2014]. Z důvodu problematické přípravy aktivního plnodélkového proteinu YddV bylo možné provést pouze předběžné kinetické analýzy. Tyto studie ukázaly, že neaktivnější je protein YddV, pokud je jeho hemové železo ve stavu Fe^{III}. Je-li ve stavu Fe^{II}-O₂ a Fe^{II}-CO, je enzym o něco méně aktivní a nejméně aktivní formou je stav Fe^{II}. Tyto výzkumy však hodnotily enzymovou aktivitu pouze z hlediska počáteční rychlosti tvorby produktu (v mikromolech *c*-di-GMP na mikromol YddV za minutu) [Tuckerman 2009, Kitanishi 2010, Tarnawski 2015].

1.2 EUKARYOTICKÉ SENZOROVÉ PROTEINY DETEKUJÍCÍ HEM

Aby naše znalosti o sensorových hemoproteinech byly ucelené a kompletní, je potřeba věnovat pozornost také eukaryotickým sensorovým proteinům, které detekují hem. Exprese a purifikace těchto proteinů a manipulace s nimi je však mnohem náročnější, což je také důvod, proč se těmito proteiny zabývá jen několik málo vědeckých skupin.

1.2.1 Kinasa HRI

Senzorový hemoprotein HRI (z *angl.* heme-regulated inhibitor), označovaný také jako „inhibitor, který je regulován hemem“, je kinasou eukaryotického iniciačního faktoru 2 α (eIF2 α). Jedná se o jeden z nejvýznamnějších hemových sensorových proteinů důležitých pro přežití eukaryotické buňky za stresových podmínek. Funkční doména HRI má kinasovou aktivitu, jejím substrátem je eIF2 α a její aktivita závisí na množství hemu. Tento enzym je aktivní pouze v nepřítomnosti hemu (*obr. 3, str. 15*). Vazba hemu na HRI způsobí strukturní změny, které vedou k inhibici enzymové aktivity tohoto proteinu [Miksanova 2006, Martinkova 2007, Hirai 2007, Igarashi 2008b].



Protein HRI svou kinasovou aktivitou reguluje proteosyntézu. Aby eukaryotické buňky byly schopné přežít za stresových podmínek (nedostatek aminokyselin, vystavení UV záření, virová infekce, akumulace denaturovaných proteinů nebo nedostatek hemu), sníží celkovou rychlost syntézy proteinů. Inhibice proteosyntézy je zprostředkována fosforylací Ser51 v eIF2 α kinasami, které specificky reagují na stres [Mathews 2007, Wek 2006, Hinnebusch 2005, Connor 2005]. Do této skupiny kinas, které fosforylují eIF2 α , patří právě také HRI. Role HRI je nejlépe patrná z jeho aktivity v retikulocytech, kde HRI reguluje syntézu globinu v závislosti na koncentraci hemu, a udržuje tak molární poměr hemu a globinu vyrovnaný [Chen 1995, Chen 2000].

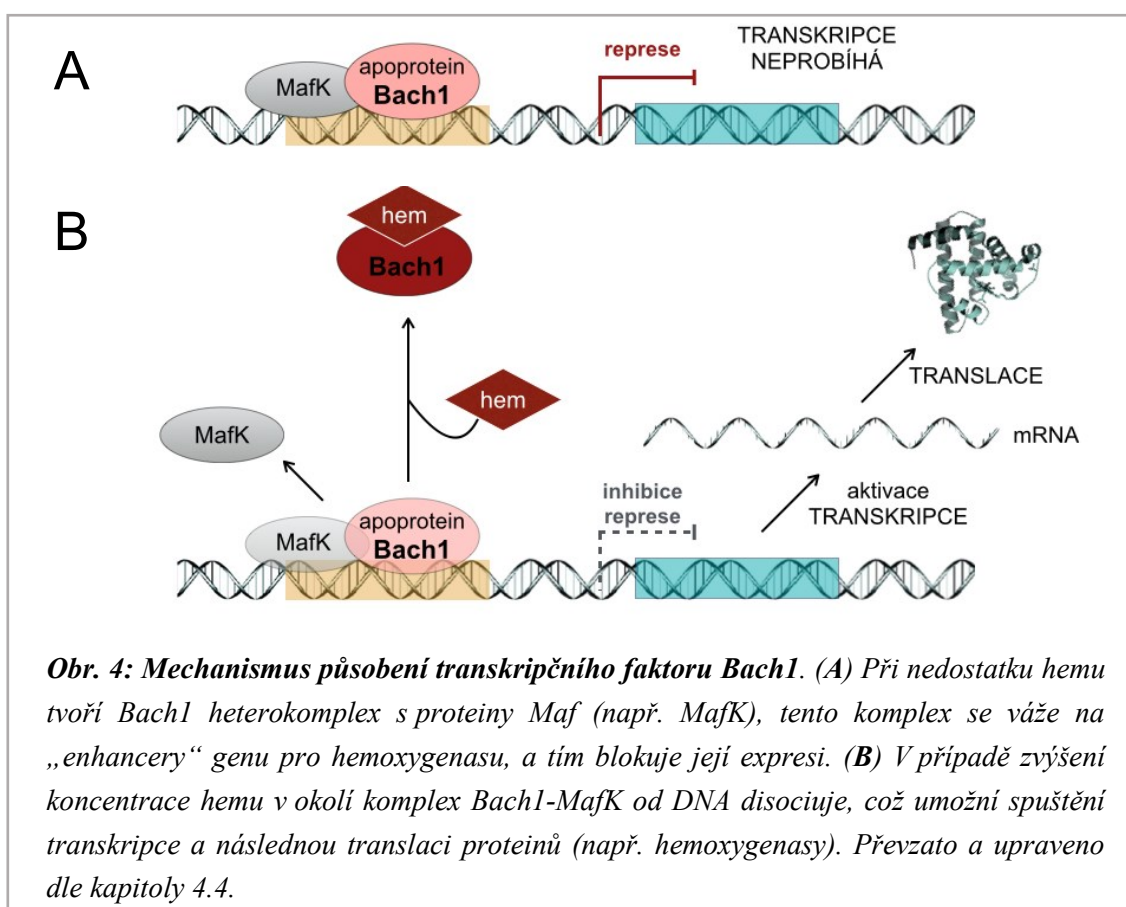
Role kinasy HRI v ostatních buňkách (vyjma retikulocytů) se ale zdá být ještě zásadnější. Bylo zjištěno, že pacienti s rakovinou plic mají Gly202 v proteinu HRI mutovaný za Ser [Greenman 2007]. Tato mutace se možná v určitých krocích podílí na rozvoji rakoviny. Pro pochopení funkce hemových sensorových proteinů a účasti HRI ve zdraví ohrožujících klinických stavech je nutné detailněji prozkoumat molekulární mechanismy působení těchto proteinů.

1.2.2 Transkripční faktor Bach1

Dalším eukaryotickým sensorovým proteinem, který detekuje hem, je transkripční faktor Bach1 (*akronym z angl. BTB domain and CNC homolog 1*), bývá označován také jako transkripční faktor se strukturou leucinového zipu nebo alternativně homolog 1 BTB a CNC domén. V tomto systému hem nereguluje

enzymovou aktivitu funkční domény (jako v případě HRI), ale reguluje transkripční aktivitu, tj. afinitu vazby k DNA [Igarashi 2014, Hira 2007].

Bach1 je savčí transkripční faktor, který funguje jako represor “enhancerů” genů pro hemoxygenasu 1 (HO-1) [Igarashi 2014, Hira 2007]. Podílí se tedy na regulaci hospodaření se železem, odpovědi na oxidační stres, erythropoézy a megakaryopoézy. Bach1 hraje roli také v některých procesech souvisejícími s rozvojem lidských chorob, účastní se např. onemocnění kardiovaskulárního a respiračního systému, trávicího traktu, poruch metabolismu glukosy, malárie a kožních onemocnění. Protein Bach1 byl prvním objeveným savčím transkripčním faktorem, jehož aktivita je regulována hemem [Igarashi 2014].



Bach1 detekuje koncentraci hemu ve svém okolí a na základě toho reguluje transkripci hemoxygenasy (obr. 4). V případě nadbytku hemu transkripci aktivuje, v opačném případě (při nedostatku hemu) transkripci hemoxygenasy inhibuje. Hemoxygenasa je enzym, který se podílí na degradaci hemu, je tudíž logické, že nadbytek hemu má za následek spuštění transkripce proteinu, který tento nadbytek odstraní a rozštěpí hem na méně toxické produkty (CO a bilirubin). Při nízké

koncentraci hemu tvoří Bach1 heterodimer s proteiny označovanými jako Maf. Tento heterokomplex se pak váže na „enhancery“ genu pro hemoxygenasu, čímž blokuje její expresi. Protein Bach1 tak poskytuje ochranu proti oxidačnímu stresu tím, že indukuje expresi hemoxygenasy [Igarashi 2014, Zhou 2016, Hira 2007].

Vedle inhibice vazby proteinu Bach1 na „enhancery“ v DNA, indukuje hem také jeho export z jádra buňky. Pro tuto regulaci genové exprese prostřednictvím hemu je v molekule Bach1 důležitý motiv dipeptidu cystein-prolin (tzv. CP motiv) [Hira 2007]. Hem se specificky váže na Bach1 v C-terminální oblasti proteinu, která obsahuje čtyři CP motivy [Ogawa 2001]. Hem navíc také podporuje polyubiquitylaci a následnou degradaci Bach1 v proteasomu, čímž snižuje poločas jeho života, a opět inhibuje vazbu Bach1 na DNA [Igarashi 2014].

Abychom lépe porozuměli procesu, kterým hem reguluje aktivitu transkripčního faktoru Bach1, potřebujeme nejprve vysvětlit mechanismus, kterým se signál o přítomnosti hemu přenese a jak ovlivní vazbu proteinu na DNA. Protein Bach1 je bez pochyby potenciálním terapeutickým cílem v boji proti chorobám spojeným s oxidačním stresem. Pro tento účel bude však nejprve nutné pochopit a objasnit konformační změny proteinu spojené s vazbou hemu a následným přenosem signálu.

2. Cíle disertační práce

Hlavním cílem předkládané disertační práce bylo odhalit mechanismus mezidoménového přenosu signálu u dvou zástupců prokaryotických hemových senzorů kyslíku (*AfGcHK*, *YddV*) a u dvou zástupců eukaryotických senzorů detekujících hem (HRI a Bach1). Při stanovování cílů byl kladen důraz také na studium strukturních vlastností těchto modelových proteinů.

Za účelem objasnění mezidoménového přenosu signálu u **prokaryotických senzorů kyslíku** *AfGcHK* a *YddV* byly stanoveny následující dílčí cíle:

- určit a popsat krystalovou strukturu sensorové domény *AfGcHK*, která obsahuje různé redoxní a ligandové formy iontu železa hemu
- prostudovat vliv různých redoxních a ligandových forem iontu železa hemu v sensorové doméně na strukturu a kinasovou aktivitu funkční domény *AfGcHK*
- objasnit, zda existuje spojitost mezi dimerizací sensorových domén a aktivitou funkčních domén proteinu *AfGcHK*
- určit kinetické parametry diguanylátcyklované reakce katalyzované hemovým senzorem *YddV* a popsat vliv různých redoxních stavů hemového železa a různých ligandů hemu na tuto reakci
- porovnat společné a rozdílné vlastnosti dvou modelových kyslíkových senzorů *AfGcHK* a *YddV*

V rámci studia strukturně-funkčních vztahů **eukaryotických senzorů hemu** HRI a Bach1 byly stanoveny tyto dílčí cíle:

- charakterizovat oligomerní stav proteinu Bach1 a stanovit kolik molekul hemu s proteinem Bach1 interaguje
- určit strukturní vlastnosti transkripčního faktoru Bach1
- posoudit vliv vazby hemu na enzymovou aktivitu kinasy HRI

3. Komentář a diskuze k souboru publikací

Předkládaná disertační práce se zabývá dvěma skupinami hemových proteinů, prokaryotickými HEMOVÝMI SENZORY PLYNŮ (*AfGcHK*, *YddV*) a eukaryotickými SENZORY HEMU (*Bach1*, *HRI*). Krátkou rešerši dosavadních poznatků o těchto skupinách sensorových hemoproteinů obsahuje kapitola 1 (*str. 9*). V následující části disertační práce jsou shrnuty a diskutovány výsledky získané v naší laboratoři a popsané v příložených publikacích (KAPITOLA 4).

3.1 PROKARYOTICKÉ KYSLÍKOVÉ SENZORY *AfGcHK* a *YddV*

Celkem tři publikace, které vznikly v rámci této disertační práce (KAPITOLY 4.1–4.3), jsou věnovány studiu prokaryotických hemových sensorů plyných molekul. Konkrétně se jedná o bakteriální proteiny *AfGcHK*, což je histidinová kinasa půdní bakterie *Anaeromyxobacter* sp. Fw109-5, a *YddV*, který je diguanylátcyklasou bakterie *Escherichia coli*. Oba proteiny patří mezi hemové senzory, které detekují kyslík, přičemž vazba kyslíku na hem v jejich sensorové (globinové) doméně ovlivňuje enzymovou aktivitu příslušné funkční domény (KAPITOLA 1.1, *str. 11*).

Flexibilita plnodélkových kyslíkových sensorů velmi znesnadňuje určování jejich struktur, a tím ztěžuje i pochopení mechanismu přenosu signálu. Přesný mechanismus přenosu signálu neznáme téměř pro žádný hemový sensorový protein. V naší laboratoři se však podařilo za pomoci několika různých analytických a biochemických metod významně se přiblížit k pochopení mechanismu mezidoménového přenosu signálu proteinu *AfGcHK* (KAPITOLY 4.1 a 4.2). Výsledky první publikace (KAPITOLA 4.1) odhalily, jak vazba různých ligandů na hem a redoxní stav hemového železa (tedy jak určitý signál) vyvolává strukturní změny proteinu vedoucí ke změnám v jeho aktivitě. Získané výsledky pak doplnila a upřesnila druhá studie (KAPITOLA 4.2), která je věnována zejména vlivu dimerizace sensorové domény proteinu *AfGcHK* na jeho kinasovou aktivitu. Všechny výsledky tak tvoří kompletní studii a vzájemně potvrzují námi navrhovaný mechanismus mezidoménového přenosu signálu kinasy *AfGcHK* (*obr. 5, str. 24*).

V naší laboratoři již dříve vznikla studie, která analyzovala strukturně-funkční vztahy proteinu *AfGcHK* pomocí metody vodík-deuteriové výměny v kombinaci

s hmotnostní spektrometrií (HDX-MS) spojenou s homologním modelováním [Stranova 2016a]. Jak je detailněji vysvětleno v kapitole 1. (str. 12), vazba kyslíku na hem v sensorové doméně *AfGcHK* aktivuje funkční doménu, která nejprve podléhá autofosforylaci a fosfát je poté přenesen na partnerský RR protein. Získaná data vedla k vysvětlení meziproteinového přenosu signálu mezi kinasou *AfGcHK* a RR proteinem, avšak dosud se nedařilo odhalit strukturní změny spojené s mezidoménovým přenosem signálu v rámci proteinu *AfGcHK*, tj. změny vyvolané různým redoxním stavem hemového železa a vazbou různých axiálních ligandů. Redoxní stav železa a vazba ligandů totiž úzce souvisí s regulací enzymové aktivity kinasy *AfGcHK* [Fojtikova 2015].

První publikace této disertační práce (KAPITOLA 4.1) se věnuje studiu přenosu signálu mezi doménami *AfGcHK* za pomoci metod rentgenové krystalografie a metody HDX-MS. Z předchozích studií víme, že forma proteinu obsahující hem v komplexu se železem ve stavu $\text{Fe}^{\text{III}}\text{-CN}^-$, $\text{Fe}^{\text{III}}\text{-OH}^-$ nebo $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-O}_2$ je aktivní, zatímco protein s hemovým železem ve stavu Fe^{II} a protein bez hemu jsou formami neaktivními [Fojtikova 2015, Kitanishi 2011]. Pro porovnání struktury aktivní a neaktivní formy proteinu bychom v ideálním případě studovali krystalovou strukturu *AfGcHK* ve stavu $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-O}_2$, ve kterém je kinasa nejvíce aktivní, a ve stavu Fe^{II} , kdy je neaktivní. Příprava takových proteinových krystalů však byla náročná, nicméně se nám nakonec podařilo získat krystal globinové domény *AfGcHK* s hemem v komplexu s 6-koordinovaným železem $\text{Fe}^{\text{III}}\text{-CN}^-$, který je naštěstí také stavem spojovaným s aktivní formou kinasy *AfGcHK* [Fojtikova 2015]. Tento krystal byl následně ponořen do redukujícího prostředí dithioničitanu sodného, abychom získali neaktivní formu proteinu (stav Fe^{II}). Co se na první pohled zdálo jako neúspěch, se posléze ukázalo být velkou výhodou. Nezískali jsme čistý stav Fe^{II} , nýbrž směsnou formu, která vedle *AfGcHK* ve stavu $\text{Fe}^{\text{III}}\text{-CN}^-$ obsahovala také hem v komplexu s 5-koordinovaným železem Fe^{II} . Navzdory počátečním rozpakům pramenícím z neúspěšné přípravy čistého krystalu ve stavu Fe^{II} se nakonec unikátní struktura „směsného“ krystalu ukázala být velmi přínosná. Krystalová struktura, ve které asi polovina molekul zaujímá stav asociovaný s aktivní formou a polovina stav spojovaný s formou neaktivní, totiž napovídá o strukturních změnách spojených s přechodem mezi aktivní a neaktivní formou proteinu daleko více než dva samostatné krystaly stavů Fe^{II} a $\text{Fe}^{\text{III}}\text{-CN}^-$. Ve struktuře „směsného“ krystalu pozorujeme díky přirozenému centrování struktur přes ion železa v hemu skutečnou superpozici obou stavů, a můžeme tak snadno sledovat pohyb, který

molekula proteinu koná při aktivaci a deaktivaci jeho kinasové aktivity. V případě dvou různých krystalů stavů Fe^{II} a Fe^{III} , které studovali například Tarnawski a kol. u proteinu YddV [Tarnawski 2015] vyvstává problém, jak při analýze strukturních motivů data správně vyhodnotit, aby odpovídala skutečnému stavu. Přirozené centrování obou struktur v námi analyzovaném „směsném“ krystalu je tedy velkou výhodou.

Jak již bylo zmíněno výše, plnodélkové hemové senzory plynných molekul je obtížné krystalizovat. I naše pokusy o krystalizaci plnodélkového proteinu *AfGcHK* opakovaně selhaly, nakonec se ale podařilo získat krystal alespoň sensorové domény proteinu, nikoli však krystal proteinu v plné délce. Výsledky rentgenové krystalografie ale velmi pěkně doplňují analýzy poskytnuté další metodou, HDX-MS. Velkou výhodou metody HDX-MS je, že pracuje s proteinem v roztoku, a tak není třeba ho krystalizovat. Díky tomu jsme byli schopni analyzovat konformační změny a interakce proteinu *AfGcHK* v jeho plnodélkové formě. Pomocí metody HDX-MS bylo tedy možné popsat strukturní rozdíly mezi aktivní a neaktivní formou plnodélkového proteinu *AfGcHK* a za pomoci rentgenové krystalografie analyzovat tyto strukturní změny v jeho globinové doméně. Unikátní spojení rentgenové krystalografie a metody HDX-MS pak poskytlo hodnotné výsledky, díky nimž jsme byli schopni poodhalit mechanismus přenosu signálu z jedné (sensorové) domény *AfGcHK* na doménu druhou (funkční). Bylo zjištěno, že redoxní stav hemového železa a přítomnost různých axiálních ligandů strukturu proteinu *AfGcHK* skutečně významně ovlivňuje. Všechny aktivní formy kinas *AfGcHK* ($\text{Fe}^{\text{III}}\text{-CN}^-$, $\text{Fe}^{\text{III}}\text{-OH}^-$, $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-O}_2$) vykazují velmi podobné strukturní uspořádání, které se liší od struktur pro neaktivní formy (Fe^{II} a bez hemu). Nejvýraznější strukturní změny jsme přitom pozorovali v globinové doméně v okolí hemu a v oblasti kontaktu dvou monomerů, které tvoří funkční dimer (tzv. dimerizační rozhraní neboli „interface“). V neaktivní formě je dimerizační rozhraní značně rozvolněnější a více přístupné molekulám rozpouštědla, než je tomu v případě aktivních forem. Nezanedbatelné změny ve struktuře proteinu se objevily také v oblasti dvou helixů, které vytváří vazebné místo pro ATP nezbytné pro autofosforylační aktivitu kinasové (funkční) domény. Data získaná pomocí HDX-MS tak identifikovala oblasti proteinu, které jsou klíčové pro přenos signálu, a pomohla tak odhalit molekulární mechanismus fungování hemového senzoru *AfGcHK*. Porovnáme-li výsledky rentgenové krystalografie a metody HDX-MS, můžeme konstatovat, že strukturní změny pozorované v krystalech *AfGcHK* nejsou tak markantní jako ty získané pomocí metody HDX-MS. Tento fakt lze však vysvětlit tím, že krystalové struktury jsou

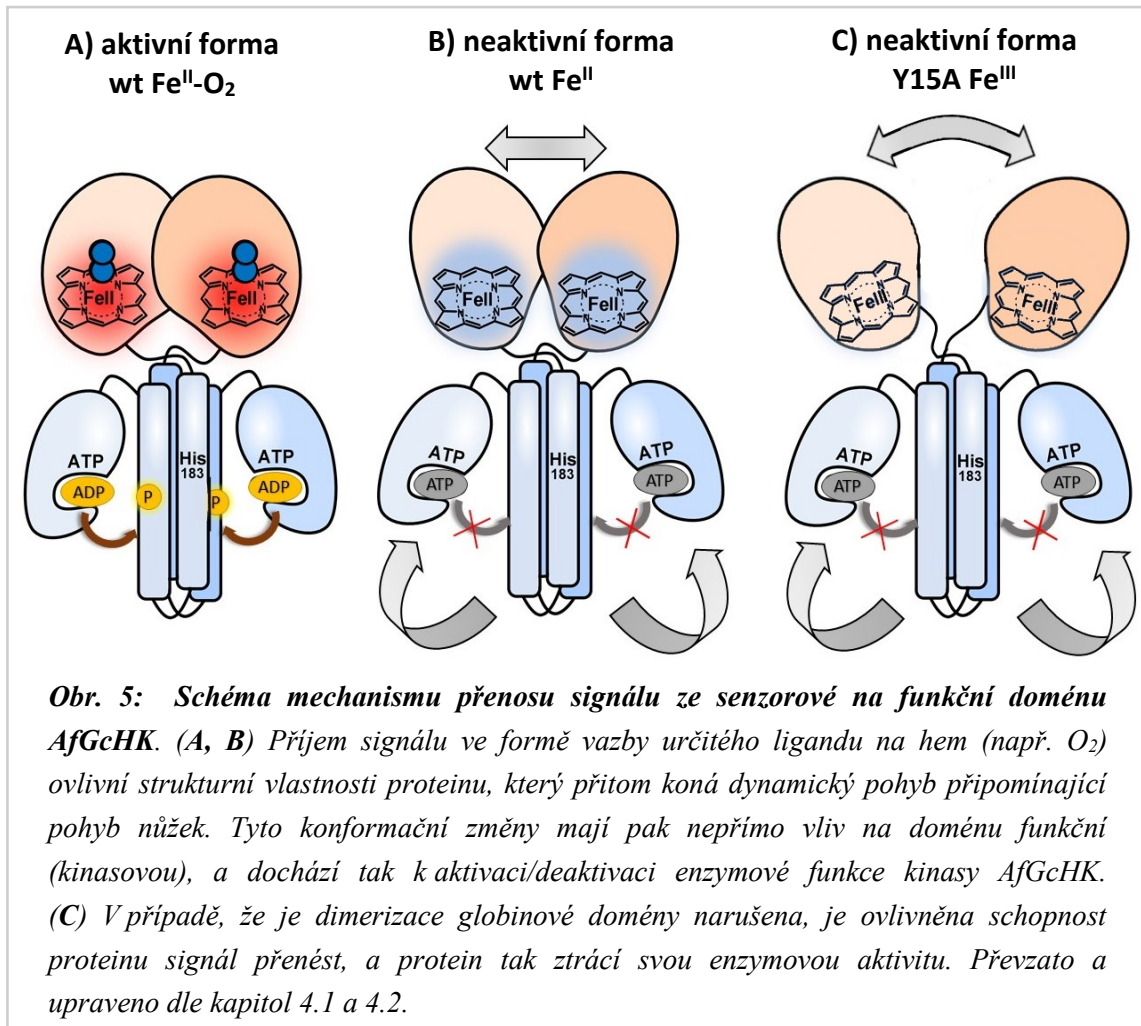
tvořeny pouze globinovou doménou proteinu. Výraznější konformační změny jsou ale pravděpodobně způsobeny také pohybem funkční domény, a proto jsou lépe pozorovatelné v plnodélkovém proteinu.

Jednoznačná změna v konformaci proteinu *AfGcHK* v případě redukce hemového železa, tj. přechodu z aktivní ($\text{Fe}^{\text{III}}\text{-CN}^-$) na neaktivní (Fe^{II}) formu, je velmi významným výsledkem. Pravděpodobně se totiž nejedná o obecnou zákonitost platnou pro všechny hemové senzory; např. Tarnawski a kol. tak výraznou strukturní změnu při změně redoxního stavu hemového železa proteinu YddV nepozorovali [Tarnawski 2015]. Nicméně je třeba poznamenat, že tito autoři porovnávali dva různé preparáty stavů Fe^{III} a Fe^{II} sensorové domény YddV a superpozicí jednotlivých dat mohlo dojít k částečnému zkreslení výsledku. Naší velkou výhodou byla skutečnost, že jsme určili krystalovou strukturu sensorové domény proteinu *AfGcHK*, kdy asi polovina molekul zastávala aktivní konformaci, tj. byla ve stavu $\text{Fe}^{\text{III}}\text{-CN}^-$, a prakticky stejné množství molekul zaujalo konformaci neaktivní, tj. stav Fe^{II} . Jedině díky tomuto unikátnímu přístupu jsme byli schopni detailně pozorovat konformační změnu spojenou s přechodem sensorové domény ze stavu asociovaného s aktivní formou do stavu spojovaného s formou neaktivní. Naše výsledky získané pomocí analýzy HDX-MS pro aktivní a neaktivní formy proteinu *AfGcHK* naznačují, že struktura proteinu při přechodu z aktivního do neaktivního stavu (a naopak) vykonává pohyb připomínající pohyb nůžek (*obr. 5, str. 24*). Takový dynamický pohyb byl odvozen i pro jiný kyslíkový senzor, protein *EcDOS* [Kurokawa 2004]. Zdá se tedy, že by se mohlo jednat o obecnější mechanismus, který není typický pouze pro protein *AfGcHK*. Abychom však takový závěr mohli plně zobecnit, je třeba provést ještě další studie, které by údaje vhodně doplnily, a potvrdily tak naši hypotézu o obecném mechanismu fungování alespoň části hemových kyslíkových senzorů. Někteří autoři [Burns 2014, Burns 2016] ale v případě jiné skupiny hemových senzorů plynů interpretují své výsledky odlišně a vysvětlují přenos signálu v hemových senzorech tak, že vlivem redukce hemového železa dochází k výraznější konformační změně pouze ve struktuře hemu, a pnutí v protoporfyrinovém skeletu pak vede ke změně aktivity a/nebo oligomerního stavu celého proteinu.

Pomocí rentgenové krystalografie (KAPITOLA 4.1) jsme také zjistili, že sensorová doména proteinu *AfGcHK* tvoří za normálních podmínek dimery. Aktivní forma proteinu má přitom dimerizační rozhraní sensorové domény velmi těsné, zatímco u struktury neaktivní formy tohoto senzoru se dimerizační rozhraní rozvolní a je více

přístupné molekulám rozpouštědla. Lze tudíž předpokládat, že blízkost dvou jednotek dimeru sensorové domény je velmi důležitá pro jeho funkci. Pokud bychom mohli pozorovat strukturní změny v sensorové doméně v případě, že by jednotlivé podjednotky tohoto dimeru od sebe disociovaly úplně, mohlo by to přinést zcela unikátní výsledky. Další studie (KAPITOLA 4.2) se právě na tento přístup zaměřila - získali jsme strukturu monomerní jednotky sensorové domény *AfGcHK*. Toho jsme dosáhli krystalizací sensorové domény proteinu ve stavu $\text{Fe}^{\text{III}}\text{-CN}^-$ v prostředí vysoké koncentrace imidazolu. Nadbytek imidazolu způsobil záměnu ligandu CN^- na iontu železa v hemu za molekulu imidazolu. Další molekula imidazolu interagovala s aminokyselinovým zbytkem Tyr15. Samotná výměna ligandů CN^- za imidazol by disociací dimeru velmi pravděpodobně nezpůsobila, komplex $\text{Fe}^{\text{III}}\text{-imidazol}$ je totiž asociován s plně enzymově aktivní formou proteinu [Fojtikova 2015]. Naši pozornost ale přitáhla druhá molekula imidazolu a její interakce s Tyr15. Zaměřili jsme se proto poté na roli Tyr15 v dimerizaci globinových domén a následně v autofosforylační aktivitě proteinu. Abychom byli schopni studovat vliv Tyr15 na oligomerizaci a aktivitu proteinu *AfGcHK*, bylo připraveno několik mutantních forem tohoto hemového senzoru, které mají tyrosin v poloze 15 zaměněný za jinou aminokyselinu (plnodélkové formy Y15A, Y15F, Y15G, Y15W a globinové domény Y15A, Y15F, Y15G, Y15W).

Analýzou vlastností mutantních forem *AfGcHK* jsme zjistili, že pokud je tyrosin v poloze 15 nahrazen jinou aromatickou aminokyselinou, konkrétně jsme testovali fenylalanin a tryptofan, globinová doména zůstává ve formě dimeru. Je-li však tyrosin nahrazen nearomatickou aminokyselinou, např. glycinem nebo alaninem, globinová doména se rozpadá na monomery. Zajímavé je, že všechny plnodélkové mutanty, ať už s aromatickou nebo nearomatickou aminokyselinou na pozici 15, tvoří v roztoku stále dimer. Je ale určitě logické se domnívat, že tento fakt je dán pouze tím, že jednotky dimeru jsou spojeny skrze interakce v kinasové doméně, přičemž globinová doména těchto konkrétních mutantů se (stejně jako v případě mutantů Y15A a Y15G izolované globinové domény) rozpadá na monomery. Dimerizační rozhraní kinasové domény je totiž pravděpodobně rozsáhlejší, než je tomu v případě domény globinové (KAPITOLA 4.1, Stranava 2016a). Tomu odpovídají také výsledky z gelové permeační chromatografie, které ukazují, že plnodélkové mutanty Y15A a Y15G sice vytváří v roztoku dimery (stejně jako mutanty obsahující aromatické aminokyseliny místo tyrosinu), ale mají strukturu méně kompaktní než mutanty Y15W a Y15F, což je vyjádřeno jejich nižším elučním objemem.



Námi získané výsledky tedy jednoznačně ukazují, že Tyr15 v sensorové doméně AfGcHK je velmi důležitý pro dimerizaci této domény a správné, tj. funkční, uspořádání celého proteinu. Když vezmeme v úvahu, že oligomerní stav sensorové domény proteinu AfGcHK, i ve smyslu pouhého „rozvolnění“ dimerizačního rozhraní, má vliv na enzymovou aktivitu, je pravděpodobné, že záměnou Tyr15 za jinou aminokyselinu dojde ke změně kinasové aktivity proteinu. A proto nás nepřekvapilo, že skutečně dva z mutantů (Y15A, Y15G) s disociovanou sensorovou doménou a ztrátou dimerizačního rozhraní svou enzymovou aktivitu úplně ztratily. Druhé dva mutanty (Y15F a Y15W), které mají v poloze 15 zaměněn tyrosin za jinou aromatickou aminokyselinu, vykazovaly aktivitu o něco málo nižší než přirozená forma (tzv. „wild-type“, wt) proteinu. U těchto mutantů totiž není dimerizační rozhraní narušeno natolik, aby monomerní jednotky od sebe disociovaly, což potvrdili i oligomerizační studie pomocí gelové permeační chromatografie. Tedy nejen plnodělkový protein, který je dimerní díky interakcím v kinasové doméně, ale i izolovaná sensorová doména těchto mutantů (Y15F a Y15W) zaujímá skutečně formu dimeru. Naši hypotézu o vlivu aminokyseliny

Tyr15 na strukturu a funkci proteinu *AfGCHK* tak analýzy oligomerního stavu a enzymové aktivity potvrdily. Shrňeme-li tyto výsledky, je jasné, že Tyr15 je nepochybně klíčový pro správné uspořádání dimerizačního rozhraní sensorové domény *AfGCHK*, a tím pádem i správnou konformaci proteinu, a má tak nepřímo vliv i na autofosforylační aktivitu kinasy *AfGCHK* (obr. 5C, str. 24).

Zajímavým faktem je také to, že monomerní mutanty izolované globinové domény (Y15A, Y15G) vedle ztráty dimerizačního rozhraní zároveň vykazují výrazně vyšší rychlost autooxidace (přeměny ze stavu $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-O}_2$ na Fe^{III}) než ty, které tvoří dimery (Y15F, Y15W). Tento fakt je pravděpodobně dán tím, že strukturální změny v okolí hemu destabilizují stav $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-O}_2$, a usnadňují tak oxidaci iontu hemového železa na stav Fe^{III} . Z důvodu nepřítomnosti aromatické aminokyseliny v blízkosti hemu se navíc vytváří ve struktuře proteinu „tunel“, kterým může lépe k molekule hemu pronikat kyslík a voda. Je však potřeba zdůraznit, že oba stavy ($\text{Fe}^{\text{II}}\text{-O}_2$ i Fe^{III}) sensorové domény jsou asociovány s plně aktivní formou kinasy *AfGCHK* [Fojtikova 2015], a ztrátu aktivity plnodélkového proteinu proto nelze vysvětlit rychlejší autooxidací iontu železa hemu.

Vysvětlením mechanismu přenosu signálu ze sensorové na funkční doménu celé řady proteinů se věnuje mnoho laboratoří po celém světě. V případě dvousložkových systémů bakterií, jejichž společným znakem je histidinkinasová aktivita jedné ze složek, bylo navrženo již několik mechanismů, které vysvětlují vliv přijetí signálu sensorovou doménou na autofosforylační aktivitu domény kinasové, resp. histidinkinasové [Shimizu 2015, Lobão 2019, Cunningham 2009, Rao 2017]. Jeden z navržených mechanismů je založen na sterickém bránění neboli mechanickém zablokování vstupu ATP do aktivního centra kinasové domény [Cunningham 2009]. Podobný mechanismus navrhuje publikace z roku 2015, ve které autoři vysvětlují přenos signálu jako přímý kontakt sensorové a kinasové domény [Shimizu 2015]. Druhý mechanismus se snaží vysvětlit přenos signálu nepřímou regulací autofosforylační aktivity bez přímého kontaktu fosforylačního místa v kinasové doméně s doménou sensorovou [Rao 2017]. Na základě nejaktuálnějších výsledků se v případě proteinu *AfGCHK* velmi pravděpodobně jedná o druhý zmiňovaný mechanismus. Námi získaná data (KAPITOLA 4.1 a 4.2) nenaznačují, že by sensorová doména přímým kontaktem interagovala s doménou kinasovou, přestože jsou v plnodélkovém proteinu spojeny jen 15 aminokyselin dlouhým peptidem, nýbrž že je signál přenášen nepřímo prostřednictvím konformačních změn obou domén. Takový mechanismus přenosu signálu je typický pro membránově vázané dvousložkové systémy [Gushchin 2017,

Abriata 2017, Zschiedrich 2016, Willett 2016], ačkoli AfGcHK není membránový protein. Dynamické přeuspořádání molekuly proteinu AfGcHK ve stavu aktivní/neaktivní schematicky znázorňuje *obr. 5A a 5B (str. 24)*.

Shrneme-li dosažené výsledky, můžeme konstatovat, že strukturní změny v sensorové doméně proteinu AfGcHK mají vliv na vlastnosti jeho funkční domény (KAPITOLY 4.1 a 4.2). Je potřeba zdůraznit také fakt, že na přenos signálu v případě AfGcHK má v neposlední řadě vliv uspořádání dimerizačního rozhraní sensorové domény (KAPITOLA 4.2). Mutantní formy globinové domény Y15A a Y15G vytváří v roztoku monomery a jejich plnodélkové formy jsou enzymově neaktivní. Rozpad globinové domény na disociované podjednotky má jednoznačně za následek ztrátu katalytické funkce celého proteinu. Tedy v případě, že je dimerizace globinové domény narušena, není možné dál signál přenést, a kinasová doména tak ztrácí svou enzymovou aktivitu (KAPITOLA 4.2). Podobně je tomu v případě, že proteinu chybí molekula hemu, případně celá sensorová doména [Fojtikova 2015, Stranova 2016a]. Kinasová doména sama o sobě nemůže být funkční, protože protein není schopen přijmout signál, který by její funkci aktivoval. Navržený mechanismus přenosu signálu v hemovém kyslíkovém senzoru s kinasovou aktivitou, AfGcHK, je uveden na *obr. 5 (str. 24)*. Aktivní forma proteinu v jeho přirozené (wt) formě je na *obr. 5* reprezentována ve stavu $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-O}_2$ (*obr. 5A*), neaktivní forma pak ve stavu Fe^{II} (*obr. 5B*). *Obr. 5C* pak znázorňuje narušení dimerizačního rozhraní (záměnou Tyr15 za alanin) a ztrátu enzymové aktivity proteinu, přestože je ve stavu Fe^{III} , který je asociován s plně aktivní formou kinasy AfGcHK. Důvodem znázornění mutantní formy Y15A ve stavu Fe^{III} (a nikoli $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-O}_2$) je, jak již bylo zmíněno výše, rychlá autooxidace hemového železa, která je způsobena mutací na Tyr15. Tato forma (Y15A) se tudíž v aerobním prostředí v podstatě ve stavu $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-O}_2$, nevyskytuje.

V naší laboratoři se dlouhodobě věnujeme vysvětlení mechanismu mezidoménového přenosu signálu s cílem popsat obecný mechanismus přenosu signálu ve skupině hemových sensorů plyných molekul s možností poukázat na specifitu jednotlivých sensorů. Analýza vlastností sensorových hemoproteinů s odlišnými funkcemi nám tak pomáhá získat ucelený pohled na danou problematiku. Druhým prokaryotickým hemovým senzorem, kterým se disertační práce zabývá, je protein YddV z bakterie *Escherichia coli* (KAPITOLA 4.3). Protein YddV je stejně jako AfGcHK kyslíkovým senzorem, který je tvořen dvěma doménami - sensorovou (globinovou) doménou, která váže hem a detekuje kyslík, a funkční doménou s

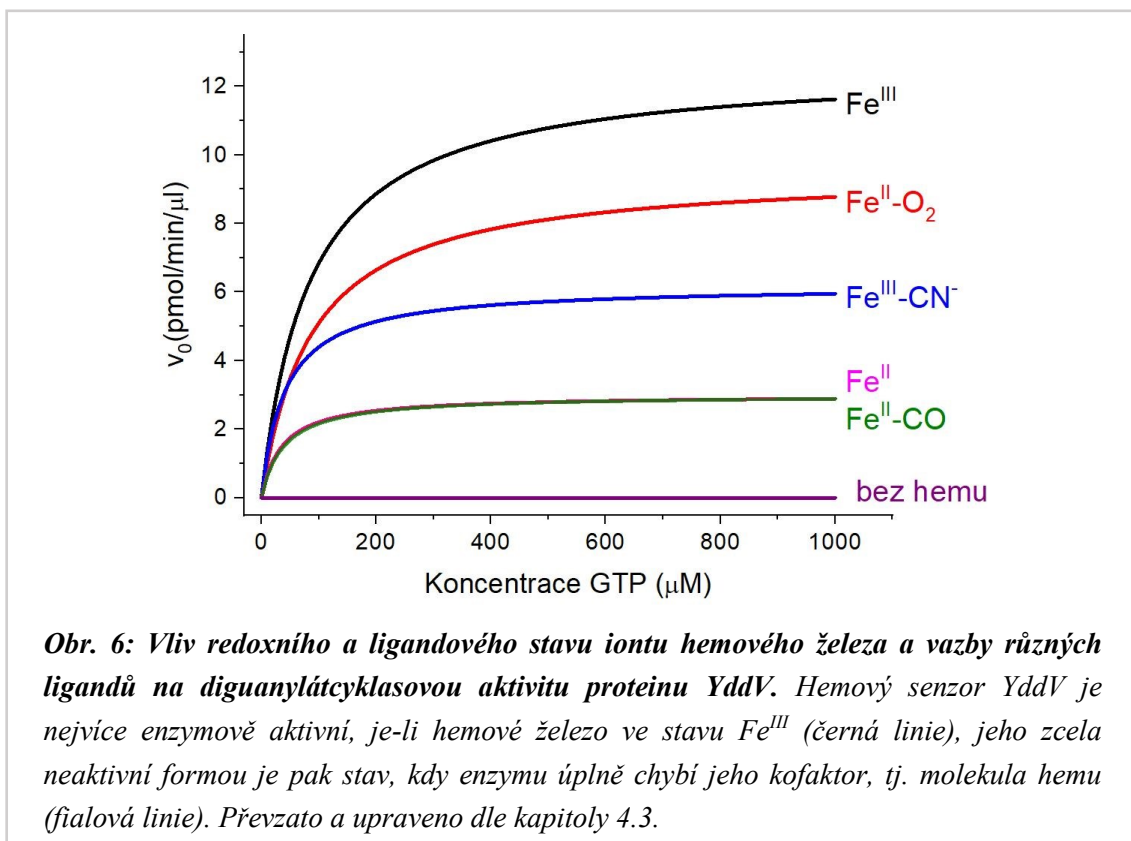
enzymovou aktivitou. Funkční doména hemoproteinu YddV má však diguanylátcyklasovou aktivitu, nikoli kinasovou, jako je tomu v případě *AfGcHK* (KAPITOLA 1, *str. 11*).

Mechanismus přenosu signálu v případě druhého studovaného kyslíkového senzoru, diguanylátcyklasy YddV, zůstával dlouho neobjasněný, neboť se nedařilo připravit tento protein v katalyticky aktivní formě [Kitanishi 2010, Tarnawski 2015]. V naší laboratoři se ale po počátečních neúspěších nakonec podařilo protein YddV připravit ve formě, která je dostatečně stabilní a zároveň enzymově plně aktivní. Toho jsme docílili připojením tzv. maltosu vázajícího proteinu (MBP, z angl. maltose binding protein) na N-konec plnodélkového proteinu YddV. Po odstranění tohoto stabilizačního prvku bohužel protein YddV okamžitě precipitoval. Enzymová aktivita i UV-Vis spektra fúzního proteinu MBP-YddV jsou však naštěstí identická jako ta pro přirozenou formu proteinu [Tuckerman 2009, Kitanishi 2010, Tarnawski 2015, Nakajima 2012]. Tento fakt naznačuje, že MBP neovlivňuje vlastnosti proteinu YddV, a fúzní protein MBP-YddV je tak vhodným modelovým systémem pro kinetické studie YddV.

Detailní analýza enzymové aktivity proteinu YddV v různých formách tohoto enzymu nám pak pomohla odhalit, jak změny v sensorové doméně proteinu, tedy různé ligandové a redoxní stavy iontu železa hemu, ovlivňují jeho katalytickou aktivitu (resp. jak se signál přenáší ze sensorové domény na doménu funkční). Z našich výsledků vyplývá, že katalytická aktivita diguanylátcyklasy YddV vykazuje kinetiku dle Michealise a Mentenové, pH optimum tohoto enzymu je 8,5–9,0 a pro jeho správnou aktivitu je nutná přítomnost iontů Mg^{2+} nebo Mn^{2+} . V případě nahrazení v buňce přirozeně se vyskytujících hořečnatých iontů jinými bivalentními ionty než manganatými (např. Ca^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+}) enzym aktivní není. Neaktivnější formou diguanylátcyklasy YddV, co se oxidačního a koordinačního stavu iontu železa hemu týče, je forma Fe^{III} (*obr. 6, str. 28*). Aktivita diguanylátcyklasy pak klesá v řadě $Fe^{III} > Fe^{II}-O_2 > Fe^{III}-CN^-$. Dvě formy proteinu YddV lze považovat za téměř neaktivní, a to Fe^{II} a $Fe^{II}-CO$. Enzymovou aktivitu protein ztrácí úplně, chybí-li v sensorové doméně hem (mutantní forma H98A není vlivem mutace schopna hem navázat).

Zajímavým faktem je, že nejméně aktivní forma Fe^{II} je aktivována vazbou kyslíku, ale nikoli vazbou CO (*obr. 6, str. 28*). Okolí hemu v sensorové doméně tedy dokáže tyto dvě dvouatomové molekuly rozlišit. Kyslíkový senzor *AfGcHK* tyto dvě molekuly také rozlišuje [Fojtikova 2015], ale například protein *EcDOS*, který je rovněž senzorem kyslíku, to nedokáže [Tanaka 2007]. Molekuly O_2 a CO jsou si sice velmi

podobné, přesto je logické předpokládat, že je vazebné místo v distální části iontu železa hemu dokáže rozlišit. Jejich přítomnost v okolním prostředí totiž značí rozdílné vnější podmínky. Některé hemoproteiny (např. hemoglobin, myoglobin, peroxidasy, cytochromy P450) striktně rozlišují mezi ligandy dvouatomových plyných molekul, jako jsou NO, CO a O₂, a jejich afinita k těmto molekulám se mnohdy výrazně liší [Tsai 2012]. Když si uvědomíme, že proteiny YddV a EcDOS spolupracují v syntéze a degradaci *c*-di-GMP (KAPITOLA 1, *str.* 13), a zároveň vezmeme v úvahu fakt, že vazba kyslíku u obou sensorů zvyšuje jejich aktivitu, může rozdíl v aktivitě proteinu s hemovým železem ve stavu Fe^{II}-CO být důležitým signalizačním mechanismem.



Za účelem objasnění mechanismu mezidoménového přenosu signálu diguanylátcyklasy YddV bylo připraveno také několik mutantních forem, které mají mutované aminokyseliny klíčové pro správné fungování sensorové domény (Leu65, Tyr43). Leucin 65 na distální straně hemu pravděpodobně v přirozené formě proteinu brání přístupu molekul vody k iontu železa hemu, zatímco hydroxidová skupina postranního řetězce tyrosinu 43 přímo interaguje s O₂ vázaným na hemu [Nakajima 2012, Stranova 2014]. Již dříve bylo při studiu spektrálních vlastností mutantů izolované globinové domény YddV zjištěno, že tyto mutace v blízkosti hemu (Leu65, Tyr43) mají za následek zvýšení rychlosti autooxidace iontu železa hemu

[Nakajima 2012]. Námi naměřená data pak dokazují, že tyto mutanty (v plnodélkové formě) navíc částečně ztrácí svou enzymovou aktivitu a mají vyšší tendenci vytvářet tetramery. Pokud tyto výsledky srovnáme se studií věnující se proteinu *AfGcHK* (KAPITOLA 4.2), lze udělat podobný závěr. Ztrátu aktivity plnodélkového proteinu nelze vysvětlit rychlejší autooxidací železa, neboť oba stavy ($\text{Fe}^{\text{II}}\text{-O}_2$ i Fe^{III}) jsou asociovány s aktivní formou enzymu. Strukturní změny způsobené mutacemi v okolí hemu destabilizují stav $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-O}_2$, a usnadňují tak oxidaci hemového železa, nicméně samotná autooxidace pokles aktivity proteinu velmi pravděpodobně nezpůsobí. Vliv na aktivitu enzymu mají spíše změny v konformaci proteinu, které vedou ke snížení schopnosti převádět signál na funkční doménu.

Enzymová aktivita i dalších proteinů s diguanylátcyklosovou aktivitou záleží na redoxním stavu hemového železa a vazbě ligandů na hem [Burns 2014, Burns 2016], což je ve shodě s výsledky YddV získanými v naší laboratoři (KAPITOLA 4.3). U některých kyslíkových sensorů s diguanylátcyklosovou aktivitou dochází ale zároveň při vazbě kyslíku na hem v sensorové doméně a při vazbě *c*-di-GMP jako produktu na inhibiční místo ve funkční doméně ke změně oligomerního stavu proteinu [Burns 2014, Burns 2016]. Takové změny v oligomerizaci proteinu YddV jsme však nepozorovali. Protein MBP-YddV se vyskytuje v roztoku převážně ve formě dimeru, a to nezávisle na redoxním stavu iontu hemového železa, vazbě ligandů nebo přítomnosti či nepřítomnosti reakčního produktu, *c*-di-GMP (KAPITOLA 4.3). Avšak enzymově neaktivní mutantní forma H98A, která není schopna vázat hem, tvoří v roztoku převážně oktamery. Mutantní formy, které mají vlivem mutace v okolí hemu sníženou katalytickou aktivitu (Leu65, Tyr43), mají zase tendenci zaujímat formu tetramerů. Tento fakt svědčí o tom, že dimerní forma je ta, která zaujímá správnou konformaci pro funkci cyklosové domény proteinu YddV a že pravděpodobně platí, že správný oligomerní stav je pro optimální sensorovou funkci hemových sensorových proteinů klíčový. Nicméně vliv redoxního stavu iontu hemového železa nebo vazby ligandů na ion železa na oligomerizaci se v případě YddV prokázat nepodařilo (KAPITOLA 4.3).

Diguanylátcyklosová aktivita YddV by měla být posuzována také v souvislosti s aktivitou fosfodiesterasy *EcDOS*, neboť se tyto dva proteiny podílejí na regulaci intracelulární koncentrace *c*-di-GMP společně (KAPITOLA 1, *str.* 13). Oba proteiny jsou kyslíkovými senzory, přičemž vazba kyslíku na hem v jejich sensorové doméně zvyšuje enzymovou aktivitu jejich funkčních domén. Pro další diskuze je důležité se zamyslet, co je řídicím krokem v kaskádě reakcí přeměny GTP na *c*-di-GMP až na

l-di-GMP. Je tedy zásadní vědět, která reakce probíhá rychleji, zdali je to syntéza *c*-di-GMP katalyzovaná YddV nebo jeho degradace, kterou katalyzuje *Ec*DOS. Kinetické parametry (K_m , V_{max}) reakce katalyzované diguanylátcyklasou YddV jsme určili v rámci analýzy enzymové aktivity tohoto proteinu (KAPITOLA 4.3), avšak v případě fosfodiesterasy *Ec*DOS jsou tyto hodnoty neznámé. Lze ale předpokládat, že koncentrace substrátu *Ec*DOS (*c*-di-GMP) v buňce je výrazně nižší než koncentrace GTP, které je substrátem YddV. Rychlost fosfodiesterasové reakce je proto řízena zejména afinitou *Ec*DOS k substrátu, naopak v případě reakce diguanylátcyklasové je rychlost reakce dána především množstvím substrátu (GTP) v buňce. Je tedy poměrně složité afinitu k substrátu a reaktivitu těchto dvou senzorů porovnávat. K dispozici máme ale disociační konstantu K_d kyslíku obou proteinů, která nám napovídá o afinitě k této signální molekule, přičemž se hodnota K_d senzorů YddV a *Ec*DOS výrazně liší: pro YddV je to pouhých 14 μ M [Kitanishi 2010] a pro *Ec*DOS 340 μ M [Taguchi 2004]. YddV má tedy ke kyslíku vyšší afinitu, což naznačuje, že při limitních koncentracích kyslíku v buňce se aktivuje pouze YddV, čímž se spustí syntéza *c*-di-GMP. *Ec*DOS se aktivuje až při vyšších koncentracích kyslíku a vzniklé *c*-di-GMP rychle degraduje. Změny v koncentraci kyslíku v buňce tak ovlivňují i intracelulární koncentraci *c*-di-GMP.

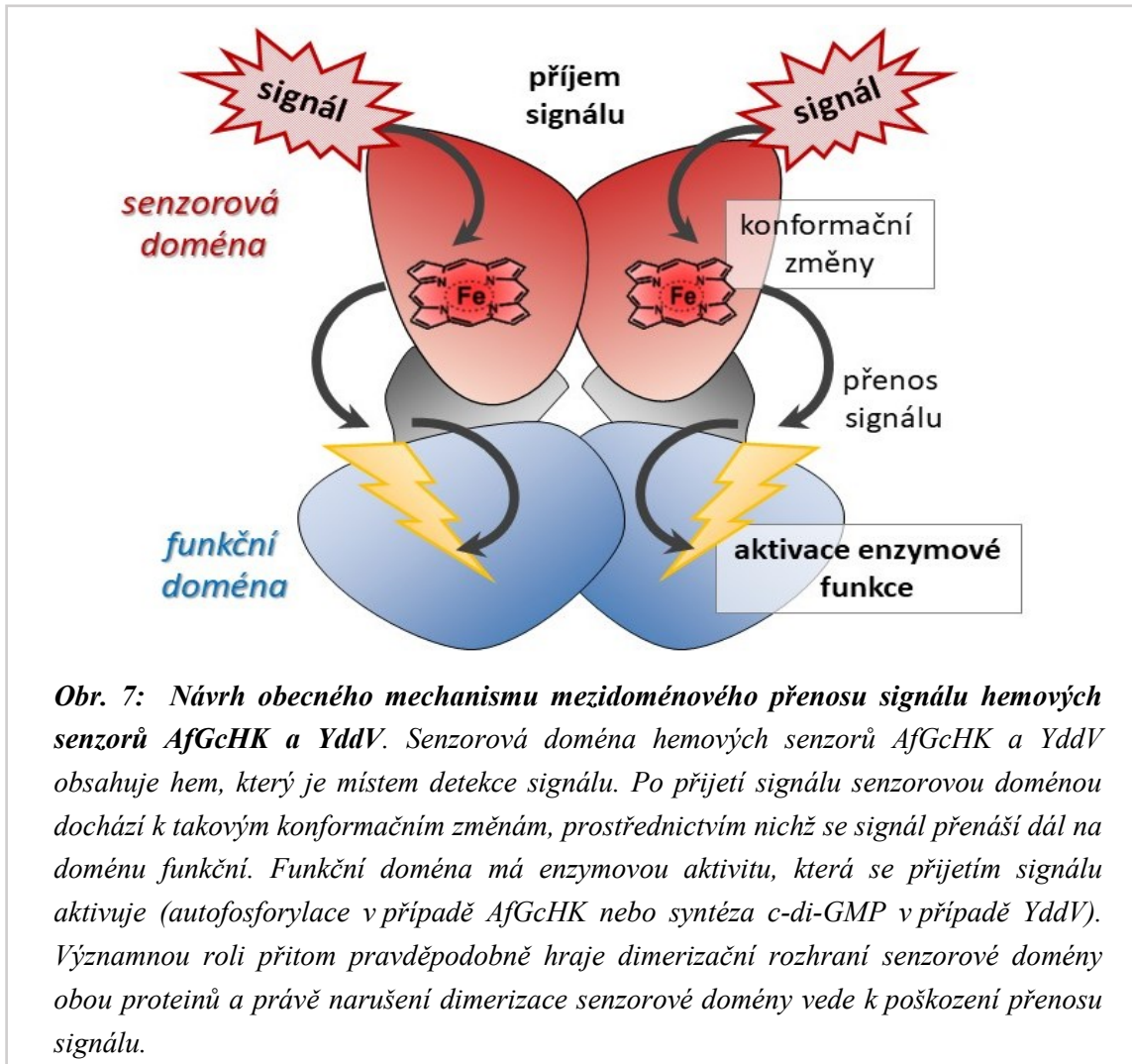
Jak již bylo zmíněno výše, funkční doména mutantu MBP-YddV H98A, který neobsahuje ve své sensorové doméně hem, je katalyticky neaktivní. Tyto výsledky jsou ve shodě s analýzou enzymové aktivity histidinové kinasy *Af*GcHK [Fojtikova 2015] a také se závěry studie uvedené v kapitole 4.1. I zde platí, že pokud sensorová doména není schopna přijmout signál (např. vazba kyslíku na hem), nemůže být funkční doména aktivována. Mutantní forma H98A MBP-YddV, která není schopna vázat hem, a nemá tak katalytickou aktivitu, navíc tvoří primárně oktamery namísto plně funkčních dimerů (KAPITOLA 4.3).

Studium vlivu změn v okolí hemu lokalizovaného v sensorové doméně na diguanylátcyklasovou aktivitu funkční domény proteinu YddV bezpochyby obohatilo naše znalosti v oblasti vztahů mezi přenosem signálu, konformací proteinu a katalytickou aktivitou proteinu YddV. V důsledku chybějících strukturních dat plnodélkového proteinu však není studie zcela kompletní, neboť se bohužel zatím nepodařilo připravit krystal plnodélkové formy proteinu YddV ani analyzovat tento protein pomocí metody HDX-MS. Vezmeme-li v úvahu krystalovou strukturu jednotlivých domén YddV [Tarnawski 2015], tak vzhledem k minimálním změnám ve

strukturním uspořádání mezi stavy Fe^{III} (aktivní) a Fe^{II} (neaktivní), nelze dělat jednoznačné závěry jako v případě *AfGcHK* (KAPITOLY 4.1 a 4.2). Na tomto místě je ale třeba připomenout, že studie věnovaná krystalovým strukturám YddV [Tarnawski 2015] pracuje se dvěma různými preparáty použitými pro určení stavů Fe^{III} a Fe^{II} . Naší velkou výhodou při analýze krystalových struktur *AfGcHK* (KAPITOLA 4.1) byl „směsný“ krystal obsahující oba stavy v rovnoměrném zastoupení. Při analýze strukturních motivů těchto stavů jsme tak získali dvě struktury, které byly „centrovány“ přes ion železa hemu přirozeně, a tím bylo umožněno zobrazení dvou struktur v jednom náhledu. Nepřesnosti při porovnání struktur v případě publikace autorů Tarnawski a kol. mohou být jedním z možných vysvětlení, proč v našem případě pozorujeme výrazně větší konformační změnu při strukturní analýze hemového senzoru *AfGcHK*. Mechanismus přenosu signálu ze sensorové (v obou případech dimerní sensorové domény) na funkční doménu je tak pravděpodobně podobný a v našem případě byly pozorované změny pouze signifikantnější. Aby byl však náš pohled zcela objektivní, nesmíme opomíjet ani možnost, že mechanismus přenosu signálu těchto dvou kyslíkových senzorů je skutečně odlišný a právě rozdíl ve strukturních změnách tuto možnost zcela nevylučuje. Zda dochází při přenosu signálu ke strukturním změnám v sensorové doméně proteinu YddV, které pak nepřímo ovlivňují aktivitu domény funkční, je proto nutné potvrdit dalšími studiemi. Údaje, které poskytují krystalové struktury publikace z roku 2015 [Tarnawski 2015], tedy nejsou v rozporu s našimi výsledky (KAPITOLA 4.3), zároveň je zatím nelze využít k obecnějším závěrům. Ukázka předpokládaného obecného mechanismu přenosu signálu, který je společný pro oba kyslíkové senzory, *AfGcHK* a YddV, je uveden na *obr. 7 (str. 32)*.

Studium bakteriálních hemových senzorů (KAPITOLY 4.1–4.3) přináší hodnotné informace pro vývoj nových antibiotik a napomáhá v boji proti bakteriální rezistenci na již existující antibiotika, neboť prokaryotické senzory plyných molekul umožňují patogenním bakteriím například měnit jejich stádium a virulenci a vytvářet biofilmy (KAPITOLA 1, *str. 11*). Ačkoli informace o těchto proteinech jsou velmi důležité pro lidské zdraví, snažíme se naši pozornost zaměřit také na eukaryotické hemoproteiny, které mají na lidské zdraví a nemoci bezprostřednější vliv. Vzhledem ke snazší přípravě bakteriálních proteinů a manipulaci s nimi bylo vhodné metody studia sensorových hemoproteinů (stanovení enzymové aktivity, strukturní studie pomocí HDX-MS a rentgenové krystalografie a další) optimalizovat právě na těchto proteinech a získané znalosti poté aplikovat na proteiny eukaryotické. V případě

eukaryotických proteinů však většinou překonáváme nejprve četné problémy s jejich izolací, čistotou a stabilitou.



3.2 EUKARYOTICKÉ SENZORY HEMU Bach1 a HRI

Eukaryotické sensorové proteiny, které detekují hem, jsou vedle prokaryotických hemových senzorů plyných molekul druhou velkou skupinou hemoproteinů, které se předkládaná disertační práce věnuje. Jak již bylo uvedeno, exprese a purifikace eukaryotických proteinů a manipulace s nimi je mnohem náročnější než práce s bakteriálními proteiny. Avšak i těmto proteinům je potřeba věnovat pozornost, aby naše znalosti o sensorových hemoproteinech byly ucelené a kompletní.

V rámci disertační práce vznikl souhrnný článek (KAPITOLA 4.4), který se plně soustředí na problematiku eukaryotických sensorových proteinů a dosud rozpoznávaných

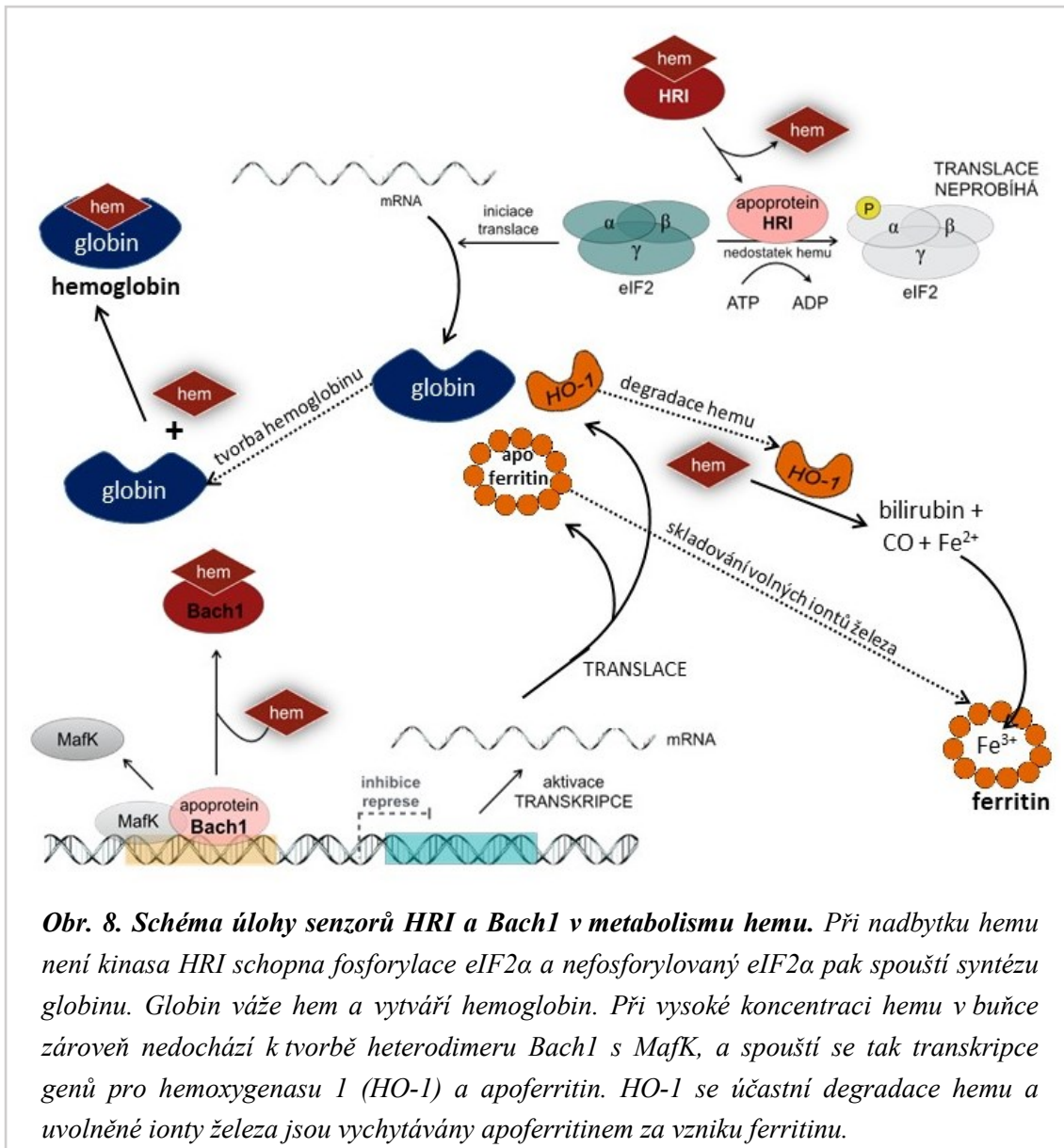
mechanismů přenosu signálu v těchto senzorech. Článek popisuje nejrůznější senzory hemu a přehledně shrnuje roli hemu jako aktivátoru či inhibitoru enzymů. Nabízí vhled také do základních molekulárních mechanismů fungování hemu jako signální molekuly, který je zásadní pro pochopení nově objevené role hemu ve fyziologických a patologických procesech. Publikace vedle hemových sensorů uvádí i některé hemové proteiny, ve kterých hem tvoří aktivní centrum. Z této skupiny hemoproteinů jsou dobře známé například hemoglobin, cytochrom c nebo cytochromy P450, nicméně publikace popisuje proteiny s hemem v aktivním centru, jejichž funkce se výrazně liší od těch, které mají uvedené prototypické hemoproteiny (např. syntéza hydrazinu nebo tvorba N-N vazeb). Větší část souhrnného článku je však věnována eukaryotickým sensorům hemu.

Některé otázky týkající se sensorů detekujících hem zůstávají dosud nevyřešené. Existují například rozpory v diskuzích ohledně pozorování, že u některých hemoproteinů je jejich funkce regulována redoxním stavem hemového železa [Carrica 2012, Motomura 2017], zatímco u jiných hemoproteinů změna redoxního stavu železa nestačí a pro správnou regulaci jejich funkce je nutná interakce hemu s CO nebo jinou dvouatomovou plynnou molekulou [Aono 2003]. Vědecká komunita v tomto směru není jednotná, ve starších publikacích bývají často opomíjeny a nesprávně diskutovány rozdíly mezi změnami způsobenými vazbou CO a změnami vyvolanými různým redoxním stavem hemu. Podle našich zjištění nemůže molekula CO interagovat s proteinem, pokud protein neobsahuje ion kovu, a pokud je tímto iontem kovu ion železa hemu, je nutné, aby byl v redukovaném stavu (KAPITOLA 4.4). Většina sensorů oxidu uhelnatého jsou tudíž proteiny, které zároveň detekují hem, na který se CO váže, čímž je zprostředkována modulace funkce daného proteinu. Na tomto místě je však vhodné zmínit také jednu publikaci, která popisuje interakci CO s volnými ionty železa, nezávislou na hemu [Wang 2017]. Autoři této publikace předpokládají, že volné ionty železa jsou v roztoku připraveného proteinu vždy přítomné a podílí se na interakci mezi CO a molekulou proteinu, přičemž se však nejedná o vazbu CO na ionty železa hemového. Takový závěr je však ojedinělý a dá se proto předpokládat, že se v tomto případě zřejmě jedná o arteficiální výsledky, neboť dosud nebylo popsáno, že by se molekula CO vážala na protein jinak než skrze ionty kovu přímo vázané ve struktuře proteinu. Mnoho autorů popisuje interakci CO s iontem železa hemu, přičemž vazba CO na hem reguluje aktivitu proteinu [Lukat-Rodgers 2010, Reinking 2005, Pardee 2009]. Jak již bylo zmíněno, CO se vždy váže na hemové železo, které je ve stavu Fe^{II}

[Boczkowski 2006, Motterlini 2010, Motterlini 2017]. Co ale není už tak jednoznačné, je, zdali dochází nejprve ke změně redoxního stavu železa na Fe^{II} a až poté je CO schopen se navázat, jak popisuje např. publikace autorů Dioum a kol. [Dioum 2002], nebo jestli se CO svou vazbou na hem nepodílí na redukci železa [Sher 2012].

Kapitola 4.4 dále zmiňuje také různé motivy, které slouží jako místo detekce hemu. V mnoha sensorových proteinech je to tzv. CP-motiv (oblast proteinu, která obsahuje sekvenci Cys-Pro), na který se molekula hemu váže. Význam prolinu sousedícího vedle cysteinu je pravděpodobně sterická regulace struktury proteinu v blízkosti místa vazby hemu, která umožňuje vazbu hemu na cystein [Zhang 1995, Omura 2005]. Nicméně ion železa hemu interaguje v sensorových proteinech i s jinými aminokyselinami, než je cystein lokalizovaný vedle prolinu. Hem se může vázat také na cystein, který však nesousedí s prolinem [Tang 2003], nebo například na aminokyselinu histidin [Lechardeur 2012].

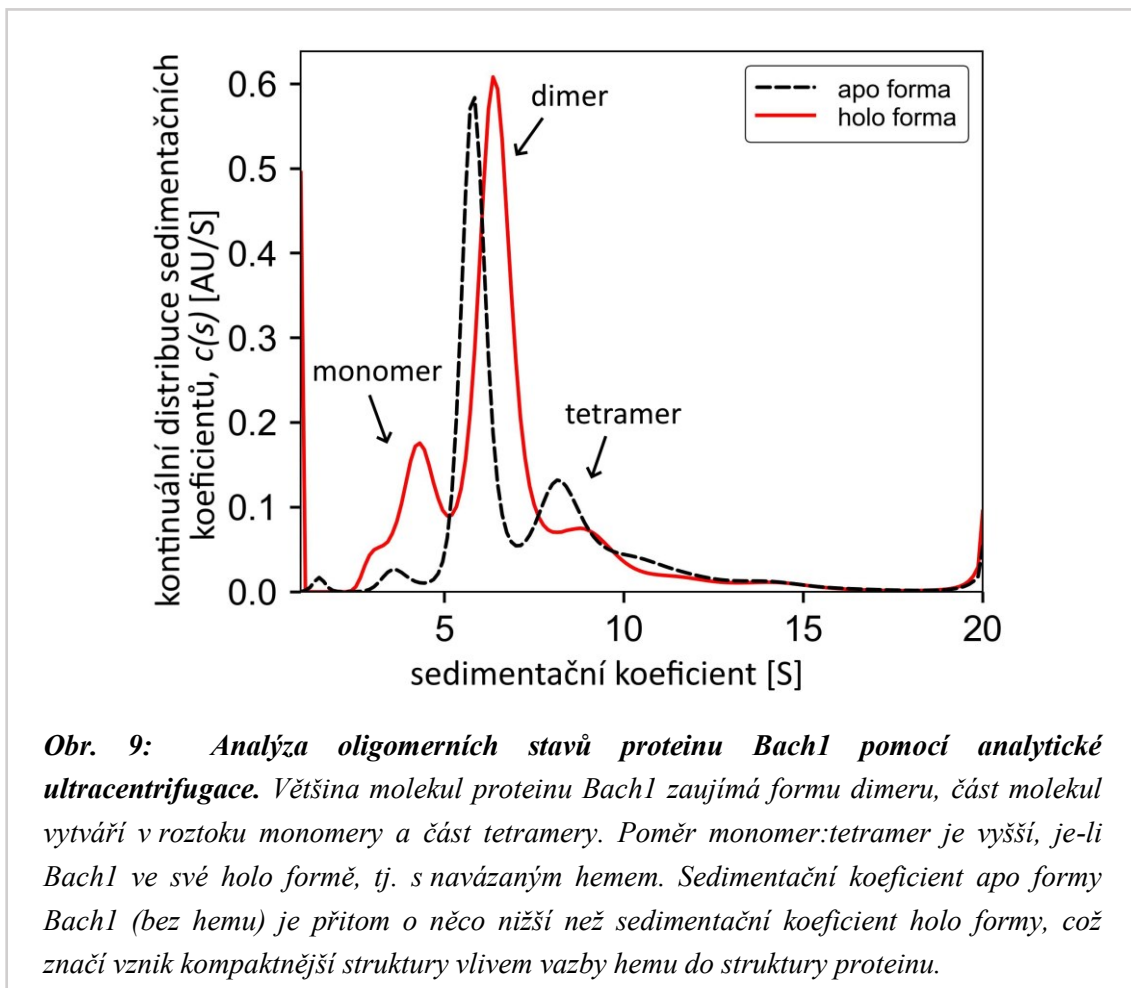
V rámci zpracovávání této disertační práce jsme se věnovali zejména dvěma zástupcům eukaryotických sensorů detekujících hem, a to transkripčnímu faktoru Bach1 a kinase HRI. Základní informace týkající se funkce a významu těchto dvou sensorových hemoproteinů jsou uvedeny v kapitole 1 (*str. 14*). Hlavním důvodem, proč byly pro strukturně-funkční studie vybrány právě senzory HRI a Bach1, je jejich nesporný význam v metabolismu hemu obecně. V případě, že dochází k poruchám syntézy hemu (např. anémie, protoporfyrie, talasémie), HRI detekuje nízkou koncentraci hemu v retikulocytech, čímž dochází k jeho autofosforylaci a následnému přenosu fosfátu na $\text{eIF2}\alpha$. Fosforylace $\text{eIF2}\alpha$ má pak za následek ukončení syntézy globinu, což vede k vyrovnání koncentrace globinu a hemu, a tak ke správné syntéze hemoglobinu [Chen 2007]. V případě nadbytku volného hemu, způsobí interakce hemu s Bach1 aktivaci transkripce některých proteinů, které jsou spojovány s metabolismem hemu. Konkrétně se jedná o hemoxygenasu 1, která volný hem degraduje, ferritin, jehož úlohou je skladování volných iontů železa, ferroportin, který napomáhá exportu volného železa z buňky, a globin, čímž se opět vyrovnává poměr hemu a globinu [Igarashi 2014, Igarashi 2017]. Bach1 společně s HRI tak významně zmírňují toxicitu volného hemu a z něj uvolněného iontu železa. *Obr. 8 (str. 35)* přehledně shrnuje úlohu hemových sensorů HRI a Bach1 v metabolismu hemu. Je důležité zdůraznit, že přestože se eukaryotické sensorové hemoproteiny účastní mnoha důležitých fyziologických funkcí, jen málo informací je dosud známo o molekulárním mechanismu jejich působení.



Obr. 8. Schéma úlohy senzorů HRI a Bach1 v metabolismu hemu. Při nadbytku hemu není kinasa HRI schopna fosforylace eIF2a a nefosforylovaný eIF2a pak spouští syntézu globinu. Globin váže hem a vytváří hemoglobin. Při vysoké koncentraci hemu v buňce zároveň nedochází k tvorbě heterodimeru Bach1 s MafK, a spouští se tak transkripce genů pro hemoxygenasu 1 (HO-1) a apoferritin. HO-1 se účastní degradace hemu a uvolněné ionty železa jsou vycitávány apoferritinem za vzniku ferritinu.

Optimalizaci exprese a purifikace studovaných eukaryotických proteinů bylo věnováno mnoho úsilí a času, které ovšem nebyly vyváženy tak kvalitními výsledky jako v případě studia prokaryotických hemových senzorů (KAPITOLY 4.1–4.3). Protein Bach1 se ale po prvotních obtížích při přípravě vhodného plazmidu pro expresi v bakteriálních buňkách dařilo izolovat v dostatečném množství i čistotě pro provedení několika různých experimentů. Byla například provedena analýza oligomerních stavů proteinu Bach1 pomocí analytické ultracentrifugace. Námi získaná data ukazují, že protein Bach1 se vyskytuje v roztoku převážně ve formě dimeru, přičemž malá část molekul proteinu zaujímá formu monomeru či tetrameru (obr. 9, str. 36). V případě holo formy Bach1 (forma, která obsahuje ve své struktuře vázaný hem) monomerní struktury převládají nad tetramerními. Pro apo formu Bach1 (bez vázaného hemu) je

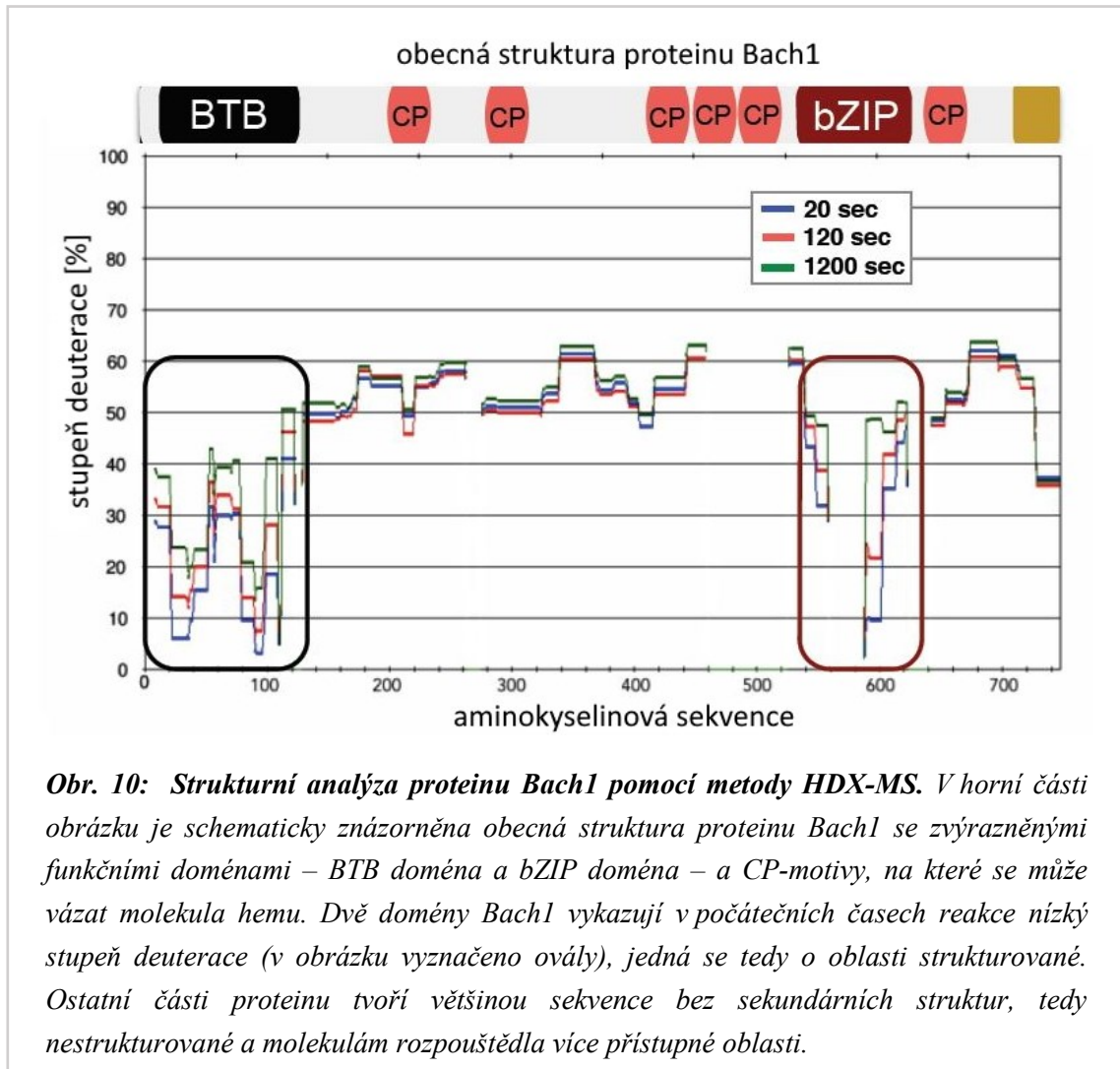
tomu naopak. Důležitým poznatkem je to, že sedimentační koeficient pro holo formu Bach1 je vyšší než pro apo formu, strukturální změny proteinu Bach1 vlivem vazby hemu jsou tedy natolik významné, že se projeví zvýšením sedimentačního koeficientu. Jedním z vysvětlení může být zvýšení molekulové hmotnosti proteinu v důsledku vazby hemu (s Bach1 totiž pravděpodobně interaguje více než jedna molekula hemu). Změna v sedimentačním koeficientu je však tak výrazná, že pravděpodobnějším vysvětlením bude vznik kompaktnější struktury vlivem interakce s hemem, která rychleji sedimentuje.



Výsledky spektroskopických analýz proteinu Bach1 publikované v minulých letech nejsou jednoznačné a například v počtu molekul hemu, které se vážou na protein Bach1, se autoři neshodují [Igarashi 2014, Hira 2007, Ogawa 2001]. Některé spektroskopické studie ukázaly, že Bach1 obsahuje pro vazbu hemu dva typy vazných míst s různou koordinační strukturou a že se na čtyři CP motivy na C-konci Bach1 vážou čtyři molekuly hemu. Tyto výsledky vedly k závěru, že hem reguluje vazbou na různá místa v molekule Bach1 dvě odlišné aktivity tohoto transkripčního faktoru - jeho

vazbu na DNA a export z jádra [Hira 2007]. Jiné studie popisují, že Bach1 interaguje pouze s jednou molekulou hemu [Ogawa 2001]. Za účelem vysvětlení této diskrepance jsme provedli spektroskopické titrační experimenty se zvyšující se koncentrací hemu v roztocích proteinu Bach1. Naše detailní spektroskopická analýza ukázala, že se na protein Bach1 vážou právě dvě molekuly hemu. Tento výsledek jsme ověřili také pomocí metody atomové absorpční spektrometrie, kterou jsme detekovali množství železa, resp. iontu železa, v preparátech proteinu Bach1.

Jako hlavní metoda studia molekulárního mechanismu působení a funkce proteinu Bach1 byla zvolena metoda HDX-MS, která je velmi vhodná přesně pro takové účely, kdy chceme sledovat strukturní změny proteinů způsobené vazbou hemu a přenosem signálu. Tato metoda byla již v naší laboratoři úspěšně využita ke sledování strukturních změn vyvolaných meziproteinovými interakcemi a vazbou různých ligandů při studiu hemového senzoru AfGcHK (Stranava 2016a, KAPITOLA 4.1), a zdála se proto být vhodná i pro analýzu konformačních změn transkripčního faktoru Bach1. V rámci experimentů pomocí metody HDX-MS jsme porovnávali dva stavy proteinu Bach1, a to jeho holo formu (s navázanou molekulou hemu) a apo formu (bez hemu). Prvotní studie sice zatím neodhalila podmínky vhodné pro pozorování strukturních změn proteinu Bach1 způsobené vazbou hemu na protein, nicméně námi získané výsledky jsou ve shodě s obecnou strukturou proteinu Bach1 (*obr. 10, str. 38*). Jeho dvě funkční domény (BTB a bZIP doména) jsou spíše strukturované, což naznačuje fakt, že vodíkové atomy v těchto oblastech byly vyměňovány za atomy deuteria jen velmi pomalu a postupně stupeň deuterace rostl. Ostatní části proteinu byly naopak deuterovány asi z 60 % téměř okamžitě a stupeň deuterace se už v čase neměnil. To naznačuje, že většinu proteinu Bach1 tvoří sekvence bez sekundárních struktur, tedy nestrukturované a molekulám rozpouštědla více přístupné oblasti. Pro sledování významnějších strukturních změn v molekule proteinu Bach1 bude pravděpodobně potřeba zapojit do studie také interakčního partnera proteinu Bach1, transkripční faktor MafK, společně s DNA, na kterou se komplex Bach1-MafK váže. Od dalších strukturních studií Bach1 (a MafK) pomocí HDX-MS jsme však byli nuceni upustit. Příčinou bylo nedostatečné pokrytí sekvence proteinu při proteolytickém štěpení, kdy v sekvenci chybí zejména klíčové oblasti obsahující CP-motivy, na které se molekuly hemu vážou (*obr. 10, str. 38*).



Pro další studie bylo potřeba připravit také interakčního partnera Bach1, transkripční faktor MafK, který s Bach1 vytváří heterodimery. Protein MafK se nám ale nepodařilo izolovat ve formě FLAG-tag ani His-tag proteinu. Po dlouhodobých obtížích jsme připravili MafK ve formě fúzního proteinu s MBP. Při pokusu o odštěpení této purifikační (a stabilizační) značky se bohužel samotný MafK stával nestabilním a precipitoval. Rozhodli jsme se tedy pracovat s fúzním proteinem MBP-MafK. Problémem ale je, že připravený protein MBP-MafK jednak obsahoval velké množství DNA, po jejímž odstranění DNasou protein degradoval, a jednak je purifikační značka MBP mnohem větší (42,5 kDa) než samotný MafK (17,5 kDa). Není proto možné pro MBP-MafK předpokládat stejné vlastnosti a chování jako pro samotný MafK.

Výsledky diskutované v předchozích odstavcích, získané při studiu strukturně-funkčních vztahů transkripčního faktoru Bach1 nejsou sice zatím součástí žádné publikace, byly však prezentovány formou plakátových sdělení na dvou národních

konferencích, TOXCON 2017 (Plzeň, 21. – 23. 6. 2017) a XIX. Interdisciplinary meeting of young life scientists (Milovy, 20. – 23. 5. 2019), a dvou mezinárodních konferencích, FEBS 2018 (Praha, 7. – 12. 7. 2018) a Paris Redox 2018 (Paříž, 25. – 26. 6. 2018).

Druhým modelovým eukaryotickým senzorem hemu, kterým se disertační práce zabývá, je HRI, který na základě množství hemu v buňce reguluje expresi proteinů (KAPITOLA 1, str. 14). Tento protein byl rekombinantní expresí v bakteriálních buňkách připraven v dostatečném množství i čistotě. Aby mohla být optimalizována metoda stanovení enzymové aktivity kinasy HRI, bylo potřeba připravit také jeho proteinový substrát eIF2 α . Díky tomu pak mohla být ověřena schopnost hemu fosforylační aktivitu HRI inhibovat. Enzymová aktivita HRI a její inhibice hemem byly charakterizovány pomocí K_m , V_{max} a IC_{50} . Dále byl připraven mutant proteinu HRI G202S, který je spojován s výskytem rakoviny plic [Greenman 2007]. Zatím jsme však významnější změny v aktivitě enzymu nebo v míře inhibice hemem nepozorovali.

V rámci analýzy inhibičních vlastností hemu na aktivitu kinasy HRI jsme testovali také dvě látky, označované jako artesunát a MSU-39446, které inhibují aktivitu sensorových kinas skrze interakci s hemem [Zheng 2017]. V případě HRI, jehož fosforylační aktivita je vazbou hemu inhibována (KAPITOLA 1, str. 14), bychom očekávali, že interakce těchto látek s hemem způsobí obnovení aktivity HRI původně potlačené přítomností hemu. Sledovali jsme nejprve vliv inhibitorů artesunátu a MSU-39446 na samotnou fosforylační aktivitu HRI v prostředí bez hemu, přičemž jsme dospěli k závěru, že tyto látky samy o sobě nejsou schopny enzymovou aktivitu HRI ovlivnit a pro jejich správné působení je nutná přítomnost hemu. Bohužel se nám ale zatím nepodařilo prokázat ani obnovení aktivity HRI inhibované vazbou hemu pomocí těchto dvou látek. Vedle měření enzymové aktivity kinasy HRI byly však provedeny také spektroskopické studie, které ukázaly významné změny v UV-Vis spektrech proteinu HRI v přítomnosti daných inhibitorů. Přítomnost artesunátu ve směsi HRI s heminem (ve stavu Fe^{III}) způsobila mírný posun absorpčního maxima Soretova pásu. Po redukci hemového železa na Fe^{II} dokonce došlo ke vzniku nového absorpčního maxima při 470 nm. Tyto změny v absorpčních spektrech naznačují, že skutečně dochází k interakci mezi artesunátem a hemem vázaným v HRI, a to zejména, pokud je ion železa hemu v redukovaném stavu Fe^{II}. Vliv této interakce na enzymovou aktivitu HRI se však zatím prokázat nepodařilo. Na přípravě publikace na toto téma se intenzivně pracuje.

Abychom lépe porozuměli procesu, kterým hem reguluje aktivitu proteinů Bach1 a HRI, potřebujeme nejprve vysvětlit mechanismus, kterým se signál o přítomnosti hemu přenese a jak ovlivní jejich funkci (vazbu na DNA, resp. fosforylační aktivitu). Tyto výsledky by pak mohly přinést zásadní informace i pro lékařské účely, neboť proteiny Bach1 a HRI jsou bezesporu potenciálními terapeutickými cíli v boji proti chorobám spojeným s poruchami metabolismu hemu a oxidačním stresem. HRI se navíc pravděpodobně účastní rozvoje rakoviny plic, a odhalení strukturně-funkčních vztahů proteinu HRI by tak mohlo napomoci při rozvoji protinádorových léčiv. Nejprve však bude nutné pochopit a objasnit strukturní změny proteinů spojené s vazbou hemu (přijetím signálu) a následným přenosem signálu a vysvětlit molekulární mechanismus jejich působení. Naše znalosti o eukaryotických senzorech se tak v naší laboratoři budeme snažit dalšími analýzami rozšířit, a napomoci tak v pochopení mechanismu přenosu signálu ve formě vazby hemu jako unikátní signální molekuly. Věříme, že stejně jako v případě bakteriálních hemových sensorů (KAPITOLY 4.1–4.3) přinese i studium eukaryotických sensorů hemu zásadní výsledky.

4. SOUBOR PUBLIKACÍ

4.1 Coordination and redox state-dependent structural changes of the heme-based oxygen sensor AfGcHK associated with intraprotein signal transduction

Stranava, M.; Man, P.; Skálová, T.; Kolenko, P.; Blaha, J.; Fojtikova, V.; Martínek, V.; Dohnálek, J.; Lengalova, A.; Rosůlek, M.; Shimizu, T.; Martínková, M.: *J. Biol. Chem.* (2017) 292, 20921–20935 (IF₂₀₁₉ 4,1).

Podíl předkladatelky na této práci: 20 % (*exprese a purifikace proteinu AfGcHK, technická asistence, příprava obrázků*)

potvrzeno korespondujícím autorem, doc. RNDr. Markétou Martínkovou, Ph.D.

4.2 Disruption of the dimerization interface of the sensing domain in the dimeric heme-based oxygen sensor AfGcHK abolishes bacterial signal transduction

Skalova, T.; Lengalova, A.; Dohnalek, J.; Harlos, K.; Mihalcin, P.; Kolenko, P.; Stranova, M.; Blaha, J.; Shimizu, T.; Martínková, M.: *J. Biol. Chem.* (2020) 295, 1587–1597 (IF₂₀₁₉ 4,1).

Podíl předkladatelky na této práci: 60 % (*exprese a purifikace mutantních forem proteinu AfGcHK, kinetické a oligomerizační analýzy, spektroskopická měření, vyhodnocení a zpracování výsledků, příprava schémat*) - jedná se o sdílené spoluautorství s Dr. Skálovou

potvrzeno korespondujícím autorem, doc. RNDr. Markétou Martínkovou, Ph.D.

4.3 Kinetic analysis of a globin-coupled diguanylate cyclase, YddV: Effects of heme iron redox state, axial ligands, and heme distal mutations on catalysis

Lengalova, A.; Fojtikova-Proskova, V.; Vavra, J.; Martínek, V.; Stranava, M.; Shimizu, T.; Martinkova, M.: *J. Inorg. Biochem.* (2019) 201, 110833–110842 (IF₂₀₁₆ 3,3).

Podíl předkladatelky na této práci: 65 % (*exprese a purifikace mutantních forem proteinu MBP-YddV, příprava wt MBP-YddV, spektroskopická měření, oligomerizační studie, zpracování a vyhodnocení výsledků, příprava obrázků*)

potvrzeno korespondujícím autorem, doc. RNDr. Markétou Martínkovou, Ph.D.

4.4 Heme: emergent roles of heme in signal transduction, functional regulation and as catalytic centres

Shimizu, T.; Lengalova, A.; Martínek, V.; Martinkova, M.: *Chem. Soc. Rev.* (2019) 48, 5624–5657 (IF₂₀₁₈ 40,4).

Podíl předkladatelky na této práci: 25 % (*řešerše týkající se proteinů Bach1 a HRI, technická asistence, příprava obrázků a schémat*)

potvrzeno korespondujícím autorem, doc. RNDr. Markétou Martínkovou, Ph.D.

5. ZÁVĚR

5. Závěr

Předkládaná disertační práce věnovaná studiu strukturně-funkčních vztahů modelových hemových sensorových proteinů si vzala na cíl prostudovat vlastnosti dvou prokaryotických hemových sensorů detekujících kyslík (*AfGcHK*, YddV) a dvou eukaryotických sensorů detekujících hem (Bach1 a HRI). Hlavními cíli této práce bylo popsat mezidoménový přenos signálu u proteinů *AfGcHK* a YddV a prostudovat vliv různých koordinačních a redoxních stavů hemového železa na strukturní a kinetické vlastnosti těchto proteinů. Cíle disertační práce byly naplněny, nejvýznamnější výsledky získané při zpracování této práce jsou přehledně shrnuty v následujících bodech.

Nejdůležitější poznatky získané při studiu mezidoménového přenosu signálu **prokaryotických sensorů kyslíku *AfGcHK* a YddV** lze shrnout následovně:

- ✓ Pomocí rentgenové krystalografie byly odhaleny rozdíly ve struktuře sensorové domény kinas *AfGcHK* při redukci hemového železa, tj. při přechodu z aktivní formy proteinu na formu neaktivní (KAPITOLA 4.1).
- ✓ Další strukturní studie pomocí metody HDX-MS ukázaly rozdíly v konformaci kinas *AfGcHK* v plnodélkovém stavu za různých redoxních a koordinačních stavů hemového železa (KAPITOLA 4.1).
- ✓ Oligomerizační studie a analýza enzymové aktivity mutantních forem proteinu *AfGcHK* potvrdily významný vliv dimerizačního rozhraní na správnou konformaci sensorové domény a následně na aktivitu funkční domény proteinu (KAPITOLA 4.2).
- ✓ Na základě získaných výsledků byl navržen mechanismus mezidoménového přenosu signálu u modelového hemového sensorového proteinu *AfGcHK* (KAPITOLY 4.1 a 4.2).
- ✓ Kinetická analýza diguanylátcyklasové reakce katalyzované hemovým senzorem YddV odhalila, že redoxní stav hemového železa a vazba různých ligandů na hem v sensorové doméně má výrazný vliv na enzymovou aktivitu jeho funkční domény (KAPITOLA 4.3).
- ✓ Výsledky strukturních a kinetických analýz modelových hemových sensorů *AfGcHK* a YddV poukázaly na některé společné a některé rozdílné rysy obou hemoproteinů a na základě těchto poznatků byl navržen obecný mechanismus přenosu signálu hemových sensorových proteinů (KAPITOLY 4.1–4.3).

Studium strukturně-funkčních vztahů **eukaryotických senzorů hemu HRI a Bach1** přineslo následující výsledky:

- ✓ Byly zavedeny a optimalizovány metody exprese a purifikace modelových eukaryotických proteinů.
- ✓ Sensory hemu Bach1 a HRI byly předběžně charakterizovány.
- ✓ Oligomerizační studie potvrdily, že protein Bach1 zaujímá v roztoku převážně formu dimeru.
- ✓ Spektrální analýza odhalila, že Bach1 interaguje se dvěma molekulami hemu.
- ✓ Za pomoci metody HDX-MS byla potvrzena obecná struktura proteinu Bach1, přičemž dvě funkční domény proteinu tvoří strukturované oblasti, avšak většina molekuly proteinu Bach1 jsou flexibilní a molekulám rozpouštědla více přístupné oblasti.
- ✓ Byla provedena pilotní enzymová charakterizace kinasy HRI pro účely dalších experimentů.
- ✓ Část disertační práce byla věnována rozsáhlé souhrnné publikaci, která se zabývá eukaryotickými hemovými senzory a přehledně shrnuje nově objevenou roli hemu jako signální molekuly (KAPITOLA 4.4).

Seznam použité literatury

- Abriata, L. A.; Albanesi, D.; Dal Peraro, M.; de Mendoza, D.: *Acc. Chem. Res.* **50**, 1359–1366 (2017).
- Aono, S.: *Acc. Chem. Res.* **36**, 825–831 (2003).
- Boczkowski, J.; Poderoso, J. J.; Motterlini, R.: *Trends Biochem. Sci.* **31**, 614–621 (2006).
- Burns, J. L.; Deer, D. D.; Weinert, E. E.: *Mol. BioSyst.* **10**, 2823–2826 (2014).
- Burns, J. L.; Rivera, S.; Deer, D. D.; Joynt, S. C.; Dvorak, D.; Weinert, E. E.: *Biochemistry* **55**, 6642–6651 (2016).
- Carrica, M. del C.; Fernandez, I.; Martí, M. A.; Paris, G.; Goldbaum, F. A.: *Mol. Microbiol.* **85**, 39–50 (2012).
- Chen, J. J.; London, I. M.: *Trends Biochem. Sci.* **20**, 105–108 (1995).
- Chen, J. J.: *Translational Control of Gene Expression*. Soneberg, N.; Hershey, J. W. B.; Mathews, M. B. (Eds) *Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY*, 529–546 (2000).
- Chen, J. J.: *Blood* **109**, 2693–2699 (2007).
- Connor, J. H.; Lyles, D. S.: *J. Biol. Chem.* **280**, 13512–13519 (2005).
- Cunningham, K. A.; Burkholder, W. F.: *Mol. Microbiol.* **71**, 659–677 (2009).
- Dioum, E. M.; Rutter, J.; Tuckerman, J. R.; Gonzalez, G.; Gilles-Gonzalez, M.-A.; McKnight, S. L.: *Science* **298**, 2385–2387 (2002).
- Du, Y.; Liu, G.; Yan, Y.; Huang, D.; Luo, W.; Martinkova, M.; Man, P.; Shimizu, T.: *BioMetals* **26**, 839–852 (2013).
- Fojtikova, V.; Stranova, M.; Vos, M. H.; Liebl, U.; Hranicek, J.; Kitanishi, K.; Shimizu, T.; Martinkova, M.: *Biochemistry* **54**, 5017–5029 (2015).
- Fojtikova, V.; Bartosova, M.; Man, P.; Stranova, M.; Shimizu, T.; Martinkova, M.: *BioMetals* **29**, 715–729 (2016).
- Girvan, H. M.; Munro, A. W.: *J. Biol. Chem.* **288**, 13194–13203 (2013).
- Greenman, Ch.; Stephens, P.; Smith, R.: *Nature* **446**, 153–158 (2007).
- Guengerich, F. P.; Yoshimoto, F. K.: *Chem. Rev.* **118**, 6573–6655 (2018).
- Gushchin, I.; Melnikon, I.; Polovinkin, V.; Ishchenko, A.; Yuzhakova, A.; Buslaev, P.; Bourenkov, G.; Grudin, S.; Round, E.; Balandin, T.; Borshchevskiy, V.; Willbold, D.; Leonard, G.; Bmdt, G.; Popov, A.; Gordeliy, V.: *Science* **356**, 10.1126/science.aah6345 (2017).
- Hanna, D. A.; Hu, R.; Kim, H.; Martinez-Guzman, O.; Torres, M. P.; Reddi, A. R.: *J. Biol. Chem.* **293**, 12378–12393 (2018).
- Hinnebusch, A. G.: *Nat. Struct. Mol. Biol.* **12**, 835–838 (2005).
- Hira, S.; Tomita, T.; Matsui, T.; Igarashi, K.; Ikeda-Saito, M.: *Life* **59**, 542–551 (2007).

- Hirai, K.; Martinkova, M.; Igarashi, J.; Saiful, I.; Yamauchi, S.; El-Mashtoly, S.; Kitagawa, T.; Shimizu, T.: *J. Inorg. Biochem.* **101**, 1172–1179 (2007).
- Huang, X.; Groves, J. T.: *Chem. Rev.* **118**, 2491–2553 (2018).
- Igarashi, J.; Kitanishi, K.; Martinkova, M.; Murase, M.; Iizuka, A.; Shimizu, T.: *Acta Chim. Slov.* **55**, 67–74 (2008a).
- Igarashi, J.; Murase, M.; Iizuka, A.; Pichierri, F.; Martinkova, M.; Shimizu, T.: *J. Biol. Chem.* **283**, 18782–18791 (2008b).
- Igarashi, J.; Kitanishi, K.; Shimizu, T.: Emerging roles of heme as a signal and the gas sensing site: Heme-sensing and gas-sensing proteins. In *Handbook of Porphyrin Science*, Kadish, K. M.; Smith, K. M.; Guilard, R. (Eds) *World Scientific Publishing, Hackensack, NJ, USA* **15**, 399–460 (2010).
- Igarashi, K.; Watanabe-Matsui, M.: *Tohoku J. Exp. Med.* **232**, 229–253 (2014).
- Igarashi, K.; Kurosaki, T.; Roychoudhuri, R.: *Nat. Rev. Immunol.* **17**, 437–450 (2017).
- Kadish, K. M.; Smith, K. M.; Guilard, R. (Eds): *Handbook of Porphyrin Science; World Scientific Publishing: Hackensack, NJ, USA; Vols. 1–15* (2010).
- Kang, Y.; Liu, R.; Wu, J.-X.; Chen, L.: *Nature* **574**, 206–210 (2019).
- Kitanishi, K.; Kobayashi, K.; Kawamura, Y.; Ishigami, I.; Ogura, T.; Nakajima, K.; Igarashi, J.; Tanaka, A.; Shimizu, T.: *Biochemistry* **49**, 10381–10393 (2010).
- Kitanishi, K.; Kobayashi, K.; Uchida, T.; Ishimori, K.; Igarashi, J.; Shimizu, T.: *J. Biol. Chem.* **286**, 35522–35534 (2011).
- Kurokawa, H.; Lee, D.-S.; Watanabe, M.; Sagami, I.; Mikami, B.; Raman, C. S.; Shimizu, T.: *J. Biol. Chem.* **279**, 20186–20193 (2004).
- Lambry, J.-C.; Stranava, M.; Lobato, L.; Martinkova, M.; Shimizu, T.; Liebl, U.; Vos, M. H.: *J. Phys. Chem. Lett.* **7**, 69–74 (2016).
- Lechardeur, D.; Cesselin, B.; Liebl, U.; Vos, M. H.; Fernandez, A.; Brun, C.; Gruss, A.; Gaudu, P.: *J. Biol. Chem.* **287**, 4752–4758 (2012).
- Lobão, J. B. D. S.; Gondim, A. C. S.; Guimarães, W. G.; Gilles-Gonzalez, M.-A.; Lopes, L. G. F.; Sousa, E. H. S.: *FEBS J.* **286**, 479–494 (2019).
- Lukat-Rodgers, G. S.; Correia, C.; Botuyan, M. V.; Mer, G.; Rodgers, K. R.: *Inorg. Chem.* **49**, 6349–6365 (2010).
- Martinkova, M.; Igarashi, J.; Shimizu, T.: *FEBS Letters* **581**, 4109–4114 (2007).
- Martinkova, M.; Kitanishi, K.; Shimizu, T.: *J. Biol. Chem.* **288**, 27702–27711 (2013).
- Mathews, M. B.; Sonenberg, N.; Hershey, J. W. B. (Eds): *Translational Control in Biology and Medicine, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY* (2007).
- Miksanova, M.; Igarashi, J.; Minami, M.; Sagami, I.; Yamauchi, S.; Kurokawa, H.; Shimizu, T.: *Biochemistry* **45**, 9894–9905 (2006).
- Motomura, T.; Suga, M.; Hienerwadel, R.; Nakagawa, A.; Lai, T.-L.; Nitschke, W.; Kuma, T.; Sugiura, M.; Boussac, A.; Shen, J.-R.: *J. Biol. Chem.* **292**, 9599–9612 (2017).
- Motterlini, R.; Otterbein, L. E.: *Nat. Rev. Drug Discovery* **9**, 728–743 (2010).

- Motterlini, R.; Foresti, R.: *Am. J. Physiol.: Cell Physiol.* **312**, C302–C313 (2017).
- Nakajima, K.; Kitanishi, K.; Kobayashi, K.; Kobayashi, N.; Igarashi, J.; Shimizu, T.: *J. Inorg. Biochem.* **108**, 163–170 (2012).
- Ogawa, K.; Sun, J.; Taketani, S.; Nakajima, O.; Nishitani, C.; Sassa, S.; Hayashi, N.; Yamamoto, M.; Shibahara, S.; Fujita, H.; Igarashi, K.: *EMBO J.* **20**, 2835–43 (2001).
- Omura, T.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **338**, 404–409 (2005).
- Pardee, K. I.; Xu, X.; Reinking, J.; Schuetz, A.; Dong, A.; Liu, S.; Zhang, R.; Tiefenbach, J.; Lajoie, G.; Plotnikov, A. N.; Botchkarev, A.; Krause, H. M.; Edwards, A.: *PLOS Biol.* **7**, e43. (2009).
- Pavlou, A.; Martínková, M.; Shimizu, T.; Kitanishi, K.; Stranava, M.; Loullis, A.; Pinakoulaki, E.: *Phys. Chem. Chem. Phys.* **17**, 17007–17015 (2015).
- Rao, M.; Herzik, M. A.; Iavarone, A. T. Jr.; Marietta, M. A.: *Biochemistry* **56**, 1274–1284 (2017).
- Reinking, J.; Lam, M. M. S.; Pardee, K.; Sampson, H. M.; Liu, S.; Yang, P.; Williams, S.; White, W.; Lajoie, G.; Edwards, A.; Krause, H. M.: *Cell* **122**, 195–207 (2005).
- Rodgers, K. R.: *Curr. Opin. Chem. Biol.* **3**, 158–167 (1999).
- Roumenina, L. T.; Rayes, J.; Lacroix-Desmazes, S.; Dimitrov, J. D.: *Trends Mol. Med.* **22**, 200–213 (2016).
- Sawai, H.; Shiro, Y.: *Gas Sensing in Cells*. Aono, S. (Ed): *The Royal Society of Chemistry*, 47–83 (2018).
- Schirmer, T.; Jenal, U.: *Nat. Rev. Microbiol.* **7**, 724–735 (2009).
- Sher, E. A.; Shaklai, M.; Shaklai, N.: *PLOS One* **7**, e33039 (2012).
- Shimizu, T.; Huang, D.; Yan, F.; Stranava, M.; Bartosova, M.; Fojtikova, V.; Martinkova, M.: *Chem. Rev.* **115**, 6491–6533 (2015).
- Stranava, M.; Martínková, M.; Stiborová, M.; Man, P.; Kitanishi, K.; Muchová, L.; Vitek, L.; Martínek, V.; Shimizu, T.: *J. Inorg. Biochem.* **140**, 29–38 (2014).
- Stranava, M.; Martínek, V.; Man, P.; Fojtikova, V.; Kavan, D.; Vaněk, O.; Shimizu, T.; Martinkova, M.: *Proteins* **84**, 1375–1389 (2016a).
- Stranava, M.: *Mechanismus přenosu signálu hemovými senzorovými proteiny detekujícími kyslík*. Disertační práce, *katedra biochemie, PŘF UK* (2016b).
- Tagliabue, L.; Maciag, A.; Antoniani, D.; Landini, P.: *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **59**, 477–484 (2010).
- Taguchi, S.; Matsui, T.; Igarashi, J.; Sasakura, Y.; Araki, Y.; Ito, O.; Sugiyama, S.; Sagami, I.; Shimizu, T.: *J. Biol. Chem.* **279**, 3340–3347 (2004).
- Tanaka, A.; Takahashi, H.; Shimizu, T.: *J. Biol. Chem.* **282**, 21301–21307 (2007).
- Tanaka, A.; Shimizu, T.: *Biochemistry* **47**, 13438–13446 (2008).
- Tang, X. D.; Xu, R.; Reynolds, M. F.; Garcia, M. L.; Heinemann, S. H.; Hoshi, T.: *Nature* **425**, 531–535 (2003).

- Tarnawski, M.; Barends, T. R. M.; Schlichting, I.: *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **71**, 2158–2177 (2015).
- Tsai, A.; Berka, V.; Martin, E.; Olson, J. S.: *Biochemistry* **51**, 172–186 (2012).
- Tsiftoglou, A. S.; Tsamadou, A. I.; Papadopoulou, L. C.: *Pharmacol. Ther.* **111**, 327–345 (2006).
- Tuckerman, J. R.; Gonzalez, G.; Sousa, E. H. S.; Wan, X.; Saito, J. A.; Alam, M.; Gilles-Gonzalez, M.-A.: *Biochemistry* **48**, 9764–9774 (2009).
- Tuckerman, J. R.; Gonzalez, G.; Gilles-Gonzalez, M.-A.: *J. Mol. Biol.* **407**, 633–639 (2011).
- Walker, J. A.; Rivera, S.; Weinert, E. E.: *Adv. Microb. Physiol.* **71**, 133–169 (2017).
- Wang, G.: *Metallomics* **9**, 634–645 (2017).
- Wek, R. C.; Jiang, H.-Y.; Anthony, T. G.: *Biochem. Soc. Trans.* **34**, 7–11 (2006).
- Willett, J. W.; Crosson, S.: *Mol. Microbiol.* **103**, 197–202 (2017).
- Yan, F.; Fojtikova, V.; Man, P.; Stráňava, M.; Martínková, M.; Du, Y.; Huang, D.; Shimizu, T.: *BioMetals* **28**, 637–652 (2015).
- Zhang, L.; Guarente, L.: *EMBO J.* **14**, 313–320 (1995).
- Zheng, H.; Colvin, C. J.; Johnson, B. K.; Kirchhoff, P. D.; Wilson, M.; Jorgensen-Muga, K.; Larsen, S. D.; Abramovitch, R. B.: *Nat. Chem. Biol.* **13**, 218–225 (2017).
- Zhou, Y.; Wu, H.; Zhao, M.; Chang, C.; Lu, Q.: *Clinic. Rev. Allerg. Immunol.* **50**, 345–356 (2016).
- Zschiedrich, C. P.; Keidel, V.; Szurmant, H.: *J. Mol. Biol.* **428**, 3752–3775 (2016).