

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

***AUTOREFERÁT DISERTAČNÍ PRÁCE***

*SUMMARY OF THE DOCTORAL THESIS*

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

Praha 2020

UNIVERZITA KARLOVA

**Přírodovědecká fakulta**

**Katedra biochemie**

Doktorský studijní program: Biochemie



RNDr. Alžběta Lengálová

**Studium struktury a funkce modelových hemových  
proteinů**

*AUTOREFERÁT DISERTAČNÍ PRÁCE*

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

Praha 2020

## 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. Disertační práce se věnuje dvěma skupinám hemových sensorových proteinů, a to prokaryotickým hemovým sensorům plyných molekul a eukaryotickým sensorům detekujícími 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 strukturní vlastnosti proteinu, a tyto konformační změny mají pak nepřímo 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.

## 1. 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]. Kromě prototypických a všeobecně známých rolí hemového komplexu ve fyziologických funkcích se postupně objevují další a další důležité role hemu. Tyto nově objevené úlohy hemu jsou zprostředkovány skupinou hemoproteinů označovaných jako **hemové sensorové proteiny**. V takových proteinech může hem fungovat jako místo detekce plynných molekul (tj. místo detekce signálu) nebo může být hem sám o sobě primárním signálem [Igarashi 2008, Martinkova 2013, Shimizu 2015]. Hemové sensorové proteiny tak můžeme rozdělit do dvou skupin, (1) „HEMOVÉ SENZORY PLYNŮ“ (hemové proteiny, které detekují plynné molekuly) a (2) „SENZORY HEMU“ (sensorové proteiny detekující hem).

První skupinu (HEMOVÉ SENZORY PLYNŮ) tvoří proteiny, které mají hem relativně pevně vázán ve své struktuře a je místem detekce plynných molekul, např. O<sub>2</sub>, 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 nepřímou, prostřednictvím vazby plynu, reguluje mnoho fyziologických funkcí [Shimizu 2015, Martinkova 2013, Sawai 2018, Kang 2019, Igarashi 2008]. Do této skupiny hemových sensorů patří dva prokaryotické proteiny, které byly studovány v rámci disertační práce, histidinkinasa *AfGCHK* a diguanylátcyklasa *YddV*.

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. Tyto senzory hemu regulují řadu významných fyziologických funkcí, např. transkripci a translaci některých proteinů, fosforylaci a degradaci proteinů atd. [Shimizu 2015, Martinkova 2013, Igarashi 2008]. Vazba hemu na tyto proteiny (nebo naopak disociace hemu z molekuly proteinu) způsobí aktivaci nebo deaktivaci těchto funkcí. Poškození popsaného systému signalizace a regulace může být spojováno s výskytem vážných onemocnění [Igarashi 2008]. Do této skupiny hemových sensorů řadíme také dva eukaryotické proteiny, kterými se disertační práce zabývá. Jsou jimi transkripční faktor *Bach1* a kinasa *HRI*.

### 1.1 Kinasa AfGcHK

AfGcHK (z anglického názvu *g*lobin-*c*oupled *h*istidine *k*inase from *A*naeromyxobacter *s*p. *F*w109-5) je hemový senzor detekující kyslík a 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 ( $\text{Fe}^{\text{II}}$ ) v sensorové doméně, což vede k významnému zvýšení autofosforylační aktivity jeho kinasové domény za pomoci intramolekulárního přenosu signálu [Willett 2017, Zschiedrich 2016, Kitanishi 2011, Martinkova 2013].

### 1.2 Diguanylátcyklasa YddV

Protein YddV (neboli *Ec*DosC) je hemový senzor detekující kyslík s diguanylátcyklasovou aktivitou z bakterie *Escherichia coli* [Kitanishi 2010, Tarnawski 2015]. 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 cyklický diguanosin-5'-monofosfát (*c*-di-GMP). *c*-di-GMP je důležitou molekulou signalizačních drah bakterií (tzv. druhý posel) a reguluje řadu klíčových fyziologických funkcí, jako je např. virulence bakterií a tvorba biofilmu [Schirmer 2009, Tuckerman 2011]. Vazba kyslíku na hem v sensorové doméně diguanylátcyklasy YddV způsobí zvýšení jeho enzymové aktivity, a podporuje tak přeměnu GTP na *c*-di-GMP [Tagliabue 2010].

### 1.3 Kinasa HRI

Senzorový hemoprotein HRI (z *angl.* *h*eme-*r*egulated *i*nhibitor), označovaný také jako „inhibitor, který je regulován hemem“, je kinasou eukaryotického iniciačního faktoru  $2\alpha$  (eIF2 $\alpha$ ), jejíž aktivita závisí na množství hemu. Tento enzym je aktivní pouze v nepřítomnosti hemu. Vazba hemu na HRI způsobí strukturní změny, které vedou k inhibici enzymové aktivity tohoto proteinu [Miksanova 2006, Martinkova 2007]. Protein HRI svou kinasovou aktivitou reguluje proteosyntézu. Aby eukaryotické buňky byly schopné přežít za stresových podmínek (nedostatek aminokyselin, virová infekce, akumulace denaturovaných proteinů nebo nedostatek hemu), sníží celkovou rychlost syntézy proteinů, přičemž inhibice proteosyntézy je zprostředkována právě fosforylací eIF2 $\alpha$  pomocí HRI [Wek 2006, Hinnebusch 2005, Connor 2005].

#### 1.4 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 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 [Igarashi 2014, Hira 2007]. 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 [Igarashi 2014, Zhou 2016, Hira 2007].

## 2. Cíle disertační práce

Hlavním cílem disertační práce bylo odhalit mechanismus mezidoménového přenosu signálu u dvou zástupců prokaryotických hemových sensorů kyslíku (*AfGcHK*, *YddV*) a u dvou zástupců eukaryotických sensorů 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 sensorů 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 diguanylátcyklosové 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 sensorů *AfGcHK* a *YddV*

V rámci studia strukturně-funkčních vztahů **eukaryotických sensorů 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

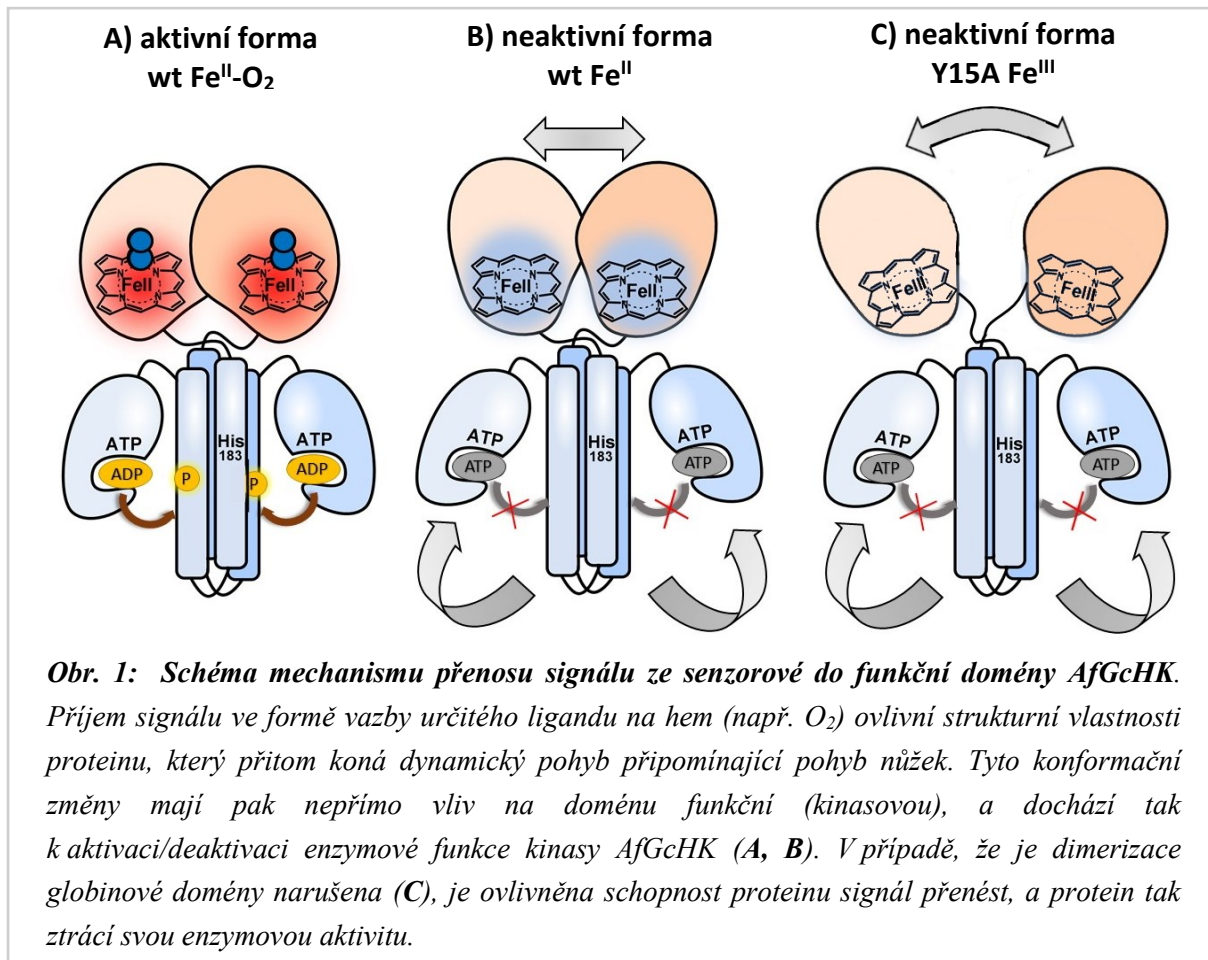
### 3. Výsledky a diskuze

Flexibilita plnodělkových kyslíkových senzorů 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*. Podařilo se nám získat krystal globinové domény *AfGcHK* s hemem v komplexu se železem ve stavu  $\text{Fe}^{\text{III}}\text{-CN}^-$  (aktivní forma) a tento krystal byl následně ponořen do redukujícího prostředí dithioničitanu sodného, abychom získali neaktivní formu proteinu (stav  $\text{Fe}^{\text{II}}$ ). Co se na první pohled zdálo jako neúspěch, se posléze ukázalo být velkou výhodou. Nezískali jsme čistý stav  $\text{Fe}^{\text{II}}$ , nýbrž směsnou formu, která vedle *AfGcHK* ve stavu  $\text{Fe}^{\text{III}}\text{-CN}^-$  obsahoval také hem v komplexu s  $\text{Fe}^{\text{II}}$ . Navzdory počátečním rozpakům pramenícím z neúspěšné přípravy čistého krystalu ve stavu  $\text{Fe}^{\text{II}}$  se nakonec unikátní struktura „směšného“ 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  $\text{Fe}^{\text{II}}$  a  $\text{Fe}^{\text{III}}\text{-CN}^-$ . Ve struktuře „směšného“ 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.

Výsledky rentgenové krystalografie pak velmi pěkně doplňují analýzy poskytnuté další metodou, vodík-deuteriovou výměnou v kombinaci s hmotnostní spektrometrií (HDX-MS). Bylo zjištěno, že redoxní stav hemového železa a přítomnost různých axiálních ligandů strukturu proteinu *AfGcHK* skutečně významně ovlivňuje. Všechny aktivní formy kinasy *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 ( $\text{Fe}^{\text{II}}$  a bez hemu). Nejvýraznější strukturní změny jsme přitom pozorovali v okolí hemu v globinové doméně a v oblasti kontaktu dvou monomerů, které tvoří funkční dimer (tzv. dimerizační rozhraní neboli „interface“). 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*. 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. Dynamické přeuspořádání molekuly proteinu *AfGcHK* ve stavu aktivní/neaktivní schematicky znázorňuje obr. 1A a 1B.



Pomocí rentgenové krystalografie jsme také zjistili, že sensorová doména proteinu *AfGcHK* za normálních podmínek tvoří 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 se právě na tento přístup zaměřila - získali jsme strukturu monomerní jednotky sensorové domény *AfGcHK*. Toho jsme dosáhli krystalizací sensorové domény proteinu ve stavu Fe<sup>III</sup>-CN<sup>-</sup> v prostředí vysoké koncentrace imidazolu. Nadbytek imidazolu způsobil záměnu ligandu CN<sup>-</sup> na iontu železa v hemu za molekulu imidazolu. Další molekula imidazolu interagovala s aminokyselinovým zbytkem Tyr15. Samotná výměna ligandů CN<sup>-</sup> za imidazol by disociací dimeru velmi pravděpodobně nezpůsobila, komplex Fe<sup>III</sup>-imidazol je totiž asociován s plně enzymově aktivní formou

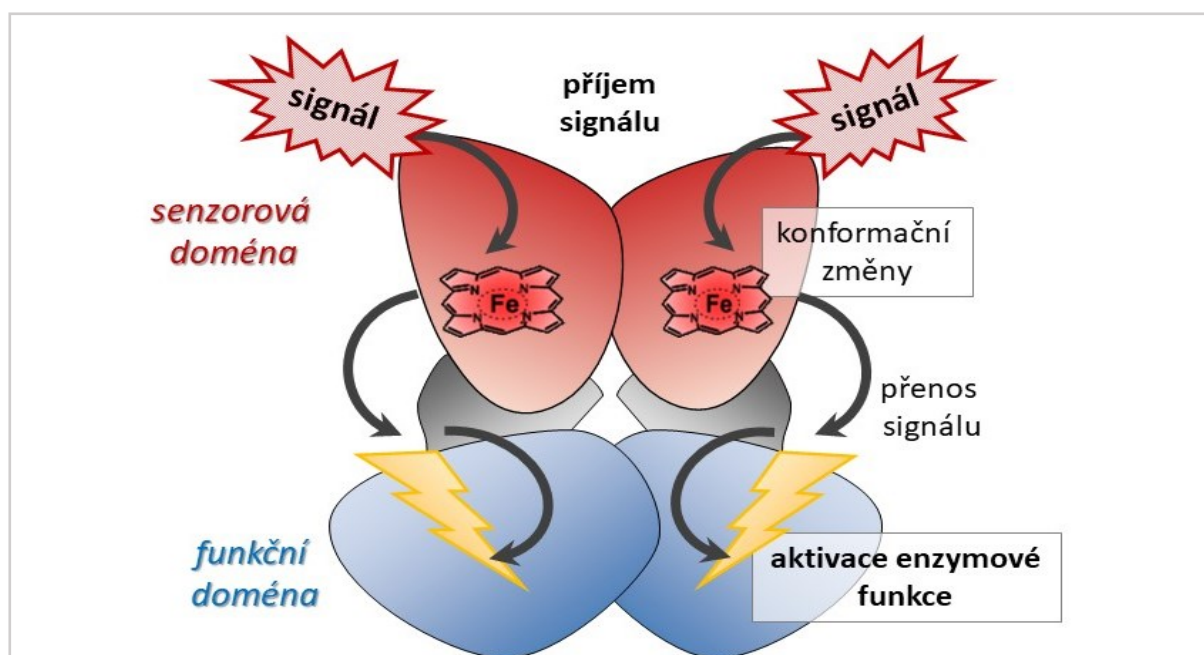
proteinu [Fojtikova 2015]. Naši pozornost ale přitáhla druhá molekula imidazolu a její interakce s Tyr15. Zaměřili jsme se proto poté na roli Tyr15 v dimerizaci globinových domén a následně v autofosforylační aktivitě proteinu. Analýzou vlastností mutantních forem *AfGcHK* jsme zjistili, že pokud je tyrosin v poloze 15 nahrazen jinou aromatickou aminokyselinou, globinová doména zůstává ve formě dimeru. Je-li však tyrosin nahrazen nearomatickou aminokyselinou, např. glycinem nebo alaninem, globinová doména se rozpadá na monomerní jednotky. Když vezmeme v úvahu fakt, že oligomerní stav sensorové domény proteinu *AfGcHK* 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. Tedy v případě, že je dimerizace globinové domény narušena, není možné dál signál přenést, a kinasová doména je tak neaktivní. Shrňme-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 nepřímý vliv i na autofosforylační aktivitu kinasy *AfGcHK* (obr. 1C, str. 8).

Druhým prokaryotickým hemovým senzorem, kterým se disertační práce zabývá, je protein YddV z bakterie *Escherichia coli*. 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 změny iontu železa hemu, ovlivňují jeho katalytickou aktivitu. 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  $Mn^{2+}$ . Nejaktivnější formou diguanylátcyklasy YddV, co se oxidačního a koordinačního stavu iontu železa hemu týče, je forma  $Fe^{III}$ . 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).

U některých kyslíkových sensorů s diguanylátcyklasovou aktivitou dochází 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. 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.

Studium vlivu změn v okolí hemu lokalizovaného v sensorové doméně na diguanylátcyklosovou 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. 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. Ukázka předpokládaného obecného mechanismu přenosu signálu, který je společný pro oba kyslíkové senzory, AfGcHK a YddV, je uveden na obr. 2.



**Obr. 2:** Návrh obecného mechanismu mezidoménového přenosu signálu hemových sensorů AfGcHK a YddV. Sensorová doména hemových sensorů AfGcHK a YddV obsahuje hem, který je místem detekce signálu. Po přijetí signálu sensorovou doménou dochází k takovým konformačním změnám, prostřednictvím nichž se signál přenáší dál na doménu funkční. Funkční doména má enzymovou aktivitu, která se přijetím signálu aktivuje (autofosforylace v případě AfGcHK nebo syntéza c-di-GMP v případě YddV). Významnou roli přitom pravděpodobně hraje dimerizační rozhraní sensorové domény obou proteinů a právě narušení dimerizace sensorové domény vede k poškození přenosu signálu.

Studium bakteriálních hemových sensorů přináší hodnotné informace například pro vývoj nových antibiotik a napomáhá v boji proti bakteriální rezistenci na již existující antibiotika. 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. Eukaryotické sensorové proteiny, které detekují hem, jsou vedle prokaryotických hemových sensorů plyných molekul druhou velkou skupinou hemoproteinů, které se disertační práce věnuje. V rámci disertační práce vznikl souhrnný článek, 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 vhléd také do základních molekulárních mechanismů fungování hemu jako signální molekuly, který je zásadní pro pochopení nově objevené role hemu ve fyziologických a patologických procesech. 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]. V této souvislosti je důležité připomenout, že ion železa hemu je schopen interakce s CO pouze ve své redukované formě, a není tedy zcela jasné, zda pozorované změny jsou vyvolány skutečně interakcí s CO, nebo k nim vedla „pouze“ redukce iontu železa hemu. 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.

V rámci zpracovávání disertační práce jsme se věnovali zejména dvěma zástupcům eukaryotických sensorů detekujících hem, a to transkripčnímu faktoru Bach1 a kinase HRI. Mnoho úsilí a času bylo věnováno optimalizaci exprese a purifikace studovaných eukaryotických proteinů, které ovšem nebyly vyváženy tak kvalitními výsledky jako v případě studia prokaryotických hemových sensorů. 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, která ukázala, že protein Bach1 se vyskytuje v roztoku převážně ve formě dimeru, přičemž malá část molekul proteinu zaujímá formu monomeru či tetrameru. Výsledky spektroskopických analýz proteinu Bach1 ukázaly, že se na protein Bach1 vážou právě dvě

molekuly hemu. Jako hlavní metoda studia molekulárního mechanismu působení a funkce proteinu Bach1 byla zvolena metoda HDX-MS. 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. Jeho dvě funkční domény (BTB a bZIP doména) jsou spíše strukturované, zatímco většinu proteinu Bach1 tvoří sekvence bez sekundárních struktur, tedy nestrukturované a molekulám rozpouštědla více přístupné oblasti.

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 přinese i studium eukaryotických sensorů hemu zásadní výsledky.

## 4. Závěr

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.

- ✓ Pomocí rentgenové krystalografie byly odhaleny rozdíly ve struktuře sensorové domény kinasy *AfGcHK* při redukci hemového železa, tj. při přechodu ze struktury sensorové domény asociované s aktivní formou proteinu na formu neaktivní.
- ✓ Další strukturní studie pomocí metody HDX-MS ukázaly rozdíly v konformaci kinasy *AfGcHK* v plnodélkovém stavu za různých redoxních a koordinačních stavů hemového železa v sensorové doméně.
- ✓ 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.
- ✓ Na základě získaných výsledků byl navržen mechanismus mezidoménového přenosu signálu u modelového hemového sensorového proteinu *AfGcHK*.
- ✓ 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.
- ✓ 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
- ✓ Byly zavedeny a optimalizovány metody exprese a purifikace modelových eukaryotických proteinů.
- ✓ Sensory hemu *Bach1* a *HRI* byly předběžně charakterizovány.
- ✓ Část disertační práce byla věnována rozsáhlé souhrnné publikaci, která se zabývá eukaryotickými hemovými senzory a přehledně shrnuje nově objevenou roli hemu jako signální molekuly.

## Seznam použité literatury

- Aono, S.: *Acc. Chem. Res.* **36**, 825–831 (2003).
- 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).
- Connor, J. H.; Lyles, D. S.: *J. Biol. Chem.* **280**, 13512–13519 (2005).
- Fojtikova, V.; Stranova, M.; Vos, M. H.; Liebl, U.; Hranicek, J.; Kitanishi, K.; Shimizu, T.; Martinkova, M.: *Biochemistry* **54**, 5017–5029 (2015).
- 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).
- Igarashi, J.; Murase, M.; Iizuka, A.; Pichierri, F.; Martinkova, M.; Shimizu, T.: *J. Biol. Chem.* **283**, 18782–18791 (2008).
- Igarashi, K.; Watanabe-Matsui, M.: *Tohoku J. Exp. Med.* **232**, 229–253 (2014).
- 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).
- 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).
- 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).
- Rodgers, K. R.: *Curr. Opin. Chem. Biol.* **3**, 158–167 (1999).
- 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).
- Shimizu, T.; Huang, D.; Yan, F.; Stranova, M.; Bartosova, M.; Fojtikova, V.; Martinkova, M.: *Chem. Rev.* **115**, 6491–6533 (2015).
- Tagliabue, L.; Maciag, A.; Antoniani, D.; Landini, P.: *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **59**, 477–484 (2010).
- Tarnawski, M.; Barends, T. R. M.; Schlichting, I.: *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **71**, 2158–2177 (2015).
- Tuckerman, J. R.; Gonzalez, G.; Gilles-Gonzalez, M.-A.: *J. Mol. Biol.* **407**, 633–639 (2011).
- 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).
- 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).

## CURRICULUM VITAE

### OSOBNÍ INFORMACE

Jméno a příjmení: *Alžběta Lengálová*  
 Datum narození: *25. ledna 1992*  
 Adresa: *Prokopova 529, 413 01 Roudnice n. L.*

### VZDĚLÁNÍ

- 2016 – dosud Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy, **doktorské studium (Ph.D.)**, studijní obor: Biochemie
- 2018 – 2020 Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy, Program celoživotního vzdělávání – na výkon povolání, **doplňující pedagogické studium chemie**, závěrečná práce: *Elektrochemie ve výuce chemie* (školitel: doc. RNDr. Václav Martínek, Ph.D.)
- 2019 Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy, **RNDr. v oboru biochemie**
- 2014 – 2016 Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy, **navazující magisterské studium (Mgr.)**, studijní obor: Biochemie, diplomová práce: *Studium vlastností protinádorových léčiv ellipticinu, etoposidu a doxorubicinu ve formě nanočástic* (školitel: prof. RNDr. Marie Stiborová, DrSc.)
- 2011 – 2014 Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy, **bakalářské studium (Bc.)**, studijní obor: Biochemie, bakalářská práce: *Detekce proteinu Hsp70 v rostlinách vystavených různým stresovým faktorům* (školitel: RNDr. Veronika Hýsková, Ph.D.)

### ŘEŠENÉ GRANTOVÉ PROJEKTY

- 2017 – 2019 hlavní řešitel projektu Grantové agentury Univerzity Karlovy (*Struktura a funkce modelových zástupců hemových sensorových proteinů a jejich participace na procesech ovlivňujících lidské zdraví*, GAUK 704217)

### JAZYKOVÉ ZNALOSTI

*anglický jazyk* (vyšší pokročilý, certifikát FCE)  
*německý jazyk* (středně pokročilý)  
*španělský jazyk* (mírně pokročilý)

### OSTATNÍ ZNALOSTI A ZKUŠENOSTI

- 2017 – dosud asistent v *Praktiku z klinické biochemie*, PŘF UK, katedra biochemie
- 2018 – 2019 vybrané přednášky předmětu *Biochemická farmakologie*, PŘF UK, katedra biochemie
- 2019 kurz *Scientific Writing*, PŘF UK
- 2017 kurz *Vysokoškolská pedagogika*, Program celoživotního vzdělávání, PŘF UK
- 2017 kurz *Praktická rétorika a prezentace*, Program celoživotního vzdělávání, PŘF UK
- 2016 – dosud administrativní práce v cestovní agentuře *Strašidelná Praha*  
 - práce na PC - MS Office (Word, Excel, PowerPoint), DS Visualizer, ChemSketch, OriginLab  
 - řidičský průkaz skupiny B



## PŘEHLED PUBLIKACÍ

### *Původní práce a práce publikované v časopisech s IF:*

1. Stranava, M.; Man, P.; Skálová, T.; Kolenko, P.; Blaha, J.; Fojtikova, V.; Martínek, V.; Dohnálek, J.; **Lengalova, A.**; Rosůlek, M.; Shimizu, T.; Martínková, M.: Coordination and redox state-dependent structural changes of the heme-based oxygen sensor AfGcHK associated with intraprotein signal transduction *J. Biol. Chem.* (2017) 292, 20921–20935 (**IF<sub>2019</sub> 4,1**).
2. Indra, R.; Černá, T.; Heger, Z.; Hraběta, J.; Wilhelm, M.; Dostálová, S.; **Lengálová, A.**; Martínková, M.; Adam, V.; Eckschlager, T.; Schmeiser, H. H.; Arlt, V. M.; Stiborová, M.: Ellipticine-loaded apoferritin nanocarrier retains DNA adduct-based cytochrome P450-facilitated toxicity in neuroblastoma cells. *Toxicology* (2019) 419, 40–54 (**IF<sub>2016</sub> 1,2**).
3. **Lengalova, A.**; Fojtikova-Proskova, V.; Vavra, J.; Martínek, V.; Stranava, M.; Shimizu, T.; Martinkova, M.: Kinetic analysis of a globin-coupled diguanylate cyclase, YddV: Effects of heme iron redox state, axial ligands, and heme distal mutations on catalysis. *J. Inorg. Biochem.* (2019) 201, 110833–110842 (**IF<sub>2016</sub> 3,3**).
4. Shimizu, T.; **Lengalova, A.**; Martínek, V.; Martinkova, M.: Heme: emergent roles of heme in signal transduction, functional regulation and as catalytic centres. *Chem. Soc. Rev.* (2019) 48, 5624–5657 (**IF<sub>2018</sub> 40,4**).
5. Skalova, T.; **Lengalova, A.**; Dohnalek, J.; Harlos, K.; Mihalcin, P.; Kolenko, P.; Stranava, M.; Blaha, J.; Shimizu, T.; Martínková, M.: Disruption of the dimerization interface of the sensing domain in the dimeric heme-based oxygen sensor AfGcHK abolishes bacterial signal transduction. *J. Biol. Chem.* (2020) 295, 1587–1597 (**IF<sub>2019</sub> 4,1**).

### *Abstrakty z konferencí a symposií uveřejněná ve sbornících a časopisech:*

6. Stiborová, M.; Mrázová, I.; **Lengálová, A.**; Dostálová, S.; Kizek, R.; Adam, V.; Frei, E.: An anticancer drug ellipticine is released from its multi-walled carbon nanotube forms and generates covalent DNA adducts *in vitro*. *21<sup>st</sup> Interdisciplinary Toxicological Conference TOXCON 2016* (22. – 24. 6. 2016, Stará lesná, Slovenská republika), *Interdisc. Toxicol.* 9 (Suppl 1), s. 58 (2016).
7. **Lengálová, A.**; Indra, R.; Černá, T.; Dostálová, S.; Heger, Z.; Kizek, R.; Frei, E.; Eckschlager, T.; Adam, V.; Stiborová, M.: Study on the release of an anticancer drug ellipticine from its multi-walled carbon nanotube forms and its capability of generating the covalent DNA adducts *in vitro*. *XXV. Biochemický sjezd* (13. – 16. 9. 2016, Praha). *Sborník přednášek a posterů, program*, s. 210 (2016). ISBN 978-80-270-0331-0.

8. **Lengálová, A.**; Vávra, J.; Mihalčín, P.; Watanabe-Matsui, M.; Igarashi, K.; Shimizu, T.; Martínková, M.: Structure and function relationship of a model heme-containing sensor protein – the mammalian transcription factor which responds to heme concentration, Bach1. *22<sup>nd</sup> Interdisciplinary Toxicological Conference TOXCON 2017* (21. – 23. 6. 2017, Plzeň), *Interdisc. Toxicol.* 10 (Suppl 1), s. 29 (2017).
9. Fojtikova, V.; Stranava, M.; **Lengalova, A.**; Shimizu T.; Martínková M.: The role of heme as an important mediator of biochemical processes. *42<sup>nd</sup> Congress of the Federation-of-European-Biochemical-Societies FEBS* (10. – 14. 9. 2017, Jeruzalém, Izrael), *FEBS J.* 284 (Suppl 1), s. 379 (2017).
10. **Lengálová, A.**; Vávra, J.; Mihalčín, P.; Watanabe-Matsui, M.; Igarashi, K.; Shimizu, T.; Martínková, M.: Bach1, a heme-containing mammalian transcription factor: study on structure and function relationship using HDX-MS. *Paris Redox 2018* (25. – 26. 6. 2018, Paříž, Francie), *ISANH Archive* 6, s. 107 (2018).
11. **Lengálová, A.**; Vávra, J.; Mihalčín, P.; Watanabe-Matsui, M.; Igarashi, K.; Shimizu, T.; Martínková, M.: Bach1, a heme-containing mammalian transcription factor: study on structure and function relationship. *43<sup>rd</sup> Congress of the Federation-of-European-Biochemical-Societies FEB* (7. – 12. 7. 2018, Praha), *FEBS OPEN BIO* 8 (Suppl 1), s. 356–357 (2018).
12. **Lengálová A.**; Vávra J.; Mihalčín P.; Watanabe-Matsui M.; Igarashi K.; Shimizu T.; Martínková M.: Study on structure and function relationship of the heme-containing sensor protein, Bach1. *XIX. Interdisciplinary meeting of young life scientists* (20. – 23. 5. 2019, Milovy), *Czech Chemical Society Symposium Series* 17 (1), s. 21 (2019).

**Plakátová sdělení bez uvedení abstraktu v sborníku příspěvků:**

13. Vávra, J.; Stráňava, M.; Fojtíková, V.; **Lengálová, A.**; Kraus, D.; Shimizu, T.; Martínková, M.: Signal Transduction in Heme-Containing Oxygen Sensor Proteins. *XX<sup>th</sup> International Conference on Oxygen Binding and Sensing Proteins, O<sub>2</sub>BiP* (3. – 6. 9. 2018, Barcelona, Španělsko).
14. **Lengálová, A.**; Mihalčín, P.; Skálová, T.; Kolenko, P.; Dohnálek, J.; Stráňava, M.; Martínková, M.: Mechanism of signal transduction in a two-component system formed by a globin-coupled histidine kinase, AfGCHK (a heme-based oxygen sensor). *44<sup>th</sup> Congress of the Federation-of-European-Biochemical-Societies FEBS* (6. – 11. 7. 2019, Krakov, Polsko).



CHARLES UNIVERSITY

**Faculty of Science**

**Department of Biochemistry**

Doctoral study program: Biochemistry



RNDr. Alžběta Lengálová

**Structure and function relationships of model  
hemoproteins**

*SUMMARY OF THE DOCTORAL THESIS*

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

Prague 2020

## Abstract

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 sensing 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* sensing 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 sensing domain dimerization interface arrangement on a signal transduction. When the dimerization of the sensing 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 sensing 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.

## 1. Introduction

In last few decades, heme-containing proteins attract more attention of scientific groups all over the world. The scientific interest in hemoproteins is absolutely understandable, because these proteins form a large group of biologically important molecules and are found in all known living organisms [Rodgers 1999, Shimizu 2015]. In addition to the prototypical and well-known roles of heme complex in physiological functions, more and more important roles of heme are now emerging. These newly discovered functions of heme are mediated by a group of hemoproteins called **heme sensor proteins**. In such proteins, heme may function as a sensing site for gaseous molecules (i.e. a signal detection site), or heme may act as the primary signal itself [Igarashi 2008, Martinkova 2013, Shimizu 2015]. Thus, heme sensor proteins can be divided into two groups, (1) "HEME-BASED GAS SENSORS" (hemoproteins that detect gaseous molecules) and (2) "HEME-RESPONSIVE SENSORS" (sensors that detect heme).

The first group mentioned above (HEM-BASED GAS SENSORS) consists of proteins in which the heme is bound relatively tightly and is the sensing site of gaseous molecules, e.g. O<sub>2</sub>, NO, CO. The activity of these proteins (most often phosphodiesterase, diguanylate cyclase or histidine kinase activity) depends on whether a gas molecule is bound to the heme or not. Hem thus indirectly, through the gas binding, regulates many physiological functions [Shimizu 2015, Martinkova 2013, Sawai 2018, Kang 2019, Igarashi 2008]. This group of heme sensors includes two prokaryotic proteins that were studied in the dissertation, the histidine kinase *AfGcHK* and the diguanylate cyclase *YddV*.

In the case of the second group of heme sensors (HEM SENSORS), the heme molecule functions as the first signal and the protein performs its function depending on the free heme concentration available. These heme sensors regulate a number of important physiological functions, such as transcription and translation of some proteins, phosphorylation and degradation of proteins, etc. [Shimizu 2015, Martinkova 2013, Igarashi 2008]. Heme binding (or, conversely, dissociation of heme from the protein molecule) causes activation or deactivation of proteins function. Damage to the described signaling and regulation system may be associated with the occurrence of serious diseases [Igarashi 2008]. Two eukaryotic proteins which the dissertation deals with, transcription factor *Bach1* and the kinase *HRI*, belong in this group of heme sensors.

### 1.1 AfGcHK histidine kinase

AfGcHK (globin-coupled histidine kinase from *Anaeromyxobacter* sp. Fw109-5) is a heme-based oxygen sensor and consists of an N-terminal (globin, sensor) domain that contains heme and a C-terminal (kinase, functional) domain that is responsible for the enzyme activity (autophosphorylation) of the protein. The diatomic oxygen molecule binds to heme iron ion ( $\text{Fe}^{\text{II}}$ ) in the sensing domain, leading to a significant increase in the autophosphorylation activity of its kinase domain through intramolecular signal transduction [Willett 2017, Zschiedrich 2016, Kitanishi 2011, Martinkova 2013].

### 1.2 YddV diguanylate cyclase

The YddV (or *EcDosC*) protein is a heme-based oxygen sensor with diguanylate cyclase activity from *Escherichia coli* [Kitanishi 2010, Tarnawski 2015]. YddV consists of an N-terminal heme-binding domain that has a globin structure and is a signal (oxygen) detecting domain, and a C-terminal functional domain that is responsible for catalyzation of the conversion of guanosine triphosphate (GTP) to cyclic diguanosine-5'-monophosphate (*c*-di-GMP). *c*-di-GMP is an important molecule of bacterial signaling pathways (so-called second messenger) and regulates a number of key physiological functions, such as bacterial virulence and biofilm formation [Schirmer 2009, Tuckerman 2011]. The binding of oxygen to heme in the sensing domain of the diguanylate cyclase YddV causes an increase in its enzyme activity, thus promoting the conversion of GTP to *c*-di-GMP [Tagliabue 2010].

### 1.3 HRI kinase

The heme-regulated inhibitor (HRI) is a kinase of eukaryotic initiation factor  $2\alpha$  (eIF2 $\alpha$ ) and its activity depends on a heme concentration. This enzyme is active only in the absence of heme. Binding of heme to HRI causes structural changes that lead to inhibition of the enzyme activity [Miksanova 2006, Martinkova 2007]. The HRI protein regulates proteosynthesis with its kinase activity. In order to survive under stress conditions (amino acid deficiency, viral infection, accumulation of denatured proteins or heme deficiency), eukaryotic cells decrease the rate of protein synthesis and this proteosynthesis inhibition is mediated by eIF2 $\alpha$  phosphorylation [Wek 2006, Hinnebusch 2005, Connor 2005].

#### **1.4 Bach1 transcription factor**

Another eukaryotic heme-responsive sensor protein is the transcription factor Bach1 (acronym for BTB domain and CNC homolog 1), also referred to as the leucine zipper transcription factor. In this system, heme regulates transcriptional activity, i.e. the binding affinity to DNA [Igarashi 2014, Hira 2007]. Bach1 is a mammalian transcription factor that acts as a repressor of "enhancers" of hemoxygenase 1 genes [Igarashi 2014, Hira 2007]. In the case of heme excess, the transcription is activated, on the other hand (in the case of heme deficiency) the transcription of hemoxygenase is inhibited. Hemoxygenase is an enzyme involved in heme degradation, and so it is logical that an excess of heme results in the transcription of a protein that removes this excess and degrades heme into less toxic products (CO and bilirubin). At low heme concentrations, Bach1 forms a heterodimer with proteins called Maf. This hetero complex then binds to the "enhancers" of the hemoxygenase gene, thereby blocking its expression [Igarashi 2014, Zhou 2016, Hira 2007].



## 2. Aims of the study

The main target of this thesis was to reveal the mechanism of interdomain signal transduction in two model prokaryotic heme-based oxygen sensors (*AfGcHK*, YddV) and two model eukaryotic heme-responsive sensors (HRI and Bach1). Emphasis was also put on the structural characterization of these model proteins.

In order to elucidate the interdomain signal transduction of the **prokaryotic oxygen sensors** *AfGcHK* and YddV, the following specific goals were set:

- to determine and describe the crystal structure of the *AfGcHK* sensing domain in various redox and ligand states of the heme iron
- to study the influence of various redox and ligand states of the heme iron in the sensing domain on the structure and kinase activity of the functional domain of *AfGcHK*
- to clarify whether there is a connection between sensing domains dimerization and the functional domains activity of the *AfGcHK* protein
- to determine the kinetic parameters of the diguanylate cyclase reaction catalyzed by the heme sensor YddV and describe the influence of different redox and ligand states of heme iron on this reaction
- to compare similar and different properties of the two model oxygen sensors *AfGcHK* and YddV

Within the study of structure and function relationships of **eukaryotic heme sensors** HRI and Bach1, the following specific goals were set:

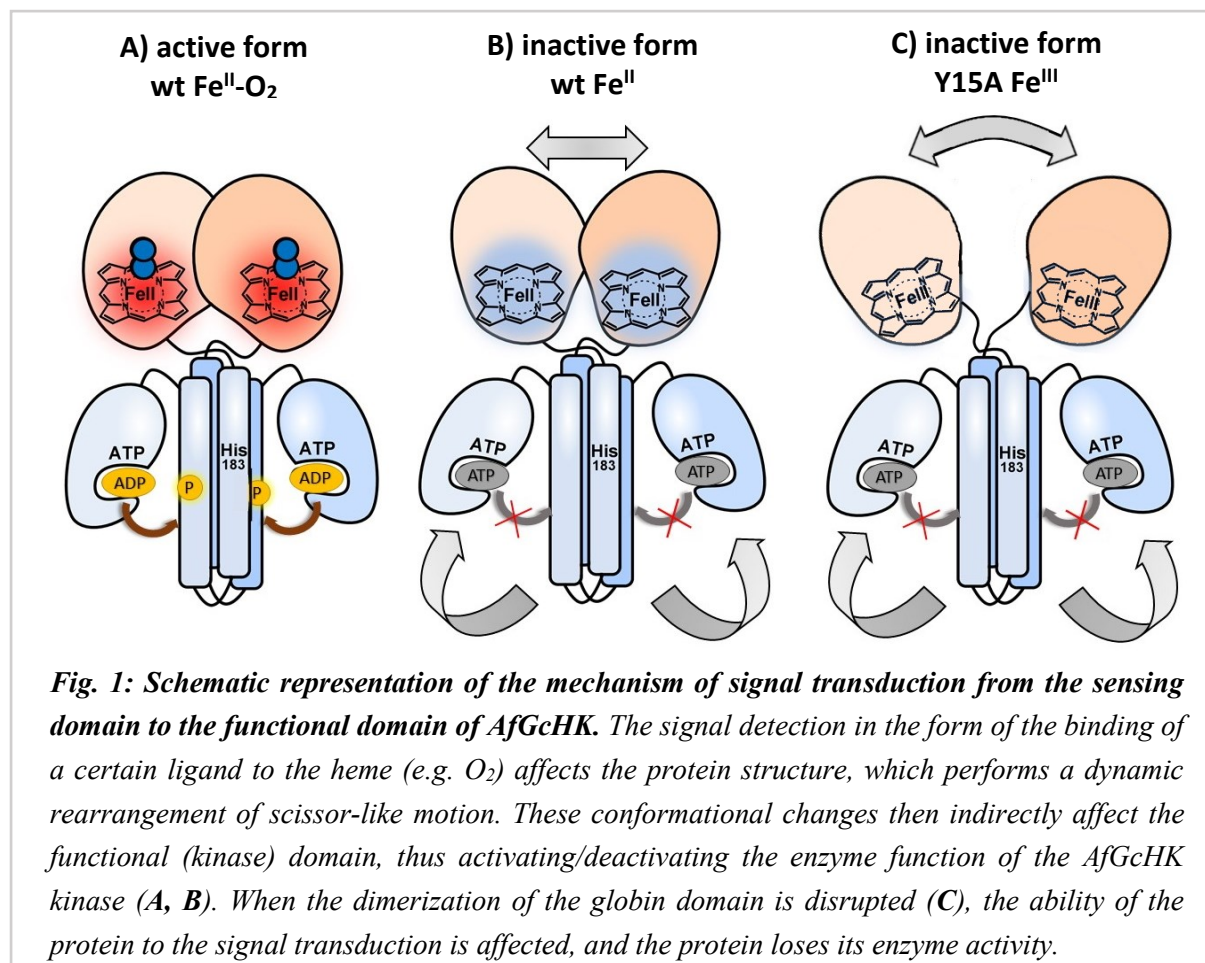
- to characterize the oligomeric state of the Bach1 protein and to determine how many heme molecules interact with the Bach1 protein
- to determine the structural properties of the transcription factor Bach1
- to assess the effect of heme binding on the enzyme activity of HRI kinase

### 3. Results and discussion

The flexibility of full-length oxygen sensors makes it very difficult to determine their structures, and thus difficult to understand their mechanism of signal transduction. The exact mechanism of signal transduction remains still unknown for almost all heme sensor proteins. However, in our laboratory, various analytical and biochemical methods helped us to approach the understanding of the mechanism of interdomain signal transduction of the *AfGcHK* protein. We obtained a crystal of the globin domain of *AfGcHK* with heme in complex with iron in the  $\text{Fe}^{\text{III}}\text{-CN}^-$  state (active form) and this crystal was subsequently immersed in a reducing medium of sodium dithionite to obtain an inactive form of the protein ( $\text{Fe}^{\text{II}}$  state). What seemed like a failure at a glance proved to be a great advantage later. We did not obtain the pure  $\text{Fe}^{\text{II}}$  state, but a mixed form which contained also heme in complex with  $\text{Fe}^{\text{II}}$  in addition to *AfGcHK* in the  $\text{Fe}^{\text{III}}\text{-CN}^-$  state. Despite the initial embarrassment stemming from the unsuccessful preparation of a pure crystal in the  $\text{Fe}^{\text{II}}$  state, the unique structure of the "mixed" crystal ultimately proved to be very beneficial. The crystal structure, in which approximately half of the molecules occupy the state associated with the active form and half the state associated with the inactive form, suggests structural changes associated with the transition between the active and inactive forms of the protein far more than two separate crystals of  $\text{Fe}^{\text{II}}$  and  $\text{Fe}^{\text{III}}\text{-CN}^-$  states. In the structure of a "mixed" crystal, we observe the true superposition of both states due to the natural overlapping of the structures over the hem iron, and we can easily observe the motion that the protein molecule performs when activating and deactivating its kinase activity.

The X-ray crystallography results were then appropriately completed by the analyzes provided by another method, hydrogen-deuterium exchange coupled to mass spectrometry (HDX-MS). It was found that the heme iron redox state and the presence of various axial ligands significantly affect the structure of the *AfGcHK* protein. All active forms of *AfGcHK* kinase ( $\text{Fe}^{\text{III}}\text{-CN}^-$ ,  $\text{Fe}^{\text{III}}\text{-OH}^-$ ,  $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-O}_2$ ) showed a very similar structural arrangement which differs from the structures for inactive forms ( $\text{Fe}^{\text{II}}$  and the structure lacking heme). The most significant structural changes were observed in the vicinity of heme in the globin domain and in the dimerization interface. Thus, the HDX-MS data identified the key regions of the protein for signal transduction, helping to reveal the molecular mechanism of action of the *AfGcHK* heme sensor. Our results obtained by HDX-MS analysis for active and inactive forms of *AfGcHK* protein suggest that the structure of the protein performs a scissor-like motion during

the transition from active to inactive state (and vice versa). The dynamic rearrangement of the *AfGcHK* protein in the active/inactive state is schematically shown in *Figs 1A* and *1B*.



Using X-ray crystallography, we also found that the sensing domain of the *AfGcHK* protein forms dimers under normal conditions. The active form of the protein has a very tight dimerization interface of the sensing domain, while in the structure of the inactive the dimerization interface is more solvent accessible. Thus, it can be assumed that the proximity of the two dimer units of the sensing domain is very important for its function. It could bring really interesting and unique results if we could observe structural changes in the sensing domain under the condition that the individual subunits of the dimer were completely dissociated from each other. Another study focused just on this approach - we obtained the monomeric structure of the *AfGcHK* sensing domain. We achieved this by crystallization of the sensor in the Fe<sup>III</sup>-CN<sup>-</sup> state under high concentration of imidazole. The excess of imidazole caused an exchange of the CN<sup>-</sup> ligand for the imidazole molecule. Another imidazole molecule interacted with the amino acid residue Tyr15. The exchange of CN<sup>-</sup> ligand for imidazole alone would cause the dimer dissociation only very unlikely, because the

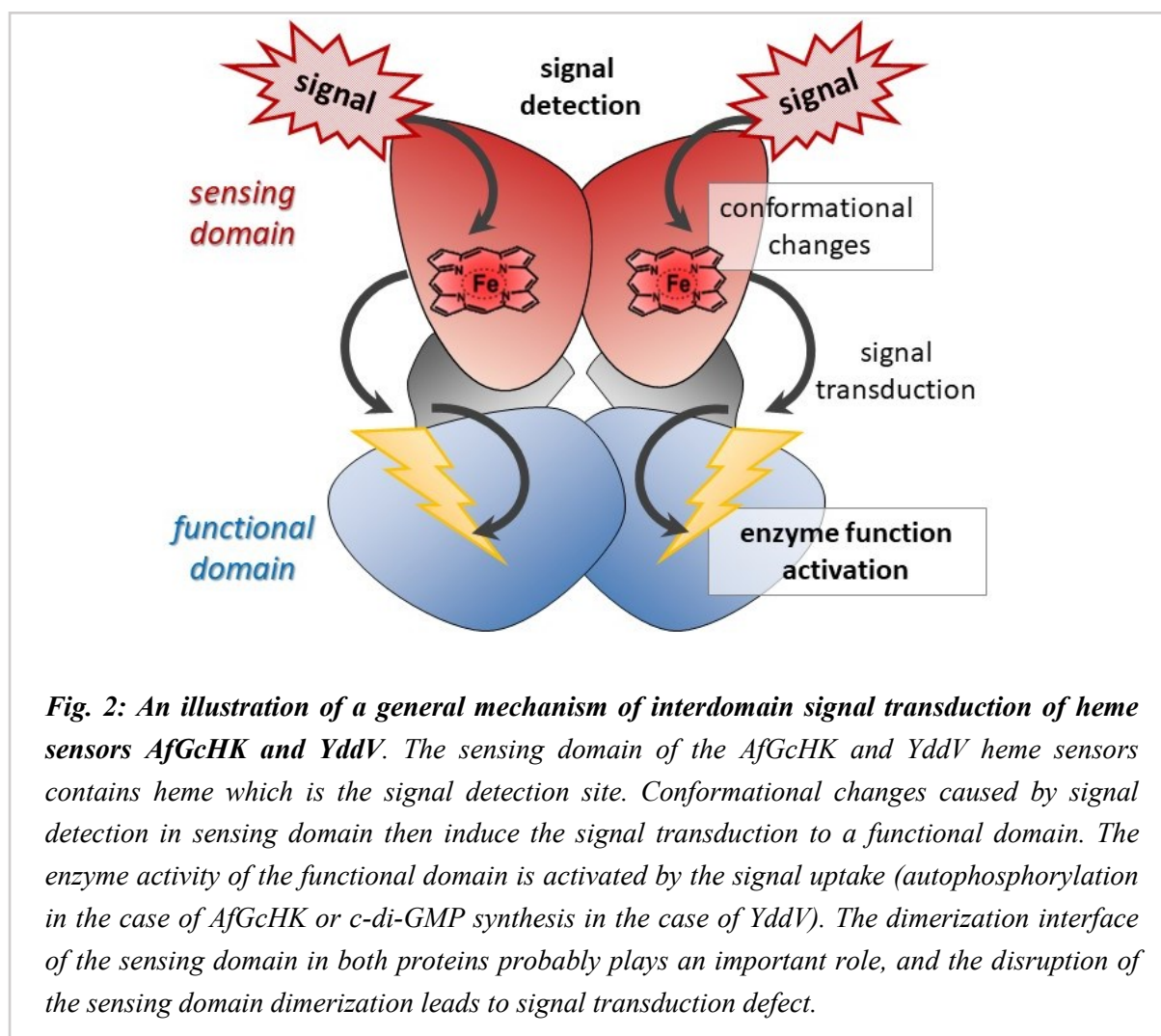
Fe<sup>III</sup>-imidazole complex is associated with a fully active form of the protein [Fojtikova 2015]. However, our attention was drawn to the second molecule of imidazole and its interaction with Tyr15. We therefore focused on the role of Tyr15 in the dimerization of globin domains and subsequently in the autophosphorylation activity of the protein. By analyzing the properties of the mutant forms of *AfGcHK*, we found that when the tyrosine at position 15 is replaced by another aromatic amino acid, the globin domain remains in the form of a dimer. However, when tyrosine is replaced by a non-aromatic amino acid, such as glycine or alanine, the globin domain dissociates into monomeric units. Considering the fact that the oligomeric state of the sensing domain of the *AfGcHK* protein affects the enzyme activity, it is likely that the replacement of Tyr15 with another amino acid will alter the kinase activity of the protein. Therefore, we were not surprised that indeed two of the mutants (Y15A, Y15G) with a dissociated sensing domain and a loss of dimerization interface completely lost their enzyme activity. Thus, if the dimerization of the globin domain is disrupted, the protein is not able to further transmit the signal, and the kinase domain is thus inactive. Summarizing these results, Tyr15 plays undoubtedly a key role in the proper arrangement of the dimerization interface of the *AfGcHK* sensing domain, and thus the correct conformation of the protein, and thus indirectly affects the autophosphorylation activity of *AfGcHK* kinase (*Fig. 1C, p. 8*).

The second prokaryotic heme sensor which the dissertation deals with is the YddV protein from *Escherichia coli*. A detailed enzyme activity analysis of the YddV protein in various forms helped us to discover how changes in a sensing domain, meaning various ligand and redox states of the heme iron ion, affect its catalytic activity. Our results showed that the catalytic activity of diguanylate cyclase YddV exhibits Michealis-Menten kinetics, the pH optimum of this enzyme is 8.5–9.0 and the catalysis requires Mg<sup>2+</sup> or Mn<sup>2+</sup> ions. The most active form of the diguanylate cyclase YddV in terms of an oxidation and coordination state of the heme iron ion is the Fe<sup>III</sup> form. The activity of diguanylate cyclase then declined in the order Fe<sup>III</sup> > Fe<sup>II</sup>-O<sub>2</sub> > Fe<sup>III</sup>-CN<sup>-</sup>. Two forms of the YddV protein can be considered almost inactive, Fe<sup>II</sup> and Fe<sup>II</sup>-CO. The protein loses its enzyme activity completely if a sensory domain lacks heme (the mutant form of H98A is not able to bind heme due to the mutation).

For some oxygen sensors with diguanylate cyclase activity, the binding of oxygen to heme in the sensing domain and the binding of *c*-di-GMP as a product to an inhibitory site in the functional domain also change the oligomeric state of the protein [Burns 2014, Burns 2016]. However, we did not observe such changes in the oligomerization of the YddV protein. But, the enzymatically inactive mutant form H98A which is unable to bind heme forms predominantly octamers in solution. Mutant forms which have a reduced catalytic

activity due to mutations in the vicinity of heme (Leu65, Tyr43) tend to form tetramers. This fact suggests that the dimeric form is that one that has the correct conformation for the function of the cyclase domain of the YddV protein, and that the correct oligomeric state is crucial for the optimal sensing of heme sensor proteins.

The study of the effect of changes in the vicinity of heme in the sensing domain on diguanylate cyclase activity of the functional domain of the YddV protein has undoubtedly enriched our knowledge of the relationships between signal transduction, protein conformation and catalytic activity of the YddV protein. However, due to the lack of structural data of the full-length protein, the study is not fully complete because unfortunately, it was not possible to prepare a crystal of the full-length YddV protein or analyze this protein using HDX-MS so far. Further studies need to be performed to confirm whether structural changes in the sensing domain occur during signal transduction which then indirectly affect the activity of the functional domain. An illustration of a putative general signal transduction mechanism that both oxygen sensors, *AfGcHK* and YddV, share is shown in Fig. 2.



The study of bacterial heme sensors provides valuable information, for example, it helps to develop new antibiotics and to combat bacterial resistance to existing antibiotics. Although information about these proteins is very important for human health, we also try to aim our attention on eukaryotic hemoproteins which have more direct effect on human health and diseases. Eukaryotic heme-responsive sensor proteins are the second large group of hemoproteins that the dissertation deals with. A comprehensive review which fully focuses on the issue of eukaryotic sensor proteins and the hitherto recognized signal transduction mechanisms in these sensors was created as a part of the dissertation. This paper describes various heme sensors and clearly summarizes the role of heme as an activator or inhibitor of enzymatic reactions. It also offers an insight into the basic molecular mechanisms of heme functioning as a signaling molecule which is essential for understanding the newly discovered role of heme in physiological and pathological processes. Some issues regarding heme-responsive sensors remain unresolved. For example, there are discrepancies in discussions regarding the observation that the function of some hemoproteins is regulated by the redox state of heme iron [Carrica 2012, Motomura 2017], while for other hemoproteins the change in iron redox state is not sufficient and proper functioning requires an interaction with CO or another diatomic gas molecule [Aono 2003]. In this context, it is important to mention that the heme iron ion is only able to interact with CO in its reduced form, and it is therefore not clear whether the observed changes are associated actually with the interaction with CO or "only" with the reduction of heme iron. The scientific community is not united in this respect; in older publications, the differences between changes caused by CO binding and changes caused by different redox states of heme are often neglected and incorrectly discussed.

We focused on two model eukaryotic heme-responsive sensors, namely the transcription factor Bach1 and kinase HRI. Much effort and time has been devoted to optimizing the expression and purification of the studied eukaryotic proteins, which, unfortunately, have not been balanced with such quality results as in the case of prokaryotic heme sensors. However, after initial difficulties in preparing a suitable plasmid for expression in bacterial cells, the Bach1 protein was isolated in sufficient quantity and purity to perform several experiments. For example, an analysis of the oligomeric states of the Bach1 protein was performed by analytical ultracentrifugation which showed that the Bach1 protein is present in solution predominantly in the form of a dimer with a small proportion of the protein molecules taking the form of a monomer or tetramer. The results of spectroscopic analyzes of the Bach1 protein revealed that exactly two heme molecules bind to the Bach1 protein. The HDX-MS method was chosen as the main method of studying the molecular mechanism of

action and function of the Bach1 protein. Although the preliminary data has not yet revealed conditions suitable for observing the structural changes of the Bach1 protein caused by heme binding, the results obtained are in agreement with the general structure of the Bach1 protein. Its two functional domains (BTB and bZIP domain) are rather structured, while most of the Bach1 protein consists of sequences without secondary structures, i.e. unstructured and more solvent accessible parts.

The Bach1 and HRI proteins are undoubtedly potential therapeutic targets in the fight against diseases associated with heme metabolism disorders and oxidative stress. In addition, HRI is likely to be involved in the development of lung cancer, and revealing the structure and function relationships of the HRI protein could help in the development of anticancer drugs. First, however, it will be necessary to understand and clarify the structural changes associated with heme binding (signal uptake) and subsequent signal transduction, and to explain the molecular mechanism of their action. In our laboratory, we will try to expand our knowledge of eukaryotic sensors by further analyzes, and thus help in understanding the mechanism of signal transduction and the role of heme as a unique signal molecule. We believe that the study of eukaryotic heme sensors will bring valuable results as in the case of bacterial heme sensors.

## 4. Conclusion

The dissertation dedicated to the study of structure and function relationships of model heme sensor proteins aimed to study the properties of two prokaryotic heme-based oxygen sensors (*AfGcHK*, *YddV*) and two eukaryotic heme-responsive sensors (*Bach1* and *HRI*). Main targets of this thesis were to describe the interdomain signal transduction of *AfGcHK* and *YddV* proteins and to study the influence of different coordination and redox states of heme iron on the structural and kinetic properties of these proteins. The aims of the dissertation were fulfilled and the most important results obtained during the elaboration of this thesis are summarized in the following points.

- ✓ Using a method of X-ray crystallography, differences in the structure of the *AfGcHK* sensing domain during the transition from the structure associated with the active form to the inactive form were revealed.
- ✓ Further structural studies using the HDX-MS method showed differences in the conformation of the full-length *AfGcHK* under different redox and coordination states of heme iron in the sensing domain.
- ✓ Oligomerization studies and analysis of the enzyme activity of mutant forms of the *AfGcHK* protein confirmed the significant influence of the dimerization interface on the correct conformation of the sensing domain and subsequently on the activity of the functional domain.
- ✓ Based on the obtained results, the mechanism of interdomain signal transduction in the model heme sensor protein *AfGcHK* was proposed.
- ✓ Kinetic analysis of the diguanylate cyclase reaction catalyzed by the heme sensor *YddV* revealed that a redox state of heme iron and a binding of various ligands to heme in the sensing domain has a significant effect on the enzyme activity of its functional domain.
- ✓ The results of structural and kinetic analyzes of model heme sensors *AfGcHK* and *YddV* pointed out some similar and some distinct properties of these hemoproteins and a general mechanism of signal transduction of heme sensor proteins was proposed based on these results.
- ✓ Methods of expression and purification of model eukaryotic proteins were optimized.
- ✓ The heme sensors *Bach1* and *HRI* were preliminarily characterized.
- ✓ Part of the dissertation dedicated to an extensive review, which deals with eukaryotic heme sensors and clearly summarizes the newly discovered role of heme as a signaling molecule.



## References

- Aono, S.: *Acc. Chem. Res.* **36**, 825–831 (2003).
- 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).
- Connor, J. H.; Lyles, D. S.: *J. Biol. Chem.* **280**, 13512–13519 (2005).
- Fojtikova, V.; Stranova, M.; Vos, M. H.; Liebl, U.; Hranicek, J.; Kitanishi, K.; Shimizu, T.; Martinkova, M.: *Biochemistry* **54**, 5017–5029 (2015).
- 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).
- Igarashi, J.; Murase, M.; Iizuka, A.; Pichierri, F.; Martinkova, M.; Shimizu, T.: *J. Biol. Chem.* **283**, 18782–18791 (2008).
- Igarashi, K.; Watanabe-Matsui, M.: *Tohoku J. Exp. Med.* **232**, 229–253 (2014).
- 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).
- 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).
- 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).
- Rodgers, K. R.: *Curr. Opin. Chem. Biol.* **3**, 158–167 (1999).
- 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).
- Shimizu, T.; Huang, D.; Yan, F.; Stranova, M.; Bartosova, M.; Fojtikova, V.; Martinkova, M.: *Chem. Rev.* **115**, 6491–6533 (2015).
- Tagliabue, L.; Maciag, A.; Antoniani, D.; Landini, P.: *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **59**, 477–484 (2010).
- Tarnawski, M.; Barends, T. R. M.; Schlichting, I.: *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **71**, 2158–2177 (2015).
- Tuckerman, J. R.; Gonzalez, G.; Gilles-Gonzalez, M.-A.: *J. Mol. Biol.* **407**, 633–639 (2011).
- 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).
- 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).

---

## CURRICULUM VITAE

---

### PERSONAL INFORMATION

---

Name: *Alžběta Lengálová*  
Date of birth: *January 25<sup>th</sup> 1992*  
Address: *Prokopova 529, 413 01 Roudnice n. L.*

---

### EDUCATION

---

- 2016 – present* Faculty of Science, Charles University, **doctoral study (Ph.D.)**, study program: Biochemistry
- 2018 – 2020* Faculty of Science, Charles University, Lifelong learning program, **Complementary educational study of chemistry**, final thesis: *Electrochemistry in chemistry teaching* (supervisor: doc. RNDr. Václav Martínek, Ph.D.)
- 2019* Faculty of Science, Charles University, **RNDr. of biochemistry**
- 2014 – 2016* Faculty of Science, Charles University, **Master's degree (MSc.)**, study program: Biochemistry, diploma thesis: *The study of properties of anticancer drugs ellipticine, etoposide and doxorubicin in the forms of nanocarriers* (supervisor: prof. RNDr. Marie Stiborová, DrSc.)
- 2011 – 2014* Faculty of Science, Charles University, **Bachelor's degree (BSc.)**, study program: Biochemistry, bachelor thesis: *Detection of Hsp70 protein in plants exposed to various stress factors* (supervisor: RNDr. Veronika Hýsková, Ph.D.)

---

### PARTICIPATION IN GRANT PROJECTS

---

- 2017 – 2019* Grant Agency of Charles University (project *Structure and function relationship of model heme-containing sensor proteins and their participation in processes associated with human health*, GAUK 704217)

---

### LANGUAGE SKILLS

---

*English* (Upper-Intermediate, FCE)  
*German* (Intermediate)  
*Spanish* (Pre-Intermediate)

---

### OTHER SKILLS AND EXPERIENCE

---

- 2017 – present* teacher in *Practical course of Clinical Biochemistry*, Charles University
- 2018 – 2019* lecturer in *Biochemical pharmacology*, Charles University
- 2019* *Scientific Writing* course, Charles University
- 2017* *Teaching at University* course, Lifelong learning program, Charles University
- 2017* *Practical rhetoric and presentation*, Lifelong learning program, Charles University
- 2016 – present* administrative work at travel agency *Strašidelná Praha*
- IT skill - MS Office (Word, Excel, PowerPoint), DS Visualizer, ChemSketch, OriginLab
  - driving licence in B category

## LIST OF PUBLICATIONS

### *Original papers published in scientific journals:*

1. Stranava, M.; Man, P.; Skálová, T.; Kolenko, P.; Blaha, J.; Fojtikova, V.; Martínek, V.; Dohnálek, J.; **Lengalova, A.**; Rosůlek, M.; Shimizu, T.; Martínková, M.: Coordination and redox state-dependent structural changes of the heme-based oxygen sensor AfGcHK associated with intraprotein signal transduction *J. Biol. Chem.* (2017) 292, 20921–20935 (**IF<sub>2019</sub> 4,1**).
2. Indra, R.; Černá, T.; Heger, Z.; Hraběta, J.; Wilhelm, M.; Dostálová, S.; **Lengálová, A.**; Martínková, M.; Adam, V.; Eckschlager, T.; Schmeiser, H. H.; Arlt, V. M.; Stiborová, M.: Ellipticine-loaded apoferritin nanocarrier retains DNA adduct-based cytochrome P450-facilitated toxicity in neuroblastoma cells. *Toxicology* (2019) 419, 40–54 (**IF<sub>2016</sub> 1,2**).
3. **Lengalova, A.**; Fojtikova-Proskova, V.; Vavra, J.; Martínek, V.; Stranava, M.; Shimizu, T.; Martinkova, M.: Kinetic analysis of a globin-coupled diguanylate cyclase, YddV: Effects of heme iron redox state, axial ligands, and heme distal mutations on catalysis. *J. Inorg. Biochem.* (2019) 201, 110833–110842 (**IF<sub>2016</sub> 3,3**).
4. Shimizu, T.; **Lengalova, A.**; Martínek, V.; Martinkova, M.: Heme: emergent roles of heme in signal transduction, functional regulation and as catalytic centres. *Chem. Soc. Rev.* (2019) 48, 5624–5657 (**IF<sub>2018</sub> 40,4**).
5. Skalova, T.; **Lengalova, A.**; Dohnalek, J.; Harlos, K.; Mihalcin, P.; Kolenko, P.; Stranava, M.; Blaha, J.; Shimizu, T.; Martínková, M.: Disruption of the dimerization interface of the sensing domain in the dimeric heme-based oxygen sensor AfGcHK abolishes bacterial signal transduction. *J. Biol. Chem.* (2020) 295, 1587–1597 (**IF<sub>2019</sub> 4,1**).

### *Abstracts from conferences and symposia published in abstract collections:*

6. Stiborová, M.; Mrízová, I.; **Lengálová, A.**; Dostálová, S.; Kizek, R.; Adam, V.; Frei, E.: An anticancer drug ellipticine is released from its multi-walled carbon nanotube forms and generates covalent DNA adducts *in vitro*. *21<sup>st</sup> Interdisciplinary Toxicological Conference TOXCON 2016* (22<sup>nd</sup> – 24<sup>th</sup> June 2016, Stará lesná, Slovak Republic), *Interdisc. Toxicol.* 9 (Suppl 1), p. 58 (2016).
7. **Lengálová, A.**; Indra, R.; Černá, T.; Dostálová, S.; Heger, Z.; Kizek, R.; Frei, E.; Eckschlager, T.; Adam, V.; Stiborová, M.: Study on the release of an anticancer drug ellipticine from its multi-walled carbon nanotube forms and its capability of generating the covalent DNA adducts *in vitro*. *XXV. Biochemický sjezd* (13<sup>th</sup> – 16<sup>th</sup> November 2016, Prague). *Collection of oral and poster presentations, program*, p. 210 (2016). ISBN 978-80-270-0331-0.

8. **Lengálová, A.**; Vávra, J.; Mihalčín, P.; Watanabe-Matsui, M.; Igarashi, K.; Shimizu, T.; Martínková, M.: Structure and function relationship of a model heme-containing sensor protein – the mammalian transcription factor which responds to heme concentration, Bach1. *22<sup>nd</sup> Interdisciplinary Toxicological Conference TOXCON 2017* (21<sup>st</sup> – 23<sup>rd</sup> June 2017, Pilsen), *Interdisc. Toxicol.* 10 (Suppl 1), p. 29 (2017).
9. Fojtikova, V.; Stranova, M.; **Lengalova, A.**; Shimizu T.; Martínková M.: The role of heme as an important mediator of biochemical processes. *42<sup>nd</sup> Congress of the Federation-of-European-Biochemical-Societies FEBS* (10<sup>th</sup> – 14<sup>th</sup> November 2017, Jerusalem, Israel), *FEBS J.* 284 (Suppl 1), p. 379 (2017).
10. **Lengálová, A.**; Vávra, J.; Mihalčín, P.; Watanabe-Matsui, M.; Igarashi, K.; Shimizu, T.; Martínková, M.: Bach1, a heme-containing mammalian transcription factor: study on structure and function relationship using HDX-MS. *Paris Redox 2018* (25<sup>th</sup> – 26<sup>th</sup> June 2018, Paris, France), *ISANH Archive* 6, p. 107 (2018).
11. **Lengálová, A.**; Vávra, J.; Mihalčín, P.; Watanabe-Matsui, M.; Igarashi, K.; Shimizu, T.; Martínková, M.: Bach1, a heme-containing mammalian transcription factor: study on structure and function relationship. *43<sup>rd</sup> Congress of the Federation-of-European-Biochemical-Societies FEB* (7<sup>th</sup> – 12<sup>th</sup> July 2018, Prague), *FEBS OPEN BIO* 8 (Suppl 1), p. 356–357 (2018).
12. **Lengálová A.**; Vávra J.; Mihalčín P.; Watanabe-Matsui M.; Igarashi K.; Shimizu T.; Martínková M.: Study on structure and function relationship of the heme-containing sensor protein, Bach1. *XIX. Interdisciplinary meeting of young life scientists* (20<sup>th</sup> – 23<sup>rd</sup> May 2019, Milovy), *Czech Chemical Society Symposium Series* 17 (1), p. 21 (2019).

***Poster presentations from conferences not published in collections or journals:***

13. Vávra, J.; Stráňava, M.; Fojtíková, V.; **Lengálová, A.**; Kraus, D.; Shimizu, T.; Martínková, M.: Signal Transduction in Heme-Containing Oxygen Sensor Proteins. *XX<sup>th</sup> International Conference on Oxygen Binding and Sensing Proteins, O<sub>2</sub>BiP* (3<sup>rd</sup> – 6<sup>th</sup> September 2018, Barcelona, Spain).
14. **Lengálová, A.**; Mihalčín, P.; Skálová, T.; Kolenko, P.; Dohnálek, J.; Stráňava, M.; Martínková, M.: Mechanism of signal transduction in a two-component system formed by a globin-coupled histidine kinase, AfGCHK (a heme-based oxygen sensor). *44<sup>th</sup> Congress of the Federation-of-European-Biochemical-Societies FEBS* (6<sup>th</sup> – 11<sup>th</sup> July 2019, Krakow, Poland).