

Savani Anbalagan✉

Instytut Biologii Molekularnej i Biotechnologii,
Wydział Biologii, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu

https://doi.org/10.18388/pb.2021_551

✉ autor korespondujący: savani.anbalagan@amu.edu.pl

Słowa kluczowe: wykrywanie wody, czujnik wody, wykrywanie tlenu, gazoreceptor

STRESZCZENIE

Sposób w jaki komórki wykrywają wodę ma fundamentalne znaczenie w biologii. Higrosensacja została wykazana w wyspecjalizowanych komórkach czuciowych, które wykrywają wilgotność zewnątrzkomórkową. Nawet u mikroorganizmów czujniki osmozy (ang. *osmosensors*) nie wychwytyją wody bezpośrednio. Uważam, że komórki muszą mieć zdolność do wykrywania cząsteczek wody bezpośrednio za pomocą czujników białkowych lub akwareceptorów, które umożliwiłyby im migrację i przetrwanie w warunkach ubogich w wodę oraz ewolucję w organizmy wielokomórkowe. Ze względu na potencjalną zdolność cząsteczek wody do wiązania się w miejscach wiązania gazu, w domenach sensorycznych gazoreceptorów zawierających cząsteczki hemu sugeruje się, że niektóre z nich mogłyby pełnić równoległą rolę jako białkowe akwareceptory. Podobnie jak gazoreceptory wykrywające gaz (substancję rozpuszczoną) funkcjonują w prawie każdej komórce, tak akwareceptory wykrywające wodę muszą również być zlokalizowane w prawie każdej komórce. Myślę, że akwareceptory są obecne w błonie komórkowej, cytoplazmie i każdej organelli. Ponadto, zastanawiam się, czy hemoglobina może również zostać uznana za potencjalny akwareceptor.

WPROWADZENIE

Ewolucja zwierząt w kierunku zmiany siedliska wodnego na lądowe i odwrotnie musiała wpłynąć na specjalizację mechanizmów wyczuwania wody. Niektóre bezkręgowce mają zdolność wyczuwania wody lub wilgotności (higrosensacja) poprzez wyspecjalizowane komórki czuciowe (higroreceptory) [1,2]. Wydaje się, że cecha wyczuwania wody musi być fundamentalnym procesem nie tylko u bezkręgowców, ale także u mikroorganizmów jednokomórkowych. Na przykład, niektóre drożdże mogą przetrwać całkowite odwodnienie, jednakże nadal zachowują pewną ilość wody (około 10% resztkowej zawartości wody w suchych drożdżach) [3]. Dlatego uważam, że organizmy eukariotyczne muszą posiadać mechanizmy wyczuwania cząsteczek wody bezpośrednio we wszystkich przedziałach komórki, co pozwoli im wyczuć i zareagować w przypadku gwałtownych zmian stresu wodnego. Jednakże nie jest jasne czy wykrywanie wody odbywa się głównie za pomocą osmosensorów lub mechanoreceptorów, czy też akwareceptorów bezpośrednio wyczuwających wodę.

Niektóre mikroorganizmy mogą szybko reagować i wyczuwać utratę lub pobór wody w ciągu pierwszych minut, zmieniając swoje właściwości bioenergetyczne. Zaobserwowano, że krótkotrwały stres osmotyczny (<1-2 minuty) wywołuje znaczące zmiany w wielu szlakach komórkowych mikroorganizmów [4]. Na fizjologię i metabolizm organizmu może wpływać nie tylko obecność czy brak cząsteczek wody, ale także obecność innych metabolitów, które wpływają na uwodnienie białek i innych biomolekuł. Wykazano, że niektóre białka funkcjonują jako osmoczuJNIKI, ale większość z nich nie wykrywa cząsteczek wody. Przykładem może być jeden z bakteryjnych osmoczuJNIKÓW, nośnik wychwyty betainy BetP, który działa w oparciu o zmiany stężenia jonów K^+ , Cs^+ lub Rb^+ [5]. Zaproponowano, że w warunkach stresu osmotycznego białkowe osmosensory mogą również funkcjonować poprzez bezpośrednie wykrywanie cząsteczek wody. Znaczącą funkcję w tym procesie miałyby pełnić zmiany konformacyjne wynikające z rozpuszczalności i/lub zmiany w innych rozpuszczalnikach nie opartych na wodzie, które są syntetyzowane w komórkach [4]. Tożsamość takich białkowych akwareceptorów jest jednak w dużej mierze nieznana. Moim zdaniem, ze względu na naturę błony komórkowej, która może zostać łatwo przerwana (np.: poprzez uraz fizyczny), komórka powinna posiadać wyspecjalizowane akwareceptory, które pozwalają jej wyczuwać wodę bezpośrednio i niemal natychmiastowo [6].

Bakteryjny FixL jest jednym z gazoreceptorów O_2 , który wyczuwa cząsteczki tlenu i wykazuje zwiększoną aktywność kinazową [7]. Jeśli zatem FixL może wiązać się z O_2 , można go nazwać białkiem wyczuwającym gaz, gazorecepto-

rem lub receptorem O₂ [8]. Ale co z podobnymi białkami, które mogą wiązać się z cząsteczkami wody zamiast tlenu? Czy takie białka nie są atrakcyjnymi kandydatami na akwareceptory? Jednak prawie każdy enzym lub receptor może wiązać się z różną liczbą cząsteczek wody. W związku z tym pojawia się pytanie: kiedy powinniśmy uznawać cząsteczkę wody wiążącą się z enzymem jako ligand enzymu, a kiedy powinniśmy nazywać receptor akwareceptorem? Co ważne, nie wszystkie związane cząsteczki wody mogą w równym stopniu wpływać na aktywność enzymatyczną białek. Tylko konkretna cząsteczka wody związana w odpowiednim miejscu będzie miała zdolność wpływania na aktywność enzymatyczną lub receptorową, która może wyzwalać sygnał komórkowy. Jest to szczególnie ważne jeśli cząsteczka wody bezpośrednio wiąże się w miejscu wiązania ligandu. Czy wtedy cząsteczka wody będzie antagonistą dla tego ligandu? A może to cząsteczka wody jest agonistą, a wcześniej zidentyfikowany ligand jest antagonistą.

Jeśli weźmiemy pod uwagę hemoglobinę, wiąże się z nią 60-75 cząsteczek wody [9-11]. Przy wysokim stężeniu O₂, wiąże się z żelazowym hemem Fe(II), a także tworzy wiązanie wodorowe z dystalną histydyną (αHis-58; helisa E7). Po uwolnieniu O₂ jako rodnika ponadtlenkowego, cząsteczka wody wiąże się z utlenionym hemem żelaza Fe(III), a także tworzy wiązanie wodorowe z dystalną resztą histydyny. Ponadto wykazano, że przy niższych stężeniach O₂ cząsteczka wody może również wiązać się w miejscu wiążącym tlen hemu żelaza Fe(II) [9-12]. Wiązanie wody powoduje stabilizację i musi zostać wyparte w celu ponownego wiązania O₂, działając jako bariera ponownego wiązania ligandu [13-17]. Podobne bariery dla wiązania O₂ lub tlenu węgla CO zostały również eksperymentalnie udowodnione w oparciu o mutanty dystalnej histydyny mioglobiny kaszalota (His64 w pozycji helikalnej E7) [18,19]. Jednak w tym kontekście cząsteczka wody nie jest określana jako ligand, ale raczej jako regulator (lub modulator) allosteryczny. Nie jest również właściwe uważanie wszystkich innych cząsteczek wody związanych z hemoglobina za ligandy. Niemniej jednak fakt, że po uwolnieniu cząsteczki O₂ cząsteczka wody może wiązać się w pobliżu miejsc aktywnych białka hemowego wcześniej związanego z tlenem i tworzyć barierę dla wiązania zwrotnego O₂, wymaga ponownego rozważenia roli cząsteczki wody jako allosterycznego modulatora lub regulatora. To rozważenie jest ważne, ponieważ oprócz dobrze znanej roli w transporcie O₂, wykazano, że hemoglobina u różnych organizmów wykazuje różnorodne aktywności enzymatyczne, takie jak reduktaza azotynowa, anhidraza, peroksydaza i deoksygenaza [20-25].

Dowody biochemiczne potwierdzające rolę struktury dystalnej kieszeni hemowej jako ważnego elementu aktywności reduktazy azotynowej przedstawiono dla hemoglobiny *Arabidopsis* [26]. Wykazano, że w szczególności mutant hemoglobiny AHb2 z dystalną histydyną (H66L) może redukować poziom azotynów i syntetyzować większe ilości tlenu azotu NO [26]. Podobne efekty odnotowano również dla hemoglobiny innych organizmów [27,28]. Wykazano, że dystalna histydyna jest kluczowym regulatorem aktywności enzymatycznej cytoglobiny i neuroglobiny [29-32]. Możemy wywnioskować, że aktywność enzymatyczna hemoglobiny jest nie tylko pod kontrolą stanu bezwodnego

związanego z O₂, ale także stanu beztlenowego związanego z wodą. Niemniej jednak, moim zdaniem należałoby jeszcze wykazać czy na aktywność enzymatyczną hemoglobiny wpływają stany wiązania wody w hemie, czy dystalna histydyna [16]. Eksperymenty mające na celu odpowiedź na to pytanie muszą jednak uwzględniać również możliwość istnienia potencjalnych niekanonicznych miejsc wiązania hemu [33].

Opierając się na danych literaturowych i argumentach przedstawionych powyżej, zastanawiam się czy hemoglobina ssaków jest tylko jednym z akwareceptorów, z jej aktywnością reduktazy azotynowej modulowaną prawdopodobnie przez stan wiązania wody bezpośrednio w miejscach wiązania O₂ z lub bez interakcji z dystalną histydyną [22,23]. Uważam, że powinniśmy zaklasyfikować niektóre gazoreceptory oparte na hemach jako akwareceptory. W przypadku takich białek moglibyśmy debatować nad tym, czy O₂ lub inny gaz jest jedynie modulatorem allosterycznym, a woda faktycznym agonistą, co może pomóc nam uznać hemoglobinę za akwareceptor. Biorąc pod uwagę podobne wymagania strukturalne miejsc wiązania hemu w gazoreceptorach opartych na hemie uważam, że niektóre z potencjalnych akwareceptorów mogą obejmować inne gazoreceptory oparte na hemie, takie jak regulator okołodobowy CLOCK (ang. *Clock Circadian Regulator*), wyczuwający tlen gazoreceptor GCY-35 (ang. *soluble guanylate cyclase homologue-35*) w *Caenorhabditis elegans*, wyczuwający tlen gazoreceptor DosP w *Escherichia coli* i inne, jeszcze nie zaklasyfikowane jako gazoreceptory, takie jak androglobina - indukujące spermatogenezę białko wiążące tlen [8,34]. Proponuję, aby białka działające poprzez domenę hemową oraz każdą inną domenę lub miejsce wyczuwające cząsteczki wody były określane jako akwareceptory, jeśli ich wiązanie lub brak wiązania może wywołać sygnał lub odpowiedź komórkową. Jeśli kinetyka jest powodem wykluczenia akwareceptorów, to musimy wziąć pod uwagę kinetykę w całym okresie życia białka, ponieważ nawet najszybszy samochód na drodze musi zwolnić, aby przekroczyć próg zwalniający.

Ostatecznie, kiedy zaakceptowaliśmy hormony jako cząsteczki sygnalizacyjne, otworzyło to pole rozwoju endokrynologii, co z kolei doprowadziło do licznych badań biochemicznych w celu zidentyfikowania receptorów wyczuwających hormony i ich roli w chorobach związanych z działaniem hormonów [35]. Teraz musimy zadać sobie pytanie, czy jeśli zaakceptujemy wodę jako cząsteczkę sygnalizacyjną, czy otworzy to również pole akwakrynologii i doprowadzi do licznych badań biochemicznych w celu zidentyfikowania akwareceptorów wyczuwających wodę i ich roli w chorobach związanych z wodą?

PODZIĘKOWANIA

Autor dziękuje Pani profesor Zofii Szweykowskiej-Kulińskiej (Instytut Biologii Molekularnej i Biotechnologii, Wydział Biologii, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza, Poznań, Polska) za umożliwienie mu uczestniczenia w jej inspirujących wykładach na temat ewolucji molekularnej. Autor dziękuje również Pani profesor Agnieszce Chacińskiej (Poprzednia afiliacja: Centrum Nowych Technologii, Uniwersytet Warszawski, Regenerative Mechanisms for Health

- International Research Agendas Programme oraz obecnej afiliacji: Międzynarodowy Instytut Maszyn i Mechanizmów Molekularnych, Polska Akademia Nauk, Warszawa, Polska) za zaproponowanie mu udziału w 44 Kongresie FEBS. S.A. jest wspierany przez granty Narodowego Centrum Nauki (SONATA-BIS 2020/38/E/NZ3/00090 i SONATA 2021/43/D/NZ3/01798). Agencja finansująca i instytucja, z którą związany jest S.A., nie były zaangażowane w przygotowanie manuskryptu. Autor korzystał z translatora DeepL do tłumaczenia tekstu z języka angielskiego na polski.

PIŚMIENNICTWO

- Tichy H, Loftus R (1996) Hygroreceptors in insects and a spider: Humidity transduction models. *Naturwissenschaften* 83:255–63
- Tichy H, Hellwig M, Kallina W (2017) Revisiting Theories of Humidity Transduction: A Focus on Electrophysiological Data. *Front Physiol* 5:8:650
- Hohmann S (2002) Osmotic Stress Signaling and Osmoadaptation in Yeasts. *Microbiol Mol Biol Rev* 66:300–372
- Wood JM (1999). Osmosensing by bacteria: signals and membrane-based sensors. *Microbiol Mol Biol Rev* 63:230–262
- Rübenhagen R, Morbach S, Krämer R (2001) The osmoreactive betaine carrier BetP from *Corynebacterium glutamicum* is a sensor for cytoplasmic K⁺. *EMBO J* 20:5412–5420
- Ishibashi K, Kondo S, Hara S, Morishita Y (2011) The evolutionary aspects of aquaporin family. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 300:566–576
- Monson EK, Weinstein M, Ditta GS, Helinski DR (1992) The FixL protein of *Rhizobium meliloti* can be separated into a heme-binding oxygen-sensing domain and a functional C-terminal kinase domain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 89:4280–4284
- Anbalagan S (2024) Heme-based oxygen gasoreceptors. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 326:E178–181
- Colombo MF, Rau DC, Parsegian VA (1992) Protein solvation in allosteric regulation: a water effect on hemoglobin. *Science*. 256:655–659
- Colombo MF, Bonilla-Rodriguez GO (1996) The water effect on allosteric regulation of hemoglobin probed in water/glucose and water/glycine solutions. *J Biol Chem* 271:4895–4899
- Bulone D, San Biagio PL, Palma-Vittorelli MB, Palma MU (1993) The role of water in hemoglobin function and stability. *Science*. 259:1335–1336
- Aranda R, Cai H, Worley CE, Levin EJ, Li R, Olson JS, et al. (2009) Structural analysis of fish versus mammalian hemoglobins: effect of the heme pocket environment on autooxidation and heme loss. *Proteins* 75:217–230
- Birukou I, Schweers RL, Olson JS (2010) Distal Histidine Stabilizes Bound O₂ and Acts as a Gate for Ligand Entry in Both Subunits of Adult Human Hemoglobin. *J Biol Chem* 285:8840–8854
- Park SY, Yokoyama T, Shibayama N, Shiro Y, Tame JRH (2006) 1.25 Å resolution crystal structures of human haemoglobin in the oxy, deoxy and carbonmonoxy forms. *J Mol Biol* 360:690–701
- Esquerra RM, López-Peña I, Tipgunlakant P, Birukou I, Nguyen RL, Soman J, et al. (2010) Kinetic spectroscopy of heme hydration and ligand binding in myoglobin and isolated hemoglobin chains: an optical window into heme pocket water dynamics. *Phys Chem Chem Phys* 12:10270–10278
- Shadrina MS, Peslherbe GH, English AM (2015) O₂ and Water Migration Pathways between the Solvent and Heme Pockets of Hemoglobin with Open and Closed Conformations of the Distal HisE7. *Biochemistry* 54:5279–5289
- Olson JS, Mathews AJ, Rohlfs RJ, Springer BA, Egeberg KD, Sligar SG, et al. (1988) The role of the distal histidine in myoglobin and haemoglobin. *Nature* 336:265–266
- Rohlfs RJ, Mathews AJ, Carver TE, Olson JS, Springer BA, Egeberg KD, et al. (1990) The effects of amino acid substitution at position E7 (residue 64) on the kinetics of ligand binding to sperm whale myoglobin. *J Biol Chem* 265:3168–3176
- Quillin ML, Arduini RM, Olson JS, Phillips GN (1993) High-resolution crystal structures of distal histidine mutants of sperm whale myoglobin. *J Mol Biol* 234:140–155
- Gow AJ, Payson AP, Bonaventura J (2005) Invertebrate hemoglobins and nitric oxide: how heme pocket structure controls reactivity. *J Inorg Biochem* 99:903–911
- Minning DM, Gow AJ, Bonaventura J, Braun R, Dewhirst M, Goldberg DE, et al. (1999) *Ascaris* haemoglobin is a nitric oxide-activated 'deoxygenase.' *Nature* 401:497–502
- Huang KT, Keszler A, Patel N, Patel RP, Gladwin MT, Kim-Shapiro DB, et al. (2005) The reaction between nitrite and deoxyhemoglobin. Reassessment of reaction kinetics and stoichiometry. *J Biol Chem* 280:31126–31131
- Basu S, Grubina R, Huang J, Conradie J, Huang Z, Jeffers A, et al. (2007) Catalytic generation of N₂O₃ by the concerted nitrite reductase and anhydrase activity of hemoglobin. *Nat Chem Biol* 3:785–794
- Wang S, Huang Y, Liu S, Lin Z, Zhang Y, Bao Y (2021) Hemoglobins from *Scapharca subcrenata* (Bivalvia: Arcidae) likely play a bactericidal role through their peroxidase activity. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 253:110545
- Wang S, Yu X, Lin Z, Zhang S, Xue L, Xue Q, et al (2017) Hemoglobins Likely Function as Peroxidase in Blood Clam *Tegillarca granosa* Hemocytes. *J Immunol Res*. 2017:7125084
- Kumar N, Astegno A, Chen J, Giorgetti A, Dominici P (2016) Residues in the Distal Heme Pocket of Arabidopsis Non-Symbiotic Hemoglobins: Implication for Nitrite Reductase Activity. *Int J Mol Sci* 17:640
- De Jesús-Bonilla W, Jia Y, Alayash AI, López-Garriga J (2007) The heme pocket geometry of *Lucina pectinata* hemoglobin II restricts nitric oxide and peroxide entry:
- model of ligand control for the design of a stable oxygen carrier. *Biochemistry* 46:10451–10460
- Bonaventura C, Henkens R, De Jesus-Bonilla W, Lopez-Garriga J, Jia Y, Alayash AI, et al. (2010) Extreme differences between hemoglobins I and II of the clam *Lucina pectinalis* in their reactions with nitrite. *Biochim Biophys Acta* 1804:1988–1995
- Tejero J, Sparacino-Watkins CE, Ragireddy V, Frizzell S, Gladwin MT (2015) Exploring the mechanisms of the reductase activity of neuroglobin by site-directed mutagenesis of the heme distal pocket. *Biochemistry* 54:722–733
- Tiso M, Tejero J, Basu S, Azarov I, Wang X, Simplaceanu V, et al. (2011) Human neuroglobin functions as a redox-regulated nitrite reductase. *J Biol Chem* 286:18277–18289
- Ukeri J, Wilson MT, Reeder BJ (2022) Modulating Nitric Oxide Dioxygenase and Nitrite Reductase of Cytoglobin through Point Mutations. *Antioxidants (Basel)* 11:1816.
- Kaliszuk SJ, Morgan NI, Ayers TN, Sparacino-Watkins CE, DeMartino AW, Bocian K, et al. (2022) Regulation of nitrite reductase and lipid binding properties of cytoglobin by surface and distal histidine mutations. *Nitric Oxide* 1:12–22
- Nye DB, Lecomte JJJ (2018) Replacement of the Distal Histidine Reveals a Noncanonical Heme Binding Site in a 2-on-2 Hemoglobin. *Biochemistry* 57:5785–5796
- Anbalagan S (2024) Oxygen is an essential gasotransmitter directly sensed via protein gasoreceptors. *Animal Model Exp Med*. 00:1–5
- Loriaux DL (2016) A Biographical History of Endocrinology. John Wiley & Sons.

Heme-based aquareceptors

Savani Anbalagan✉

Institute of Molecular Biology and Biotechnology, Faculty of Biology, Adam Mickiewicz University, Poznań, Poland

✉corresponding author: savani.anbalagan@amu.edu.pl

Keywords: water-sensing, water sensor, oxygen-sensing, gasoreceptor

SUMMARY

How cells sense water is of fundamental importance in biology. Hygrosensation has been demonstrated in specialized sensory cells that sense extracellular moisture. Even in microorganisms, osmosensors do not sense water *per se*. Water-sensing mechanisms would have been necessary for organisms to migrate and survive in water-poor conditions and to evolve into multicellular organisms. Due to the potential ability of water molecules to bind to gas-binding sites in the heme-based sensing domains of gasoreceptors, I suggest that some of them could have a parallel role as protein aquareceptors. Just as gasoreceptors function in almost every cell, aquareceptors must also function in almost every cell. I think that aquareceptors must be present in the cell membrane, cytoplasm, and every organelle. I also wonder if hemoglobin could also be considered a putative aquareceptor.