

Häm-Protein-Interaktionen

Häm-Interaktionen an der Schnittstelle zwischen SARS-CoV-2 und Wirtszelle

MARIE-T. HOPP,¹ DIANA IMHOF²

¹INSTITUT FÜR INTEGRIERTE NATURWISSENSCHAFTEN, UNIVERSITÄT KOBLENZ

²PHARMAZEUTISCHE BIOCHEMIE UND BIOANALYTIK, UNIVERSITÄT BONN

A link between COVID-19 and heme-driven pathophysiology was recognized early due to SARS-CoV-2-induced autoimmune reactions leading to hemolysis. The accumulating heme has been shown to trigger inflammation and thrombosis. Moreover, heme-binding motifs were identified in the viral spike glycoprotein and protein 7a as well as in the host protein ACE2. Biophysical and *in silico* studies confirmed heme binding to these proteins, emphasizing the potential relevance of hemolysis in COVID-19.

DOI: 10.1007/s12268-023-2025-5

© Die Autorinnen 2023

■ Hämoglobinopathien (z. B. Sichelzellerkrankheit), paroxysmale nächtliche Hämoglobinurie, Favismus sowie Transfusionsreaktionen sind nur einige Beispiele für Ereignisse, die mit intravaskulärer Hämolyse einhergehen können. Aus den Erythrozyten in das Blutplasma freigesetztes Hämoglobin wird im Zuge dessen zu Globinen und Häm abgebaut, sofern die Kapazität des Hämoglobin-bindenden Haptoglobins gesättigt ist. Das freigesetzte Häm sollte ebenfalls abgefangen werden, wofür das Protein Hämopexin verantwortlich ist, dessen Plasmakonzentration jedoch unter hämolytischen Bedingungen nicht für die vollständige Beseitigung des überschüssigen Häms ausreicht. Auch andere Häm-abfangende Mechanismen werden bei starker intravaskulärer Hämolyse überwältigt, sodass Häm im Blutplasma akkumuliert. Dieses labile, bioverfügbare Häm ist für seine proinflammatorischen und gerinnungsfördernden Eigenschaften seit langem bekannt, wobei diese Effekte durch die Interaktion mit Proteinen hervorgerufen werden, deren Funktion in Folge der Hämbindung beeinflusst wird [1–3]. Dies konnte beispielsweise bereits für diverse Komplement- [1] und Gerinnungsproteinen [2, 4] gezeigt werden.

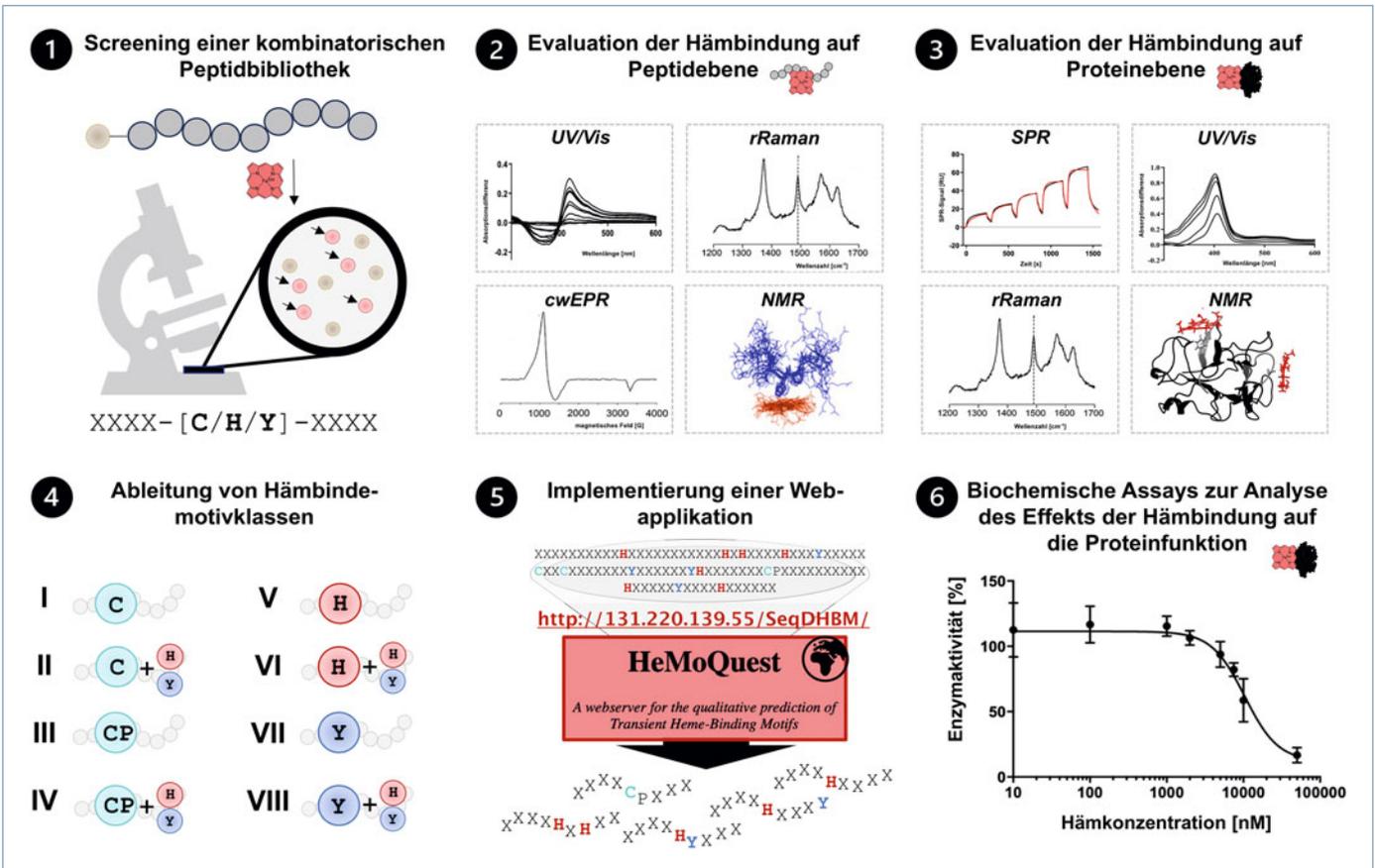
Voraussetzung für transiente Häm-Protein-Interaktionen

Auf molekularer Ebene waren die Grundlagen der Häm-Protein-Assoziation noch vor ca. 15 Jahren weitgehend unbekannt. Mithilfe chemischer, biochemischer und biophysikalischer Methoden konnten jedoch die Erkennungsmerkmale auf den Proteinoberflächen für die Hämbindung sukzessiv aufgeklärt werden (**Abb. 1**, [5–7]). Fe(II/III)-Häm bindet dabei über eine koordinative Bindung als axialer Ligand an Proteine. Dies wird insbesondere über Aminosäuren mit Heteroatomen (z. B. Cys, His, Tyr) realisiert und beträchtlich durch die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen, elektrostatischen und Van-der-Waals-Wechselwirkungen mit dem Protoporphyrin-IX-Ringsystem unterstützt, wie die Cys-, His- und Tyr-basierten Konsensussequenzen und die entsprechenden Strukturuntersuchungen zeigten (**Abb. 1**, [5–7]). Eine effiziente Bindung von Häm an solche Motive ist charakterisiert durch Affinitäten im niedrigen mikro- bis nanomolaren Bereich, wobei CP- sowie kombinierte H/Y-basierte Sequenzen häufig die höchste Affinität gegenüber Häm aufwiesen [5–7]. Diese Erkenntnisse führten zur Entwicklung einer Webapplikation („HeMoQuest“), die uns heute die Vorhersage von Häm-bindenden/-regulatorischen Moti-

ven (HBM/HRM) in Proteinen anhand der Aminosäuresequenz und Strukturevaluation erlaubt (**Abb. 1**, [5, 8]).

Häm und virale Infektionen: ein komorbider Zusammenhang

Im Zuge der SARS-CoV-2-verursachten Pandemie rückten Untersuchungen zur Interaktion von Häm mit Virusbestandteilen wieder verstärkt in den Fokus. So war beispielsweise bereits bekannt, dass Zika-, Chikungunya- und Dengue-Viren mit Häm wechselwirken können [9, 10]. Von solchen Viren verursachte Ausbrüche werden immer intensiver untersucht, wobei auch Begleiterkrankungen der Patient:innen mehr und mehr berücksichtigt werden, um die Entwicklung der Infektion und daraus resultierender Folgeerkrankungen besser einschätzen zu können. In diesem Kontext erschienen erste Berichte, die das Auftreten von hämolytischen Ereignissen im Zusammenhang mit oder als Folge von SARS-CoV-2-Infektionen beschrieben, überaus interessant. Für die Analyse von derartigen Komorbiditäten hat sich die Anwendung von Wissensgraphen als bioinformatisches Tool bewährt. So wurde 2019 auch für die Häm-induzierten Effekte in hämolytischen Erkrankungen ein solcher Wissensgraph, „HemeKG“, erstellt, indem erstmalig aus der Literatur bekannte Wechselwirkungen und Kausalitäten dargestellt wurden [3]. Hier konnten insbesondere Rückschlüsse auf die durch Häm ausgelösten, entzündlichen Reaktionen dargestellt werden [3]. Auch für die durch eine SARS-CoV-2-Infektion induzierten Effekte wurden Wissensgraphen erarbeitet, was den direkten Vergleich der Biomarker von hämolytischen bzw. Häm-induzierten Krankheitserscheinungen und der Pathophysiologie von COVID-19 ermöglichte [11]. Auf diese Weise zeigten sich neben den Hämolyse-Biomarkern Lactat-Dehydrogenase (LDH) und Bilirubin auch Gemeinsamkeiten bei Entzündungs- und Gerinnungsparametern (**Abb. 2**). Dies erlaubte einen Rückschluss darauf, dass Patient:innen mit hämolytischen Vorerkrankungen möglicherweise empfänglicher für



▲ **Abb 1:** Workflow zur biochemischen und biophysikalischen Analyse der Anforderungen an Häm-bindemotive (HBMs) in Proteinen: Mithilfe einer kombinatorischen Peptidbibliothek werden Häm-bindende Sequenzen identifiziert (1), die anschließend mit spektroskopischen Methoden auf ihre Häm-bindekapazität überprüft werden (2). Proteine, die solche HBMs enthalten, werden mit biophysikalischen Methoden auf ihre Fähigkeit zur Hämbindung evaluiert (3). Die Analyse von mehreren hundert Peptidsequenzen ermöglicht die Klassifizierung der HBMs anhand der Eisenion-koordinierenden Aminosäure (C, H, Y) und benachbarter Reste, die mit dem Protoporphyrinring interagieren (4). Die Fülle an experimentellen Daten erlaubt die Etablierung eines Suchalgorithmus zur Auffindung von HBMs in Proteinen, dessen Zugänglichkeit über die Implementierung der Webapplikation „HeMoQuest“ [8] (5) ermöglicht wurde. Der Effekt der Hämbindung auf Proteine wird schließlich in funktionellen Tests untersucht (6).

einen schweren Verlauf von COVID-19 sein könnten, und das Auftreten von hämolytischen Ereignissen im Rahmen von SARS-CoV-2-Infektionen die Entzündungs- und prothrombotischen Prozesse weiter anfachen könnte. Diese Erkenntnisse verdeutlichten die Bedeutung der Berücksichtigung von hämolytischen Vorerkrankungen und/oder SARS-CoV-2-induzierter Hämolyse im Verlauf von COVID-19.

Virale und Wirtszellproteine als Häm-Interaktionspartner

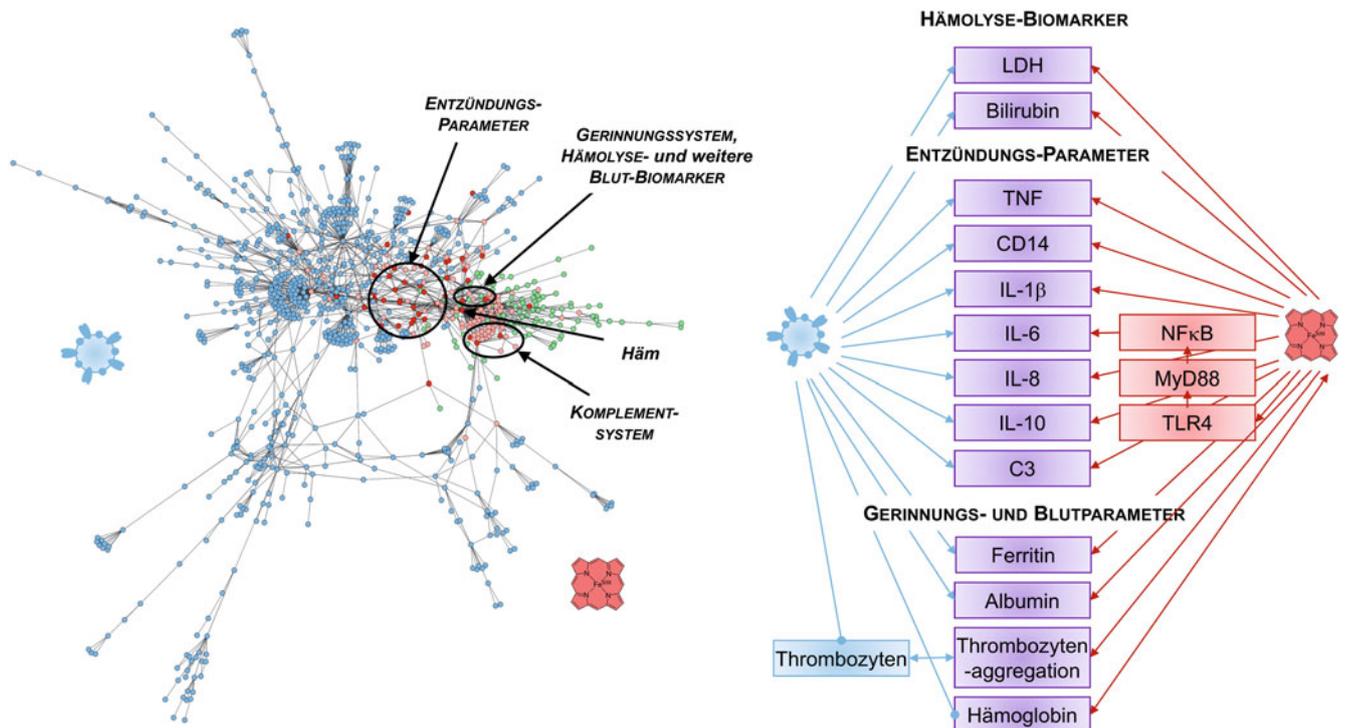
Das Auftreten von SARS-CoV-2-induzierter Hämolyse als Folge von Autoimmunreaktionen brachte auch die Möglichkeit von Häm-Protein-Interaktion im Kontext von SARS-CoV-2-Infektionen auf. So wurden mithilfe von „HeMoQuest“ die Primärsequenzen der an der Virusoberfläche exponierten Proteine und der humane Wirtszellrezeptor ACE2 auf potenzielle HBMs analysiert, wodurch eine Auswahl an potenziell Häm-bindenden Pro-

teinen an der Schnittstelle von SARS-CoV-2 und humanen Wirtszellen vorhergesagt wurden (**Abb. 3A**, [11]). Um die Qualität der potenziellen HBMs weiter einzuschätzen, wurden diese als Protein-abgeleitete Peptide synthetisiert und ihr Hämbindeverhalten mithilfe von UV/Vis-spektroskopischen Interaktionsstudien untersucht (**Abb. 3A**). Hierbei wurden für das virale Spike-Glykoprotein und das akzessorische Protein 7a sowie für das humane ACE2 je ein hoch affines HBM und weitere moderat bindende Motive identifiziert [11]. Die anschließende Analyse der Hämbindung auf Proteinebene erfolgte mittels Oberflächenplasmonenresonanz (SPR)-Spektroskopie und molekularen Docking- und Simulationsstudien [12]. Aufgrund mangelnder Verfügbarkeit wurde die Ektodomäne von Protein 7a zunächst mittels Festphasenpeptidsynthese und Pufferoxidation synthetisiert. Die anschließenden SPR-Studien charakterisierten Protein 7a als transient Häm-bindendes Protein, was sich

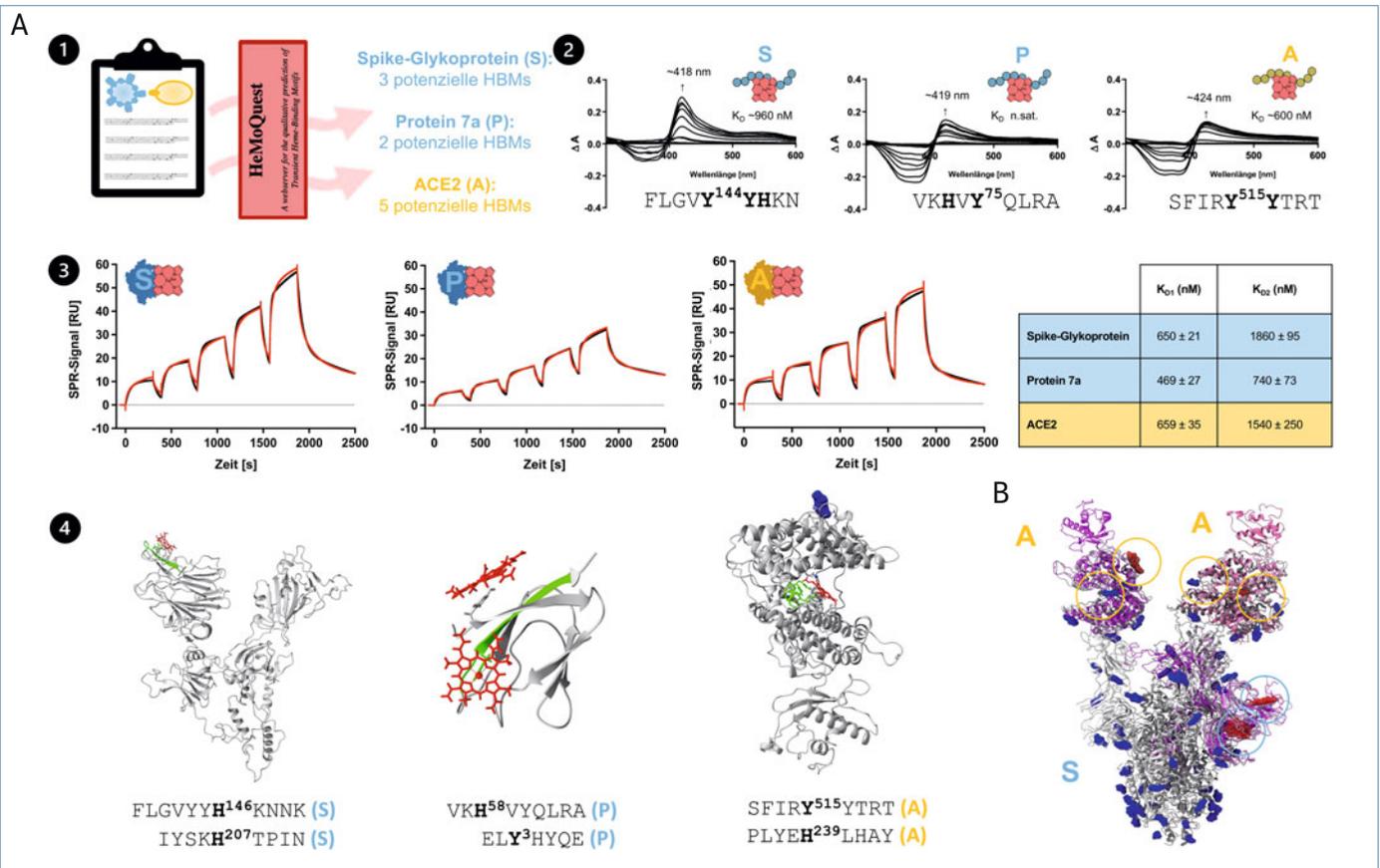
durch schnelle Assoziations- und Dissoziationskonstanten und eine Bindungsaffinität im nanomolaren Bereich ($K_{D1} \sim 469$ nM, $K_{D2} \sim 740$ nM) zeigte [12]. Das beobachtete biphasische und heterogene Hämbindeverhalten war im Einklang mit dem zuvor identifizierten hochaffinen HBM (H^{58}/Y^{60}) und einer weiteren, unspezifischen Bindungsstelle (Y^3), die bei *in silico*-Studien beobachtet wurde. Ein vergleichbares Hämbindeverhalten wurde auch für das virale Spike-Glykoprotein ($K_{D1} \sim 650$ nM, $K_{D2} \sim 1,86$ μ M) und das humane ACE2 ($K_{D1} \sim 659$ nM, $K_{D2} \sim 1,54$ μ M) beobachtet [12]. Auch hier deckte sich das beobachtete biphasische Bindungsverhalten mit den zuvor identifizierten und durch *in silico*-Studien bestätigten HBMs (**Abb. 3A**).

Fazit und Ausblick

Die physiologische Relevanz von Häm im Zuge von SARS-CoV-2-Infektionen, sei es durch bereits vorliegende oder viral autoimmun erzeugte hämolytische Ereignisse,



▲ **Abb 2:** Strukturierung und semantische Verknüpfung der experimentellen Daten in Wissensgraphen. **A,** Die Superimposition des Häm-Netzwerks „HemeKG“ mit dem COVID-19-Wissensgraph [11] verdeutlicht gemeinsame Biomarker von hämolytischen Erkrankungen und COVID-19. **B,** Beide Pathophysiologien zeigen Überschneidungen (violett) in diversen Hämolyse-, Entzündungs-, Gerinnungs- und Blut-Biomarkern [11]. Modifiziert nach [11].



▲ **Abb 3:** Evaluation der Hämbindung an SARS-CoV-2-Proteine und ACE2. **A,** Vorhersage von HBMs (1), deren Analyse mit UV/Vis-Spektroskopie (2), Charakterisierung der Interaktionen mit SPR-Spektroskopie (3) und *in silico*-Studien (4). **B,** Die HBMs im Spike-Glykoprotein und ACE2 befinden sich nicht an der Virus-Wirtszell-Schnittstelle. Angelehnt an [12].

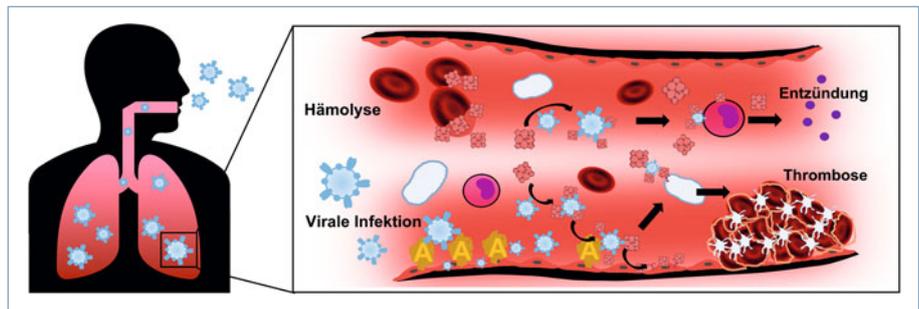
sollte auf Grundlage der beobachteten, gemeinsamen Biomarker sowie der potenziell möglichen Häm-Protein-Wechselwirkungen an der Schnittstelle der Virus-Wirtszell-Interaktion in Betracht gezogen und berücksichtigt werden. Obwohl die Häm-Bindungsstellen des viralen Spike-Glykoproteins und des humanen Rezeptors ACE2 nicht an der direkten Schnittstelle der beiden Proteine zu finden sind (**Abb. 3B**), könnte die Häm-Bindung an beide Proteine die virale Aufnahme in die Wirtszelle beeinflussen, was die früher beobachtete Replikationsunterdrückung von SARS-CoV-2 in Gegenwart von Häm erklären könnte. Darüber hinaus wäre es denkbar, dass das Virus über das Spike-Glykoprotein und Protein 7a Häm bindet und auf Immunzellen übertragen kann, was auch für aus Erythrozyten stammende Mikrovesikel bereits bekannt ist und dort zu einer gesteigerten Aktivierung des Toll-like-Rezeptors 4 führt, was in COVID-19 die Entzündungsprozesse steigern könnte (**Abb. 4**). Jedoch müssen weitere *ex vitro*- und *in vivo*-Untersuchungen erfolgen, um die physiologische Relevanz der beobachteten Häm-Protein-Interaktionen zu charakterisieren.

Danksagung

Wir bedanken uns bei der Deutschen Forschungsgemeinschaft (D.I.) und der Universität Bonn (Argelander Stipendium an M.-T.H. und STEP 4 Programm an D.I.) für die finanzielle Unterstützung. ■

Literatur

- [1] Hopp MT, Imhof D (2021) Linking labile heme with thrombosis. *J Clin Med* 10: 427
- [2] Roumenina LT, Rayes J, Lacroix-Desmazes S et al. (2016) Heme: Modulator of plasma systems in hemolytic diseases. *Trends Mol Med* 22: 200–213
- [3] Humayun F, Domingo-Fernández D, Paul George AA et al. (2019) A computational approach for mapping heme biology in the context of hemolytic disorders. *Front Bioeng Biotechnol* 8: 74
- [4] Hopp MT, Alhanafi N, Paul George AA et al. (2021) Molecular insights and functional consequences of the interaction of heme with activated protein C. *Antioxid Redox Signal* 34: 32–48
- [5] Wißbrock A, Paul George AA, Brewitz HH et al. (2019) The molecular basis of transient heme-protein interactions: Analysis, concept and implementation. *Bioscience Rep* 39: BSR20181940
- [6] Syllwasschy BF, Beck MS, Družeta I et al. (2020) High-affinity binding and catalytic activity of His/Tyr-based sequences: Extending heme-regulatory motifs beyond CP. *Biochim Biophys Acta – Gen Subj* 1864: 129703



▲ **Abb 4:** Nach einer SARS-CoV-2-Infektion kann es bei Hämolyse-Patient:innen zu Folgeereignissen kommen, die thrombotische und inflammatorische Ereignisse verstärken, z. B. durch die Aktivierung von TLR4-Signalen durch Interaktion des Rezeptors mit Häm und dem Spike-Glykoprotein. Darüber hinaus könnte SARS-CoV-2 als Shuttle für den Häm-Transfer zu Gefäßzellen dienen. Angelehnt an [12].

- [7] Rathod DC, Vaidya S, Hopp MT et al. (2023) Shapes and patterns of heme-binding motifs in mammalian heme-binding proteins. *Biomolecules* 13: 1031.
- [8] Paul George AA, Lacerda M, Syllwasschy BF et al. (2020) HeMoQuest: A webserver for qualitative prediction of transient heme binding to protein motifs. *BMC Bioinformatics* 21: 124
- [9] Assunção-Miranda I, Cruz-Oliveira C, Neris RLS et al. (2016) Inactivation of Dengue and Yellow Fever viruses by heme, cobalt-protoporphyrin IX and tin-protoporphyrin IX. *J Appl Microbiol* 120: 790–804
- [10] Neris RLS, Figueiredo CM, Higa LM et al. (2018) Co-protoporphyrin IX and Sn-protoporphyrin IX inactivate Zika, Chikungunya and other arboviruses by targeting the viral envelope. *Sci Rep* 8: 9805
- [11] Hopp MT, Domingo-Fernández D, Gadiya Y et al. (2021) Linking COVID-19 and heme-driven pathophysiologicals: A combined computational-experimental approach. *Biomolecules* 11: 644
- [12] Hopp MT, Rathod DC, Imhof D (2022) Host and viral proteins involved in SARS-CoV-2 infection differentially bind heme. *Protein Sci* 31: e4451

Funding note: Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL.
Open Access: Dieser Artikel wird unter der Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz veröffentlicht, welche die Nutzung, Vervielfältigung, Bearbeitung, Verbreitung und Wiedergabe in jeglichem Medium und Format erlaubt, sofern Sie den/die ursprünglichen Autor(en) und die Quelle ordnungsgemäß nennen, einen Link zur Creative Commons Lizenz beifügen und angeben, ob Änderungen vorgenommen wurden. Die in diesem Artikel enthaltenen Bilder und sonstiges Drittmaterial unterliegen ebenfalls der genannten Creative Commons Lizenz, sofern sich aus der Abbildungslegende nichts anderes ergibt. Sofern das betreffende Material nicht unter der genannten Creative Commons Lizenz steht und die betreffende Handlung nicht nach gesetzlichen Vorschriften erlaubt ist, ist für die oben aufgeführten Weiterverwendungen des Materials die Einwilligung des jeweiligen Rechteinhabers einzuholen. Weitere Details zur Lizenz entnehmen Sie bitte der Lizenzinformation auf <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.de>.

Korrespondenzadresse:

Prof. Dr. Diana Imhof
 Pharmazeutische Biochemie und Bioanalytik
 Pharmazeutisches Institut
 Universität Bonn
 An der Immenburg 4
 D-53121 Bonn
 dimhof@uni-bonn.de

AUTORINNEN



Marie-T. Hopp

2012–2017 Studium der Chemie und Biologie an der Universität Koblenz-Landau, anschließende Promotion bis 2021 an der Universität Bonn. 2021–2023 PostDoc an der Universität Bonn. Seit 2023 Juniorprofessorin in der Abteilung Chemie am Institut für Integrierte Naturwissenschaften der Universität Koblenz.



Diana Imhof

1990–1996 Chemie- und Biologiestudium an den Universitäten Jena und Dublin, Irland. Promotion bis 1999 in Jena. Von 1999–2005 PostDoc an den Universitätskliniken Leipzig und Jena sowie an der Ohio State University, Columbus, USA. 2005 Wechsel an das Zentrum für Molekulare Biomedizin der Universität Jena und Leitung einer Nachwuchsgruppe. 2011–2016 W2-Professorin am Pharmazeutischen Institut der Universität Bonn, dort seit 2016 als W3-Professorin.