

NOVÁ ROLE HEMU VE ZDRAVÍ A NEMOCI – HEMOVÉ SENZOROVÉ PROTEINY

Tento článek je součástí seriálu *Ženy v české chemii*

MARKÉTA MARTÍNKOVÁ

Katedra biochemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova, Hlavova 2030, 128 43 Praha 2
marketa.martinkova@natur.cuni.cz

Klíčová slova: hem, hemoproteiny, hemové sensorové proteiny, přenos signálu

• <https://doi.org/10.54779/chl20220163>

Došlo 31.12.21, přijato 5.2.22.

Obsah

1. Úvod
2. Hem
3. Hemoproteiny
4. Hemové sensorové proteiny, které detegují přítomnost signální molekuly hemu
5. Hemové sensorové proteiny, které detegují signální molekuly plynu jejich interakcí s hemem
6. Závěr

1. Úvod

Zapojení železa do životně důležitých procesů na Zemi bylo pravděpodobně ranou událostí evoluce¹. Zpo-

čátku byly ionty železa využity jako jednoduché a hojně zastoupené donory elektronů a poté se tento prvek rozšířil jako esenciální součást řady proteinů. S rostoucí koncentrací kyslíku a současným snížením dostupnosti vodorozpustných sloučenin železa² si organismy musely vyvinout mechanismy pro velmi efektivní aerobní respiraci, ale zároveň zavést účinné strategie pro získávání, přepravu a skladování iontů železa³. Problematická je hlavně biologická dostupnost železitých iontů. Dosažitelná koncentrace Fe^{2+} iontů je cca $10^{-1} \text{ mol l}^{-1}$ a Fe^{3+} $10^{-18} \text{ mol l}^{-1}$ při pH 7. Železité ionty mají ve vodném prostředí tendenci hydrolyzovat na hydroxid železitý a následně tvořit agregáty, čímž se ještě dále snižuje jejich dostupnost. Vzhledem k tomu, že za aerobních podmínek převládají Fe^{3+} ionty, je jejich špatná dostupnost často velkým problémem pro organismy závislé na tomto prvku. Dalším problémem spojeným s využitím iontů železa živými organismy je fakt, že tyto ionty mají tendenci zvyšovat oxidativní stres. Superoxidový anion radikál a peroxid vodíku jsou vedlejšími produkty normální aerobní respirace a jsou pouze mírně reaktivní ve vodných roztocích. Peroxid vodíku však v přítomnosti volných železnatých iontů vytváří vysoce škodlivé a reaktivní hydroxylové radikály tzv. Fentonovou reakcí. Hydroxylové radikály pak poškozují buněčné struktury, což může vést až k buněčné smrti⁴. V důsledku tohoto jevu si většina aerobních organismů vyvinula speciální proteiny k bezpečné přepravě iontů železa⁵ a také k účinné obraně před reaktivními formami kyslíku⁶.

Během evoluce se železo rozšířilo napříč všemi biologickými systémy. Mezi proteiny s obsahem tohoto prvku mají zvláštní postavení tzv. Fe-S proteiny (např. rubre-



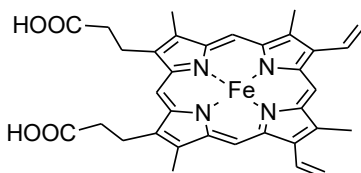
Doc. RNDr. Markéta Martínková, Ph.D. se narodila v roce 1976 v Opavě. Vystudovala obor biochemie na Přírodovědecké fakultě Univerzity Karlovy (PřF UK); v roce 2003 zde obhájila disertační práci. Několik let (2004–2006) pak působila na Tohoku Univerzitě v japonském městě Sendai a s japonskými kolegy – a nejen s nimi – intenzivně stále spolupracuje v rámci mezinárodních projektů. Od roku 2020 například vede české zastoupení mezinárodního projektu s názvem „Prevence antibiotikové rezistence cílenou terapií pneumonií u dětí“ (TARGET). V současné době také vyučuje klinickou biochemii a biochemické aspekty biomedicíny na katedře biochemie, PřF UK. Garantuje bakalářský a navazující magisterský studijní program Biochemie a je členkou oborové rady doktorského studijního programu Biochemie PřF UK a doktorského studijního programu Biochemie a bioorganická chemie VŠCHT. Předmětem jejího vědeckého zájmu jsou především hemoproteiny a jejich vliv na zdraví a nemoci. Výzkum své vědecké skupiny specializuje na hemové sensorové proteiny, v nichž hem může působit jako vlastní signál anebo jako detekční místo pro molekuly plynů (například kyslík, oxid uhelnatý atd.). Je autorkou 48 publikací v mezinárodních vědeckých časopisech s více než 700 citacemi a h-indexem 13. Od roku 2013 byla studijní proděkanou PřF UK a od února 2022 zastává funkci studijní prorektorky Univerzity Karlovy. Kromě hemoproteinů a Univerzity Karlovy ji velkou radost dělají její dvě děti.

doxiny a feredoxiny) a hemoproteiny (např. hemoglobin a cytochromy), které tvoří samostatné vnitřně relativně jednotné skupiny. Další proteiny s obsahem železa nepatří do žádné z těchto skupin: jde o proteiny zajišťující jeho transport nebo ukládání (transferiny, feritin), ale i enzymy (např. některé dioxygenasy), nebo proteiny přenášející kyslík (hemerythrin)⁷. Tento přehledný referát se bude dále věnovat pouze hemoproteinům s tím, že v následující kapitole se nejprve zaměříme na výjimečné vlastnosti hemu a následně se soustředíme na novou, unikátní skupinu hemoproteinů s názvem hemové senzorní proteiny.

2. Hem

V hemu je atom železa koordinačně-kovalentně vázán ke čtyřem atomům dusíku tetrapyrrolového jádra, které je součástí struktury s názvem protoporfyrin IX (obr. 1). Porphyriny jsou obecně heterocyklické makrocyclické sloučeniny složené ze čtyř pyrrolových podjednotek propojených methinovými můstky a jednotlivé pyrrolové podjednotky nesou různé substituenty. Na osmi substituovatelných pozicích se vyskytují tři různé druhy substituentů, konkrétně dva vinylové zbytky, dvě propionové kyseliny a čtyři methylové skupiny (obr. 1). Porphyrin obsahuje 26 p-elektronů, z nichž 18 tvoří planární, kruhový konjugovaný systém⁸. V důsledku toho vykazují roztoky porfyrinů charakteristickou červenou barvu, protože silně absorbují záření ve viditelné oblasti elektromagnetického spektra. Závěrečnou a klíčovou reakcí biosyntézy hemu je právě vestavba Fe²⁺ do struktury protoporfyrinu IX. Průběh je katalyzován ferrochelatásou (hemsynthasou), jejímž kofaktorem jsou Fe-S klastry⁹. Zdá se tedy, že Fe-S proteiny jsou evolučně starší formou inkorporace iontů železa do proteinů než hemoproteiny.

V hemoproteinech se nejčastěji vyskytuje hem typu *b* (obr. 1). V odborné literatuře se označením „hem“ nazývá většinou právě hem typu *b*, tj. komplex protoporfyrinu IX s atomem železa¹⁰. V daleko menší míře se v hemoproteinech mohou vyskytnout další typy hemů (např. hem *a* nebo hem *c*), které se zpravidla liší od hemu *b* v substituentech porfyrinového skeletu. Hem typu *a* obsahuje dlouhý hydrofobní izoprenoidní řetězec a formylovou skupinu místo jednoho z methylových substituentů. Vinylové skupiny hemu typu *c* tvoří kovalentní thioetherové vazby s cysteinovými zbytky proteinu¹⁰.



Obr. 1. **Struktura hemu.** Na obrázku je konkrétně znázorněna struktura hemu typu *b*

Pro funkci hemu je zásadní, že kromě vazeb vzniklých se čtyřmi atomy dusíku porfyrinu se centrální atom železa může vázat i na jeden nebo dva další ligandy, které nazýváme axiální ligandy. Typickými axiálními ligandy jsou některé aminokyselinové postranní řetězce daného hemoproteinu; často se jedná o histidin, cystein, dále pak například o methionin, asparagin, tyrosin a lysin. Kromě toho může být jedna z axiálních pozic hemu přechodně prázdná nebo obsazená malými ligandy (molekulou diatomových plynů – O₂, CO a NO a dále pak např. CN⁻, OH⁻ a H₂O)¹¹. V neposlední řadě modulují vlastnosti hemu také celé distální, resp. proximální oblasti hemoproteinů, které jsou vyplněné aminokyselinovými zbytky proteinu bez přímé interakce s hemem (na rozdíl od axiálních ligandů), nicméně vytvářející vhodné prostředí pro funkci daného systému (například síť vodíkových vazeb apod.).

Pět 3d orbitalů volného železa je energeticky rovnocenných a obsazují se podle Hundova pravidla maximální multiplicity spinu¹². Tato energetická degenerace ovšem mizí, pokud je železo umístěno v elektromagnetickém poli určité symetrie. Když je centrální železo hemu – v prvním přiblížení – umístěno v poli s oktaedrickou symetrií; jeho d orbitály se tedy podle teorie ligandového pole štěpí podle rozdílné symetrie do dvou skupin: dva orbitály e_g (d_{x²-y²} a d_{z²}) a tři orbitály t_{2g} (d_{xy}, d_{xz} a d_{yz}). V závislosti na intenzitě štěpení ligandovým polem se mění velikost energetického rozdílu mezi oběma skupinami orbitalů (spektrochemické štěpení ΔE) a to umožňuje spárování elektronů, přechod z tzv. vysokospinového stavu do nízkospinového¹². Dalším faktorem, který má vliv na elektronovou strukturu hemového komplexu, je interakce mezi centrálním atomem železa a p-orbitaly axiálních ligandů, tzv. zpětná donace, „p-backbonding“. Uplatňuje se zejména u šestých (druhých axiálních) ligandů, jakými jsou malé diatomové molekuly (NO, CO, O₂ a CN⁻) a umožňuje vysvětlit i funkci hemových enzymů (cytochromů P450 a peroxidas)^{13,14}. Různorodá povaha axiálních ligandů centrálního atomu železa hemu má zásadní vliv nejen na spinový stav, ale také na redoxní potenciál studovaných hemoproteinů¹⁵. Redoxní potenciál iontu železa v různých hemoproteinech se tak pohybuje od –460 mV až do 400 mV (cit.^{16,17}). Jedinečná koordinační chemie železa umožnila evoluci hemoproteinů takovým způsobem, že vlastnosti železa hemu mohou být modulovány selektivními změnami v sekvenci proteinového řetězce. Výměnou axiálních ligandů je tak dosaženo optimálního přizpůsobení k funkci daného hemoproteinu.

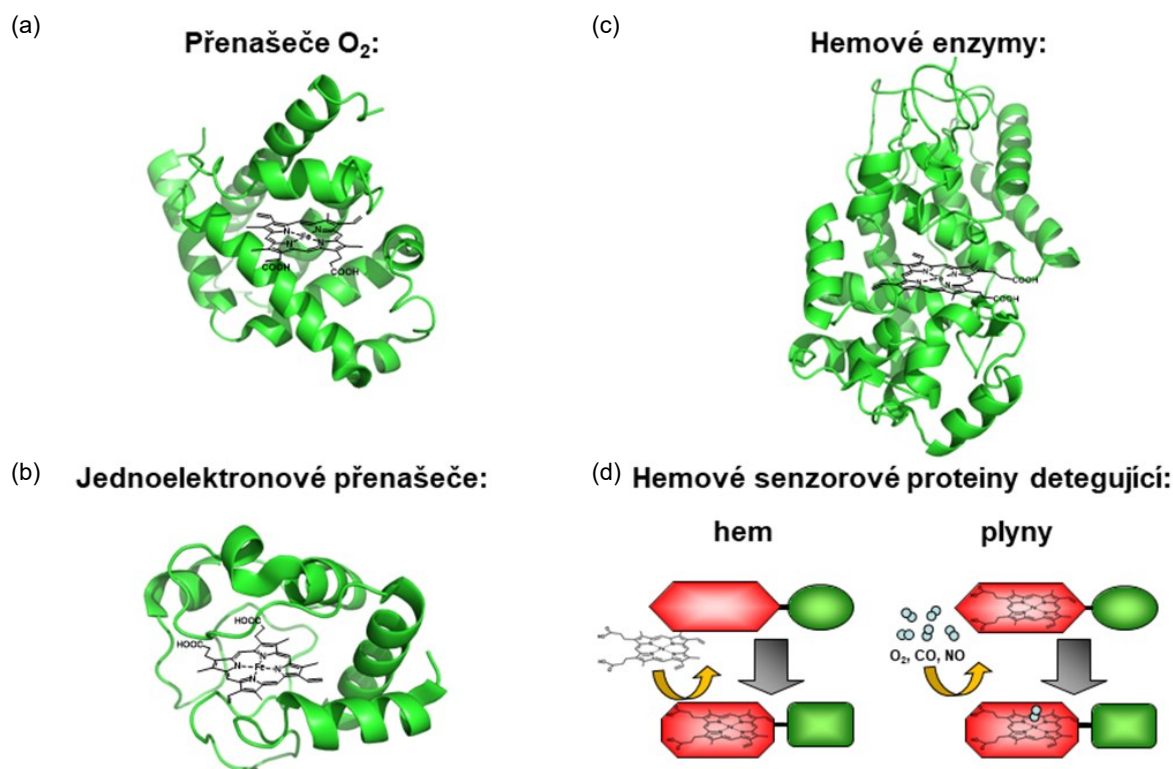
Volné molekuly hemu (někdy také nazývané labilní hem nebo ještě lépe směnitelný hem)¹⁸ jsou ve vodném roztoku prakticky nerozpustné a navíc jsou toxické¹⁹. Tato toxicita se projevuje tvorbou reaktivních forem kyslíku, analogicky jako je tomu v případě volného iontu železa (viz předchozí kapitola). Z obou těchto důvodů je koncentrace volného hemu v cytosolu buněk objektivně velmi nízká (v rozsahu cca 100 nmol l⁻¹)^{18,20,21}. Navíc se zdá, že v buňkách existují chaperony resp. transportní proteiny, které přenášejí hem z místa jeho syntézy do cílových hemoproteinů (např. glycerinaldehyd-3-fosfátdehydrogenasa)^{22–25}.

3. Hemoproteiny

Rozlišujeme následující čtyři základní skupiny hemoproteinů (obr. 2): (a) hemoproteiny zapojené do transportu a uskladnění kyslíku (např. hemoglobin, myoglobin); (b) hemoproteiny zodpovědné za transport elektronů (např. cytochrom c); (c) hemové enzymy schopné katalyzovat oxigenační, hydroxylační a/nebo peroxidasové reakce (např. cytochrom P450, peroxidasy). Zástupci všech těchto tří prototypových skupin hemoproteinů obsahují molekulu hemu, který tvoří samotné katalytické nebo funkční centrum. Výše uvedené proteiny jsou obvykle složeny z jedné kompaktní struktury (jedné domény)²⁶ (obr. 2). (d) V poslední době byla překvapivě objevena ještě čtvrtá skupina proteinů, která byla nazvána jako hemové sensorové proteiny^{27–31}. Zatímco hemoproteiny zapojené do uskladnění a transportu kyslíku jsou studovány posledních 150 let, hemoproteiny transportující elektrony známe více než století a hemové enzymy skoro sedmdesát let, historie objevů spojených s hemovými senzory je velmi krátká. Tato čtvrtá skupina hemoproteinů byla objevena teprve před asi dvaceti lety a významně změnila pohled vědecké

komunity na hemoproteiny a jejich vlastnosti. Jedná se totiž o zcela novou roli hemoproteinů v živých organismech. Tento referát se dále zaměří pouze na tuto čtvrtou a nejméně prozkoumanou skupinu hemoproteinů.

Nedávné studie odhalily, že hem jako takový může kontrolovat mnoho různorodých procesů v řadě organismů včetně člověka. Role hemu v takové regulaci je zprostředkována právě zcela novou skupinou hemoproteinů. Obecně je známo, že hem může působit jako vlastní signál sensorových proteinů, které detegují koncentraci volného (labilního) hemu (viz poslední odstavec předchozí části). Tuto podskupinu hemových sensorů nazýváme hemové sensorové proteiny, které detegují hem³². Molekula hemu také může vytvářet vazebné místo pro detekci plynných molekul v případě druhé podskupiny hemových sensorových proteinů, které detegují signální plynné molekuly jejich interakcí s hemem^{33,34}. Konkrétně ligace a/nebo naopak disociace molekuly hemu na/z první podskupiny hemových sensorových proteinů reguluje různé pochody v buňce, jako je interakce s nukleovými kyselinami (např. transkripce, translace, vazba DNA, zpracování mikroRNA), činnost iontových kanálů nebo aktivita klíčových enzymů



Obr. 2. Schématické znázornění struktur čtyř základních skupin hemoproteinů. (a) Přenašeče kyslíku – jako příklad je uvedena struktura myoglobinu; (b) Přenašeče elektronů – jako příklad struktury proteinu z této skupiny je uvedena struktura cytochromu c; (c) Hemové enzymy s ilustrační ukázkou struktury peroxidasy; (d) Hemové sensorové proteiny, které buď detegují hem nebo detegují plyny. Struktury přirozených forem hemových sensorových proteinů s kompletním proteinovým řetězcem nejsou zpravidla k dispozici, proto jsou zde struktury naznačeny jen schématicky. Koncepčně jsou obě podskupiny hemových sensorových proteinů vždy složeny alespoň ze dvou domén: sensorové domény (deteguje hem nebo plynnou molekulu interakcí s hemem – zde označena červenou barvou) a funkční (označena zelenou barvou). (Barevná verze obrázku je dostupná na webových stránkách časopisu Chemické listy)

(např. proteinkinas) a degradace proteinů, v reakci na dostupnost hemu³². Alternativně v hemových sensorových proteinech, které detegují plyny, působí hem jako interakční místo pro vazbu plyných molekul, hlavně O₂, NO a CO, a nepřímo tak reguluje mnoho fyziologických funkcí, včetně aktivit proteinkinas, guanylátcyklas, fosfodiesteras a transkripčních faktorů v reakci na dostupnost plynu^{33,34} (obr. 2, část d).

Molekula všech dosud známých zástupců z obou podskupin hemových sensorových proteinů je vždy složena alespoň ze dvou domén: sensorové domény (deteguje hem nebo plynou molekulu interakcí s hemem) a funkční domény^{32–34} (obr. 2, část d). Vztahy mezi strukturou a funkcí, mechanismy komunikace mezi těmito doménami a přenos signálu však dosud nebyly plně pochopeny. Obecně je důležité vysvětlit základní mechanismus detekce primárního signálu zaznamenaného sensorovou doménou, přenos signálu ze sensorové domény do domény funkční a následné pravděpodobně konformační změny funkční domény, které bezprostředně ovlivňují funkci daného proteinu. Je potřeba těmto mechanismům rozumět na molekulární úrovni, abychom byli později schopni ovlivnit procesy regulované těmito hemovými sensorovými proteiny a tím i všechny procesy kontrolované hemem. Je také nutné odhalit vliv jednotlivých konkrétních hemových sensorových proteinů na lidské zdraví a nemoci. Některé informace jsou již známy, ale jsou spíše neúplné a někdy až kontroverzní^{32,33}. Systematické sekvenování DNA odhalilo v genomech různých organismů (včetně savců) tisíce domén, potenciálně schopných interakce s hemem^{26,35}. Je tedy možno předpokládat, že mnoho klíčových procesů spojených s molekulou hemu, jak ve zdraví, tak v nemoci, bude teprve objeveno.

Hemové sensorové proteiny potřebují pružně reagovat v případě, že detegují signál (hem nebo plyn) a to je umožněno jejich velmi flexibilní strukturou, na rozdíl od struktury klasických hemoproteinů z prvních tří skupin (např. myoglobin), které jsou strukturálně relativně rigidní^{32,33,36} (obr. 2). Strukturu hemových sensorových proteinů a jejich velkou konformační změnu způsobenou vazbou signální molekuly (hemu nebo plynu) na sensorovou doménu a přenos tohoto prvotního signálu do změny struktury funkční domény však lze odvodit pouze z nepřímých experimentálních přístupů. V případě některých hemových sensorových proteinů jsou již známy struktury izolovaných sensorových a/nebo funkčních domén^{37–39}. Dosud nebyla popsána žádná trojrozměrná struktura kompletního (nezkráceného) hemového sensorového proteinu, který deteguje hem, na základě analýzy odpovídajících proteinových krystalů, zatímco byla publikována (zatím však pouze jediná) struktura kompletního hemového senzoru, který deteguje plyny – konkrétně transkripčního aktivátoru, který deteguje CO (CooA)⁴⁰. Obecně jsou experimenty s hemovými sensorovými proteiny s kompletním proteinovým řetězcem (tj. s jejich přirozenými variantami) velmi náročné^{36,38}. Důvodů je několik. Může to být způsobeno nestabilitou proteinů, které mají tendenci vytvářet nerozpustné agregáty^{41,42}. Hemové sensorové proteiny také často interagují s různými proteiny tepelného šoku⁴³ a/nebo

jsou směsí různých (auto)fosforylovaných variant⁴⁴. Proto je obtížné získat velká množství vysoce purifikovaných proteinů nezbytných pro spolehlivé strukturální studie. To vysvětluje, proč se většina dosavadních studií zaměřila na izolované sensorové domény a funkční domény a tyto části proteinů studuje odděleně. Takový přístup je však velmi riskantní a přináší potenciálně zavádějící interpretace výsledků. Například byla popsána nepřirozená koordinační struktura centrálního atomu železa hemu v izolované sensorové doméně kinasy eukaryotického iniciačního faktoru 2 α , která je regulována hemem (HRI, z angl. heme regulated inhibitor)⁴⁵. Žádná taková (arteficiální) koordinace nebyla pozorována u přirozeně se vyskytujícího proteinu HRI, který obsahuje sensorovou i funkční doménu^{36,41}. Podrobně o tomto konkrétním hemovém sensorovém proteinu pojednává následující kapitola.

Obecně je ještě potřeba zdůraznit, že dělicí čára mezi oběma podskupinami hemových sensorových proteinů, tedy těmi, které detegují hem a těmi, které detegují signální molekuly plynů prostřednictvím hemu, není tak ostrá, jak by se na první pohled mohlo jevit^{32,33}. Některé hemové sensorové proteiny, které detegují hem, mohou být ještě dále regulovány molekulou plynu^{36,46,47}. Interakce molekuly plynu s hemem v sensorové doméně je tedy společná jak pro některé senzory hemu, tak pro všechny hemové sensorové proteiny, které detegují plyny.

4. Hemové sensorové proteiny, které detegují přítomnost signální molekuly hemu

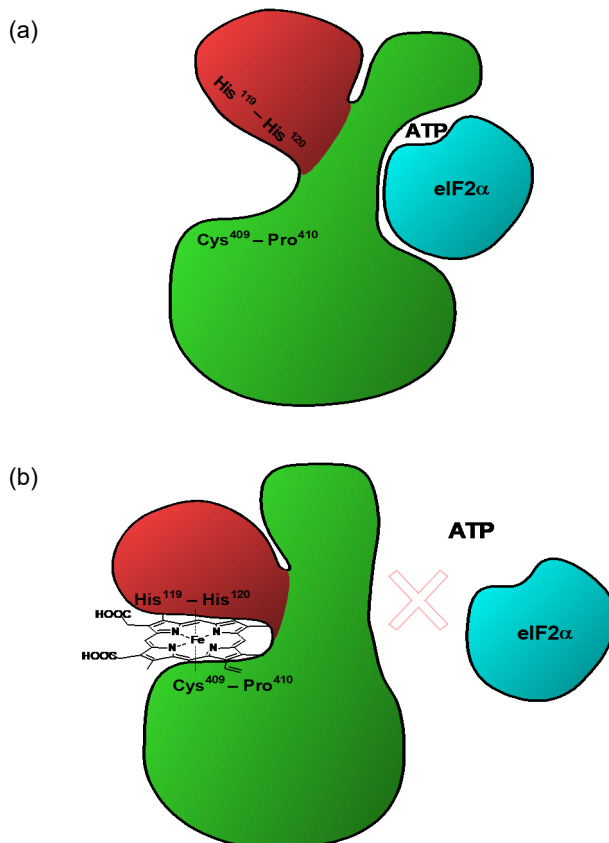
V současné chvíli je popsáno několik desítek zástupců hemových sensorových proteinů, které detegují přítomnost signální molekuly hemu. Jednotliví zástupci, jejich struktury a mechanismy detekce molekuly hemu (pokud jsou vůbec známy) jsou přehledně shrnuty a diskutovány v naší aktuální publikaci³²; naše výzkumná skupina se dlouhodobě věnuje výzkumu mechanismu působení několika zástupců těchto sensorů. Na příkladu jednoho z nich, konkrétně HRI, lze ukázat typické vlastnosti této podskupiny hemových sensorových proteinů.

HRI se jeví být jedním z nejdůležitějších hemových sensorových proteinů pro přežití eukaryot v reakci na stresové stavy buněk, které bezprostředně souvisí s lidským zdravím. Tento systém je důležitý pro regulaci eukaryotické proteosyntézy. Eukaryotické buňky snižují svou celkovou rychlost syntézy proteinů za účelem přežití v reakci na takové stresové podmínky, jako je nedostatek aminokyseliny, osvětlení UV světlem, virová infekce, akumulace denaturovaných proteinů, a právě nedostatek hemu. Pokles (inhibice) syntézy proteinů je způsoben fosforylací eukaryotického iniciačního faktoru 2 α (eIF2 α) na serinu v pozici 51 (cit.⁴⁸) kinasami eIF2 α , které specificky reagují na jeden z výše uvedených stresových podnětů⁴⁹. Funkční doména HRI tedy analogicky jako další známé „stresové“ kinasy vykazuje kinasovou aktivitu vůči svému substrátu – eIF2 α , v našem případě v závislosti na dostupnosti hemu. Enzym je aktivní v nepřítomnosti hemu. Vazba hemu na protein HRI indukuje globální strukturální (konformační)

změnu, ta vede ke katalytické inhibici, která je indukovaná hemem^{36,41,46,50}.

Úloha HRI byla nejprve odhalena v retikulocytech, kde tento protein řídí syntézu globinu v reakci na koncentraci hemu s cílem vyrovnávat molární poměr hemu a globinu³⁰. Nedostatek hemu způsobí prostřednictvím HRI inhibici proteosyntézy nových globinových molekul, které by se jinak akumulovaly, precipitovaly a postupně zničily daný retikulocyt³⁰. Kromě proteosyntézy globinu v retikulocytech řídí HRI syntézu tryptofan-2,3-dioxygenasy a cytochromu P4502B v játrech při akutní porfyrii^{51,52}. Navíc se ukazuje, že také úloha HRI v neerytroidních buňkách je pro přežití organismu zcela zásadní. Systematické sekvenování genomů maligně transformovaných (nádorových) buněk poukázalo na geny, jejichž časté mutace bezprostředně souvisí s rozvojem nádorového onemocnění (rakoviny)⁵³. Bylo zjištěno, že u lidských pacientů s rakovinou plic je glycin v pozici 202 v HRI zpravidla mutován na serin⁵³. Tato mutace se tedy může podílet na rozvoji rakoviny. Abychom ale plně pochopili roli HRI ve zdraví a nemoci, je nejprve důležité porozumět mechanismu působení tohoto senzoru.

Na základě výsledků našich studií funkce a mechanismu působení HRI byly navrženy následující tři závěry. Za prvé, molekula HRI interaguje pouze s jednou molekulou hemu a to tak, že jeden axiální ligand centrálního atomu železa hemu tvoří histidinový zbytek umístěný v senzoro-ové doméně a druhým ligandem je pak thiolátová síra cysteinu lokalizovaného ve funkční doméně^{36,41,50} (obr. 3). Pro hemové senzoro-ové proteiny je obecně hem-thiolátová koordinace velmi častá, a navíc bývá vedle axiálního cysteinu lokalizován prolin, stejně jako v HRI. Tento tzv. CP motiv tvoří typické detekční místo hemových senzorů³². Význam prolinu vedle cysteinu spočívá pravděpodobně v jeho sterické regulaci proteinové struktury v těsném sousedství detekčního místa pro hem a tím je modulována interakce hemu s cysteinem. Afinita HRI k hemu odpovídá koncentraci volného hemu v retikulocytech a je poměrně nízká, K_d je 10^{-5} mol l^{-1} (cit.⁴¹). Je potřeba, aby HRI zaznamenala přítomnost hemu až při významném nárůstu jeho koncentrace nad rámec přirozené nízké hladiny volného hemu. Obecně se afinita různých hemových senzoro-ových proteinů k hemu výrazně liší³². Za druhé, katalýza HRI je silně potlačena nejen hemem ($IC_{50} = 9,5$ μ mol l^{-1}), ale ještě více Hg^{2+} ($IC_{50} = 0,6$ μ mol l^{-1}) a tato suprese je odstraněna NO, což podporuje hypotézu, že thiolát cysteinu se účastní katalytické regulace⁴⁶. Již výše bylo zmíněno, že dělicí čára mezi hemovými senzoro-ovými proteiny, které detegují hem a těmi, které detegují molekuly plynu, není ostrá. A je to případ i HRI. Primárně je tento senzor regulován koncentrací hemu, ale dále může být inhibiční vliv hemu (nebo jiného inhibitoru) zvrácen signální molekulou plynu (v tomto případě NO)⁴⁶. Za třetí, interakce mezi senzoro-ovou a funkční doménou zprostředkovaná signální molekulou hemu způsobuje globální strukturální změny (obr. 3), které hrají klíčovou roli v mechanismu působení a funkci HRI^{36,41,50}. Jak již bylo zmíněno výše, strukturální flexibilita je společným znakem všech hemových senzoro-



Obr. 3. Schématické znázornění mechanismu detekce a přenosu signálu v případě HRI. Pokud HRI nedeteguje přítomnost molekuly hemu (a), je enzymová aktivita funkční domény zachována a dochází k fosforylaci substrátu tj. eukaryotického iniciačního faktoru 2α . V případě, že se zvýší koncentrace hemu v prostředí, je toto detegováno HRI (b) a její enzymová aktivita vůči eukaryotickému iniciačnímu faktoru 2α je zastavena. HRI – kinasa eukaryotického iniciačního faktoru 2α , která je regulována hemem; eIF2 α – eukaryotický iniciační faktor 2α . (Barevná verze obrázku je dostupná na webových stránkách časopisu Chemické listy)

vých proteinů a je pro funkci těchto proteinů důležitá, ale zároveň značně komplikuje studium těchto systémů³².

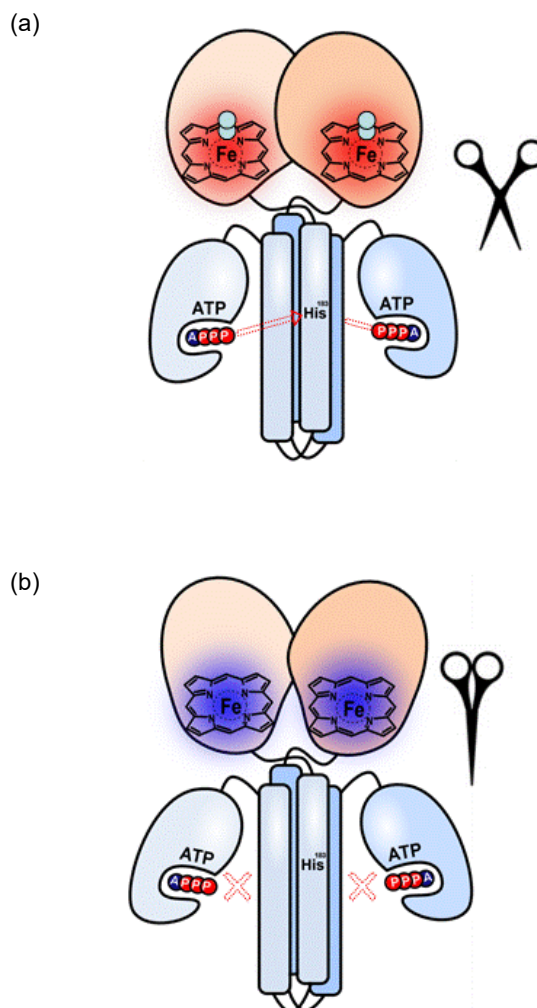
5. Hemové senzoro-ové proteiny, které detegují signální molekuly plynu jejich interakcí s hemem

Podskupina hemových senzoro-ových proteinů, které detegují signální molekuly plynu jejich interakcí s hemem je již poměrně bohatě zastoupena několika desítkami členů. Převážně, ale ne výlučně, se jedná o proteiny bakteriální, které pomáhají jednobuněčným organismům reagovat na měnící se atmosféru, detegovat její složení s cílem přizpůsobit svůj metabolismus okolním podmínkám. Tuto problematiku jsme nedávno shrnuli ve dvou přehledných

referátech, na něž čtenáře s hlubším zájmem o hemové senzory proteiny, které detegují plyny, odkazujeme^{33,34}. Během posledních osmi let jsme charakterizovali a vysvětlili vztahy mezi strukturou a funkcí a zaměřili se na přenos signálu v případě tří základních modelových prokaryotických hemových senzory proteinů, které detegují plyny. Jedná se o přímý kyslíkový senzor z *Escherichia coli*, který vykazuje fosfodiesterasovou aktivitu (EcDOS)^{54–56}, diguanylátcyklastu s globinovou strukturou senzory domény z *Escherichia coli* (YddV)^{42,55,57–59} a histidinkinasy s globinovou strukturou senzory domény z půdní bakterie *Anaeromyxobacter* sp. kmen Fw109-5 (AfGcHK)^{38,39,60–63}. Ve všech třech případech se jedná o hemové senzory kyslíku³⁴. Bakteriální hemové senzory se mnohem snadněji studují, protože se s nimi daleko efektivněji experimentuje – jsou výrazně stabilnější, lépe a ve větším množství se produkují a během jejich izolace dosahujeme výrazně vyšší čistoty než v případě eukaryotických hemových senzory proteinů, které detegují hem (viz předchozí kapitola). Tyto proteiny tedy představují jednak cenný a relativně dobře dostupný modelový systém pro pozdější aplikace na systémy eukaryotické. Navíc v sobě zahrnují jedinečný cíl pro vývoj nových léků s antibakteriálním účinkem, které by vyřadily schopnost bakterií detegovat změny okolního prostředí a tím jejich možnost se měnícím podmínkám přizpůsobit. Proto jsou informace o mechanismu působení těchto proteinů tak důležité ve vztahu k lidskému zdraví.

Dvosložkový bakteriální systém, který obsahuje AfGcHK a jeho regulátor odpovědi (RR), představuje v současné chvíli asi nejdetailněji popsáný příklad pro ilustraci mechanismu detekce a přenosu signálu, a to primárně díky studiu jednotlivých složek tohoto systému v jejich přirozených, nezkrácených formách^{38,39,60–62}. V případě, že centrální atom železa hemu v senzory doméně AfGcHK interaguje s O₂ nebo CO (jedná se o formy Fe^{II}-O₂ a Fe^{II}-CO) nebo je dokonce oxidován a interaguje s OH⁻, nebo CN⁻ (formy Fe^{III}-OH⁻ a Fe^{III}-CN⁻), struktura senzory domény se změní tak, že se tento signál přenesou do funkční domény, ta se aktivuje a zahájí autokinasovou aktivitu, tj. fosfátová skupina ze substrátu enzymu, ATP, se přenesou na histidin v pozici 183 ve funkční doméně^{60,63}. Naopak, pokud je železo hemu bez interakce s molekulou plynu, tj. zůstává ve formě Fe^{II} bez interakce s šestým ligandem v distální oblasti hemu, nebo pokud molekula hemu v senzory doméně úplně chybí, struktura senzory domény zaujme takovou konformaci, která není produktivní, tj. nezpůsobí aktivaci funkční domény a v důsledku tohoto procesu enzym nevykazuje autokinasovou aktivitu^{60,63}. Protein AfGcHK se přirozeně vyskytuje jako dimer⁶¹ (obr. 4). Nejflexibilnější částí celého proteinu AfGcHK je smyčka, která spojuje senzory a funkční domény a proteinová kavita distální vůči rovině hemu senzory domény AfGcHK, která je zodpovědná za vazbu kyslíku, navíc tato oblast je jedinou flexibilní částí senzory domény⁶¹. Mechanismus přenosu signálu mezi oběma doménami (tzv. intra-proteinový přenos signálu) byl objasněn kombinací několika experimentálních přístupů – vyřešením krystalové struktury izolované senzory

domény asociované s aktivní formou Fe^{III}-CN⁻ a asociované s neaktivní Fe^{II} formou a srovnáním odhalených změn s výsledky metody, která studuje přirozenou, nezkrácenou variantu AfGcHK v různých stavech (vodík-deuteriová výměna kombinovaná s hmotnostně spektrometrickou detekcí)³⁸. Hlavní rozdíly mezi aktivní a neaktivní formou



Obr. 4. Schématické znázornění mechanismu detekce a přenosu signálu v případě AfGcHK. Pokud je ion železa hemu v senzory doméně redukován a v prostředí není molekula kyslíku (a), zaujímá senzory doména takovou konformaci, která je spojena s neaktivní konformací také funkční domény a nepozorujeme enzymovou aktivitu (autofosforylaci) funkční domény. Pokud ale dojde k detekci kyslíku (b) a tím k jeho vazbě do senzory domény, změní se konformace této domény a daná změna je přenesena do domény funkční. Následně probíhá autofosforylační reakce. Neaktivní a aktivní stav AfGcHK lze schématicky připodobnit k pohybu nůžek. Prepracováno podle cit³⁸. AfGcHK – histidinkinasa s globinovou strukturou senzory domény z *Anaeromyxobacter* sp. kmen Fw10, která deteguje kyslík jeho interakcí s hemem. (Barevná verze obrázku je dostupná na webových stránkách časopisu Chemické listy)

AfGcHK byly pozorovány v rámci proteinové kavity proximální vůči rovině hemu sensorové domény AfGcHK, na dimerizačním rozhraní sensorové (globinové) domény a ve vazebném místě pro substrát, tj. ATP ve funkční (kinasové) doméně³⁸. Data naznačují, že zásadní pro přenos signálu ze sensorové domény do domény funkční je dimerizační rozhraní sensorové domény³⁹ (obr. 4). Navíc se ukazuje, že tyrosin v pozici 15 hraje klíčovou roli v dimerizaci sensorové (globinové) domény AfGcHK a dimerizace této domény je nezbytná pro vnitřní přenos signálu a následnou autofosforylaci proteinu³⁹. Aktivní a neaktivní stav AfGcHK si můžeme představit jako uzavřené nebo otevřené nůžky (obr. 4). Signál pro aktivaci AfGcHK, vazba kyslíku k iontu železa hemu v sensorové doméně, vyvolá změnu v nejbližším okolí hemu, což způsobí změnu („uzavření“) dimerizačního rozhraní sensorové domény a tato změna je přenesena do domény funkční s následným přiblížením vazebního místa pro ATP blíže k histidinu v pozici 183, který se snadněji autofosforyluje („nůžky se uzavřou“). Při disociaci kyslíku z hemu sensorové domény se AfGcHK deaktivuje a opačný sled kroků si lze představit jako „otevření nůžek“ (obr. 4).

V tomto modelovém dvousložkovém systému se podařilo také vysvětlit mechanismus mezi-proteinového přenosu signálu. Pokud je protein AfGcHK autofosforylován, přenesení se fosfát z histidinu v pozici 183 na asparagin v pozici 52 první domény RR. Tato doména má k AfGcHK výrazně vyšší afinitu než doména druhá, na jejíž asparagin v pozici 169 je fosfát přenesen až poté, co proběhne interakce s první doménou^{61,63}. Předpokládáme, že fosforylace asparaginu v první RR doméně mění celkovou strukturu RR tak, že teprve po této změně může druhá doména RR interagovat s AfGcHK. Proteiny AfGcHK a RR tvoří komplex v poměru 2:1, tedy dimer AfGcHK interaguje s jedinou molekulou RR (cit.⁶¹).

6. Závěr

Přestože se hemové sensorové proteiny podílejí na řadě důležitých fyziologických procesů, přesný mechanismus jejich fungování a přenosu signálu ze sensorové domény do domény funkční zatím ještě nebyl uspokojivě popsán a pochopen. Vyřešení tohoto problému bude mít nezpochybnitelný praktický význam. Například role HRI v procesu rozvoje nádorů plic u lidí činí z tohoto hemového sensorového proteinu jedinečný cíl umožňující kontrolu takovýchto patologických procesů. Podobně hemové sensorové proteiny, které detegují kyslík, konkrétně YddV, EcDOS a AfGcHK, se podílejí na schopnosti bakterií reagovat na změnu vnějšího prostředí například iniciací tvorby biofilmu, sporulací nebo modulací virulence patogenických bakterií. Proto představují zajímavý terapeutický cíl při vývoji antibiotik nové generace. Abychom však mohli ovlivňovat funkce těchto sensorů, ať již detegují samotný hem nebo prostřednictvím vazby na hem detegují molekuly plynů, musíme nejprve pochopit molekulární mechanismy jejich působení. Jakmile pochopíme tento mechanis-

mus, můžeme navrhnout sloučeniny, které vyřadí z funkce schopnost těchto proteinů přenášet signál a tím reagovat na původní podněty. V konečném důsledku pak budeme schopni ovlivnit mnoho důležitých procesů, jak bylo diskutováno výše. Kromě toho je více než pravděpodobné, že mnohé z klíčových funkcí spojených s hemem, jak ve zdraví, tak v nemoci, budou teprve objeveny.

Seznam zkratek

HRI	kinasa eukaryotického iniciačního faktoru 2 α , která je regulována hemem (heme regulated inhibitor)
CooA	transkripční aktivátor, který deteguje CO
eIF2 α	eukaryotický iniciační faktor 2 α
EcDOS	přímý kyslíkový senzor z <i>Escherichia coli</i> , který vykazuje fosfodiesterasovou aktivitu
YddV	diguanylátcyklasa s globinovou strukturou sensorové domény z <i>Escherichia coli</i>
AfGcHK	histidinkinasa s globinovou strukturou sensorové domény z <i>Anaeromyxobacter</i> sp. kmen Fw10
RR	regulátor odpovědi v dvousložkovém systému bakterie <i>Anaeromyxobacter</i>

LITERATURA

- Williams R. J.: *Nature* 343, 213 (1990).
- Holland H. D.: *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B., Biol. Sci.* 361, 903 (2006).
- Andrews S. C.: *Adv. Microb. Physiol.* 40, 281 (1998).
- Valko M., Rhodes C. J., Moncol J., Izakovic M., Mazur M.: *Chem.-Biol. Interact.* 160, 1 (2006).
- Iuchi S., Weiner L.: *J. Biochem. (Tokyo)* 120, 1055 (1996).
- Imlay J. A.: *Annu. Rev. Biochem.* 77, 755 (2008).
- Sánchez M., Sabio L., Gálvez N., Capdevila M., Dominguez-Vera J. M.: *IUBMB Life* 69, 382 (2017).
- Pino-Rios R., Cárdenas-Jirón G., Tiznado W.: *Phys. Chem. Chem. Phys.* 22, 21267 (2020).
- Weerth R. S., Medlock A. E., Dailey H. A.: *J. Biol. Chem.* 297, 101017 (2021).
- Caughey W. S., Smythe G. A., O'Keefe D. H., Maskasky J. E., Smith M. I.: *J. Biol. Chem.* 250, 7602 (1975).
- Smith L. J., Kahraman A., Thornton J. M.: *Proteins* 78, 2349 (2010).
- van Vleck J. H.: *Phys. Rev.* 41, 208 (1932).
- Neidig M. L., Solomon E. I.: *Chem. Commun. (Camb. Engl.)* 5843 (2005). DOI:10.1039/b510233m
- Morita Y., Mason H. S.: *J. Biol. Chem.* 240, 2654 (1965).
- Liu G., Shao W., Zhu S., Tang W.: *J. Inorg. Biochem.* 60, 123 (1995).
- Capeillere-Blandin C., Mathieu D., Mansuy D.: *Biochem. J.* 392, 583 (2005).

17. Liu J., Chakraborty S., Hosseinzadeh P., Yu Y., Tian S., Petrik I., Bhagi A., Lu Y.: *Chem. Rev.* 114, 4366 (2014).
18. Gallio A. E., Fung S. S.-P., Cammack-Najera A., Hudson A. J., Raven E. L.: *JACS Au* 1, 1541 (2021).
19. Roumenina L. T., Rayes J., Lacroix-Desmazes S., Dimitrov J. D.: *Trends Mol. Med.* 22, 200 (2016).
20. Hanna D. A., Hu R., Kim H., Martinez-Guzman O., Torres M. P., Reddi A. R.: *J. Biol. Chem.* 293, 12378 (2018).
21. Donegan R. K., Moore C. M., Hanna D. A., Reddi A. R.: *Free Radical Biol. Med.* 133, 88 (2019).
22. Haskamp V. a 13 spoluautorů: *J. Biol. Chem.* 293, 2558 (2018).
23. Sweeny E. A. a 10 spoluautorů: *J. Biol. Chem.* 293, 14557 (2018).
24. Fleischhacker A. S., Ragsdale S. W.: *J. Biol. Chem.* 293, 14569 (2018).
25. Ponka P., Sheftel A. D., English A. M., Scott Bohle D., Garcia-Santos D.: *Trends Biochem. Sci.* 42, 395 (2017).
26. Kadish K. M., Smith K. M., Guillard R.: *Handbook of Porphyrin Science*, World Scientific Publishing, Hackensack 2010.
27. Rodgers K. R.: *Curr. Opin. Chem. Biol.* 3, 158 (1999).
28. Stone J. R., Marletta M. A.: *Biochemistry* 35, 1093 (1996).
29. Aono S., Nakajima H., Saito K., Okada M.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 228, 752 (1996).
30. Chen J. J., London I. M.: *Trends Biochem. Sci.* 20, 105 (1995).
31. Fagard R., London I. M.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 78, 866 (1981).
32. Shimizu T., Lengalova A., Martínek V., Martínková M.: *Chem. Soc. Rev.* 48, 5624 (2019).
33. Shimizu T., Huang D., Yan F., Stranova M., Bartosova M., Fojtiková V., Martínková M.: *Chem. Rev.* 115, 6491 (2015).
34. Martínková M., Kitanishi K., Shimizu T.: *J. Biol. Chem.* 288, 27702 (2013).
35. Igarashi J., Kitanishi K., Martinkova M., Murase M., Iizuka A., Shimizu T.: *Acta Chim. Slov.* 55, 67 (2008).
36. Igarashi J., Murase M., Iizuka A., Pichierri F., Martinkova M., Shimizu T.: *J. Biol. Chem.* 283, 18782 (2008).
37. Zhang W., Phillips G. N.: *Structure* 11, 1097 (2003).
38. Stranova M. a 11 spoluautorů: *J. Biol. Chem.* 292, 20921 (2017).
39. Skalova T. a 9 spoluautorů: *J. Biol. Chem.* 295, 1587 (2020).
40. Lanzilotta W. N., Schuller D. J., Thorsteinsson M. V., Kerby R. L., Roberts G. P., Poulos T. L.: *Nat. Struct. Biol.* 7, 876 (2000).
41. Miksanova M., Igarashi J., Minami M., Sagami I., Yamauchi S., Kurokawa H., Shimizu T.: *Biochemistry* 45, 9894 (2006).
42. Lengalova A., Fojtikova-Proskova V., Vavra J., Martínek V., Stranova M., Shimizu T., Martinkova M.: *J. Inorg. Biochem.* 201, 110833 (2019).
43. Mukai K., Shimizu T., Igarashi J.: *Protein Pept. Lett.* 18, 1251 (2011).
44. Igarashi J., Sasaki T., Kobayashi N., Yoshioka S., Matsushita M., Shimizu T.: *FEBS J.* 278, 918 (2011).
45. Inuzuka T., Yun B.-G., Ishikawa H., Takahashi S., Hori H., Matts R. L., Ishimori K., Morishima I.: *J. Biol. Chem.* 279, 6778 (2004).
46. Martinkova M., Igarashi J., Shimizu T.: *FEBS Lett.* 581, 4109 (2007).
47. Uma S., Yun B. G., Matts R. L.: *J. Biol. Chem.* 276, 14875 (2001).
48. Mathews M. B., Sonenberg N., Hershey J. W. B. (ed.): *Translational Control in Biology and Medicine*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor 2007.
49. Wek R. C., Jiang H.-Y., Anthony T. G.: *Biochem. Soc. Trans.* 34, 7 (2006).
50. Hirai K., Martinkova M., Igarashi J., Saiful I., Yamauchi S., El-Mashtoly S., Kitagawa T., Shimizu T.: *J. Inorg. Biochem.* 101, 1172 (2007).
51. Liao M. a 9 spoluautorů: *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 323, 979 (2007).
52. Han X.-M., Lee G., Hefner C., Maher J. J., Correia M. A.: *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 314, 128 (2005).
53. Greenman C. a 65 spoluautorů: *Nature* 446, 153 (2007).
54. Du Y., Liu G., Yan Y., Huang D., Luo W., Martinkova M., Man P., Shimizu T.: *Biometals* 26, 839 (2013).
55. Anzenbacher P. a 10 spoluautorů: *FEBS J.* 281, 5208 (2014).
56. Yan F., Fojtikova V., Man P., Stranova M., Martínková M., Du Y., Huang D., Shimizu T.: *Biometals* 28, 637 (2015).
57. Stranova M., Martínková M., Stiborová M., Man P., Kitanishi K., Muchová L., Vitek L., Martínek V., Shimizu T.: *J. Inorg. Biochem.* 140, 29 (2014).
58. Pavlou A., Martínková M., Shimizu T., Kitanishi K., Stranova M., Loullis A., Pinakoulaki E.: *Phys. Chem. Chem. Phys.* 17, 17007 (2015).
59. Lambry J.-C., Stranova M., Lobato L., Martinkova M., Shimizu T., Liebl U., Vos M. H.: *J. Phys. Chem. Lett.* 7, 69 (2016).
60. Fojtikova V., Stranova M., Vos M. H., Liebl U., Hranicek J., Kitanishi K., Shimizu T., Martinkova M.: *Biochemistry* 54, 5017 (2015).
61. Stranova M., Martínek V., Man P., Fojtikova V., Kavan D., Vaněk O., Shimizu T., Martinkova M.: *Proteins* 84, 1375 (2016).
62. Fojtikova V., Bartosova M., Man P., Stranova M., Shimizu T., Martinkova M.: *Biometals* 29, 715 (2016).
63. Kitanishi K., Kobayashi K., Uchida T., Ishimori K., Igarashi J., Shimizu T.: *J. Biol. Chem.* 286, 35522 (2011).

M. Martínková (*Department of Biochemistry, Faculty of Science, Charles University*): **The Novel Role of Heme in Health and Diseases - Heme-Containing Sensor Proteins**

The iron atom possesses unique properties, being manifested in the heme molecule. In addition to the involvement of heme in many processes (such as oxygen or electron transport and catalysis of enzyme reaction), it can also regulate key pathways critical for health. Heme-containing sensor proteins mediate the heme regulation role. The review aims to underline the main characteristics of the heme-containing sensor proteins group, either sensing heme or sensing a gas molecule through a heme-binding site, on the example of specific representatives from each sensor subgroup.

Keywords: heme, hemoproteins, heme-containing sensor proteins, signal transduction

- Martínková M.: Chem. Listy 116, 163–171 (2022).
- <https://doi.org/10.54779/chl20220163>