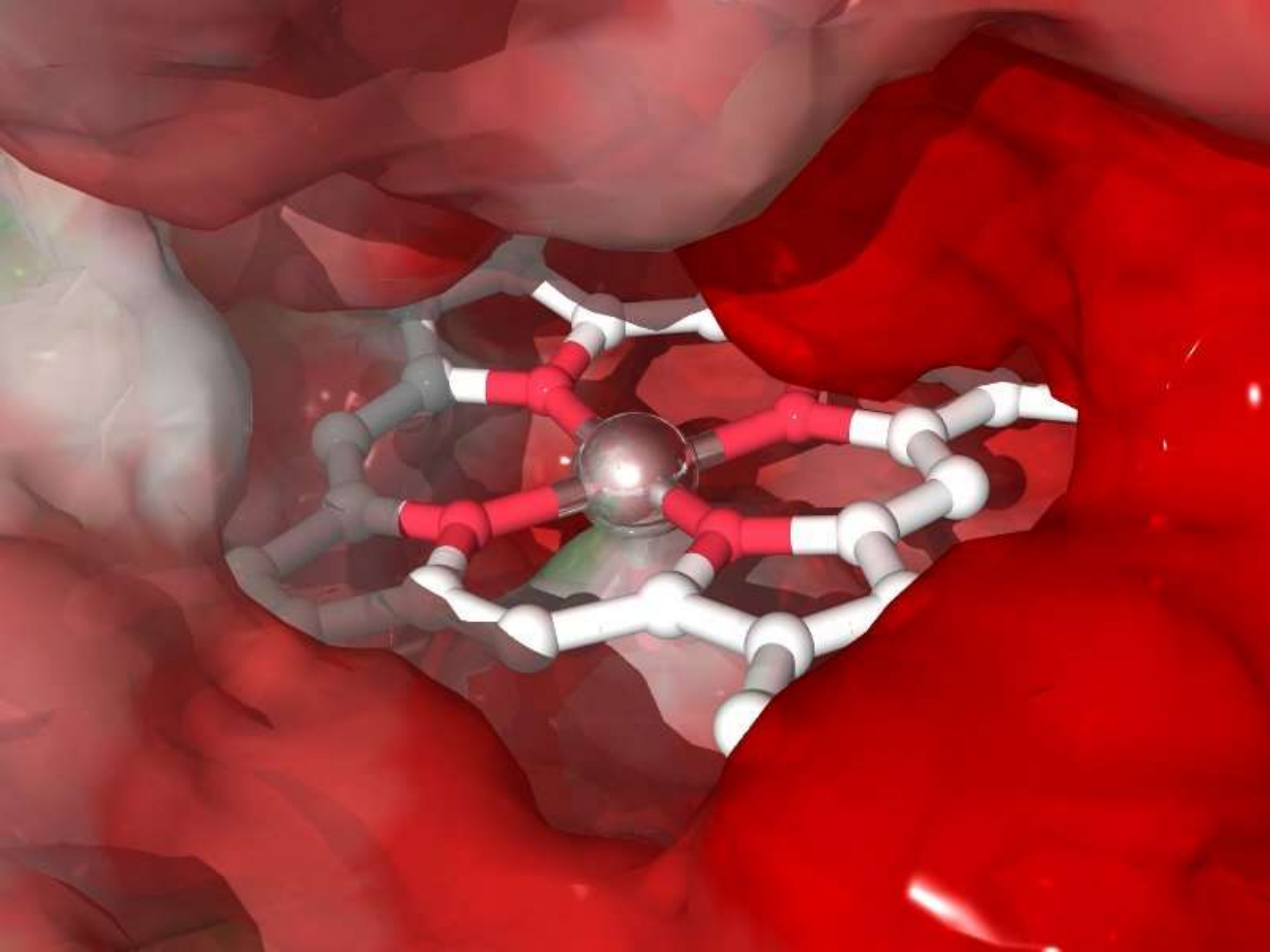


Trendy v boji s bakteriální rezistencí

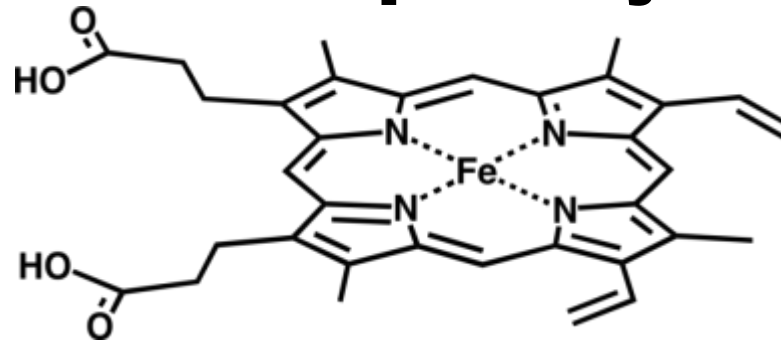
doc. RNDr. Markéta Martínková, Ph.D.

katedra biochemie, Přírodovědecká fakulta,
University Karlovy

www.natur.cuni.cz/martinkova



Hemoproteiny



Mb, Hb

**Přenos a uskladnění
O₂**

hemové enzymy

**Oxygenasová reakce
O₂ + e⁻**

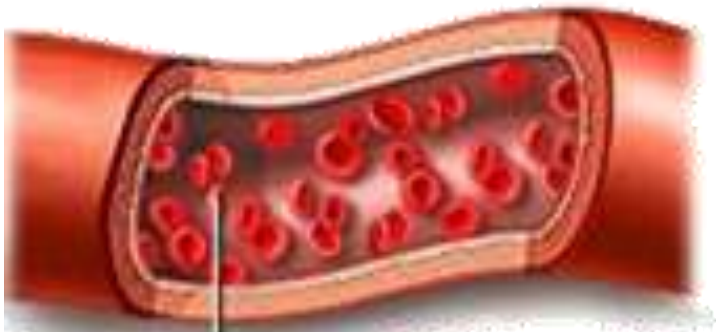
Cyt c, Cyt b₅

**Přenos elektronů
e⁻**

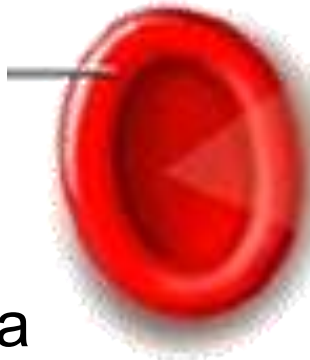
**hemové senzorové
proteiny**

**I. senzory hemu
II. senzory plynů (O₂, CO, NO)**

Hemoglobin

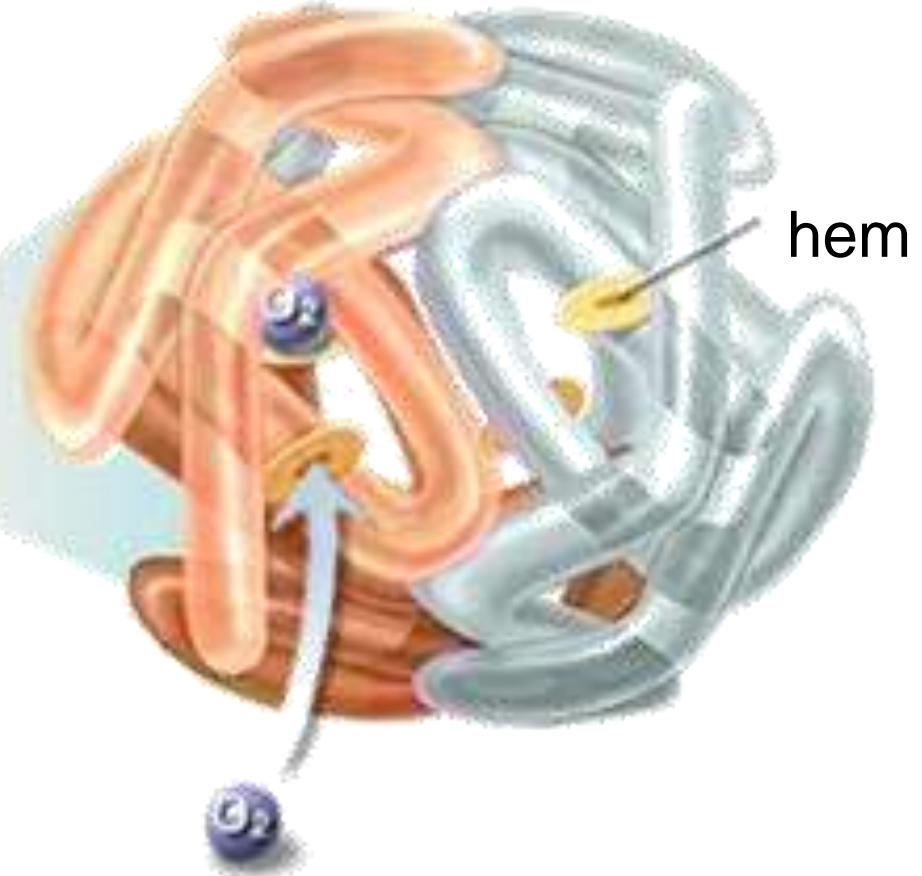


červená
krvinka



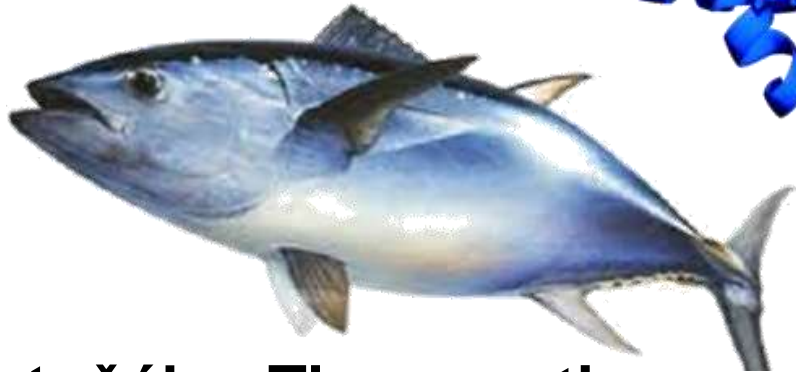
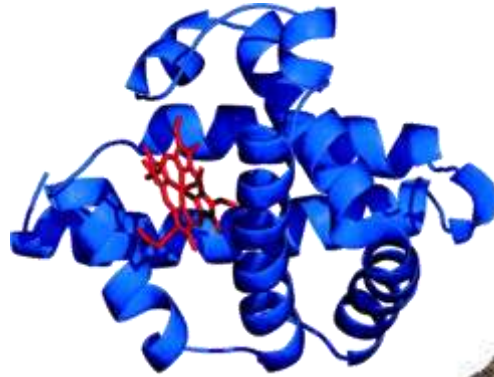
červená krvinka
obsahuje několik stovek tisíc
molekul hemoglobinu, který
transportuje kyslík

molekula hemoglobinu



kyslík se váže na hem v
molekule hemoglobinu

Myoglobin



tuňák – *Thunnus thynnus*

aktivní – potřebuje hodně O_2
– hodně myoglobinu

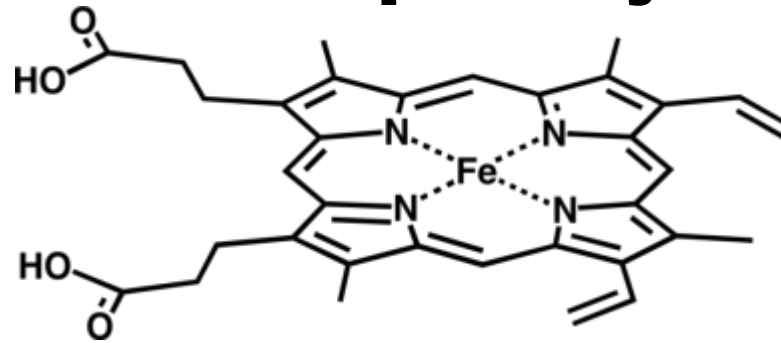


platýz - *Pleuronectes platessa*

lenivý – málo myoglobinu



Hemoproteiny



Mb, Hb

**Přenos a uskladnění
O₂**

hemové enzymy

**Oxygenasová reakce
O₂ + e⁻**

Cyt c, Cyt b₅

**Přenos elektronů
e⁻**

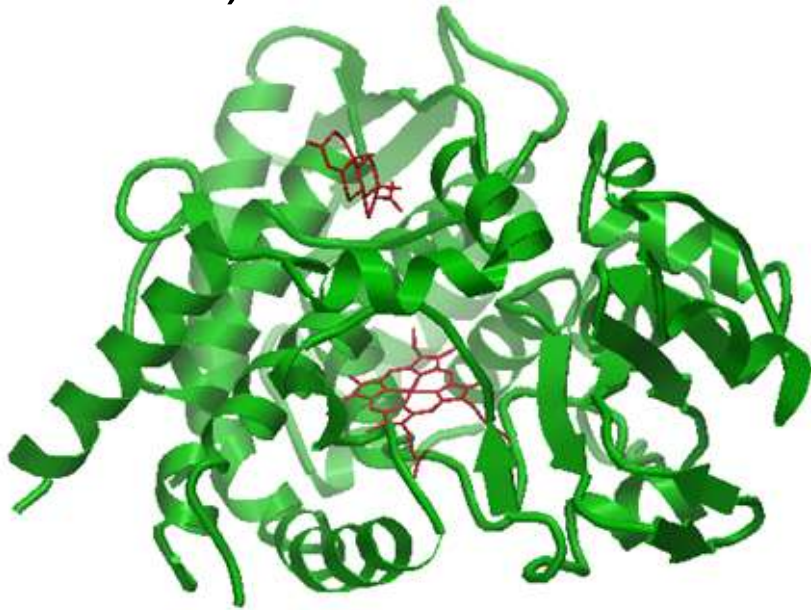
**hemové senzorové
proteiny**

**I. senzory hemu
II. senzory plynů (O₂, CO, NO)**

Hemové enzymy

OXYGENASY - CYTOCHROMY P450...

➔ biotransformace léků (včetně antibiotik) a xenobiotik (toxiny bakterií)



prof. Hayaishi objevil **oxygenasy** v roce **1956** (foto z oslavy 50. výročí objevu, 2006)

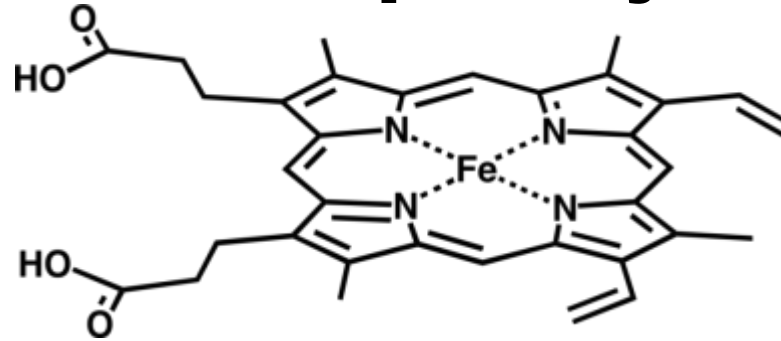
Naiman K. et al. *Mutat Res* (2011) **726**, 160-168.

Mikšanová M. et al. *Chem Res Toxicol* (2004) **17**, 663-671.

Mikšanová M. et al. *Collect Czech Chem Commun* (2004) **69**, 589-602.

Naiman K. et al. *Toxicol Sci* (2012) **127**, 348-359.

Hemoproteiny



Mb, Hb

**Přenos a uskladnění
O₂**

hemové enzymy

**Oxygenasová reakce
O₂ + e⁻**

Cyt c, Cyt b₅

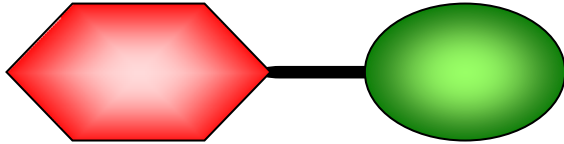
**Přenos elektronů
e⁻**

**hemové senzorové
proteiny**

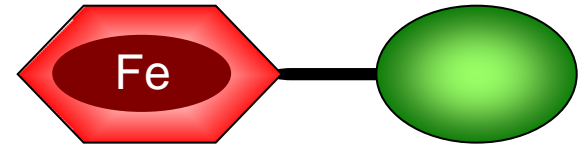
**I. senzory hemu
II. senzory plynů (O₂, CO, NO)**

Hemové senzorné proteiny

I. senzory hemu

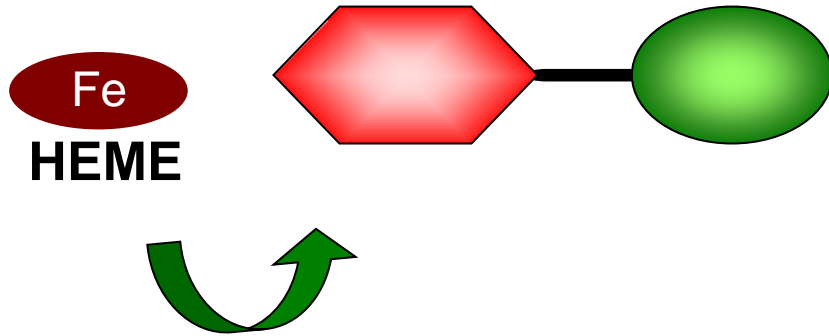


II. senzory plynů

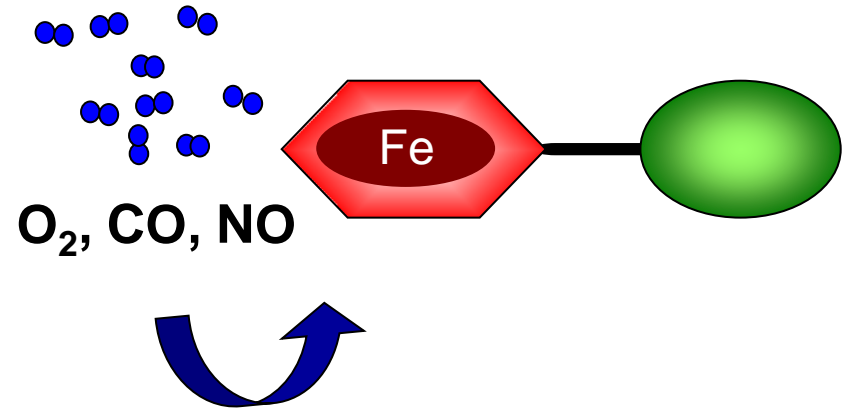


Hemové senzorné proteiny

I. senzory hemu

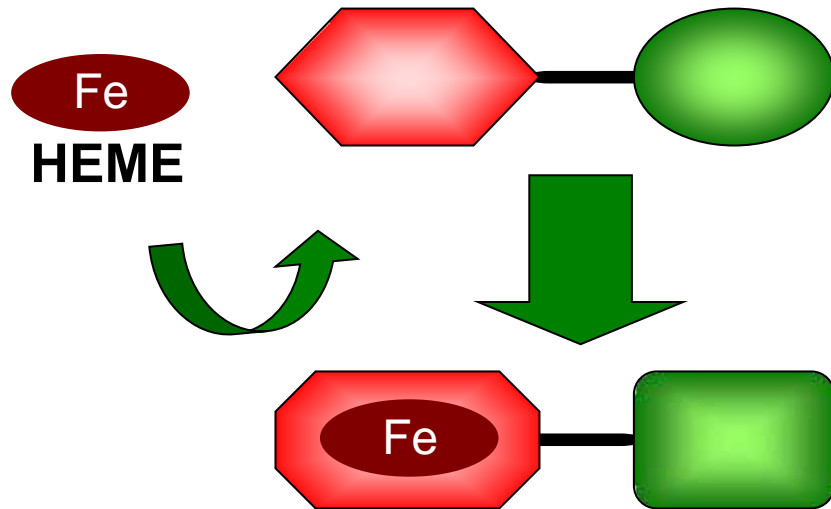


II. senzory plynů

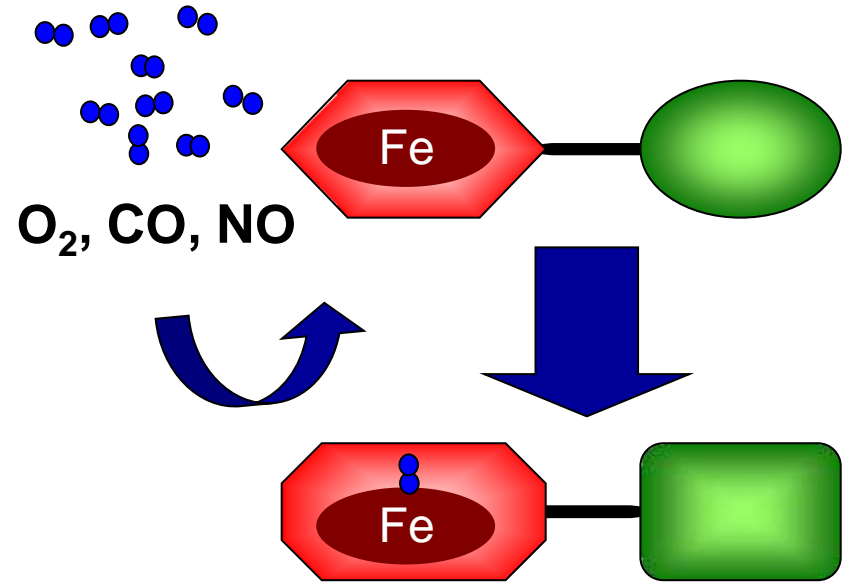


Hemové senzorné proteíny

I. senzory hemu



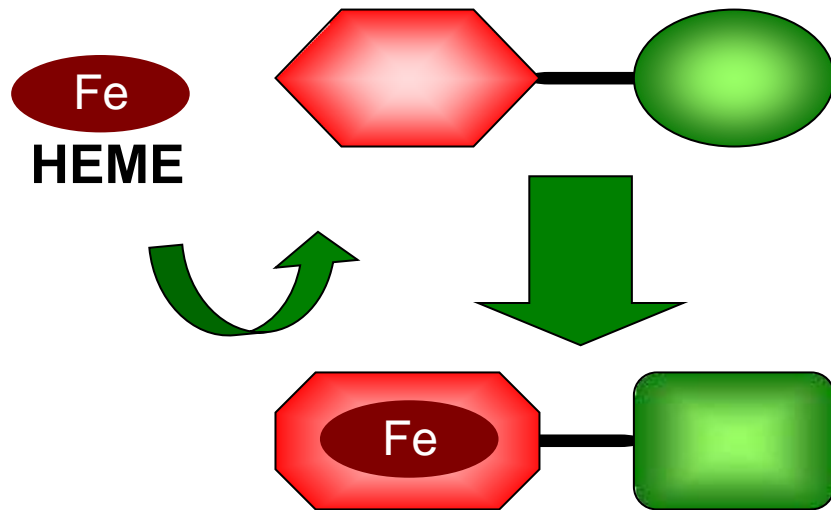
II. senzory plynů



Hemové senzorné proteiny

PRAKTICKÝ VÝZNAM

I. senzory hemu



Význam při procesech souvisejících s rozvojem maligní transformace (zhoubné nádory)

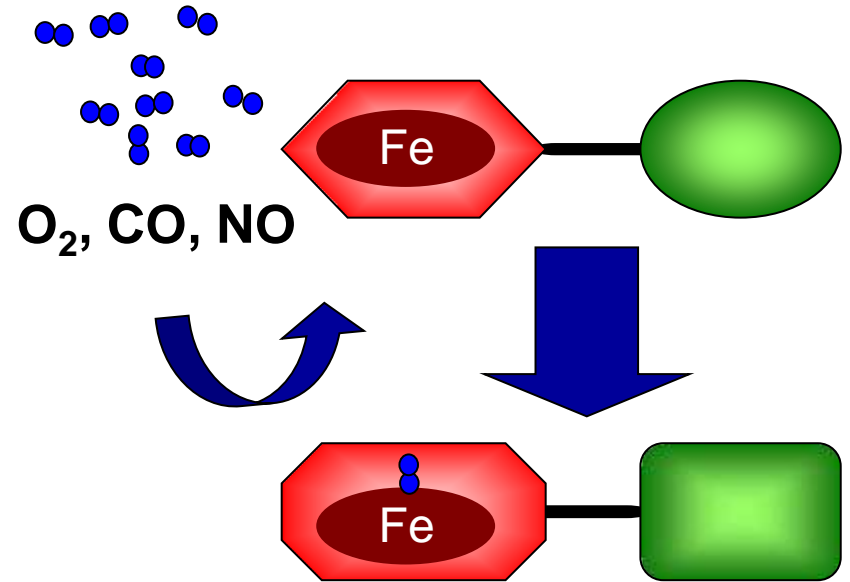
PROTINÁDOROVÁ TERAPIE

Martinkova M. et al. *J Biol Chem* (2013) **288**, 27702.

Shimizu T. et al. *Chem Rev* (2015) **115**, 6491.

Shimizu T. et al. *Chem Soc Rev* (2019) **48**, 5624.

II. senzory plynů



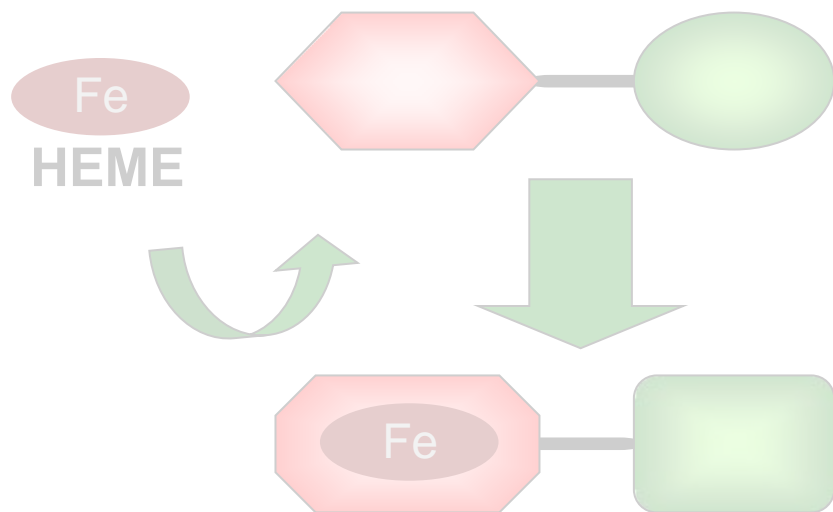
Regulace klíčových bakteriálních procesů (virulence, pohyb, tvorba biofilmů...)

ANTIBIOTIKA NOVÉ GENERACE

Hemové senzorné proteiny

PRAKTICKÝ VÝZNAM

I. senzory hemu



Význam při procesech souvisejících s rozvojem maligní transformace (zhoubné nádory)

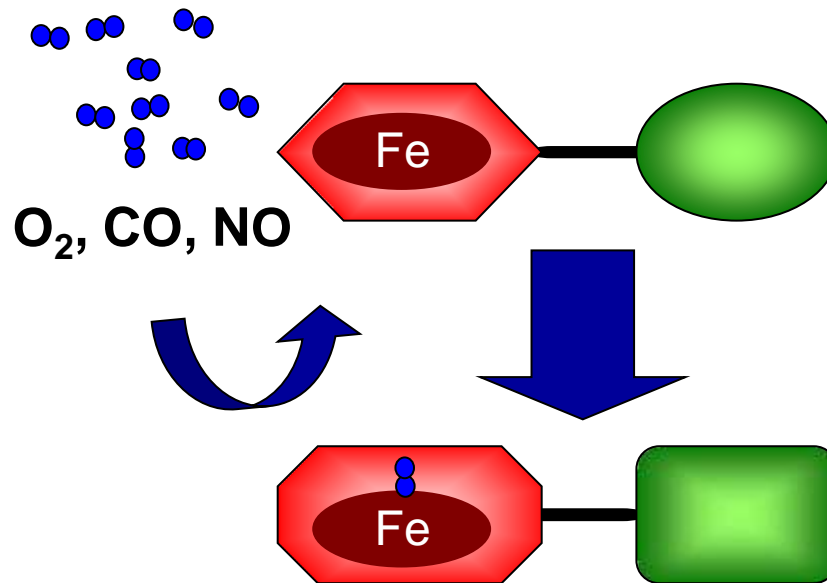
PROTINÁDOROVÁ TERAPIE

Martinkova M. et al. *J Biol Chem* (2013) **288**, 27702.

Shimizu T. et al. *Chem Rev* (2015) **115**, 6491.

Shimizu T. et al. *Chem Soc Rev* (2019) **48**, 5624.

II. senzory plynů

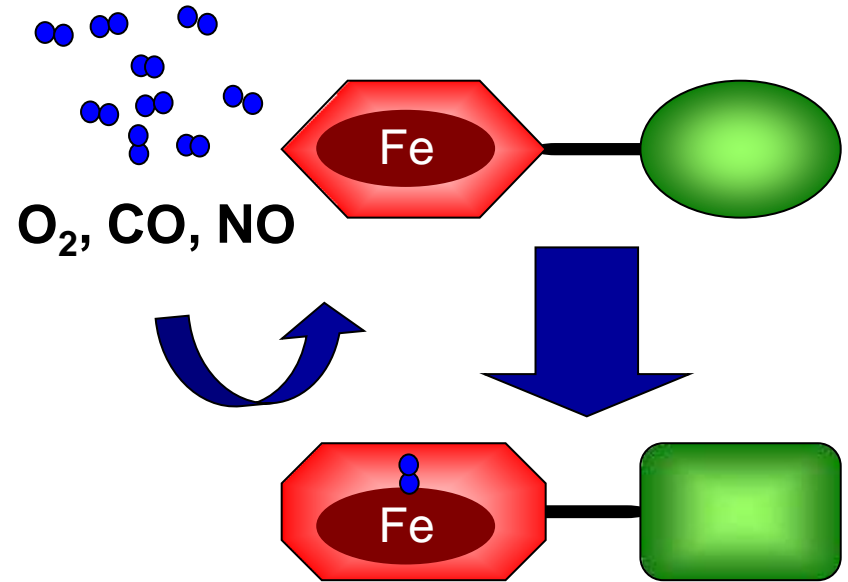


Regulace klíčových bakteriálních procesů (virulence, pohyb, tvorba biofilmů...)

ANTIBIOTIKA NOVÉ GENERACE

Bakteriální hemové senzory kyslíku (plynů) CÍLE VÝZKUMU

PŘENOS SIGNÁLU
strukturně-fukční vztahy



RYCHLÝ ZPŮSOB DETEKCE

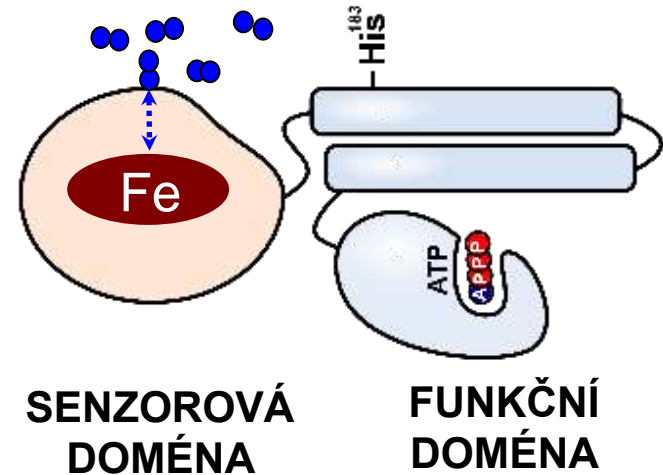
genů pro senzory resp. související s patogenitou,
virulencí a ATB resistencí bakterií/virů

Bakteriální hemové senzory kyslíku (plynů) PŘENOS SIGNÁLU

histidinkinasa s globinovou
strukturou senzorné domény
A/GcHK

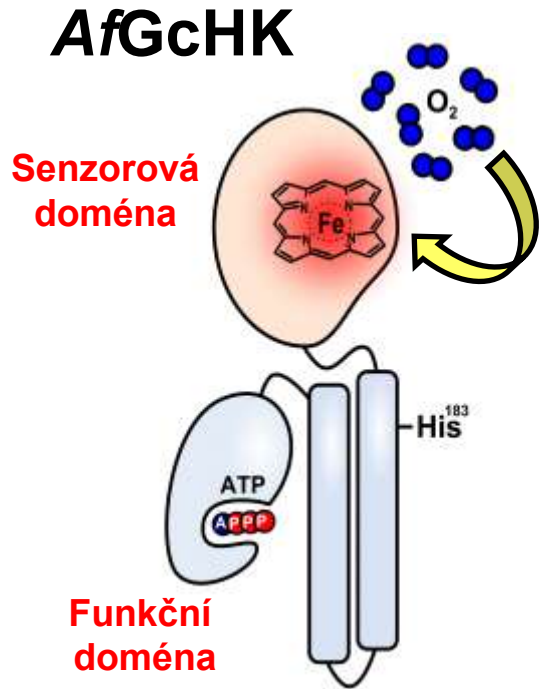
Anaeromyxobacter strain Fw109-5,
Anaeromyxobacter dehalogenans,
Myxococcus xanthus

anaerobní růst



- Fojtíková V. et al. *Biochemistry* (2015) **54**, 5017.
Stranova M. et al. *Proteins* (2016) **84**, 1375–1389.
Stranova M. et al. *J Biol Chem* (2017) **292**, 20921.
Skalova M. et al. *J Biol Chem* (2020) **295**, 1587.

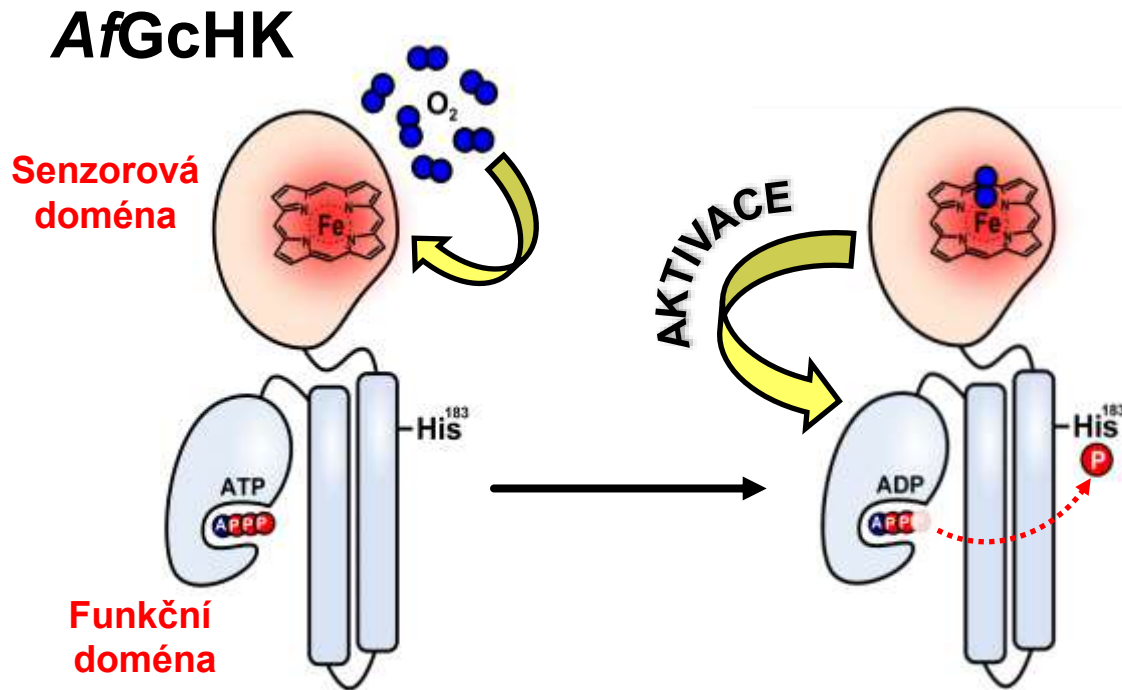
Bakteriální hemové senzory kyslíku (plynů) PŘENOS SIGNÁLU



- Fojtíková V. et al. *Biochemistry* (2015) **54**, 5017.
Stranava M. et al. *Proteins* (2016) **84**, 1375–1389.
Stranava M. et al. *J Biol Chem* (2017) **292**, 20921.
Skalova M. et al. *J Biol Chem* (2020) **295**, 1587.

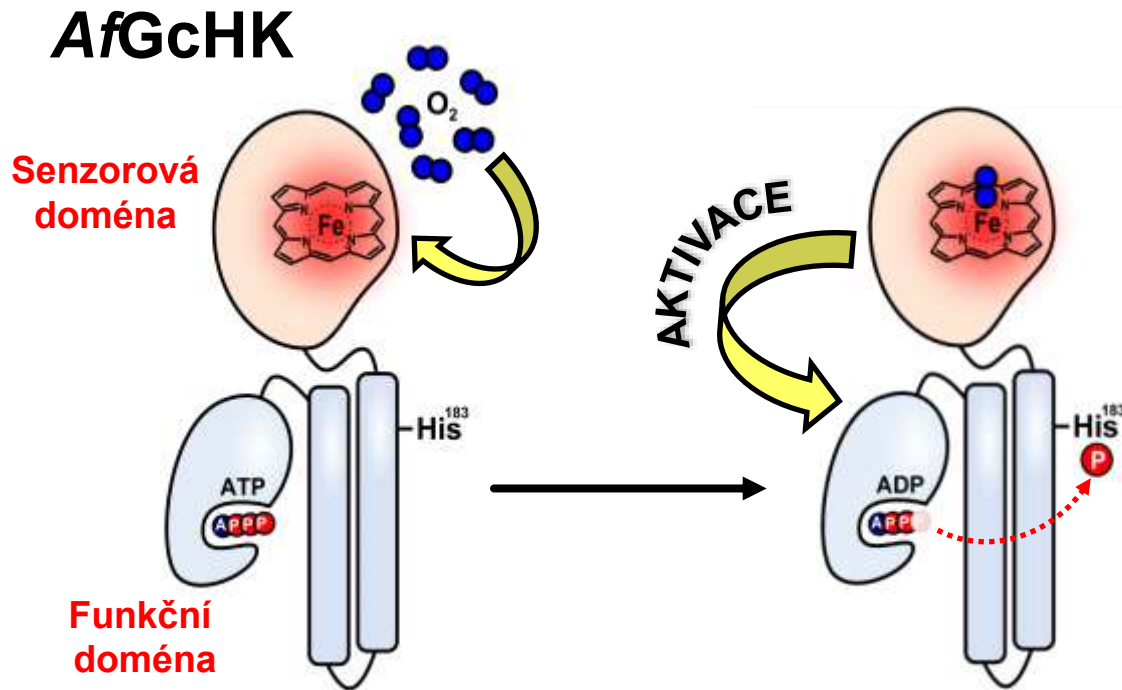
Bakteriální hemové senzory kyslíku (plynů)

PŘENOS SIGNÁLU



- Fojtíková V. et al. *Biochemistry* (2015) **54**, 5017.
Stranava M. et al. *Proteins* (2016) **84**, 1375–1389.
Stranava M. et al. *J Biol Chem* (2017) **292**, 20921.
Skalova M. et al. *J Biol Chem* (2020) **295**, 1587.

Bakteriální hemové senzory kyslíku (plynů) PŘENOS SIGNÁLU



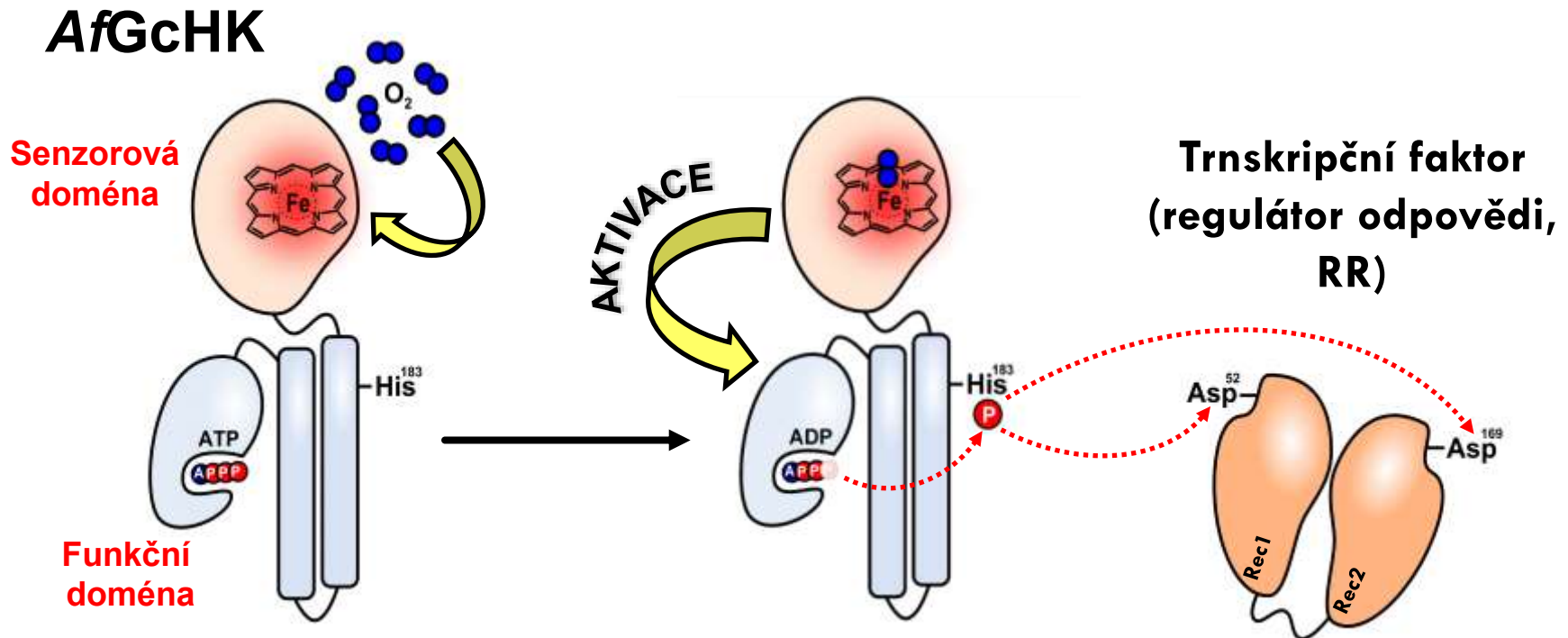
INTRAPROTEINOVÝ

PŘENOS SIGNÁLU

- Fojtíková V. et al. *Biochemistry* (2015) **54**, 5017.
Stranava M. et al. *Proteins* (2016) **84**, 1375–1389.
Stranava M. et al. *J Biol Chem* (2017) **292**, 20921.
Skalova M. et al. *J Biol Chem* (2020) **295**, 1587.

Bakteriální hemové senzory kyslíku (plynů)

PŘENOS SIGNÁLU

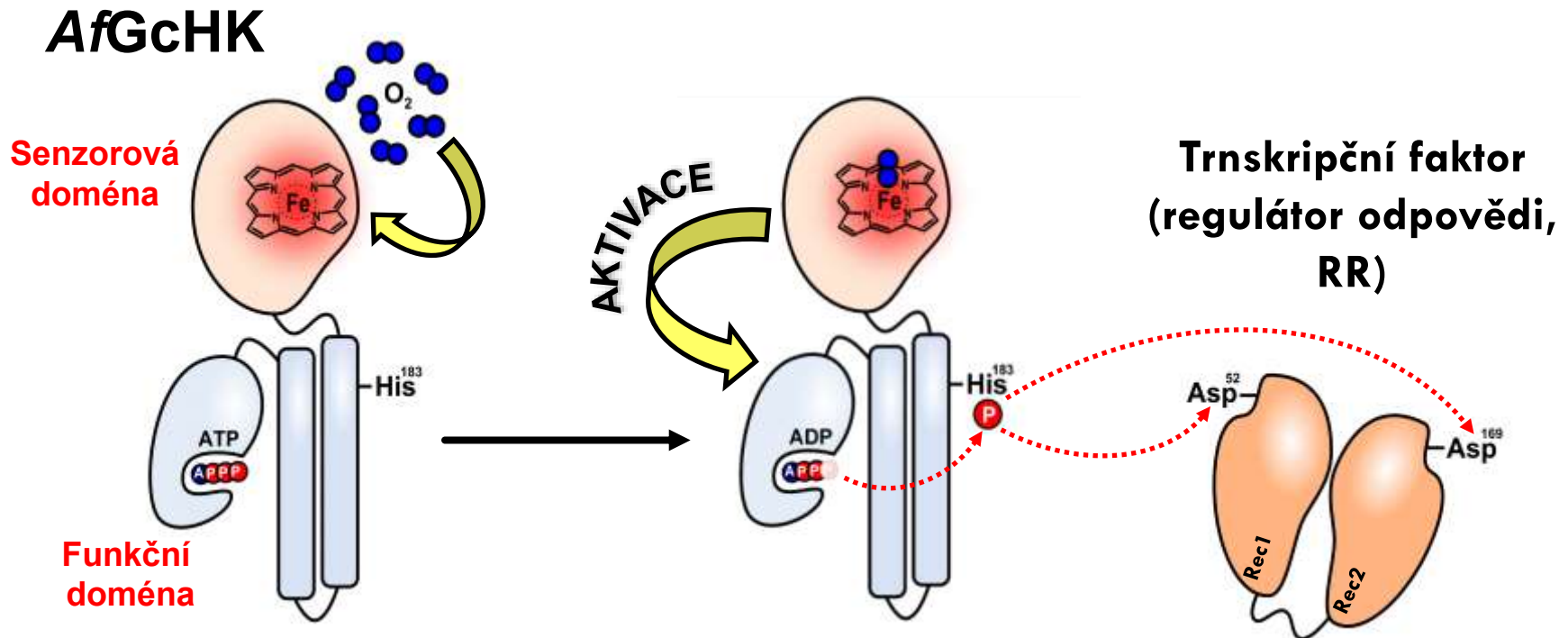


INTRAPROTEINOVÝ

PŘENOS SIGNÁLU

- Fojtíková V. et al. *Biochemistry* (2015) **54**, 5017.
Stranava M. et al. *Proteins* (2016) **84**, 1375–1389.
Stranava M. et al. *J Biol Chem* (2017) **292**, 20921.
Skalova M. et al. *J Biol Chem* (2020) **295**, 1587.

Bakteriální hemové senzory kyslíku (plynů) PŘENOS SIGNÁLU



INTRAPROTEINOVÝ INTERPROTEINOVÝ PŘENOS SIGNÁLU

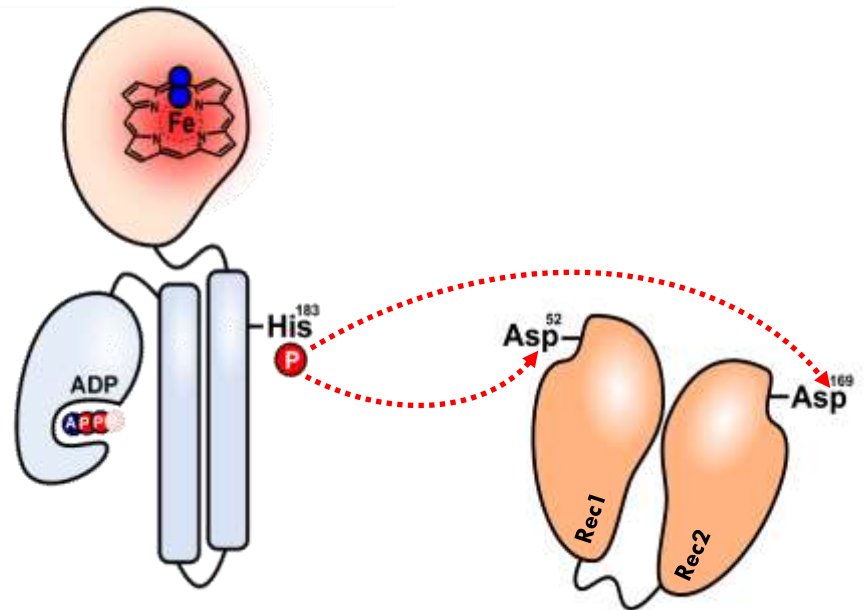
- Fojtíková V. et al. *Biochemistry* (2015) **54**, 5017.
Stranava M. et al. *Proteins* (2016) **84**, 1375–1389.
Stranava M. et al. *J Biol Chem* (2017) **292**, 20921.
Skalova M. et al. *J Biol Chem* (2020) **295**, 1587.

Interproteinový přenos signálu

1. STUDIE OLIGOMERNÍHO STAVU

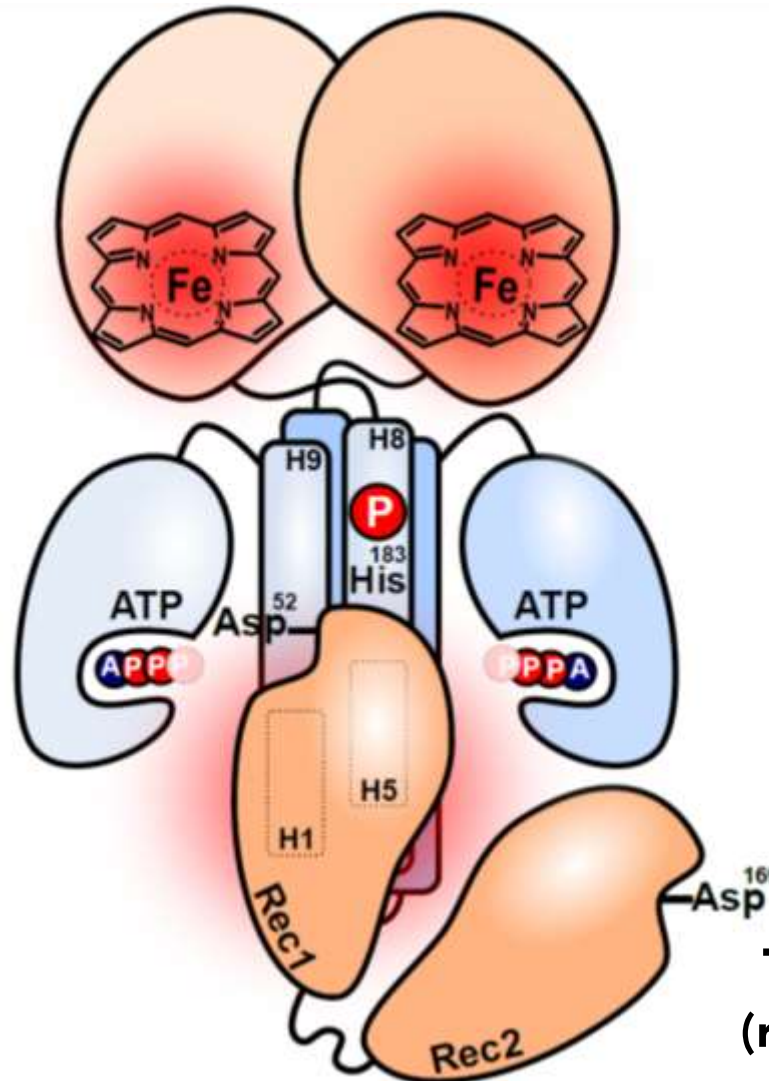
2. KINETICKÁ ANALÝZA

3. STRUKTURNÍ STUDIE



INTERPROTEINOVÝ PŘENOS SIGNÁLU

AfGcHK



**Transkripční faktor
(regulátor odpovědi)**

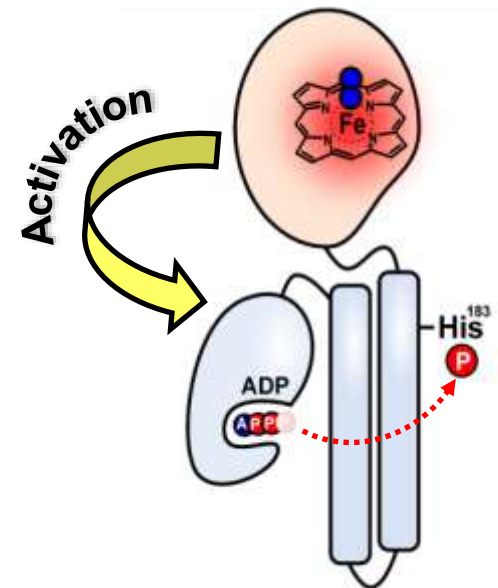
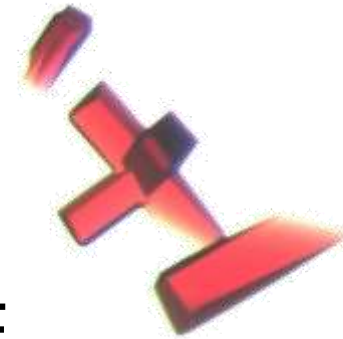
Intraproteinový přenos signálu

1. KINETICKÁ ANALÝZA

2. HDX STUDIE

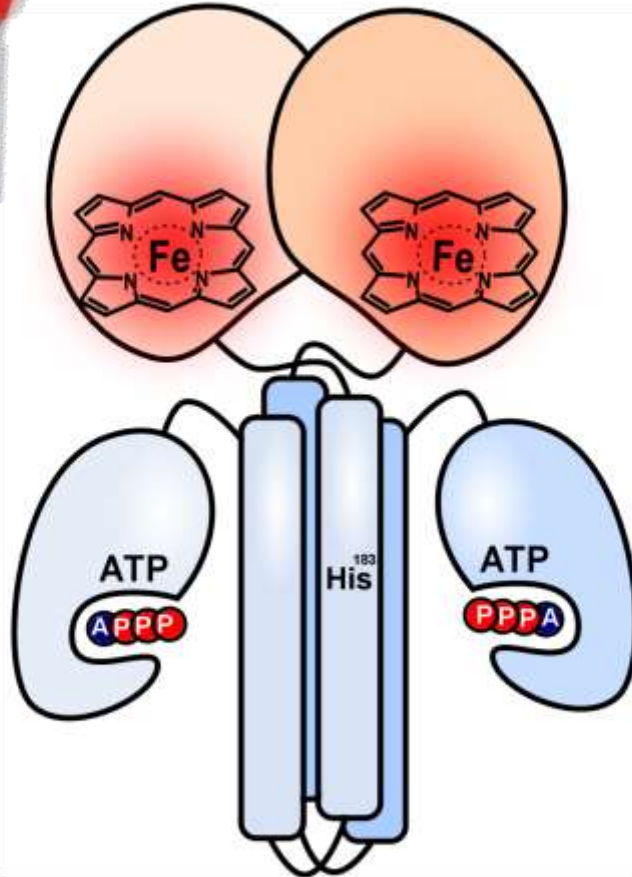
3. KRYSTALOGRAFICKÁ STUDIE

4. DIMERIZAČNÍ ROZHRANÍ

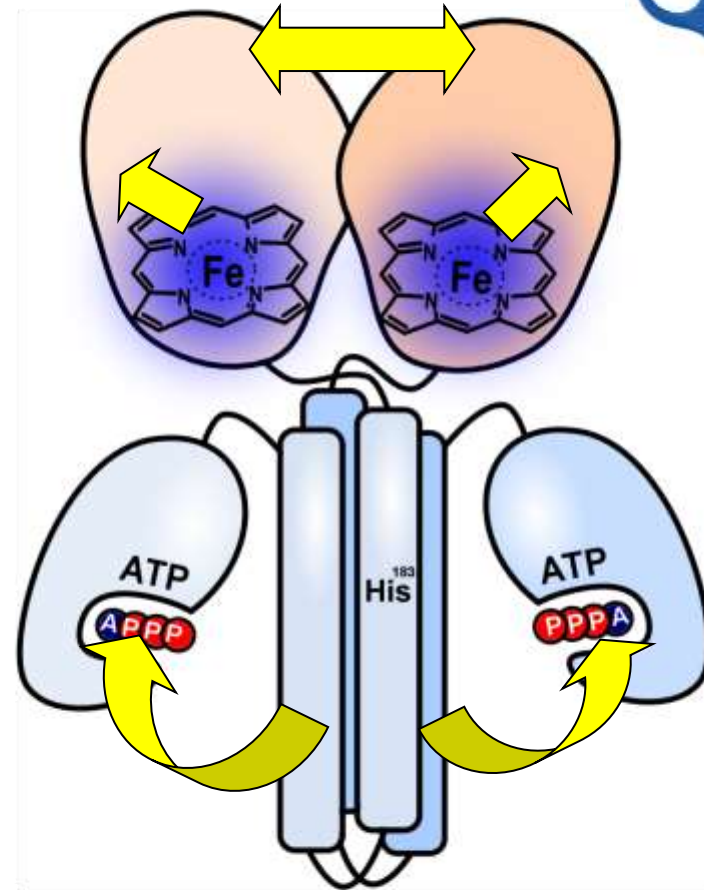


INTRAPROTEINOVÝ PŘENOS SIGNÁLU

Aktivní stav
Fe(III)



Neaktivní stav
Fe(II)



Stranova M. et al. *J Biol Chem* (2017) **292**, 20921.

Fojtíková V. et al. *Biochemistry* (2015) **54**, 5017.

Skalova M. et al. *J Biol Chem* (2020) *in press*

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

Received for publication, October 23, 2019, and in revised form, December 30, 2019. Published, Papers in Press, December 30, 2019, DOI 10.1074/jbc.RA119.011574

✉ Tereza Skalova^{†1}, ✉ Alzbeta Lengalova^{§1}, ✉ Jan Dohnalek[‡], Karl Harlos[¶], Peter Mihalcin[¶], ✉ Petr Kolenko^{†1}, Martin Stranova[§], Jan Blaha^{§2}, Toru Shimizu[§], and ✉ Markéta Martínková^{§3}

From the [†]Institute of Biotechnology of the Czech Academy of Sciences, v.v.i., Biocev, Vestec, 252 50 Czech Republic, the [§]Department of Biochemistry, Faculty of Science, Charles University, Prague 2, 128 43 Czech Republic, the [‡]Division of Structural Biology, The Wellcome Trust Centre for Human Genetics, University of Oxford, OX3 7BN Oxford, United Kingdom, and the [¶]FNSPE, Czech Technical University in Prague, Brehova 7, Prague 1, 115 19 Czech Republic

Edited by F. Peter Guengerich

The heme-based oxygen sensor protein AfGcHK is a globin-coupled histidine kinase in the soil bacterium *Anaeromyxobacter* sp. Fw109-5. Its C-terminal functional domain exhibits autophosphorylation activity induced by oxygen binding to the heme-Fe(II) complex located in the oxygen-sensing N-terminal globin domain. A detailed understanding of the signal transduction mechanisms in heme-containing sensor proteins remains elusive. Here, we investigated the role of the globin domain's dimerization interface in signal transduction in AfGcHK. We present a crystal structure of a monomeric imidazole-bound AfGcHK globin domain at 1.8 Å resolution, revealing that the helices of the WT globin dimer are under tension and suggesting that Tyr-15 plays a role in both this tension and the globin domain's dimerization. Biophysical experiments revealed that whereas the isolated WT globin domain is dimeric in solution, the Y15A and Y15G variants in which Tyr-15 is replaced with Ala or Gly, respectively, are monomeric. Additionally, we found that although the dimerization of the full-length protein is preserved via the kinase domain dimerization interface in all variants, full-length AfGcHK variants bearing the Y15A or Y15G substitutions lack enzymatic activity. The combined structural and biophysical results presented here indicate that Tyr-15 plays a key role in the dimerization of the globin domain of AfGcHK and that globin domain dimerization is essential for internal signal transduction and autophosphorylation in this

protein. These findings provide critical insights into the signal transduction mechanism of the histidine kinase AfGcHK from *Anaeromyxobacter*.

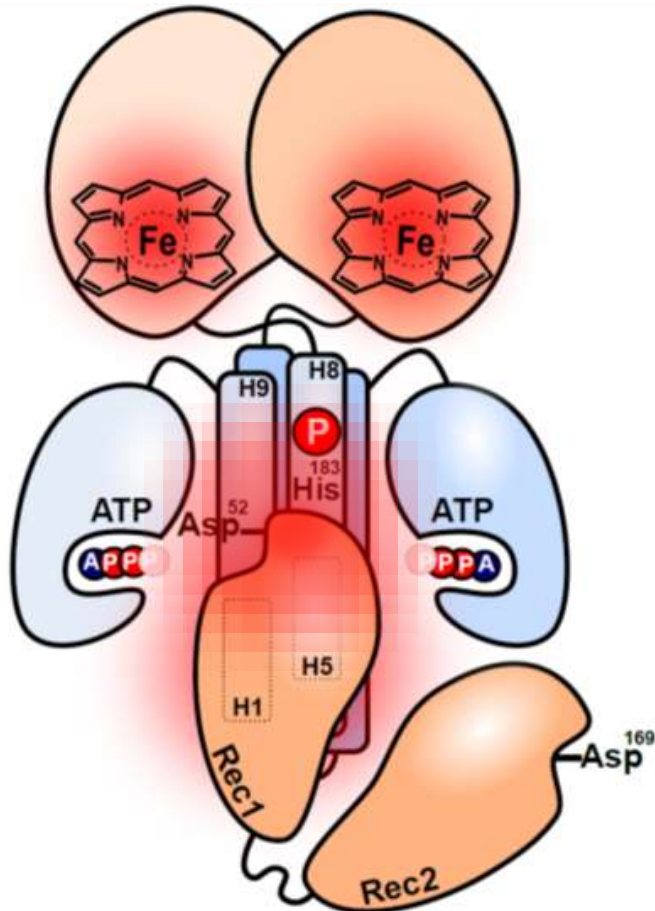
Heme complexes play essential roles in many important physiological processes, including oxygen transport and storage, electron transport, oxidative stress protection, and signaling. They are also vital components of heme-containing sensor proteins, a large group of biologically significant proteins that are represented in almost all living organisms and exhibits great functional diversity (1–6).

There is considerable interest in the structure-function relationships of heme-based oxygen sensors because the heme-iron complex serves as the signaling center (1, 7–14). Proteins of this type often act as one component of a two-component signal transduction system. These systems are associated with biofilm formation and virulence in certain pathogenic bacteria but also fulfill many other functions (15–18). The heme-based oxygen sensor AfGcHK⁴ is a globin-coupled histidine kinase from the soil bacterium *Anaeromyxobacter* sp. Fw109-5 (19). It has an N-terminal heme-bound globin domain and a C-terminal kinase domain. The binding of oxygen to a heme-Fe(II) complex in the oxygen-sensing globin domain induces autophosphorylation of its kinase domain via interdomain signal transduction (19). AfGcHK proteins containing a heme-Fe(II)-O₂

Bakteriální hemové senzory kyslíku (plynů)

PŘENOS SIGNÁLU

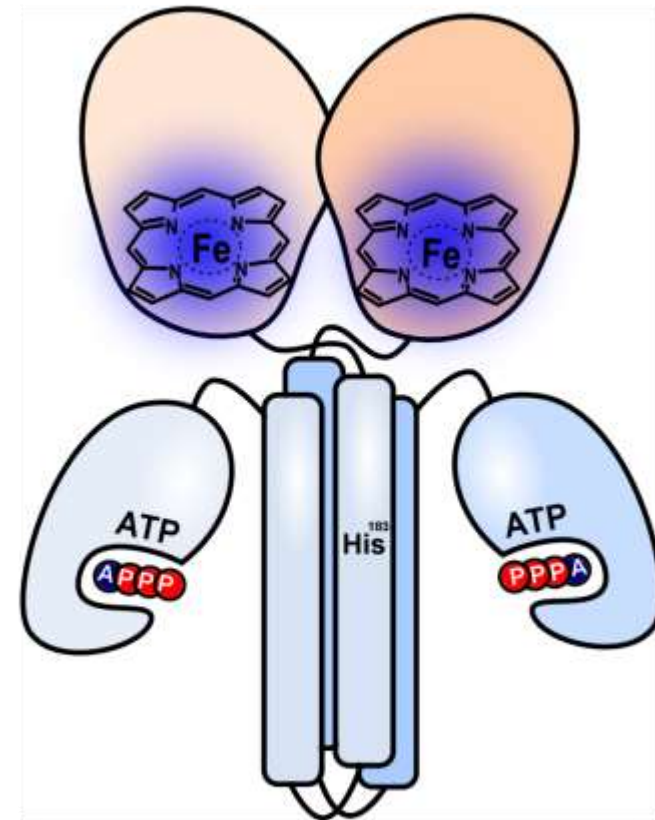
INTERPROTEINOVÝ



Transkripční faktor (regulátor odpovědi)

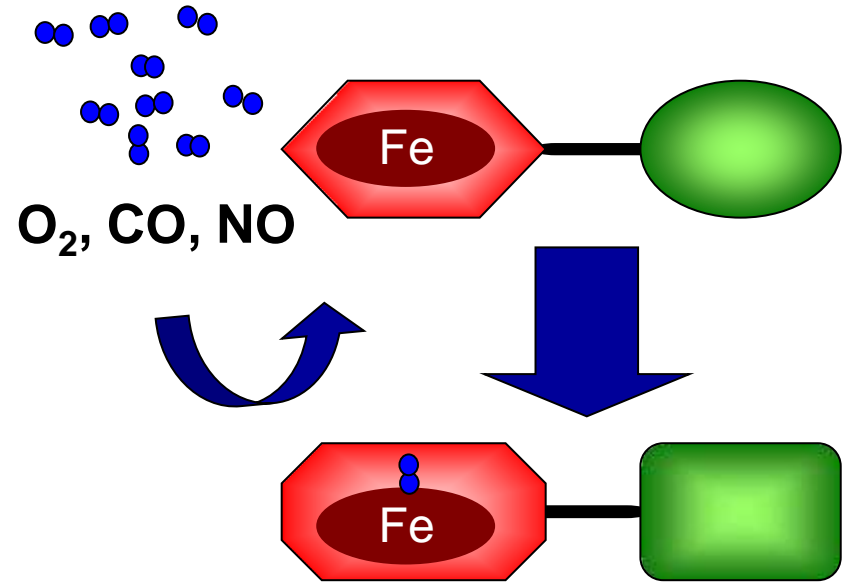
INTRAPROTEINOVÝ

Senzorová doména



Funkční doména

Bakteriální hemové senzory kyslíku (plynů) CÍLE VÝZKUMU



PŘENOS SIGNÁLU
strukturově-funkční vztahy

RYCHLÝ ZPŮSOB DETEKCE

genů pro senzory resp. související s patogenitou,
virulencí a ATB resistencí bakterií/virů

Bakteriální hemové senzory kyslíku (plynů)

RYCHLÝ ZPŮSOB DETEKCE



Call: 9th Call – JPIAMR Joint Call on Diagnostics and Surveillance 2019

Title: Prevention of antibiotic resistance by TARGETed Treatment of pneumonia in children

Acronym: TARGET

Project composition

Type	Name	Institute	Country
Coordinator	Marien De Jonge	Radboud University Medical Center	The Netherlands
Partner	Markéta Martinkova	Charles University Prague	Czech Republic
Partner	Blandina Mmbaga	Kilimanjaro Christian Medical Centre (KCMC)	Tanzania

Institucionální podpora grantem 8F20011 Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy

Bakteriální hemové senzory kyslíku (plynů)

RYCHLÝ ZPŮSOB DETEKCE

bakterie

Streptococcus pneumoniae

Haemophilus influenzae

Staphylococcus aureus

Mycoplasma pneumoniae

viry

lidský orthopneumovirus (*respiratory syncytical virus, RSV*)

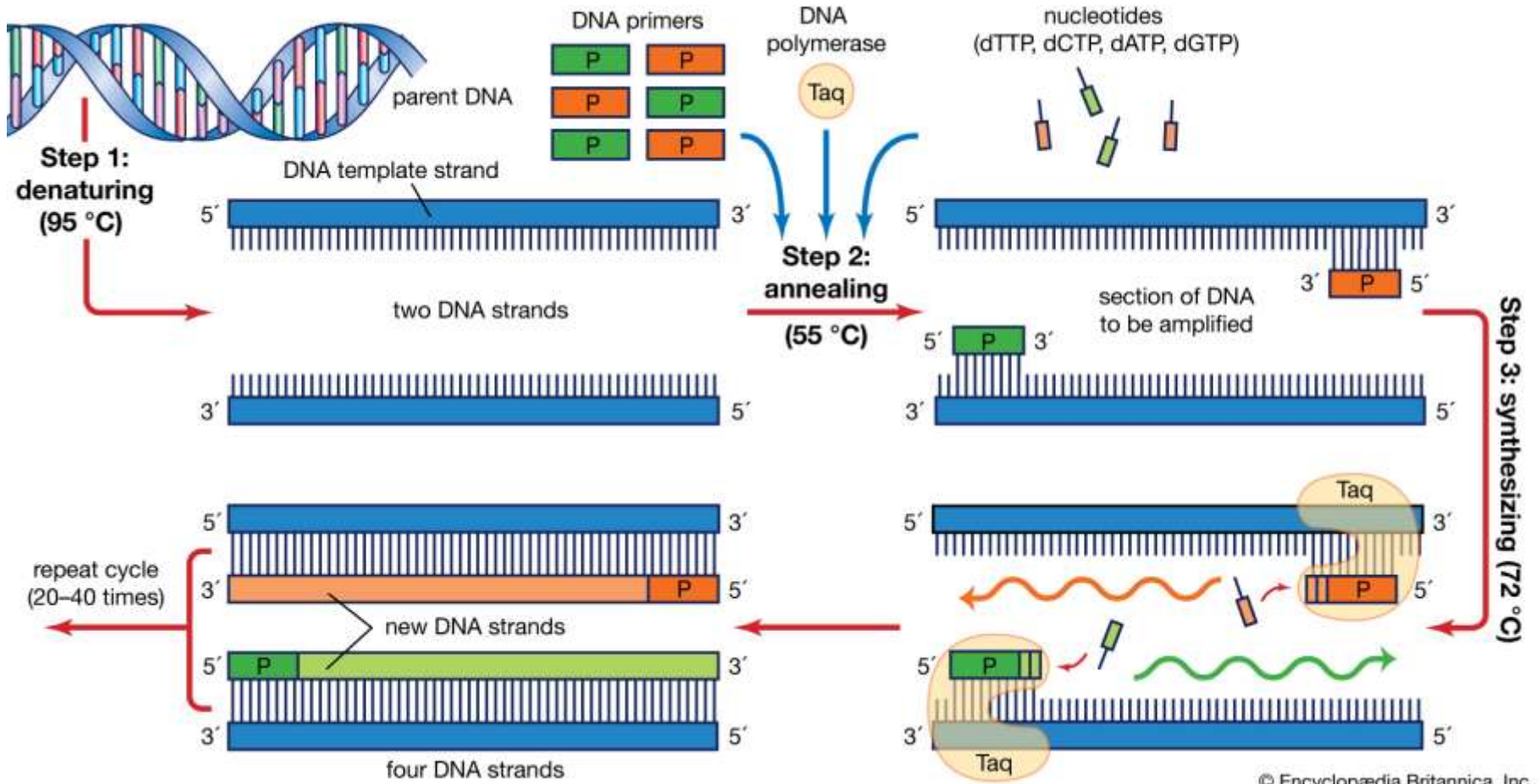
virus chřipky (*influenza A a B*)

virus způsobující COVID-19 (*SARS-CoV-2*)

Bakteriální hemové senzory kyslíku (plynů)

RYCHLÝ ZPŮSOB DETEKCE

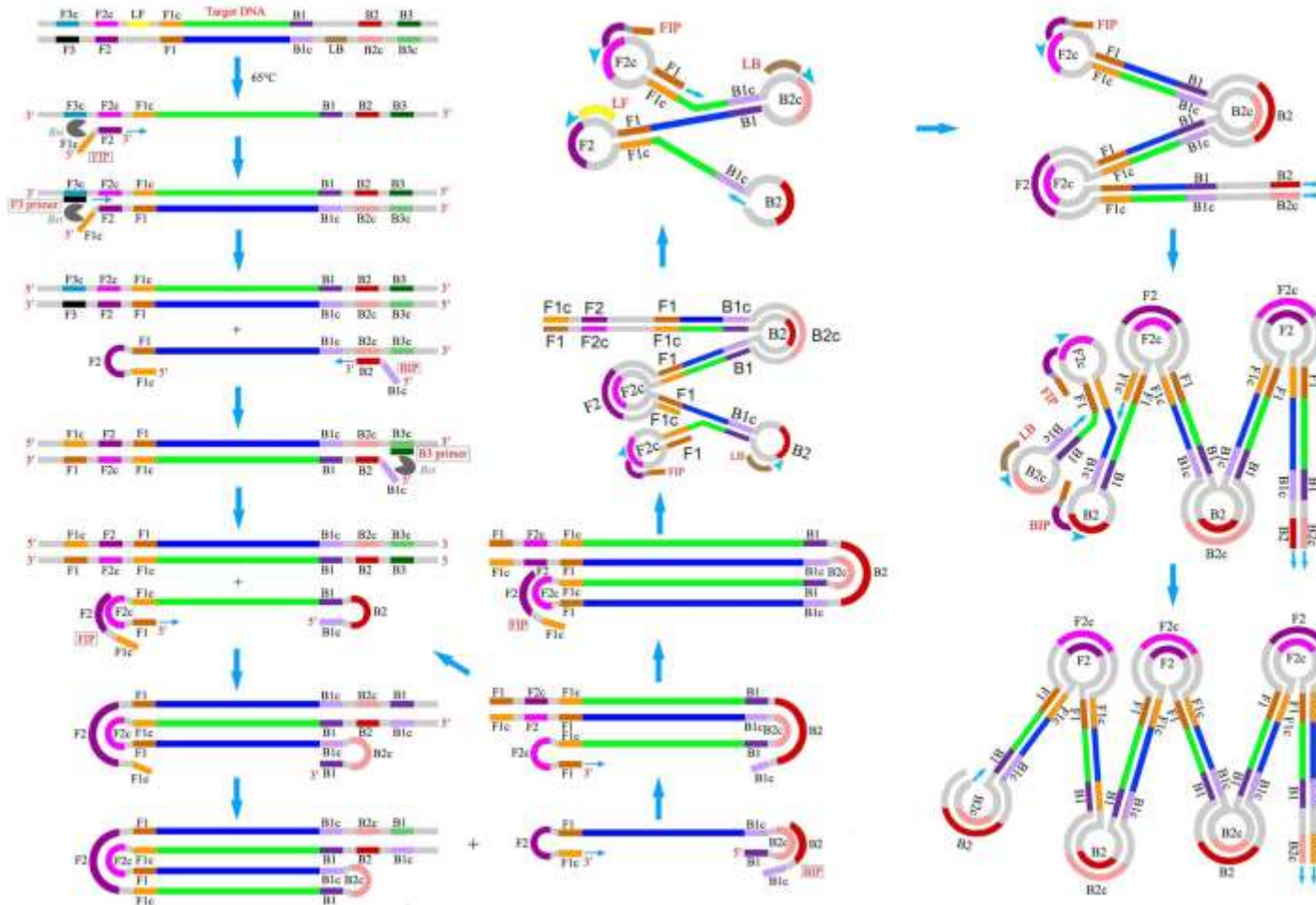
Polymerázová řetězová reakce (PCR)



Taq DNA polymerase

Bakteriální hemové senzory kyslíku (plynů) RYCHLÝ ZPŮSOB DETEKCE

Izotermální amplifikace zprostředkovaná smyčkami (LAMP) (LAMP)



***Bst* DNA polymerase**

Bakteriální hemové senzory kyslíku (plynů)

RYCHLÝ ZPŮSOB DETEKCE

PCR vers. LAMP

PCR	LAMP
Teplotní cykly (drahý přístroj)	Izotermální – jediná teplota (bez přístroje)
2 „primery“ – specifické oblasti DNA	4 – 6 primerů
Pomalé, typicky >1 hodina	Rychlé, typicky <30 min
Výtěžek amplifikace ~0.2 mg	Výtěžek amplifikace ~10-20 mg (100x více než PCR)
Nevhodné pro vizuální detekci (drahý přístroj pro detekci a náklady na další činidla)	Vhodné pro vizuální detekci (bez přístroje) – zákal, barva....
Citlivé k přítomnosti inhibitorů Taq DNA polymerasy	Vysoká tolerance k inhibitorům Bst DNA polymerasy

Bakteriální hemové senzory kyslíku (plynů)

RYCHLÝ ZPŮSOB DETEKCE

PCR vers. LAMP

PCR	LAMP
Teplotní cykly (drahý přístroj)	Izotermální – jediná teplota (bez přístroje)
2 „primery“ – specifické oblasti DNA	4 – 6 primerů - specifické
Pomalé , typicky >1 hodina	Rychlé , typicky <30 min
Výtěžek amplifikace ~0.2 mg	Výtěžek amplifikace ~10-20 mg (100x více než PCR) - citlivé
Nevhodné pro vizuální detekci (drahý přístroj pro detekci a náklady na další činidla)	Vhodné pro vizuální detekci (bez přístroje) – zákal, barva.... - levné
Citlivé k přítomnosti inhibitorů Taq DNA polymerasy	Vysoká tolerance k inhibitorům Bst DNA polymerasy

Bakteriální hemové senzory kyslíku (plynů)

RYCHLÝ ZPŮSOB DETEKCE

Streptococcus pneumoniae – deteke pomoci PCR

> *Streptococcus pneumoniae* (strain TIGR4, serotype 4, **LytA gene**)

```
ATGGAAATTAATGTGAGTAAATTAAGAACAGATTTGCCTCAAGTCGGCGTGCAACCATATAGGCAAGTACACGCACACTCAAC
TGGGAATCCGCATTCAACCGTACAGAATGAAGCGGATTATCACTGGCGGAAAGACCCAGAATTAGGTTTTTTCTCGCACATTG
TTGGGAACGGTTGCATCATGCAGGTAGGACCTGTTGATAATGGTGCCTGGGACGTTGGGGGCGGTTGGAATGCTGAGACCTAT
GCAGCGGTTGAACTGATTGAAAGCCATTCAACCAAAGAAGAGTTCATGACGGACTACCGCCTTTATATCGAACTCTTACGCAA
TCTAGCAGATGAAGCAGGTTTTGCCGAAAACGCTTGATACAGGGAGTTTAGCTGGAATTAAAACGCACGAGTATTGCACGAATA
ACCAACCAAACAACCACTCAGACCACGTTGACCCTTATCCATATCTTGCTAAATGGGGCATTAGCCGTGAGCAGTTTAAGCAT
GATATTGAGAACGGCTTGACGATTGAAACAGGCTGGCAGAAGAATGACACTGGCTACTGGTACGTACATTCAGACGGCTCTTA
TCCAAAAGACAAGTTTGAGAAAATCAATGGCACTTGGTACTACTTTGACAGTTCAGGCTATATGCTTGCAGACCGCTGGAGGA
AGCACACAGACGGCAACTGGTACTGGTTCGACAACTCAGGCGAAATGGCTACAGGCTGGAAGAAAATCGCTGATAAGTGGTAC
TATTTCAACGAAGAAGGTGCCATGAAGACAGGCTGGGTCAAGTACAAGGACACTTGGTACTACTTAGACGCTAAAGAAGGCGC
CATGGTATCAAATGCCTTTATCCAGTCAGCGGACGGAACAGGCTGGTACTACCTCAAACCAGACGGAACACTGGCAGACAGGC
CAGAATTCACAGTAGAGCCAGATGGCTTGATTACAG
```

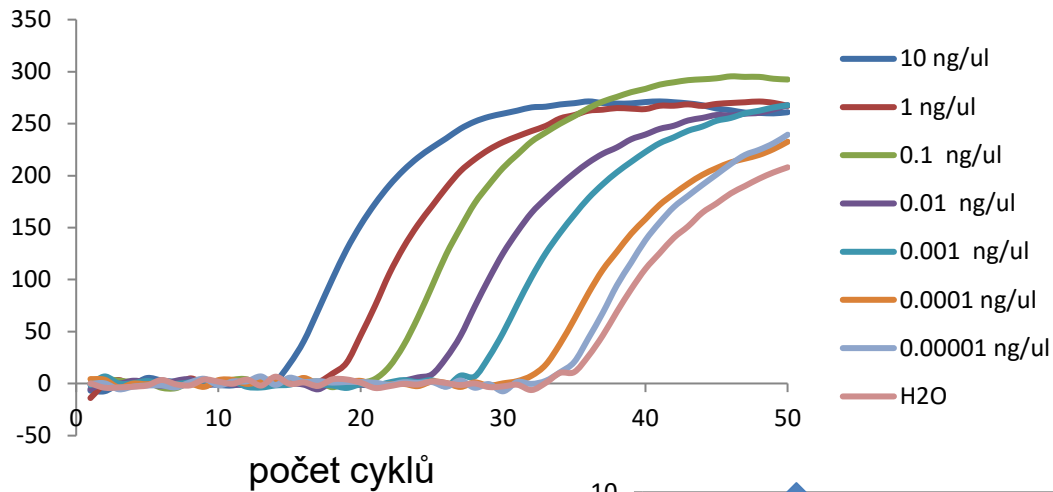
ACGCAATCTAGCAGATGAAGCA – forward qPCR primer

GCCGAAAACGCTTGATACAGGGAG – qPCR probe

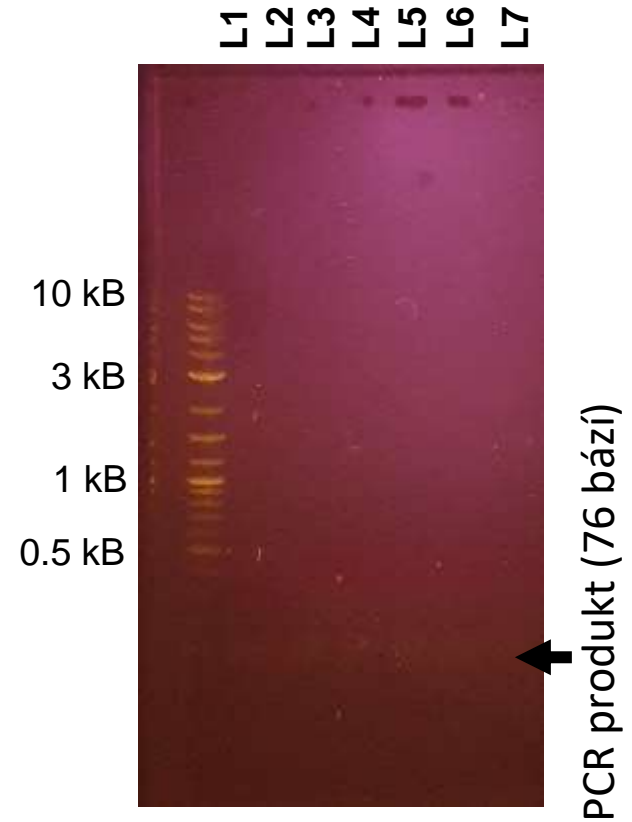
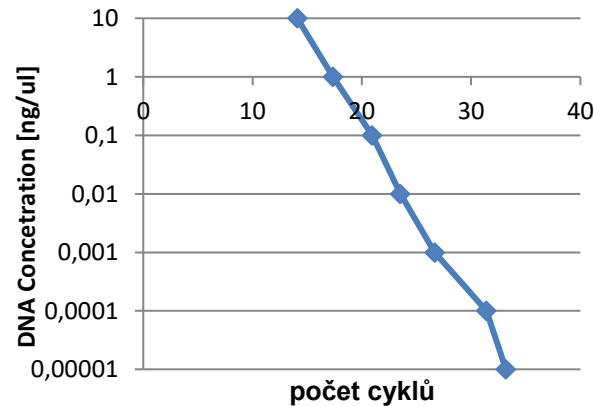
AGCTGGAATTAAAACGCACGA – reverse qPCR primer

Bakteriální hemové senzory kyslíku (plynů) RYCHLÝ ZPŮSOB DETEKCE

Streptococcus pneumoniae – detekce pomocí PCR



L1 – SP DNA 10 ng/ul
L2 – SP DNA 1 ng/ul
L3 – SP DNA 0.1 ng/ul
L4 – SP DNA 0.01 ng/ul
L5 – SP DNA 0.001 ng/ul
L6 – SP DNA 0.0001 ng/ul



Bakteriální hemové senzory kyslíku (plynů)

RYCHLÝ ZPŮSOB DETEKCE

Streptococcus pneumoniae – deteke pomoci LAMP

> *Streptococcus pneumoniae* (strain TIGR4, serotype 4, **LytA gene**)

ATGGAATTAATGTGAGTAAATTAAGAACAGATTTGCCTCAAGTCGG**CGT**GCAACCATATAGGCAAGTACACGCA**CACTCAAC**
TGGGAATCCGCATTCAACCGTACAGAA**TGAAGCGGATTATCACTGGCGG**AAAGACCCAGAATTAGGTTTTT**TCTCGCACATTG**
TTGGGAACGGT**TGCATCATGCAGGTAGGA**CCTGTTGATAATGGTGCCTGGGACGTTGGG**GGCGGTTGGAATGCT**GAGACCTAT
GCAGCGGTTGAACTGATTGAAAGCCATTCAACCAAAGAAGAGTTCATGACGGACTACCGCCTTTATATCGAACTCTTACGCAA
TCTAGCAGATGAAGCAGGTTTGCCGAAAACGCTTGATACAGGGAGTTTAGCTGGAATTAAAACGCACGAGTATTGCACGAATA
ACCAACCAAACAACCACTCAGACCACGTTGACCCTTATCCATATCTTGCTAAATGGGGCATTAGCCGTGAGCAGTTTAAGCAT
GATATTGAGAACGGCTTGACGATTGAAACAGGCTGGCAGAAGAATGACACTGGCTACTGGTACGTACATTCAGACGGCTCTTA
TCCAAAAGACAAGTTTGAGAAAATCAATGGCACTTGGTACTACTTTGACAGTTCAGGCTATATGCTTGCAGACCGCTGGAGGA
AGCACACAGACGGCAACTGGTACTGGTTCGACAACTCAGGCGAAATGGCTACAGGCTGGAAGAAAATCGCTGATAAGTGGTAC
TATTTCAACGAAGAAGGTGCCATGAAGACAGGCTGGGTCAAGTACAAGGACACTTGGTACTACTTAGACGCTAAAGAAGGCGC
CATGGTATCAAATGCCTTTATCCAGTCAGCGGACGGAACAGGCTGGTACTACCTCAAACCAGACGGAACACTGGCAGACAGGC
CAGAATTCACAGTAGAGCCAGATGGCTTGATTACAG

5 LAMP primerů:

F3

F1cF2 (FIP primer)

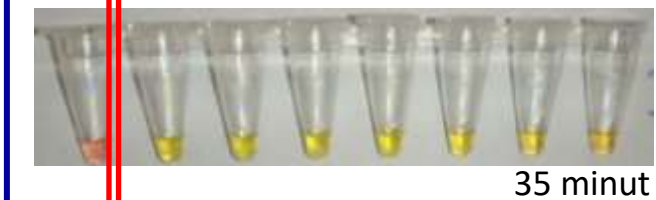
B1cB2 (FIB primer)

BL

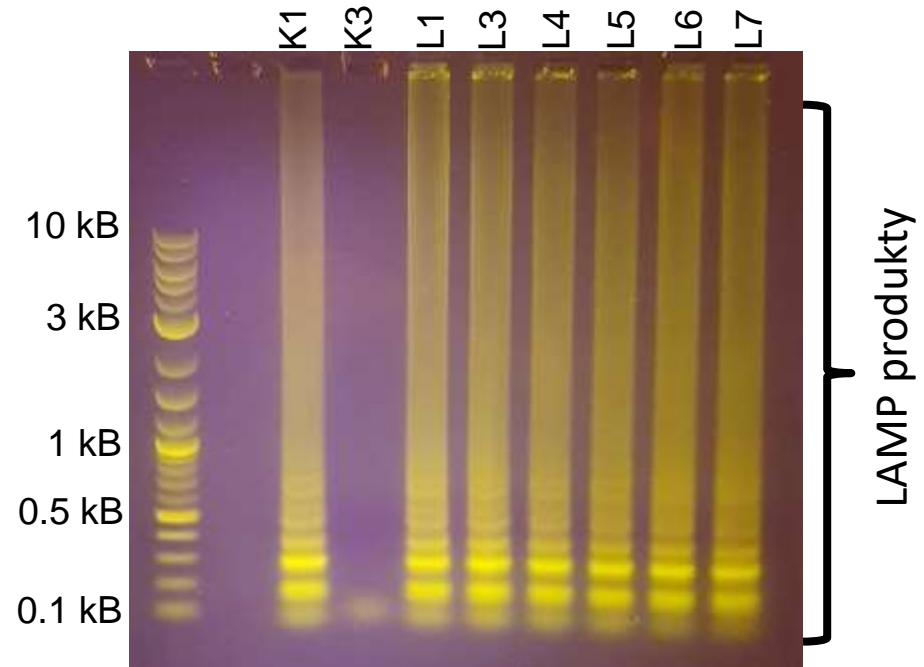
B3c

Bakteriální hemové senzory kyslíku (plynů) RYCHLÝ ZPŮSOB DETEKCE

Streptococcus pneumoniae – detekce pomocí LAMP



- K1 – Warmstar pol. + LAMP primers, NO lysate DNA
- L – stock con. ~150 ng/ul
- L1 – LAMP mix + SP DNA 10 ng/ul
- L2 – LAMP mix + SP DNA 1 ng/ul
- L3 – LAMP mix + SP DNA 0.1 ng/ul
- L4 – LAMP mix + SP DNA 0.01 ng/ul
- L5 – LAMP mix + SP DNA 0.001 ng/ul
- L6 – LAMP mix + SP DNA 0.0001 ng/ul



Bakteriální hemové senzory kyslíku (plynů)

RYCHLÝ ZPŮSOB DETEKCE

deteke pomoci LAMP

bakterie

- ✓ *Streptococcus pneumoniae*
- ✓ *Haemophilus influenzae*
- Staphylococcus aureus*
- Mycoplasma pneumoniae*

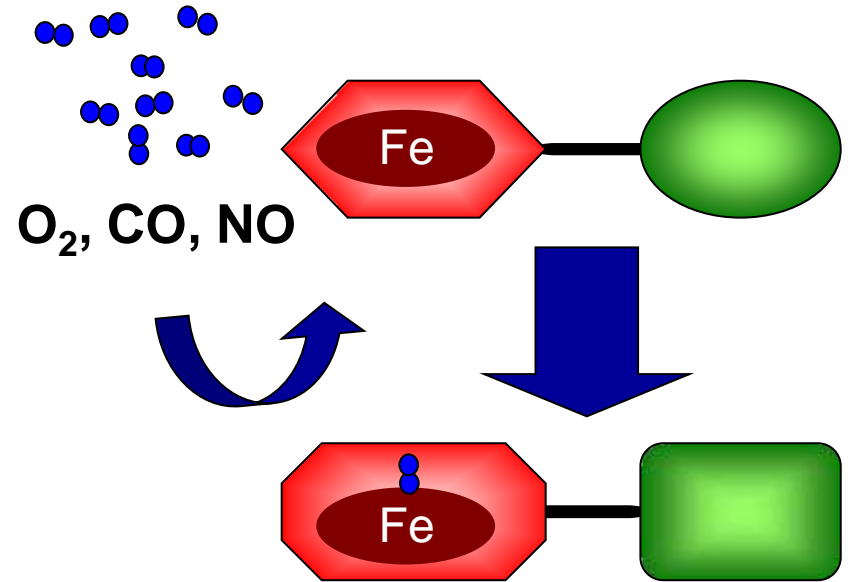
viry

- lidský orthopneumovirus (*respiratory syncytical virus, RSV*)
- virus chřipky (*influenza A a B*)
- virus způsobující COVID-19 (*SARS-CoV-2*)

Bakteriální hemové senzory kyslíku (plynů)

SHRNUTÍ

PŘENOS SIGNÁLU
strukturně-fukční vztahy



RYCHLÝ ZPŮSOB DETEKCE

genů pro senzory resp. související s patogenitou,
virulencí a ATB resistencí bakterií/virů

Acknowledgment

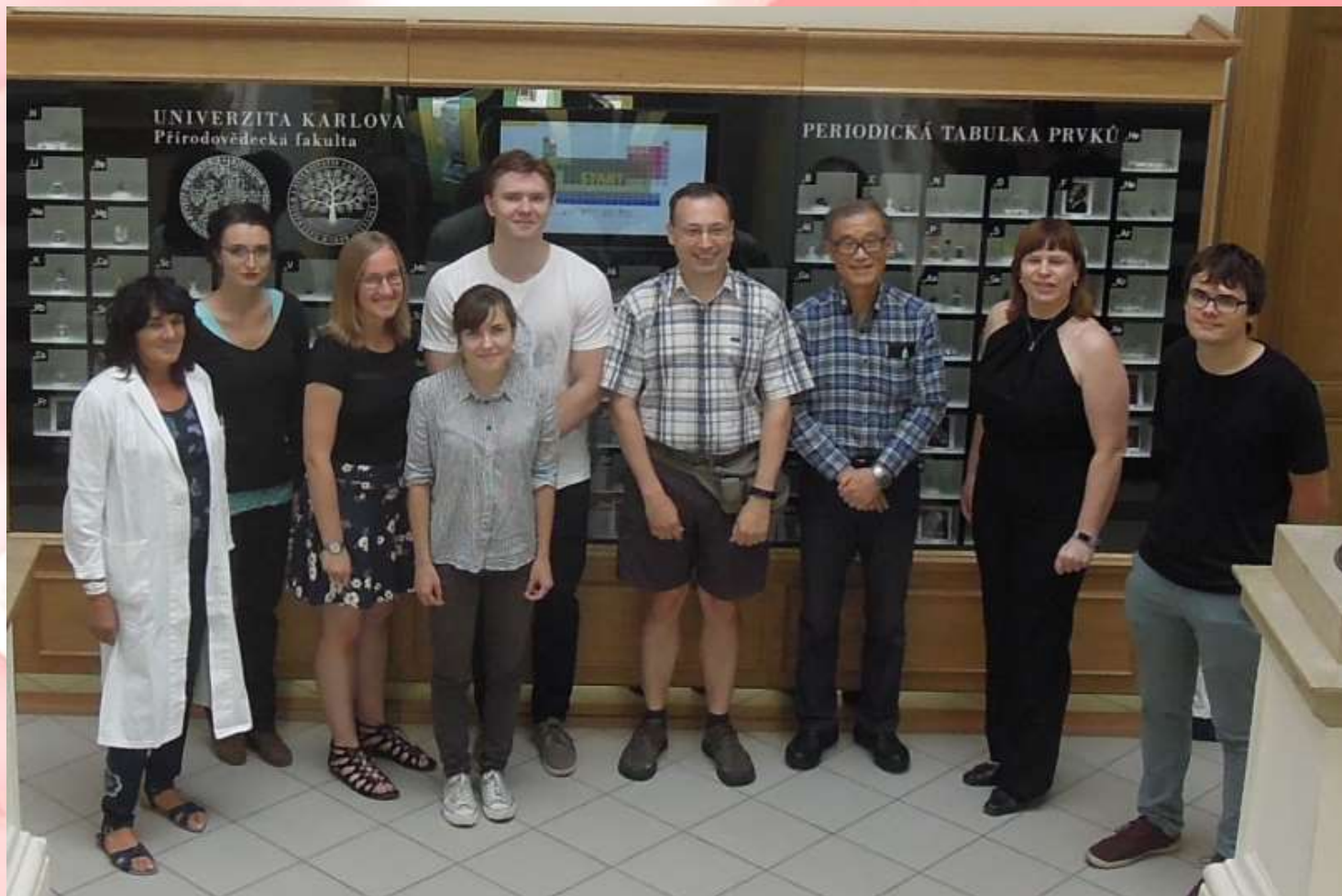
Marien de Jonge

Marten Vos

Costas Varotsis

Petr Man

Jan Dohnálek



www.natur.cuni.cz/martinkova

