

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická

Neuroglobin  
Bakalářská práce

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická  
Akademický rok: 2024/2025

# ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Simona Petříková**  
Osobní číslo: **C22227**  
Studijní program: **B0914P360019 Laboratorní diagnostika ve zdravotnictví**  
Téma práce: **Neuroglobin**  
Téma práce anglicky: **Neuroglobin**  
Zadávací katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

## Zásady pro vypracování

1) Zpracujte literární rešerši zaměřenou na neuroglobin. V rámci zadaného tématu se nejprve zaměřte na přehled hemových proteinů, vč. hemoglobinu a myoglobinu, jejich strukturu, význam, syntézu. Následně se zaměřte na detailní popis vzniku, funkce a výskytu neuroglobinu. Především se zaměřte na aktuální stav poznání o tomto proteinu a jeho význam pro diagnostiku.

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

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

Seznam doporučené literatury:

Podle pokynů vedoucího bakalářské práce.

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

Datum zadání bakalářské práce: **20. prosince 2024**

Termín odevzdání bakalářské práce: **1. července 2025**

**prof. Ing. Petr Němec, Ph.D.** v.r.  
děkan

L.S.

**prof. RNDr. Tomáš Roušar, Ph.D.** v.r.  
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2025

Prohlašuji:

Práci s názvem „**Neuroglobin**“ jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využil, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byl jsem seznámen 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. 2025

Simona Petříková v.r.

## **PODĚKOVÁNÍ**

Ráda bych zde poděkovala vedoucímu mé bakalářské práce doc. RNDr. Tomáši Roušarovi Ph.D. za vybrání tématu, odborné vedení mé bakalářské práce, cenné rady, vstřícnost a věnovaný čas.

## **ANOTACE**

Bakalářská práce je zaměřena na strukturu, vlastnosti a význam neuroglobinu. V úvodní části je stručně popsána struktura metaloproteinů a popis dvou základních zástupců (hemoglobin, myoglobin). Další kapitola je věnována samotnému neuroglobinu a jeho buněčným mechanismům. V poslední části se práce zabývá rolí neuroglobinu v patologických stavech, kde je shrnut i jeho terapeutických význam.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

Metaloprotein, neuroglobin, oxidační stres, mitochondrie, neuroprotektce

## **TITLE**

Neuroglobin

## **ANNOTATION**

The bachelor thesis is focused on the structure, properties and significance of neuroglobin. In the first chapter the structure of metalloproteins is briefly described and two basic representatives (hemoglobin, myoglobin). The next chapter describes neuroglobin itself and its cellular mechanisms. The last part of the thesis deals with the role of neuroglobin in pathological conditions, where its therapeutic significance is also summarized.

## **KEYWORDS**

Metalloprotein, neuroglobin, oxidative stress, mitochondria, neuroprotection

# OBSAH

SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK.....	9
SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK.....	10
ÚVOD.....	12
1 TEORETICKÁ ČÁST .....	13
1.1 Metaloproteiny .....	13
1.1.1 Metaloporfyrin.....	13
1.1.2 Globin .....	14
1.1.3 Hemoglobin .....	15
1.1.4 Myoglobin .....	17
1.2 Neuroglobin .....	18
1.2.1 Evoluce neuroglobinu .....	18
1.2.2 Struktura neuroglobinu .....	19
1.2.2.1 Hexakoordinace železa v hemu.....	19
1.2.2.2 Dutiny a migrace ligandu ve vnitřních dutinách .....	21
1.2.3 Neuroprotektce .....	22
1.2.3.1 Antiapoptický účinek neuroglobinu .....	23
1.2.3.2 Antioxidační účinek.....	24
1.2.3.3 G-proteiny.....	25
1.3 Role neuroglobinu v patologických stavech.....	29
1.3.1 Nádorová onemocnění .....	29
1.3.1.1 Nádory centrální nervové soustavy .....	29
1.3.1.2 Karcinom prsu a plic.....	30
1.3.1.3 Hepatocelulární karcinom.....	31
1.3.1.4 Kolorektální karcinom .....	31
1.3.1.5 Karcinom slinivky břišní .....	33
1.3.2 Role v neurodegenerativních onemocněních .....	33
1.3.2.1 Huntingtonova choroba .....	34
1.3.2.2 Alzheimerova choroba.....	35

1.3.2.3	Parkinsonova choroba.....	36
1.3.3	Role při ischemickém poškození .....	37
1.3.3.1	Cévní mozková příhoda.....	37
1.3.3.2	Retinální ischemie .....	38
2	ZÁVĚR.....	40
3	POUŽITÁ LITERATURA .....	42

## SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK

<b>Obrázek 1:</b> Syntéza hemu .....	14
<b>Obrázek 2:</b> Vývoj globinů u obratlovců .....	19
<b>Obrázek 3:</b> Pohled na proximální a distální místa hemu neuroglobinu.....	20
<b>Obrázek 4:</b> Rovnováha mezi 5c a 6c formou a proces vazby ligandu .....	20
<b>Obrázek 5:</b> Lidský neuroglobin .....	22
<b>Obrázek 6:</b> Proteinový komplex neuroglobin-cytochromt c .....	24
<b>Obrázek 7:</b> Cyklus aktivace/inaktivace G-proteinů pomocí GCPR .....	26
<b>Obrázek 8:</b> Lipidový raft .....	27
<b>Obrázek 9:</b> Formování $\beta$ -amyloidu .....	35

## SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

AD	Alzheimerova choroba
A $\beta$	$\beta$ -amyloid
ALA	Kyselina $\delta$ -aminolevulová
Apaf-1	Faktor aktivující apoptickou proteázu
APP	Prekurzorový amyloidový protein
cAMP	Cyklický adenosinmonofosfát
CMP	Cévní mozková příhoda
CNS	Centrální nervová soustava
CRC	Kolorektální karcinom
Cyt c	Cytochrom c
EGFR	Epidermální růstový faktor
E $\alpha$	Estrogenový receptor $\alpha$
E2	17 $\beta$ -estradiol
GAP	Proteiny aktivující GTPázu
G $\alpha$	$\alpha$ -podjednotka G-proteinu
G $\beta\gamma$	$\beta\gamma$ dimer G-proteinu
GDI	Inhibitory disociace guaninnukleotidu
GDP/GTP	Guaninové nukleotidy
GEF	Guaninnukleotidové výměnné faktory
GPCR	G-proteinem spřažené receptory
HCC	Hepatocelulární karcinom
HD	Huntingtonova choroba
HGB	Hemoglobin

HisE7	Histidinový zbytek (distální strana)
HisF8	Histidinový zbytek (proximální strana)
HTT	Huntingtin
MGB	Myoglobin
mHTT	Mutovaný huntingtin
NGB	Neuroglobin
PD	Parkinsonova choroba
polyQ	Polyglutaminové agregáty
ROS	Reaktivní formy kyslíku
5c	Pentakoordinovaná forma neuroglobinu
6c	Hexakoordinovaná forma neuroglobinu

## ÚVOD

Tato práce se zaměřuje na problematiku neuroglobinu a jeho biologického významu v různých typech buněk a tkání, a to jak za fyziologických, tak patologických podmínek. Pro správné pochopení role neuroglobinu je nejprve nutné porozumět základní struktuře a funkci metaloproteinů.

NGB byl poprvé identifikován poměrně nedávno, a proto je jeho struktura a vlastnosti v lidském organismu stále zkoumána. Vzhledem k jeho schopnosti reagovat na oxidační stres, hypoxii a mitochondriální dysfunkci je neuroglobin považován za významný cytoprotektivní faktor.

Zvýšený výskyt neurodegenerativních, ischemických i nádorových onemocnění podtrhuje potřebu detailního studia proteinů, které mohou zasahovat do mechanismů buněčné ochrany. NGB se ukazuje být jedním z takových proteinů, a jeho výzkum může přinést nové poznatky.

# 1 TEORETICKÁ ČÁST

## 1.1 Metaloproteiny

Metaloproteiny jsou bílkoviny obsahující ionty kovů, které se vyskytují ve všech typech živých organismů. Metaloproteiny představují širokou skupinu proteinů, které obsahují centrální kov, který je nezbytný pro jejich strukturu a funkci. Nejčastěji se jedná o ionty železa, mědi, zinku, hořčíku, manganu a dalších kovů. Přítomnost těchto iontů je klíčová pro zajištění enzymatické aktivity, přenos elektronů, transport kyslíku, buněčnou signalizaci nebo regulaci genové exprese. Metaloproteiny nejsou homogenní skupinou – zahrnují enzymy, signální molekuly i strukturní proteiny, přičemž kovový ion zde slouží jako kofaktor nezbytný pro danou biologickou funkci (Selvaraj *et al*, 2024).

U obratlovců bylo objeveno několik typů metaloproteinů, mezi něž patří hemoglobin, myoglobin, cytoglobin, neuroglobin, androglobin, globin X, globin Y a globin E (Exertier *et al*, 2022). Tyto globinové proteiny se vyskytují nejen u živočichů, ale také u bakterií, *Protista*, hub a rostlin (Sun *et al*, 2001).

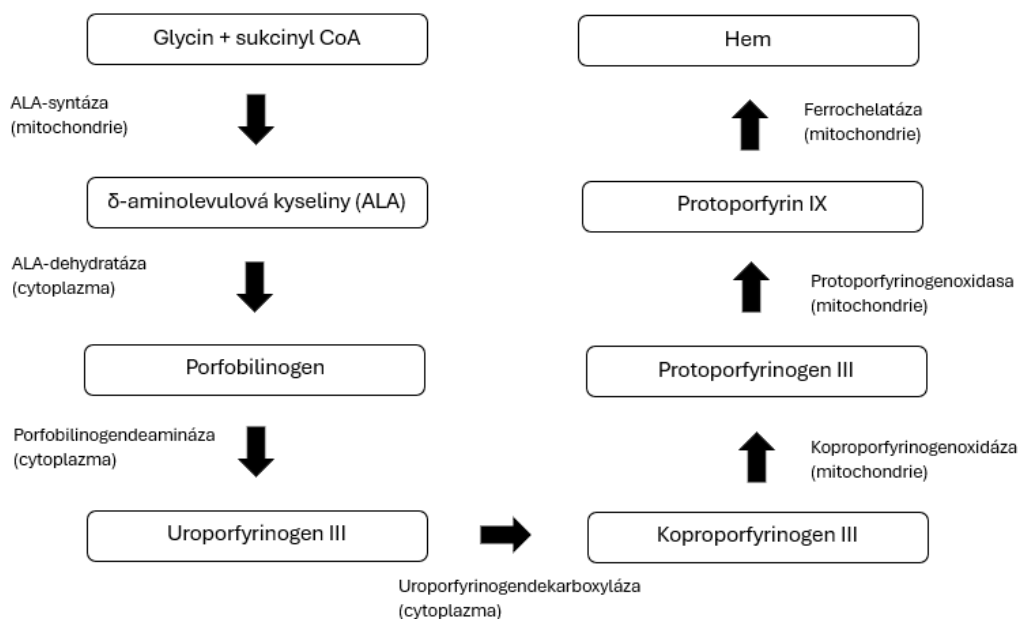
### 1.1.1 Metaloporfyrin

Hem je prostetická skupina, která je pevně vázána na peptidovou část molekuly, a to buď kovalentně, nebo nekovalentně. Jsou to cyklické sloučeniny složené ze čtyř pyrrolových kruhů, propojených methenylovými můstky. Jejich typickou vlastností je schopnost tvořit komplexy s kovovými ionty, které se vážou na dusíkové atomy uvnitř pyrrolových kruhů. V biologických systémech je nejčastějším kovem železo, které se obvykle nachází ve dvojmocné formě ( $\text{Fe}^{2+}$ ) a má schopnost reverzibilně vázat kyslík, což je klíčové například pro transportní a respirační funkce (Pittman, 2011).

Biosyntéza hemu probíhá ve všech somatických buňkách, které obsahují mitochondrie. Je ovšem také potřeba dvou výchozích látek pro tento proces, a to sukcinyl-CoA, pocházející z Krebsova cyklu, a aminokyselina glycin. Aktivaci glycinu pyridoxalfosfátem dochází k jeho reakci s acetyl-CoA za vzniku kyseliny  $\alpha$ -amino- $\beta$ -ketoadipové. Ta následně podléhá dekarboxylaci, čímž vzniká  $\delta$ -aminolevulová kyselina (ALA). Tato reakce, katalyzovaná enzymem ALA-syntázou, probíhá v mitochondriálním matrix.

Následně ALA přechází do cytosolu, kde dvě molekuly ALA kondenzují působením enzymu ALA-dehydratázy za vzniku porfobilinogenu a dvou molekul vody. Čtyři molekuly porfobilinogenu se poté spojují do lineárního tetrapyrrolového řetězce – hydroxymethylbilanu. Tato kondenzace, je zprostředkována enzymem porfobilinogendeaminázou. Hydroxymethylbilan může spontánně cyklizovat, přičemž vzniká uroporfyrinogen III – a vzácněji i jeho izomer uroporfyrinogen I. Obě sloučeniny obsahují čtyři pyrrolové kruhy, propojené methylenovými můstky.

Další krok zajišťuje enzym uroporfyrinogendekarboxyláza který uroporfyrinogen III přeměňuje na koproporfyrinogen III. Ten se transportuje zpět do matrix mitochondrie, kde je nejprve oxidován koproporfyrinogenoxidázou na protoporfyrinogen III a následně protoporfyrinogenoxidázou na protoporfyrin IX jako přímý prekurzor hemu. Posledním krokem syntézy hemu je inkorporace iontu železa do protoporfyrinu. Tato reakce je podpořena enzymem ferrochelátázou (Engelking, 2015).



Obrázek 1: Syntéza hemu – dvě hlavní výchozí látky (sukcinyl-CoA a glycin) a jejich následné přeměny.

### 1.1.2 Globin

Globin je protein složený z aminokyselinového řetězce, který se skládá do charakteristických  $\alpha$ -helixů obklopujících centrálně uloženou hemovou skupinu (Bashford et al., 1987). Pro správnou funkci tohoto proteinu je nezbytné, aby nabyl

tzv. nativní konformace. To znamená, že jeho prostorové uspořádání musí být specifické. Pořadí aminokyselin, které jsou mezi sebou spojeny peptidovými vazbami, označujeme jako primární strukturu proteinu. Tato struktura je zapisována od N-konce k C-konci řetězce. Sekundární struktura proteinu je tvořena prostorovým uspořádáním sousedních nebo blízkých aminokyselinových zbytků, například do  $\alpha$ -helixů nebo  $\beta$ -skládaných listů. Terciární struktura představuje celkové prostorové uspořádání celého polypeptidového řetězce, včetně vztahů mezi jeho vzdálenějšími částmi a kvartérní struktura se týká prostorových vztahů mezi jednotlivými polypeptidovými řetězci, pokud je protein tvořen více než jedním řetězcem.

Důležitým aspektem formování sekundární struktury proteinů je prostorové uspořádání kostry polypeptidového řetězce. Toto uspořádání je primárně řízeno dvěma dihedrálními úhly, označovanými jako  $\phi$  (phi) a  $\psi$  (psi), které určují orientaci jednotlivých aminokyselinových zbytků vůči sobě. Jejich možné kombinace jsou omezeny sterickými vlivy, tedy prostorovými překážkami mezi atomy hlavního i postranního řetězce. Pro vizualizaci těchto konformačních možností se používá Ramachandranův diagram. Ten znázorňuje oblasti dihedrálních úhlů, které jsou stericky přípustné a odpovídají nejběžnějším sekundárním strukturám, jako jsou  $\alpha$ -helixy a  $\beta$ -skládané listy. Právě  $\alpha$ -helix bývá nejčastěji zastoupenou strukturou v globulárních proteinech. Pokročilé přístupy, jako je zavedení tzv. Ramachandranova čísla, umožňují kvantitativně hodnotit konformaci proteinových zbytků a odhalovat pravidelnosti i neuspořádané oblasti v jejich struktuře (Mannige *et al*, 2016).

V případě metaloproteinů, mezi které patří i globiny, je tato struktura zvláště důležitá, protože prostorové uspořádání proteinu umožňuje správné umístění kovového iontu. Globulární proteiny (sféroproteiny) mají obvykle kulovitý, nebo elipsoidní tvar. Jejich prostorová organizace je taková, že hydrofobní postranní skupiny aminokyselin se nacházejí uvnitř molekuly, zatímco hydrofilní části jsou orientovány směrem ven. Tato orientace umožňuje interakci hydrofilních částí s vodným prostředím buňky, což je důležité pro jejich funkci (Pesce *et al*, 2002).

### 1.1.3 Hemoglobin

Bílkovinná část hemoglobinu (HGB) je složena ze čtyř polypeptidových řetězců, přičemž každý z nich obsahuje navázanou molekulu hemu. Dva z těchto

řetězců jsou typu  $\alpha$  a dva typu  $\beta$ .  $\alpha$ -řetězec se skládá ze 141 aminokyselin, zatímco  $\beta$ -řetězec obsahuje 146 aminokyselin. Jednotlivé podjednotky jsou uspořádány do specifické kvartérní struktury, která umožňuje efektivní kooperativní vazbu kyslíku (Marengo-Rowe, 2006).

Každý HGB monomer je schopen navázat jednu molekulu kyslíku, takže celý HGB může přenášet až čtyři molekuly kyslíku současně. Vazba kyslíku na HGB je spojena s významnými konformačními změnami: po navázání kyslíku dochází k posunu atomu železa blíže do roviny porfyrinového kruhu. Tento posun je přenesen přes proximální histidin na celou polypeptidovou kostru, což následně ovlivní i sousední podjednotky. Výsledkem je přechod HGB z napjatého (T – *taut*) stavu s nízkou afinitou ke kyslíku do uvolněného (R – *relaxed*) stavu s vyšší afinitou. Navázání první molekuly kyslíku na HGB vyvolá konformační změnu, která následně usnadňuje vazbu dalších molekul.

Kromě transportu kyslíku se HGB podílí i na přenosu protonů ( $H^+$ ). Za každé čtyři molekuly uvolněného kyslíku váže HGB dva protony. Tento proces má klíčový význam pro regulaci pH krve a je úzce spojen s tzv. Bohrovým efektem. Bohrov efekt popisuje skutečnost, že zvýšení koncentrace oxidu uhličitého a protonů (nižší pH) v periferních tkáních snižuje afinitu HGB ke kyslíku, což usnadňuje jeho uvolnění tam, kde je nejvíce potřeba. Naopak v plicích, kde je koncentrace oxidu uhličitého nižší a pH vyšší, je afinita HGB ke kyslíku zvýšena, což podporuje jeho nasycení kyslíkem.

Důležitým regulátorem funkce HGB je molekula 2,3-bisfosfoglycerátu. Tato molekula se váže na dutinu mezi  $\beta$ -podjednotkami v T stavu HGB a stabilizuje tuto konformaci, čímž snižuje afinitu ke kyslíku. Přítomnost 2,3-bisfosfoglycerátu je proto klíčová pro správnou distribuci kyslíku do tkání, zejména za podmínek, kdy je dostupnost kyslíku snížena (Kosmachevskaya *et al*, 2018).

V lidském organismu existuje několik typů HGB v závislosti na stádiu vývoje. U dospělých převažuje hemoglobin A, který je složen  $\alpha_2\beta_2$  řetězců. Další formou je hemoglobin F složen z  $\alpha_2\gamma_2$  řetězců, a který je hlavní formou u plodu a novorozenců a vyznačuje se vyšší afinitou ke kyslíku, což umožňuje efektivní přenos kyslíku z mateřské krve. Minoritně se také u dospělých lidí může vyskytovat HGBA<sub>2</sub>, který je složen z  $\alpha_2\delta_2$  řetězců.

Existují rovněž různé mutantní formy HGB, například hemoglobin S u srpkovité anémie, kdy dochází k záměně aminokyseliny glutamátu za valin na  $\beta$ -

řetězci, což vede k agregaci molekul HGB při deoxygenaci a deformaci erytrocytů. Další varianty zahrnují hemoglobin C či různé thalasemie, které jsou spojeny s poruchami syntézy  $\alpha$ - nebo  $\beta$ -řetězců. Tyto mutace mohou mít významné klinické důsledky a ovlivňují jak transportní kapacitu HGB, tak jeho stabilitu (Bank, 2006).

#### 1.1.4 Myoglobin

I když HGB i myoglobin (MGB) mají podobné úkoly v těle, jejich struktura a funkce se liší. Na rozdíl od tetramerního HGB je MGB jednořetězcový protein (monomer), který je podobný  $\beta$ -řetězci HGB. MGB je složen z jednoho polypeptidového řetězce o délce 153 aminokyselin (Rout *et al*, 2021).

Hlavní funkcí MGB je uskladnění kyslíku v buňkách, zejména v buňkách kosterního a srdečního svalu. MGB působí jako zásobárna kyslíku, který je uvolňován během intenzivní svalové aktivity, kdy jsou potřeby kyslíku vysoké. Na rozdíl od HGB, který se nachází v červených krvinkách a je zodpovědný za transport kyslíku v krvi, MGB je vázán ve svalových vláknech a působí spíše na lokální úrovni, kde se podílí na zajištění přístupu kyslíku do mitochondrií, kde probíhá aerobní metabolismus (Keppner *et al*, 2020).

V klinické praxi je MGB považován za časný a citlivý biomarker poškození svalových vláken. Jeho měření se využívá například při podezření na infarkt myokardu. Při poškození svalových buněk se totiž MGB uvolňuje do krevního oběhu. V plazmě se běžně váže na transportní bílkoviny, především plazmatické globuliny. Pokud však jeho množství v krvi výrazně vzroste, část z něj zůstává nevázaná, volně cirkuluje a je filtrován ledvinami. Pokud jeho množství přesáhne schopnost tubulárního zpětného vstřebávání, objevuje se v moči (Rout *et al*, 2021).

## 1.2 Neuroglobin

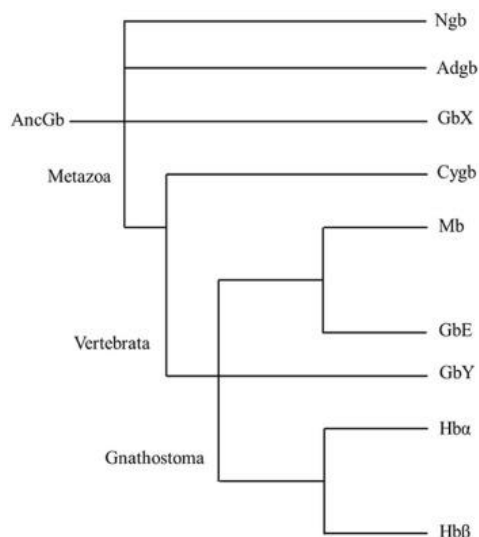
Neuroglobin (NGB) je relativně nově identifikovaný metaloprotein, jehož objev byl poprvé publikován v roce 2000 T. Burmesterem a kol. Tento protein byl nalezen u člověka i myši a svou specifickou expresí v mozkové tkáni získal označení „neuroglobin“. Podobně jako jiné globiny, i NGB obsahuje hemovou skupinu a je schopen reverzibilně vázat kyslík, čímž se podílí na jeho dostupnosti pro buňky nervové soustavy.

NGB se vyskytuje především v oblastech mozku s vysokou metabolickou aktivitou, jako je mozková kůra, thalamus nebo subthalamické jádro, kde by mohl hrát roli v udržování buněčné homeostázy za podmínek oxidačního stresu nebo nedostatku kyslíku. Vzhledem k vysoké afinitě k O<sub>2</sub> a schopnosti vázat kyslík i při velmi nízkém parciálním tlaku se předpokládá, že NGB přispívá k zajištění dostatečného okysličení neuronů. Jeho výrazná evoluční odlišnost od ostatních globinů, stejně jako jeho výskyt u různých živočišných druhů, naznačují, že vznikl jako součást adaptace nervového systému na vysoké nároky na kyslík (Burmester *et al*, 2000).

### 1.2.1 Evoluce neuroglobinu

NGB oproti HGB a MGB představuje evolučně odlišný metaloprotein, který se pravděpodobně oddělil již v raných fázích vývoje mnohobuněčných organismů (Burmester *et al*, 2000).

NGB se objevil v období u *Metazoa* od společného předka (Keppner *et al*, 2020). Společný předek všech globinů, označovaný jako archeální protoglobin (obr. 2), existoval před více než 800 miliony lety, ale jeho přesná funkce je stále neznámá (Ascenzi *et al*, 2016). NGB se vyvinul jako samostatný typ dříve, než se živočichové rozdělili na *Protostomia* (prvoústí) a *Deuterostomie* (druhoústí) (Schwartz *et al*, 2013). Nachází se u většiny obratlovců (Lüdemann *et al*, 2019) s výjimkou mihulí, chrupavčitých a dvojdyšných ryb (Keppner *et al*, 2020).



Obrázek 2: Vývoj globinů u obratlovců – neuroglobin (NGB), androglobin (ADGB) a globin X (GbX) se vyvinuly ze společného předka (AncGb) nezávislými duplikačními událostmi (Ascenzi *et al*, 2016).

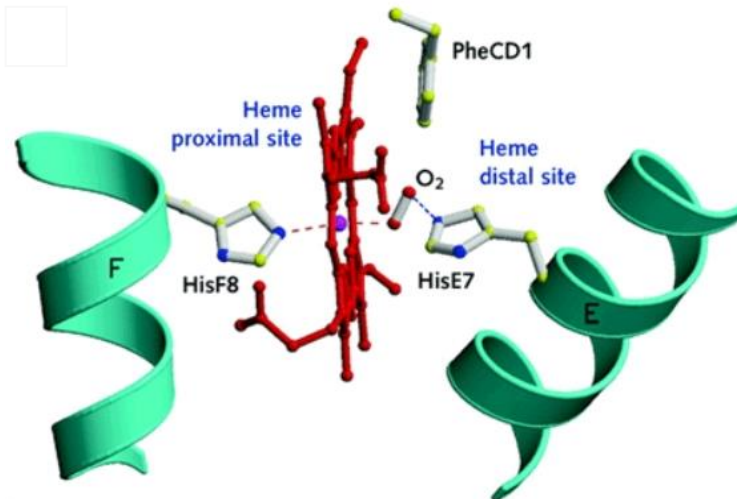
## 1.2.2 Struktura neuroglobinu

Stejně jako MGB je NGB tvořen jedním řetězcem (monomer). U člověka obsahuje 151 aminokyselin. Jeho struktura se ovšem od klasického HGB a MGB významně liší. I přes funkční podobnosti s těmito metaloproteiny sdílí NGB s HGB < 25 % podobnost a s MGB < 21 % podobnost v aminokyselinovém řetězci. Gen kódující NGB je u člověka lokalizován na chromozomu 14q24 (Burmester *et al*, 2000).

### 1.2.2.1 Hexakoordinace železa v hemu

NGB se skládá ze 3  $\alpha$ -helixů, které vykazují typické trojrozměrné („three-over-three“) záhyby (Semenova *et al*, 2024). Toto uspořádání se označuje také jako  $\alpha$ -helikální sendvič (Exertier *et al*, 2019). Šroubovice jsou označovány písmeny A, B, C, D, E, F, G a H (Boron *et al*, 2015).

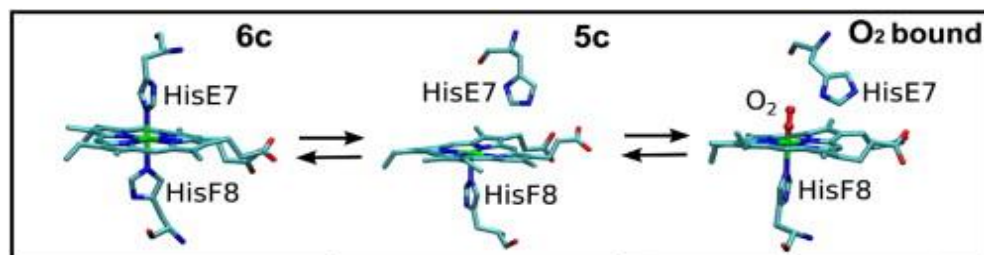
Železo (obr. 3) v hemu je koordinováno dvěma histidinovými zbytky – jeden se váže na železo z proximální strany (HisF8), druhý z distální strany (HisE7) (Pesce *et al*, 2003; Exertier *et al*, 2019). Intramolekulární disulfidový můstek, tvořený dvěma cysteinovými zbytky, ovlivňuje vazbu ligandu (Semenova *et al*, 2024). Tato disulfidová vazba pevně stabilizuje smyčku CD, čímž reguluje jeho strukturální dynamiku a funkční vlastnosti (Exertier *et al*, 2022).



Obrázek 3: Pohled na proximální a distální místa hemu neuroglobinu – na proximální straně se nachází F helix (světle zelená) s histidinovým zbytkem HisF8 (šedá) a na straně distální se nachází E helix (tmavě zelená) a histidinový zbytek HisE7 (šedá). Uprostřed se nachází hem (červená) (Pesce *et al*, 2002).

Koordinace centrálního železa je ovlivňována čtyřmi dusíkovými atomy porfyrinu. Proximální HisF8 je ukotven ve své poloze, což vede k charakteristickému pentakoordinovanému (5c) stavu. V blízkosti atomu železa v hemové skupině se nachází vazebné místo pro kyslík, které je částečně ovlivněno přítomností histidinem. Ten napomáhá správnému navázání molekuly kyslíku (Boron *et al*, 2015) nebo jiného plynného ligandu (např. NO, CO) a plnit tak svou funkci (Colloc'h *et al*, 2017). Toto místo však může být blokováno externím zbytkem (HisE7) (obr. 4). Vzniká tak bis-histidyl hexakoordinovaný (6c) stav a dochází tak k blokaci vazebného místa.

Přechod mezi 5c a 6c formou ovlivňuje, jak rychle a efektivně může NGB vázat kyslík nebo jiné molekuly. Vazba ligandů je možná pouze na reaktivní 5c formu. Čím blíže je totiž rovnováha posunuta směrem ke stavu 5c, tím je afinita plynného ligandu na centrální železo vyšší (Boron *et al*, 2015).

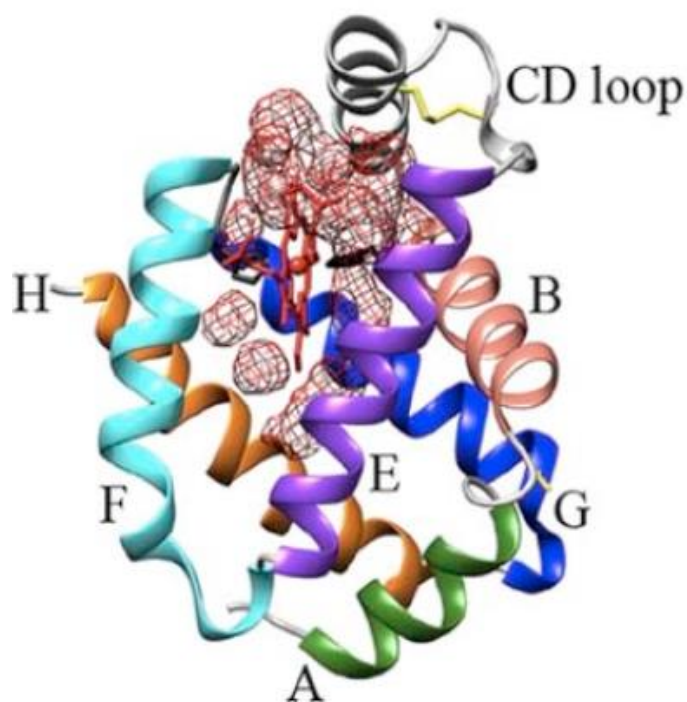


Obrázek 4: Rovnováha mezi 5c a 6c formou a proces vazby ligandu. Bis-histidylková hexakoordinace (vlevo), pentakoordinace bez ligandu (uprostřed) a hexakoordinace vázaná na kyslík (vpravo) (Boron *et al*, 2015).

Dalším důležitým faktorem je schopnost NGB přizpůsobit svou strukturu tak, aby umožnil plynnému ligandu vstoupit do vazebného místa. To umožňuje právě C-D smyčka, která je schopná vytvořit vnitřní disulfidový můstek, který ovlivňuje rovnováhu mezi formami 5c a 6c (Boron *et al*, 2015). To zahrnuje dočasnou disociaci distálního histidinu (HisE7) a díky tomu dojde k přístupu k hemu a usnadnění vazby na kyslík (Exertier *et al*, 2019).

#### **1.2.2.2 Dutiny a migrace ligandu ve vnitřních dutinách**

Uvnitř NGB byly pozorovány neobvykle velké sítě hydrofobních dutin a tunelů (obr. 5), které hrají důležitou roli v jeho funkci. Rozsáhlá síť vnitřních dutin má významnou roli pro klouzání hemu a navázání plynného ligandu (Colloc'h *et al*, 2017) a spojuje hemovou kapsu s okolním proteinovým prostředím (matrix) (Moschetti *et al*, 2009). Dutina umožňuje navigovat plynné ligandy pomocí difúzních cest do kovového centra (Ascenzi *et al*, 2016). Okolní prostředí dutiny může také sloužit dočasně jako úložiště pro ligand, když je hem plně obsazený (Pesce *et al*, 2003), což může mít ochranný význam pro nervové buňky (Colloc'h *et al*, 2017). Části proximálních a distálních míst jsou obklopeny dutinami a kanály a jsou uzavřeny vnějším okolí (Ascenzi *et al*, 2016).



Obrázek 5: Lidský neuroglobin –  $\alpha$ -helixy tvoří typický helikální sendvič (A-H), C a D  $\alpha$ -šroubovice a smyčky jsou šedé, systém dutin a tunelů je zvýrazněn červenou barvou (Ascenzi et al, 2016).

### 1.2.3 Neuroprotektce

Ačkoli lidský mozek tvoří jen asi 2 % tělesné hmotnosti, v klidovém stavu spotřebuje přibližně 20 % veškerého kyslíku, který organismus využívá, a to zejména kvůli energeticky náročné činnosti neuronů. Nedostatečné množství kyslíku má okamžité i dlouhodobé následky na výkon neuronů a mozku. Takový nedostatek je spojen s neurologickými onemocněními, jako je cévní mozková příhoda, Alzheimerova choroba, nebo onemocněními krevního systému, jako je například anémie. Mozek má však své vlastní adaptivní mechanismy v reakci na nedostatečné zásobení neuronů kyslíkem. Mezi tyto mechanismy patří například změny v mitochondriální struktuře, změna normální činnosti enzymu ATPázy v buňce, zvýšení enzymatické aktivity sukcinátdehydrogenázy a aktivace faktoru indukujícího hypoxii. Neuronům a astrocytům pomáhá zachycovat kyslík při patologických stavech právě NGB (Li et al, 2023).

Při hypoxicko-ischemickém poškození dochází ke zvýšení exprese NGB v buňkách, díky kterému se zvyšuje schopnost přežití nervových buněk (Sun et al, 2001). Bylo zjištěno, že NGB je přítomen v mitochondriích a neuritech nervových buněk. Při hypoxii dochází k jeho přesunu, společně s mitochondriemi, směrem

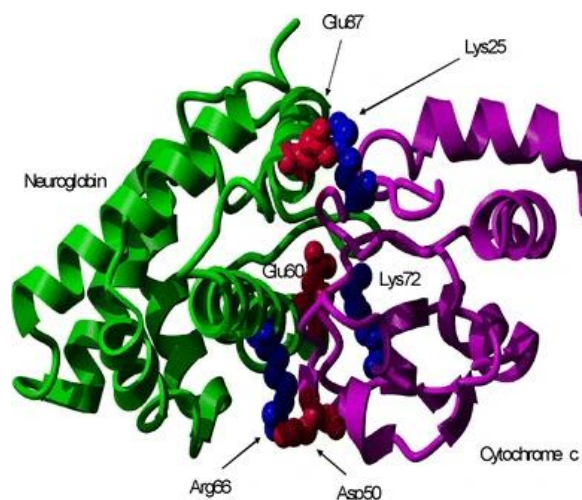
k cytoplazmatické membráně, což napomáhá ochraně buněk před závažnějším poškozením (Li *et al*, 2023).

### 1.2.3.1 Antiapoptický účinek neuroglobinu

Apoptóza, jeden z typů programované buněčné smrti, představuje konečný důsledek řady patologických stavů a dostupné důkazy naznačují, že u akutních poranění i neurodegenerativních onemocnění bývá často spojena s mitochondriální dysfunkcí. Možnost zabránit mitochondriálním událostem zapojeným do buněčné smrti by tedy mohla představovat účinné nástroje k omezení poškození neuronů. Vysoká exprese NGB je spojena se zachovanou mitochondriální funkcí a se zvýšeným přežitím nervových buněk *in vitro* a *in vivo* v různých experimentálních modelech buněčného poškození (Guidolin *et al*, 2016).

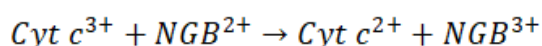
Apoptóza má dvě hlavní iniciační dráhy – dráha receptoru smrti (= vnější) a mitochondriální dráhu (= vnitřní). NGB se uplatňuje především u vnitřní dráhy apoptózy. Tato dráha je vyvolána intracelulárním stresem, který spustí aktivaci BH3 proteinů, a to zejména tBid proteinu. BH3 proteiny aktivují Bcl-2 proteiny Bax a Bak. Tento děj musí být regulován antiapoptickými Bcl-2 proteiny. Aktivované proteiny Bax a Bak oligomerizují a dojde tak ke změně permeability vnější membrány mitochondrií, což má za následek uvolnění proapoptických intermembránových proteinů mitochondrie včetně hemového proteinu cytochromu c (Cyt c). Jakmile dojde k uvolnění Cyt c do cytosolu, spojí se s proteinem Apaf-1 (faktor aktivující apoptickou proteázu) v přítomnosti ATP. Dochází k jeho oligopolymerizaci a vzniká velký proteinový útvar zvaný apoptosom. Apoptosom následně aktivuje kaspázovou kaskádu. Nejdříve dojde k aktivaci rozštěpením pro-kaspázy 9 na kaspázu 9, která štěpí a aktivuje kaspázu 3. Ta následně zprostředkovává destrukci buňky.

Právě NGB zabraňuje vzniku apoptosomu a spuštění kaskády (Raychaudhuri *et al*, 2010). Dojde totiž k interakci oxidovaného Cyt c s redukováným NGB za vzniku komplexu NGB-Cyt c (obr. 6) (Semenova *et al*, 2024). Při tvorbě komplexu mezi těmito dvěma hemoproteinovými molekulami dochází ke strukturní reorganizaci za vzniku dvou solných můstků a vodíkové vazby (Tiwari *et al*, 2018).



Obrázek 6: Proteinový komplex neuroglobin-cytochromu c – struktura komplexu mezi NGB (vlevo) a Cyt c (vpravo) (Raychaudhuri *et al*, 2010).

Při tvorbě tohoto komplexu dochází k redoxní reakci, při které NGB předá elektron Cyt c, čímž ho redukuje z apopticky aktivní železité formy ( $\text{Fe}^{3+}$ ) na neaktivní železnatou formu ( $\text{Fe}^{2+}$ ). Železnatá forma Cyt c se nemůže účastnit reakce s Apaf-1 a postrádá tak svou schopnost iniciace apoptózy (Semenova *et al*, 2024).



### 1.2.3.2 Antioxidační účinek

Volné radikály představují důležité meziproducty v mnoha biochemických reakcích organismu. Jejich nadměrná akumulace může vést k vážnému poškození buněk a může být spojena s rozvojem různých onemocnění. Antioxidanty proto hrají klíčovou roli v ochraně buněk před oxidačním stresem. V buňkách existují antioxidační systémy, které účinně neutralizují reaktivní formy kyslíku (ROS). Vychytávání ROS zajišťují enzymatické i neenzymatické složky antioxidačního systému (Li *et al*, 2011). Velkou roli v této ochraně má také NGB, který se podílí na neutralizaci ROS a tím přispívá k zachování buněčné integrity.

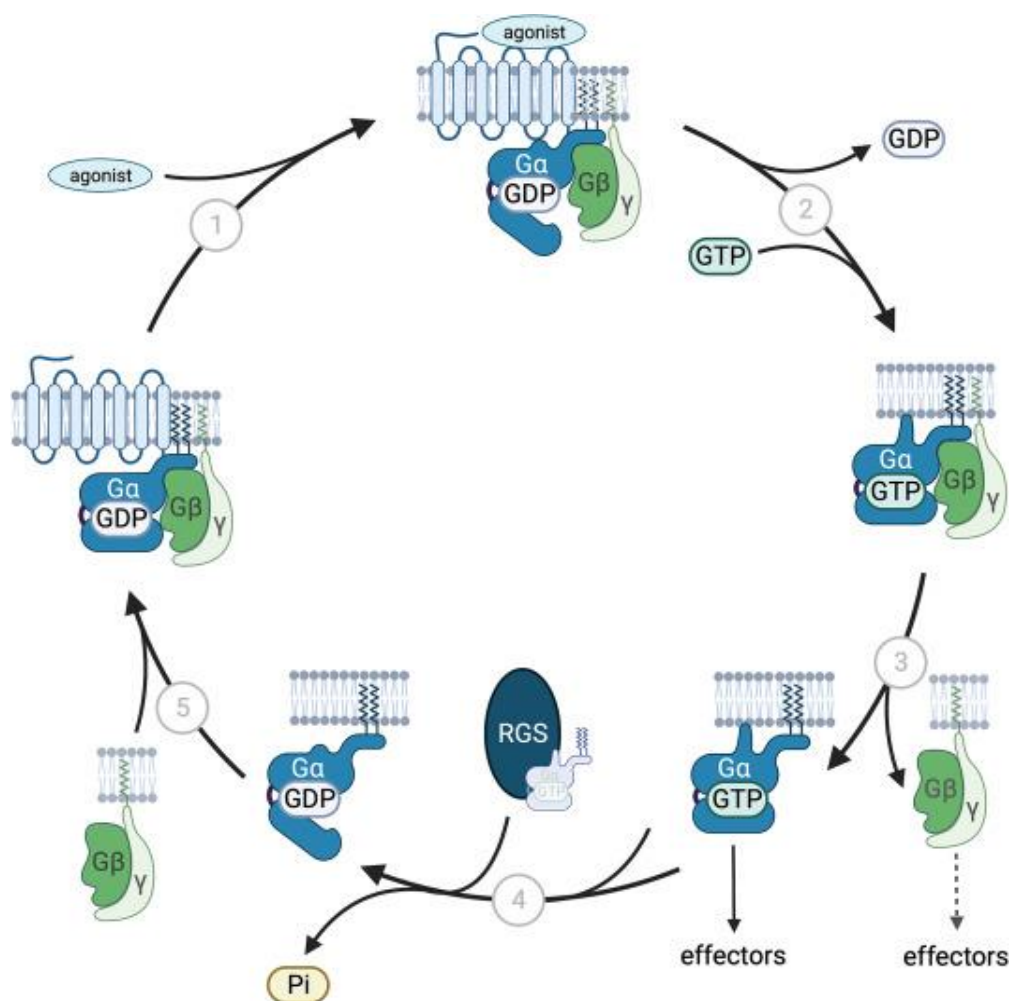
Mitochondrie jsou hlavním místem tvorby superoxidových aniontů, které se vyskytují hlavně v komplexu I a III elektronového transportního řetězce. Produkce superoxidu na komplexu III je ovšem dvakrát vyšší než u komplexu I. Hlavní funkcí komplexu III je přenos elektronů z ubiquinolu na Cyt c, přičemž současně dochází k přesunu protonů přes vnitřní mitochondriální membránu. Tento proces vytváří elektrochemický potenciál, který následně pohání syntézu ATP. Může ale dojít

k úniku elektronů ze semichinonu, meziproductu oxidace ubichinolu, na kyslík a vznikne tak již zmiňovaný superoxid.

Bylo prokázáno, že při mitochondriálním stresu, NGB významně potlačuje aktivitu komplexu III a produkci ROS a tím zabraňuje neurotoxicitě. Jedním z důvodů může být vazba NGB na podjednotku Cyc1, která je součástí komplexu III. Cyc1 se podílí na zajištění efektivního přenosu elektronů v rámci mitochondriálního dýchacího řetězce, a tím přispívá k energetickému metabolismu eukaryotických buněk (Yu *et al*, 2016).

### 1.2.3.3 G-proteiny

Heterotetramerní G-proteiny se skládají ze tří podjednotek –  $\alpha$  podjednotky ( $G\alpha$ ) s GTPázovou aktivitou a  $\beta\gamma$  dimeru ( $G\beta\gamma$ ). Jedná se o proteiny zprostředkovávající signál, tzn. že mají schopnost přenášet informace z některých receptorů. Jejich funkce závisí na vazbě guaninových nukleotidů (GDP/GTP). G-proteinem spřažené receptory (GPCR) jsou aktivovány ligandem, nebo jiným signálem z prostředí, což vede k uvolnění GDP z  $G\alpha$  podjednotky (obr. 7). Na uvolněné místo se následně váže GTP, čímž se  $G\alpha$  podjednotka aktivuje – mění svůj tvar (dochází ke konformační změně) a disociuje se jak od receptoru, tak od  $G\beta\gamma$  dimeru. Obě oddělené složky,  $G\alpha$ -GTP i  $G\beta\gamma$ , pak mohou samostatně regulovat aktivitu různých efektorových molekul, jako jsou fosfolipáza C, adenylátcykláza nebo iontové kanály. Aktivní  $G\alpha$ -GTP je schopna svou činnost ukončit pomocí vlastní GTPázové aktivity, kdy dochází k hydrolýze GTP na GDP a následnému znovuspojení s  $G\beta\gamma$  dimerem do původního neaktivního komplexu (Wakasugi *et al*, 2003).



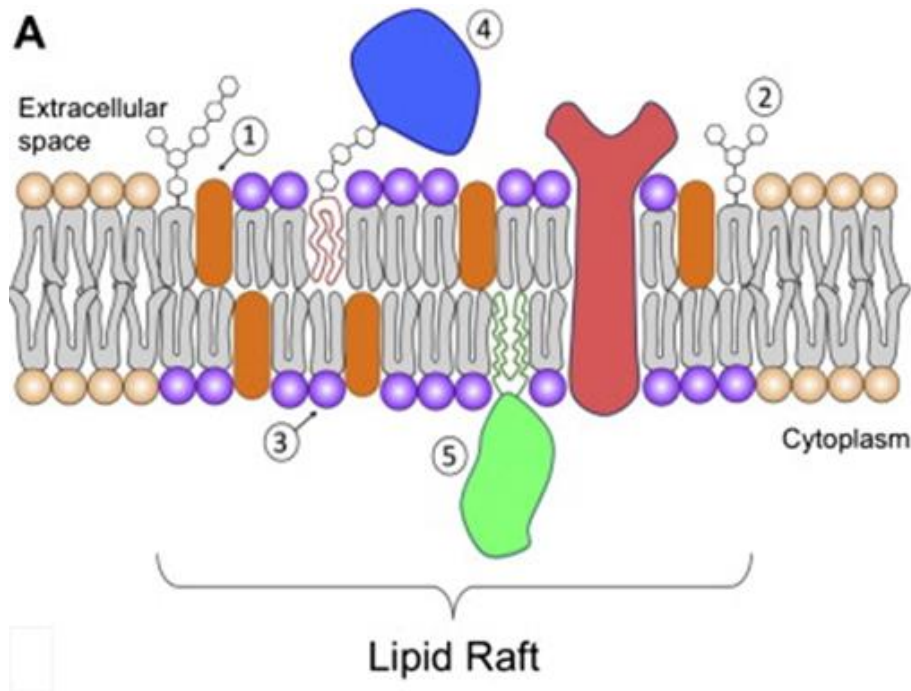
Obrázek 7: Princip cyklu aktivace/inaktivace G-proteinů pomocí GPCR – aktivace po navázání agonisty na receptor dochází k výměně na  $G\alpha$  podjednotce. Aktivovaný  $G\alpha$ -GTP a  $G\beta\gamma$  dimer se oddělí a ovlivňují efekty (Nürnberg et al, 2024).

Aktivitu G-proteinů regulují 3 hlavní skupiny proteinových modulátorů: proteiny aktivující GTPázu (GAP), guaninnukleotidové výměnné faktory (GEF) a inhibitory disociace guaninnukleotidu (GDI). GAP urychlují hydrolýzu GTP na GDP a tím vedou k inaktivaci G-proteinů. GEF podporují uvolnění GDP, což umožňuje navázání GTP a aktivaci G-proteinu. GDI naproti tomu stabilizují vazbu GDP a brání jeho výměně, a tím udrží G-protein v neaktivním stavu (Wakasugi et al, 2003).

Cyklický adenosinmonofosfát (cAMP) je klíčovým druhým poslem v buňkách, který zprostředkovává přenos signálů v odpovědi na různé extracelulární podněty. V nervových buňkách hraje cAMP zásadní roli v regulaci buněčného růstu, přežití neuronů a odpovědi na stresové podmínky. Aktivita cAMP je regulována různými signálními dráhami, přičemž podjednotka  $G_{ai}$ , inhibuje aktivitu adenylátcyklázy, což vede k poklesu hladiny cAMP a ovlivňuje tak tyto buněčné procesy.

V tomto kontextu NGB vykazuje důležitou roli v modulaci hladiny cAMP. NGB působí jako inhibitor GDI pro  $\alpha$ -podjednotky Gi/o proteinů, čímž zabraňuje poklesu cAMP. Tento mechanismus je klíčový pro neuroprotekcii, protože stabilizace cAMP může pomoci chránit neurony před poškozením, například v podmínkách stresu nebo zánětu (Calebiro *et al*, 2009).

Za podmínek oxidačního stresu se NGB přesouvá do lipidových raftů (obr. 8), což jsou specifické struktury (mikrodomény) v plazmatické membráně, které hrají klíčovou roli v organizaci signálních komplexů a interakcích membránových proteinů (Takahashi *et al*, 2016). Vzájemné interakce v membráně mezi lipidy vedou k vytvoření uspořádaných oblastí zvaných lipidové rafty, které mají velikost 10 až 200 nm, a do kterých se shlukují receptory. Toto uspořádání zvyšuje efektivitu jejich aktivace. Tím usnadňují účinnější přenos signálu uvnitř buňky. Rafty obsahují bohaté množství lipidů, jako jsou cholesterol, sfingolipidy a gangliosidy. Narušením lipidových raftů, například odstraněním cholesterolu, inhibicí syntézy sfingolipidů nebo enzymatickým štěpením jejich složek, výrazně ovlivňuje aktivitu receptorů, které jsou na jejich přítomnosti závislé (Nehr-Majoros *et al*, 2025).



Obrázek 8: Lipidový raft – cholesterol (1), glykosfingolipid (2), fosfolipidy s nasyceným uhlovodíkovým řetězcem (3), glykosilfosfatidylový protein (4) a proteiny s posttranslačními modifikacemi (5) (Sebastião *et al*, 2013).

NGB se podílí na signalizaci v rámci lipidových raftů prostřednictvím vazby na membránový protein flotilin-1, který je nezbytný pro vznik těchto mikrodomén. Tento proces má zásadní význam, protože přítomnost NGB v lipidových raftech umožňuje ovlivnit aktivitu G proteinů a modifikovat signální dráhy, které vedou k ochraně neuronů před oxidačním stresem. V tomto prostředí NGB váže GDP-vázanou formu G $\alpha$ i proteinů, čímž inhibuje aktivitu adenylátcyklázy a snižuje hladinu cAMP. Tím přispívá k stabilizaci buněčného prostředí a ochraně před poškozením vyvolaným stresem (Takahashi *et al*, 2016).

## 1.3 Role neuroglobinu v patologických stavech

### 1.3.1 Nádorová onemocnění

Rakovinné buňky často podléhají oxidačnímu stresu, který je důsledkem jejich rychlého metabolismu a zvýšené produkce ROS. Z tohoto důvodu si nádorové buňky vyvinuly adaptační mechanismy, které jim umožňují přežít i v podmínkách nepříznivého redoxního prostředí. Jedním z možných kompenzačních faktorů se ukazuje být NGB (Fiocchetti *et al*, 2014). NGB ovšem může mít u některých typů nádorů i tumor supresorové vlastnosti a tvoří základní obrannou linii proti nekontrolovanému dělení buněk a vzniku nádorů (Zhang *et al*, 2013).

#### 1.3.1.1 Nádory centrální nervové soustavy

Výrazná exprese NGB byla detekována ve vybraných typech mozkových nádorů, přičemž mezi nejvýznamnější patří glioblastomy. V rámci imunohistochemické analýzy lidských nádorových tkání bylo zjištěno, že NGB je přítomen zejména v nádorech s neuroektodermálním původem. V případě mozkových nádorů je exprese NGB poměrně konzistentní a silná zejména u glioblastoma multiform, kde může plnit ochrannou roli vůči hypoxii a oxidačnímu stresu. NGB se může podílet na udržení buněčné viability, a to díky své schopnosti vázat kyslík a účinkovat jako ROS scavenger (Emara *et al*, 2010). Gliom představuje jednu z nejčastějších malignit centrálního nervového systému (CNS), s charakteristickou nepříznivou prognózou a častou recidivou. I přes pokroky v neurochirurgii, radioterapii a chemoterapii zůstává léčba pokročilého gliomu omezená, přičemž molekulární mechanismy jeho vzniku a progresu stále nejsou plně objasněny (Zhang *et al*, 2017).

U jiných typů nádorů CNS, jako jsou meningeomy, byla exprese NGB nevýznamná nebo úplně chyběla. To opět podporuje hypotézu, že exprese NGB je charakteristická především pro nádory neuroektodermálního původu. Dále bylo zjištěno, že exprese NGB v glioblastomech je výrazně vyšší než v nízké maligních gliomech nebo v normálních mozkových tkáních. Vysoká exprese NGB by mohla odrážet adaptační schopnosti zvláště agresivních nádorových buněk, což naznačuje možnou souvislost mezi hladinou jeho exprese a stupněm malignity nádoru. Tento jev může být využit jako potenciální biomarker agresivity nádoru nebo dokonce jako cíl terapeutického zásahu.

V rámci srovnání lze uvést, že cytoglobin, jiný člen metaloproteinů, vykazuje v nádorových mozkových tkáních výrazně odlišný profil exprese, který je spíše sporadický a méně specifický pro nádory CNS. Tento rozdíl dále potvrzuje unikátní roli NGB v patofyziologii mozkových nádorů (Emara *et al*, 2010).

### 1.3.1.2 Karcinom prsu a plic

Kromě nádorů mozku byla exprese NGB detekována také v některých nádorových typech mimo CNS, zejména v adenokarcinomech plic a prsu (Emara *et al*, 2010). Rakovina prsu je celosvětově nejčastěji diagnostikovaným zhoubným onemocněním u žen, s odhadovaným počtem 2,3 milionu nových případů v roce 2020, což odpovídá přibližně 11,3 % všech nově zjištěných nádorových onemocnění. Z těchto případů tvoří přibližně 79 % nádory, které exprimují estrogenový receptor  $\alpha$  (ER $\alpha$ ), což z této podskupiny činí nejčastější molekulární typ karcinomu prsu (Fernandez *et al*, 2021). ER $\alpha$ , který je hojně exprimován v hormonálně závislých nádorech prsu, hraje klíčovou roli při regulaci exprese NGB prostřednictvím působení hormonu 17 $\beta$ -estradiolu (E2). E2 indukuje translaci NGB a zároveň podporuje jeho relokaci z cytoplazmy do mitochondrií. Právě mitochondriální lokalizace NGB pomáhá přežití nádorových buněk. Tento vztah může mít důsledky nejen pro pochopení hormonálně řízené buněčné rezistence, ale i pro vývoj cílené léčby, která by mohla narušit ochrannou osu NGB–ER $\alpha$  a tím zvýšit účinnost protinádorové terapie (Fiocchetti *et al*, 2016). V souladu s klíčovou úlohou ER $\alpha$  při vývoji a progresi rakoviny prsu je v klinické praxi široce využívána endokrinní terapie, která se zaměřuje buď na inhibici syntézy estrogenů pomocí inhibitorů aromatázy, nebo na blokádu estrogenového receptoru prostřednictvím antagonistů, jako je tamoxifen či fulvestrant. Přesto však vysoké procento ER $\alpha$ -pozitivních karcinomů prsu (30 až 40 %) vykazuje získanou rezistenci vůči těmto léčivům. To zdůrazňuje potřebu identifikace nových terapeutických cílů, jako například zmiňované narušení mechanismů zprostředkovaných NGB (Fernandez *et al*, 2021).

Přestože intenzita exprese NGB v plicních nádorech není tak vysoká jako u glioblastomů, u některých vzorků nemalobuněčného karcinomu plic byla detekována slabá až střední pozitivita NGB. Uvnitř nádorové tkáně často vzniká hypoxie kvůli nedostatečnému cévnímu zásobení. Expese NGB se v takových podmínkách zvyšuje, pomáhá nádorovým buňkám přežít nízký parciální tlak kyslíku

tím, že tlumí oxidační stres. Tím může nepřímo přispívat k odolnosti nádoru vůči nepříznivému mikroprostředí (Oleksiewicz *et al*, 2011).

### **1.3.1.3 Hepatocelulární karcinom**

Hepatocelulární karcinom (HCC) je nejčastější primární zhoubný nádor jater a patří mezi malignity s velmi nepříznivou prognózou, především kvůli častému pozdnímu záchytu. Většina případů je diagnostikována až v pokročilém stádiu, kdy jsou možnosti kurativního zásahu, jako je chirurgická resekce, výrazně omezené (Zhang *et al*, 2024). Mezi klíčové patofyziologické mechanismy tohoto onemocnění patří chronická hypoxie, oxidační stres a poruchy intracelulární signalizace, které narušují rovnováhu mezi proliferací a apoptózou (Zhang *et al*, 2013).

Jedním z hlavních signálních systémů, jehož nadměrná aktivita je v HCC běžná, je dráha RAF/MEK/ERK. Aktivace této kaskády vede k podpoře buněčného růstu, přežití a migrace, a její abnormální aktivita bývá spojována se zvýšenou invazivitou nádorových buněk a tendencí tvořit metastázy (Zhou *et al*, 2023).

V souvislosti s tímto mechanismem byl u pacientů s HCC pozorován výrazný pokles hladin NGB ve srovnání se zdravou jaterní tkání. Jeho snížená exprese koreluje s vyšší proliferací a aktivitou nádorových buněk a jejich schopností vytvářet nová nádorová ložiska. Naproti tomu obnovení exprese NGB vedlo ke zpomalení buněčného cyklu, omezení množení nádorových buněk a celkovému útlumu nádorového růstu. Tento účinek je úzce spojen s inhibicí dráhy RAF/MEK/ERK, jejíž aktivita je v přítomnosti vyšších hladin NGB výrazně omezena. Kromě přímého antiproliferačního působení se tím zároveň zvyšuje citlivost nádorových buněk vůči dalším terapeutickým zásahům. Snížená exprese NGB tedy neznamena jen pasivní nedostatek ochranné molekuly, ale aktivně přispívá k progresi nádoru prostřednictvím narušení regulačních mechanismů buněčného růstu (Zhang *et al*, 2013).

### **1.3.1.4 Kolorektální karcinom**

Kolorektální karcinom (CRC) je třetím nejrozšířenějším nádorem na světě. Odhaduje se, že globální zátěž CRC se do roku 2030 zvýší na více než 2,2 milionu nových případů a 1,1 milionu úmrtí ročně. Pětiletá míra přežití pacientů s metastatickým karcinomem tlustého střeva je pouze 14 % (Xue *et al*, 2023).

V kontextu CRC se NGB jeví jako slibný tumor-supresorový faktor. Jeho exprese je v nádorové tkáni výrazně snížena ve srovnání se zdravým střevním epitelem, přičemž tento pokles je výsledkem epigenetické regulace, konkrétně hypermetylace promotorové oblasti genu pro NGB, což vede k potlačení jeho transkripce. Klinicky byl tento jev spojen s vyšší agresivitou nádoru, větší pravděpodobností vzniku jaterních metastáz a celkově horší prognózou.

Na buněčných liniích Caco-2 a HCT116 bylo experimentálně dokázáno, že umělé zvýšení exprese NGB v nádorových buňkách CRC vede ke zpomalení nebo zastavení buněčného cyklu ve fázi G2 nebo ve fázi M, zvýšené náchylnosti k apoptóze a potlačení invazivního chování. Zásadní úlohu v protinádorovém působení NGB hraje i jeho schopnost narušit angiogenezi, což je proces tvorby nových cév, který je nezbytný pro zásobení rostoucího nádoru kyslíkem a živinami. Tento efekt je zprostředkován utlumením aktivity proteinu GPR35, klíčového regulátoru angiogenního prostředí. Vysoká exprese NGB narušuje funkci tohoto proteinu, čímž dochází k omezení cévního zásobení nádoru. To vede ke zhoršeným podmínkám pro přežívání nádorových buněk a omezení jejich schopnosti tvořit metastázy (Xiang *et al*, 2023).

Na druhé straně však role NGB není v tomto případě jednoznačně protinádorová, jelikož v buněčné linii DLD-1 (lidský kolorektální adenokarcinom) bylo prokázáno, že E2 prostřednictvím receptoru ER $\beta$  zvyšuje hladiny NGB obdobným způsobem, jaký byl popsán u nádorových buněk prsu. I zde dochází k posttranskripční regulaci a následné ochraně buněk před apoptózou. Tento ochranný účinek je zvláště patrný za přítomnosti oxidačního stresu, jaký vzniká např. během chronického zánětu nebo infekce, kdy jsou aktivovány makrofágy a neutrofily produkující ROS.

U premenopauzálních žen bývá vyšší hladina E2 spojena s nižším rizikem vzniku CRC, zatímco při pokročilé nádorové progresi a dlouhodobé zánětlivé zátěži může stejný hormon přispívat ke zvýšení odolnosti nádorových buněk vůči apoptóze. Tento paradox odráží komplexní úlohu NGB, jehož funkce se může měnit v závislosti na hormonálním, oxidačním i epigenetickém kontextu nádoru (Fiocchetti *et al*, 2015).

### 1.3.1.5 Karcinom slinivky břišní

Rakovina slinivky břišní představuje jednu z nejagresivnějších forem nádorového onemocnění a je čtvrtou nejčastější příčinou úmrtí na rakovinu celosvětově. Prognóza pacientů zůstává velmi nepříznivá, přičemž pětileté přežití dosahuje pouze 11 % (Wu *et al*, 2023). Včasná detekce preinvazivních lézí a identifikace molekulárních terapeutických cílů proto představují klíčovou příležitost k prodloužení přežití pacientů. Ačkoli screening není v současnosti doporučován pro běžnou populaci, nově se ukazuje, že sledování slinivky břišní může zlepšit prognózu u vybraných vysoce rizikových skupin. Změny v epidemiologii tohoto onemocnění, nové zkušenosti s monitorováním a objev nadějných biomarkerů poskytují základ pro efektivnější hodnocení rizika, časnou detekci i prevenci (Stoffel *et al*, 2023).

Jedním z významných molekulárních cílů v léčbě rakoviny slinivky je receptor epidermálního růstového faktoru (EGFR), který patří do rodiny tyrozinkinázových receptorů erb-B a hraje zásadní roli v regulaci růstu a šíření nádorových buněk. Nadměrná exprese EGFR byla detekována u 30–89 % případů karcinomu pankreatu a bývá spojována s pokročilejšími stádii onemocnění, metastázami a nepříznivou prognózou. Přestože se EGFR jeví jako atraktivní terapeutický cíl, vysoká míra vrozené nebo získané rezistence snižuje účinnost EGFR inhibitorů v klinické praxi. Kombinované přístupy cílící zároveň na dráhy EGFR a RAS však v preklinických studiích přinášejí povzbudivé výsledky (Zhou *et al*, 2017).

Novější poznatky naznačují, že svou roli v regulaci těchto signálních drah může sehrávat i NGB. Bioinformatické analýzy poukázaly na zapojení NGB v signálních drahách spojených s G proteinem, cGMP/cAMP i MAPK, a také na jeho interakci s dalšími klíčovými proteiny. V experimentálním modelu rakoviny slinivky bylo prokázáno, že NGB snižuje hladiny GNAI1, což je inhibiční podjednotka Gai komplexu a současně tlumí expresi EGFR a jeho fosforylovaných forem, čímž přispívá k omezení růstu a metastazování nádorových buněk slinivky břišní (Wu *et al*, 2023).

### 1.3.2 Role v neurodegenerativních onemocněních

V západních společnostech je vyšší délka života korelována se zvýšeným výskytem neurodegenerativních onemocnění. Slibnou terapeutickou strategií pro oddálení nebo prevenci nástupu by mohlo být obnovení neuroprotektivních drah

fyziologicky spouštěných neuronů proti stresovému poškození (Cracco *et al*, 2023). Přesný mechanismus, kterým NGB zajišťuje svou neuroprotektivní funkci u onemocnění CNS, dosud není u některých onemocnění plně objasněn. V posledních letech však přibývá důkazů potvrzujících jeho antiapoptický účinek, a to zejména v souvislosti s neurodegenerativními onemocněními (Li *et al*, 2016).

### 1.3.2.1 Huntingtonova choroba

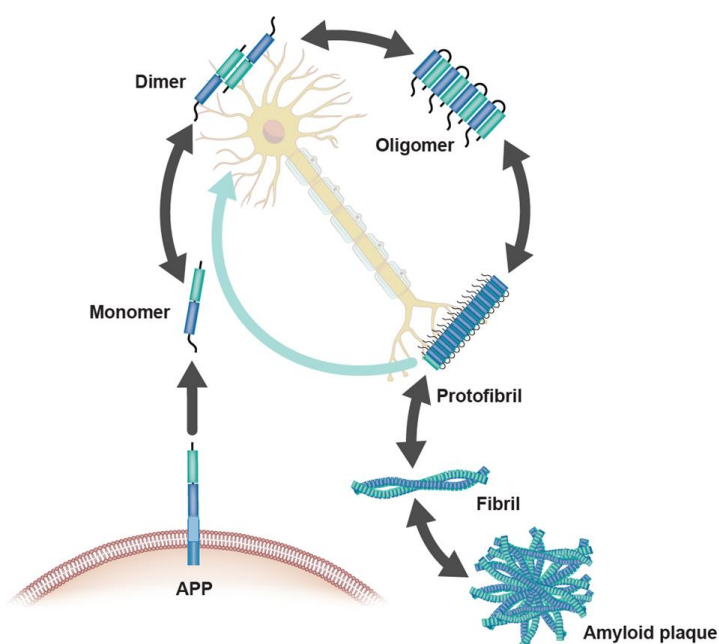
Huntingtonova choroba (HD) je autozomálně dominantní dědičné onemocnění, které je charakterizováno postupnou ztrátou neuronů v různých oblastech CNS. Jedná se o neurodegenerativní poruchu, jejímž klinickým obrazem jsou především motorické poruchy, kognitivní deficit a psychiatrické symptomy. Mezi hlavní neuropatologické znaky patří postupné odumírání neuronů ve striatu a související kortikální dysfunkce. Příčinou onemocnění je mutace v genu pro protein huntingtin (HTT), která vede k tvorbě patologických polyglutaminových agregátů (polyQ) lokalizovaných v jádrech neuronů. V současnosti je dostupná pouze symptomatická léčba, která zmírňuje projevy nemoci, avšak neovlivňuje její progresi (Cardinale *et al*, 2018). Studie *in vitro* ukázaly, že HTT má ochranný účinek v neuronálních buňkách vystavených různým apoptotickým podnětům, včetně deprivace séra a mitochondriálních toxinů (Nuzzo *et al*, 2017).

E2 je silný neurotrofický faktor, který ovlivňuje vývoj a přežití neuronů, stejně jako růst dendritických buněk a tvorbu synapsí. E2 navíc vykazuje neuroprotektici proti neuronální smrti vyvolané  $\beta$ -amyloidem, glutamátovou toxicitou a oxidačním stresem. E2 chrání zejména neurony před apoptózou snížením produkce reaktivních forem dusíku a ROS, inhibicí neurotoxických účinků oxidovaných lipoproteinů s nízkou hustotou a glutamátu, udržováním homeostázy  $Ca^{2+}$  (Cardinale *et al*, 2018). U buněk exprimujících normální formu HTT bylo zjištěno, že E2 stimuluje tvorbu komplexu mezi NGB a HTT a tím dochází k inhibici apoptózy. Naproti tomu v přítomnosti mutovaného huntingtinu (mHTT), typického pro HD, je tato ochranná dráha narušena, tzn. že E2 nezvyšuje hladiny NGB ani jeho lokalizaci do mitochondrií. Navíc mHTT snižuje odpověď buněk na E2 a brání aktivaci NGB jako antiapoptotického proteinu (Nuzzo *et al*, 2017).

### 1.3.2.2 Alzheimerova choroba

Alzheimerova choroba (AD) je nejčastějším chronickým neurodegenerativním onemocněním, které postihuje převážně starší populaci. Klinicky se projevuje postupným úbytkem kognitivních funkcí a poruchami schopnosti učení. Mezi tři hlavní neuropatologické znaky AD patří tvorba amyloidních plaků, vznik neurofibrilárních klubek a úbytek neuronů. Za hlavní mechanismus vedoucí ke ztrátě nervových buněk je považována neuronální apoptóza.

Nadměrné hromadění  $\beta$ -amyloidu ( $A\beta$ ) je nejen společný důsledek různých patologických procesů spojených s AD, ale také je to klíčový faktor, který přispívá k apoptóze neuronů a následnému rozvoji kognitivních poruch (Li *et al*, 2016). Peptid  $A\beta$  se vyskytuje v několika strukturálních formách – jako monomery, rozpustné agregáty různé velikosti (např. oligomery a protofibrily) a jako nerozpustné fibrily, které tvoří amyloidní plaky (obr. 9). Z hlediska neurotoxicity jsou nejvíce škodlivé právě rozpustné agregáty protofibrily, které významně přispívají k patologickým změnám typickým pro AD. Bylo prokázáno, že tyto rozpustné formy  $A\beta$  jsou toxičtější než jejich monomerní podoba či nerozpustné fibrily (Söderberg *et al*, 2023). Toxicita  $A\beta$  stimuluje štěpení prekursorového amyloidového proteinu (APP) prostřednictvím kaspáz, čímž dochází ke zvýšení produkce neurotoxických forem  $A\beta$  a současně k prohlubování apoptotického poškození neuronů.



Obrázek 9: Formování  $\beta$ -amyloidu – agregační formy  $A\beta$  mohou existovat jako monomery, dimery, oligomery, protofibrily, fibrily a amyloidní plaky (Hampel *et al*, 2021).

Na základě těchto zjištění se předpokládá, že inhibice aktivity kaspáz by mohla nejen omezit tvorbu A $\beta$ , ale zároveň zabránit apoptóze neuronálních buněk, což z ní činí další potenciální směr v léčbě AD (de Vidania *et al*, 2020).

Některé experimentální studie na myších modelech ukázaly, že hladina NGB v mozkové tkáni může s věkem stoupat, a to paralelně se zvyšující koncentrací A $\beta_{42}$ . Nicméně ochranná kapacita je v pozdějších stádiích onemocnění pravděpodobně vyčerpána nebo narušena, což přispívá k progresivní ztrátě neuronů a rozvoji klinických příznaků (Li *et al*, 2016).

### 1.3.2.3 Parkinsonova choroba

Parkinsonova choroba (PD) je druhým nejčastějším neurodegenerativním onemocněním a způsobuje progresivně se zhoršující ztrátu motorických funkcí. Na vzniku a progresi PD se podílí řada etiologických faktorů, mezi které patří zděděné genetické mutace, mitochondriální dysfunkce, zhoršená imunitní odpověď, abnormální dráhy lysozomální autofagie a expozice toxinům z prostředí. Mitochondriální dysfunkce patří mezi klíčové mechanismy podílející se na rozvoji PD. Zejména narušení funkce komplexu I v elektronovém transportním řetězci. Dlouhodobé poškození mitochondrií a jejich nedostatečná obnova přispívají k úbytku dopaminergních neuronů, což se klinicky projevuje motorickými i nemotorickými symptomy typickými pro PD.

NGB má schopnost stabilizovat mitochondriální membránový potenciál, zlepšovat poměr NAD<sup>+</sup>/NADH a snižovat oxidační stres. Mechanisticky NGB interaguje s podjednotkou komplexu I NDUFA10, čímž přispívá k udržení mitochondriálních funkcí a inhibici mitochondriální apoptózy. Tyto poznatky naznačují, že NGB by mohl představovat potenciální terapeutický cíl při léčbě neurodegenerativních onemocnění, jako je právě PD (Liang *et al*, 2020).

Přeměna dusitanu (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) probíhá prostřednictvím hemoproteinů, jako jsou HGB, MGB ale i NGB, a vzniká tak oxid dusnatý (NO), který má neuroprotektivní roli. NO se totiž podílí na reverzibilní S-nitrosaci cysteinových zbytků v komplexu I. Tato úprava zabraňuje nevratnému oxidačnímu poškození a zajišťuje ochranu mitochondriální funkce. Kromě ochrany komplexu I přispívá NGB (prostřednictvím NO) také k aktivaci antioxidantní signální dráhy Nrf2. Aktivovaný transkripční faktor Nrf2 podporuje expresi genů zapojených do buněčné obrany proti oxidačnímu stresu.

Podáváním dusitanu by se mohlo docílit zpomalení progresu onemocnění i v pokročilejších stádiích (Milanese *et al*, 2018).

### **1.3.3 Role při ischemickém poškození**

Sítnice i mozek jsou velmi citlivé na hypoxickou ischemii (Schi *et al*, 2011). Cévní mozková příhoda (CMP) představuje celosvětový zdravotní a sociální problém. Výrazně přispívá ke zkrácení délky života a zhoršuje jeho kvalitu. Nejčastějším typem CMP je ischemická forma, která tvoří přibližně 80–85 % případů (Peinado *et al*, 2021). Ischemické poškození je také klíčovým mechanismem poškození sítnice a významně se podílí na patogenezi řady očních onemocnění, jako jsou retinální cévní okluze, diabetická retinopatie, ischemická optická neuropatie či glaukom. Zároveň představuje častou příčinu zrakového postižení a slepoty (Chan *et al*, 2012).

#### **1.3.3.1 Cévní mozková příhoda**

Vzniká v důsledku ucpání nebo zúžení mozkové tepny, jež omezují přívod kyslíku a živin do mozkové tkáně a vedou k poškození či smrti neuronů. Typicky bývá postižena oblast zásobovaná střední mozkovou tepnou, včetně parietální kůry a striata (Peinado *et al*, 2021). Při ischemii mozku se postižené místo dělí na dvě hlavní zóny: ischemické jádro, kde je průtok krve natolik snížený, že buňky rychle odumírají, a okolní oblast zvanou penumbra. V penumbře je průtok krve sice omezený, ale částečně zachovaný, takže nervové buňky zde mohou po určitou dobu přežívat a jsou potenciálně zachránitelné. Po obnovení průtoku krve po CMP se však může rozvinout sekundární ischemicko-reperfuční poškození, které dále zhoršuje stav tkáně. K tomuto poškození dochází v důsledku zvýšené produkce ROS, reaktivních forem dusíku, poruchy mitochondrií, ztráty iontové homeostázy a energetického vyčerpání. Tyto děje vedou k otoku buněk, narušení membránové integrity a nevratné neuronální smrti, a to především v ischemickém jádru. Výsledkem je narušení axonální sítě a funkčních okruhů, což může vyústit v trvalé neurologické postižení (Kim *et al*, 2021).

Terapeutický zásah je neúčinnější, pokud je zahájen co nejdříve po vzniku CMP. Mezi současné možnosti patří trombolýza a mechanická trombektomie, které však mají omezené využití a nesou rizika. Proto se hledají nové strategie, které by nejen obnovily perfuzi, ale také podpořily přežití neuronů v penumbrální oblasti.

Mezi zkoumané přístupy patří například regulace oxidačního stresu, potlačení zánětlivých kaskád, inhibice apoptózy a stimulace neurogeneze a synaptogeneze.

NGB je momentálně považován za slibný cíl pro neuroprotektivní terapii. Jeho zvýšená exprese může zmírnit negativní dopady přechodné fokální ischemie (Peinado *et al*, 2021). NGB nefunguje pouze jako ochranný faktor proti poškození neuronů během ischemicko-reperfuzního inzultu, ale zároveň podporuje regeneraci axonů v postižené mozkové tkáni. Zvýšení jeho hladin v oblasti infarktu tak představuje potenciálně účinný terapeutický přístup (Xiong *et al*, 2018).

Hematoencefalická bariéra představuje důležitou ochrannou strukturu mozku, která reguluje průnik látek mezi krví a nervovou tkání. Na jejím udržování se podílejí především endotelové buňky a pericyty. Tyto buňky nejen zajišťují stabilitu bariéry, ale během ischemie také reagují na stres. Produkují ROS a uvolňují ochranné signální molekuly, které podporují přežití okolních buněk (Kim *et al*, 2022). Přímé podání NGB do mozku však komplikuje přítomnost této bariéry. I když je hematoencefalická bariéra po ischemii částečně narušena, stále brání snadnému průniku léčiv do mozkové tkáně. Za tímto účelem byly vyvinuty například hyaluronátové nanočástice, které umožňují efektivní transport NGB do mozku. Tyto nanočástice dosáhly cílové mozkové oblasti a po 24 hodinách byly mikroskopicky detekovány v neuronech (Peinado *et al*, 2021).

Kromě přímé terapie se zkoumá také využití NGB jako biomarkeru. Díky své detekovatelnosti v periferní krvi by mohl sloužit jako cenově dostupný a praktický nástroj pro hodnocení prognózy a vedení léčby u pacientů po CMP (Ramli *et al*, 2024).

### **1.3.3.2 Retinální ischemie**

Sítnice je tkáň s mimořádně vysokými metabolickými nároky. Je tvořena různými typy buněk, jejichž správná funkce závisí na nepřetržitém přísunu kyslíku a živin. K udržení své homeostázy proto potřebuje stabilní a dostatečné krevní zásobení. Pokud dojde k jeho narušení, může vzniknout ischemicko-reperfuzní poškození. Tento proces hraje klíčovou roli v rozvoji glaukomu. Dochází při něm k náhlému omezení krevního průtoku, které je následováno jeho rychlým obnovením. Prudké změny v dodávce kyslíku a živin způsobují oxidační stres, aktivaci zánětlivých procesů a odumírání retinálních gangliových buněk. To významně přispívá ke zhoršení zrakové funkce.

Součástí tohoto poškození jsou také změny v lipidovém metabolismu. Lipidy jsou pro sítnici nezbytné – podílejí se na stavbě buněčných membrán, zajišťují energetický metabolismus, umožňují buněčnou signalizaci a ovlivňují zánětlivé reakce. Při ischemicko-reperfučním poškození může dojít k narušení jejich rovnováhy. Výsledkem je ztráta buněčné integrity, tvorba lipidových kapiček a poškození mitochondrií (Wu *et al*, 2023).

V sítnici je NGB exprimován v koncentraci stokrát vyšší než v mozku (Chan *et al*, 2012). Největší spotřeba kyslíku v sítnici se nachází v oblastech s vysokou metabolickou aktivitou, zejména ve vnitřních segmentech fotoreceptorových buněk, plexiformních vrstvách a vrstvě gangliových buněk. Právě v těchto strukturách byly zaznamenány také vysoké koncentrace NGB. Za fyziologických podmínek se NGB vyskytuje výhradně v neuronech sítnice, zatímco v pigmentovém epitelu ani v jiných očních buňkách není přítomen.

Při akutním narušení okysličení, například v důsledku prudkého zvýšení nitroočního tlaku, dochází k ischemii sítnice. V reakci na tuto zátěž se výrazně zvyšuje exprese NGB. Tento jev ukazuje, že NGB reaguje na změny v dostupnosti kyslíku a může být součástí ochranných mechanismů sítnice. Zajišťuje transport kyslíku k nervovým buňkám v době jeho nedostatku a zároveň funguje jako jeho dočasná zásobárna. Uvolňování kyslíku z NGB může oddálit buněčnou smrt a zvýšit odolnost neuronů vůči poškození způsobenému hypoxií. Tento mechanismus je nejvýznamnější v akutní fázi ischemie, kdy je přísun kyslíku zcela přerušeno, a právě zvýšený NGB může pomoci zmírnit energetický deficit a ochránit retinální gangliové buňky před nevratným poškozením (Shi *et al*, 2011).

## 2 ZÁVĚR

Tato bakalářská práce se zabývala neuroglobinem, specifickým členem metaloproteinů, který se vyskytuje převážně v nervové tkáni. Cílem bylo popsat jeho strukturu, funkci a význam v lidském organismu, a to jak za fyziologických, tak patologických podmínek.

V teoretické části byly nejprve představeny základní informace o metaloproteinech a jejich významu, včetně hemu jakožto metaloporfyrinové složky a globinu, jako proteinové složky. Dále byla popsána struktura samotného neuroglobinu, včetně specifík, jako je hexakoordinace železa, vnitřní dutiny a možnosti migrace ligandů, které úzce souvisí s vlastnostmi neuroglobinu. Pozornost byla věnována také jeho ochranné funkci v nervových buňkách, a to zejména působení proti apoptóze, oxidačnímu stresu a interakci s G-proteiny.

V další části práce byla shrnuta role neuroglobinu v patologických stavech. Byla popsána jeho úloha v různých typech nádorů, neurodegenerativních onemocněních a při ischemickém poškození.

U nádorových onemocnění vykazuje neuroglobin dvojí chování v závislosti na konkrétním typu nádoru. V glioblastomu, karcinomu prsu a nemalobuněčném karcinomu plic má neuroglobin cytoprotektivní účinek, který podporuje přežití nádorových buněk v hypoxickém prostředí, což může napomáhat růstu nádoru a jeho rezistenci vůči léčbě. Naopak v případě hepatocelulárního karcinomu a karcinomu slinivky břišní, vysoká exprese neuroglobinu může působit tumor-supresivně. Snižuje cévní zásobení nádoru a tím omezuje jeho růst i schopnost vytvářet metastázy. U kolorektálního karcinomu, může neuroglobin zastávat obě tyto role.

V případě neurodegenerativních onemocnění, jako je Alzheimerova choroba, Parkinsonova choroba a Huntingtonova choroba, převažuje neuroprotektivní funkce neuroglobinu. Pomáhá chránit neurony před apoptózou, snižuje oxidační stres a tím může zpomalovat průběh degenerativních změn v mozku.

Při ischemickém poškození, jako je cévní mozková příhoda nebo retinální ischemie, hraje neuroglobin převážně ochrannou roli, kdy přispívá k přežití neuronů v důsledku nedostatku kyslíku. Pomáhá stabilizovat buněčné prostředí, omezuje oxidační stres a zvyšuje odolnost buněk vůči apoptóze.

Neuroglobin lze považovat za potenciální biomarker a také možný cíl pro budoucí terapeutické přístupy. Jeho přesná úloha však stále není plně objasněna a je potřeba dalších výzkumů.

### 3 POUŽITÁ LITERATURA

Ascenzi P., di Masi A., Leboffe L., Fiocchetti M., et al.: Neuroglobin: From structure to function in health and disease. *Mol Aspects Med.* 2016; 52:1-48. doi:10.1016/j.mam.2016.10.004.

Bank A.: Regulation of human fetal hemoglobin: new players, new complexities. *Blood.* 2006; 107(2):435-443. doi:10.1182/blood-2005-05-2113.

Bashford D., Chothia C., Lesk A.M.: Determinants of a protein fold. Unique features of the globin amino acid sequences. *J Mol Biol.* 1987; 196(1):199-216. doi:10.1016/0022-2836(87)90521-3.

Boron I., Capece L., Pennacchiotti F., Wetzler D.E., et al.: Engineered chimeras reveal the structural basis of hexacoordination in globins: a case study of neuroglobin and myoglobin. *Biochim Biophys Acta.* 2015; 1850(1):169-177. doi:10.1016/j.bbagen.2014.10.006.

Burmester T., Weich B., Reinhardt S., Hankeln T.: A vertebrate globin expressed in the brain. *Nature.* 2000; 407(6803):520-523. doi:10.1038/35035093.

Calebiro D., Nikolaev V. O., Gagliani M. C., de Filippis T., et al.: Persistent cAMP-signals triggered by internalized G-protein-coupled receptors. *PLoS Biol.* 2009; 7(8):e1000172. doi:10.1371/journal.pbio.1000172.

Cardinale A., Fusco F. R., Paldino E., Marino M., et al.: Localization of neuroglobin in the brain of R6/2 mouse model of Huntington's disease. *Neurol Sci.* 2018; 39(2):275-285. doi:10.1007/s10072-017-3168-2.

Chan A. S., Saraswathy S., Rehak M., Ueki M., et al.: Neuroglobin protection in retinal ischemia. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2012; 53(2):704-711. doi:10.1167/iovs.11-7408.

Colloc'h N., Carpentier P., Montemiglio L. C., Vallone B.: Mapping Hydrophobic Tunnels and Cavities in Neuroglobin with Noble Gas under Pressure. *Biophys J.* 2017; 113(10):2199-2206. doi:10.1016/j.bpj.2017.10.014.

- Colloc'h N., Sacquin-Mora S., Avella G., Dhaussy A., et al.: Determinants of neuroglobin plasticity highlighted by joint coarse-grained simulations and high pressure crystallography. *Sci Rep.* 2017; 7(1):1858. doi:10.1038/s41598-017-02097-1.
- Cracco P., Montalesi E., Parente M., Cipolletti M., et al.: A Novel Resveratrol-Induced Pathway Increases Neuron-Derived Cell Resilience against Oxidative Stress. *Int J Mol Sci.* 2023; 24(6):5903. doi:10.3390/ijms24065903.
- de Vidania S., Palomares-Perez I., Frank-García A., Saito T., et al.: Prodromal Alzheimer's Disease: Constitutive Upregulation of Neuroglobin Prevents the Initiation of Alzheimer's Pathology. *Front Neurosci.* 2020; 14:562581. doi:10.3389/fnins.2020.562581.
- Emara M., Turner A. R., Allalunis-Turner J.: Hypoxic regulation of cytoglobin and neuroglobin expression in human normal and tumor tissues. *Cancer Cell Int.* 2010; 10:33. doi:10.1186/1475-2867-10-33.
- Engelking L. R.: Chapter 32 - Heme Biosynthesis, Textbook of Veterinary Physiological Chemistry (Third Edition). 2015; 195-201.
- Exertier C., Milazzo L., Freda I., Montemiglio L. C., et al.: Proximal and distal control for ligand binding in neuroglobin: role of the CD loop and evidence for His64 gating. *Sci Rep.* 2019; 9(1):5326. doi:10.1038/s41598-019-41780-3.
- Exertier C., Montemiglio L. C., Freda I., Gugole E., et al.: Neuroglobin, clues to function and mechanism. *Mol Aspects Med.* 2022; 84:101055. doi:10.1016/j.mam.2021.101055.
- Fernandez S. V., Fiocchetti M., Cipolletti M., Segatto M., et al.: Neuroglobin: A New Possible Marker of Estrogen-Responsive Breast Cancer. *Cells.* 2021; 10(8):1986. doi:10.3390/cells10081986.
- Fiocchetti M., Camilli G., Acconcia F., Leone S., et al.: ER $\beta$ -dependent neuroglobin up-regulation impairs 17 $\beta$ -estradiol-induced apoptosis in DLD-1 colon cancer cells upon oxidative stress injury. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2015; 149:128-137. doi:10.1016/j.jsbmb.2015.02.005.

- Fiocchetti M., Cipolletti M., Leone S., Naldini A., et al.: Neuroglobin in Breast Cancer Cells: Effect of Hypoxia and Oxidative Stress on Protein Level, Localization, and Anti-Apoptotic Function. *PLoS One*. 2016; 11(5):e0154959. doi:10.1371/journal.pone.0154959.
- Fiocchetti M., Nuzzo M. T., Totta P., Acconcia F., et al.: Neuroglobin, a pro-survival player in estrogen receptor  $\alpha$ -positive cancer cells. *Cell Death Dis*. 2014; 5(10):e1449. doi:10.1038/cddis.2014.418.
- Guidolin D., Tortorella C., Marcoli M., Maura G., et al.: Neuroglobin, a Factor Playing for Nerve Cell Survival. *Int J Mol Sci*. 2016; 17(11):1817. doi:10.3390/ijms17111817.
- Hampel H., Hardy J., Blennow K., Chen C., et al.: The Amyloid- $\beta$  Pathway in Alzheimer's Disease. *Mol Psychiatry*. 2021; 26(10):5481-5503. doi:10.1038/s41380-021-01249-0.
- Hardison R.C.: Evolution of hemoglobin and its genes. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2012; 2(12):a011627. doi:10.1101/cshperspect.a011627.
- Ilangovan G., Khaleel S. A., Kundu T., Hemann C., et al.: Defining the reducing system of the NO dioxygenase cytoglobin in vascular smooth muscle cells and its critical role in regulating cellular NO decay. *J Biol Chem*. 2021; 296:100196. doi:10.1074/jbc.RA120.016394.
- Keppner A., Maric D., Correia M., Koay T. W., et al.: Lessons from the post-genomic era: Globin diversity beyond oxygen binding and transport. *Redox Biol*. 2020; 37:101687. doi:10.1016/j.redox.2020.101687.
- Kim H. R., Won S. J., Fabian C., Kang M. G., et al.: Mitochondrial DNA aberrations and pathophysiological implications in hematopoietic diseases, chronic inflammatory diseases, and cancers. *Ann Lab Med*. 2015; 35(1):1-14. doi:10.3343/alm.2015.35.1.1.
- Kim S. D., Kim M., Wu H. H., Jin B. K., et al.: Prunus cerasoides Extract and Its Component Compounds Upregulate Neuronal Neuroglobin Levels, Mediate Antioxidant Effects, and Ameliorate Functional Losses in the Mouse Model of Cerebral Ischemia. *Antioxidants (Basel)*. 2021; 11(1):99. doi:10.3390/antiox11010099.

- Kim Y., Kim M., Kim S. D., Yoon N., et al.: Distribution of Neuroglobin in Pericytes is Associated with Blood-Brain Barrier Leakage against Cerebral Ischemia in Mice. *Exp Neurol.* 2022; 31(5):289-298. doi:10.5607/en22001.
- Kosmachevskaya O. V., Topunov A. F.: Alternate and Additional Functions of Erythrocyte Hemoglobin. *Biochemistry (Mosc).* 2018; 83(12):1575-1593. doi:10.1134/S0006297918120155.
- Li C. Y., Jiang H. F., Li L., Lai X. J., et al.: Neuroglobin Facilitates Neuronal Oxygenation through Tropic Migration under Hypoxia or Anemia in Rat: How Does the Brain Breathe? *Neurosci Bull.* 2023; 39(10):1481-1496. doi:10.1007/s12264-023-01040-x.
- Li W., Wu Y., Ren C., Lu Y., et al.: The activity of recombinant human neuroglobin as an antioxidant and free radical scavenger. *Proteins.* 2011; 79(1):115-125. doi:10.1002/prot.22863.
- Li Y., Dai Y. B., Sun J. Y., Xiang Y., et al.: Neuroglobin Attenuates Beta Amyloid-Induced Apoptosis Through Inhibiting Caspases Activity by Activating PI3K/Akt Signaling Pathway. *J Mol Neurosci.* 2016; 58(1):28-38. doi:10.1007/s12031-015-0645-z.
- Liang X., Wen Y., Feng C., Xu L., et al.: Neuroglobin protects dopaminergic neurons in a Parkinson's cell model by interacting with mitochondrial complex NDUFA10. *Neuroscience.* 2024; 562:43-53. doi:10.1016/j.neuroscience.2024.10.033.
- Lüdemann J., Verissimo K. M., Dreger K., Fago A., et al.: Globin E is a myoglobin-related, respiratory protein highly expressed in lungfish oocytes. *Sci Rep.* 2019; 9(1):280. doi:10.1038/s41598-018-36592-w.
- Mannige R. V., Kundu J., Whitelam S.: The Ramachandran Number: An Order Parameter for Protein Geometry. *PLoS One.* 2016; 11(8):e0160023. doi:10.1371/journal.pone.0160023.
- Marengo-Rowe A. J.: Structure-function relations of human hemoglobins. *Proc (Bayl Univ Med Cent).* 2006; 19(3):239-245. doi:10.1080/08998280.2006.11928171.

- Milanese C., Tapias V., Gabriels S., Cerri S., et al.: Mitochondrial Complex I Reversible S-Nitrosation Improves Bioenergetics and Is Protective in Parkinson's Disease. *Antioxid Redox Signal*. 2018; 28(1):44-61. doi:10.1089/ars.2017.6992.
- Moschetti T., Mueller U., Schulze J., Brunori M., et al.: The structure of neuroglobin at high Xe and Kr pressure reveals partial conservation of globin internal cavities. *Biophys J*. 2009; 97(6):1700-1708. doi:10.1016/j.bpj.2009.05.059.
- Nehr-Majoros A., Karakai L., Payrits M., Bencze N., et al.: Cyclodextrins inhibit TRPV1 and TRPA1 activation-induced nociception via cholesterol depletion. *J Lipid Res*. 2025. doi:10.1016/j.jlr.2025.100844.
- Nuzzo M. T., Fiocchetti M., Totta P., Cardinale A., et al.: Huntingtin polyQ Mutation Impairs the 17 $\beta$ -Estradiol/Neuroglobin Pathway Devoted to Neuron Survival. *Mol Neurobiol*. 2017; 54(8):6634-6646. doi:10.1007/s12035-016-0337-x.
- Nürnberg B., Beer-Hammer S., Reisinger E., Leiss V.: Non-canonical G protein signaling. *Pharmacol Ther*. 2024; 255:108589. doi:10.1016/j.pharmthera.2024.108589.
- Oleksiewicz U., Daskoulidou N., Liloglou T., Tasopoulou K., et al.: Neuroglobin and myoglobin in non-small cell lung cancer: expression, regulation and prognosis. *Lung Cancer*. 2011; 74(3):411-418. doi:10.1016/j.lungcan.2011.05.001.
- Peinado M. Á., Ovelleiro D., Del Moral M. L., Hernández R., et al.: Biological Implications of a Stroke Therapy Based in Neuroglobin Hyaluronate Nanoparticles. Neuroprotective Role and Molecular Bases. *Int J Mol Sci*. 2021; 23(1):247. doi:10.3390/ijms23010247.
- Pesce A., Bolognesi M., Bocedi A., Ascenzi P., et al.: Neuroglobin and cytoglobin. Fresh blood for the vertebrate globin family. *EMBO Rep*. 2002; 3(12):1146–1151. doi:10.1093/embo-reports/kvf248.
- Pesce A., Dewilde S., Nardini M., Moens L., et al.: Human brain neuroglobin structure reveals a distinct mode of controlling oxygen affinity. *Structure*. 2003; 11(9):1087–1095. doi:10.1016/s0969-2126(03)00166-7.

Pittman R. N.: Regulation of Tissue Oxygenation. San Rafael (CA): Morgan & Claypool Life Sciences; 2011. Chapter 4, Oxygen Transport. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK54103/>.

Ramli Y., Rusdi F., Kurniawan M., Sadikin M., et al.: Outcome of Ischemic Stroke at Six Months with Neuroglobin as a Marker. *Innov Clin Neurosci*. 2024; 21(10):38–43.

Raychaudhuri S., Skommer J., Henty K., Birch N., et al.: Neuroglobin protects nerve cells from apoptosis by inhibiting the intrinsic pathway of cell death. *Apoptosis*. 2010; 15(4):401–411. doi:10.1007/s10495-009-0436-5.

Rout J., Swain B. C., Subadini S., Mishra P. P., et al.: Conformational dynamics of myoglobin in the presence of vitamin B12: A spectroscopic and in silico investigation. *Int J Biol Macromol*. 2021; 192:564-573. doi:10.1016/j.ijbiomac.2021.10.030

Sebastião A. M., Colino-Oliveira M., Assaife-Lopes N., Dias R. B., et al.: Lipid rafts, synaptic transmission and plasticity: impact in age-related neurodegenerative diseases. *Neuropharmacology*. 2013; 64:97–107. doi:10.1016/j.neuropharm.2012.06.053.

Selvaraj C., Vijayalakshmi P., Alex A. M., Alothaim A. S., et al.: Metalloproteins structural and functional insights into immunological patterns. *Adv Protein Chem Struct Biol*. 2024; 141:67-86. doi:10.1016/bs.apcsb.2024.03.009.

Semenova M. A., Bochkova Z. V., Smirnova O. M., Maksimov G. V., et al.: Charged Amino Acid Substitutions Affect Conformation of Neuroglobin and Cytochrome c Heme Groups. *Curr Issues Mol Biol*. 2024; 46(4):3364–3378. doi:10.3390/cimb4604021.

Shi S. Y., Feng X. M., Li Y., Li X., et al.: Expression of neuroglobin in ocular hypertension induced acute hypoxic-ischemic retinal injury in rats. *Int J Ophthalmol*. 2011; 4(4):393–395. doi:10.3980/j.issn.2222-3959.2011.04.14.

Söderberg L., Johannesson M., Nygren P., Laudon H., et al.: Lecanemab, Aducanumab, and Gantenerumab – Binding Profiles to Different Forms of Amyloid-Beta Might Explain Efficacy and Side Effects in Clinical Trials for Alzheimer's Disease. *Neurotherapeutics*. 2023; 20(1):195–206. doi:10.1007/s13311-022-01308-6.

- Stoffel E. M., Brand R. E., Goggins M.: Pancreatic Cancer: Changing Epidemiology and New Approaches to Risk Assessment, Early Detection, and Prevention. *Gastroenterology*. 2023; 164(5):752–765. doi:10.1053/j.gastro.2023.02.012.
- Sun Y., Jin K., Mao X. O., Zhu Y., et al.: Neuroglobin is up-regulated by and protects neurons from hypoxic-ischemic injury. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001; 98(26):15306–15311. doi:10.1073/pnas.251466698.
- Takahashi N., Wakasugi K.: Identification of residues crucial for the interaction between human neuroglobin and the  $\alpha$ -subunit of heterotrimeric G<sub>i</sub> protein. *Sci Rep*. 2016; 6:24948. doi:10.1038/srep24948.
- Tiwari P. B., Chapagain P. P., Üren A.: Investigating molecular interactions between oxidized neuroglobin and cytochrome c. *Sci Rep* 2018; 10557. doi:10.1038/s41598-018-28836-6.
- Wakasugi K., Nakano T., Morishima I.: Oxidized human neuroglobin acts as a heterotrimeric Galpha protein guanine nucleotide dissociation inhibitor. *J Biol Chem*. 2003; 278(38):36505–36512. doi:10.1074/jbc.M305519200.
- Wu D., An Q., Ji H., Dai J., et al.: Retinal ischemia-reperfusion injury induces intense lipid synthesis and remodeling. *Biochem Biophys Res Commun*. 2023; 689:149232. doi:10.1016/j.bbrc.2023.149232.
- Wu F., He J., Deng Q., Chen J., et al.: Neuroglobin inhibits pancreatic cancer proliferation and metastasis by targeting the GNAI1/EGFR/AKT/ERK signaling axis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2023; 664:108–116. doi:10.1016/j.bbrc.2023.04.080.
- Xiang Q., Zhou D., Xiang X., Le X., et al.: Neuroglobin plays as tumor suppressor by disrupting the stability of GPR35 in colorectal cancer. *Clin Epigenetics*. 2023; 15(1):57. doi:10.1186/s13148-023-01472-2.
- Xiong X. X., Pan F., Chen R. Q., Hu D. X., et al.: Neuroglobin boosts axon regeneration during ischemic reperfusion via p38 binding and activation depending on oxygen signal. *Cell Death Dis*. 2018; 9(2):163. doi:10.1038/s41419-017-0260-8.

Xue F., Jiang J., Kou J.: Screening of key genes related to ferroptosis and a molecular interaction network analysis in colorectal cancer using machine learning and bioinformatics. *J Gastrointest Oncol.* 2023; 14(3):1346–1359. doi:10.21037/jgo-23-405.

Yu Z., Zhang Y., Liu N., Yuan J., et al.: Roles of Neuroglobin Binding to Mitochondrial Complex III Subunit Cytochrome c1 in Oxygen-Glucose Deprivation-Induced Neurotoxicity in Primary Neurons. *Mol Neurobiol.* 2016; 53(5):3249–3257. doi:10.1007/s12035-015-9273-4.

Zhang B., Chang M., Wang J., Liu Y.: Neuroglobin functions as a prognostic marker and promotes the tumor growth of glioma via suppressing apoptosis. *Biomed Pharmacother.* 2017; 88:173–180. doi:10.1016/j.biopha.2017.01.029.

Zhang J., Lan S. J., Liu Q. R., Liu J. M., et al.: Neuroglobin, a novel intracellular hexa-coordinated globin, functions as a tumor suppressor in hepatocellular carcinoma via Raf/MAPK/Erk. *Mol Pharmacol.* 2013; 83(5):1109–1119. doi:10.1124/mol.112.083634.

Zhang L., Xu J., Zhou S., Yao F., et al.: Endothelial DGKG promotes tumor angiogenesis and immune evasion in hepatocellular carcinoma. *J Hepatol.* 2024; 80(1):82–98. doi:10.1016/j.jhep.2023.10.006.

Zhou J., Tu D., Peng R., Tang Y., et al.: RNF173 suppresses RAF/MEK/ERK signaling to regulate invasion and metastasis via GRB2 ubiquitination in Hepatocellular Carcinoma. *Cell Commun Signal.* 2023; 21(1):224. doi:10.1186/s12964-023-01241-x.

Zhou J., Zhao T., Ma L., Liang M., et al.: Cucurbitacin B and SCH772984 exhibit synergistic anti-pancreatic cancer activities by suppressing EGFR, PI3K/Akt/mTOR, STAT3 and ERK signaling. *Oncotarget.* 2017; 8(61):103167–103181. doi:10.18632/oncotarget.21704.