

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ
KATEDRA BIOLOGICKÝCH A BIOCHEMICKÝCH VĚD

STRUKTURA HEMOGLOBINŮ
BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

AUTOR PRÁCE: Lucie Bravencová

VEDOUCÍ PRÁCE: doc. RNDr. Tomáš Roušar, Ph.D.

2020

UNIVERSITY OF PARDUBICE
FACULTY OF CHEMICAL TECHNOLOGY
DEPARTMENT OF BIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL SCIENCES

STRUCTURE OF HEMOGLOBINS

BACHELOR THESIS

AUTHOR: Lucie Bravencová

SUPERVISITOR: doc. RNDr. Tomáš Roušar, Ph.D.

2020

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2019/2020

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE (projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Lucie Bravencová**
Osobní číslo: **C17357**
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Zdravotní laborant**
Téma práce: **Struktura hemoglobinů**
Zadávací katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Zásady pro vypracování

1) Zpracujte literární rešerši zaměřenou na krevní barvivo hemoglobin. V bakalářské práci se nejprve zaměřte na obecný popis struktury, funkce a významu hemoglobinu. Dále uveďte různé typy hemoglobinu, které se v rámci ontogeneze člověka vyskytují. V poslední části práce se stručně zaměřte na uvedení přehledu klinicky nejvýznamnějších poruch hemoglobinové struktury.

2) Ke zpracování kompilace využijte elektronických vědeckých databází, jako jsou např. *ScienceDirect*, *HighWire*, *NCBI Pubmed*, apod.

Rozsah pracovní zprávy: **25 s.**
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Vedoucí bakalářské práce: **doc. RNDr. Tomáš Roušar, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání bakalářské práce: **20. prosince 2019**
Termín odevzdání bakalářské práce: **3. července 2020**

L.S.

prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

prof. Mgr. Roman Kandár, Ph.D.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2020

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 1. 7. 2020

Lucie Bravencová

Poděkování:

Ráda bych zde poděkovala doc. RNDr. Tomáši Roušarovi Ph.D. za vybrání tématu, odborné vedení mé bakalářské práce, cenné rady, vstřícnost a věnovaný čas. Také bych chtěla poděkovat své rodině a příteli za podporu během celého studia.

Anotace

Tato bakalářská práce popisuje různé typy hemoglobinů a jejich strukturu. V úvodní části je stručně charakterizován lidský hemoglobin, jeho vlastnosti, význam a funkce. Ve druhé kapitole jsou popsány jednotlivé typy hemoglobinů, vlastnosti, rozdíly mezi těmito druhy hemoglobinů, ale i jejich struktura a uspořádání podjednotek. Další kapitola popisuje syntézu globinových řetězců během vývoje plodu a syntézu hemu. V poslední kapitole jsou uvedeny nejčastější poruchy tvorby hemoglobinového řetězce a jejich charakteristika.

Klíčová slova:

Hemoglobin; struktura hemoglobinu; podjednotky hemoglobinu.

Annotation

This bachelor thesis describes different types of hemoglobin and its structure. In the introductory part, human hemoglobin is briefly characterized, its properties and significance of its function. The second chapter describes various types of hemoglobin, properties, differences among these types of hemoglobin and also its structure and subunits arrangement. Next chapter describes the synthesis of globin chains during fetal development and synthesis of heme. The last chapter presents the most common disorders of hemoglobin chain formation and their characteristics.

Key words:

Hemoglobin; hemoglobin structure; hemoglobin subunit.

Obsah

Úvod	12
1. Hemoglobin	13
1.1 Charakteristika hemoglobinu.....	13
1.2 Erythropoeza.....	14
1.3 Funkce hemoglobinu	15
1.3.1 Transport plynů.....	16
1.3.2 Bohrův efekt.....	17
1.3.3 Regulace metabolismu NO.....	18
2. Typy a struktura hemoglobinů	19
2.1 Struktura hemu	19
2.2 Struktura globinových řetězců.....	20
2.3 T a R-konformace.....	22
2.4 Typy lidského hemoglobinu.....	24
2.4.1 Embryonální hemoglobiny	24
2.4.2 Fetální hemoglobin	26
2.4.3 Hemoglobin dospělého typu.....	27
3. Syntéza hemoglobinu	29
3.1 Časová regulace syntézy	30
3.2 Síla vazeb hemoglobinových podjednotek	31
3.3 Reaktivace genů.....	32
3.4 Acetylace hemoglobinu	33
3.5 Syntéza hemu.....	34
4. Poruchy hemoglobinové struktury	37
4.1 Srpkovitá anemie.....	37
4.2 Thalasemie	39
4.2.1 α -thalasemie	39
4.2.2 β -thalasemie	41
5. Závěr	43
6. Seznam použité literatury	44

Seznam obrázků:

Obr. 1: Struktura molekuly hemoglobinu	14
Obr. 2: Schéma hemové kapsy v β -řetězci.	20
Obr. 3: Porovnání primární struktury řetězců hemoglobinu.....	21
Obr. 4: Struktura β -globinového řetězce.	22
Obr. 5: Kvarterní uspořádání podjednotek hemoglobinu v T a R-konformaci....	24
Obr. 6: Hemoglobinový tetramer složený ze dvou identických α a β dimerů.	27
Obr. 7: Syntéza globinových řetězců během pre a postnatálního vývoje	31
Obr. 8: Struktura hemu: komplex Protoporfyrin IX + Fe^{II}	34
Obr. 9: Biosyntéza hemu.	36
Obr. 10: Uspořádání α -helixů v hemoglobinové jednotce.....	38

Seznam tabulek:

Tab. I: Typy hemoglobinů a obsah řetězců	28
--	----

Seznam použitých zkratk:

ALAD	5-aminolevulátdehydratasa
CSF	Kolonie stimulující faktor
CYP	Cytochrom P450
HbA	Hemoglobin A
HbA ₂	Hemoglobin A ₂
HbF	Fetální hemoglobin
HbF ₁	Acetylovaný fetální hemoglobin
HbH	Hemoglobin H
HbO ₂	Oxyhemoglobin
HbO ₂ ⁻	Bazická forma oxyhemoglobinu
HHb	Kyselá forma deoxyhemoglobinu
SCD	Srpkovitá anémie
TfR	Receptor pro transferin
2,3-BPG	2-3-bisfosfoglycerát
5-ALA	5-aminolevulová kyselina

Úvod

Hemoglobin je červené krevní barvivo vyskytující se v červených krvinkách obratlovců a dalších živočichů. Hlavní úlohou tohoto proteinu je transport krevních plynů, a to především kyslíku, z plic do tkání a naopak, avšak v organismu člověka má mnoho dalších funkcí, jako je např. podílení se na udržování acidobazické rovnováhy krve. Referenční hodnoty hemoglobinu se liší podle pohlaví, odlišné jsou ale i hodnoty dospělých jedinců a novorozenců. Dospělí muži mají referenční hodnoty hemoglobinu 135-170 g/l, u dospělých žen je rozmezí 120-160 g/l a u novorozenců jsou hodnoty 120-180 g/l.

Lidský hemoglobin je složený ze dvou částí: bílkovinné a nebílkovinné. Strukturně se jedná o tetramerní molekulu, jelikož se skládá ze čtyř podjednotek. Každá podjednotka je složena z globinového řetězce a hemu s navázaným dvojmocným železem, na které se mohou vázat přenášené plyny.

Existují různé druhy hemoglobinů, jejichž koncentrace se mění v závislosti na stádiu vývoje organismu. Některé hemoglobiny se v organismu vyskytují pouze za fyziologických podmínek a při patologických procesech je nahrazují jiné druhy hemoglobinů, které mohou být pro danou chorobu typické. Všechny typy hemoglobinů se od sebe liší zastoupením jednotlivých globinových řetězců, což zapříčiňuje jejich rozdílné vlastnosti.

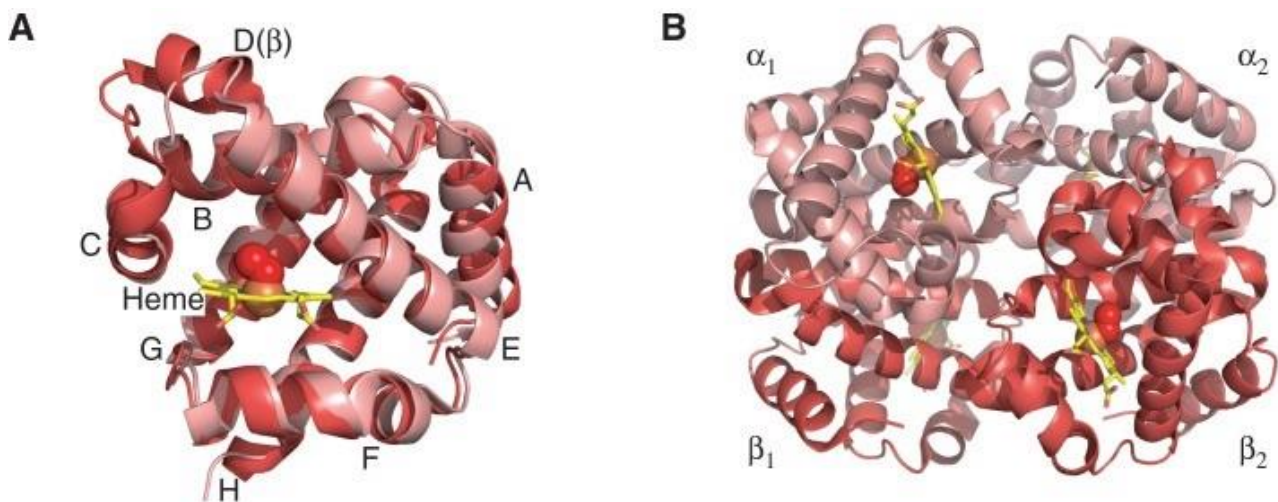
1 Hemoglobin

1.1 Charakteristika hemoglobinu

Hemoglobin je jedním z nejlépe popsaných proteinů lidského těla díky své jasně červené barvě a různým barevným změnám, které mohou být ukazatelem zdraví a chorobných stavů, jako je např. anémie, hypoxie nebo otrava oxidem uhelnatým (*Yonetani et al., 2008*). Jedná se o konjugovanou bílkovinu vyskytující se ve vysokých koncentracích ve zralých erytrocytech. Tato molekula je zodpovědná především za transport kyslíku, oxidu uhličitého a protonů mezi plicemi a tkáněmi. Na každý gram hemoglobinu připadá asi 1,34 ml kyslíku. Vázáním protonů je hemoglobin schopen regulovat poměr bází a kyselin a přispívat tak k udržení správné hodnoty pH krve.

Aby nedošlo k denaturaci hemoglobinu v plazmě a ztrátě ledvinami, jsou hemoglobinové molekuly velmi těsně uspořádány v červených krvinkách, o koncentraci přibližně 340 g/l (*Otto, 2020*). Jedná se o sférickou, kulovitou molekulu, která je tvořena 4 podjednotkami (tetramery), o molekulové hmotnosti 64 450 Da (*Pecka, 2002*). Řadí se mezi metaloproteiny, jelikož je v jeho molekule obsaženo dvojmocné železo. Je tvořen dvěma základními částmi: hemem a globinem.

Funkční vlastnosti molekul hemoglobinu jsou primárně určovány charakteristickými záhyby na aminokyselinových řetězcích globinů, jako je například 7 peptidových úseků na α -řetězci a 8 peptidových úseků na β -řetězci. Tyto helixy jsou složeny do kompaktního globulárního uspořádání a po heterodimerizaci utvoří strukturu tetrameru. K syntéze globinových řetězců dochází v erytroidních prekurzorech červených krvinek. Polypeptidové řetězce tvoří velký centrální prostor, ve kterém je uložena prostetická skupina. Hem je vázán nekovalentními vazbami a je tak zabráněno nežádoucí oxidaci železa (*Schechter, 2008*).



Obr. 1: Struktura molekuly hemoglobinu (Thom et al., 2013).

Na obrázku č. 1A můžeme vidět znázornění hemoglobinových podjednotek. α -řetězec (růžová) a β -řetězec (červená) jsou stočeny do α -helixů a označeny písmeny A-H, výjimku tvoří α -globin, kterému chybí helix D.

Na obrázku č. 1B je zobrazena kvarterní struktura hemoglobinové molekuly s navázaným kyslíkem (červené kuličky) na čtyřech vazebných místech hemu (protoporfyrin IX jako žluté tyčky s atomy železa – oranžová) (Thom et al., 2013)

1.2 Erytropoeza

Erytropoeza je děj probíhající v kostní dřeni, při němž se tvoří a vyvíjí červené krvinky v erytroidní vývojové řadě. Nejprve se z nediferenciovaných kmenových buněk tvoří prekurzorové buňky obsahující jádro. Poté dochází k enukleaci, tzn. vypuzení jádra mimo buňku, a vznikají retikulocyty. Tyto buňky během 48 hodin dozrávají a tvoří se zralé erytrocyty. Pro správný vývoj a diferenciaci buněk jsou potřeba tzv. hemopoetiny, neboli CSF, kolonie stimulující faktory, které působí na receptory na buněčných membránách. Růstovým faktorem zabezpečující správný vývoj červené krevní řady je erytropoetin, který je tvořen hlavně v játrech a ledvinách.

Jednotlivé linie všech krevních elementů vznikají ze společné pluripotentní kmenové buňky. Dochází k diferenciaci na dvě základní linie: myeloidní, ze které vznikají erytrocyty, granulocyty, monocyty a trombocyty, a lymfoidní linie. Poté se přes progenitorové kmenové buňky tvoří tzv. prekurzorové buňky, neboli blasty. Během erythropoezy vznikají erytrocyty přes několik stádií: proerytroblast, bazofilní normoblast, polychromní normoblast, ortochromní normoblast a retikulocyt. Všechny tyto buňky se od sebe liší např. velikostí a přítomností jádra, tvarem a velikostí buňky nebo barvou cytoplazmy (*Yan et al., 2019*).

Syntéza hemoglobinu je přesně regulovaný a koordinovaný proces. Během hematopoezy začíná tvorba hemoglobinu ve fázi proerytroblastů a stále více se zrychluje s postupující diferenciací na erytroblasty. Aby byl hemoglobin správně syntetizován, je potřeba dodat do buňky železo. Pomocí receptorů TfR exprimovaných na plazmatické membráně je možné železo transportovat dovnitř buněk, které železo potřebují.

Ve stádiu ortochromního normoblastu dochází k hromadění dostatečného množství hemoglobinu. Pokud během akumulace není buňka zásobována železem, není možné zajistit dostatečnou hladinu hemoglobinu v retikulocytech. Poté následuje enukleace a vzniká retikulocyt, který v kostní dřeni zůstává 2-3 dny a následně je uvolněn do periferní krve (*Ogawa, 2020*).

1.3 Funkce hemoglobinu

Tak jako všechny biologické molekuly se i hemoglobin skládá z řady atomů (C, H, O, N, S), které jsou velmi specificky uspořádány prostřednictvím primární, sekundární, terciální a kvarterní struktury, aby byla tato molekula schopna vykonávat svou specifickou funkci (*Selim, 2010*).

Kromě základní funkce hemoglobinu přenášet plyny z plic do tkání a naopak, je hemoglobin také vysoce reaktivní díky atomu železa v hemu. Hemoglobin se tak může zúčastnit oxidačních reakcí a je schopen vykazovat např. aktivitu podobou peroxidásám, kdy železo reaguje s peroxidem vodíku a vzniká tak silný oxidant ferryl hemoglobin (Fe^{4+}) a radikály na bázi proteinu. Tyto oxidované formy hemoglobinu jsou velmi reaktivní a můžou se podílet na oxidačním poškození okolních tkání. Proto je hemoglobin za fyziologických

podmínek uložen uvnitř erytrocytu, a pokud se během patologických dějů nebo po transfuzích uvolní nadměrné množství hemoglobinu, tělo se brání pomocí obranných proteinů, jako jsou např. haptoglobin, hemopexin a α -1-mikroglobulin (*Chakane et al. 2017*).

1.3.1 Transport plynů

Hemoglobin je fyziologicky velmi důležitá molekula, představuje sofistikovaný systém transportu kyslíku a zajišťuje správnou koncentraci plynů ve tkáních za různých podmínek. Přenos plynů tělesnými tekutinami je dán rozpustností hemoglobinu ve vodě, která je poměrně nízká. Molekula hemoglobinu je schopna vázat určité množství hemoglobinu, které se mění v závislosti na koncentraci kyslíku v krvi.

Během cirkulace v arteriích má hemoglobin vysokou afinitu ke kyslíku a nízkou afinitu k oxidu uhličitému, organickým fosfátům, vodíkovým a chloridovým iontům, avšak v cirkulaci žilní se míra této afinity mění a tyto jsou obráceny. Při oxidaci hemoglobinu se molekula kyslíku reverzibilně váže na atom železa, který je uložen ve struktuře hemu. Jakmile dojde k navázání kyslíku na jeden ze čtyř hemů, další sycení zbylých třech hemů kyslíkem je usnadněno. Hemoglobin tedy může vázat až čtyři molekuly kyslíku (*Marengo-Rowe, 2006*).

Transport kyslíku z plic do tkání můžeme rozdělit na dva samostatné děje: navázání kyslíku na hemoglobin při průchodu erytrocytů plicemi a uvolnění kyslíku z molekuly hemoglobinu během průchodu krvinek tkáněmi. V kapilárách plic vstupují molekuly kyslíku do červených krvinek, okysličený hemoglobin (oxyhemoglobin, HbO_2) je poté transportován arteriemi do celého těla. Následně se deoxyhemoglobin vrací žilami zpět do plic a celý cyklus se opakuje.

Poté co CO_2 vstoupí do erytrocytu, proton vzniklý z kyseliny uhličitě reaguje s bazickou formou HbO_2^- a vzniká HHbO_2 . Tato molekula má sníženou afinitu ke kyslíku, proto kyslík vystupuje z erytrocytu do tkání a vzniká kyselá forma deoxyhemoglobinu HHb . Zvýšená koncentrace protonů, které vznikly difúzí CO_2 do erytrocytu, je pohlcena hemoglobinem.

Jakmile se žilní krev dostane zpět do plic, kyslík společně s HCO_3^- vstupuje do krvinky a vzniká HHbO_2 . V přítomnosti HCO_3^- funguje tato molekula jako kyselina a vzniká HbO_2^- a kyselina uhličitá. Karboanhydráza katalyzuje rozpad kyseliny za vzniku vody a CO_2 , který difunduje z buňky do alveol plic (Engelking, 2015).

1.3.2 Bohrův efekt

Bohrův efekt je fyziologický proces, který je zásadní pro efektivní uvolňování kyslíku do tkání v těle. K maximálnímu účinku tohoto efektu dochází při pH 7,4 pomocí 2,3-BPG. Jedná se o organický fosfátový alosterický efektor nacházející se v erythrocytech. Tato molekula ovlivňuje kyslíkovou afinitu k hemoglobinu, proto účinně reguluje množství uvolněného kyslíku do tkání vykonávajících své metabolické funkce (Okonjo, 2017).

Obecně platí, že po uvolnění kyslíku z molekuly hemoglobinu vniká 2,3-BPG do hemoglobinu a snižuje afinitu ke kyslíku. Molekula 2,3-BPG se váže do dutiny mezi β -řetězce. Jelikož je tato molekula záporně nabitá, váže se elektrostaticky pouze na kladně nabitě skupiny hemoglobinu (Litwack, 2018). Kyslík je tedy uvolňován do tkání i přes to, že koncentrace plynu v molekule hemoglobinu je nízká.

Jedná se o velmi citlivou odpověď organismu na tkáňovou hypoxii a udržuje tak tkáňový metabolismus závislý na kyslíku do doby, než se projeví účinek ostatních kompenzačních mechanismů. Bohrův efekt je důležitý hlavně ve tkáních s vysokým metabolismem, např. buňky pracovního svalstva, ale také v placentě, kde dochází k výměně dýchacích plynů matky a plodu (Kosmachevskaya, 2018).

Pomocí experimentálních pozorování byly určeny dva typy Bohrova efektu: kyselý Bohrův efekt probíhá při $\text{pH} \leq 6$ a dochází k vyvazování protonů z roztoku deoxyhemoglobinem. Tato reakce je považována za negativní příspěvek k Bohrovu efektu. Druhým typem je alkalický Bohrův efekt, který je fyziologicky důležitější. Tento děj probíhá při pH vyšším než 7. Protony jsou uvolňovány z molekuly hemoglobinu do roztoku a na vzniklý deoxyhemoglobin se váže kyslík. Alkalický Bohrův efekt je naopak považován za pozitivní příspěvek.

Na Bohrově efektu se podílí 14 aminokyselinových zbytků molekuly hemoglobinu. Skupiny s pozitivním příspěvkem k Bohrovu účinku jsou: His50 α , His72 α , His89 α , His97 β , His116 β , His117 β , His146 β a NH₃⁺ terminální skupina Val1 α . Mezi negativně přispívající skupiny patří His20 α , His45 α , His112 α , His2 β , His77 β a His143 β (Okonjo, 2015).

1.3.3 Regulace metabolismu NO

Biochemické funkce hemoglobinu nejsou omezeny jen na přenos kyslíku a oxidu uhličitého v těle. Jeho další úlohou v organismu může být např. regulace metabolismu oxidu dusnatého. Tento plyn se podílí na řízení mnoha fyziologických procesů, zároveň ale jeho metabolity dovedou neenzymaticky modifikovat biologické molekuly, proto je potřeba udržovat koncentraci tohoto oxidu ve fyziologickém rozmezí (Tejero *et al.*, 2014).

Hlavním biochemickým regulátorem tvorby NO je hemoglobin, který má schopnost interagovat s oxidem dusnatým za různých redoxních stavů. K vazbě s oxidem dusnatým může dojít různými způsoby: vazba na železo v hemu vede k tvorbě nitrosylHb, další možností je navázání na thiolové skupiny Cys β 93 a vznik S-nitrosylHb a komplexu dinitrosyl-železo. Tato látka může sloužit k uskladnění NO a je schopna zprostředkovat transport NO nebo [Fe(NO)₂] skupin k cílovým proteinům (Kosmachevskaya, 2018).

2 Typy a struktura hemoglobinů

Všechny lidské hemoglobiny jsou globulární proteiny a mají strukturu tetrameru. Skládají se ze čtyř polypeptidových řetězců dvou typů a na nich navázaných čtyř struktur hemu. Každý globinový řetězec má tedy navázanou jednu molekulu hemu. Molekula hemoglobinu byla prvním proteinem, jehož struktura byla popsána pomocí rentgenové krystalografie (*Otto, 2020*).

Během nitroděložního vývoje jedince můžeme rozlišovat různé druhy hemoglobinů, které se v závislosti na období vývoje mění. Molekuly hemoglobinů se liší pouze bílkovinnou částí, tj. globinem. Prostetická (nebílkovinná) část hem zůstává stejná.

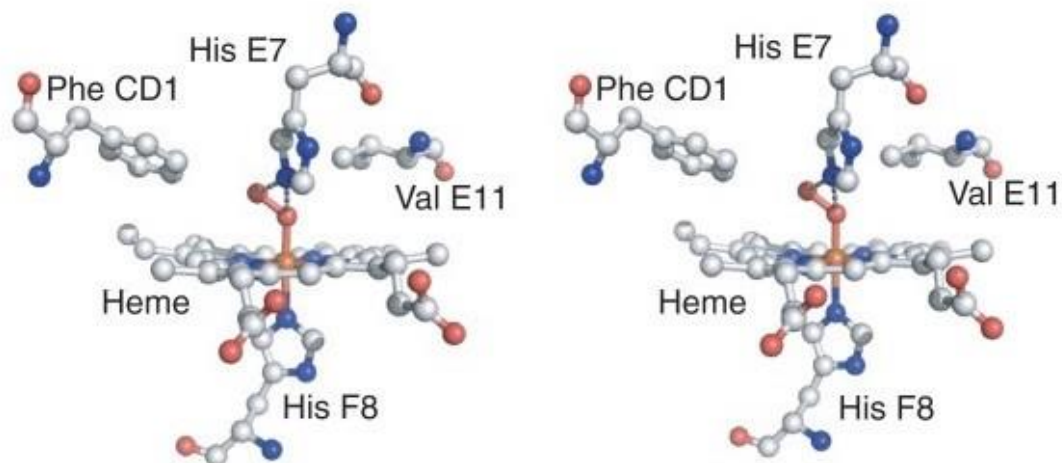
Jednotlivé typy hemoglobinu se liší podle obsahu řetězců v molekule, což zapříčiňuje jejich odlišné vlastnosti, které poskytují specifické výhody v různých fázích vývoje člověka. Může se jednat např. o rozdílnou afinitu ke kyslíku (*Manning et al., 2007*).

2.1 Struktura hemu

Hem hraje roli v mnoha buněčných procesech, jako je vazba kyslíku a dalších plynů, detoxikace léčiv, redoxní reakce nebo regulace transkripce a translace některých genů (*Piel et al., 2019*). Jeho struktura je tvořena z kruhu atomů uhlíku, vodíku a dusíku s atomem železa uprostřed (*Selim, 2010*). V jedné molekule hemoglobinu jsou obsaženy čtyři tetrapyrolové prstence v podobě protoporphyrinu IX a čtyři centrálně uložené atomy dvojmocného železa, na které se váže kyslík. Pokud dojde k oxidaci železa na trojmocné železité ionty, vznikne methemoglobin a hem ztrácí schopnost vázat kyslík. Železnatý iont je navázán ve středu tetrapyrolového kruhu, který je spojen methioninovými můstky.

Protoporphyrin IX je spojen s polypeptidovými řetězci globinů pomocí vazby na α -řetězec v poloze 141 a β -řetězec v poloze 146 (*Marengo-Rowe, 2006*). V hemu je obsaženo železo ve dvojmocném stavu, které má šest párů elektronů, čtyři z těchto párů elektronů jsou vázány na pyrolové dusíky v porfyrinovém makrocycly. Dva zbývající páry jsou pod a nad rovinou porfyrinového kruhu,

příčemž je jeden z těchto párů navázán na histidinové zbytky globinového řetězce a druhý zbylý pár váže plyn (Phillips, 2019).



Obr. 2: Schéma hemové kapsy v β -řetězci, zobrazení proximálních (F8) a distálních (E7) histidinů a dalších aminokyselinových zbytků ovlivňujících vazbu ligandu a autooxidaci (Thom et al., 2013).

2.2 Struktura globinových řetězců

Následkem vývoje hemoglobinů v průběhu milionů let se v současnosti vyskytují dvě rodiny globinů, které tvoří lidský hemoglobin. Různé kombinace aminokyselinových sekvencí tedy vedou k různým typům řetězců, které se označují řeckými písmeny. Jedná se o α -rodinu a β -rodinu. Rodina α proteinů je tvořena řetězci α a ζ , které mají shodnou aminokyselinovou sekvenci z 59 % a skládají se ze 141 aminokyselin. Jejich molekulová hmotnost je 15 126 Da.

Rodina β proteinů obsahuje řetězce β , δ , γ a ϵ . Tyto globiny mají délku 146 aminokyselin. Molekulová hmotnost ostatních řetězců o 146 aminokyselinách je 15 866 Da. δ -řetězec je s β -řetězcem shodný v 93 %. γ -řetězec je s β -řetězcem identický ze 73 % (Brittain, 2002). Aminokyselinová sekvence γ -řetězce se od β -řetězce liší buď ve 39, nebo 40 zbytcích, v závislosti na tom, zda je v poloze 136 přítomen glycin nebo alanin (Manca et al., 2008). Dvacet dva z těchto zbytků jsou

na vnějším povrchu molekuly, další zbytky se vyskytují vevnitř a mají podobnou polaritu (Adachi et al., 2000). O trochu více je s β -řetězcem podobný ε -řetězec, a to v 75 %. Řetězec δ se liší od řetězce β v 10 aminokyselinových zbytcích (Brittain, 2002).

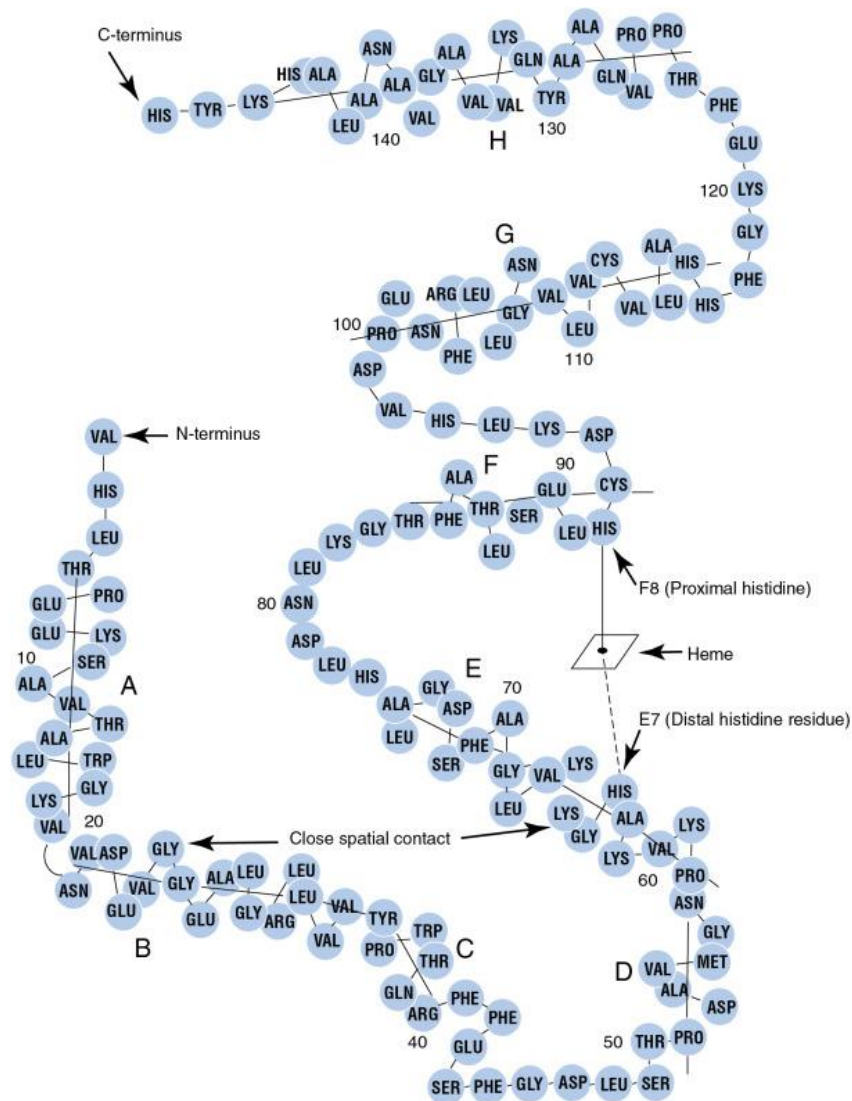


Obr. 3: Porovnání primární struktury řetězců hemoglobinu. Oblasti v rámečku označují aminokyseliny vyskytující se ve všech řetězcích, šedé oblasti znázorňují rozdílné úseky v řetězci β a γ (Manca et al., 2008).

Globinový řetězec je rozdělen do osmi helixů označených písmeny A-H, které jsou odděleny sedmi nehelickými segmenty. Hem se nachází mezi helixy E a F, přičemž atom železa je spojen s proximálně uloženým histidinem F8 na jedné straně roviny hemu. Kyslík se váže na druhé straně roviny hemu a je v těsné blízkosti distálního histidinu E8, ale nevzniká vazba. Toto uspořádání pomáhá železu zůstat ve formě dvojmocného iontu bez ohledu na to, zda je kyslík navázán nebo ne.

Aminokyseliny řetězce na vnitřní straně jsou hydrofobní, naopak aminokyseliny na straně vnější jsou hydrofilní. Tyto vlastnosti činí molekulu hemoglobinu rozpustnou ve vodě. Obsah různých aminokyselin v různých řetězcích hemoglobinu také ovlivňuje náboj tetrameru. Proto lze k frakcionaci,

identifikaci a kvantifikaci normálních hemoglobinů použít elektroforézu, nebo vysoce účinnou kapalinovou chromatografií (Otto, 2020).



Obr. 4: Struktura β -globinového řetězce (Otto, 2020).

2.3 T a R-konformace

Hemoglobin se v lidském těle vyskytuje ve dvou formách, a to ve formě okysličeného hemoglobinu R-formy (z angl. *relaxed*) a neokysličeného hemoglobinu T-formy (z angl. *taut*). Tato změna je dána rotací o 15° mezi dvěma řetězci α a β a dochází ke změně vazby mezi těmito dvěma řetězci. Navázání molekuly kyslíku na deoxyhemoglobin způsobí prostorovou změnu. Ta se projeví v terciární struktuře podjednotek. Následně dochází ke změnám i v kvarterním

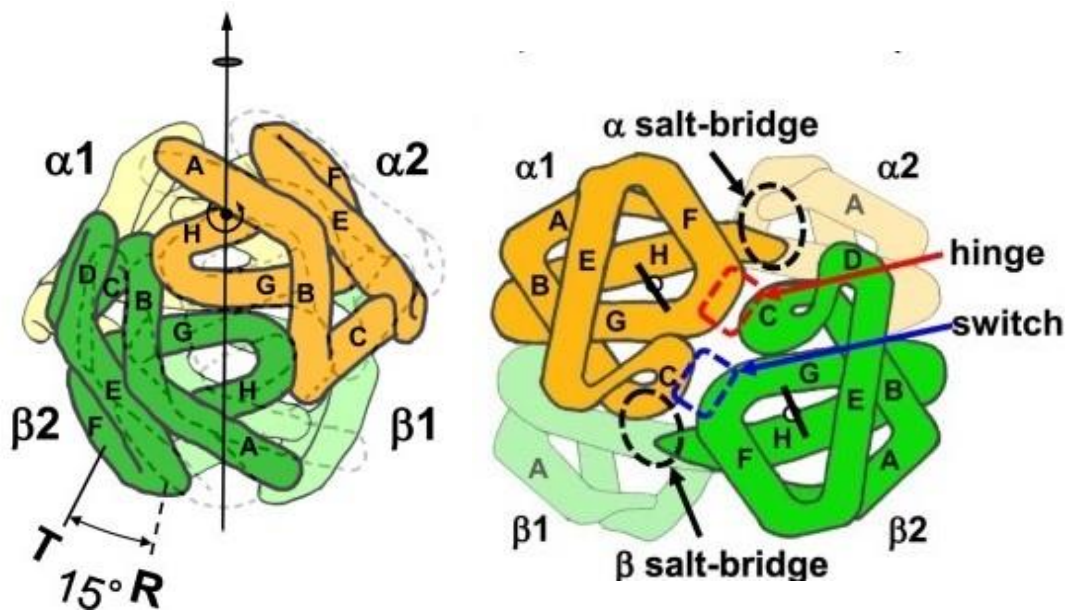
uspořádání a je zvýšena vazba kyslíku na ostatní podjednotky. K přechodu mezi T-formou a R-formou dochází po navázání dvou až tří molekul kyslíku, nekovalentní interakce jsou velmi slabé a neudrží T-konformaci (*Bhagavan et al., 2015*).

Výsledkem je změna polohy molekuly hemu. Ve struktuře T (deoxyhemoglobin) je poloha železnatého iontu posunuta z roviny porfyrinového kruhu, tím je ztížena vazba kyslíku na železo a zároveň snížena afinita kyslíku k T-konformaci. Ve struktuře HbO₂ je naopak atom železa v rovině a může v této poloze vázat kyslík. R-konformace má tedy zvýšenou afinitu ke kyslíku. V plicích, kde je vysoký tlak kyslíku, přechází hemoglobin z T-formy na R-formu, přičemž ve tkáních s nízkým obsahem kyslíku dochází k transformaci R-formy na T-formu (*Litwack, 2018*).

Energie potřebná pro konformační změny je čerpána z vazby kyslíku na železo hemu a vznikem nových nekovalentních vazeb, které se vyskytují v R-konformaci. Při vazbě čtyř molekul kyslíku na deoxyhemoglobin v plicích se uvolňuje více energie, než je zapotřebí k přerušení nekovalentních vazeb T-formy.

Látky snižující stabilitu R-konformace nebo zvyšující stabilitu T-konformace se nazývají negativní alosterické efekty nebo alosterické inhibitory hemoglobinu, posunují disociační křivku hemoglobinu doprava. Naopak pozitivní, alosterické efekty neboli alosterické aktivátory, zvyšují stabilitu R-konformace nebo snižují stabilitu T-konformace a posunují disociační křivku doleva. Mezi tyto látky patří např. kyslík a oxid uhelnatý (*Bhagavan et al. 2015*).

Jakmile je molekula hemoglobinu v T-konformaci, je mezi β -řetězci utvořena dutina, do které se váže 2,3-BPG. Pokud dojde k přechodu na R-konformaci, vazby jsou porušeny a 2,3-BPG je uvolněn (*Litwack, 2018*). Deoxyhemoglobin je stabilizován několika solnými můstky, Van der Waalsovými silami a vodíkovými vazbami. Tyto vazby se vyskytují mezi aminokyselinami postranních řetězců (*Bhagavan et al. 2015*).



Obr. 5: Znáornění kvarterního uspořádání podjednotek hemoglobinu v T a R-konformaci (Shibayama, 2020)

V T-konformaci jsou dva α a β dimery omezeny solnými můstky, které obsahují C-terminální zbytky. Tyto vazby spojují $\alpha 1$ - $\alpha 2$, $\alpha 1$ - $\beta 2$ a $\alpha 1$ - $\beta 1$ podjednotky vodíkovými vazbami mezi dimery na C-helixu a FG-helikálním rohu. V R-formě se tyto vazby nenacházejí, avšak konformace je stabilizována několika nekovalentními vazbami. Po okysličení dojde k posunu železa, což má za následek zánik solných můstků a přechod z T-konformace do R (Shibayama, 2020).

2.4 Typy lidského hemoglobinu

2.4.1 Embryonální hemoglobiny

Všechny typy embryonálních hemoglobinů mají navzájem podobnou tetramerickou strukturu a vyznačují se velmi vysokou afinitou ke kyslíku. Tímto je zabezpečen přísun kyslíku do plodu, i přes to, že je jeho koncentrace nízká. Mezi normálně se vyskytující embryonální hemoglobiny řadíme: hemoglobin Portland 1, hemoglobin Gower 1 a hemoglobin Gower 2. Tyto tři typy hemoglobinů se

fyziologicky nacházejí v krevním oběhu plodu v různých stádiích jeho vývoje. Existují také další dva typy embryonálních hemoglobinů: Portland 2 a Portland 3. Tyto hemoglobiny se však vyskytují pouze za patologických podmínek (*Manning et al., 2017*).

Hemoglobin Portland 1 obsahuje řetězce ζ_2 a γ_2 . V těle se vyskytuje v prvních měsících embryonálního vývoje. Je substituovaným protějškem HbF, oba totiž obsahují řetězce γ .

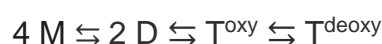
U hemoglobinu Portland 2 je zastoupení řetězců ζ_2 a β_2 . Tento typ hemoglobinu se vyskytuje velmi zřídka, a to hlavně při extrémním typu α -thalasemie, kde je α -řetězec nahrazen řetězcem ζ , jelikož α -řetězec není syntetizován. Plod tak trpí nedostatkem kyslíku, rozvíjí se u něj *hydrops fetalis* a další závažná poškození (*Manning et al., 2007*).

Existuje i hemoglobin Portland 3 s kombinací řetězců ζ_2 a δ_2 , ale i tento typ je přítomen pouze za patologických podmínek a to u α -thalasemie major. Spolu s hemoglobinem Portland 2 jsou nejvíce disociovanými formami hemoglobinů a mají nejslabší podjednotkové rozhraní (*Manning et al., 2010*).

Hemoglobin Gower 1 je tvořen řetězci ζ_2 a ϵ_2 . Tento typ hemoglobinu je přítomen v prvních měsících normálního vývoje plodu. Hemoglobin Gower 2 se od předchozího liší přítomností α -řetězce. Tento typ hemoglobinu společně s hemoglobinem Portland 1 na konci třetího trimestru (28. týden až porod) klesá na téměř nezjistitelné hodnoty koncentrací.

2.4.1.1 Inverzní alosterický efekt

Při tvorbě hemoglobinu dochází nejprve ke spojení dvou monomerů a vzniká dimer. Sloučením dvou dimerů následně vzniká tetramerová struktura hemoglobinu. Tento děj lze popsat rovnicí:



Embryonální hemoglobiny se liší od hemoglobinů dospělého typu silou vazeb mezi dimery a monomery, která jsou na rozdíl od dospělých hemoglobinů slabá. Tato vlastnost posouvá výše uvedenou rovnici doleva, což vede ke

zvýšené vazbě kyslíku. Jedná se o inverzní alosterický efekt, účinek tohoto efektu je opačný od běžných alosterických regulátorů, jako je např. 2,3-BPG. Nejprve dochází k redistribuci embryonálního hemoglobinu a nastane posun rovnice doleva, což se projeví oslabením T^{deoxy} struktury. Vzniká HbO_2 a následně je zvýšena afinita embryonálních hemoglobinů ke kyslíku.

Poměr forem neokysličeného a okysličeného hemoglobinu $T^{\text{deoxy}}/T^{\text{oxy}}$ se nazývá alosterická konstanta L . Tato konstanta se liší u každého typu hemoglobinu, přičemž hodnota L pro embryonální hemoglobiny je nižší než pro dospělý hemoglobin. Ve směru rovnice zleva doprava se zvyšuje energeticky výhodnější stav a naopak klesá vazba na kyslík. To znamená, že deoxyhemoglobin má nejsilnější podjednotkové interakce a neváže kyslík (*Manning et al., 2017*).

2.4.2 Fetální hemoglobin

Fetální hemoglobin (HbF) obsahuje řetězce α_2 a γ_2 . Objevuje se ve fetální fázi vývoje plodu a je hlavním hemoglobinem nitroděložního života. Při narození se hladina HbF pohybuje mezi 65–95 % (*Little et al., 2009*). Tento typ hemoglobinu je ve skutečnosti směs dvou molekul $\alpha_2^G \gamma_2$ a $\alpha_2^A \gamma_2$, které se liší pouze v poloze 136 jedním nukleotidem. Gen $^G\gamma$ obsahuje kodon GGA (kódující glycin) a gen $^A\gamma$ kodon GCA (kódující alanin). Tvoří se produkty dvou nealelických genů γ -globinu.

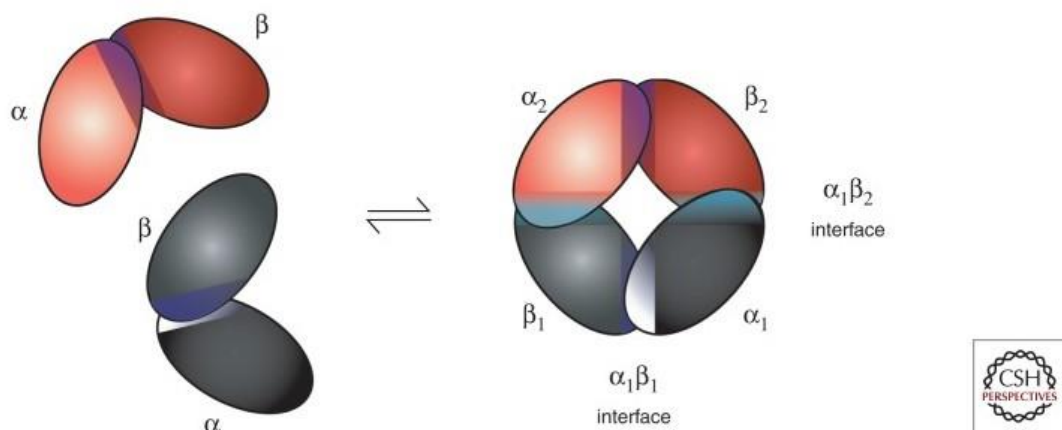
Poměr těchto dvou forem γ -řetězce u zdravých novorozenců je asi 70:30, ale v dospělosti se tento poměr mění na 40:60 v důsledku přepnutí genů γ -globinů na β -globiny. Pokud jsou tyto poměry změněny, může to nasvědčovat molekulárnímu defektu na úrovni syntézy HbF. V době narození představuje fetální hemoglobin asi 70 % z celkového hemoglobinu plodu (*Manca et al. 2008*).

HbF se liší svou afinitou ke kyslíku. Na rozdíl od hemoglobinu dospělého typu má HbF afinitu ke kyslíku mírně vyšší, jelikož neváže 2,3-BPG tak silně. Je proto efektivnější v krevním oběhu plodu, protože dokáže lépe odebírat kyslík z mateřského oběhu. Nevýhodou ale je, že se kyslík hůř uvolňuje do tkání. Pro zajištění dostatečné oxygenace tkání plod tuto vlastnost kompenzuje produkcí většího množství červených krvinek (*Schechter, 2008*).

Výrazně zvýšenou tetramerovou sílu má ve srovnání s dospělým hemoglobinem ligovaný HbF, což je způsobeno 18 aminokyselinami na N-terminálním konci helixu A v γ -podjednotce. Tento úsek se od β -podjednotky dospělého hemoglobinu liší v 8 aminokyselinách. Tato vlastnost také způsobuje, že fetální erythrocyty jsou rezistentní vůči parazitům způsobující malárii, jelikož tetramery hemoglobinu nedisociují tak snadno jako tetramery hemoglobinu A (Yagami et al., 2002).

2.4.3 Hemoglobin dospělého typu

Hemoglobin A (HbA) má zastoupení řetězců α_2 a β_2 . Struktura tetrameru vzniká spojením monomerů α a β pomocí velmi silné vazby, a vznikají dimery. Následně se dva dimery spojí pomocí slabé vazby, která umožňuje přechod mezi HbO₂ a deoxyhemoglobinem (Manning et al., 2017). Tato cesta vzniku odráží relativní stabilitu $\alpha_2\beta_2$ tetrameru, která zahrnuje stabilní proteinové interakce α a β -řetězce na $\alpha_1\beta_1$ rozhraní (Adachi et al., 2000).



Obr. 6: Hemoglobinový tetramer složený ze dvou identických α a β dimerů – červená a šedá (Thom et al., 2013).

HbA se vyskytuje u dospělých jedinců a dětí, u kterých je HbF postupně nahrazován HbA. V nízké koncentraci se u dospělých může vyskytovat také molekula hemoglobinu A₂ (HbA₂), kde je řetězec β nahrazen řetězcem δ. U obou molekul se tedy nachází řetězec α a liší se v zastoupení druhého řetězce (*Manca et al., 2008*). Tento hemoglobin je produkován velmi málo v důsledku mutace v promotorové oblasti genu pro δ-řetězec (*Otto, 2020*).

Konečný poměr počtu jednotlivých druhů hemoglobinu je ustálen kolem prvního roku života. V této době je v krvi obsaženo 97 % HbA, HbA₂ tvoří 2 % a HbF 1 %. Dospělí jedinci mají zbytkové množství HbF, které je obsaženo ve skupině erytrocytů zvané F-buňky, kde je přítomen i HbA. Hladiny F-buněk i HbF se u dospělých liší a většinou jsou podmíněny geneticky (*Manca et al., 2008*). Přejdem z embryonálních hemoglobinů přes HbF na hemoglobiny dospělého typu se mění i afinita ke kyslíku. Dospělý hemoglobin má afinitu ke kyslíku výrazně nižší, tímto procesem se snaží plod přizpůsobit přechodu z intrauterinního hypoxického prostředí do extrauterinního prostředí bohatého na kyslík (*Juul et al., 2018*).

Tab. 1: Typy hemoglobinů a obsah řetězců

Ontogeneze	Typ hemoglobinu	Zastoupení řetězců
Zárodek	Hb-Portland 1	$\zeta_2 \gamma_2$
	Hb-Portland 2	$\zeta_2 \beta_2$
	Hb-Portland 3	$\zeta_2 \delta_2$
	Hb-Gower 1	$\zeta_2 \epsilon_2$
	Hb-Gower 2	$\alpha_2 \epsilon_2$
Plod	Hb-F	$\alpha_2 \gamma_2$
Dospělý	Hb-A	$\alpha_2 \beta_2$
	Hb-A ₂	$\alpha_2 \delta_2$

3 Syntéza hemoglobinu

Všechny fyziologicky významné lidské hemoglobinové heterotetramery jsou složeny z řetězců, které se dělí do α -like a β -like skupin (*Thom et al., 2013*). Geny těchto skupin globinů jsou velmi přísně ontogeneticky regulovány a jejich kvantitativní exprese musí být koordinovaná a vyvážená (*Juul et al., 2018*).

Šest globinových řetězců je kódováno šesti strukturními geny. Geny pro α -globiny a ζ -globiny se nachází na krátkém raménku chromozomu 16. Geny pro β , γ , ϵ , δ -globiny jsou lokalizovány na krátkém raménku chromozomu 11. V lidském genomu se vyskytuje kopie genu pro β , γ , ϵ , δ -řetězce na každé chromatidě, v diploidní buňce se tedy budou nacházet dva geny. Pro α a ζ -globiny jsou to dvě kopie na každé chromatidě, dohromady tedy čtyři kopie genů na každou diploidní buňku (*Otto, 2020*).

Koordinované přepínání α -like a β -like genů má za následek vysokou expresi hemoglobinu Gower 1, HbF a HbA během vývojových stádií embrya, plodu a dospělosti. Ostatní hemoglobiny Gower 2, Portland 1 a Portland 2 jsou exprimovány v relativně nízkých hladinách primitivních a zralých erytroidních buňkách, primárně během embryonálního a raného vývoje plodu (*Zhenning et al, 2001*).

Protože jsou geny globinu na chromozomech transkribovány ve směru $5' \rightarrow 3'$, páry embryonálních hemoglobinových podjednotek jsou vytvářeny v nejranějších časech v nízkých počátečních koncentracích (*Manning et al., 2010*). Transkripce genu lidského globinu vede k expresi prekurzorů mRNA v jádru buňky, které jsou následně zpracovány v cytoplazmě na zralou mRNA. Díky translačnímu mechanismu buňky, pomocí enzymů a ribosomů, jsou produkovány globiny (*Bank, 2006*). Vznikající globinové řetězce rychle začleňují hem, protože stabilizuje jejich přirozené skládání do hemoglobinových podjednotek složených z osmi helixů s názvem A-H, které se dohromady skládají do globulární struktury (*Thom et al., 2013*).

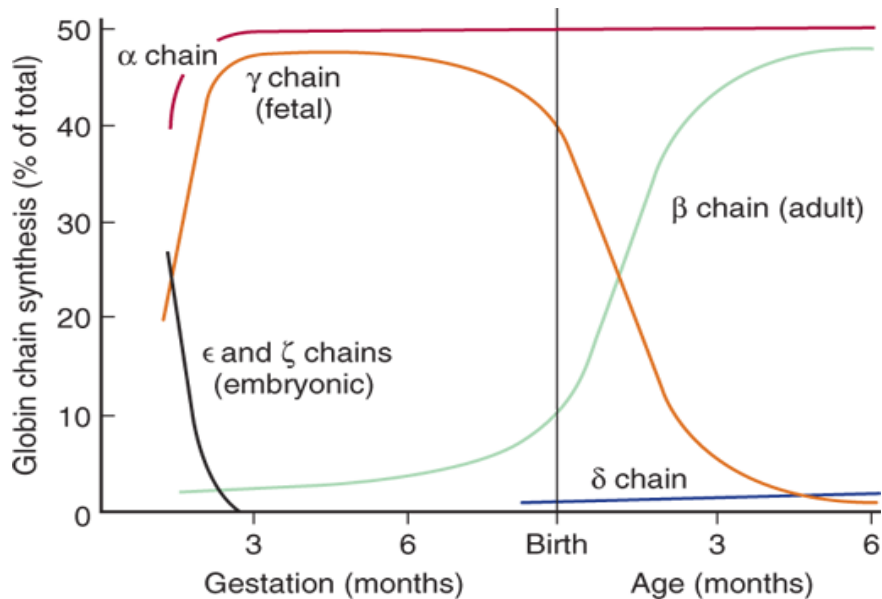
3.1 Časová regulace syntézy

Syntéza hemoglobinu začíná asi 14 dní po početí. Nejprve jsou tvořeny řetězce ζ a ϵ , poté dochází k nahrazení těchto globinů syntézou α a γ -řetězců přibližně v pátém až sedmém týdnu těhotenství. V šestém týdnu začíná syntéza β -řetězce, který je potřebný pro dospělý typ HbA. Tvorba tohoto řetězce se zvyšuje zároveň s klesající syntézou řetězce γ a tento přechod trvá do šestého měsíce života. Do 12. týdnu těhotenství tvoří HbF téměř všechen syntetizovaný hemoglobin. Po 20. týdnu už nevznikají ζ a ϵ -řetězce, ale za patologických podmínek (α -thalasemie) může syntéza ζ -řetězce přetrvávat až do třetího trimestru (*Juul et al., 2018*).

Přechod z jedné formy hemoglobinu na jinou je časově regulován, ale tato změna může být do značné míry ovlivňována i hladinou kyslíku. Při stavu relativní hypoxie je tvořen především HbF prostřednictvím buď přímých účinků na expresi genu globinu, nebo také zvýšenou regulací tvorby erythropoetinu (*Barret et al., 2009*).

Produkce hemoglobinu je řízena dvěma přepínači. Syntéza embryonálních hemoglobinů Gower 1, Gower 2 a Portland 1 přechází asi v prvních dvou měsících na tvorbu fetálních hemoglobinů $\alpha_2^G \gamma_2$ a $\alpha_2^A \gamma_2$. Začíná se tvořit silný pár α - γ a převládá nad slabšími α - ϵ , ζ - ϵ , a ζ - γ páry. Pomalá posttranslační acetylace γ -podjednotek vede ke slabším párům $\alpha\gamma^{Ac}$, což má za následek druhé přepnutí, když jsou β -podjednotky exprimovány za vzniku α - β párů (*Manning et al., 2010*). Těsně před narozením tedy dochází k aktivaci druhého přepínače a začíná syntéza hemoglobinu A a A₂.

V důsledku druhého přechodu je v krvi při narození obsaženo 70 až 80 % HbF, ale o 6 měsíců později dosahují hodnoty HbF jen 4 až 5 %. Přechod z HbF na dospělý HbA není zapříčiněn změnami v populaci kmenových buněk, ale je způsoben změnami v programu genové exprese, které se vyskytují ve všech dceřiných buňkách dané populace kmenových buněk (*Manca et al. 2008*). Přechod z převládající exprese HbF na dospělý HbA je tedy zprostředkován transkripčním přepínačem v konečných erytroidních progenitorech z γ -globinu na β -globin (*Sankaran et al., 2013*).



Source: K.E. Barrett, S.M. Barman, H.L. Brooks, Jason X.J. Yuan:
 Ganong's Review of Medical Physiology, Twenty-Sixth Edition
 Copyright © McGraw-Hill Education. All rights reserved.

Obr. 7: Syntéza globinových řetězců během pre a postnatálního vývoje jedince (Barret, 2010)

3.2 Síla vazeb hemoglobinových podjednotek

Proteinové struktury jsou většinou drženy pohromadě interakcemi mezi bílkovinami zahrnujícími „podjednotková rozhraní“, která mají vazebné síly. Pomocí těchto vazeb je definována jejich funkce, afinita k dalším podjednotkám, trvání interakce a výměna podjednotek za ty vhodnější. K této výměně mezi dvěma odlišnými hemoglobiny dochází při disociaci jejich dimerů, děj probíhá při nízkém pH (Manning *et al.*, 2009). Jak již bylo řečeno, nejslabší podjednotkové interakce mají embryonální hemoglobiny. Jsou složeny ze slabých dimerů, které disociují na monomery a dochází k destabilizaci tetramerové struktury (Manning *et al.*, 2010).

Fetální a dospělé typy hemoglobinu mají podjednotkové rozhraní znatelně silnější, i když acetylace HbF jeho silné interakce podstatně snižuje, a proto postupně dochází ke snižování jeho exprese. (Manning *et al.*, 2009). Díky těmto poznatkům bylo zjištěno, že α -podjednotky mají s dalšími řetězci nejsilnější interakce, naopak je tomu v případě ζ -podjednotek.

V pozdějších stádiích vývoje plodu dochází k rychlému nárůstu koncentrace fetálního hemoglobinu v porovnání s pomalým nástupem dospělého

HbA. HbF je syntetizován v erytroidních buňkách při nízké koncentraci hemoglobinu a je schopen vytvářet tetramery z dimerů efektivněji, jelikož má nejnižší volnou energii v interakci podjednotek. Vnitřní rozdíly v silách podjednotkových vazeb HbF a dospělého hemoglobinu určují schopnost upřednostnit syntézu určitého hemoglobinu před jiným ve zrajícím erytrocytu (*Manning et al., 2009*). Při tvorbě HbA dochází nejprve ke vzniku $\alpha_1\beta_1$ rozhraní, které se nejprve tvoří za velmi nízkých koncentrací podjednotek. To znamená, že toto rozhraní je energeticky stabilnější než všechny ostatní podjednotkové spojení (*Adachi et al., 2000*).

Během vývoje plodu se tedy nejdříve tvoří hemoglobiny s nejslabšími interakcemi (embryonální) a poté se postupně začínají tvořit hemoglobiny silnější, tzn. HbF a poté hemoglobiny dospělého typu. Jde tedy o určitou konkurenci mezi jednotlivými podjednotkami s cílem vytvořit co nejsilnější propojení podjednotek (*Manning et al. 2010*). Při spojování globinových podjednotek s dalšími jsou interakce ovlivněny pořadím genů (kdy jsou dané podjednotky exprimovány), posttranskripčními reakcemi a silou vazby mezi podjednotkami (*Manning et al. 2009*).

3.3 Reaktivace genů

Různá klinická pozorování prokázala, že stav srpkovité anémie a β -thalasemie je zlepšen díky zvýšené produkci HbF. Zvýšené hladině HbF byl také přičítán asymptomatický průběh srpkovité anémie u dětí. U pacientů s β -thalasemií pomáhají zvýšené hladiny HbF k mírnějšímu klinickému průběhu onemocnění, u pacientů se srpkovitou anémií výrazně ovlivňují klinickou závažnost a snižují úmrť na toto onemocnění (*Sankaran et al., 2013*).

I přes fakt, že primární funkcí HbF je přenos plynů v systému plod-placenta, poskytuje tento typ hemoglobinu dostatečnou kapacitu pro přenos kyslíku v těle dospělého pacienta bez jakýchkoliv významných vedlejších účinků (*Brittain, 2002*).

Intracelulárně může být exprese lidského genu pro γ -globin během vývoje a reaktivace v buňkách dospělých řízena na úrovni posttranskripčního zpracování transkriptů mRNA, stability mRNA, translace a posttranslačních dějů

i na úrovni transkripce. Proto mohou látky, které zvyšují koncentraci HbF u pacientů, působit na jedné nebo více úrovních (*Bank, 2006*).

Podávání chemických látek, jako jsou např. hydroxymočovina, butyráty nebo 5-azacytidin, vede navzdory všem kontrolním mechanismům k opětovné aktivaci genů pro γ -globiny. Tímto způsobem lze potencionálně obnovit tvorbu fetálního hemoglobinu v oběhu dospělého člověka a využít tuto reaktivaci k léčbě hemoglobinopatií, jako je srpkovitá anémie nebo β -thalasemie.

3.4 Acetylace hemoglobinu

Acetylace proteinových aminoskupin (N-terminální α -aminoskupiny nebo lysinové ϵ -aminoskupin) patří mezi jedny z nejčastějších posttranslačních proteinových úprav. Odhaduje se, že N-terminální α -aminoacetylace se vyskytuje přibližně u 90 % vznikajících eukaryotických proteinů vznikajících během biosyntézy. Poté následuje další změna N-konců, za účelem odhalení nových N-terminálních zbytků přítomných ve zralých proteinech.

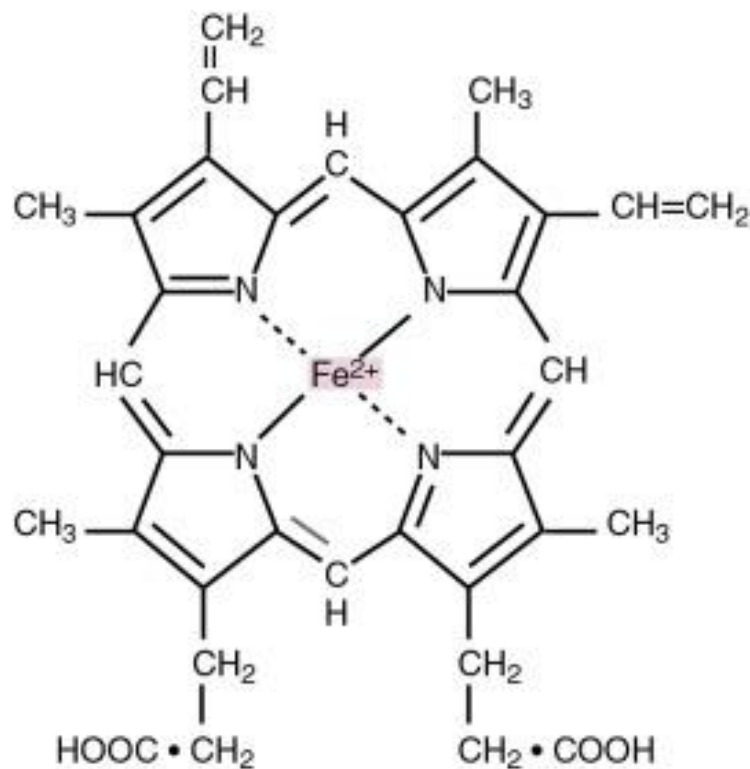
K acylaci α -aminoskupin dochází zřídka u dospělých typů hemoglobinu, ale je běžnější u jiných typů hemoglobinu (*Ashiuchi et al., 2009*). HbA ve svém řetězci β na N-koncovém zbytku přirozeně obsahuje valin, v HbF je v řetězci γ obsažen na konci glycin, který je v případě HbF₁ acetylován. N-koncové podjednotky dvou ze tří lidských embryonálních hemoglobinů, které jsou v průběhu vývoje prekurzory HbF, jsou zcela acetylovány (*Manning, 2001*).

N-terminální acetylace probíhá ve zlomku γ -podjednotek HbF a v ζ -podjednotkách některých embryonálních hemoglobinů. N-terminální zbytky acetylserinu se vyskytují v některých lidských HbF, ale jejich konkrétní funkce není známa. Několik variant lidských hemoglobinů může obsahovat také acetylvalin. Zbytky některých N-terminálních glycinů podléhají částečné acylaci v důsledku relativně nízké katalytické účinnosti acetyltransferázy pro tyto zbytky. Mezi účinky acylace u HbF patří snížení odezvy na 2,3-BPG a podpora snížení interakce mezi páry dimerů na alosterickém rozhraní (*Ashiuchi et al., 2009*).

3.5 Syntéza hemu

Hem je využíván v celé řadě buněčných dějů a procesů, proto je nezbytnou buněčnou součástí. Je využíván jako prostetická skupina mnoha hemoproteinů, jako jsou např. hemoglobin, myoglobin, respirační cytochromy, cytochrom P450 (CYP) a některé další látky (Phillips, 2019). Velmi vysoká úroveň syntézy hemu se vyskytuje v kostní dřeni v buňkách erytroidní řady, jelikož zde dochází k tvorbě hemoglobinu (Piel et al. 2019).

Tvorba hemu probíhá také v játrech, kde je využíván primárně pro CYP, které jsou obsaženy v endoplazmatickém retikulu. Jejich úlohou je oxidace chemikálií, různých léčiv, endogenních steroidů, vitamínů, mastných kyselin apod., avšak schopnost syntetizovat hem mají všechny jaderné buňky (Phillips, 2019).

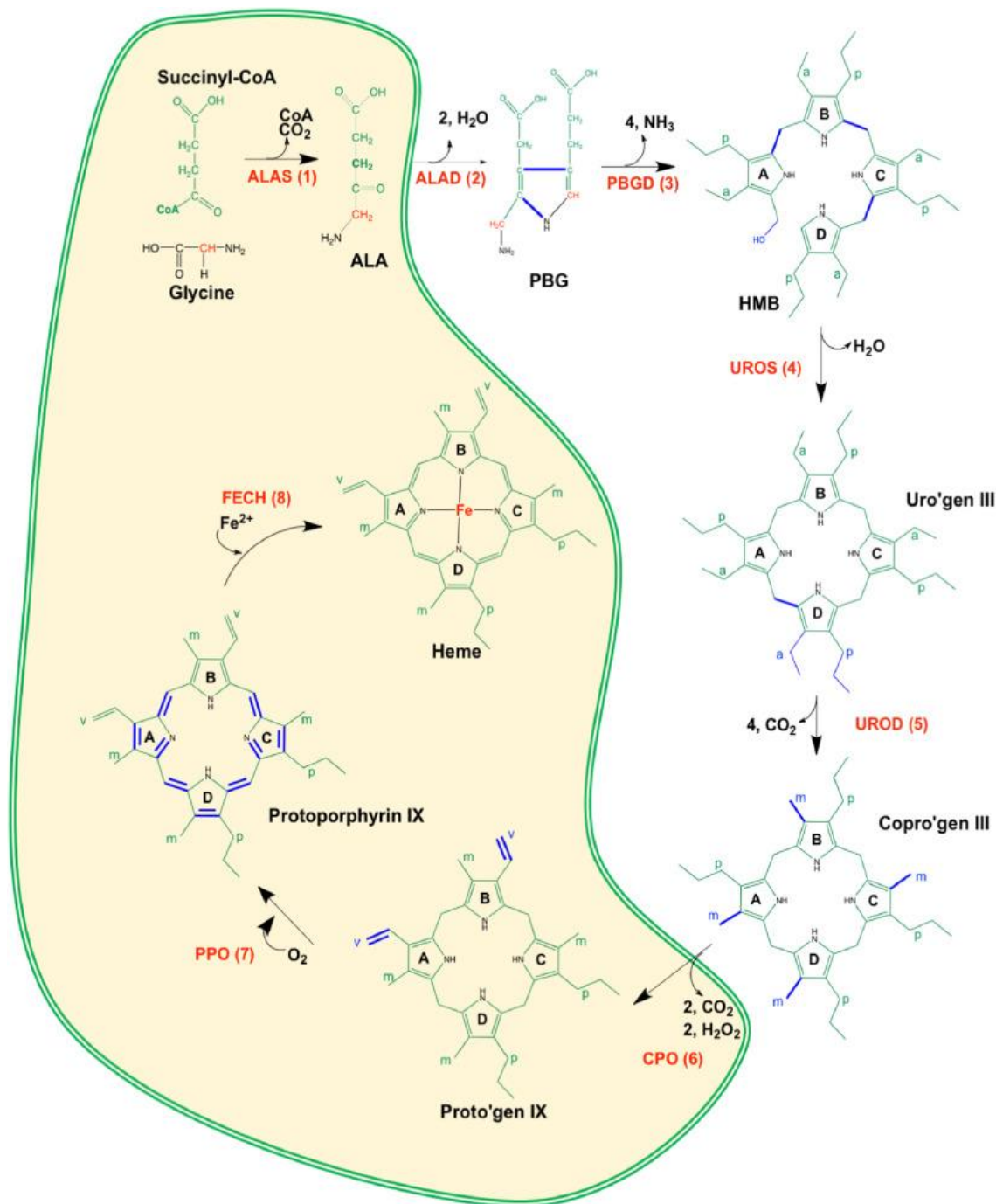


Obr. 8: Struktura hemu: komplex Protoporfyirin IX + Fe^{II} (Otto, 2020).

Hem i jeho biosyntetické meziprodukty jsou vysoce reaktivní molekuly a mohou být pro buňky toxické, proto je syntéza a distribuce hemu striktně regulována (Piel et al., 2019). První tři a poslední tři reakce biosyntézy hemu probíhají v mitochondriích, přičemž ostatní reakce se vyskytují v prostředí cytosolu. Výchozími látkami jsou glycin a sukcylnylCo-A, který pochází z mitochondriálního cyklu trikarboxylové aminokyseliny. Kondenzace těchto dvou látek je katalyzována 5-aminolevulátsyntasou, který se nachází na vnější mitochondriální membráně. Jeho kofaktorem je vitamín B6 neboli pyridoxal-5-fosfát.

Vzniklá 5-ALA přechází z mitochondrií do cytosolu, kde dochází ke kondenzaci a současné dehydrataci těchto dvou molekul a vzniká porfobilinogen. Tato reakce je katalyzována 5-aminolevulátdehydratasou (ALAD). ALAD může být snadno inhibována olovem, proto je možný vznik anémie způsobené sníženou biosyntézou hemu.

Následnou kombinací a spojením čtyř molekul PBG vzniká uroporfyrinogen III. V těchto reakcích se uplatňují dva enzymy: uroporfyrinogen I syntáza a uroporfirinogen III kotsyntáza. Z uroporfyrinogenu dekarboxylací vzniká koproporfyrinogen III, který opět vstupuje do mitochondriálního prostředí a oxidací vzniká protoporfyrinogen III a poté protoporfyrin IX. Poslední reakcí je navázání železa do molekuly protoporfyrinu za katalýzy ferrochelatasou (hemsynthetasou), která může být také inhibována olovem (Engelking, 2015).



Obr. 9: Biosyntéza hemu, substráty a enzymy uvnitř žlutého pole jsou lokalizovány v mitochondriích (Phillips, 2019).

4 Poruchy hemoglobinové struktury

Hemoglobinopatie patří mezi nejčastější dědičné choroby na světě. Jedná se o molekulární poruchy, které souvisejí s genovými změnami a brání tak správné syntéze polypeptidových řetězců hemoglobinu. Tato onemocnění můžeme rozlišit na thalasemie, které jsou způsobené defekty syntézy hemoglobinu a kvalitativní poruchy tvorby hemoglobinu, kam patří např. srpkovitá anemie.

Tato onemocnění vznikají v důsledku bodové genové mutace genů kódujících globinové řetězce, což se může projevit změnou funkce hemoglobinu, nebo tvaru a vlastností erytrocytu. Dochází buď ke ztrátě aminokyselin v proteinovém řetězci, anebo k jejímu nahrazení (*Farsaci et al., 2019*).

Dospělý HbA, který je fyziologicky složen ze dvou α -řetězců a dvou β -řetězců, je geneticky změněn. Následkem těchto změn může dojít k substituci aminokyselin v β -řetězci a vzniká tak hemoglobin S, hemoglobin C a hemoglobin E, nebo se může snížit syntéza jednotlivých řetězců a vyvinout se α -thalasemie či β -thalasemie (*Taylor et al., 2012*).

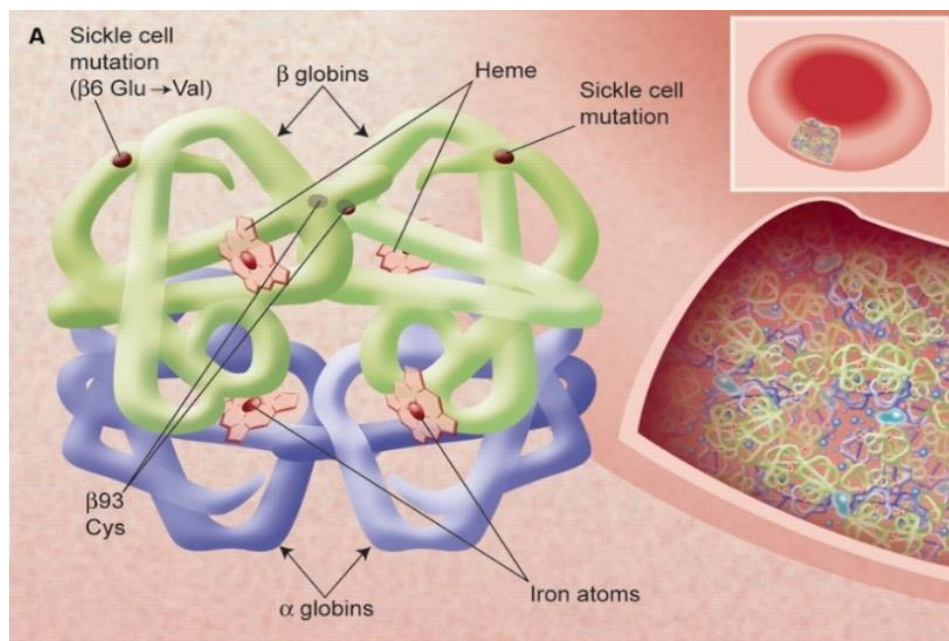
4.1 Srpkovitá anemie

Srpkovitá anemie (SCD), neboli hemoglobinopatie S, je závažné dědičné hemolytické onemocnění. Vzniká následkem genové bodové mutace v šestém kodonu β -globinového dospělého hemoglobinu, který je při nízké koncentraci kyslíku náchylný k polymeraci. Dochází k záměně aminokyseliny kyseliny glutamové za valin a vzniká hemoglobin S. Pacienti trpící SCD mohou být homozygoti syntetizující Hb S, nebo heterozygoti tvořící Hb S v kombinaci s další mutací β -řetězce (např. hemoglobin C nebo β -thalasemie). SCD patří mezi celosvětově nejčastěji se vyskytující hemoglobinopatie (*Randolph, 2020*).

Pacient může trpět jak akutními, tak i chronickými příznaky SCD, mezi takové projevy patří bolesti, mrtvice, tichý mozkový infarkt a poškození orgánů. Srpkovité erytrocyty jsou rigidní, zvyšují viskozitu krve, brání průtoku krve v kapilárách, a proto může docházet k hypoxii tkání. Pokud tento stav přetrvává,

dochází k buněčné smrti a hrozí riziko infarktu či poškození orgánů (*Forget et al., 2013*).

Toto onemocnění může zapříčinit i předčasnou smrt, avšak klinická závažnost SCD přímo závisí na koncentraci hemoglobinu S v cytoplazmě krvinek. Rychlost a vznik hemoglobinu S může ovlivňovat také koncentrace ostatních hemoglobinů v erytrocytu. Srpkovité erythrocyty na druhou stranu však také slouží jako ochrana proti malárii. Buňky, které jsou napadené parazitem, mění svůj tvar obzvláště snadno. Jsou vychytávány a destruovány ve slezině a choroba se proto nerozvíjí.



Obr. 10: Uspořádání α -helixů v hemoglobinové jednotce. Na obrázku jsou také znázorněna místa mutací na β -řetězcích vyskytujících se u SCD (*Schechter, 2008*)

Polymerizovaný hemoglobin S, který se vyskytuje v krevním oběhu pacienta, polymerizuje rychlostí, která exponenciálně souvisí s jeho množstvím (*Zhenning et al. 2004*). Srpkovité erythrocyty vznikají v periferních tkáních, kde je snížený parciální tlak kyslíku. V deoxygenované formě je hemoglobin špatně rozpustný a vytváří v červené krvi agregáty. V důsledku toho mění erythrocyt flexibilitu a bikonkávní tvar do podoby půlměsíce (drepanocyty), čímž má větší tendenci k hemolýze a přilnutí na neutrofilů nebo na endotel cév. Abnormalita propustnosti membrány a dehydratace červených krvinek nakonec vede k předčasnému zničení erythrocytů a chronické hemolytické anemii (*Demirci et al., 2018*).

4.2 Thalasemie

Thalasemie jsou charakterizovány jako heterogenní skupina hypochromních a mikrocytárních anemií. Jedná se o onemocnění vyznačující se nedostatečnou tvorbou jednoho nebo více globinových řetězců. Chybějící, nebo snížená syntéza jednoho ze dvou řetězců vede ke snížené produkci hemoglobinu, ale také k nepoměru jeho řetězců, jelikož neovlivněný gen stále syntetizuje neporušené řetězce (Keohane, 2020). Nespárované řetězce se hromadí v erythrocytech, precipitují a následně poškozují membrány krvinek. Při poruše erythrocytární membrány dochází k hemolýze, přičemž se hromadí přebytečné železo z rozpadlých krvinek. Porucha tvorby podjednotek zapříčiňuje úplný, nebo částečný nedostatek funkčního hemoglobinu, z čehož plynou problémy s transportem plynů do tkání a zpět.

Dané mutace jsou často specifické pro různé populace, nejčastější výskyt thalasiemií je na Středním východě, v jižní a jihovýchodní Asii a v zemích kolem Středoziemního moře. Thalasemie se dědí jako alely jednoho nebo více genů globinu přítomné buď na chromozomu 16 (postižení α -řetězců), nebo na chromozomu 11 (postižení β , γ a δ -řetězců) (Wild et al., 2017).

Pacienti trpící touto chorobou jsou chráněni proti malárii, jelikož parazit roste v pozměněných krvinkách pomaleji než v normálních erythrocytech. Projevy této nemoci mohou být mírné až úplně asymptomatické, ale projevem může být také těžká anémie. Tato anémie a další poruchy jsou totiž způsobeny neúčinnou erythropoézou, která má za následek výskyt hypochromních erythrocytů. Sražené řetězce v těchto krvinkách tvoří inkluze, tzv. Heinzova tělíška (Bhagavan et al., 2015).

4.2.1 α -thalasemie

α -thalasemie můžeme rozdělit na dva haplotypy. Prvním je α^0 -thalasemie, delece postihuje oba dva geny pro α -řetězce na chromozomu 16, a proto nedochází k žádné syntéze α -globinu. Druhým haplotypem je α^+ -thalasemie. U tohoto haplotypu se vyskytuje mutace v jednom ze dvou genů pro α -řetězce a syntéza globinu je snížena. α -thalasiemií je postiženo až 5 % světové populace a klinické projevy tohoto onemocnění mohou sahát od asymptomatického průběhu

až po závažná onemocnění charakterizovaná neúčinnou erythropoézou, opakujícími se transfuzemi a zpožděním růstu (Vichinsky, 2013).

U α -thalasemií můžeme rozlišit čtyři klinické syndromy, které jsou dány počtem zasažených genů a množstvím produkovaných α -řetězců: tiché nosičství, α -thalasemie minor, syntéza HbH a α -thalasemie major (*hydrops fetalis* syndrom). U tichých nosičů je postižen jeden gen ze čtyř, proto nedochází k žádným hematologickým projevům nemoci (Kohne, 2011). Jelikož jeden gen k plné syntéze α -řetězce chybí, je množství tohoto řetězce mírně sníženo. Při narození se proto může v malé koncentraci tvořit abnormální typ hemoglobinu Bart (1-2 %), který se skládá ze čtyř γ -globinů. Poměr řetězců α/β je tedy téměř normální.

Hemoglobin Bart má velmi vysokou afinitu ke kyslíku, podobně jako myoglobin, a nedodává proto kyslík do tkání. Plod je schopen díky hemoglobinu Portland 1 přežít do třetího trimestru, ale poté je plod silně anoxický a začne se rozvíjet syndrom *hydrops fetalis*, který se projevuje srdečním selháním a otoky ve fetálních subkutánních tkáních (Keohane, 2020).

Pacienti postižení α -thalasemií minor mají poškozeny dva geny pro α -řetězce. Tato forma thalasemie může být homozygotní, nebo heterozygotní, a její průběh je většinou asymptomatický s mírnou mikrocytární anemií. Po narození může být produkován hemoglobin Bart (5-15 %), ale v dospělosti je poměr řetězců α/β vyrovnaný, takže syntéza hemoglobinu Bart ustává.

Pokud je pacient postižen delecí tří genů a α -řetězec tedy syntetizuje pouze jeden gen, je v takovém případě produkován nestabilní HbH hemoglobin, který je tvořen čtyřmi řetězci nadbytečných β -globinů. Po narození může být syntetizován hemoglobin Bart, který tvoří až 40 % z celkové koncentrace hemoglobinu, přičemž HbF a HbA tvoří zbytek. Jakmile dojde k přepnutí syntézy z γ -řetězců na β -řetězce, je hemoglobin Bart nahrazen HbH. Tento typ hemoglobinu může snadno oxidovat a srážet se, v erytrocytech pak vznikají tělíčka denaturovaného hemoglobinu.

α -thalasemie major, neboli syndrom *hydrops fetalis*, je onemocnění, při kterém jsou postiženy všechny čtyři geny pro syntézu α -globinů. Tyto řetězce tedy úplně chybí a tvoří se hemoglobin Bart (γ_4) s malým množstvím hemoglobinu Portland I a hemoglobinu Bart (Keohane, 2020). Toto onemocnění je neslučitelné

se životem a obvykle dochází k úmrtí plodu v děloze, nebo krátce po porodu (*Wild et al., 2017*).

4.2.2 β -thalasemie

β -thalasemie a s ní spojené poruchy mohou být způsobeny různými mutacemi. Jedná se o autozomálně recesivní onemocnění a většinu typů β -thalasemie způsobují bodové mutace postihující gen pro β -globin (*Mustafa et al., 2020*). Molekulární podstata těchto thalasemií je velmi rozmanitá a bylo popsáno více než 200 mutací, které mohou způsobovat β -thalasemii. Mutace může být způsobena v jakémkoliv kroku mechanismu proteosyntézy, jako je např. transkripce, zpracování mRNA, nebo zachování posttranslační integrity β -globinového řetězce (*Wild et al., 2017*). β -thalasemie se vyznačuje sníženou syntézou, nebo úplným chyběním β -globinů. V erytrocytu jsou proto nespárované α -globiny v přebytku a tvoří nerozpustné agregáty.

Pacienti s β -thalasemií jsou charakterističtí variabilními klinickými projevy, které se mohou značně lišit od asymptomatické formy až po závažné klinické fenotypy (*Mustafa et al., 2020*). Onemocnění můžeme dále rozdělit na úplnou absenci β -řetězců, tzv. β^0 -thalasemii, a na β^+ -thalasemii, kde dochází k výraznému snížení syntézy těchto řetězců. Pacient má tedy nedostatek hemoglobinu a dochází ke kumulaci α -globinů v cytoplazmě erytrocytu.

U heterozygotů (β -thalasemie minor) nedochází k žádným větším projevům onemocnění, objevuje se mírná až střední hypochromní mikrocytární anémie a nedochází k hemolýze (*Forget et al., 2013*). Pacient má obvykle zvýšené hladiny HbA₂, obsah hemoglobinů je tedy 92-95 % HbA, >3,8 % HbA₂ a variabilní koncentrace HbF 0,5–4 % (*Nienhuis et al., 2012*).

U homozygotů (β -thalasemie major) bývá projevem už od narození silná hemolytická anémie a pacient je závislý na transfuzích, které udržují hladinu cirkulujícího HbA. Přidružuje se též ne moc efektivní erytropoéza se zánikem prekurzorových erytroidních buněk v kostní dřeni (*Forget et al., 2013*). Masivní expanze kostní dřene může způsobit extramedulární hematopoézu a dochází ke zvětšení jater a sleziny. U jedinců s těžkým průběhem β -thalasemie dochází k přetížení organismu železem, což má za následek srdeční dysfunkce a ukládání železa v játrech (*Nienhuis et al., 2012*). Mezi komplikace u pacientů

trpících β -thalasemií můžeme řadit také tromboembolické příhody, které jsou pravděpodobně zapříčiněny abnormálními povrchy červených krvinek, které exprimují fosfatidylserin, který simuluje koagulaci krve. Pokud je β -thalasemie neléčená, dochází v prvních pěti letech života k úmrtí až 80 % dětí s touto diagnosou (*Sirachainan et al., 2016*).

Existuje také neobvyklý typ β -thalasemie intermedia. Objevuje se středně těžká až těžká hemolytická anémie, ale pacient není závislý na pravidelných transfuzích krve (*Musallam et al., 2012*). Většina pacientů s touto diagnosou má dva geny postižené mutací a genotyp je tedy stejný jako u β -thalasemie major, avšak průběh onemocnění je zpravidla mírnější. Nerovnováha mezi řetězci není tak velká, a proto je akumulace α -podjednotek v cytoplazmě erytrocytu menší. Možnou příčinou této snížené nerovnováhy může být dědičnost mírnější mutace β^+ -thalasemie s méně postiženou syntézou β -globinů než je obvykle (*Forget et al., 2013*).

5 Závěr

Cílem této bakalářské práce bylo charakterizovat jednotlivé typy hemoglobinů, jejich strukturu, vlastnosti a čím se od sebe tyto jednotlivé druhy liší.

V úvodu práce je definován lidský hemoglobin a jeho funkce a vlastnosti. Hlavní funkcí tohoto proteinu je přenos kyslíku z plic do tkání a oxidu uhličitého naopak ze tkání do plic, aby mohlo dojít k jeho vydýchání. Hemoglobin má také funkci nárazníkového systému krve.

Lidský hemoglobin je tvořen dvěma částmi: globinem a hemem. Globin je část bílkovinná, jedná se o polypeptidový řetězec, který je složen z různých aminokyselin. Hem je komplexní sloučenina tvořena protoporphyrinem IX a navázaným železnatým iontem. Každá molekula hemoglobinu obsahuje čtyři globinové řetězce a čtyři sloučeniny hemu.

Každý typ hemoglobinu se liší obsahem jednotlivých řetězců. Tyto globinové řetězce jsou složeny z rozdílných druhů aminokyselin a mají odlišný počet aminokyselin, což ovlivňuje jejich vlastnosti. Molekula hemoglobinu je tetramer, skládá se ze čtyř podjednotek, které jsou spojeny pomocí podjednotkových propojení. Tyto hemoglobinové interakce mají různou sílu a liší se podle toho, o jaký typ hemoglobinu se jedná. Nejsilnější podjednotkové spojení má dospělý typ HbA.

Syntéza hemoglobinu je během vývoje plodu v děloze striktně koordinovaná a kontrolovaná. V průběhu vývoje dochází ke změnám v expresi jednotlivých genů a globinové řetězce se tvoří postupně od embryonálních typů hemoglobinu až po fetální a nakonec dospělý typ hemoglobinu. Syntéza hemu probíhá v mitochondriích a cytoplazmě. Hemoglobinopatie se řadí mezi nejčastěji se vyskytující dědičné poruchy. Může se jednat o poruchu syntézy hemoglobinového řetězce nebo o kvalitativní poruchy tvorby hemoglobinu.

6 Seznam použité literatury

- [1] Adachi K., Zhao Y., Yamaguchi T., Surrey, S.: *Assembly of – with α -Globin Chains to Form Human Fetal Hemoglobin in Vitro and in Vivo*, The Journal of Biological Chemistry, 2000, 275: 12424-12429 .
- [2] Ashiuch M., Yagami T., Willey R. J., Padovan J. C. et al.: *N-terminal acetylation and protonation of individual hemoglobin subunits: Position-dependent effects on tetramer, strength and cooperativity*, Protein Science, 2009, 14: 1458-1471.
- [3] Bank A.: *Regulation of human fetal hemoglobin: new players, new complexities*, Blood, 2006, 107 (2): 435-443.
- [4] Barret K. E., Barman S. M., Brooks H. L., Boiano S.: *Ganong's Review of Medical Physiology: Twenty-Third Edition*, McGraw-Hill education/Medical, 2009, cap. 32, 525-527.
- [5] Bhagavan N. V., Ha C.: *Chapter 26 – Hemoglobin*, Essentials of Medical Biochemistry (Second Edition), 2015, 489-509.
- [6] Brittain T.: *Molecular aspects of embryonic hemoglobin function*, Molecular Aspects of Medicine, 2002, 23 (4): 293-342.
- [7] Demirci S., Uchida N., Tisdale J. F.: *Gene therapy for sickle cell disease: An update*, Cytotherapy, 2018, 20 (7): 800-910.
- [8] Engelking L. R.: *Chapter 32 - Heme Biosynthesis*, Textbook of Veterinary Physiological Chemistry (Third Edition), 2015, 195-201.
- [9] Engelking L. R.: *Chapter 84 – Protein Buffer Systems*, Textbook of Veterinary Physiological Chemistry (Third Edition), 2015, 544-548.
- [10] Farsaci F., Tellone E., Galtieri A., Ficarra S.: *A new model with internal variables for theoretical thermodynamic characterization hemoglobin: Entropy determination and comparative study*, Journal of Molecular Liquids, 2019, 279: 632-639.
- [11] Forget B. G., Bunn H. F.: *Classification of the Disorders of Hemoglobin*, Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine, 2013, 3 (2).
- [12] He Z., Lian L., Asakura T., Russell J. E.: *Functional effects of replacing human α - and β -globins with their embryonic globin homologues in defined haemoglobin heterotetramers*. British Journal of Haematology, 2010, 109: 882-890.

- [13] Chakane S., Matos T., Kettisen K., Bulow L.: *Fetal hemoglobin is much less prone to DNA cleavage compared to the adult protein*, Redox Biology, 2017, 12: 114-120.
- [14] Juul S. E., Christensen R. D.: 78 – *Developmental Hematology*, Avery's Diseases of the Newborn (Tenth Edition), 2018, 1113-1120.
- [15] Keohane E. M.: 25 – *Thalasseмии*, Rodak's Hematology (Sixth Edition), 2020, 424-444.
- [16] Kohne E.: *Hemoglobinopathies: clinical manifestations, diagnosis, and treatment*, Deutsches Arzteblatt international, 2011, 108 (31-32): 532-540.
- [17] Kosmachevskaya O. V., Topunov A. F.: *Alternate and Additional Functions of Erythrocyte Hemoglobin*, Biochemistry (Moscow), 2018, 83: 1575-1593.
- [18] Little R. R., Roberts W. L.: *A Review of Variant Hemoglobins Interfering with Hemoglobin A1c Measurement*, Journal of Diabetes Science and Technology, 2009, 3 (3): 446-451.
- [19] Litwack G.: *Chapter 21 – Blood and Lymphatic System*, Human Biochemistry, 2018, 681-708.
- [20] Manca L., Masala B.: *Disorders of the synthesis of human fetal hemoglobin*, IUBMB Life, 2008, 60: 94-111.
- [21] Manning L. R., Manning J. M.: *The Acetylation State of Human Fetal Hemoglobin Modulates the Strength of Its Subunit Interactions: Long-Range Effects and Implications for Histone Interaction in the Nucleosome*, Biochemistry, 2001, 40 (6): 1635-1639.
- [22] Manning L. R., Popowicz A. M., Padovan J. C., Chait B. T. et al.: *Gel filtration of dilute human embryonic hemoglobins reveals basis for their increased oxygen binding*, Analytical Biochemistry, 2017, 519: 38-41.
- [23] Manning L. R., Popowicz A. M., Padovan J., Brian C. T. et al.: *Development expression of human hemoglobins mediated by maturation of their subunit interfaces*, Protein Science, 2010, 19 (8): 1595-1599.

- [24] Manning L. R., Russell J. E., Popowicz A. M., Manning R. S. et al.: *Energetic Differences at The Subunit Interfaces of Normal Human Hemoglobins Correlate with Their Developmental Profile*, *Biochemistry*, 2009, 48 (13): 7568-7574.
- [25] Marengo-Rowe A. J.: *Structure-function relations of human hemoglobins*, *Proceedings (Baylor University, Medical Center)*, 2006, 19 (3): 239–245.
- [26] Musallam K. M., Taher A. T., Rachmilewitz E. A.: *β -Thalassemia Intermedia: A Clinical Perspective*, *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2012, 2 (7).
- [27] Mustafa I., Firdous N., Shebl F. M., Shi Z. et al.: *Genetic epidemiology of beta-thalassemia in the Maldives: 23 years of a beta-thalassemia screening program*, *Gene*, 2020, 741: 144544.
- [28] Neinhuis A. W., Nathan D. G.: *Pathophysiology and Clinical Manifestations of the β -Thalassemias*, *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 2012, 2 (12).
- [29] Okonjo K. O.: *Bohr effect of human hemoglobin: Separation of tertiary and quaternary contributions based on the Wyman equation*, *Biophysical Chemistry*, 2017, 228: 87-97.
- [30] Okonjo, K. O.: *Bohr effect of hemoglobins: Accounting for differences in magnitude*, *Journal of Theoretical Biology*, 2015, 380: 436-443.
- [31] Oqawa C., Tsuchiya K., Maeda K.: *Retikuloocyte hemoglobin content*, *Clinica Chimica Acta*, 2020, 504: 138-145.
- [32] Otto C. N.: *7 – Hemoglobin metabolism*, *Rodak's Hematology*, 2020, 91-103.
- [33] Pecka M.: *Laboratorní hematologie v přehledu: Buňka a krvinekva*, FINIDR, s.r.o., Český Těšín, 2002, cap. 3, 96–120.
- [34] Phillips J. D.: *Heme biosynthesis and the porphyrias*, *Molecular Genetics and Metabolism*, 2019, 128 (3): 164-177.
- [35] Piel R. B., Dailey Jr. H. A., Medlock A. E.: *Insights into the complex(ity) of heme synthesis and distribution*, *Molecular Genetics and Metabolism*, 2019, 128 (3): 198-203.
- [36] Randolph T. R.: *24 – Hemoglobinopathies (structural defects in hemoglobin)*, *Rodak's Hematology (Sixth Edition)*, 2020, 394-423.
- [37] Sankaran V. G., Orkin S. H.: *The Switch from Fetal to Adult Hemoglobin*, *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2013, 3 (1).

- [38] Selim N. S., El-Marakby S. M.: *Radiation-induced changes in the optical properties of hemoglobin molecule*, Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2010, 76(1): 56-61.
- [39] Shibayama N.: *Allosteric transitions in hemoglobin revisited*, Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – General Subjects, 2020, 1864 (2).
- [40] Schechter A. N.: *Hemoglobin research and the origins of molecular medicine*, Blood, 2008, 112 (10), 3927–3938.
- [41] Sirachainan N., Chuansumrit A., Kadegasem P., Sasanakul W. et al.: *Normal hemostatic parameters in children and young adults with α -thalassemie diseases*, Thrombosis Research, 2016, 146: 35-42.
- [42] Taylor S. M., Parobek C. M., Fairhurst R. M.: *Haemoglobinopathies and the clinical epidemiology of malaria: a systematic review and meta-analysis*, The lancet: Infectious Diseases, 2012, 12 (6): 457-468.
- [43] Tejero J., Gladwin M. T.: *The Globin Superfamily: Functions in Nitric Oxide Formation and Decay*, Biological chemistry, 2014, 395 (6): 631-639.
- [44] Thom C. S., Dickson C. F., Gell D. A., Weiss M. J.: *Hemoglobin variants: biochemical properties and clinical correlates*. Cold Spring Harbor perspectives in medicine , 2013, 3(3).
- [45] Vichinsky E. P.: *Clinical Manifestation of α -Thalassemia*, Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine, 2013, 3 (5).
- [46] Wild B. J., Bain B. J.: *14 – Investigation of Variant Haemoglobins and Thalassemias*, Dacie and Lewis Practical Haematology (Twelfth Edition), 2017, 282-311.
- [47] Yagami T., Ballard B. T., Padovan J. C., Chait B. T. et al.: *N-terminal contributions of the gamma-subunit of fetal hemoglobins to its tetramer strength: remote effects at subunit contacts*, Protein Science, 2002, 11 (1): 27-35.
- [48] Yan H., Hale J., Jaffray J., Li J.: *Developmental Differences Between Neonatal and Adult Human Erythropoiesis*, American journal of hematology, 2019, 93 (4): 494-503.
- [49] Yonetani T., Laberge M.: *Protein dynamics explain the allosteric behaviors of hemoglobin*, Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Proteins and Proteomics, 2008, 1784 (8): 1146-1158.

- [50] Zhenning H. Russell E.: *Expression, purification and characterization of human hemoglobins Gower-1 ($\zeta_2 \epsilon_2$), Gower-2 ($\alpha_2 \epsilon_2$) and Portland-2 ($\zeta_2 \beta_2$) assembled in complex transgenic-knockout mice*, *Blood*, 2001, 97 (4): 1099-1105.
- [51] Zhenning H., Russell J. E.: *Effect of ζ -globin substitution on the O_2 -transport properties of Hb S in vitro and in vivo*, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2004, 325 (4): 1376-1382.